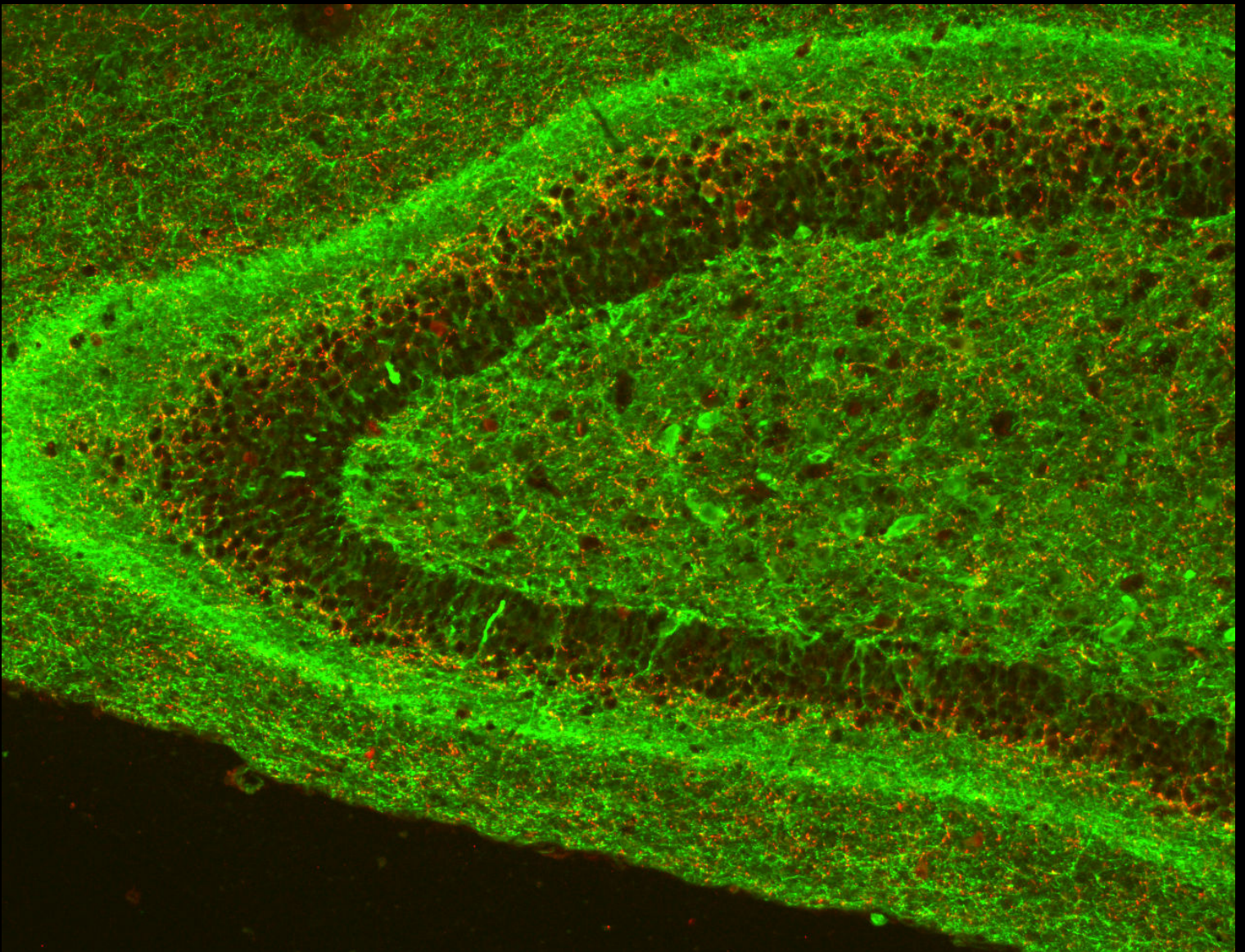




KATARZYNA DOMEK-ŁOPACIŃSKA

**Tlenek azotu i cykliczny GMP w
dojrzewaniu układu cholinergicznego
mózgu oraz w mechanizmach
poznawczych w procesie starzenia.**



Praca doktorska wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Joanny B. Strosznajder

Warszawa 2008

Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane:

- „Nitric oxide-induced cGMP synthesis in the cholinergic system during the development and aging of the rat brain” **K. Domek-Łopacińska**, M. van de Waarenburg, M. Markerink-van Ittersum, H.W.M. Steinbusch, J. de Vente, *Brain Res Dev Brain Res.* 2005, 158, 72-81.
- „Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology” **K. Domek-Łopacińska** & J.B. Strosznajder, *J. Physiology and Pharmacology* 2005, 56, Supp 2, 15-34
- “The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging” **K. Domek-Łopacińska** & J. B. Strosznajder, 2007 (*Brain Res* 2008; praca w druku)

Badania sfinansowano z grantu MNiSW N401 032 31/0642.

Serdecznie dziękuję Promotorowi niniejszej pracy, Pani Profesor Joannie Strosznajder, za życzliwość, pomoc, wsparcie i cenne wskazówki udzielone w trakcie pisania rozprawy oraz opiekę naukową podczas całego okresu pracy.

Dziękuję bardzo Doktorowi Janowi De Vente, mojemu Opiekunowi podczas pracy na Uniwersytecie w Maastricht oraz Koleżankom i Kolegom z laboratorium w Holandii, za pomoc i serdeczną atmosferę pracy.

Chciałabym podziękować także Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału za miłą atmosferę pracy, wsparcie i inspirujące dyskusje podczas powstawania tej rozprawy.

Szczególne podziękowania chciałam skierować do Moniki Kamińskiej, która pomogła mi w bardzo wielu sytuacjach i w dużej mierze przyczyniła się do powodzenia doświadczeń przeprowadzonych na potrzeby tej pracy.

Dziękuję serdecznie Pani Doktor Hannie Kozłowskiej za pomoc w analizie preparatów w mikroskopie konfokalnym.

Katarzyna Domek-Łopacińska

Pracę tę chciałabym zadedykować Mojemu Kochanemu Mężowi, jako wyraz wielkiego uznania za pomoc, motywację i dodawanie mi wiary we własne siły podczas jej powstawania, Mojej Córcie dzięki której przekonałam się, że nie ma rzeczy niemożliwych oraz Moim Wspaniałym Rodzicom, dzięki którym jestem dzisiaj tym, kim jestem i Mojemu Bratu, który jako jedyny wysłuchał dzielnie i ze zrozumieniem całego wstępu i zasnął dopiero w połowie wyników. Dziękuję.

Spis treści

Wykaz stosowanych w pracy skrótów	11
1. Wstęp	13
1.1. Rola tlenu azotu i cyklicznego GMP w przekazywaniu sygnału w mózgu	13
1.1.1. Synteza tlenu azotu	13
1.1.2. Synteza cGMP	17
1.1.3. Przekazywanie sygnału przez cGMP w komórce	20
1.1.3.1. Kinaza białkowa zależna od cGMP (PKG)	21
1.1.3.2. Kanały jonowe regulowane cyklicznymi nukleotydami	24
1.1.3.3. Transportery cyklicznych nukleotydów	25
1.1.3.4. Fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów	26
1.1.3.4.1. Budowa fosfodiesteraz	30
1.1.3.4.2. Inhibitory fosfodiesteraz	31
1.2. Wpływ starzenia na ścieżkę sygnałową NO/cGMP w mózgu	34
1.2.1. Wpływ starzenia na ekspresję i aktywność NOS	34
1.2.2. Ekspresja i aktywność sGC i PDE oraz poziom cGMP podczas starzenia się mózgu	35
1.3. Układ cholinergiczny, glutaminianergiczny, pamięć i cGMP	36
1.3.1. Modyfikacja ścieżki sygnałowej NO/cGMP w badaniach procesów uczenia się i pamięci	41
2. Założenia i cele pracy	45
3. Materiały i metody	47
3.1. Materiał doświadczalny	47
3.2. Charakterystyka inhibitorów fosfodiesteraz oraz nNOS	48
3.3. Badania <i>in vitro</i>	50
3.3.1. Metody radiochemiczne	50
3.3.1.1. Pomiar aktywności NOS	50
3.3.2. Metody immunohistochemiczne	51

3.3.2.1. Badanie poziomu immunoreaktywności cGMP w skrawkach mózgu	51
3.3.2.1.1. Przygotowanie skrawków i znakowanie przeciwciałami	51
3.3.2.1.2. Analiza w mikroskopie i liczenie komórek	52
3.3.3. Metody analizy ekspresji genów	53
3.3.3.1. Badanie poziomu mRNA dla fosfodiesteraz cGMP (PDE2, PDE5 i PDE9) metodą hybrydyzacji <i>in situ</i>	53
3.4. Badania <i>in vivo</i>	56
3.4.1. Farmakologiczna modyfikacja zdolności poznawczych szczurów	56
3.4.1.1. Podskórne podawanie inhibitorów PDE2 i PDE5	56
3.4.1.2. Podskórne podawanie inhibitora nNOS	56
3.4.2. Metody behawioralne	57
3.4.2.1. Test pamięci rozpoznawczej	57
3.4.2.2. Test otwartego pola	58
3.5. Opracowanie statystyczne wyników	59
4. Wyniki	61
4.1. Zmiany poziomu immunoreaktywności cGMP w mózgach szczurów podczas dojrzewania i starzenia	61
4.2. Wpływ stymulacji receptorów cholinergicznym na poziom immunoreaktywności cGMP w układzie cholinergicznym mózgu	73
4.3. Wpływ selektywnych inhibitorów fosfodiesteraz 2 i 5 na poziom immunoreaktywności cGMP w mózgach szczurów dorosłych i starych	74
4.4. Zmiany ekspresji PDE2, PDE5 i PDE9 w mózgach szczurów dorosłych i starych	79
4.5. Wpływ zahamowania PDE2 oraz PDE5 na pamięć rozpoznawczą zwierząt podczas starzenia	81
4.5.1. Wpływ selektywnych inhibitorów PDE2, Bay 60-7550 oraz PDE5 zaprinastu, na pamięć rozpoznawczą szczurów 3 miesięcznych (dorosłych)	82
4.5.2. Wpływ selektywnych inhibitorów PDE2, Bay 60-7550 oraz PDE5 zaprinastu, na pamięć rozpoznawczą szczurów 12 miesięcznych	84
4.5.3. Wpływ selektywnych inhibitorów PDE2, Bay 60-7550 ; PDE5 zaprinastu, oraz inhibitora nNOS, NAAN na pamięć rozpoznawczą szczurów 24 miesięcznych (starych)	85

4.5.4. Ocena wpływu selektywnych inhibitorów PDE2 oraz PDE5 na zdolności poznawcze szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych	86
4.6. Wpływ zahamowania PDE2 oraz PDE5 <i>in vivo</i> na aktywność podstawową NOS w mózgu podczas starzenia	87
5. Dyskusja	93
6. Podsumowanie i wnioski	109
7. Streszczenie	111
8. Bibliografia	115

Wykaz stosowanych w pracy skrótów

AC	cyklaza adenylanowa
AMP	adenozynomonofosforan
ATP	3,5- adenzynotryfosforan
cGMP	cykliczny guanozynomonofosforan
CNG	kanały jonowe bramkowane cyklicznymi nukleotydami (ang. cyclic nucleotides gated ion channels)
DMSO	dimetylosulfotlenek
eNOS	śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (ang. endothelial nitric oxide synthase)
EDTA	kwasi etylenodiaminotetraoctowy
GC	cyklaza guanylanowa
GMP	guanozynomonofosforan
GTP	guanozynotryfosforan
IBMX	3-izobutylo-1,1-metylenoksyantyna
iNOS	indukowana syntaza tlenku azotu (ang. inducible nitric oxide synthase)
IR-cGMP	immunoreaktywność cGMP
LTD	długotrwała depresja synaptyczna (ang. long term depression)
LTP	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. long term potentiation)
MRP	białko odporności wielolekowej (ang. multidrug resistance protein)

NAAN	(4S)-N-(4-Amino 5[aminoety]aminopentyl)-N'-nitroguanidina (nNOS Inhibitor I Calbiochem)
NMDA	N-metylo-D-asparaginian
nNOS	neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. neuronal nitric oxide synthase)
NOS	syntaza tlenku azotu
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	bufor fosforanowy
pGC	błonowa izoforma cyklazy guanylanowej
PDE	fosfodiesteraza (y)
PFA	paraformaldehyd
pGC	błonowa cyklaza guanylanowa
PKA	kinaza białkowa zależna od cAMP
PKG	kinaza białkowa zależna od cGMP
SD	błąd standardowy
SEM	błąd standardowy średniej
sGC	rozpuszczalna (cytozolowa) cyklaza guanylanowa
TBS	bufor TRIS o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl i pH 7,6
vAChT	(ang. vesicular acetylcholine transporter) pęcherzykowy transporter acetylocholiny

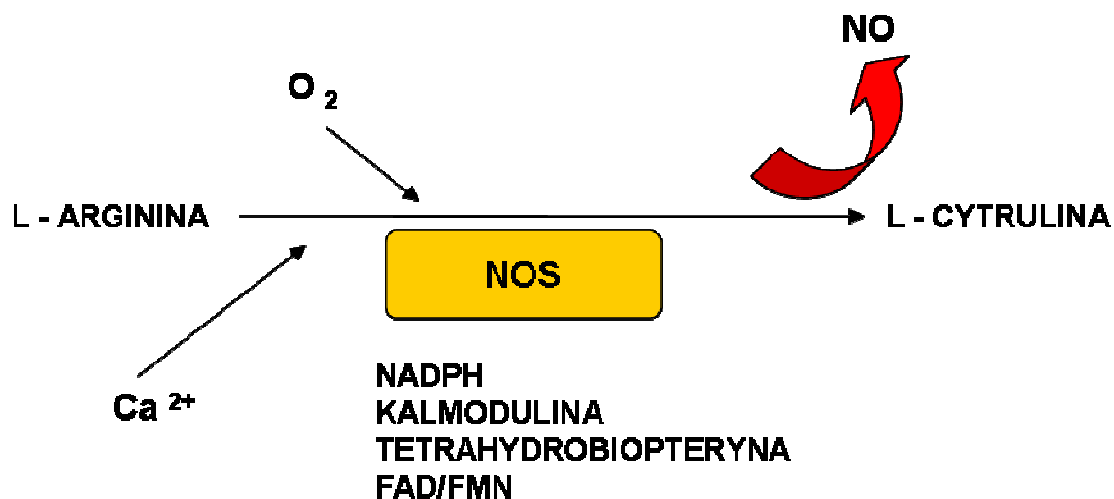
1.Wstęp

1.1. Rola tlenu azotu i cyklicznego GMP w przekazywaniu sygnału w mózgu

Transdukcja sygnału jest procesem leżącym u podstaw istnienia organizmów żywych. Na proces ten składa się odebranie i rozpoznanie sygnałów przez odpowiednie komórki a następnie wytworzenie prawidłowych odpowiedzi. Ośrodkowy układ nerwowy jest miejscem koordynującym transdukcję sygnałów, swoistym centrum odbierania i przekazywania informacji, dzięki któremu funkcjonuje cały organizm. Tlenek azotu (NO) należy do nielicznej grupy gazowych neuromediatorów, zaliczany jest również do grupy przekaźników zwrotnych przekazujących informacje z części post do presynaptycznych zakończeń nerwowych [Garthwaite i wsp., 1988]. Rolę receptora NO w mózgu pełni rozpuszczalna izoforma cyklicznej guanylanowej (sGC). W warunkach fizjologicznych NO jest uwalniany głównie w wyniku pobudzenia receptorów NMDA, dyfunduje do otaczających komórek, w których aktywuje procesy transdukcji sygnału oraz przekazuje informacje do części presynaptycznej, gdzie aktywuje sGC. Cykliczna guanylanowa syntetyzuje cGMP, co stymuluje między innymi kinazę białkową PKG zależną od cGMP i prowadzi do uwalniania neurotransmiterów.

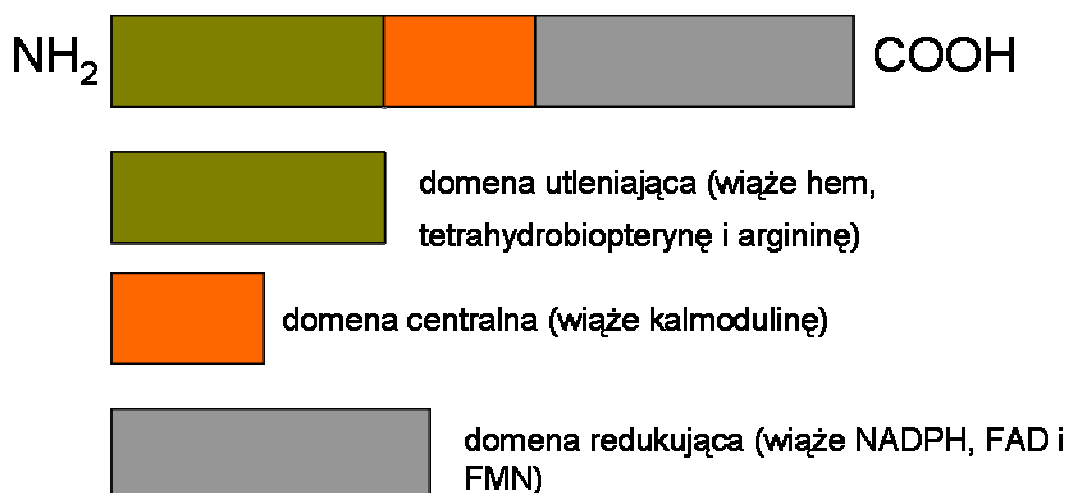
1.1.1. Synteza tlenu azotu

Enzymem syntetyzującym NO jest syntaza tlenu azotu (Nitric Oxide Synthase, NOS; E.C. 1.14.13.39), homodimeryczne białko cytoplazmatyczne, którego aktywność jest zależna od stężenia jonów wapnia i kalmoduliny, niezbędnym kofaktorem dla NOS są również NADPH, FAD i FMN. W tkance nerwowej NOS syntetyzuje NO z L – argininy w obecności tlenu, związkami powstającym w tej reakcji w stosunku stechiometrycznym z NO jest cytrulina [Knowles i wsp., 1989; Bredt i Snyder, 1990]. Reakcję katalizowaną przez NOS przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Reakcja katalizowana przez syntazę tlenku azotu w mózgu.

NOS w swojej budowie wykazuje znaczącą homologię do cytochromu P450. Do aktywności NOS konieczne są domeny: C-końcowa redukująca (wiąże NADPH, FAD i FMN), centralnie położona domena wiążąca kalmodulinę i N-końcowa utleniająca (wiąże hem, tetrahydrobiopterynę i argininę). Maksymalna szybkość syntezy NO jest ograniczona przez tempo dostarczania elektronów do hemu przez domenę redukującą. Obecność kalmoduliny w centralnej domenie jest potrzebna do wydajnego przenoszenia elektronów z kofaktorów, związanych przez domenę redukującą, na hem. Schemat budowy domenowej NOS przedstawiono na rycinie 2.

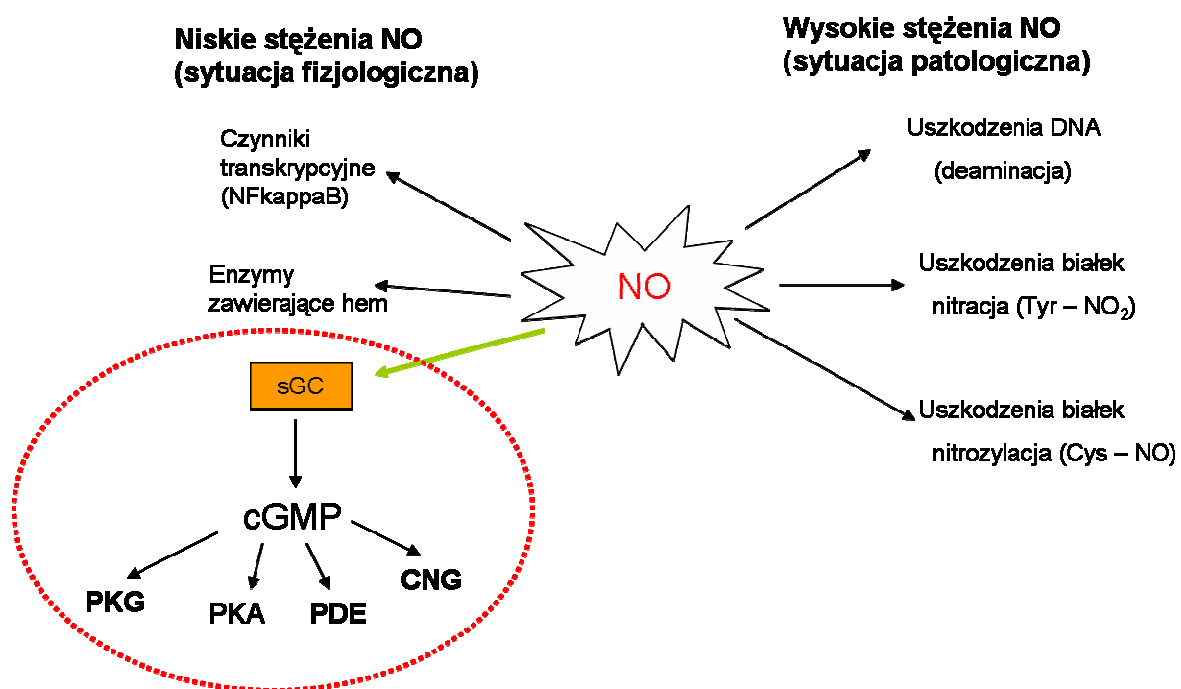


Rycina 2. Schemat budowy domenowej NOS.

Dotychczas odkryto trzy podstawowe izoformy NOS: neuronalną (nNOS, czasami oznaczaną również jako NOS I), indukowaną (iNOS lub NOS II) oraz endotelialną (eNOS lub NOS III) [Frostermann i wsp., 1998]. Indukowana iNOS trwale wiąże kalmodulinę i nie reaguje na wahania stężenia jonów wapnia; odgrywa ona rolę głównie w zjawiskach odpornościowych. Konstytutywne izoformy: neuronalna i śródbłonkowa (odpowiednio: nNOS i eNOS) są zależne od sygnalizacji wapniowej i syntetyzują stosunkowo małe ilości NO odgrywającego rolę w zjawiskach plastyczności synaptycznej i w regulacji przepływu krwi [Bredt i wsp., 1991; Dinerman i wsp., 1994]. Wszystkie trzy izoformy występują w mózgu. nNOS została wykryta w neuronach i astrocytach [Togashi i wsp., 1997; Korzhevskii i wsp., 2007], jest syntetyzowana konstytutywnie w całym mózgu, chociaż poziom ekspresji i aktywności różni się w zależności od części mózgu, najwyższy poziom ekspresji (mRNA i białka) nNOS obserwuje się w moście, mózdzku, podwzgórzu i korze mózgu, natomiast poziom białka eNOS jest równomiernie wysoki w całym mózgu [Bredt i wsp., 1990; Campese i wsp., 2007].

Za pośrednictwem białek zagęszczeń postsynaptycznych nNOS jest związana z kompleksem receptora NMDA, dzięki czemu jest silnie aktywowana przez jony wapnia napływające po otwarciu receptorów NMDA. Izoforma eNOS jest obecna w komórkach nabłonka wyściełającego naczynia krwionośne, jak również w neuronach piramidowych hipokampa [Dinnerman i wsp., 1994]. Wyniki Burette i wsp. [2002] wskazują, że neurony piramidowe hipokampa charakteryzuje aktywność nNOS, a nie eNOS. Indukowana izoforma iNOS nie ulega stałej ekspresji w zdrowym mózgu, istnieją przypuszczenia że proces fizjologicznego starzenia mózgu może indukować ekspresję iNOS. Badania Chalimoniuk i Strosznajder [1998] oraz Jęsko i wsp. [2003] nie wykazały aktywności iNOS w mózgu szczurów dorosłych i starych wolnych od patogenów. Ponadto nie stwierdzono u tych zwierząt ekspresji genu kodującego iNOS na poziomie mRNA. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że iNOS powstaje w mózgu w odpowiedzi na uszkodzenia i procesy zapalne, pod wpływem aktywacji przez cytokiny oraz endotoksyny [Heneka i Feinstein, 2001; Czapski i wsp., 2007]. NO w mózgu pełni rolę zwrotnego przekaźnika przekazującego informację z części post do presynaptycznej zakończeń nerwowych. Jest również wtórnym przekaźnikiem w części postsynaptycznej. NO jako „nietypowy” neurotransmitter gazowy, mała lipofilna cząsteczka o okresie półtrwania rzędu kilku sekund, może dyfundować w tkankach na odległości około 10 – 100 μm , do komórek w których

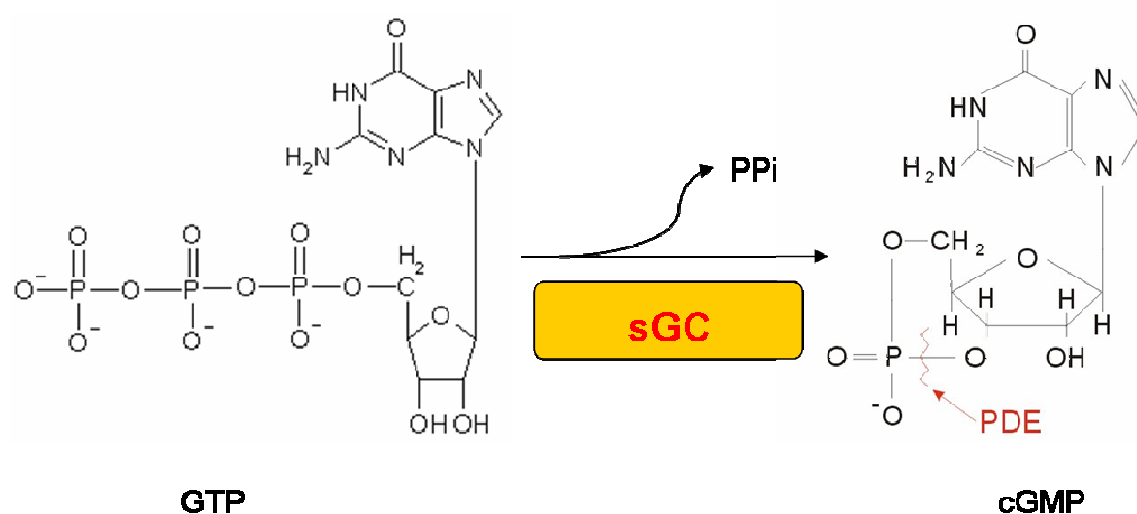
obecna jest rozpuszczalna (cytozolowa) cyklaza guanylanowa (sGC), która pełni funkcję receptora NO w mózgu. Szacuje się, że „strefa wpływu” NO wynosi około dwóch milionów synaps [Garthwaite, 1995]. W ośrodkowym układzie nerwowym NO jest zaangażowany w wiele różnych procesów takich jak długotrwałe wzmocnienie, długotrwała depresja synaptyczna, powstawanie i dojrzewanie synaps, uzależnienie i tolerancja leków, nadwrażliwość bólowa, ponadto wpływa na ścieżki sygnałowe czuciowe i motoryczne, reguluje przepływ krwi, wydzielanie neurohormonów, pobieranie pokarmu i zachowania seksualne [Garthwaite, 1995]. W zależności od stężenia NO może inicjować różne ścieżki komórkowe, zarówno te fizjologiczne, jak i patologiczne (Rycina 3.). W niniejszej pracy skupiono się na fizjologicznym działaniu NO.



Rycina 3. Udział tlenu azotu w fizjologii i patologii komórki (obszar zainteresowania niniejszej pracy zaznaczono na czerwono). Na rycinie zastosowano następujące skróty: CNG - kanał jonowy bramkowany cyklicznymi nukleotydami; PDE – fosfodiesteraza(y); PKA - kinaza białkowa zależna od cAMP; PKG - kinaza białkowa zależna od cGMP; sGC - rozpuszczalna (cytozolowa) cyklaza guanylanowa

1.1.2. Synteza cGMP

Głównym celem NO w mózgu jest rozpuszczalna cyklaza guanylanowa (sGC), enzym występujący w cytoplazmie [Kimura i Murad, 1975]. NO aktywuje sGC przyłączając się bezpośrednio do prostetycznej grupy hemowej, co wywołuje zmiany konformacyjne enzymu i stymuluje syntezę cGMP z GTP [Stone i Marleta, 1995]. Reakcję powstawania cGMP przedstawiono na rycinie 4.

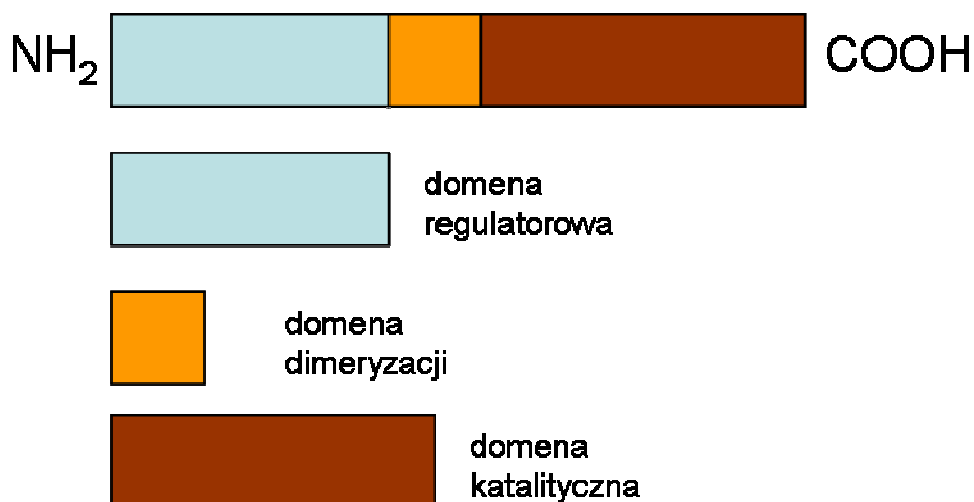


Rycina 4. Synteza cGMP przez rozpuszczalną izoformę cyklazy guanylanowej (na czerwono zaznaczono miejsce działania fosfodiesteraz podczas hydrolizy cGMP).

Rozpuszczalna izoforma GC jest heterodimerem zbudowanym z podjednostek α i β o masie około 70 – 80 kDa każda [Garbers, 1979; Kamisaki i wsp., 1986; Koesling i wsp., 1988; Humbert i wsp., 1990]. Ekspresja obydwu podjednostek jest niezbędna do katalitycznej aktywności enzymu. Hem związany z heterodimerem sGC ma, w odróżnieniu od wielu innych białek, większe powinowactwo do NO niż do tlenu. Związanie tlenu powoduje inaktywację enzymu, a obecność związków redukujących zwiększa ją. Do hemu w sGC może się też wiązać tlenek węgla, jednak powoduje to zaledwie 4-krotną aktywację enzymu w porównaniu ze 100-200-krotną stymulacją przez NO [Stone i Marletta, 1994]. Dimer posiada tylko jedno miejsce wiążące substrat (katalityczne), współtworzone przez określone aminokwasy domen katalitycznych podjednostek α i β [Liu i wsp., 1997; Lucas i wsp., 2000].

Dotychczas sklonowano dwie podjednostki α ($\alpha 1$ i $\alpha 2$) i dwie podjednostki β ($\beta 1$ i $\beta 2$), niemniej jednak enzym jest aktywny tylko jeżeli koekspresji ulegają jednocześnie $\alpha 1$ i $\beta 1$, lub $\alpha 2$ i $\beta 1$ [Nakane i wsp., 1988; Harteneck i wsp., 1990; Nakane i wsp., 1990; Buechler i wsp., 1991]. W mózgu najpowszechniej występują podjednostki $\alpha 1$ i $\beta 1$. U ludzi zlokalizowano dotychczas loci trzech genów kodujących sGC, podjednostka $\alpha 2$ jest kodowana przez gen leżący na chromosomie 11, $\alpha 3$ na chromosomie 4, a $\beta 2$ na chromosomie 13. Dimer $\alpha 1/\beta 1$ ma wyższą aktywność katalityczną niż $\alpha 1/\beta 2$. Uważa się, że ekspresja $\beta 2$ i wypieranie przez nią $\beta 1$ z dimerów może stanowić jeden z mechanizmów regulacji aktywności sGC. Również obecność podjednostki $\alpha 2$ w dimerze zmniejsza aktywność katalityczną enzymu. Odkryto także podjednostki $\alpha 3$ i $\beta 3$ o słabiej poznanym znaczeniu. Dodatkowo w przypadku niektórych podjednostek może zachodzić alternatywne składanie, czasami prowadząc do powstawania podjednostek hamujących aktywność enzymu [Behrends i wsp., 1995].

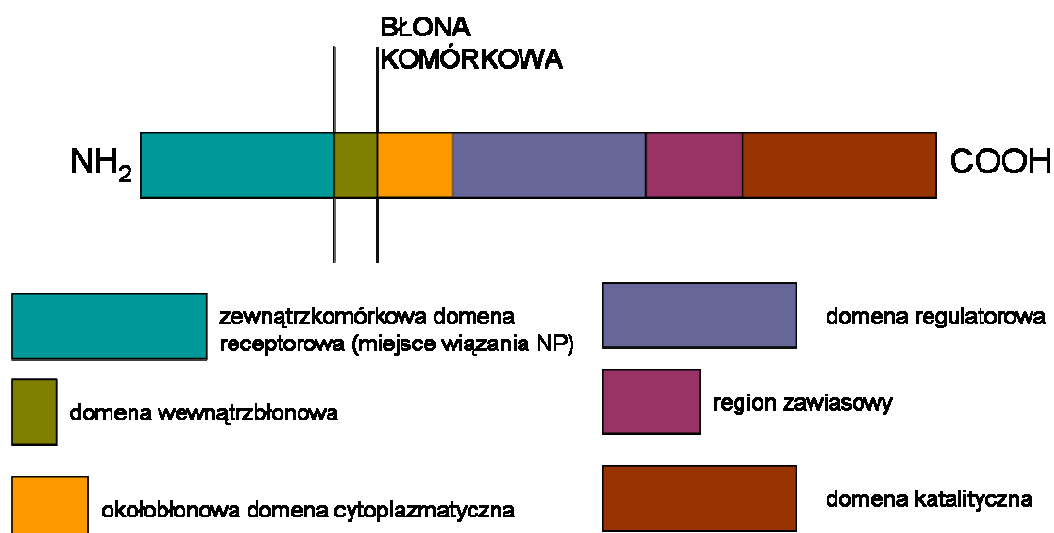
Każda z podjednostek ma domenę regulatorową na N – końcu i domenę katalityczną na C – końcu, grupa hemowa jest zlokalizowana na N – końcu każdej podjednostki [Lucas i wsp., 2000; Domek-Lopacinska i Strosznajder, 2005]. Budowę sGC przedstawiono na rycinie 5.



Rycina 5. Schemat domenowej budowy rozpuszczalnej izoformy syntazy guanylanowej (sGC). Zmodyfikowano na podstawie [Hobbs, 1997].

Podobnie jak NOS, obecność sGC stwierdza się w komórkach w całego mózgu i są one zlokalizowane w pobliżu komórek wykazujących aktywność NOS [Schmidt i wsp., 1992; Furuyama i wsp., 1993; Southam i Garthwaite, 1993; Burgunder i Cheung, 1994; Giuli i wsp., 1994; De Vente i wsp., 1998; Gibb i Garthwaite, 1998; Burette i wsp., 2002]. Wyniki najnowszych badań ekspresji sGC w mózgu wykazały, że podjednostką występującą w mózgu najczęściej jest $\beta 1$. Wysoki poziom mRNA wszystkich podjednostek zlokalizowano w zwojach podstawy, hipokampie, korze mózgu i mózdzku. Ponadto zaobserwowano bardzo niewielkie różnice w ekspresji podjednostek sGC w mózgu małp naczelnych i szczurów, co sugeruje konserwowaną ewolucyjnie rolę ścieżki sygnałowej NO/cGMP w tak ważnych procesach zachodzących w mózgu jak uczenie się i pamięć oraz zachowanie [Pifarre i wsp., 2007]. Poziom białka sGC jest najwyższy w podwzgórzu, moście, mózdzku i rdzeniu [Campese i wsp., 2007]. Komórkowa lokalizacja podjednostek sGC w mózgu małp wykazała, że podjednostka $\beta 1$ występuje głównie w cytoplazmie, a $\alpha 2$ w błonie dendrytów między innymi komórek Purkiniego, zwłaszcza postsynaptycznie [Bidmon i wsp., 2006]. Ponadto badania ekspresji sGC podczas wczesnego rozwoju mózgu pokazały, że wraz z migracją komórek i dojrzewaniem kory mózgu zmienia się lokalizacja sGC, przy czym najwyższy poziom tego enzymu występuje w dendrytach [Ding i wsp., 2005].

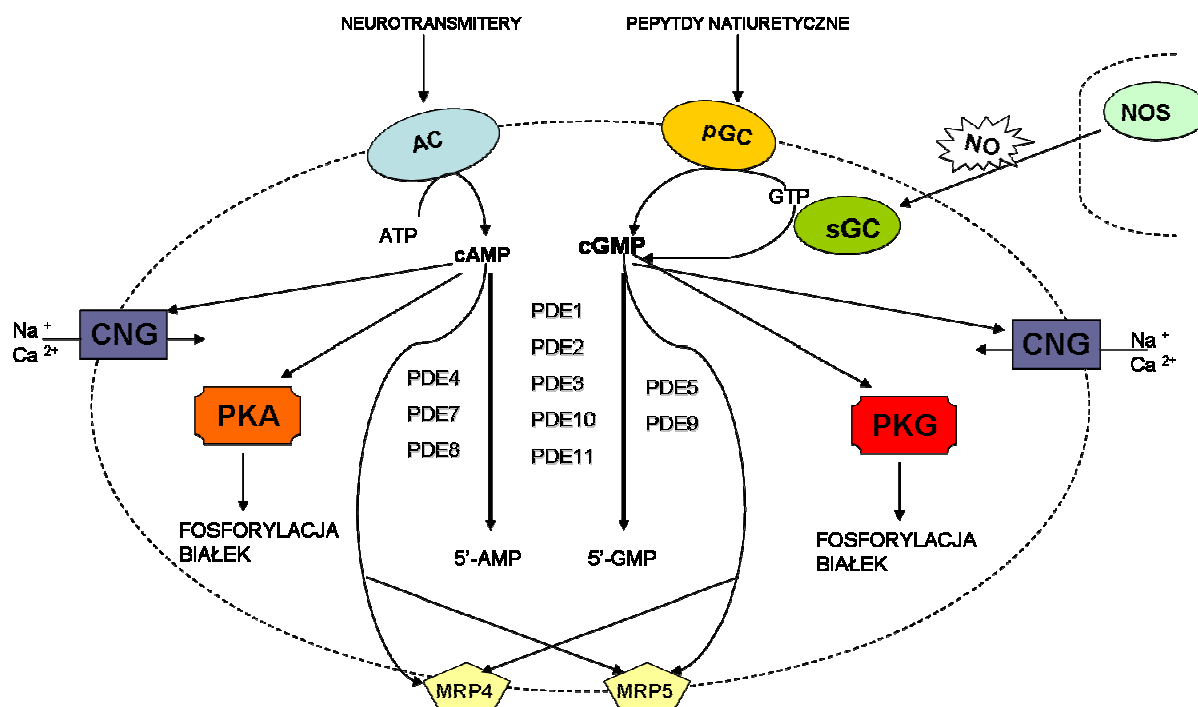
Poza omówioną cytozolową izoformą syntazy guanylanowej występuje również izoforma błonowa, (pGC), która syntetyzuje cGMP w wyniku aktywacji przez peptydy natriuretyczne ANP, BNP i CNP [Lucas i wsp., 2000; Wedel i Garbers, 2001]. Dotychczas zidentyfikowano siedem różnych izoform pGC (GC-A do GC-G). W mózgu zlokalizowano trzy z nich GC-A, GC-B i GC-C [Herman i wsp., 1996a; Herman i wsp., 1996b; Wedel i Garbers, 2001], a izoforma GC-D jest charakterystyczna dla komórek siatkówki, gdzie bierze udział w procesie fototransdukcji [Lucas i wsp., 2000]. Jej obecność stwierdza się także w komórkach opuszki węchowej [Julifils i wsp., 1997]. pGC jest dużym białkiem transbłonowym, wszystkie izoformy mają budowę domenową, z domeną receptorową na zewnątrz błony (na N - końcu białka), pojedynczą domeną wewnątrzbłonową, okołobłonową domeną cytoplazmatyczną, domeną regulatorową, tzw. regionem zawiasowym i domeną katalityczną na C - końcu białka. Schemat budowy pGC przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Schemat budowy domenowej błonowej cykazy guanylanowej (pGC). Zmodyfikowano na podstawie [Lucas i wsp., 2000].

1.1.3. Przekazywanie sygnału przez cGMP w komórce

Wewnątrz komórek głównymi efektorami cGMP są: kinaza białkowa zależna od cGMP (PKG), kanały jonowe bramkowane cyklicznymi nukleotydami (CNG) i fosfodiesterazy (PDE). cGMP pełni bardzo ważną rolę w przekazywaniu sygnału między innymi w układzie nerwowym. Drugim przekaźnikiem sygnału, który często towarzyszy cGMP jest cAMP zaangażowany w rozwój układu nerwowego [Truman i wsp., 1996; Gibbs i Truman, 1998; Schachatner i wsp., 1999; Van Wagenen i Rehder, 1999; Polleux i wsp., 2000; Gibbs i wsp., 2001; Simpson i wsp., 2002] oraz takie procesy jak fototransdukcja, powonienie [Broillet i Firestein, 1999], kurczenie i relaksacja mięśni gładkich [Carvajal i wsp., 2000]. Schematyczne zestawienie metabolizmu i ścieżek sygnałowych cGMP i cAMP w komórce przedstawiono na rycinie 5.



Rycina 5. Schematyczne zestawienie ścieżek metabolicznych i sygnałowych cAMP i cGMP w komórce. Na rycinie zastosowano następujące skróty: 5' AMP – adenylozomonofosforan; 5' GMP – guanozynomonofosforan; AC - cyklaza adenylanowa; ATP - 3,5-adenozynotrifosforan; CNG - kanał jonowy bramkowany cyklicznymi nukleotydami; GTP – guanozynotrifosforan; MRP - białko odporności wielolekowej; NOS – syntaza tlenku azotu; PDE – fosfodiesteraza; pGC – błonowa cyklaza guanylanowa, PKA - kinaza białkowa zależna od cAMP; PKG - kinaza białkowa zależna od cGMP; sGC - rozpuszczalna (cytozolowa) cyklaza guanylanowa

1.1.3.1. Kinaza białkowa zależna od cGMP

Jednym z efektorów cGMP wewnątrz komórek jest kinaza zależna od cGMP (PKG), która należy do rodziny kinaz serynowo - treoninowych. [Lohmann i wsp., 1997; Pfeifer i wsp., 1999]. U ssaków występują trzy izoformy PKG, które powstają z dwóch genów - prkg1 kodującego cytozolową PKG I i prkg2 kodującego błonową PKG II. Kinaza PKG I ma 2 izoformy α i β powstające w wyniku alternatywnego składania białka różniące się budową N – końca, przy czym izoforma α ma wyższe powinowactwo do cGMP [Sandberg i wsp., 1989; Wernet i wsp., 1989; Uhler, 1993; Jarchau i wsp., 1994], białko to ma ciężar cząsteczkowy 76 kDa i jest homodimerem występującym w cytoplazmie komórek. PKG II jest homodimerem związanym z błoną komórkową i ma ciężar cząsteczkowy 86 kDa. Aktywacja PKG następuje w stężeniach cGMP sub- i mikromolarnych [Hofmann, 2005]. PKG zawierają N -

końcową domenę A, domenę regulatorową i domenę katalityczną na C - końcu białka [Hofmann, 2005]. Wszystkie PKG mają w N - końcowej domenie miejsce dimeryzacji, miejsce autoinhibicji (aktywowane w nieobecności cGMP), miejsce autofosforylacji (autofosforylacja w obecności cGMP zwiększa aktywność enzymu) i miejsce regulujące wewnątrzkomórkową lokalizację enzymu. Domena regulatorowa ma 2 miejsca wiążące cGMP z wysokim i z niskim powinowactwem. PKG I α wykazuje najwyższe powinowactwo dla cGMP, najniższe ma PKG II. Zajęcie obu miejsc domeny regulatorowej przez cGMP uwalnia domenę katalityczną od związanej z nią sekwencji autohamującej (pseudosubstratowej) położonej na N – końcu, umożliwia to autofosforylację i wzrost aktywności PKG [Hofmann, 2005]. N - końcowa część kinazy zawiera również sekwencję określającą lokalizację wewnątrzkomórkową (miejsce acetylacji lub mirystylacji) oraz suwak leucynowy umożliwiający homodimeryzację. Uproszczony schemat budowy PKG I i PKG II przedstawiono na rycinie 6.

a.



b.



miejsce acetylacji

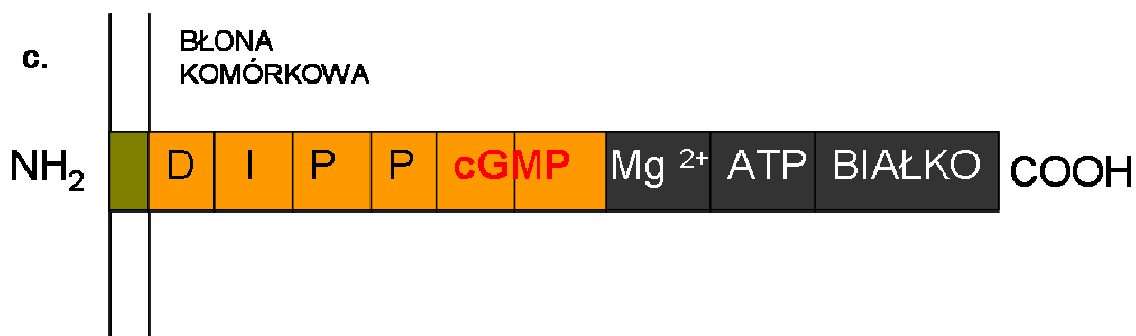


domena regulatorowa, miejsca wiązania cGMP
(W – wysokie powinowactwo, N – niskie powinowactwo)



domena katalityczna

c.



miejsce mirystylacji
(zakotwiczenia w błonie)



domena regulatorowa (D – miejsce dimeryzacji podjednostek, I – miejsce autoinhibicji, P – miejsce fosorylacji, cGMP – miejsce wiązania cGMP)



domena katalityczna, zawiera miejsce wiązania jonów Mg^{2+} , miejsce wiązania ATP i miejsce wiązania fosorylowanego białka

Rycina 6. Uproszczony schemat budowy domenowej PKG. (a – PKG I α , b – PKG I β , c – PKG II). Stworzono na podstawie prac przeglądowych [Lucas i wsp., 2000; Hofmann, 2005].

PKG I pełni rolę regulatora cytozolowego stężenia jonów wapnia. Fosforyluje receptor IP_3 oraz substrat G będący inhibitorem fosfataz. Innym prawdopodobnym substratem jest zależna od wapnia cytozolowa fosfolipaza A2 (PLA2) [Lucas i wsp., 2000]. PKG I α i β znajdują się głównie w cytozolu. Ich sekwencje różnią się od siebie na N - końcu, co umożliwia interakcje z odmiennymi grupami białek. PKG II jest zakotwiczona do błony komórkowej dzięki mirystylacji N - końca. Początkowo odkryto obecność PKG I w komórkach Purkiniego w mózdku [Lohmann i wsp., 1981], później stwierdzono, że PKG ulega ekspresji również w innych regionach mózgu, chociaż najwyższy poziom białka obserwuje się w mózdku i hipokampie [Kingston i wsp., 1996; El-Husseini i wsp., 1999]. W przeciwieństwie do PKG I, PKG II jest produkowana niemal w całym mózgu [El-Husseini i wsp., 1995; El-Husseini i wsp., 1999; De Vente i wsp., 2001]. Pomimo rozpowszechnionej ekspresji PKG II w mózgu, uszkodzenie kodującego ją genu nie powoduje dramatycznych skutków [Werner i wsp., 2004], w przeciwieństwie do skutków uszkodzenia genu dla PKG I [Feil i wsp., 2003; Demyanenko i wsp., 2005]. PKG I β jest zaangażowana w LTP w hipokampie [Arancio i wsp., 2001; Kleppisch i wsp., 2003], a PKG I α prawdopodobnie uczestniczy w LTD w neuronach Purkiniego w mózdku [Feil i wsp., 2003; Hofmann, 2005].

Wszystkie izoformy PKG są uważane za enzymy o wysokim powinowactwie do cGMP, wartość K_m dla PKG I α wynosi 4 - 38nM, 54 - 750nM dla PKG I β oraz 40nM dla PKG II [Smolenski i wsp., 1998; Kotera i wsp., 2003]. Ponadto autofosforylacja enzymu zwiększa powinowactwo do cGMP. PKG może również chronić cGMP przed degradacją ponieważ związanie nukleotydu uniemożliwia jego hydrolizę przez fosfodiesterazy [Kotera i wsp., 2003].

1.1.3.2. Kanały jonowe regulowane cyklicznymi nukleotydami

Kolejną grupą białek aktywowanych przez cykliczne nukleotydy są kanały jonowe bramkowane cyklicznymi nukleotydami (CNG). Po raz pierwszy opisano występowanie CNG w komórkach fotoreceptorowych [Fesenko i wsp., 1985; Haynes i Yau, 1985] oraz w węchowych neuronach receptorowych [Nakamura i Gold, 1987], gdzie kanały te pośredniczą w transdukcji bodźców czuciowych do aktywności neuronalnej [Zufall i wsp., 1994; Wei i wsp., 1998]. CNG otwierają się w odpowiedzi

na związanie cGMP lub cAMP i regulują napływ jonów sodu lub wapnia do wnętrza komórki. Różne podtypy CNG różnią się powinowactwem do cGMP i cAMP. Kanał występujący w neuronach węchowych jest aktywowany przez obydwie nukleotydy i jest kanałem wapniowym, a kanał obecny w fotoreceptorach jest kanałem sodowym aktywowanym tylko przez cGMP [Zufall i wsp., 1994; Wei i wsp., 1998]. Przez wiele lat obowiązywał pogląd, że głównym, jeżeli nie jedynym odbiorcą sygnału cGMP w neuronach jest PKG. Badania zapoczątkowane około 10 lat temu wykazały jednak, że poza ekspresją w neuronach fotoreceptorowych i węchowych, CNG są obecne w korze mózgu, hipokampie i mózdzku oraz innych częściach ośrodkowego układu nerwowego [El-Husseini i wsp., 1995; Kingston i wsp., 1996; Bradley i wsp., 1997; Kingston i wsp., 1999]. W porównaniu z PKG, kanały CNG mają niższe powinowactwo do cGMP i do aktywacji potrzebują od 10 do 100 razy wyższego poziomu cGMP niż PKG [Lincoln i Cornwell, 1993]. Z tego powodu, wydaje się, że do otwarcia CNG potrzebny jest lokalny znaczny wzrost poziomu cGMP, a podstawowy lub nieznacznie podniesiony poziom tego nukleotydu nie aktywuje kanałów, za wyjątkiem kanałów w fotoreceptorach siatkówki. Ponieważ kanały CNG pośredniczą w przekazywaniu sygnału przez cykliczne nukleotydy i wpływają na poziom wapnia w komórce, najprawdopodobniej odgrywają ważną rolę w regulacji aktywności neuronalnej i plastyczności synaptycznej [Barnstable, 2004; Bradley i wsp., 1997; Feil i Kleppisch, 2008; Kuzmiski i McVicar, 2001; Podda i wsp., 2008; Zufall i wsp., 1997].

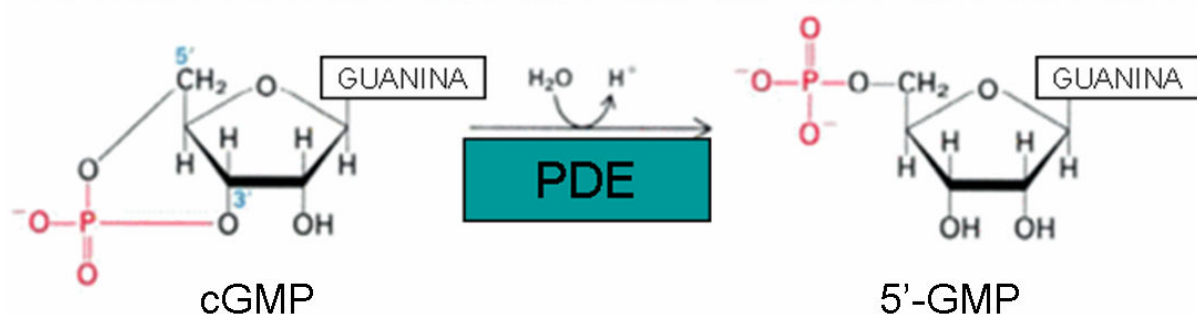
1.1.3.3. Transportery cyklicznych nukleotydów

cGMP i cAMP mogą być eliminowane z komórek na dwa sposoby: poprzez hydrolizę przez fosfodiesterazy lub transport na zewnątrz komórek [Davoren i Sutherland 1963; Brunton i Mayer, 1979; Wiemer i wsp., 1982]. W latach sześćdziesiątych Davoren i Sutherland [1963] poinformowali o możliwości transportu cAMP przez błonę komórkową wbrew gradientowi stężeń. Badania przeprowadzone w ostatnich latach ostatecznie dowiodły istnienia białek transportujących cykliczne nukleotydy. Transporterami są białka należące do dużej rodziny posiadających „kasetę” wiążącą ATP (z ang. ATP-binding cassette; ABC) białek odporności wielolekowej (z ang. multidrug resistance proteins; MRP). Białka ABC mogą transportować bardzo wiele różnych cząsteczek przez błonę komórkową, a do swojej aktywności wymagają

obecności ATP [Borst i Elferink, 2002]. Dwa białka należące do rodziny ABC, MRP4 i MRP5 mogą transportować cykliczne nukleotydy oraz ich analogi [Kool i wsp., 1997; Jedlitschky i wsp., 2000; Chen i wsp., 2001]. Obydwa z nich transportują cGMP i wykazują wysokie powinowactwo (K_m rzędu $10\mu\text{M}$ dla MRP4 i $2\mu\text{M}$ dla MRP5) dla tego nukleotydu, ich zdolność wiązania cAMP jest dużo niższa, K_m dla MRP4 wynosi $45\mu\text{M}$ i $400\mu\text{M}$ dla MRP5 [Jedlitschky i wsp., 2000; Chen i wsp., 2001]. Dotychczas nie poznano dokładnie fizjologicznej roli transporterów cyklicznych nukleotydów, wiadomo że obydwa (MRP4 i 5) są obecne w mózgu i w różnego rodzaju hodowlach neuronów i komórek glejowych [McAleer i wsp., 1999; Ballerini i wsp., 2002; Hirrlinger i wsp., 2002]. Ponadto MRP4 i MRP5 ulegają ekspresji w komórkach endotelialnych tworzących barierę krew - mózg [Zhang i wsp. 2000]. Co ciekawe wykazano, że eksport cyklicznych nukleotydów przez MRP5 można zahamować przy pomocy inhibitorów fosfodiesteraz cGMP – między innymi sildenafilu, zaprinastu i dipiramidamolu [Jedlitschky i wsp., 2000; Sundkvist i wsp. 2002].

1.1.3.4. Fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów

Pomimo, że cykliczne nukleotydy mogą być usuwane z komórki przez transportery, głównymi enzymami obniżającymi ich poziom są fosfodiesterazy (PDE), które hydrolizują wiązanie fosfodiestrowe w cAMP i cGMP (Rycina 7.).



Rycina 7. Reakcja hydrolizy cGMP katalizowanej przez fosfodiesterazy (PDE).

Fosfodiesterazy pełnią bardzo ważną rolę w komórkach, poprzez hydrolizę cAMP oraz cGMP determinują ich poziom oraz czas trwania sygnału przenoszonego przez te kluczowe przekaźniki drugorzędowe.

Według specyficzności PDE można podzielić na:

- hydrolizujące tylko cAMP - PDE4, PDE7 i PDE8 [Bolger i wsp., 1997; Gardner i wsp., 2000; Wang i wsp., 2001]
- hydrolizujące tylko cGMP - PDE5, PDE6 (która występuje wyłącznie w komórkach fotoreceptorowych) i PDE9 [Rosman i wsp., 1998; Florio i wsp., 1996; Andreeva i wsp., 2001; Rentero i wsp., 2003]
- hydrolizujące obydwa cykliczne nukleotydy - PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 oraz PDE11 [Yan i wsp., 1994; Martinez i wsp., 2002; Taira i wsp., 1993; Fujishige i wsp., 1999a i b; Yuasa i wsp., 2001].

Dotychczas odkryto ponad 95 różnych izoform PDE zgrupowanych w 11 rodzin, oraz 23 geny kodujące PDE, które bardzo często ulegają alternatywnemu składaniu. Należy jednak podkreślić, że dane te dotyczą wszystkich sklonowanych genów i opisanych izoform białek wyizolowanych z różnych tkanek licznych organizmów (człowieka i innych ssaków). Prawdopodobnie nie wszystkie warianty spotykane u jednych gatunków występują u innych, tak jak to wykazano dla PDE11 [Yuasa i wsp., 2000, Yuasa i wsp., 2001]. Rola fizjologiczna istnienia tak wielu form alternatywnego składania genów dla PDE nie została jeszcze wyjaśniona i szczegółowo zbadana. Wiadomo, że mogą one różnić się właściwościami biochemicznymi w tym interakcji z innymi białkami w komórkach, a także występowaniem miejsc fosforylacji. Ponieważ alternatywne składanie jest procesem specyficznym tkankowo, prawdopodobnie poszczególne izoformy z jednej rodziny występują selektywnie w poszczególnych komórkach i tkankach [Yan i wsp., 1996; Kotera i wsp., 1999a; Miro i wsp., 2001; Rentero i wsp., 2003].

PDE6 jest obecna wyłącznie w komórkach siatkówki, natomiast wszystkie pozostałe 10 rodzin zlokalizowano w innych komórkach ośrodkowego układu nerwowego [Kincaid i wsp., 1987; Billingsley i wsp., 1990; Repaske i wsp., 1993; Furuyama i wsp., 1994; Polli i Kincaid, 1994; Yan i wsp., 1994; Iwahashi i wsp., 1996; Reinhardt i Bondy, 1996; Kotera i wsp., 1997; Cherry i Davis, 1999; Fujishige i wsp., 1999a; Fawcett i wsp., 2000; Andreeva i wsp., 2001; Miro et al., 2001]. Badania lokalizacji fosfodiesteraz wykazały, że komórki posiadają zazwyczaj więcej niż jeden rodzaj PDE, w różnych ilościach oraz w różnych kompartmentach komórkowych [Julifils i

wsp., 1997; Beavo and Brunton, 2002]. Zestawienie 11 rodzin fosfodiesteraz wraz z krótką charakterystyką przedstawiono w tabeli 1.

RODZINA	CHARAKTERYSTYKA	GEN (TRANSKRYPTY)*	Km #	Vmax	FOSFORYLACJA	LITERATURA
PDE1	PDE zależne od kalmoduliny	1A (12), 1B (2), 1C (5)	cGMP (1.1-5µM) < cAMP (1.2-113µM)	cGMP ? cAMP	PKA, CaMKII	[Bentley i wsp., 1992; Poili i Kincaid, 1992; Sonnenburg i wsp., 1993; Yan i wsp., 1994; Sonnenburg i wsp., 1995; Loughney i wsp., 1996; Yan i wsp., 1996; Yu i wsp., 1997; Michibata i wsp., 2001]
PDE2	PDE aktywowane przez cGMP	2A (3)	cGMP (15-30µM) < cAMP (30-50 µM)	cGMP ? cAMP	nie określono	[Murashima i wsp., 1990; Sonnenburg i wsp., 1991; McAllister-Lucas i wsp., 1993; Repaske i wsp., 1993; Rosman i wsp., 1997]
PDE3	PDE hamowane przez cGMP	3A (1), 3B (1)	cGMP (0.02-0.8µM) ? cAMP (0.15-0.38µM)	cGMP < cAMP	PKA, kinaza białkowa zależna od insuliny	[Meacci i wsp., 1992; Taira i wsp., 1993; Kuthe i wsp., 1999; Kasuya i wsp., 2000; Choi i wsp., 2001; Schitsukawa i wsp., 2001]
PDE4	PDE hydrolizujące cAMP (hamowane przez rolipram)	4A (4), 4B (3), 4C (3), 4D (5)	cGMP (>3000µM) > cAMP (1-3µM)	cGMP << cAMP	PKA	[Colicelli i wsp., 1989; Michaeli i wsp., 1993; Bolger i wsp., 1996; Nemoz i wsp., 1996; Bolger i wsp., 1997; Obermolte i wsp., 1997; Owens i wsp., 1997; Wang i wsp., 1997; Saidou i wsp., 1998; Rena i wsp., 2001]
PDE5	PDE wiążące cGMP i selektywnie hydrolizujące cGMP	5A (3)	cGMP (1-5µM) < cAMP (>300µM)	cGMP > cAMP	PKG, PKA	[Thomas i wsp., 1990; Kotera i wsp., 1997; Loughney i wsp., 1998; Stacey i wsp., 1998; Lin i wsp., 2000; Lin i wsp., 2002]
PDE6	PDE selektywne dla cGMP, występują w komórkach fotoreceptorowych	6A (podjednostka α - w przęcikach), 6B (podjednostka β - w przęcikach), 6C (podjednostka α - w czopkach), 6D (podjednostka δ - w przęcikach), 6G (podjednostka γ - przęcikach)	cGMP (0.060-1µM) < cAMP (2000µM)	cGMP >> cAMP	PKA, PKC, Cdk5	[Gillespie i Beavo, 1988; Udovichenko i wsp., 1993; Florio i wsp., 1996; Wang i wsp., 1996; Li i wsp., 1998; Hayashi i wsp., 2000]
PDE7	PDE selektywne dla cAMP, niewrażliwe na działanie rolipramu	7A (3), 7B (3)	cGMP (>1000µM) > cAMP (0.03-1µM)	cGMP << cAMP	PKA	[Michaeli i wsp., 1993; Bloom i Beavo, 1996; Han i wsp., 1997; Gardner i wsp., 2000; Hetman i wsp., 2000a; Sasaki i wsp., 2000; Miro i wsp., 2001; Sasaki i wsp., 2002]
PDE8	PDE hydrolizujące cAMP z wysokim powinowactwem, niewrażliwe na IBMX	8A (5), 8B (4)	cGMP (124µM) > cAMP (0.06-0.15µM)	cGMP << cAMP	nie określono	[Fisher i wsp., 1998a; Hayashi i wsp., 1998; Soderling i wsp., 1998a; Wang i wsp., 2001; Wang i wsp., 2001]
PDE9	PDE o wysokim powinowactwie i selektywności dla cGMP	9A (20)	cGMP (0.07-0.17µM) < cAMP (230µM)	cGMP >> cAMP	nie określono	[Fisher i wsp., 1998b; Guipponi i wsp., 1998; Soderling i wsp., 1998b; Rentero i wsp., 2003]
PDE10	PDE hydrolizujące cAMP, regulowane przez cGMP	10A (10)	cGMP (3.0-14µM) > cAMP (0.05-0.28µM)	cGMP > cAMP	PKA	[Fujishige i wsp., 1999a i b; Kotera i wsp., 1999b; Loughney i wsp., 1999; Soderling i wsp., 1999]
PDE11	PDE wrażliwe na poziom cGMP, hydrolizujące obydwa nukleotydy	11A (4)	cGMP (0.52-4.2µM) ? cAMP (1.04-5.7µM)	cGMP ? cAMP	PKA, PKG	[Fawcett i wsp., 2000; Hetman i wsp., 2000b; Yuasa i wsp., 2000; Yuasa i wsp., 2001].

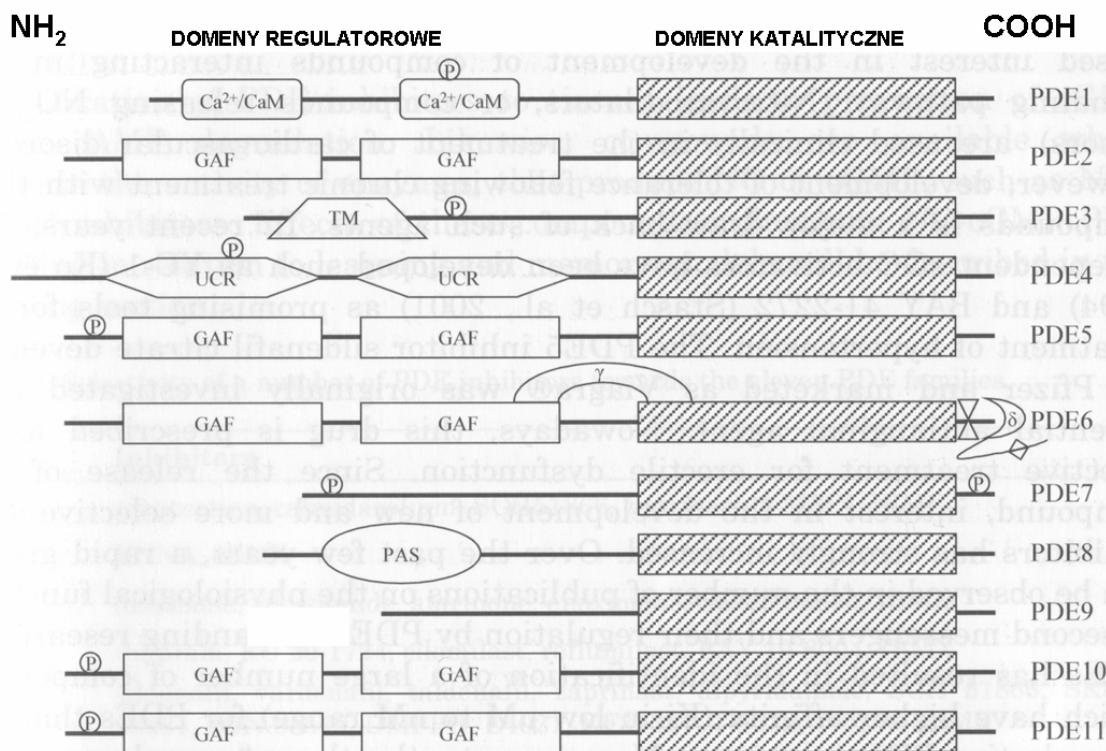
Tabela 1. Zestawienie i krótka charakterystyka fosfodiesteraz * warianty genów odkrytych u ludzi, psów, szczurów i myszy; # określono zakres dla różnych izoform w obrębie tej samej rodziny CaMKII - kinaza białkowa zależna od kalmoduliny; Cdk5 - kinaza białkowa zależna od cAMP, PKG - kinaza białkowa zależna od cAMP, PKG - kinaza białkowa zależna od cAMP

1.1.3.4.1. Budowa fosfodiesteraz

Wszystkie PDE mają w swojej strukturze dwie podstawowe domeny, na C-końcu silnie konserwowaną ewolucyjnie domenę katalityczną zbudowaną z około 270 aminokwasów, a na N-końcu domenę regulatorową. Enzymy te funkcjonują jako dimery (poza PDE6, która jest tetramerem). W obrębie tej samej rodziny białka te wykazują homologię około 65% lub nawet większą na poziomie budowy aminokwasowej. Homologię pomiędzy PDE z różnych rodzin określa się maksymalnie na 40% [Beavo, 1995]. Co ciekawe, homologia w obrębie tej samej rodziny genów kodujących PDE u różnych gatunków jest bardzo wysoka i wynosi ponad 90%.

Domeny regulatorowe monomerów PDE są zlokalizowane na N - końcu białek i różnią się budową oraz rozmiarem w zależności od rodziny fosfodiesteraz. Domeny te mogą zawierać miejsca wiązania wapnia i kalmoduliny (PDE1), allosteryczne miejsca wiązania cGMP - tzw. domeny GAF (PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 i PDE11), miejsca związania z błoną komórkową (PDE3), oraz miejsca fosforylacji dla różnych kinaz białkowych, między innymi PKG i PKA. PDE8 jako jedyna posiada domenę PAS, która prawdopodobnie reguluje oddziaływania między białkami i wewnątrzkomórkową lokalizację enzymu [Soderling i Beavo, 2000]. Przyłączenie cGMP do tandemu domen GAF wywołuje różne skutki w zależności od rodzaju PDE, na przykład w PDE2 związanie cGMP z GAF stymuluje hydrolizę cAMP i cGMP [Rosman i wsp., 1997], a przyłączenie cGMP do GAF w PDE5 zwiększa jej fosforylację i stymuluje aktywność PDE5 [Gopal i wsp., 2001; Rybalkin i wsp., 2002]. Poza PDE5 fosforylacji przez PKG lub PKA i inne kinazy ulegają PDE1, PDE3, PDE4, PDE7, PDE10 i PDE11 [Beltman i wsp., 1993; Florio i wsp., 1994; Degerman i wsp., 1997; Kotera i wsp., 1999b; Yuasa i wsp., 2000; Sasaki i wsp., 2002; Tabela 1.]. Analiza struktury rodzin PDE wykazała, że enzymy te posiadają wiele potencjalnych miejsc fosforylacji, których dokładna funkcja nie została jeszcze zbadana.

Schematyczną budowę domenową fosfodiesteraz przedstawiono na rycinie 8.



Rycina 8. Uproszczony zmodyfikowany schemat budowy domenowej fosfodiesteraz na podstawie [Soderling i Beavo, 2000; Yuasa i wsp., 2000; Francis i wsp., 2001; Sasaki i wsp., 2002], zmienione. Na schemacie zastosowano następujące oznaczenia i skróty: Ca²⁺/CaM, domena wiążąca wapń i kalmodulinę; GAF, domena GAF wiążąca cGMP; P, miejsce fosforylacji; PAS, domena regulatorowa PAS; TM, domena transbłonowa; UCR, konserwowany ewolucyjnie region „upstream”; δ, podjednostka delta; γ, podjednostka gamma; Δ, grupy prenylowe; ◇, domena PDZ

1.1.3.4.2. Inhibitory fosfodiesteraz

Fosfodiesterazy zostały podzielone na 11 rodzin na podstawie opisanych wcześniej cech, jak również na podstawie ich powinowactwa do różnych inhibitorów PDE (Tabela 2).

RODZINA	INHIBITORY
PDE1	vipocentyna, kalmidazol, SCH 51866, zaprinast, 8-MMX, IBMX
PDE2	EHNA, IBMX, Bay 60-7550
PDE3	milrinon, cilostamid, amrinon, enoximon, SK&F 95654, IBMX
PDE4	rolipram, RO 20-1724, cilomilast, roflumilast, BAY 19-8004, MEM1018, MEM1091, IBMX
PDE5	sildenafil, vardenafil, tadalafil, zaprinast, dipyridamol, SCH 51866, SK&F 96231, WIN 65579, DMPPO, E4021, KF31327, T-1032, T-0156, IBMX
PDE6	sildenafil, vardenafil, tadalafil, zaprinast, dipyridamol, DMPPO, E4021, IBMX
PDE7	dipyridamol, SCH51866, papaweryna, IBMX
PDE8	dipyridamol
PDE9	zaprinast w wysokich stężeniach, SCH51866
PDE10	dipyridamol, zaprinast, E4021, SCH51866, IBMX
PDE11	dipyramidol, zaprinast, E4021, SCH51866, IBMX

Tabela 2. Zestawienie inhibitorów PDE. W tabeli zastosowano następujące skróty: 8-MMX – 8-metoksymetylo-3-izobutylo-1,1-metyloksantyna; EHNA – erytro-9-(2-hydroksy-3-nonyl) adenina; IBMX – 3-izobutylo-1-metyloksantyna.

Niektóre z inhibitorów PDE były stosowane w medycynie na długo zanim zostały poznane ich właściwości hamowania fosfodiesteraz. Już w starożytnym Egipcie kwiat niebieskiej lili wodnej o łacińskiej nazwie *Nymphacea caerulea* był używany jako środek przeciwbólowy, poprawiający pamięć i krążenie krwi, zwiększający popęd płciowy oraz poprawiający nastrój. Współczesne badania tej rośliny wykazały, że poza fitosterolami i bioflawonoidami, kwiaty te zawierają kilka substancji o właściwościach hamujących aktywność fosfodiesteraz .

Na początku lat sześćdziesiątych Butcher i Sutherland [1962] odkryli, że metyloksantyny takie jak kofeina i teofilina hamują rozkład cyklicznych nukleotydów. Dzięki olbrzymiej różnorodności sekwencji kodujących domeny katalityczne i regulatorowe oraz specyficzności tkankowej ekspresji PDE istnieją duże możliwości opracowania selektywnych inhibitorów dla poszczególnych izoform [Beavo i Reifsnnyder, 1990]. Inhibitory PDE są obecnie stosowane w leczeniu wielu chorób

takich jak astma, choroby układu sercowo-naczyniowego, depresja i zaburzenia potencji [Essayan, 2001; Corbin i wsp., 2002; Sturton i Fitzgerald, 2002]. Metyloksantyny takie jak kofeina, teofilina czy IBMX oraz papaweryna należą do grupy niespecyficznych inhibitorów PDE. Substancje te hamują aktywność PDE hydrolizujących cGMP i cAMP, charakteryzują się niskim powinowactwem (K_i rzędu 1mM), są obecnie nazywane inhibitorami PDE pierwszej generacji. Wadą tych inhibitorów jest częste wywoływanie działań niepożądanych (efektów ubocznych), takich jak zaburzenia w metabolizmie adeniny [Dousa, 1999].

Inhibitor PDE5, cytrynian sildenafilu opracowany przez firmę Pfizer i sprzedawany jako Viagra[®] był początkowo badany pod kątem stosowania w leczeniu dusznicy bolesnej, a obecnie jest chyba najbardziej znanym inhibitorem PDE, z powodzeniem stosowanym w zaburzeniach erekcji. Od czasu wypuszczenia na rynek sildenafilu zainteresowanie selektywnymi inhibitorami PDE znacząco wzrosło, opracowano liczne inhibitory PDE drugiej generacji o bardzo wysokim powinowactwie (K_i od niskich wartości μM do nM) i specyficzności dla poszczególnych rodzin PDE. I tak powstały kolejne inhibitory PDE5 vardenafil i tadalafil, obydwa również stosowane w leczeniu zaburzeń erekcji. Ponadto wyprodukowano selektywne inhibitory PDE4 takie jak cilomilast i roflumilast, które obiecująco przechodzą kolejne etapy badań klinicznych pod kątem leczenia chorób układu oddechowego takich jak przewlekła obturacyjna choroba płuc i astma [Sturton i Fitzgerald, 2002]. Badany klinicznie jest również inhibitor PDE2 i PDE5, exisulind [Liu i wsp., 2001] sprzedawany przez firmę Cell Pathways Inc. pod nazwą Aptosyn[®]. Jest to lek wywołujący apoptozę w wielu rodzajach komórek nowotworowych i hamujący rozwój guzów w modelach zwierzęcych. Exisulind hamuje działanie PDE2 i PDE5 przez co zwiększa poziom cGMP i aktywację PKG, dzięki fosforylacji dochodzi do aktywacji transkrypcji kaspaz i apoptozy komórek nowotworowych [Haanen, 2001]. Exisulind bada się pod kątem leczenia raka sutka, płuc, prostaty i jelita grubego. Wykazano również, że inhibitory PDE5, zaprinast i T-1032 mają działanie neuroprotekcyjne i rozważa się ich stosowanie w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego [Nakamizo i wsp., 2003]. Ponadto zaobserwowano, że sildenafil korzystnie wpływa na procesy regeneracji mózgu po udarze [Zhang i wsp., 2002].

1.2. Wpływ starzenia na ścieżkę sygnałową NO/cGMP w mózgu

Proces starzenia znacząco wpływa na metabolizm NO i cGMP w mózgu. Zmianom ulegają ekspresja i aktywność enzymów zaangażowanych w syntezę i degradację tych przekaźników sygnału. Prawdopodobnie zmiany te mają związek z upośledzeniem możliwości poznawczych u osób starszych. W 1998 roku McCann i wsp. zaproponowali hipotezę zależnego od NO starzenia mózgu. Według tej teorii, powtarzające się infekcje i procesy zapalne w obrębie OUN i organów obwodowych mogą prowadzić do aktywacji indukowanej izoformy NOS i w ten sposób zwiększać poziom NO w mózgu. Patologicznie podwyższony poziom NO wraz z zaburzeniami w sygnalizacji glutaminianergiczej mogą prowadzić do uszkodzeń neuronów i gleju, a głównymi skutkami tych procesów są zaburzenia w wydzielaniu hormonów, mediatorów zapalnych oraz upośledzenie plastyczności neuronalnej i możliwości poznawczych starczego mózgu [McCann i wsp., 1998].

1.2.1. Wpływ starzenia na ekspresję i aktywność NOS

Wyniki badań dotyczących zmian ekspresji i aktywności NOS w różnych częściach mózgu są dość niespójne. Według niektórych grup badawczych ekspresja i aktywność tego enzymu spada w procesie starzenia, według innych rośnie, a są też dane sugerujące brak statystycznie znamiennej zmian.

W badaniach przeprowadzonych na starych szczurach obserwowano 30 - 60% spadek liczby neuronów syntetyzujących nNOS w prążkowiu i jądrach okolicy podwzgórza [Cha i wsp. 1998, 2000]. Podobne wyniki przy użyciu reakcji immunohistochemicznej dla NADPH-diaforazy (biochemicznego markera obecności NOS) uzyskali Yamada i wsp. [1996]. Obniżenie poziomu mRNA i białka NOS w mózdzku starczym wykazała również grupa Yu i wsp. [2000]. Na spadek aktywności tego enzymu w mózgu w procesie starzenia wskazują również wyniki innych badań [Mollace i wsp., 1995; Vallebuona i Raiteri, 1995, Paul i wsp., 2005]. Zaobserwowano też, że podczas starzenia maleje zależna od pobudzenia receptora NMDA synteza NO i cGMP [Vallebuona i Raiteri, 1995; Chalimoniuk i Strosznajder, 1998]. Niemniej jednak opublikowano również prace informujące o wzroście ekspresji i aktywności NOS w niektórych regionach mózgu. W 1999 La Porta i Comolli zaobserwowali

wzrost ekspresji mRNA dla nNOS w hipokampie starych szczurów oraz indukcję iNOS [La Porta i Comolli, 1999; Vernet i wsp., 1998]. Wzrost aktywności podstawowej NOS w mózgu starczym był również stwierdzony przez Chalimoniuk i Strosznajder [1998] oraz Jęsko i wsp. [2003]. Ponadto wykazano, że u starych szczurów dochodzi do zwiększenia aktywności NOS w hipokampie, korze mózgu i mózdzku w porównaniu do zwierząt dorosłych [La Porta i Comolli, 1999; Jesko i wsp., 2003]. Natomiast badania przeprowadzone na starczym mózgu ludzkim nie wykazały dotychczas statystycznie znamiennych różnic w ekspresji i aktywności NOS [Blum-Degen i wsp., 1999]. Większość autorów prac dotyczących ekspresji i aktywności NOS w mózgach starczych zgadza się co do faktu, że parametry te są wysoce zmienne w zależności od badanych części mózgu, od rasy zwierząt, stanu ich zdrowia, warunków hodowli oraz warunków przechowywania materiału.

1.2.2. Ekspresja i aktywność sGC i PDE oraz poziom cGMP podczas starzenia się mózgu

Biorąc pod uwagę fakt, że w OUN głównym „receptorem” tlenku azotu, aktywowanym nawet przy bardzo niskich nanomolarnych stężeniach NO, jest sGC [Garthwaite, 1991]; zmiany w syntezie NO zachodzące w procesie starzenia wpływają bezpośrednio na syntezę i poziom cGMP w mózgu.

W badaniach elektrofizjologicznych wykazano, że już u szczurów 7 miesięcznych dochodzi do znacznego obniżenia funkcji przekaźnikowej w układzie NMDA/NO/cGMP w porównaniu do szczurów 3 miesięcznych, co zdaniem autorów pracy tłumaczy gorsze wyniki tych zwierząt w teście labiryntu i leży u podstaw upośledzenia pamięci przestrzennej w procesie starzenia [Piedrafita i wsp., 2007]. Podstawowy poziom cGMP w hipokampie i mózdzku starych (28 miesięcznych) zwierząt jest znacząco obniżony w porównaniu do szczurów dorosłych, natomiast w korze mózgu nie zaobserwowano spadku poziomu cGMP. Przy użyciu niespecyficznego inhibitora PDE, IBMX wykazano że za obniżenie poziomu cGMP odpowiedzialna jest podwyższona aktywność PDE w mózgu starczym [Chalimoniuk i Strosznajder, 1998]. Jednocześnie w tej samej pracy zaobserwowano wzrost aktywności sGC w hipokampie i mózdzku starych szczurów, co wskazuje że

równowaga przemian metabolicznych zostaje przesunięta na korzyść degradacji cGMP. Z drugiej strony wyniki Ibarra i wsp. [2001] sugerują, że w korze i prążkowie starczego ludzkiego mózgu ekspresja sGC jest obniżona w porównaniu z mózgiem dorosłym. Autorzy pracy podejrzewają, że do obniżenia ekspresji sGC i poziomu białka $\alpha 1$ i $\beta 1$ cyklazy guanylanowej może dochodzić w wyniku obumierania komórek produkujących sGC w starczym mózgu. Analiza ekspresji mRNA fosfodiesteraz hydrolizujących cGMP w mózgach osób starych wykazała, że PDE2 i PDE9 są obecne w korze mózgu, prążkowie i hipokampie. W mózgu starczym nie zlokalizowano natomiast PDE5 [Reyes-Irisarri i wsp., 2007].

1.3. Układ cholinergiczny, glutaminianergiczny, pamięć i cGMP

Układami neurotransmiterowymi zaangażowanymi w plastyczność synaptyczną i zdolności poznawcze są układ glutaminianergiczny i układ cholinergiczny. Ten pierwszy bierze udział w procesach LTP i LTD, które są uważane za komórkowe mechanizmy uczenia i pamięci [Watkins i Jane, 2006]. Do wywołania obydwu tych procesów niezbędna jest aktywacja receptorów glutaminianergicznych. Receptory NMDA są zaangażowane w powstawanie plastyczności w synapsach warstw CA1 i CA3 w hipokampie [Silva, 2003]. Podczas długotrwałego wzmocnienia napływ jonów wapnia przez kanały receptorów NMDA wywołuje zwiększenie liczby wbudowanych w błonę postsynaptyczną receptorów AMPA i to właśnie one są odpowiedzialne za przekazywanie potencjałów. Stopień aktywacji receptorów NMDA zależy od zewnątrzkomórkowego stężenia jonów magnezu blokujących receptory. Podczas silnej stymulacji przy wysokim potencjale błony komórkowej dochodzi do aktywacji receptorów AMPA i zależna od napięcia blokada magnezowa zostaje zwolniona, a przyłączenie glutaminianu powoduje napływ jonów wapnia do postsynaptycznych zakończeń nerwowych, tam aktywuje kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny CaMKII, NOS i uwalnianie NO. Jest to bardzo złożony proces, w który zaangażowane są liczne białka zagęszczeń postsynaptycznych w tym PDZ 95. Zagadnienie to omówiono na łamach wielu prac poglądowych [Bear i Malenka, 1994; Contractor i Heinemann 2002; Lynch, 2004; Stanton, 1996] NO jako przekaźnik zwrotny dyfunduje do zakończeń presynaptycznych, gdzie aktywuje sGC, a wysoki

poziom syntezy cGMP dodatkowo stymuluje uwalnianie glutaminianu [Dawson i Snyder., 1994; McDonald i wsp., 2006]. Zablokowanie receptorów NMDA upośledza niektóre rodzaje pamięci u szczurów [Luft i wsp., 2008; Manahan-Vaughan i wsp., 2008; May-Simera i Levin, 2003, Ohno i Watanabe, 1996]. Metabotropowe receptory glutaminianergiczne typu I i II zlokalizowane w korze okołowęchowej uczestniczą w powstawaniu (nabywaniu) pamięci rozpoznawczej [Barker i wsp., 2006]. Ponadto wykazano przy użyciu transgenicznymy myszy, że nadekspresja genu NR2B kodującego podjednostkę receptora NMDA powoduje znaczną poprawę pamięci zwierząt, a wyłączenie genów receptora NMDA w warstwie CA1 hipokampa znacząco upośledza pamięć [Silva, 2003; Nakajima i Tang, 2005]. Agoniści receptora NMDA oraz związki wpływające na jego aktywność takie jak glicyna i D-seryna, jak również agoniści receptora AMPA i receptora kainowego powodują wzrost stężenia cGMP w mózdzku i hipokampie poprzez aktywację nNOS lub eNOS [Danysz i wsp., 1989; Gairthwaite 1991; Mayer i wsp., 1992; Wood i Rao, 1991; Wood i wsp., 1992]. W wyniku stymulacji receptorów metabotropowych następuje uwalnianie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych przy udziale inozytolo(1,4,5) trifosforanu (IP₃), wzrasta aktywność NOS i stężenie cGMP. PKG fosforyluje PKC hamując jej aktywność, co prowadzi do obniżenia aktywności fosfolipazy C (PLC) i zmniejszenia syntezy IP₃. PKG może też fosforylować podjednostki kanałów wapniowych typu L i N i w ten sposób modulować pośrednio uwalnianie neuroprzekaźników [Hell i wsp., 1994; Meriney i wsp., 1994]. Ponadto jony wapnia mogą aktywować fosfolipazę A₂, co powoduje uwolnienie kwasu arachidonowego i eikozanoidów [Phillis i O'Regan, 2004]. Te związki mogą działać jako przekaźniki zwrotne i dyfundując do części presynaptycznej regulować uwalnianie glutaminianu [Danysz i wsp., 1995]. Podczas starzenia mózgu dochodzi do upośledzenia działania układu glutaminianergicznego. Wychwyt zwrotny oraz uwalnianie glutaminianu w mózgu starczym są znacząco obniżone [McEntee i Crook, 1993]. Ponadto w procesie starzenia spada ilość miejsc wiązania ligandów do receptora NMDA [Tamaru i wsp., 1991]. W mózgu starczym obserwuje się również obniżenie ilości postsynaptycznych receptorów NMDA oraz zmniejszenie ich wrażliwości na agonistę i niektóre modulatory. W procesie starzenia nie zmieniają się natomiast receptory AMPA i kwasu kainowego [Tamaru i wsp., 1991]. Układy glutaminianergiczny i cholinergiczny oddziałują pomiędzy sobą za pośrednictwem receptorów nikotynowych [May-Simera i Levin, 2001], muskarynowych [Dudkin i wsp., 1995],

AMPA i NMDA. Neurony cholinergiczne mogą posiadać receptory NMDA, a nawet uwalniać glutaminian. Ponadto neurony glutaminianergiczne pobudzają neurony cholinergiczne za pośrednictwem neuronów histaminergicznych [Philippu i Prast, 2001a]. W korze okołowęchowej mózgu podczas zapamiętywania zapachów i smaków neurotransmisja cholinergiczna odbywa się niezależnie od pobudzenia receptorów AMPA i NMDA [Gutierrez i wsp., 2004]. Z kolei w hipokampie pobudzenie receptorów muskarynowych M2 neuronów w warstwach CA1 i CA3 hamuje aktywność receptorów glutaminianergicznych [Fernández de Sevilla i wsp., 2002; Buno i wsp., 2006]. W formacji Broca i okolicach przegrody środkowej, części przodomózgowia unerwiającej hipokamp i zaangażowanej w procesy poznawcze, neurony cholinergiczne współwystępują z neuronami glutaminianergicznymi i GABAergicznymi. Badania Manseau i wsp. [2005] wykazały, że neurony glutaminianergiczne mogą pobudzać sąsiadujące z nimi neurony GABAergiczne i cholinergiczne, a zablokowanie receptorów glutaminianergicznych w tej części mózgu zaburza procesy uczenia się i pamięci [Izquierdo, 1994].

Jak wykazano w wielu badaniach *in vitro* i *in vivo*, NO może wpływać na uwalnianie acetylocholinę a także glutaminianu [Philippu i Prast, 2001b]. Prawdopodobnie te dwa układy uzupełniają się i współuczestniczą w powstawaniu pamięci, a NO i cGMP funkcjonują jako przekaźniki sygnału w obydwu z nich.

Acetylocholina jest zaangażowana w prawidłowy rozwój kory mózgu i jej aktywność funkcjonalną. Bierze udział w kontroli ukrwienia mózgu, regulacji cyklu snu i czuwania oraz w procesach poznawczych. Wyniki najnowszych prac zwracają uwagę na rolę acetylocholinę w aktywności neuronów w procesach powstawania pobudzenia i skupienia uwagi w mechanizmach niezbędnych dla nabywania pamięci.

Unerwienie cholinergiczne mózgu składa się z neuronów okolicy podstawnej przodomózgowia znajdujących się w polu przyśrodkowym przegrody mózgu, jądrze pasma przekątnego formacji Broca i wielkokomórkowym jądrze podstawnym Meynerta. Do tego układu zaliczamy również neurony cholinergiczne jądra konarowo-mostowego i jądra grzbietowo-bocznego nakrywki. Ponadto interneurony cholinergiczne występują w prążkowie i korze mózgu oraz jądrach nerwów czaszkowych [Semba i Fibiger, 1989; Wainer i wsp., 1993; Aznavour i wsp., 2003].

W mechanizmach uczenia się i pamięci kluczową rolę odgrywają neurony cholinergiczne okolicy podstawnej przodomózgowia, które unerwiają korę mózgową

oraz hipokamp. Neurony cholinergiczne tej części mózgowia są odpowiedzialne za efekty amnestyczne leków antycholinergicznych zarówno u zwierząt, jak i u ludzi [Drachaman i Leavitt, 1974]. W bardzo wielu pracach dowiedziono, że blokowanie muskarynowych receptorów cholinergicznych lub uszkodzenie dróg projekcji cholinergicznej upośledza pamięć badaną różnymi rodzajami testów behawioralnych [między innymi: Roussinov i Yonkov, 1976; Diaz del Guante i wsp., 1991; Fontana i wsp., 1994; Nilsson i Gage, 1993; De-Mello i Carobrez, 2002; Bertaina-Anglade i wsp., 2006], a stymulacja uwalniania acetylocholinę w hipokampie poprawia pamięć [między innymi: Fontana i wsp., 1994; Bejar i wsp., 1999], podobnie jak hamowanie acetylocholinoesterazy [Prickaerts i wsp., 2005].

W procesie fizjologicznego starzenia zmniejsza się ilość i wielkość neuronów cholinergicznych, zmienia się ich morfologia, obniża się ilość receptorów muskarynowych i nikotynowych, zmniejsza się synteza i uwalnianie acetylocholinę oraz wychwyt cholinę. Stwierdzono ponadto obniżenie aktywności acetylotransferazy cholinowej oraz przyspieszenie okresu zanikania LTP w hipokampie. Zmiany te w różnym stopniu przyczyniają się do zaburzeń zdolności poznawczych charakterystycznych dla starzenia [Strosznajder i Mossakowski, 2001; Burke i Barnes, 2006].

Rola acetylocholinę i układu cholinergicznego w procesach poznawczych jest dzisiaj niekwestionowana, podobnie jak udział w tych procesach NO i cGMP. Związek acetylocholinę z cGMP po raz pierwszy opisał Ferendelli i wsp. [1970]. Po podskórnym podaniu agonisty receptorów muskarynowych M1, oksotremoryny myszom zaobserwowano wzrost poziomu cGMP w korze mózgu i mózdzku. Podobny efekt uzyskano po podaniu antagonisty receptorów muskarynowych, atropiny. Podanie agonisty łącznie z antagonistą nie powodowało zwiększenia poziomu cGMP [Ferendelli i wsp., 1970; De Vente, 2004].

Mimo iż od 1970 roku upłynęło już prawie 40 lat, do dzisiaj nie jest całkowicie poznana rola stymulowanej przez acetylocholinę syntezy cGMP w mózgu. Wydaje się, że NO i cGMP umożliwiają interakcje pomiędzy różnymi układami neuroprzekaźnikowymi w mózgu. W jądrze połączone NO i cGMP aktywują uwalnianie acetylocholinę poprzez wzmocnienie uwalniania glutaminianu [Prast i wsp., 1998]. Interneurony cholinergiczne prądkowia uwalniają acetylocholinę po pobudzeniu przez zakończenia glutaminianergiczne przy udziale receptorów

glutaminianergicznymi metabotropowymi [Berg i wsp., 2007] i jonotropowymi [Arruda Paes i wsp., 2004]. Z kolei w korze wzrokowej to unerwienie cholinergiczne i receptory muskarynowe M1 umożliwiają aktywację neuronalną i tak zwane mLTD za pośrednictwem receptorów NMDA. Ten rodzaj plastyczności synaptycznej stanowi mechanizm cholinergicznej modyfikacji przekaźnictwa glutaminianergicznego i umożliwia przekazywanie informacji wzrokowej niezbędnej dla powstawania pamięci [McCoy i McMahon, 2007]. Mechanizm mLTD podczas którego dochodzi do długotrwałej depresji synaps CA3 – CA1 za pośrednictwem receptorów muskarynowych M1, zachodzi w hipokampie. Ten rodzaj plastyczności jest zależny od pobudzenia i aktywacji receptorów NMDA i składają się na niego długotrwałe pobudzenie (LTP) wywołane przez stymulację o wysokiej częstotliwości i LTD indukowane przez stymulację o niskiej częstotliwości. Chociaż podczas mLTD w tej części hipokampa agonista receptorów muskarynowych indukuje LTD za pośrednictwem mechanizmów innych niż aktywacja receptorów NMDA [McCutchen i wsp., 2006].

W badaniach immunohistochemicznych oraz badaniach ekspresji genów wykazano, że neurony cholinergiczne podstawy przodomózgowia syntetyzują NOS [Vincent i Kimura, 1992; Sugaya i McKinney, 1994], a także że poziom ekspresji NOS w komórkach cholinergicznym jest regulowany przez NGF [Holtzman i wsp., 1994]. Natomiast interneurony cholinergiczne kory mózgu nie wykazują obecności NOS [Vincent i Kimura, 1992]. Aktywacja NOS w komórkach cholinergicznym może zachodzić za pośrednictwem receptorów NMDA [Garthwaite, 1991; Garthwaite i Boulton, 1995]. Można byłoby oczekiwać, że aktywacja receptorów muskarynowych prowadzi do aktywacji NOS, syntezy NO i produkcji cGMP, ale mechanizm taki zaobserwowano jak narazie tylko w hodowlach komórkowych [Castoldi i wsp., 1993; De Vente, 2004].

Badano również wpływ aktywności transferazy acetylocholinowej na poziom cGMP i wykazano że zwiększenie aktywności transferazy powoduje podniesienie poziomu cGMP [Wiemer i wsp., 1989]. W doświadczeniach na skrawkach mózgu dowiedziono, że agoniści receptorów muskarynowych zwiększają poziom cGMP [Black i wsp., 1979; Nordstrom i wsp., 1983], zwłaszcza w regionie CA3 hipokampa [Kinnier i wsp., 1980]. W licznych doświadczeniach wykazano, że agoniści i antagoniści receptorów muskarynowych mogą stymulować syntezę cGMP w różnych regionach mózgu wielu

gatunków zwierząt [De Vente, 2004]. Taka obserwacja sugeruje, że za podniesienie poziomu cGMP w tych dwóch przeciwstawnych sytuacjach, zaangażowane są różne mechanizmy, a konkretnie różne rodzaje receptorów muskarynowych. Możliwe, że atropina zwiększa poziom cGMP w części presynaptycznej zakończeń neuronów cholinergicznym przez blokowanie autoreceptorów M2. Z drugiej strony agoniści receptorów cholinergicznym mogą stymulować syntezę cGMP w części postsynaptycznej za pośrednictwem receptora M3 [Tonnaer i wsp., 1991]. Wykazano również, że NO/cGMP/PKG wpływają na zwiększenie uwalniania acetylocholiny [Trabace i Kendrick, 2000], między innymi w rejonie mózgu odpowiedzialnym za powstawanie pobudzenia [Lydic i wsp., 2006].

W 2000 roku wykazano po raz pierwszy w badaniach poziomu immunoreaktywności cGMP, że NO zwiększa poziom cGMP w interneuronach cholinergicznym kory i prądkowia oraz we włóknach projekcji cholinergicznym neuronów przedmózgowia dorosłych szczurów [De Vente i wsp., 2000 i 2001].

1.3.1. Modyfikacja ścieżki sygnałowej NO/cGMP w badaniach procesów uczenia się i pamięci.

Zdolność do zapamiętywania nowych informacji jest niezwykle istotna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zaburzenia mechanizmów uczenia się i pamięci przejawiają się w postaci różnych schorzeń, od łagodnych ubytków pamięci charakterystycznych dla fizjologicznego starzenia, aż do poważnych demencji takich jak choroba Alzheimera. Zrozumienie mechanizmów komunikacji komórkowej, które leżą u podstaw powstawania pamięci jest bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia. W 1957 roku Scoville i Milner wykazali, że hipokamp odgrywa ważną rolę w powstawaniu pamięci. Usunięcie tej struktury mózgu powoduje utratę możliwości zapamiętywania nowych wiadomości. Pomimo kontrowersji na temat mechanizmów powstawania pamięci, generalnie przyjmuje się, że przechowywanie informacji w mózgu jest zależne od siły połączeń synaptycznych pomiędzy neuronami. Procesem leżącym u podstaw uczenia się i pamięci na poziomie komórkowym jest długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) [Bliss i Lomo, 1973]. LTP polega na wzmocnieniu przekazywania sygnału z neuronu do neuronu. Dzięki modyfikacji funkcjonalnych połączeń pomiędzy komórkami wzrasta efektywność przekazywania sygnału

między nimi. Informacja docierająca z komórki presynaptycznej wywołuje odpowiedź w części postsynaptycznej, również komórka presynaptyczna dzięki przekaźnikom zwrotnym odbiera informacje od neuronu postsynaptycznego i w ten sposób rozpoczyna się proces wzmocnienia synaptycznego. Dzieje się tak w wyniku częstego pobudzania synapsy - połączenia częściej używane stają się silniejsze. Przekaznikiem zwrotnym umożliwiającym efektywne przekazywanie informacji z części postsynaptycznej do presynaptycznej w wyniku pobudzenia receptorów glutaminianergicznych NMDA jest NO. Zahamowanie syntezy NO przez inhibitory NOS lub zastosowanie wiążącej NO hemoglobiny, hamuje LTP w skrawkach hipokampa [Bohme i wsp., 1991; Schuman i Madison, 1991; Bon i wsp., 1992]. Ponadto wykazano, że zahamowanie aktywności sGC oraz PKG również zaburza LTP [Zhuo i wsp., 1994; Monfort i wsp., 2002; Bon i Gartwaite, 2003]. Zastosowanie donorów NO lub analogów cGMP stymuluje LTP [Zhuo i wsp., 1994; Arancio i wsp., 1995]. Monfort i wsp. [2002] wykazali, że do wywołania LTP niezbędna jest aktywacja sGC, synteza cGMP i aktywacja PKG, a następnie hydrolizujących cGMP fosfodiesteraz. Mimo iż z przedstawionych prac wynika jasno, że NO/cGMP/PKG są niezbędne dla funkcjonowania LTP; należy wspomnieć że rola NO w tym procesie jest cały czas dyskutowana. Istnieje kilka prac, które nie potwierdzają udziału NO w LTP [między innymi Kleppisch i wsp., 1999] . Autorzy badań podejrzewają, że sprzeczność wyników jest spowodowana używaniem różnych szczepów zwierząt oraz procedur doświadczalnych [Son i wsp., 1998; Holscher, 2002].

Silne argumenty za udziałem NO i cGMP w procesach poznawczych pochodzą z badań behawioralnych, podczas których analizuje się działanie rozmaitych substancji wpływających na procesy zależne od NO/cGMP. Pierwszy dowód na udział NO w powstawaniu pamięci pochodzi z 1992 roku. Podczas testu biernego unikania przeprowadzonego na młodych kurczętach Holscher i Rose [1992] wykazali, że zahamowanie aktywności NOS przez N-nitro-L-argininę (NNLA) hamuje powstawanie pamięci długotrwałej, a jednoczesne podanie substratu NOS, L-argininy przywraca zwierzętom możliwość zapamiętywania. Badania na bezkręgowcach wykazały, że zahamowanie NOS upośledza uczenie warunkowane u ślimaków [Teyke, 1996; Katzoff i wsp., 2002], zapamiętywanie wzrokowe i dotykowe u ośmiornic [Robertson i wsp., 1994], pamięć węchową u pszczół [Muller, 1996; Hosler i wsp., 2000] oraz pamięć przestrzenną u świerszczy [Jaffe i Blanco, 1994]. U dorosłych ssaków zahamowanie syntezy NO powoduje upośledzenie pamięci

związanej z powonieniem u owiec [Kendrick i wsp., 1997] i pamięci rozpoznawczej u szczurów [Prickaerts i wsp., 1997; Blokland i wsp., 1998; Pitsikas i wsp., 2002], procesów uczenia się u nowourodzonych szczurów [Myslivecek i wsp., 1996; Samama i Boehm 1999], pamięci przestrzennej u dorosłych szczurów [Bohme i wsp., 1993; Choopani i wsp., 2008; Yamada i wsp., 1995; Zou i wsp., 1998], pamięci socjalnej [Bohme i wsp., 1993], pamięci badanej w teście pasywnego unikania u szczurów [Bernabeu i wsp., 1995; Fin i wsp., 1995; Huang i Lee, 1995] i myszy [Baratti i Kopf, 1996] oraz znacząco zaburza zdolności poznawcze u małą [Prendergast i wsp., 1997; Prast i Philippu, 2001]. Wszystkie te odkrycia jasno potwierdzają kluczową rolę jaką odgrywa NO w procesach uczenia się i pamięci, a ponadto dowodzą, że jego rola jest ewolucyjnie zachowana u wielu gatunków zwierząt. W badaniach procesów poznawczych u szczurów najczęściej stosuje się dwa testy behawioralne – test pamięci rozpoznawczej i test biernego unikania. W teście pamięci rozpoznawczej bada się czy zwierzę pamięta obiekt, który został mu zaprezentowany podczas 1 sesji poznawczej po upływie określonego okresu czasu. Test biernego unikania polega na badaniu czy szczur zapamiętał negatywny bodziec w postaci impulsu elektrycznego. W obydwu rodzajach testów pamięci wykazano, że decydujące znaczenie ma czas podania inhibitora NOS. Do zaburzenia pamięci dochodzi tylko jeżeli inhibitor NOS zostanie podany bezpośrednio przed sesją poznawczą lub bezpośrednio po niej, zastosowanie inhibitorów na innych etapach doświadczenia nie ma wpływu na pamięć zwierząt [Bernabeu i wsp., 1995; Fin i wsp., 1995; Blokland i wsp., 1998], podobnie zastosowanie inhibitorów sGC upośledza pamięć tylko jeżeli następuje bezpośrednio po sesji poznawczej [Bernabeu i wsp., 1997]. W badaniach biochemicznych wykazano, że aktywność NOS, sGC oraz poziom cGMP i aktywność PKG ulega podwyższeniu w hipokampie bezpośrednio po 2 sesji testu biernego unikania, w której bada się pamięć szczurów [Bernabeu i wsp., 1995; Bernabeu i wsp., 1996; Bernabeu i wsp., 1997]. Na podstawie przytoczonych prac można stwierdzić, że NO oraz sGC i cGMP są zaangażowane w powstawanie pamięci.

Pierwsze doświadczenia, które wykazały rolę PDE w procesach poznawczych przeprowadzono na muszce owocowej *Drosophila melanogaster*. W 1976 roku zidentyfikowano gen o nazwie *dunce* związany z upośledzeniem pamięci u muszek [Dudai i wsp., 1976], później okazało się, że jest to gen który koduje PDE4 hydrolizującą cAMP [Byers i wsp., 1981]. Dzisiaj wiadomo, że gen ten ma swój

homolog u ludzi [Swinnen i wsp., 1989; Monaco i wsp., 1994]. Inna mutacja zaburzająca zdolności poznawcze u *Drosophila melanogaster* występuje w genie rutabaga i prowadzi do zmian w aktywności cykazy adenylanowej [Feany, 1990], podobnie mutacja o nazwie amnesiac upośledza syntezę cAMP [Feany i Quinn, 1995].

Badania roli fosfodiesteraz w procesach poznawczych u dorosłych ssaków rozpoczęto od badań na szczurach. Roussinov i Yonkov [1976] wykazali, że niespecyficzny inhibitor PDE, kofeina poprawia pamięć przestrzenną analizowaną przy użyciu testu labiryntu, a ponadto dowiedli przy użyciu skopolaminy, że w powstawanie pamięci przestrzennej zaangażowany jest układ cholinergiczny. U myszy zastosowanie niespecyficznego inhibitora PDE, IBMX [Villiger i Dunn, 1981] lub papaweryny [Chutae, 1981] oraz selektywnego inhibitora PDE4, RO-20-1724 [Villiger i Dunn, 1981] prowadzi do poprawy pamięci ocenianej przez test biernego unikania. Badania Prickaerts i wsp. [1997] wykazały, że zaprinast, inhibitor PDE5 hydrolizującej cGMP, poprawia pamięć rozpoznawczą u dorosłych szczurów oraz jest w stanie przywrócić zdolność do zapamiętywania obiektu upośledzoną przez podanie zwierzętom inhibitora NOS. Zaobserwowano również, że podanie analogu cGMP (ale nie cAMP) bezpośrednio do hipokampa po sesji poznawczej poprawia wyniki dorosłych szczurów w teście pamięci rozpoznawczej [Prickaerts i wsp., 2002a] oraz teście biernego unikania [Bernaubeu i wsp., 1996]. Na podstawie wyników uzyskanych dla inhibitorów PDE5 można stwierdzić, że cGMP jest zaangażowany głównie we wczesne etapy konsolidacji pamięci w hipokampie zwierząt dorosłych. Stwierdzono, że inhibitory PDE5 podnoszą poziom cGMP w hipokampie, a także że ich wpływ na pamięć jest silnie zależny od czasu podania [Prickaerts i wsp., 2002b; Prickaerts i wsp., 2004; Prickaerts i wsp., 2005]. W badaniach na dorosłych szczurach i myszach dowiedziono również, że selektywne zahamowanie hydrolizującej cGMP PDE2 poprawia pamięć socjalną, rozpoznawczą i przestrzenną zwierząt [Boess i wsp., 2004].

2. Założenia i cele pracy

Tlenek azotu i cykliczny GMP są ważnymi przekaźnikami informacji międzykomórkowej i wewnątrzkomórkowej. Związki te biorą udział w wielu procesach fizjologicznych oraz patologicznych zachodzących w mózgu. Od dawna badane jest ich znaczenie w procesach poznawczych. Z dotychczasowych badań wiadomo, że NO i cGMP biorą udział w długotrwałej depresji synaptycznej i długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym. Wykazano również, że analogi cGMP oraz inhibitory hydrolizujących go fosfodiesteraz poprawiają zdolności poznawcze dorosłych zwierząt, a inhibitory syntazy tlenu azotu oraz leki antycholinergiczne upośledzają pamięć.

Układ glutaminianergiczny i cholinergiczny mózgu są kluczowymi dla prawidłowego funkcjonowania mechanizmów pamięci i uczenia się. Związek pomiędzy cGMP a funkcją układu cholinergicznego nie jest do końca poznany. Faktem jest, że w dorosłym mózgu cGMP jest obecny niemal wyłącznie w neuronach i włóknach układu cholinergicznego oraz w mniejszym stopniu w neuronach glutaminianergicznych oraz GABAergicznych kory mózgu. Wzmacnianie ścieżki sygnałowej NO/cGMP pozwala przywrócić zdolności poznawcze upośledzone przez hamowanie układu cholinergicznego.

Podczas procesu starzenia się organizmu w mózgu zachodzi wiele zmian, skutkujących między innymi obniżeniem możliwości poznawczych i spadkiem plastyczności neuronalnej. W badaniach procesów molekularnych związanych ze starzeniem się mózgu wykazano, że aktywność syntazy NO (NOS) oraz poziom NO wzrasta u starych zwierząt, niemniej jednak poziom cGMP jest w mózgu starym obniżony, a zdolności poznawcze starych zwierząt są mniejsze niż możliwości osobników dorosłych.

Enzymami odpowiedzialnymi za obniżanie poziomu cGMP są fosfodiesterazy (PDE). W mózgu poziom cGMP kontrolują głównie trzy izoformy PDE2, PDE5 i PDE9 oraz pośrednio NOS poprzez uwalnianie NO niezbędnego do syntezy cGMP przez rozpuszczalną izoformę cyklazy guanylanowej (sGC).

Dotychczasowy poziom wiedzy na temat znaczenia NO i cGMP podczas starzenia mózgu jest niewystarczający dla zrozumienia procesów prowadzących do upośledzenia możliwości poznawczych, co skłoniło nas do podjęcia próby

wyjaśnienia procesów wpływających na poziom cGMP w mózgu starczym oraz zbadania możliwości podniesienia jego stężenia u starych zwierząt. Ponadto zdecydowanie lepiej zbadane jest znaczenie NO i cGMP w układzie glutaminianergicznym, niż cholinergicznym.

Celem prowadzonych badań było sprawdzenie zdolności układu cholinergicznego mózgu szczura do syntezy cGMP na szlaku zależnym od NO na różnych etapach rozwoju zwierząt oraz podczas starzenia. Ponadto poznanie mechanizmów prowadzących do obniżenia poziomu cGMP w mózgu starczym. Cel badań obejmował także analizę wpływu selektywnego zahamowania fosfodiesteraz 2 i 5 na poziom immunoreaktywności cGMP oraz na pamięć rozpoznawczą szczurów i aktywność NOS w różnych częściach mózgu w procesie starzenia.

Wyznaczono następujące cele szczegółowe:

1. Zbadanie poziomu immunoreaktywności cGMP w układzie cholinergicznym z uwzględnieniem formacji Broca, przegrody środkowej, prążkowiec i hipokampa w skrawkach mózgu szczurów 1, 4, 10, 21 dniowych, 3 i 24 miesięcznych (odpowiednio dorosłych i starych) i przeprowadzenie analizy porównawczej zdolności tego układu do syntezy cGMP na różnych etapach rozwoju i starzenia mózgu.
2. Analiza ekspresji *in situ* mRNA fosfodiesteraz 2, 5 i 9 w skrawkach mózgu zwierząt dorosłych i starych.
3. Określenie wpływu selektywnych inhibitorów PDE 2 i 5 na poziom immunoreaktywności cGMP w badanych regionach mózgu zwierząt dorosłych i starych.
4. Zbadanie wpływu selektywnych inhibitorów PDE2 i PDE5 na pamięć rozpoznawczą szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych oraz aktywność podstawową NOS w hipokampie, prążkowiec i korze mózgu. Ponadto określenie wpływu selektywnego inhibitora neuronalnej izoformy NOS na pamięć rozpoznawczą i aktywność NOS u szczurów 24 miesięcznych poddanych działaniu inhibitora PDE2.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał doświadczalny

Badania przeprowadzono na samcach szczurów szczepów Wistar, Lewis i Fisher. W badaniach przeprowadzonych na początku niniejszej pracy wykazano, że użyte szczepy szczurów nie różnią się pod względem badanych procesów.

Do doświadczeń używano zwierzęta z następujących grup wiekowych:

- P1 – (postnatal 1), szczury jednodniowe,
- P4 – szczury czterodniowe,
- P10 – szczury dziesięciodniowe,
- P21 – szczury dwudziestojednodniowe,
- młode – dorosłe; szczury 3 miesięczne o masie ciała około 300g, stare – dorosłe; szczury 12 miesięczne o masie ciała około 500g, stare; szczury 24 miesięczne o średniej masie ciała około 600g.

Każdy wariant eksperymentu przeprowadzono przy użyciu od 3 do 10 zwierząt z każdej grupy wiekowej. Zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej w IMDiK PAN, w Warszawie, lub z hodowli prowadzonej na Uniwersytecie w Maastricht w Holandii. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności oraz wolnego dostępu do wody i pożywienia. Doświadczenia z udziałem zwierząt były wykonywane zgodnie z zasadami prawa etycznego, zgodnego z Konwencją Europejską na podstawie zezwolenia wydanego przez I Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, z siedzibą w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

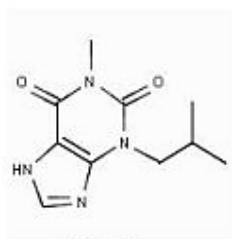
3.2. Charakterystyka inhibitorów fosfodiesteraz oraz nNOS

Inhibitory PDE:

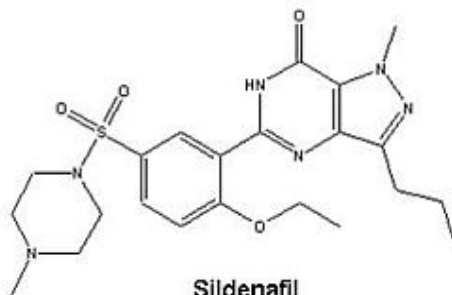
- a) IMBX** (Janssen Chimica) - 3-izobutylo-1,1-metylenoksantyna, nieselektywny inhibitor PDE, oprócz PDE8 i PDE9 ($IC_{50} = 2-50 \mu M$); stosowany *in vitro* w stężeniu 1 mM [Beavo i wsp., 1970],
- b) sildenafil** (Bayer AG) - 1-[4-etoksy-3-(6,7-dihydro-1-metylo-7-okso-3-propylo-1H-pirazolo[4,3-d]pirymidyn-5-ylo)fenylosulfonylo]-4-metylopiperazyna, inhibitor PDE5 o wartości $IC_{50} = 33 \mu M$; stosowany *in vitro* w stężeniach 1 μM lub 10 μM ,
- c) zaprinast** (Merck) - 1,4-Dihydro-5-(2-propoksyfenylo)-7H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidyn-7-on, inhibitor PDE5 o wartości IC_{50} dla PDE5 = 0.8 μM , w wyższych stężeniach hamuje również PDE9 ($IC_{50} = 35 \mu M$); podawany podskórnie w dawce 0,3mg na kilogram masy ciała, rozpuszczony w DMSO . [Gillespie i Beavo, 1989; Burns i wsp., 1992; Lugnier i wsp., 1992; Dundore i wsp., 1993; Pagani i wsp., 1993; Fisher i wsp., 1998],
- d) Bay 60-7550** (Alexis Biochemicals), [2-(3,4-Dimetoksybenzylo)-7-[(1R)-1-[(1R)-1-hydroksyetylo]-4-fenylbutyl]-5-metylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(3H)-on] selektywny inhibitor PDE2 ($IC_{50} = 5nM$); podawany podskórnie w dawce 0,3mg na kilogram masy ciała, rozpuszczony w DMSO, w badaniach *in vitro* stosowany w stężeniu 0,1 μM [Boess i wsp. 2004].

Inhibitor nNOS:

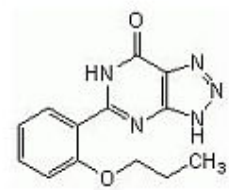
- a) NAAN** (nNOS Inhibitor I Calbiochem) (4S)-N-(4-Amino 5[aminoetyl]aminopentyl)-N'-nitroguanidina, ($K_i = 120 nM$), selektywny inhibitor neuronalnej izoformy NOS; podawany podskórnie w dawce 1mg na kilogram masy ciała, rozpuszczony w DMSO [Hah i wsp., 2001].



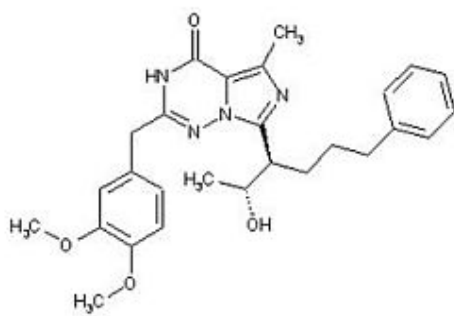
IBMX



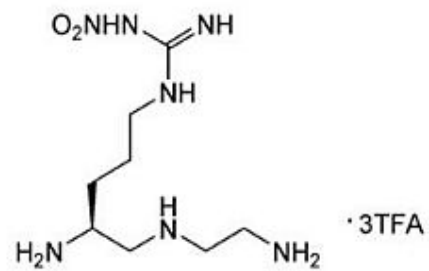
Sildenafil



Zaprinast



Bay 60-7550



NAAN

Rycina 9. Wzory chemiczne inhibitorów PDE i nNOS użytych podczas badań *in vitro* i *in vivo*.

3.3. Badania *in vitro*

3.3.1. Metody radiochemiczne

3.3.1.1. Pomiar aktywności NOS

Wyjściowym materiałem do badań aktywności podstawowej NOS był hipokamp, prążkowie oraz kora mózgu 3, 12 i 24 miesięcznych szczurów szczepu Wistar. Analizowano wpływ zahamowania PDE2 oraz PDE5 *in vivo* na aktywność NOS w wybranych częściach mózgu. Po przeprowadzeniu testów behawioralnych (z użyciem inhibitorów PDE) zwierzęta dekapitowano, błyskawicznie schładzano głowę i, w temperaturze 4 C, wydobywano mózg, usuwano naczynia krwionośne i substancję białą, izolowano hipokamp, prążkowie i korę mózgu. Tkanekę homogenizowano w buforze 50mM Tris-HCl, pH 7.4 z 0,32M sacharozą i z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz „Complete TM” (Roche Diagnostics GmbH). Homogenat odwirowywano z prędkością 10000 g przez 15 minut. Nadsączczyli zgrubną frakcję cytozolową używano do doświadczeń. Zawartość białka w preparacie oznaczano metodą Lowry’ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina [Lowry i wsp., 1951].

Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 300µl zawierała 50mM Tris-HCl pH 7.4, [U-¹⁴C] L-argininę ($2,8 \times 10^5$ dpm), 100µM, 2mM CaCl₂, 1µM kalmodulinę, 15µM FAD, 10µM tetrahydrobiopterynę, 1mM NADPH, 1mM EDTA, 1mM ditiotreitól i 200µg białka. Inkubację prowadzono w łaźni wodnej z wytrząsaniem przez 20 minut, w 37⁰C. Reakcję przerywano 1ml 100mM Tris pH 5.5 z 10mM EDTA i następnie mieszaninę wirowano. Produkt reakcji, [¹⁴C] cytrulina była eluowana dwukrotnie 1ml H₂O na kolumnach Dowex™ 50WX-8. Radioaktywność 0,5ml próby była mierzona w 8ml płynu scyntylicyjnego Braya w liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1407.

3.3.2. Metody immunohistochemiczne

3.3.2. 1. Badanie poziomu cGMP w skrawkach mózgu

3.3.2.1.1. Przygotowanie skrawków i znakowanie przeciwciałami

Wyjściowym materiałem do badań immunoreaktywności cGMP były mózgi szczurów. Zwierzęta dekapitowano, błyskawicznie schładzano głowę i, w temperaturze 4°C, izolowano mózg, a następnie zanurzano w lodowatym buforze Krebsa-Ringera (pH 7,4) stale nasycanym karbogenem i w stałej temperaturze 4°C cięto na 400µm skrawki (od Bregmy 2.20 do Bregmy -0.26) przy pomocy urządzenia Campden Integraslice 7550 PSDS wyposażonego w nóż ceramiczny.

Zgodnie z metodą opisaną przez De Vente i wsp. [2000] oraz K.Domek - Łopacińska i wsp. [2005], uzyskane skrawki mózgu zbierano i umieszczano w stale nasycanym karbogenem buforze Krebsa-Ringera pH 7,4 w temperaturze pokojowej na 15 minut. Następnie przenoszono je do wypełnionych buforem Krebsa 6 dołkowych szalek (do hodowli komórek) i powoli podnoszono temperaturę do 36°C. Skrawki inkubowano przez 40 minut z 1mM IBMX, przez ostatnie 10 minut również w obecności donora NO, 100µM DEANONO.

W celu zbadania znaczenia PDE2 i PDE5 u zwierząt dorosłych i starych skrawki mózgu szczurów 3 i 24 miesięcznych inkubowano odpowiednio z 0,1 µM Bay 60-7550 i/lub z 10 µM sildenafilem. Dla oceny wpływu agonisty receptorów cholinergicznych, karbacholu na poziom IR-cGMP skrawki mózgu zwierząt dorosłych i starych inkubowano przez 40 minut w buforze Krebsa-Ringera, przez ostatnie 10 minut w obecności 10 µM karbacholu, bez donora NO, DEANONO.

Po zakończeniu inkubacji utrwalano skrawki za pomocą świeżo depolimeryzowanego 4 % paraformaldehydu (PFA) z 3% kwasem pikrynowym w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7.4. Utrwalanie prowadzono przez 30 minut w 4°C. Na następne 1,5 godziny skrawki umieszczano w utrwalaczu z dodatkiem 10% sacharozy. Po upływie 2 godzin skrawki dalej inkubowano w temperaturze 4°C przez noc, w roztworze 10% sacharozy w 0,1 M buforze fosforanowym dla odpłukania

paraformaldehydu. Następnego dnia skrawki umieszczano na szkiełkach i zamrażano w CO₂, a następnie cięto na skrawki 10µm przy użyciu kriostatu w temperaturze -20⁰C. Do dalszych badań uzyskiwano skrawki kriostatowe z wewnętrznych 300 µm pierwotnego skrawka mózgu. Skrawki 10 µm umieszczano na szkiełkach i suszono przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie szkiełka płukano 3 razy po 5 minut w buforze TBS (50mM Tris - Hcl pH 7.5, 0.5M NaCl) i inkubowano przez noc w komorze wilgotnej, w 4⁰C z owczym przeciwciałem przeciwko cGMP (utrwalonemu PFA) [Tanaka i wsp., 1997] (w rozcieńczeniach 1:8000 lub 1:4000 w TBS z 0.3% Triton-X-100) oraz z króliczym przeciwciałem przeciwko pęcherzykowemu transporterowi acetylocholino (vAChT) w stężeniu 1:2000 (Chemicon). Następnego dnia prowadzono reakcję z przeciwciałami drugorzędowymi, stosując ośle IgG antyowcze skoniugowane z fluoresceiną Alexa 488 (Molecular Probes). Do detekcji przeciwciała króliczego użyto oślego IgG antykróliczego skoniugowanego z fluoresceiną CY-3 (Jackson). Po zakończeniu znakowania przeciwciałami szkiełka osuszano i zamykano w roztworze 80% glicerolu w PBS. W celu potwierdzenia specyficzności uzyskanych obrazów dla wszystkich grup doświadczalnych wykonano preparaty kontrolne, bez pierwszych przeciwciał.

3.3.2.1.2. Analiza w mikroskopie i liczenie komórek

Skrawki mózgu wyznakowane przeciwciałami analizowano w badaniu mikroskopowym przy użyciu aparatu firmy Olympus AX70. Do analizy oraz liczenia komórek wybierano 10 z serii 30 skrawków mózgu każdego badanego zwierzęcia. Formację Broca i okolice przegrody fotografowano z 10 krotnym powiększeniem, prążkowie fotografowano obiektywem powiększającym 20 krotnie. Zdjęcia wykonywano przy użyciu programu AnalySIS®. Uzyskane w ten sposób czarnobiałe fotografie immunoreaktywności cGMP i vAChT (16 bitowe zawierające 4095 tonów szarości) nakładano na siebie i konwertowano do obrazów kolorowych (zielony dla cGMP, czerwony dla vAChT). Dzięki temu komórki, w których zaobserwowano kolokalizację cGMP i vAChT były łatwo widoczne (jako żółte). Podczas liczenia komórek w razie wątpliwości odnoszono się do oryginalnych obrazów czarnobiałych.

Zdjęcia hipokampów uzyskano w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 510, przy użyciu laserów argonowego 488 dla detekcji Alexa 488 (cGMP) i helowo-neonowego 543 dla uwidocznienia CY-3 (vAChT) w programie Zeiss LSM 510.

Jako komórki cholinergiczne oceniano te, w których wykryto obecność znacznika vAChT. Do określenia liczby komórek cholinergicznych wykazujących pozytywną reakcję immunohistochemiczną dla cGMP na różnych etapach rozwoju mózgu wyznakowano co 3 skrawki kriostatowy (serię 10 skrawków dla każdego badanego mózgu), tak aby nie liczyć tej samej komórki dwukrotnie. Celem nie było określenie liczby wszystkich komórek cholinergicznych w formacji Broca, okolicach przegrody i w prążkowie, ponieważ zastosowana metoda nie umożliwia takiej dokładności. Podczas otrzymywania skrawków mózgu dochodzi do niewielkiej utraty tkanki.

Policzono całkowitą liczbę komórek wyznakowanych przeciwciałem przeciwko vAChT w badanych regionach mózgu, a liczbę komórek cholinergicznych wykazujących immunoreaktywność dla cGMP wyrażono jako procent wszystkich komórek w których wykazano obecność znacznika vAChT (cholinergicznych) [Domek-Łopacińska i wsp., 2005].

3.3.3. Metody analizy ekspresji genów

3.3.3.1. Badanie poziomu mRNA dla fosfodiesteraz cGMP (PDE2, PDE5 i PDE9) metodą hybrydyzacji *in situ*

Ekspresję fosfodiesteraz badano w mózgach 3 miesięcznych samców szczurów rasy Lewis i 24 miesięcznych samców szczurów rasy Fisher. Wszystkie etapy doświadczenia przeprowadzono w warunkach wolnych od RNAz.

Zwierzęta dekapitowano, mózgi izolowano na lodzie, błyskawicznie zamrażano w CO₂ i przechowywano w temperaturze -70°C, do czasu wykonania skrawków kriostatowych. Zamrożone mózgi cięto w kriostacie na 14 µm skrawki i umieszczano na specjalnych szkiełkach SuperFrost Plus (Menzel-Glaser, Germany). Hybrydyzację *in situ* przeprowadzono na co trzecim skrawku 14 µm prążkowie i kory czołowej mózgu, oznaczono mRNA za pomocą sond sensownych i antysensownych dla

PDE2, PDE5 i PDE9 według metody opracowanej przez van Staveren i wsp. [2003] oraz van Staveren i Markerink van Ittersum [2005] .

Dla PDE2 używano sond RNA komplementarnych do sekwencji PDE2A (nukleotydy od 1964-2314, numer w GenBank NM_031079):

```
ctaccacaactggatgcacgccttctctgtctctcacttttgctacttgctctacaagaatctggagctctccaactacctcg  
aggacatcgagatctttgctgtgtttatttctgcatgtgtcacgacctggaccacagaggcacaacaactcctccag  
gtggcctcgaaatctgtgctggctgactctacagctcagagggctctgtcatggagaggcaccactttgctcaggcca  
ttgctatcctcaacacctatggctgtaatatctttgaccacttctctcggaaggactatcagcgaatgctggacctgatga  
gggacatcatcttgccacggacctggcacaccac
```

Dla PDE5 używano sond RNA komplementarnych do sekwencji PDE5A (nukleotydy od 2206 do 2580, numer w GenBank D89093):

```
ccttaacacggcacagtgcatgtttgctgctctgaaagcaggcaagattcagaacaagttgacggatctggagacgc  
ttgcattgctgattgccgcttaagccatgatttgaccatcgtggtgtgaacaactcatacacagcggagcgcgagcac  
cccctggcccagctgtactgccactccaccatggagcaccatcacttcgaccagtgtgtatggttctaaacagccca  
ggcaaccagatcctcagtgccctctccattgaagaatataagaccacattgaaaataatcaagcaagcaattttagcc  
actgacctagcactgtacattaagagacgaggagaatTTTTgaactataagaaaaaatgaattc
```

Dla PDE9 używano sond RNA komplementarnych do sekwencji PDE9A1 (nukleotydy od 10 do 828, numer w GenBank AF031147):

```
atgggggcccggctcctcaagctaccggcccaaggccatctacctagacatcgatggacgatccagaaggtggtttt  
cagcaagtactgcaactccagtgacatcatggacctgttctgtatcgccaccggcctgcctcggaacaccaccatctc  
cctttaaccacagacgacgccatggtctccatcgatcccaccatgcctgcaattcagagcgcactccctacaaggt  
gagacctgtggctgtgaagcaagtgtctgaacgagaagaacttatccagggcgtgctggcccaggtggcggaaaca  
tttccagagcgttaagatcaacgagctgaaagccgaagtgcaaatcacctggccgtgctggagaaacgggtgga  
attggaaggacttaaagtggaggatcgaaaaatgcaagagtgacattaaaaagatgcgggaggagtggcagct  
aggaacagcaggaccaactgtccatgtaaatacagtttttgataacaagaagttgacacctcgacgtgatgtcccc  
acttaccacaagtacctgctctcccagagaccatcgaagccctacggaagcccactttgatgtctggctttgggaac  
ccaacgagatgctgagctgtttagaacatgtaccacgacctgtggtctggtcagggacttcagcatcaaccaatcac  
gctccgcaggtggctgctctgtgtgcatgacaactacaggaacaaccctccacaactccggcactgcttctgtgtga  
cacagatgatgtacagtatggctctggctctgtggcctcca
```

Preparaty rozmrażano przez 10 minut w 50 °C a następnie utrwalano przez 20 minut 4% PFA w 0,1 M PBS w temperaturze pokojowej, po zakończeniu utrwalania odpłukiwano PFA przez trzykrotne płukanie PBS. Następnie preparaty inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej w 0,1 M trietanoloaminie z 0,25% bezwodnikiem kwasu octowego. Po inkubacji preparaty płukano dwukrotnie buforem 2x SSC (0,3M NaCl, 0,03M cytrynian sodu, pH 7,0) przez 5 minut, a następnie płukano w 37 °C buforem 2x SSC z 50% formamidem.

Hybrydyzację prowadzono w komorze wilgotnej w temperaturze 55 °C przez noc, pod szkiełkami nakrywkowymi. Użyto 100 µl mieszaniny hybrydyzacyjnej, która składała się z: 50% dejonizowanego formamidu, DNA (ze spermy łososia) w stężeniu 250 µg/ml, 1mg/ml tRNA, 10% siarczan dekstranu, bufor 2x SSC, 1x roztwór Denhardt'a, 300 ng/ml sondy RNA znakowanej dioksygeniną. Po hybrydyzacji preparaty płukano w buforze 2x SSC, 1x SSC i 0,1x SSC z dodatkiem 50% formamidu w temperaturze 55 °C przez 20 minut. Następnie, w celu usunięcia niezhybrydyzowanej jednoniciowej sondy, preparaty poddano działaniu RNAzy T1 (2U/ml, Roche) w buforze 2x SSC z 1mM EDTA przez 15 minut w temperaturze 37 °C. RNAzę odpłukano przez 20 minut w buforze 2x SSC w 55 °C. Następnie preparaty płukano przez 10 minut buforem 2x SSC w temperaturze pokojowej i inkubowano przez 5 minut w buforze zawierającym 150 mM NaCl i 100 mM kwas maleonowy (pH 7.5). Następnie blokowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej w takim samym buforze z dodatkiem 1% odczynnika blokującego (Roche) i 5% surowicy owczej. Po blokowaniu preparaty inkubowano przez noc w 4 °C z przeciwciałem przeciwko dioksygeninie sprzężonym z alkaliczną fosfatazą (1:2000) w buforze zawierającym 150 mM NaCl i 100 mM kwas maleonowy (pH 7.5), 1% odczynnik blokujący (Roche) i 1% surowicę owczą. Kolejnego dnia preparaty płukano trzykrotnie buforem zawierającym 150 mM NaCl i 100 mM kwas maleonowy (pH 7.5) i 10 minut buforem TBS z 0,025% Tween 20 i trzykrotnie przez 5 minut czystym buforem TBS. Następnie preparaty płukano dwukrotnie w buforze zawierającym HCl (pH 9.5), 0,1 M NaCl i 0,05 M MgCl₂, a potem barwiono błękitem tetrazolowym i 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosforanem w buforze o pH 9.5, który zawierał 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ i 1 mM levamizol, przez 36 godzin w temperaturze pokojowej, w ciemności. Po 12 godzinach bufor zmieniono na świeży. Reakcję barwienia przerywano 10 mM buforem Tris-HCl z 1 mM EDTA (pH 8.0). Na końcu preparaty płukano w TBS i zamykano w buforze TBS z glicerolem.

Skrawki mózgu wyznakowane przeciwciałem analizowano przy użyciu mikroskopu Olympus IX71, a zdjęcia uzyskano przy użyciu programu AnalySIS®. Prążkowie i korę mózgu fotografowano pod 10 lub 20 krotnym powiększeniem.

3.4. Badania *in vivo*

3.4.1. Farmakologiczna modyfikacja zdolności poznawczych szczurów

3.4.1.1. Podskórne podawanie inhibitorów PDE2 i PDE5

W celu zbadania wpływu inhibitorów fosfodiesteraz hydrolizujących cGMP na pamięć szczurów, zwierzętom 3, 12 i 24 miesięcznym podawano selektywny inhibitor PDE2, Bay 60 – 7550 (Alexis Biochemicals) oraz inhibitor PDE5, zaprinast (Merck). W zależności od doświadczenia szczury otrzymywały podskórnie jeden z inhibitorów w dawce 0,3mg/ kg m.c., rozpuszczone w DMSO (Sigma), zwierzęta kontrolne otrzymywały iniekcję z samego DMSO (0,1ml/100g m.c.). Badano wpływ inhibitorów na nabywanie oraz konsolidację pamięci, w zależności od doświadczenia inhibitory podawano 1 godzinę przed rozpoczęciem testu pamięci rozpoznawczej lub bezpośrednio po zakończeniu prezentacji pierwszego obiektu. Po zabiegu szczury odkładano do klatek i pozostawiano tam do czasu rozpoczęcia kolejnego etapu testu.

3.4.1.2. Podskórne podawanie inhibitora nNOS

Do zbadania wpływu zahamowania neuronalnej izoformy NO na pamięć szczurów, grupie zwierząt 24 miesięcznych oprócz selektywnego inhibitora PDE2, podawano podskórnie selektywny inhibitor nNOS, NAAN (Calbiochem) w dawce 1mg/kg m.c., rozpuszczony w DMSO. Tej grupie zwierząt wykonywano dwie iniekcje (z Bay 60-7550 i z NAAN) bezpośrednio po zakończeniu prezentacji pierwszego obiektu.

3.4.2. Metody behawioralne

3.4.2.1. Test pamięci rozpoznawczej

Test wykonywano zgodnie z metodą opracowaną przez Ennaceur i Delacour [1988], zmodyfikowaną przez Kosiorek i wsp. [2003]. Test oparty jest na naturalnej skłonności gryzoni do zainteresowania nowymi, nieznanymi obiektami.

Zwierzęta badano w pleksiglasowym pudełku o wymiarach 65 x 45 x 45 umieszczonym w izolowanym akustycznie pomieszczeniu i w warunkach stałego oświetlenia 40 luxów. Podczas trwania eksperymentu pudełko nie było czyszczone, tak żeby szczury mogły pozostawić i potem rozpoznać swój zapach. Dobę przed rozpoczęciem testu przeprowadzono sesję habituacyjną, podczas której zwierzęta po kolei poznawały pudełko przez 5 minut. Następnego dnia przeprowadzano właściwe doświadczenie, składające się z dwóch sesji poznawczych. Podczas pierwszej sesji (oznaczonej jako T1) w pudełku umieszczano jeden obiekt (oznaczony jako A) i zwierzęta miały 5 minut na poznanie obiektu, a potem wracały do swoich klatek. Po dwóch godzinach przeprowadzano drugą sesję (T2), w pudełku umieszczano jeden identyczny obiekt (A') i jeden nowy obiekt (B), a szczury miały 3 minuty na zapoznanie się z dwoma przedmiotami. Przedmiotami używanymi przez nas podczas doświadczeń były miski i kubki, obiekty nie mające dla zwierząt żadnego, naturalnego znaczenia ani pozytywnego, ani negatywnego. Obiekt używany podczas T2 był identyczny z tym, używanym podczas T1, ale nie dostarczał szczurom żadnych bodźców zapachowych. Podczas trwania obydwu prób T1 i T2 mierzono czas, przez który zwierzęta wykazywały zainteresowanie obiektami. Jako zainteresowanie obiektem zdefiniowano zbliżenie nosa na odległość 2 cm i mniejszą, lub dotykanie obiektu nosem. Na podstawie obserwacji zwierząt uzyskano następujące dane: t_A = czas zainteresowania obiektem A podczas T1, $t_B+t_{A'}$ = czas zainteresowania obiektami A' (duplikatem A) i nowym (B) podczas T2. Na podstawie uzyskanych danych dla każdego z badanych zwierząt obliczono tak zwany indeks dyskryminacji (ID), który wskazuje ile czasu zwierzę spędziło na badaniu nowego obiektu w porównaniu do starego obiektu w trakcie drugiej sesji testowej.

$$ID = \frac{t_B \times 100}{t_B + t_{A'}}$$

Wartość ID równa lub mniejsza od 50 oznacza, że szczur nie rozpoznał duplikatu A', jeżeli ID jest większa niż 50 oznacza to, że szczur pamięta obiekt A poznany podczas pierwszego zadania.

Skróty używane w opisie testu pamięci rozpoznawczej:

- T1 – pierwsza sesja poznawcza, podczas której szczur poznaje jeden obiekt
- T2 – druga sesja poznawcza, podczas której szczur ma możliwość eksplorowania dwóch obiektów
- A – pierwszy przedmiot, pokazywany zwierzętom (tA czas zainteresowania tym przedmiotem)
- A' – duplikat A (tA' czas zainteresowania duplikatem)
- B – drugi, nowy obiekt prezentowany szczurom podczas T2 (tB czas zainteresowania nowym przedmiotem).
- ID – indeks dyskryminacji

3.4.2.2. Test otwartego pola

Do badania zdolności lokomotorycznych i zachowań eksploracyjnych zastosowano test otwartego pola . W tym celu poszczególne zwierzęta umieszczano pojedynczo w szarej, otwartej od góry skrzynce o wymiarach 100 x 100 cm i wysokości 47 cm z naniesionymi na podłodze liniami dzielącymi powierzchnię na 25 równych kwadratów. Skrzynka była ustawiona bezpośrednio na podłodze, w słabym oświetleniu, w izolowanym akustycznie otoczeniu. Po zakończeniu testu z określonym zwierzęciem cały aparat przemywano detergentem z alkoholem w celu usunięcia śladów zapachowych. Obserwację prowadzono przez 5 min. Mierzono następujące parametry: całkowita liczba przejść przez kwadraty (za przejście przez pojedynczy kwadrat przyjmowano sytuację, w której wszystkie cztery łapy zwierzęcia znajdowały się w danym kwadracie); liczba przejść przez kwadraty zewnętrzne; liczba przejść przez kwadraty centralne; iliczba wspięć przy ścianach; liczba stójek (wspięcia bez opierania się o ścianki) oraz liczba myć szczurów.

3.5. Opracowanie statystyczne wyników

Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Badania behawioralne wykonywane na grupach co najmniej 10 zwierząt. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia znamienności statystycznej różnic zaobserwowanych w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano testem t – Student’a lub wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testu post-hoc Dunetta lub Bonferroniego. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności p poniżej 0,05.

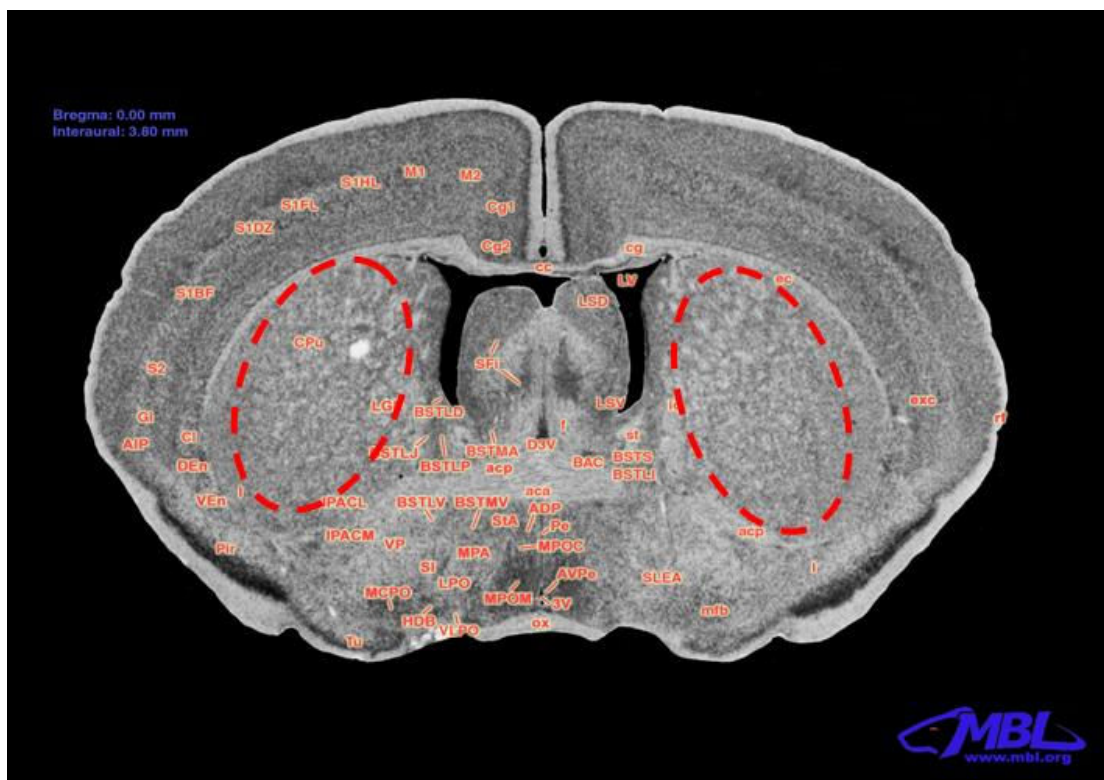
4. Wyniki

4.1. Zmiany poziomu cGMP w mózгах szczurów podczas dojrzewania i starzenia

Prowadzone badania miały na celu określenie jak zmienia się immunoreaktywność cGMP (IR-cGMP) w mózгах szczurów 1, 4, 10 i 21 dniowych oraz 3 i 24 miesięcznych. Badano również zdolność układu cholinergicznego mózgu do syntezy cGMP w odpowiedzi na donor NO, DEANONO. Doświadczenia przeprowadzono na skrawkach mózgu znakowanych przeciwciałami przeciwko cGMP i pęcherzykowemu transporterowi acetylocholin (vAChT), preparaty analizowano i fotografowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Uzyskano kolorowe obrazy, w których cGMP uwidoczniono jako zielony, a vAChT (czyli ciała i wypustki neuronów cholinergiczych) jako czerwony. Dzięki temu komórki, w których zaobserwowano kolokalizację cGMP i vAChT były łatwo widoczne jako żółte. Dla określenia zdolności układu cholinergicznego do syntezy cGMP na różnych etapach życia szczurów policzono całkowitą liczbę komórek wyznakowanych przeciwciałem przeciwko vAChT i cGMP w formacji Broca i prążkowi mózgu (Rycina 10). Ilość komórek cholinergiczych wykazujących IR-cGMP wyrażono jako procent wszystkich komórek posiadających vAChT (cholinergiczych) w badanych regionach mózgu (Rycina 12).



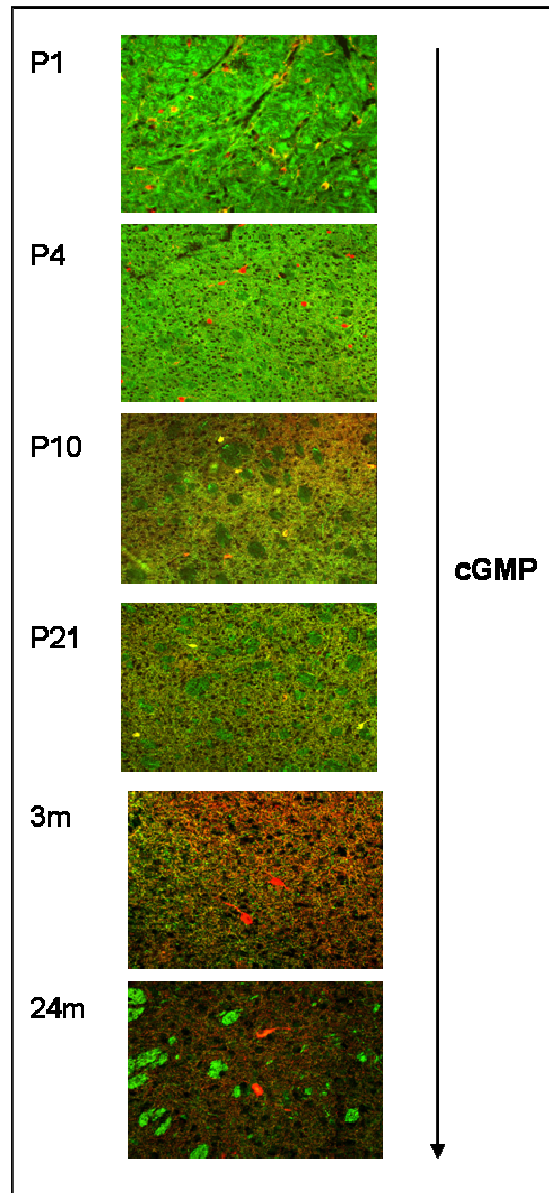
a)



b)

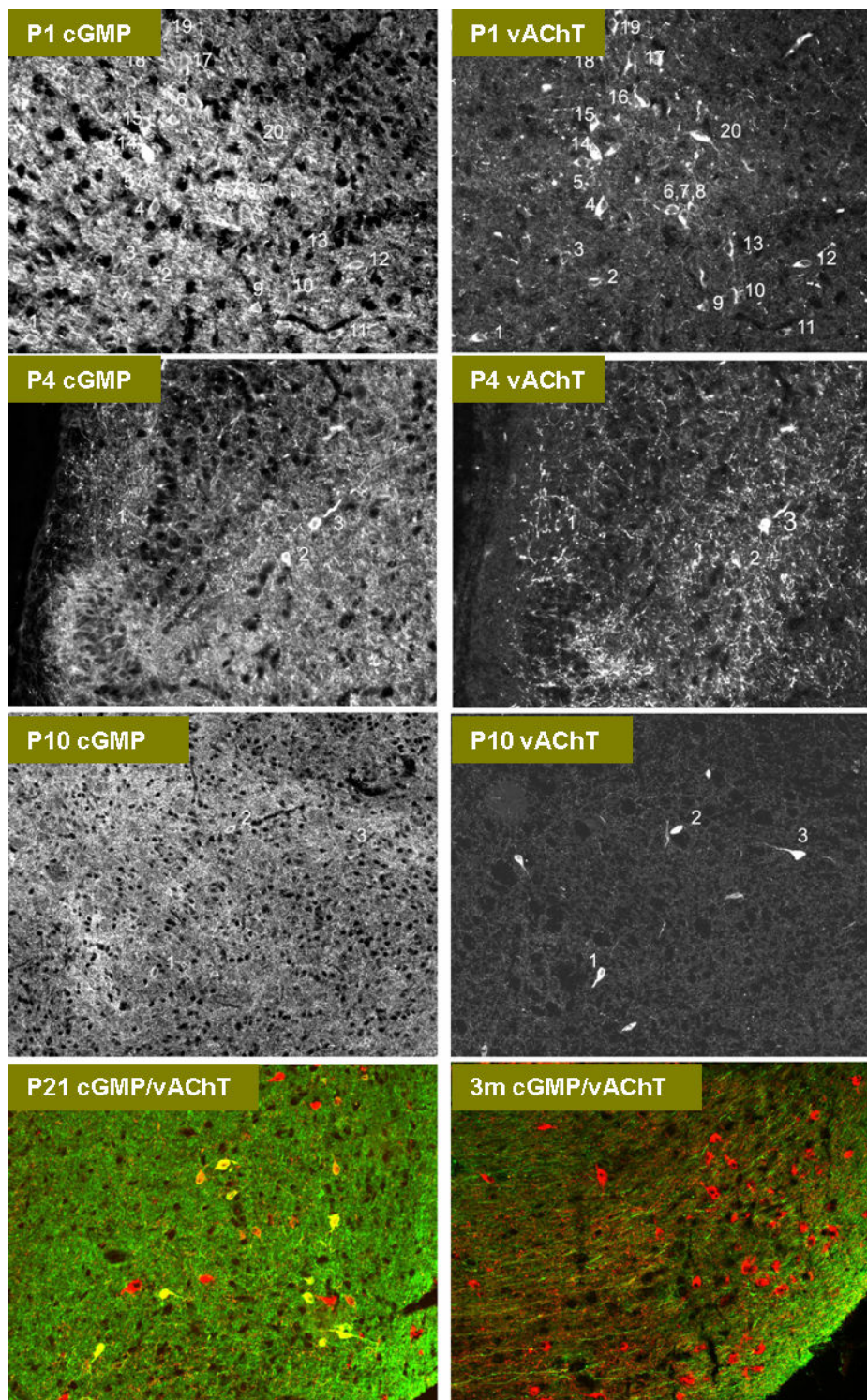
Rycina 10. Badane regiony mózgu. Zdjęcie a - formacja Broca (jędrowo pasma przekątnego) i jędrowo przysrodkowe przegrody, zdjęcie b – prązkowie. Zdjęcia uzyskano ze strony www.mbl.org.

Podczas analizy mikroskopowej preparatów zaobserwowano, że poziom cGMP (określony jako intensywność sygnału) w mózgu jest bardzo wysoki u młodych zwierząt i maleje w procesie dojrzewania i starzenia (Rycina 11).

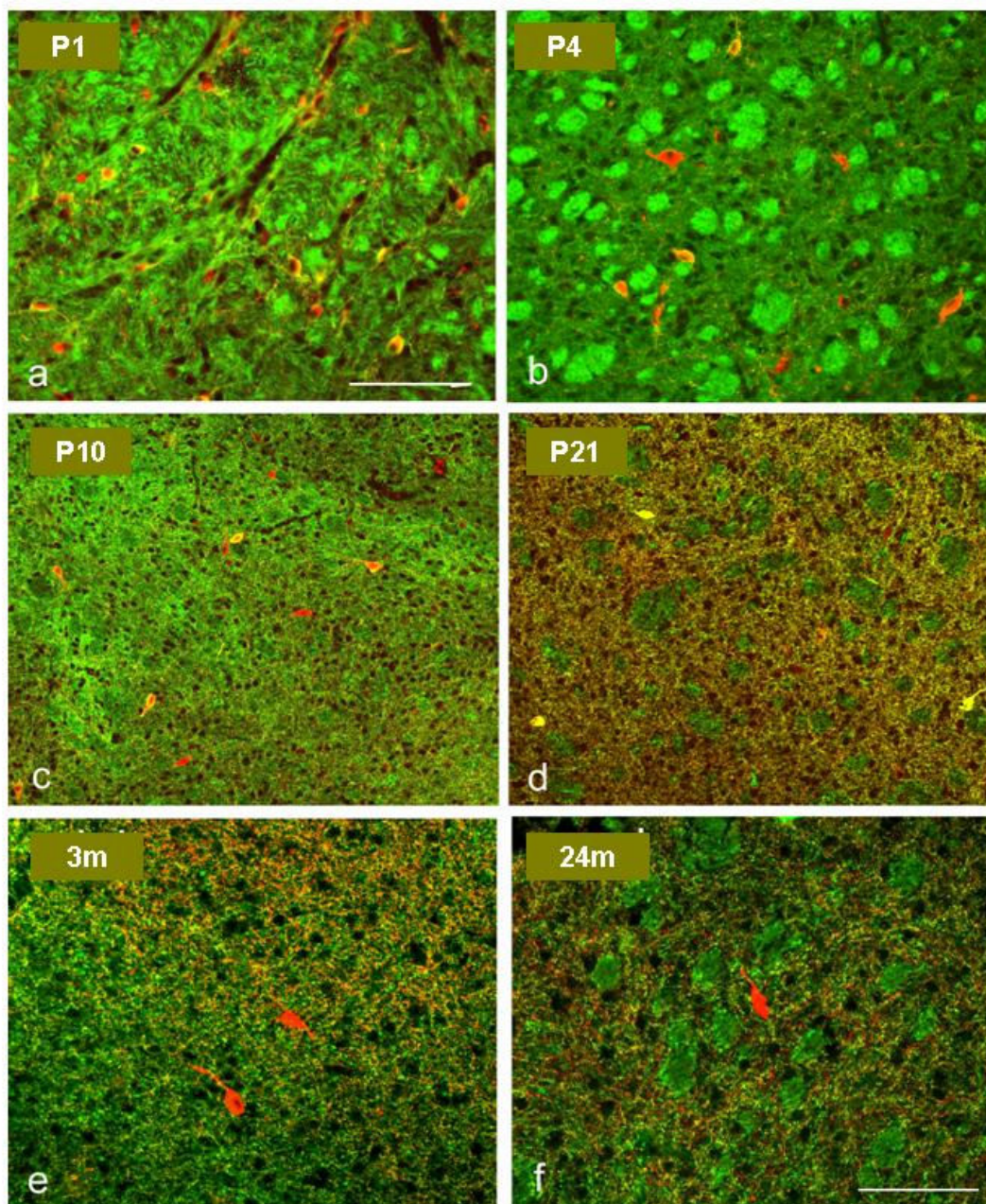


Rycina 11. Zmiany poziomu IR-cGMP w mózgu podczas dojrzewania i starzenia. Przykładowe zdjęcia lokalizacji cGMP (zielony) i vAChT (czerwony) w prążkowie zwierząt od P1 do 24 miesięcy. Komórki i włókna, w których występuje kolokalizacja cGMP i vAChT widoczne są jako żółte. Preparaty wykonano metodą immunohistochemiczną na skrawkach mózgu inkubowanych w obecności niespecyficznego inhibitora PDE, IBMX oraz donora NO, DEANONO. Poziom IR-cGMP w mózgu zwierząt 3 miesięcznych przyjmowano jako kontrolny. Zdjęcia mózgow zwierząt od P1 do P21 wykonano w powiększeniu x10. Fotografie mózgow szczurów 3 i 24 miesięcznych wykonano w powiększeniu x20.

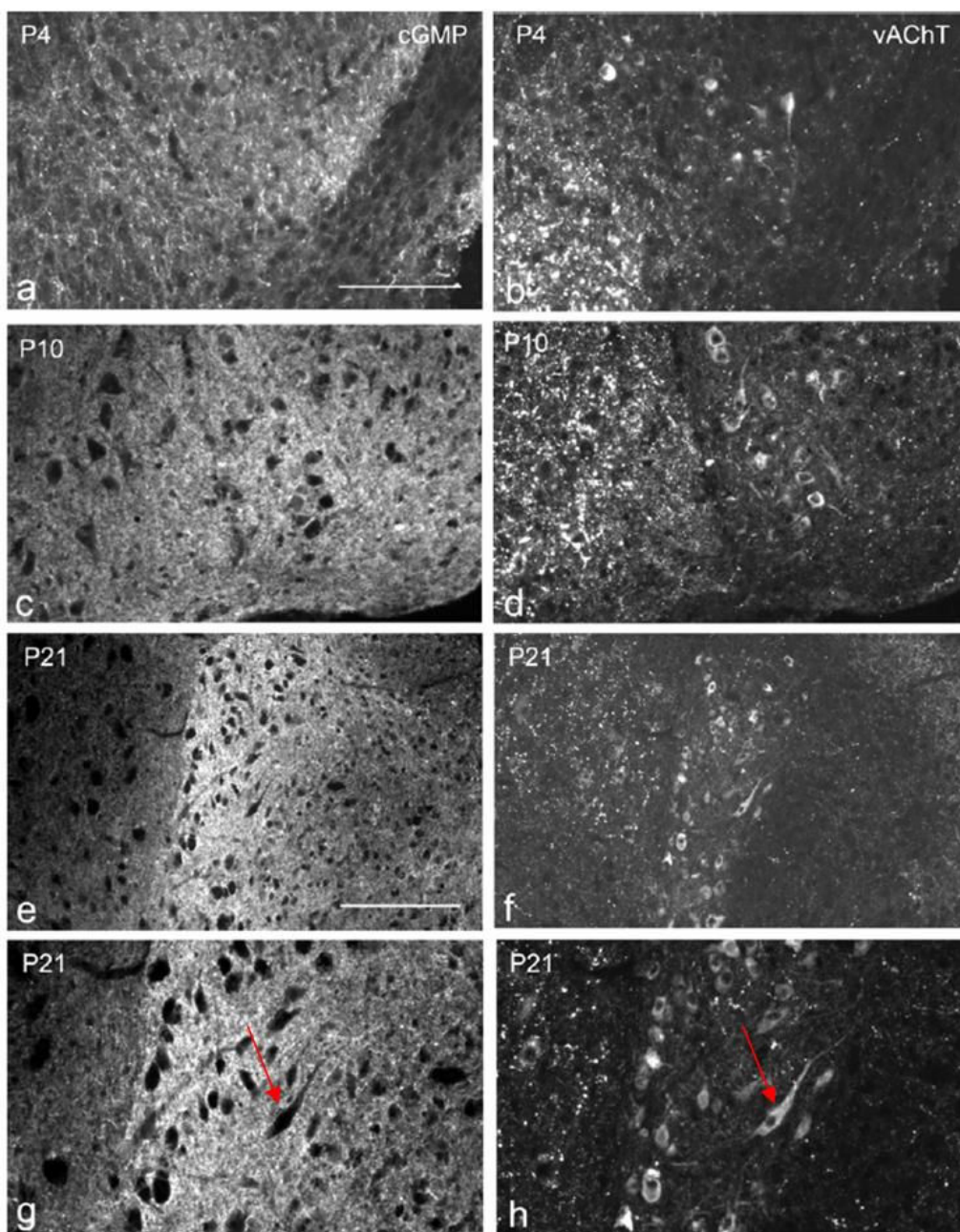
U szczurów P1 do P21 cGMP obecny jest prawie we wszystkich regionach mózgu, w większości komórek i włókien nerwowych (Rycina 11). W skrawkach mózgu zwierząt 3 miesięcznych po inkubacji z donorem NO i IBMX, cGMP obecny jest głównie w układzie cholinergicznym mózgu. U szczurów 24 miesięcznych poziom cGMP jest bardzo niski. (Ryciny 11, 12 i 13). Wykazano, że zdolność do syntezy cGMP posiadają neurony cholinergiczne znajdujące się w okolicach przegrody, w formacji Broca i interneurony cholinergiczne prążkowiec (Ryciny 12 i 13), natomiast neurony cholinergiczne jądra nakrywkowo konarowo mostowego nie syntetyzują cGMP w odpowiedzi na donor NO, DEANONO (Rycina 14).



Rycina 12. Lokalizacja cGMP (zielony) i vAChT (czerwony) w serii skrawków mózgu metodą immunohistochemiczną (kolokalizacja widoczna w komórkach i włóknach jako kolor żółty). Przykładowe fotografie formacji Broca wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, w powiększeniu x10. Na czarnobiałych zdjęciach cyframi zaznaczono komórki, w których zlokalizowano cGMP oraz vAChT. Skrawki inkubowano w obecności niespecyficznego inhibitora PDE, IBMX oraz donora NO, DEANONO.



Rycina 13. Kolokalizacja cGMP (zielony) i vAChT (czerwony) metodą immunohistochemiczną w serii skrawków mózgu metodą immunohistochemiczną (kolokalizacja widoczna w komórkach i włóknach jako kolor żółty). Przykładowe fotografie prążkowania uzyskane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w powiększeniu x20 (odcinek odpowiada 50µm). Skrawki inkubowano w obecności niespecyficznego inhibitora PDE, IBMX oraz donora NO, DEANONO.



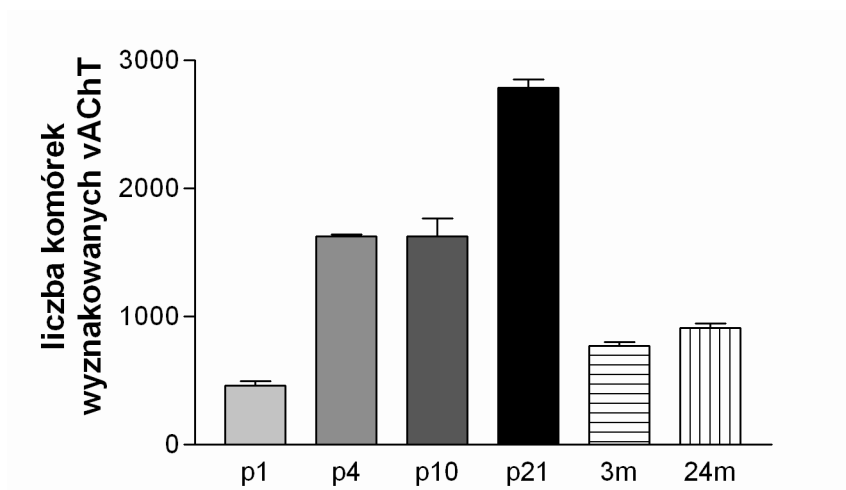
Rycina 14. Lokalizacja cGMP i vAChT metodą immunohistochemiczną w jądrze nakrywkowo konarowo mostowym – przykładowe fotografie wykonane w powiększeniu x10 (a do f) i x20 (g oraz h). *Neurony cholinergiczne w tej części tyłomózgowia nie syntetyzują cGMP w odpowiedzi na donor NO (czerwona strzałka, zdjęcia g oraz h – powiększenie x 20).*

W tabeli 3 zestawiono średnią całkowitą liczbę policzonych podczas doświadczeń komórek cholinergicznym wyznakowanych przeciwciałem przeciwko vAChT w formacji Broca i prążkowie mózgu na różnych etapach życia szczurów.

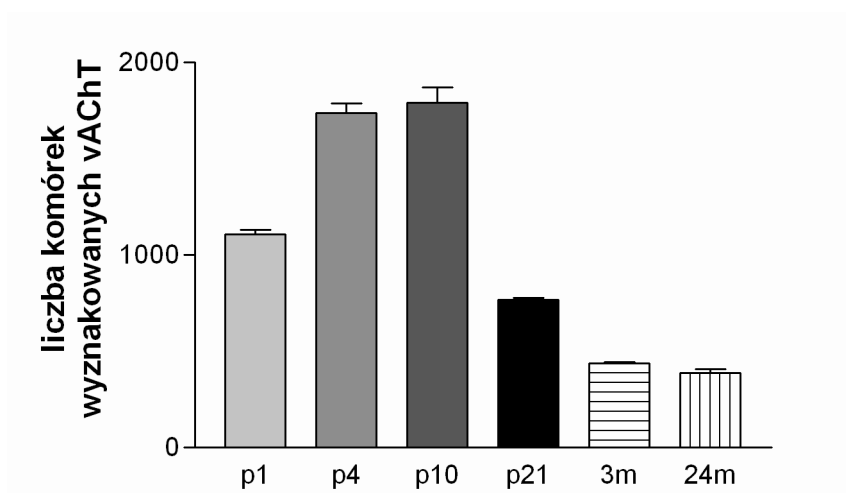
Region mózgu	Formacja Broca, okolice przegrody						Prążkowie						
	P1	P4	P10	P21	3m	24m	P1	P4	P10	P21	3m	24m	
wiek zwierząt													
liczba policzonych neuronów cholinergicznym	460	1626	1629	2787	772	914	1107	1738	1790	769	439	389	
standardowy błąd średniej (SEM)	35,47	18,08	138,80	63,52	30,35	32,33	23,52	49,80	81,84	10,39	6,03	19,35	

Tabela 3. Zestawienie liczby komórek cholinergicznym policzonych w skrawkach mózgu wyznakowanych immunohistochemicznie przeciwciałem przeciwko vAChT. Dane stanowią średnie z całkowitej liczby policzonych komórek cholinergicznym dla każdego szczura. Liczba zwierząt użytych do doświadczeń (n) wynosiła: n = 4 dla P1; n = 3 dla P4; n = 5 dla P10; n = 3 dla P21; n = 3 dla 3 miesięcznym szczurów dorosłym; n = 3 dla 24 miesięcznym zwierząt starych.

Analiza wyników liczenia komórek cholinergicznym w formacji Broca i w prążkowie wykazała, że liczba komórek cholinergicznym w tych regionach mózgu maleje wraz z wiekiem zwierząt (Rycina 15). W okolicach przegrody i formacji Broca najwyższą liczbę komórek cholinergicznym obserwowano u zwierząt P21 (Rycina 15a i Tabela 3). W prążkowie liczba interneuronów cholinergicznym osiągała maksimum 10 dnia życia szczurów (P10), a potem sukcesywnie malała (Rycina 15b i Tabela 3).



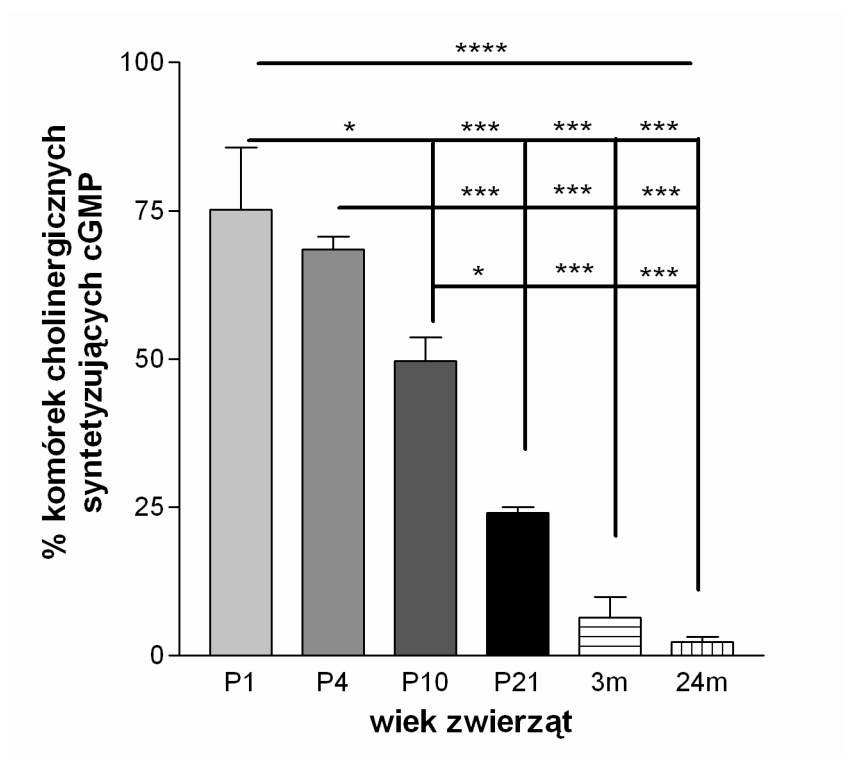
a) Formacja Broca.



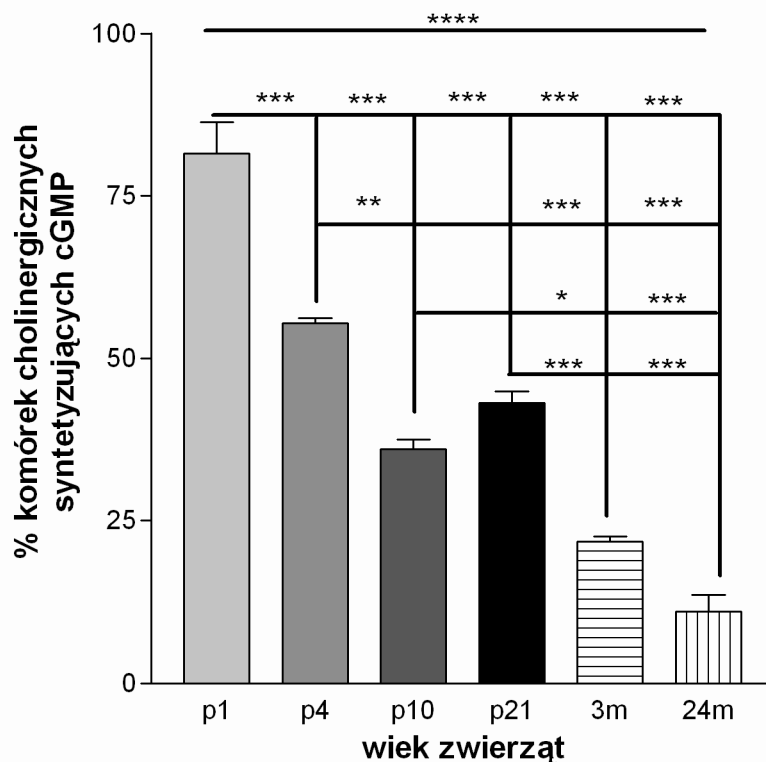
b) Prążkowie.

Rycina 15. Zmiany liczby komórek cholinergicznyc w formacji Broca i prążkowie szczurów P1 – 24 miesięcznych. Komórki liczone na preparatach wykonanych metodą immunohistochemiczną w skrawkach mózgu, jako znacznik neuronów cholinergicznyc używano vAChT. Dane przedstawione na wykresach stanowią średnie z całkowitej liczby policzonych komórek cholinergicznyc dla każdego szczura. Liczba zwierząt użytych do doświadczeń (n) wynosiła: n = 4 dla P1; n = 3 dla P4; n = 5 dla P10; n = 3 dla P21; n = 3 dla 3 miesięcznych szczurów dorosłych; n = 3 dla 24 miesięcznych zwierząt starych.

W badaniach immunohistochemicznych wykazano również, że liczba neuronów cholinergicznycy wykazujących IR-cGMP w formacji Broca i prążkowie maleje wraz z wiekiem zwierząt (Rycina 16). Ilość komórek cholinergicznycy syntetyzujących cGMP wyrażono jako procent komórek wyznakowanych przeciwciałem przeciwko vAChT (cholinergicznycy) dla poszczególnych regionów mózgu. W formacji Broca u bardzo młodych szczurów (P1), aż 75 procent neuronów cholinergicznycy wykazuje immunoreaktywność dla cGMP po inkubacji z donorem NO, w mózgu zwierząt 3 miesięcznych jest to 6 procent neuronów cholinergicznycy, a w mózgu szczurów 24 miesięcznych już tylko około 2 procent z nich zachowuje tą zdolność (Rycina 16a.). W prążkowie szczurów P1 aż 81 procent komórek cholinergicznycy syntetyzuje cGMP w odpowiedzi na donor NO, w prążkowie zwierząt dorosłych 21 procent tych neuronów, natomiast u starych zwierząt taką zdolność zachowuje około 11 procent interneuronów cholinergicznycy.



a) Formacja Broca.

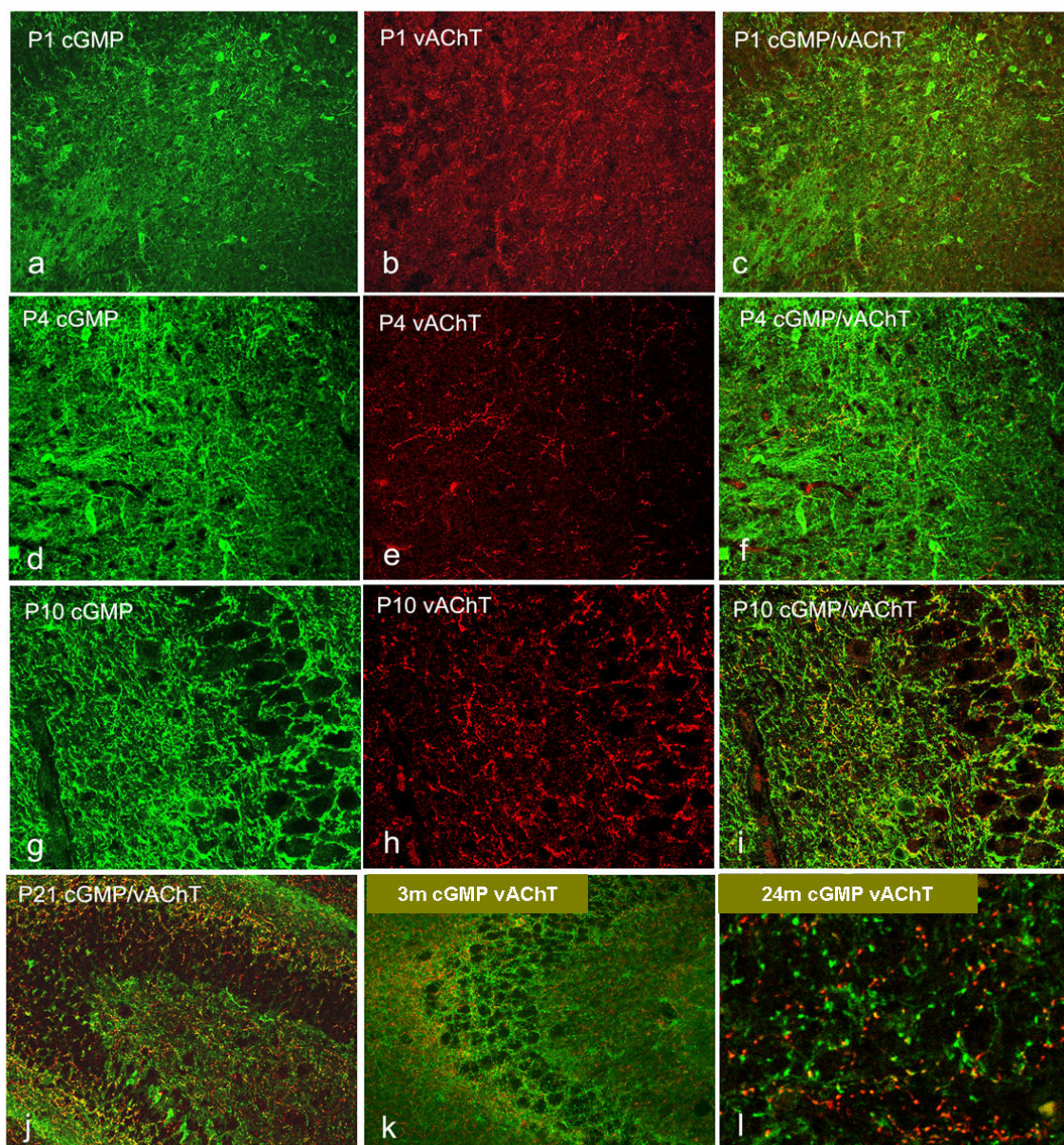


b) Prażkowie.

Rycina 16. Zmiany IR-cGMP w neuronach cholinergicznycy na różnych etapach życia szczurów. Komórki liczone w preparatach wykonanych metodą immunohistochemiczną w skrawkach mózgu, znakowanych przeciwciałami przeciwko cGMP i vAChT. Dane przedstawione na wykresach stanowią średnie otrzymane przy użyciu 3 – 5 szczurów ($n = 4$ dla P1; $n = 3$ dla P4; $n = 5$ dla P10; $n = 3$ dla P21; $n = 3$ dla 3 miesięcznych szczurów dorosłych; $n = 3$ dla 24 miesięcznych zwierząt starych). Opracowanie statystyczne wyników przeprowadzono przy użyciu metody wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu post-hoc Bonferroniego, gdzie **** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Neurony cholinergiczne przegrody środkowej i formacji Broca docierają swoimi włóknami aż do hipokampa, dlatego dodatkowo badano immunoreaktywność cGMP we włóknach cholinergicznycy hipokampa. Analiza obrazów uzyskanych przy użyciu mikroskopu konfokalnego wykazała, że w hipokampie liczba włókien cholinergicznycy syntetyzujących cGMP w odpowiedzi na donor NO maleje wraz z dojrzewaniem szlaku cholinergicznycy, łączącego okolice jąder podstawy z hipokampem. Zaobserwowano, że unerwienie cholinergiczne hipokampa jest bardzo ubogie, punktowe u jednodniowych zwierząt (P1). Pojedyncze włókna cholinergiczne pojawiają się około 4 dnia po urodzeniu (P4) a pomiędzy dniem 10 i 21 dochodzi do

pełnego unerwienia tej struktury mózgu. Najwyższy poziom IR- cGMP obserwowano we włóknach cholinergicznym hipokampa u zwierząt P1 i P4, u szczurów P10 i P21 poziom IR-cGMP ulegał obniżeniu, a u szczurów dorosłych i starych kolokalizacja cGMP i vAChT występowała bardzo rzadko (Rycina 17.).

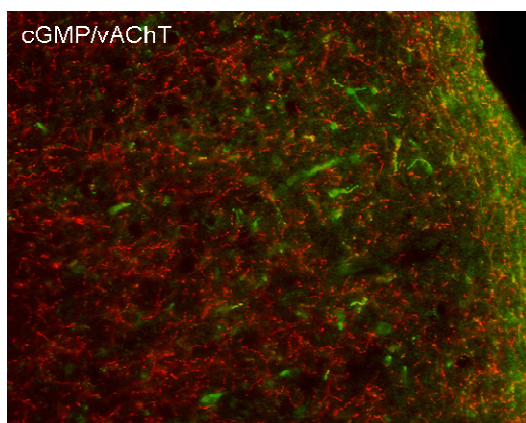


Rycina 17. Lokalizacja cGMP (zielony) we włóknach cholinergicznym hipokampa metodą immunohistochemiczną – przykładowe fotografie. Obrazy uzyskano w mikroskopie konfokalnym, jedynie zdjęcia j oraz k powstały przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Preparaty wykonano metodą immunohistochemiczną na skrawkach mózgu inkubowanych w obecności IBMX oraz DEANONO, znakowanych przeciwciałami przeciwko cGMP i vAChT. Zdjęcia a-c oraz j,k wykonano w powiększeniu x10, d-i w powiększeniu x20, a fotografię l uzyskano w powiększeniu x40. Kolokalizacja cGMP (zielony) i vAChT (czerwony) widoczna jest w włóknach jako kolor żółty.

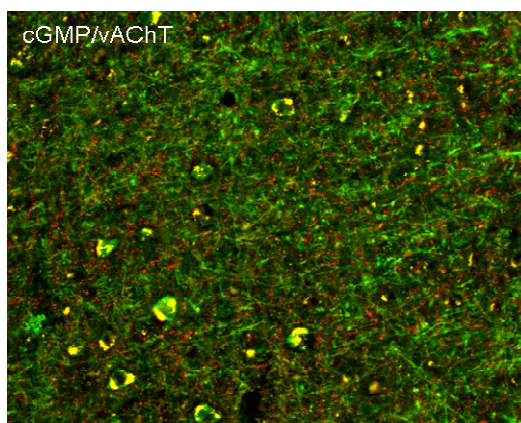
4.2. Wpływ stymulacji receptorów cholinergiczych na poziom immunoreaktywności cGMP w układzie cholinergicznym mózgu

Przeprowadzone doświadczenie miało na celu zbadanie wpływu agonisty receptorów cholinergiczych muskarynowych i nikotynowych, karcholu na poziom IR-cGMP w mózgu 3 miesięcznych szczurów. Otrzymane wyniki wykazały, że inkubacja skrawków mózgu z karcholem w stężeniu 10 μ M powoduje podwyższenie poziomu IR-cGMP w części neuronów cholinergiczych, w większości włókien cholinergiczych oraz dookoła nich w korze czołowej. W przodomózgowiu najwyższy poziom IR-cGMP po stymulacji receptorów cholinergiczych karcholem obserwuje się w wyspach Calleja w większości włókien i niektórych komórkach. W prążkowie karchol powoduje znaczące podniesienie IR-cGMP głównie w interneuronach cholinergiczych oraz w mniejszym stopniu w włóknach i dookoła nich.

KONTROLA (BUFOR KREBSA)



KARBACHOL

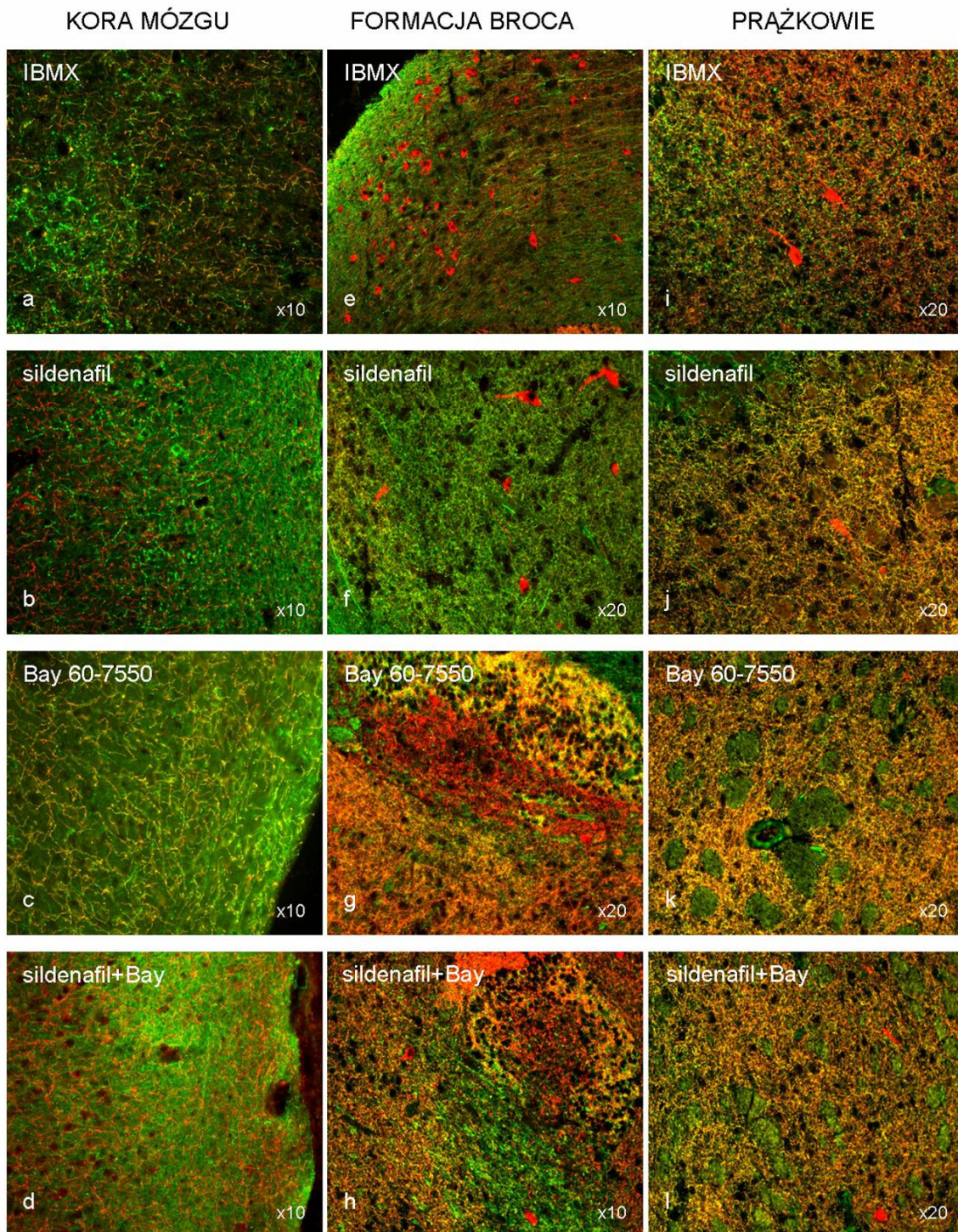


Rycina 18. Wpływ pobudzenia receptorów cholinergiczych na poziom IR-cGMP w skrawkach mózgu. Przykładowe zdjęcia kory czołowej mózgu zwierząt 3 miesięcznych uzyskane w mikroskopie fluorescencyjnym w powiększeniu $\times 10$. Preparaty wykonano metodą immunohistochemiczną na skrawkach mózgu inkubowanych z 10 μ M karcholem, znakowano przeciwciałami przeciwko vAChT (czerwony) i cGMP (zielony). Kolokalizacja widoczna jest jako kolor żółty.

4.3. Wpływ selektywnych inhibitorów fosfodiesteraz 2 i 5 na poziom immunoreaktywności cGMP w mózгах szczurów dorosłych i starych

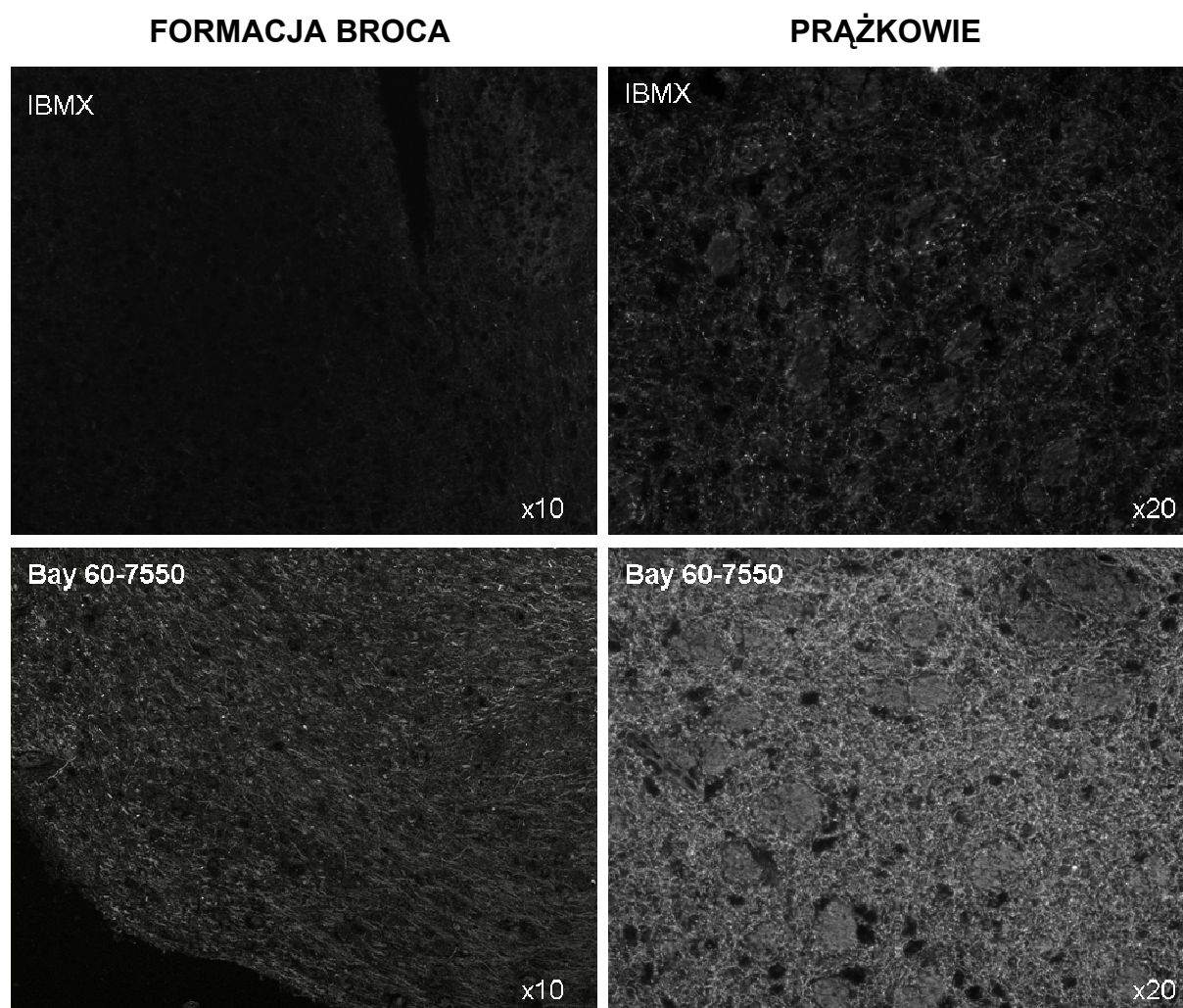
Prowadzone badania miały na celu określenie jak zmienia się IR-cGMP w mózгах szczurów 3 i 24 miesięcznych po zahamowaniu PDE2, PDE5 lub obydwu enzymów jednocześnie. Aktywność PDE5 hamowano w skrawkach mózgu poprzez inkubację z sildenafilem w stężeniu 10 μM i/lub z Bay60-7550 w stężeniu 0,1 μM dla zahamowania PDE2. W reakcji immunohistochemicznej wykazano, że inkubacja skrawków mózgu zwierząt 3 miesięcznych oraz 24 miesięcznych z inhibitorem PDE2, Bay 60-7550 znacząco podwyższa intensywność sygnału dla cGMP w mózgu, natomiast zahamowanie PDE5 przy pomocy sildenafilu podnosi poziom immunoreaktywności dla tego nukleotydu tylko u zwierząt 3 miesięcznych.

W mózгах dorosłych, 3 miesięcznych szczurów zahamowanie PDE5 powoduje podniesienie poziomu IR-cGMP w komórkach nerwowych (niecholinergicznym), włóknach (między innymi cholinergicznym) i wokół nich. Zastosowanie inhibitora PDE2 powoduje jeszcze wyraźniejsze podniesienie poziomu IR-cGMP głównie we włóknach cholinergicznym. Inkubacja skrawków mózgu 3 miesięcznych zwierząt w obecności obydwu inhibitorów wywołuje bardzo silne podniesienie poziomu IR-cGMP w komórkach, włóknach nerwowych i wokół nich (Rycina 19).



Rycina 19. Zmiany immunoreaktywności cGMP w mózgu zwierząt 3 miesięcznych po inkubacji skrawków w obecności inhibitorów PDE2 i PDE5. Zestawienie przykładowych fotografii kory mózgu, formacji Broca oraz wysp Calleja i prążkowie. Skrawki inkubowano w obecności donora NO, DEANONO oraz wymienionych inhibitorów PDE. Preparaty wykonano metodą immunohistochemiczną na skrawkach mózgu, znakowanych przeciwciałami przeciwko cGMP (zielony) i vAChT (czerwony). Kolokalizacja jest widoczna we włóknach jako kolor żółty.

W mózgach starych, 24 miesięcznych szczurów zahamowanie PDE5 nie wpływa na intensywność reakcji immunohistochemicznej dla cGMP w mózgu, sygnał dla cGMP jest słaby tak jak w skrawkach kontrolnych. Inkubacja skrawków mózgu 24 miesięcznych zwierząt z inhibitorem PDE2, Bay 60-7550 powoduje znaczące podniesienie immunoreaktywności cGMP we włóknach nerwowych i ciałach komórek (Rycina 20). Wynik reakcji immunohistochemicznej inkubacji skrawków z obydwoma inhibitorami nie zmienia się w porównaniu do reakcji z zastosowaniem Bay 60-7550 (wyniki nie prezentowane).



Rycina 20. Zmiany IR-cGMP w mózgu zwierząt 24 miesięcznych po inkubacji skrawków w obecności selektywnego inhibitora PDE2. Przykładowe fotografie formacji Broca i prążkowie. Preparaty wykonano metodą immunohistochemiczną na skrawkach mózgu, znakowanych przeciwciałami przeciwko cGMP.

Podsumowanie zmian zachodzących w mózgu pod wpływem zahamowania PDE2 i PDE5 *in vitro* zestawiono w tabeli 4.

Poziom immunoreaktywności cGMP oznaczono w tabeli przy użyciu następujących znaków graficznych:

↓↓ - prawie niewidoczny sygnał

↓ - słaby sygnał

↑ - widoczny sygnał "poziom podstawowy"

↑↑ - intensywny sygnał

↑↑↑ - bardzo intensywny sygnał

↑↑↑↑ - bardzo silnie intensywny sygnał

cGMP/vAChT	kora czołowa	formacja Broca i okolice przegrody	prążkowie	
IBMX (KONTROLA)	↑ cGMP we włóknach (głównie cholinergicznym)	↑ cGMP obecny głównie w wyspach Calleja, kolokalizacja z vAChT w części włókien i 6 % komórek	↑ cGMP w większości włókien cholinergicznym i ± 20 % neuronów	3 miesięczne
sildenafil	↑↑ cGMP we włóknach cholinergicznym i rozproszone wokół, oraz w niektórych komórkach niecholinergicznym,	↑↑ cGMP obecny głównie w wyspach Calleja, kolokalizacja z vAChT w części włókien	↑↑ cGMP, we włóknach i okazjonalnie w komórkach cholinergicznym	
Bayer 60-7550	↑↑↑ cGMP we włóknach cholinergicznym i rozproszone wokół nich	↑↑ cGMP, kolokalizacja z vAChT w części włókien, ↑↑↑ cGMP w wyspach Calleja	↑↑↑ cGMP, kolokalizacja z vAChT we włóknach i okazjonalnie w komórkach cholinergicznym	
sildenafil/Bay 60-7550	↑↑↑↑ cGMP we włóknach cholinergicznym i rozproszone wokół nich	↑↑ cGMP, kolokalizacja z vAChT we włóknach ↑↑↑ cGMP w wyspach Calleja	↑↑↑ cGMP, kolokalizacja z vAChT we włóknach i okazjonalnie w komórkach cholinergicznym	
IBMX	↑ cGMP we włóknach i okazjonalnie ciałach komórek cholinergicznym	↓ cGMP we włóknach cholinergicznym, głównie w wyspach Calleja i ± 2% komórek wyznakowanym vAChT	↓ cGMP we włóknach i w ± 10% komórek cholinergicznym	
sildenafil	↓↓ cGMP	↓↓ cGMP	↓↓ cGMP	
Bayer 60-7550	↑↑ cGMP w komórkach oraz włóknach i rozproszone dookoła nich, częściowo kolokalizacja z vAChT	↑↑ cGMP, kolokalizacja z vAChT w części włókien i okazjonalnie w neuronach	↑↑↑ cGMP, kolokalizacja z vAChT we włóknach	
sildenafil/Bay 60-7550	↑↑ cGMP we włóknach i rozproszone dookoła nich, częściowo kolokalizacja z vAChT	↑↑ cGMP, kolokalizacja z vAChT w części włókien i okazjonalnie w neuronach	↑↑↑ cGMP, kolokalizacja z vAChT we włóknach	

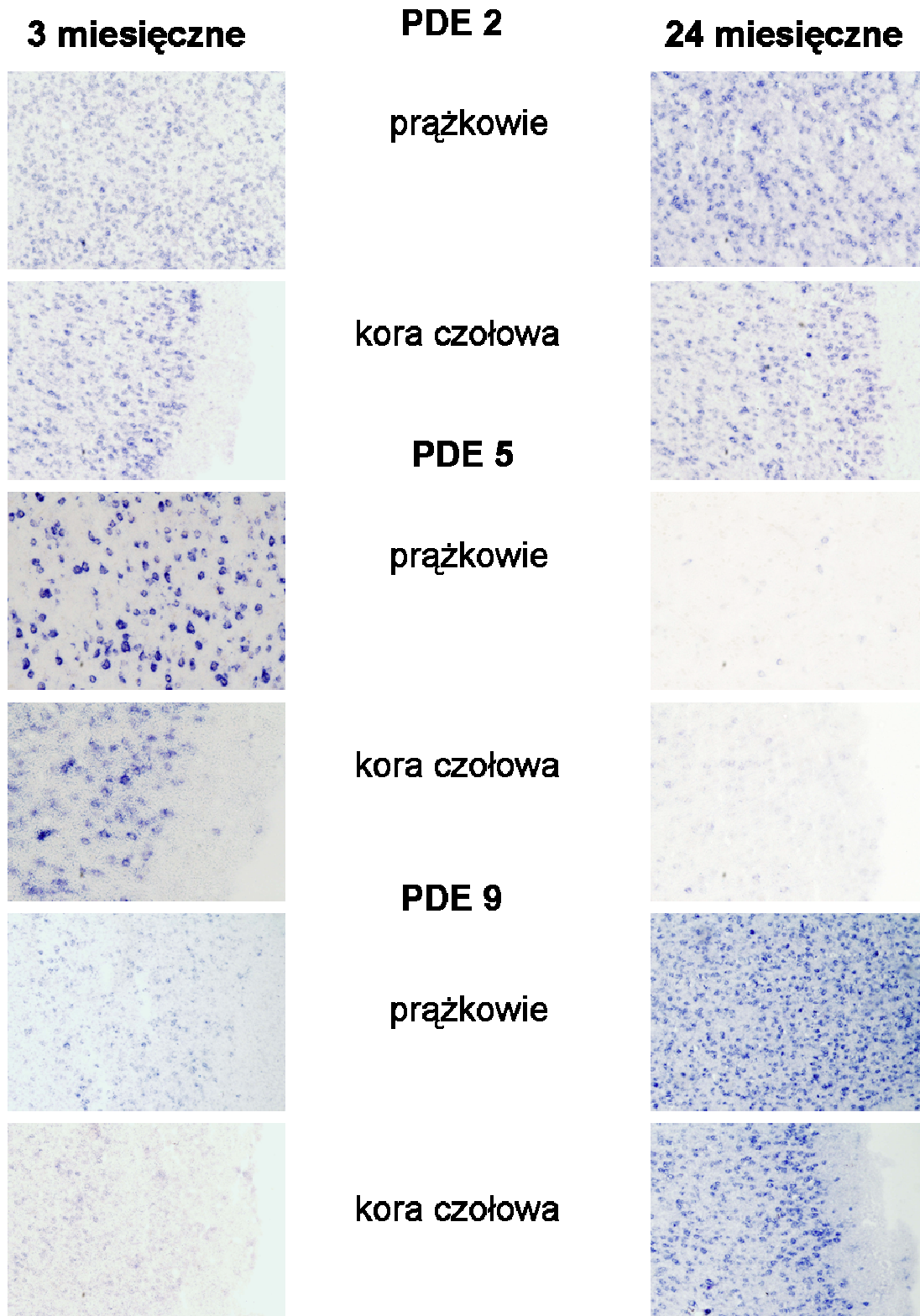
Tabela 4. Zestawienie wyników badań wpływu selektywnych inhibitorów PDE2 i PDE5 na poziom cGMP w mózgu zwierząt dorosłych i starych. *Poziom cGMP określono jako jego immunoreaktywność w skrawkach mózgu zwierząt 3 i 24 miesięcznym metodą immunohistochemiczną.*

4.4. Zmiany ekspresji PDE2, 5 i 9 w mózgach szczurów dorosłych i starych.

W celu zlokalizowania mRNA fosfodiesteraz 2, 5 i 9 w mózgu szczurów 3 i 24 miesięcznych wykonano hybrydyzację *in situ* na skrawkach mózgu, przy użyciu sond RNA znakowanych dioksygeniną.

Zaobserwowano, że ekspresja fosfodiesteraz odpowiedzialnych w mózgu za hydrolizę cGMP zmienia się podczas starzenia zwierząt (Rycina 21). Ekspresję badanych fosfodiesteraz obserwowano w ciałach komórek w różnych strukturach mózgu, na zdjęciach przedstawiono lokalizację PDE2, 5 i 9 w prążkowie i korze czołowej mózgu.

W mózgach zwierząt 3 i 24 miesięcznych zlokalizowano mRNA dla PDE2, stwierdzono że poziom ekspresji jest podobny w obydwu grupach wiekowych, nieznacznie wyższy u starszych zwierząt. Ekspresję PDE5 obserwowano jedynie u zwierząt 3 miesięcznych, u starych 24 miesięcznych szczurów nie zlokalizowano mRNA PDE5. Ekspresję PDE9 najbardziej selektywnej fosfodiesterazy cGMP, obserwowano w mózgach zwierząt 3 i 24 miesięcznych, u starych szczurów stwierdzono zdecydowanie wyższy poziom mRNA PDE9.



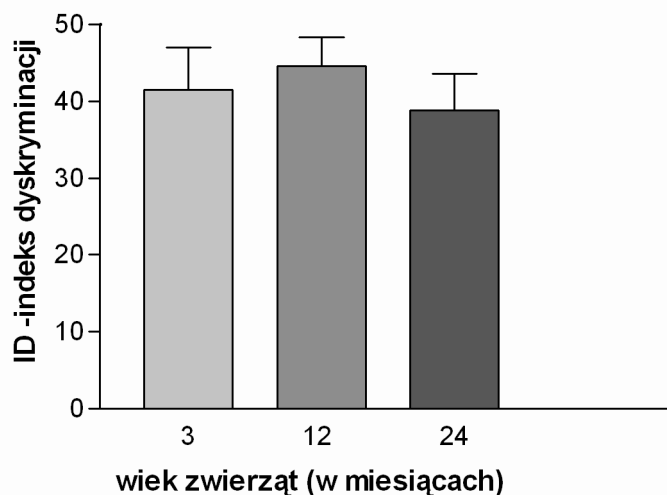
Rycina 21. Lokalizacja mRNA PDE2, 5 i 9 w skrawkach z wybranych regionów mózgu szczurów 3 i 24 miesięcznych. Preparaty otrzymano metodą hybrydyzacji *in situ* przy użyciu sondy RNA znakowanej DIG na skrawkach mózgu szczurów 3 i 24 miesięcznych. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu, w świetle przechodzącym i w powiększeniu x20.

4.5. Wpływ zahamowania PDE2 oraz PDE5 na pamięć rozpoznawczą zwierząt podczas starzenia.

W celu zbadania wpływu inhibitorów fosfodiesteraz hydrolizujących cGMP na zdolności poznawcze zwierząt podczas starzenia, zwierzętom podawano podskórnym jeden z selektywnych inhibitorów PDE 2 (Bay 60-7550) lub PDE5 (zaprinast) i analizowano ich wpływ na nabywanie oraz konsolidację pamięci podczas testu pamięci rozpoznawczej. Dla określenia czy stosowane inhibitory nie zaburzają aktywności eksploracyjnej i lokomotorycznej szczurów przeprowadzono test otwartego pola. Zwierzętom kontrolnym podawano DMSO. W badaniach wstępnych wykazano, że DMSO nie wpływa na pamięć, aktywność lokomotoryczną ani eksploracyjną szczurów.

Test pamięci rozpoznawczej poprzedzany był sesją habituacji – dzień przed eksperymentem zwierzęta umieszczano na 5 minut w pustej klatce testowej. Dzień później rozpoczynano właściwe doświadczenie. Na początku przeprowadzano 5 minutową sesję poznawczą prezentacji obiektu, a po 2 godzinach badano czy szczury pamiętają prezentowany wcześniej obiekt.

Zaobserwowano, że szczury 3, 12 i 24 miesięczne, którym nie podano inhibitorów (tylko DMSO) po 2 godzinach nie pamiętają prezentowanego wcześniej przedmiotu, indeks dyskryminacji (ID) dla wszystkich grup wiekowych wynosi mniej niż 50 (Rycina 22).



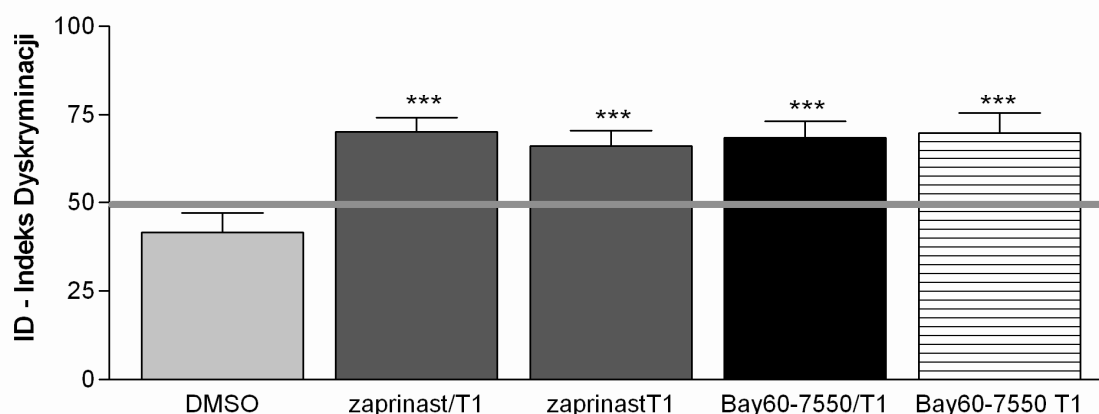
Rycina 22. Wyniki testu pamięci rozpoznawczej u szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych. Test przeprowadzono po 2 godzinach od prezentacji obiektu. Szczurom podawano podskórnie DMSO w dawce 100ml/kg m.c. Dane przedstawione na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z dziesięciu niezależnych doświadczeń dla każdej grupy wiekowej \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Bonferroniego. Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w pamięci rozpoznawczej pomiędzy badanymi grupami wiekowymi.

Bezpośrednio po teście pamięci rozpoznawczej przeprowadzano test otwartego pola, ponieważ nie zaobserwowano żadnego wpływu starzenia ani zastosowanych inhibitorów na aktywność lokomotoryczną ani eksploracyjną badanych zwierząt, wyników tego testu nie przedstawiono w niniejszej pracy.

4.5.1. Wpływ selektywnych inhibitorów PDE2, Bay 60-7550 oraz PDE5 zaprinastu, na pamięć rozpoznawczą szczurów 3 miesięcznych (dorosłych).

Inhibitory PDE2 i PDE5 podawano szczurom w dawce 0,3mg na kilogram masy ciała, po rozpuszczeniu w DMSO. Badano ich wpływ na nabywanie i konsolidację pamięci, w tym celu jeden z inhibitorów podawano podskórnie godzinę przed sesją prezentacji obiektu (/T1) lub bezpośrednio po sesji prezentacji (T1). Zaobserwowano, że u zwierząt 3 miesięcznych zarówno zahamowanie PDE2 jak również PDE5 poprawia

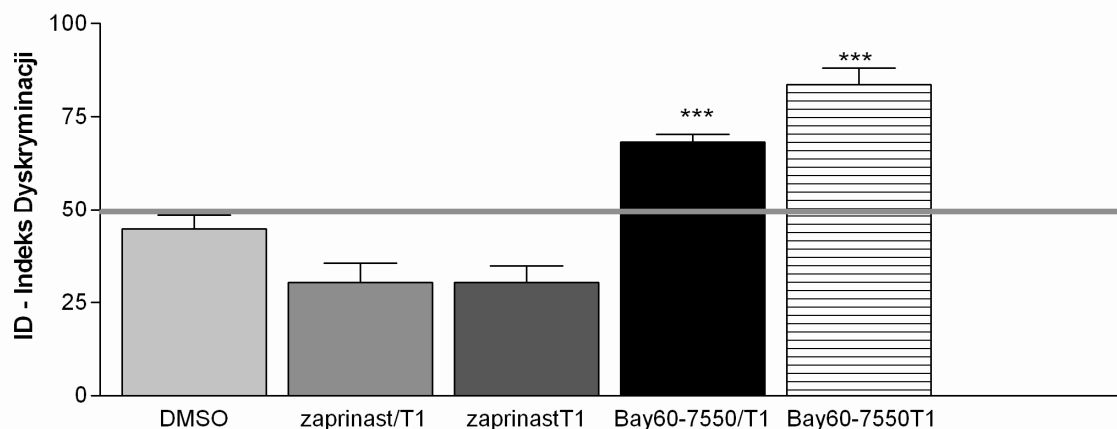
pamięć rozpoznawczą. Podanie zaprinastu przed testem znacząco poprawia nabywanie pamięci, wskaźnik ID jest o 40,8% większy niż u zwierząt kontrolnych, a podanie inhibitora PDE5 po sesji prezentacji obiektu poprawia konsolidację pamięci, ID jest większy o 37,2% w stosunku do grupy kontrolnej. Stwierdzono również, że podanie zwierzętom dorosłym Bay 60-7550 przed testem poprawia proces nabywania pamięci, wskaźnik ID zwiększa się o 39%, a podanie inhibitora po sesji prezentacji obiektu poprawia konsolidację pamięci, ID jest większe o 40,5% w porównaniu do grupy kontrolnej, zwierząt które otrzymały DMSO. Podsumowując, wykazano że zahamowanie PDE5 lub PDE2 u zwierząt 3 miesięcznych poprawia pamięć rozpoznawczą. Zestawienie wyników przedstawiono na rycinie 23.



Rycina 23. Wpływ inhibitorów PDE2 lub PDE5 na wyniki testu pamięci rozpoznawczej u szczurów 3 miesięcznych. Test przeprowadzono po 2 godzinach od prezentacji obiektu. Szczurom podawano podskórnie DMSO w dawce 100ml/kg m.c. lub jeden z inhibitorów w dawce 0,3mg/kg m.c. Dane przedstawione na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z dziesięciu niezależnych doświadczeń dla każdej grupy eksperymentalnej \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Dunett'a. Każdą grupę porównywano do grupy kontrolnej, *** - $p < 0,001$.

4.5.2. Wpływ selektywnych inhibitorów PDE2, Bay 60-7550 oraz PDE5 zaprinastu, na pamięć rozpoznawczą szczurów 12 miesięcznych.

Wpływ inhibitorów PDE2 oraz PDE5 na pamięć rozpoznawczą szczurów 12 miesięcznych badano identycznie jak działanie tych substancji na zdolności poznawcze zwierząt 3 miesięcznych. Zaobserwowano, że u zwierząt 12 miesięcznych zahamowanie PDE5 nie poprawia pamięci rozpoznawczej, a nawet nieznacznie obniża ID. Podanie inhibitora PDE2, Bay 60-7550 podobnie jak u zwierząt 3 miesięcznych poprawia nabywanie i konsolidację pamięci. Wartości ID zwiększają się odpowiednio o 34,6% i 46,57% w stosunku do 12 miesięcznych szczurów kontrolnych.

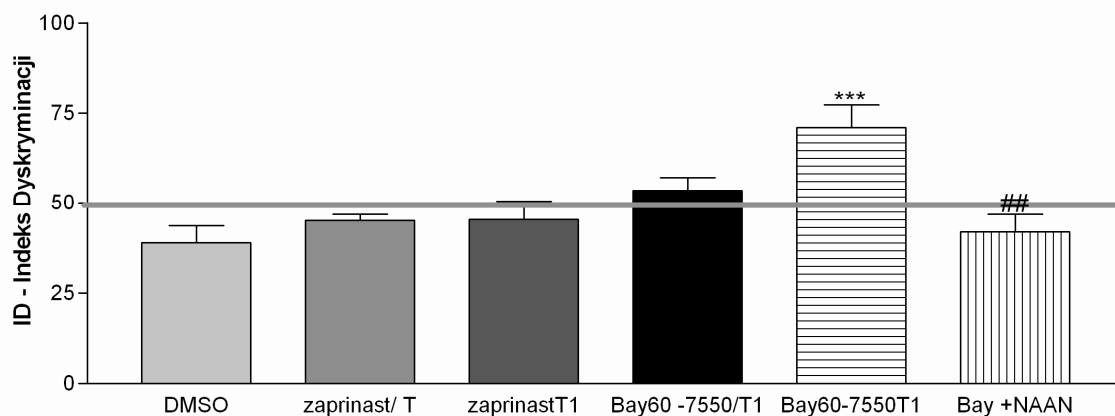


Rycina 24. Wpływ inhibitorów PDE2 lub PDE5 na wyniki testu pamięci rozpoznawczej u szczurów 12 miesięcznych. Test przeprowadzono po 2 godzinach od prezentacji obiektu. Szczurom podawano podskórnie DMSO w dawce 100ml/kg m.c. lub jeden z inhibitorów w dawce 0,3mg/kg m.c. Dane przedstawione na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z dziesięciu niezależnych doświadczeń dla każdej grupy eksperymentalnej \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Dunett'a. Każdą grupę porównywano do grupy kontrolnej, *** - $p < 0,001$.

4.5.3. Wpływ selektywnych inhibitorów PDE2, Bay 60-7550 ; PDE5, zaprinastu, oraz inhibitora nNOS, NAAN na pamięć rozpoznawczą szczurów 24 miesięcznych (starych).

W celu zbadania wpływu inhibitorów PDE2 oraz PDE5 na pamięć rozpoznawczą szczurów 24 miesięcznych postępowano tak jak ze zwierzętami 3 i 12 miesięcznymi. Zaobserwowano, że u 24 miesięcznych szczurów, podobnie jak u szczurów 12 miesięcznych, zahamowanie PDE5 nie wpływa na poprawę pamięci rozpoznawczej. Podanie inhibitora PDE2, Bay 60-7550 poprawia konsolidację pamięci rozpoznawczej 24 miesięcznych zwierząt, średnia wartość współczynnika ID jest u szczurów traktowanych inhibitorem o 45,2% wyższa od średniej zwierząt z grupy kontrolnej.

U tej grupy wiekowej dodatkowo zbadano wpływ inhibitora neuronalnej izoformy NOS (nNOS) na poprawę pamięci wywołaną przez zahamowanie PDE2. Doświadczenie to miało na celu zbadanie czy mechanizm działania inhibitorów fosfodiesteraz jest zależny od NOS. Wykazano, że podskórne podanie selektywnego inhibitora nNOS, NAAN w dawce 0,1mg/kg m.c. zwierzętom, którym podano również inhibitor PDE2, Bay 60-7550 znosi jego korzystne działanie. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że inhibitor PDE 2 poprawia pamięć na ścieżce zależnej od nNOS.



Rycina 25. Wpływ inhibitorów PDE2, PDE5 oraz nNOS na wyniki testu pamięci rozpoznawczej u szczurów 24 miesięcznych. Test przeprowadzono po 2 godzinach od prezentacji obiektu. Szczurom podawano podskórnie DMSO w dawce 100ml/kg m.c., jeden z inhibitorów PDE w dawce 0,3mg/kg m.c. lub Bay 60-7550 oraz NAAN w dawce 0,1mg/kg m.c. Dane przedstawione na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z dziesięciu niezależnych doświadczeń dla każdej grupy eksperymentalnej \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Dunett'a (każdą grupę porównywano do grupy kontrolnej, *** - $p < 0,001$), efekt działania inhibitora nNOS określono przy pomocy testu t-Student'a (porównano grupę Bay vs. Bay+NAAN, ## - $p < 0,01$).

4.5.4. Ocena wpływu selektywnych inhibitorów PDE2 oraz PDE5 na zdolności poznawcze szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych.

W celu porównania efektywności działania podawanych podskórnie inhibitorów PDE2 lub PDE5 na poprawę pamięci rozpoznawczej szczurów podczas starzenia, wyniki otrzymane dla poszczególnych grup wiekowych zestawiono w tabeli 5.

Grupa wiekowa	DMSO (kontrola) [ID ± SD]	Zaprinast (inhibitor PDE5)		Bay 60-7550 (inhibitor PDE2)	
		/T1	T1	/T1	T1
szczury 3 miesięczne	41,6 ± 13,3	70 ± 9,8	66,1±10,7	68,5 ± 11,3	69,9 ± 15,8
szczury 12 miesięczne	44,7 ± 9,1	30,32 ± 12,7	30,3 ± 10,8	68,3 ± 5,1	83,6 ± 11
szczury 24 miesięczne	38,9 ± 13,2	45 ± 4,1	45,3 ± 12,6	53,5 ± 8,5	71 ± 16,7

Tabela 5. Zestawienie wpływu inhibitorów PDE2 lub PDE5 na nabywanie oraz konsolidację pamięci rozpoznawczej u szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych. *Test pamięci rozpoznawczej (sesję T2) przeprowadzono po 2 godzinach od prezentacji obiektu. Szczurom podawano podskórnie DMSO w dawce 100ml/kg m.c. lub jeden z inhibitorów w dawce 0,3mg/kg m.c. Dane przedstawione w tabeli stanowią średnią arytmetyczną z dziesięciu niezależnych doświadczeń dla każdej grupy eksperymentalnej ± SD.*

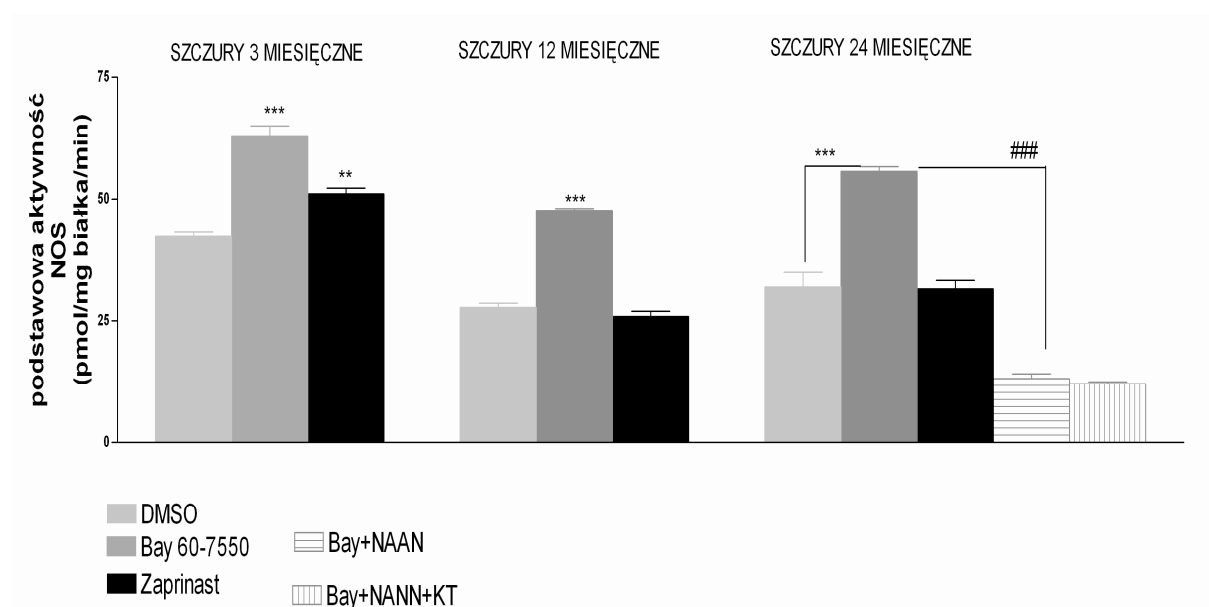
4.6. Wpływ zahamowania PDE2 oraz PDE5 *in vivo* na aktywność podstawową NOS w mózgu podczas starzenia.

Aktywność podstawową NOS badano metodą radiochemiczną we frakcji cytozolowej otrzymanej z homogenatów z hipokampa, prążkowiec lub kory mózgu szczurów 3, 12 oraz 24 miesięcznych po podskórnym podaniu inhibitorów PDE2 lub PDE5. U zwierząt 24 miesięcznych badano dodatkowo wpływ podanego podskórnie selektywnego inhibitora nNOS na aktywność podstawową NOS w wybranych częściach mózgu. Zwierzęta dekapitowano bezpośrednio po zakończeniu testów behawioralnych, czas od podania inhibitora do wykonania pomiaru aktywności NOS wahał się od 2,5 do 3,5 godziny.

Zaobserwowano, że zahamowanie PDE2 przez podskórne podanie Bay 60-7550 zwiększa aktywność podstawową NOS w hipokampie u wszystkich grup wiekowych (Rycina 26), co koreluje z poprawą pamięci rozpoznawczej u badanych zwierząt (Tabela 5). Na przykładzie zwierząt 24 miesięcznych wykazano, że jednoczesne podanie inhibitora PDE2 i inhibitora nNOS powoduje znaczące obniżenie aktywności podstawowej NOS w hipokampie, co najprawdopodobniej świadczy o znaczącym udziale tej izoformy w procesach związanych z uczeniem i pamięcią. Dodatkowo

zaobserwowano, że zastosowanie inhibitora PKG, KT5823 (*in vitro*) nie wpływa na aktywność podstawową NOS po podaniu inhibitorów PDE2 oraz nNOS.

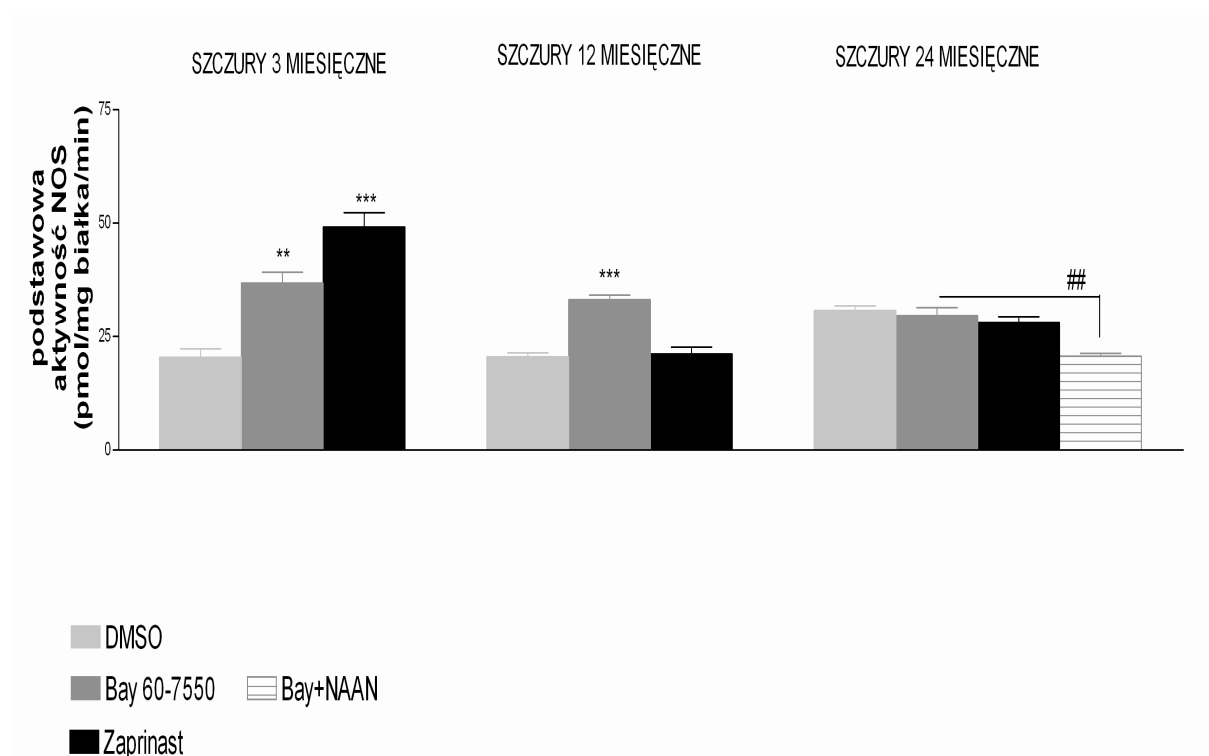
Inhibitor PDE5, zaprinast zwiększa aktywność podstawową NOS w hipokampie tylko u zwierząt 3 miesięcznych, podobnie tylko w tej grupie wiekowej zaprinast poprawia możliwości poznawcze. Zestawienie wyników przedstawiono na rycinie 26.



Rycina 26. Wpływ inhibitorów PDE2, PDE5 na aktywność podstawową NOS w hipokampie szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych oraz inhibitora PDE2 podanego łącznie z inhibitorem nNOS na aktywność podstawową NOS w hipokampie zwierząt 24 miesięcznych. Szczurom podawano podskórnie DMSO w dawce 100ml/kg m.c., jeden z inhibitorów PDE w dawce 0,3mg/kg m.c. lub Bay 60 -7550 oraz NAAN w dawce 0,1mg/kg m.c. Aktywność podstawową NOS mierzono radiochemicznie w cytozolu. Dane przedstawione na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń dla każdej grupy eksperymentalnej \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Dunett'a (każdą grupę porównywano do grupy kontrolnej, *** - $p < 0,001$; odpowiednio ** - $p < 0,01$), efekt działania inhibitora nNOS określono przy pomocy testu t- Student'a (porównano grupę Bay vs. Bay+NAAN, ### - $p < 0,001$).

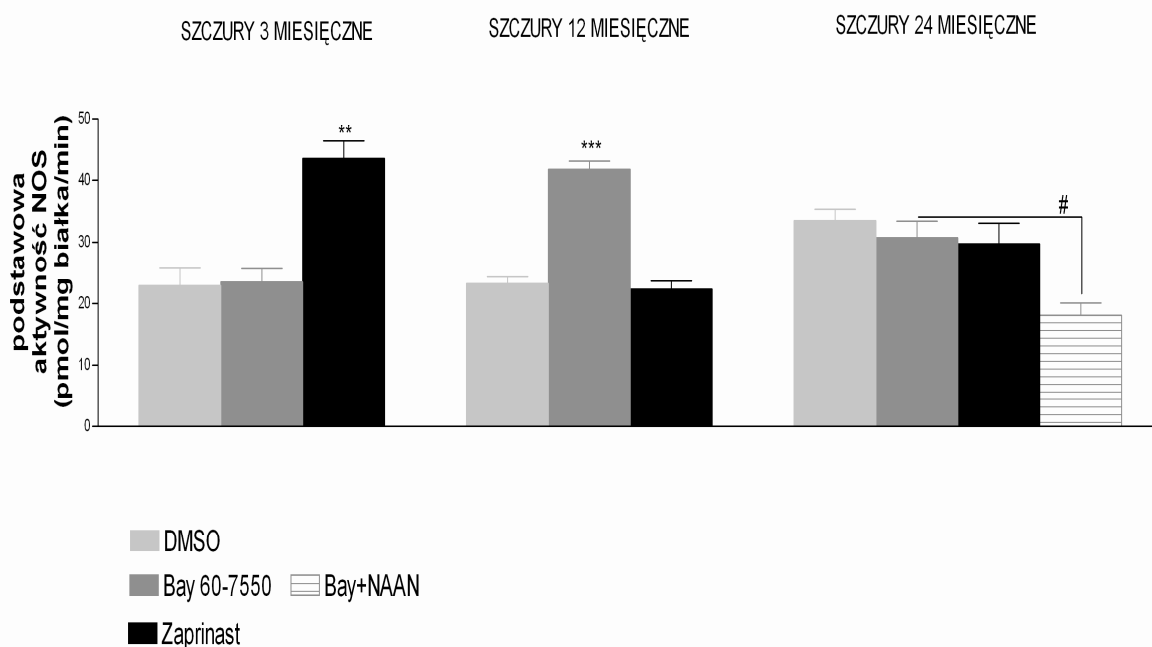
Inhibitory PDE wpływają na aktywność NOS w prążkowie podobnie, jak na aktywność tego enzymu w hipokampie. Zaobserwowano, że zahamowanie PDE2 przez podskórne podanie Bay 60 - 7550 zwiększa aktywność podstawową NOS w

prążkowiu u wszystkich grup wiekowych (Rycina 27), co koreluje z poprawą pamięci rozpoznawczej u badanych zwierząt (Tabela 5). U zwierząt 24 miesięcznych wykazano, że jednoczesne podanie inhibitora PDE2 i inhibitora nNOS powoduje zniesienie efektu działania Bay 60-7550 i obniżenie aktywności NOS w prążkowiu w porównaniu do aktywności NOS po zahamowaniu PDE2. Inhibitor PDE5, zaprinast zwiększa aktywność podstawową NOS w prążkowiu tylko u zwierząt 3 miesięcznych, podobnie tylko w tej grupie wiekowej zaprinast poprawia możliwości poznawcze. Zestawienie wyników przedstawiono na rycinie 27.



Rycina 27. Wpływ inhibitorów PDE2, PDE5 na aktywność podstawową NOS w prążkowiu szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych oraz inhibitora PDE2 podanego łącznie z inhibitorem nNOS na aktywność podstawową NOS w prążkowiu zwierząt 24 miesięcznych. Szczurom podawano podskórnie DMSO w dawce 100ml/kg m.c., jeden z inhibitorów PDE w dawce 0,3mg/kg m.c. lub Bay 60 -7550 oraz NAAN w dawce 0,1mg/kg m.c. Aktywność podstawową NOS mierzono radiochemicznie w cytozolu. Dane przedstawione na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń dla każdej grupy eksperymentalnej \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Dunett'a (każdą grupę porównywano do grupy kontrolnej, *** - $p < 0,001$; odpowiednio ** - $p < 0,01$), efekt działania inhibitora nNOS określono przy pomocy testu t- Student'a (porównano grupę Bay vs. Bay+NAAN, ## - $p < 0,01$).

Podczas badania działania inhibitorów PDE2 i PDE5 na aktywność podstawową NOS w korze mózgu zaobserwowano, że zahamowanie PDE2 przez podskórne podanie Bay 60 - 7550 zwiększa aktywność podstawową NOS w korze tylko u zwierząt 12 miesięcznych (Rycina 28). U zwierząt 24 miesięcznych wykazano, że podanie inhibitora nNOS powoduje obniżenie aktywności podstawowej NOS w korze mózgu. Zaobserwowano również, że inhibitor PDE5, zaprinast zwiększa aktywność podstawową NOS w korze mózgu tylko u zwierząt 3 miesięcznych, podobnie tylko w tej grupie wiekowej zaprinast poprawia możliwości poznawcze. Zestawienie wyników przedstawiono na rycinie 28.



Rycina 27. Wpływ inhibitorów PDE2, PDE5 na aktywność podstawową NOS w korze mózgu szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych oraz inhibitora PDE2 podanego łącznie z inhibitorem nNOS na aktywność podstawową NOS w korze mózgu zwierząt 24 miesięcznych. Szczurom podawano podskórnie DMSO w dawce 100ml/kg m.c., jeden z inhibitorów PDE w dawce 0,3mg/kg m.c. lub Bay 60 -7550 oraz NAAN w dawce 0,1mg/kg m.c. Aktywność podstawową NOS mierzono radiochemicznie w cytozolu. Dane przedstawione na wykresie stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń dla każdej grupy eksperymentalnej \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc Dunett'a (każdą grupę porównywano do grupy kontrolnej, *** - $p < 0,001$; odpowiednio ** - $p < 0,01$), efekt działania inhibitora nNOS określono przy pomocy testu t- Student'a (porównano grupę Bay vs. Bay+NAAN, # - $p < 0,05$).

Podsumowując należy podkreślić, że w badaniach wpływu inhibitorów PDE2 oraz PDE5 na aktywność NOS oraz zdolności poznawcze szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych zaobserwowano korelację pozytywnego wpływu inhibitorów na pamięć zwierząt ze zwiększaniem aktywności NOS w hipokampie i prążkowie. Jednocześnie na przykładzie zwierząt 24 miesięcznych wykazano, że zahamowanie nNOS znosi korzystne działanie inhibitora PDE2 na pamięć oraz obniża aktywność NOS, co sugeruje, że poprawienie pamięci przez zahamowanie PDE2 wiąże się ze wzrostem aktywności NOS, oraz że izoformą mającą znaczny udział w tym mechanizmie jest nNOS.

5. Dyskusja

Od prawie 40 lat badany jest związek cGMP i układu cholinergicznego. Pomimo wielu lat badań i intensywnych doświadczeń mających zgłębić tę skomplikowaną zależność, do dziś nie udało się jednoznacznie określić znaczenia cGMP w funkcjonowaniu tego ważnego układu neuroprzekaźnikowego. Coraz więcej wiadomo na temat udziału NO i cGMP w mechanizmach uczenia się i pamięci. Wraz z wynikami nowych badań pojawiają się nowe możliwości modyfikowania i poprawiania zdolności poznawczych. W niniejszej pracy badano jak zmienia się zdolność układu cholinergicznego do syntezy cGMP na szlaku zależnym od NO, podczas rozwoju i starzenia mózgu. Analizowano również ekspresję enzymów kontrolujących poziom cGMP, fosfodiesteraz w mózgu starczym oraz to, czy hamując ich aktywność można poprawić pamięć u zwierząt starych.

W prowadzonych przez nas badaniach immunohistochemicznych wykazano, że poziom cGMP w mózgu oraz zdolność neuronów cholinergicznym okolicy przegrody środkowej i formacji Broca do syntezy cGMP w odpowiedzi na NO maleje podczas rozwoju i starzenia mózgu szczurów. Podobnie w prążkowiu interneurony cholinergiczne tracą wraz z wiekiem zdolność do zależnej od NO syntezy cGMP. Badania wykazały również, że neurony cholinergiczne jądra nakrywkowo konarowo mostowego nie reagują podniesieniem poziomu cGMP na podanie donora NO, na żadnym etapie rozwoju po urodzeniu zwierząt, co sugeruje brak aktywności sGC w tych komórkach. Prawdopodobnie jej aktywność jest wyciszana jeszcze w rozwoju zarodkowym. Dodatkowo zaobserwowano, że neurony cholinergiczne przodomózgowia tracą zdolność do syntezy cGMP pod wpływem NO stopniowo i równoległe z dojrzewaniem drogi cholinergicznym unerwiającej hipokamp, co obrazuje malejąca wraz z wiekiem zwierząt ilość włókien wykazujących immunoreaktywność dla cGMP i pęcherzykowego transportera acetylocholin (vAChT) w hipokampie. Komórki cholinergiczne unerwiające korę nową mózgu zachowują natomiast zdolność do syntezy cGMP pod wpływem NO przez całe życie i włókna cholinergiczne kory wykazują immunoreaktywność dla cGMP na wszystkich etapach rozwojowych, co zaobserwował również De Vente i wsp. [2001]. Liczba neuronów cholinergicznym w jednej półkuli mózgu szczura jest szacowana na około 20,000 [Smith i Booze, 1995; Geula i wsp., 1993]. W naszej pracy ze względu na

zastosowaną metodykę nie określiliśmy całkowitej liczby neuronów w mózгах badanych zwierząt, chodziło bowiem przede wszystkim o zbadanie procentowego udziału neuronów cholinergiczných syntetyzujących cGMP wśród wszystkich neuronów cholinergiczných. Zaobserwowaliśmy jednak, że liczba policzonych przez nas neuronów cholinergiczných jest zdecydowanie niższa u starych (24 miesięcznych), niż u młodych zwierząt. W formacji Broca i okolicy przegrody środkowej średnia liczba neuronów cholinergiczných rosła z 460 u zwierząt P1 do 2787 u szczurów P21, a następnie malała do 914 u zwierząt 24 miesięcznych. Natomiast w prążkowie najwyższą liczbę średnio 1790 neuronów obserwowaliśmy u szczurów P10, u szczurów 3 miesięcznych liczba interneuronów cholinergiczných spadała do 439, a u zwierząt 24 miesięcznych do 389 neuronów. Spadek liczby neuronów cholinergiczných zaobserwowali w swoich badaniach również Smith i współpracownicy [Smith i wsp., 1993; Smith i Booze, 1995].

Wyniki naszych badań kolokalizacji cGMP i vAChT w prążkowie wykazały, że immunoreaktywność cGMP i vAChT nie jest równomierna w całej strukturze. Unerwienie cholinergiczne prążkowie rozwija się najpierw w bocznej części jądra ogoniastego i skorupy, następnie komórki migrują do wewnątrz tej struktury i rosną. Pełne unerwienie prążkowie obserwuje się u szczurów około 16 dnia po urodzeniu (P16) [Aznavour i wsp., 2003]. W niniejszej pracy na podobnym etapie wiekowym, u zwierząt 21 dniowych (P21) zaobserwowaliśmy przejściowy wzrost liczby komórek cholinergiczných syntetyzujących cGMP, co najprawdopodobniej ma związek z udziałem ścieżki sygnałowej NO/cGMP z dojrzewaniem unerwienia cholinergicznego prążkowie.

Spadek poziomu i immunoreaktywności cGMP w różnych rejonach mózgu podczas starzenia wykazano w wielu pracach [Chalimoniuk i Strosznajder, 1998; De Vente i wsp., 1998a; Markerink i wsp., 1997; Puri i Volicer, 1981; Schmidt i Thornberry, 1978; Vallebuona i Raiteri, 1995; Wei, 1993]. W niniejszej pracy również zaobserwowano spadek poziomu immunoreaktywności cGMP w trakcie rozwoju i starzenia mózgu szczurów. Prawdopodobną przyczyną spadku poziomu cGMP w mózgu starym jest podwyższona aktywność PDE [Chalimoniuk i Strosznajder, 1998], co potwierdzono również w tej pracy wykazując, że inkubacja skrawków starczego mózgu z inhibitorem PDE2 powoduje znaczące podniesienie immunoreaktywności cGMP. Ponadto stwierdzono, że zmienia się ekspresja PDE 2, 5 i 9 w mózgu starym. Dochodzi do nieznacznego zwiększenia poziomu mRNA dla

PDE2 oraz istotnego podwyższenia poziomu mRNA PDE9, najbardziej selektywnej ze wszystkich PDE hydrolizujących cGMP. W mózgach zwierząt 24 miesięcznych nie obserwowano mRNA PDE5, co sugeruje że ekspresja tej PDE jest podczas starzenia wyciszana.

Wysoki poziom cGMP po urodzeniu podczas rozwoju mózgu zwierząt młodych jest prawdopodobnie niezbędny dla wytworzenia prawidłowego, dojrzałego unerwienia mózgu. Polleux i Morrow [2000] wykazali, że w korze mózgu szczura w trakcie rozwoju, cGMP określa kierunek wzrostu aksonów i dendrytów. Również w badaniach na bezkręgowcach dowiedziono, że NO i cGMP odgrywają kluczową rolę podczas rozwoju i dojrzewania połączeń nerwowych [Scholz i wsp., 1998]. Zaobserwowana w naszych badaniach utrata możliwości syntezy cGMP pod wpływem NO w włóknach cholinergicznym hipokampa podczas rozwoju zbiega się w czasie z dojrzewaniem unerwienia cholinergicznego tej struktury i wykształceniem receptorów muskarynowych M2 [Goldbach i wsp., 1998; Ludkiewicz i wsp., 2002]. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że cGMP jest zaangażowany w rozwój drogi cholinergicznym i unerwienie hipokampa. Pomimo, że nasze wyniki wskazują na udział sygnalizacji NO/cGMP w powstawaniu i dojrzewaniu unerwienia cholinergicznego hipokampa i prążkowie, te dwa procesy znacząco się różnią. Ciało neuronów cholinergicznym oraz ich wypustki unerwiające hipokamp nie wykazują znaczącej immunoreaktywności dla cGMP na skutek podania NO u zwierząt powyżej 21 dnia życia. We włóknach cholinergicznym prążkowie po podaniu NO i zahamowaniu PDE przy pomocy 1mM IBMX obserwuje się immunoreaktywność cGMP nawet u szczurów dorosłych i starych. Trudno jest określić dlaczego w ciałach neuronów cholinergicznym prążkowie u dorosłych i starych zwierząt nie dochodzi do syntezy cGMP pod wpływem NO. Podobne rezultaty otrzymał De Vente i wsp. [1998] dla komórek piramidowym hipokampa i komórek Purkinjego w mózdzku, pomimo stwierdzonej przez wielu badaczy obecności podjednostek sGC w tych neuronach [Burette i wsp., 2002; Ding i wsp., 2004]. Nawet w obecności niezależnym od NO aktywatorów sGC takich jak YC-1 i Bay 41-2272, które zwykle znacząco stymulują syntezę cGMP [Becker i wsp., 2001], nigdy nie notowano immunoreaktywności cGMP w neuronach piramidowym hipokampa i komórkach Purkinjego w mózdzku [Van Staveren, 2004; De Vente i Steinbusch, 2000b]. Prawdopodobnie sGC jest w tych komórkach hamowana przez jakiś czynnik wewnętrzny, albo nie ma w nich któregoś z kofaktorów niezbędnych dla aktywności enzymu [Mo i wsp., Schmidt i

wsp., 2001]. Nie wiadomo także, czy u dorosłych zwierząt ciała komórek cholinergicznym unerwiających korę mózgu syntetyzują cGMP na drodze zależnej od NO, czy nie. We wcześniejszych badaniach De Vente i wsp. [1998] wykazali, że komórki i włókna cholinergiczne, które wykazują immunoreaktywność dla NOS nie syntetyzują cGMP pod wpływem NO [Sugaya i McKinney, 1994]. Podobne wyniki *in vivo* otrzymali Southam i Garthwaite [1993]. W okolicy podstawy przodomózgowia szczura nNOS eksprymuje 30 do 50 procent neuronów cholinergicznym [Sugaya i McKinney, 1994], nie wiadomo ile z tych komórek unerwia korę mózgu. Funkcja cGMP we włóknach cholinergicznym kory również nie jest znana. Hartlage-Rübsamen i Schliebs [2001] zasugerowali, że unerwienie cholinergiczne pochodzące z neuronów znajdujących się w jądrach podstawy reguluje aktywność nNOS. Możliwe, że NO działa tutaj jako przekaźnik zwrotny i powoduje podwyższenie poziomu cGMP w zakończeniach włókien cholinergicznym przez co kontroluje uwalnianie acetylocholiny, przy czym nie jest jasne czy ma działanie stymulujące czy hamujące. Podsumowując tę część przeprowadzonych przez nas badań, można stwierdzić, że warunkowana przez NO synteza cGMP w neuronach cholinergicznym podstawy przodomózgowia i prądkowia zaczyna się obniżać w drugim tygodniu po urodzeniu zwierząt. Poziom cGMP w mózgu spada sukcesywnie przez całe życie szczurów, a pozytywna korelacja tego spadku ze zmniejszeniem kolokalizacji cGMP i vAChT we włóknach hipokampa pozwala przypuszczać, że NO i cGMP odgrywają istotną rolę w dojrzewaniu unerwienia cholinergicznym tej ważnej struktury mózgu. Przeprowadziliśmy również doświadczenie badające wpływ pobudzenia receptorów cholinergicznym na poziom IR-cGMP w mózgu dojrzłym. Otrzymane wyniki wykazały, że inkubacja skrawków mózgu 3 miesięcznym szczurów z agonistą receptorów cholinergicznym (karbacholem) powoduje podwyższenie poziomu cGMP w neuronach oraz włóknach cholinergicznym głównie w korze czołowej, wyspach Celleja oraz w prądkowiu. Castoldi i wsp. [1993] zaobserwowali, że karbachol powoduje podwyższenie stężenia cGMP w hodowlach pierwotnym neuronów kory mózgu, a zahamowanie aktywności NOS znosi efekt działania agonisty. Zwiększenie stężenia cGMP w korze mózgu i mózdku po podaniu agonisty receptorów muskarynowym, oksotremoryny obserwowali również Ferrendelli i wsp. [1970]. Wyniki otrzymanej w tej pracy jak również zaprezentowane dane literaturowe sugerują, że pobudzenie receptorów muskarynowym prowadzi do zwiększenia syntezy cGMP, prawdopodobnie na szlaku zależnym od NO.

W niniejszej pracy badaliśmy również wpływ selektywnych inhibitorów PDE2 i PDE5 na poziom IR-cGMP w skrawkach mózgu szczurów dorosłych i starych. Nasze wyniki wykazały, że inkubacja skrawków mózgu dorosłych i starych szczurów z selektywnym inhibitorem PDE2 o nazwie Bay 60-7550 powoduje znaczące podniesienie cGMP-IR w mózgu zwłaszcza w komórkach i włóknach w korze czołowej, włóknach w prążkowie i wyspach Calleja w przodomózgowiu, a także w hipokampie. Bardzo podobne wyniki uzyskaliśmy po inkubacji skrawków mózgu z obydwoma inhibitorami: Bay 60-7550 oraz sildenafilem hamującym aktywność PDE5. Podniesienie IR-cGMP w hipokampie po inkubacji skrawków z Bay 60-7550 obserwowali również Boess i wsp. [2004] u dorosłych szczurów. Na podstawie tych wyników można stwierdzić jednoznacznie, że zahamowanie aktywności PDE2 w mózgu prowadzi do znaczącego wzrostu poziomu cGMP, a zatem jest to jedna z fosfodiesteraz obniżająca jego poziom w mózgach zwierząt dorosłych i starych. Badaliśmy także wpływ inhibitora PDE5, sildenafilu na IR-cGMP w skrawkach mózgu dorosłych i starych szczurów. Wykazaliśmy, że u zwierząt dorosłych zahamowanie PDE5 prowadzi do zwiększenia IR-cGMP w korze mózgu, prążkowie i w wyspach Calleja oraz do niewielkiego wzrostu IR-cGMP w hipokampie. We wszystkich badanych strukturach mózgu zwiększenie poziomu IR-cGMP pod wpływem sildenafilu było mniej widoczne, niż po zahamowaniu PDE2 przez Bay 60-7550. Zwiększenie IR-cGMP w skrawkach hipokampa dorosłych szczurów pod wpływem selektywnych inhibitorów PDE5 obserwowali również Prickaerts i wsp., [2002]. Badania wykazały, że vardenafil jest zdecydowanie bardziej skuteczny niż sildenafil, co potwierdzili Rutten i wsp. [2005] w skrawkach hipokampa dorosłych myszy. W niniejszej pracy wykazaliśmy, że inkubacja skrawków mózgu zwierząt starych (24 miesięcznych) z sildenafilem nie powoduje wzrostu IR-cGMP; sygnał dla cGMP po zahamowaniu PDE5 jest taki sam, jak w mózgach kontrolnych, których nie inkubowano z inhibitorem. W kolejnych badaniach, gdzie przy użyciu hybrydyzacji *in situ* analizowaliśmy poziom mRNA PDE w mózgach dojrzałych i starczych wykazaliśmy, że u zwierząt 24 miesięcznych PDE5 nie ulega ekspresji w mózgu, stąd zastosowanie selektywnego inhibitora tego enzymu nie powoduje zwiększenia poziomu jego substratu, cGMP w skrawkach mózgu. Po zastosowaniu selektywnych inhibitorów PDE2 i 5 obserwowano IR-cGMP w korze mózgu nie tylko w komórkach i włóknach, ale również rozproszone dookoła nich, co może być efektem transportu cGMP na zewnątrz komórek przy osiągnięciu wysokiego stężenia

wewnątrzkomórkowego tego nukleotydu. Znaczny wzrost IR-cGMP we włóknach po zahamowaniu PDE, sugeruje że enzymy te są aktywne głównie w wypustkach neuronów.

Kolejnym etapem niniejszej pracy było zbadanie ekspresji PDE 2, 5 i 9 w mózгах szczurów 12 i 24 miesięcznych, dorosłych i starych. Analiza poziomu mRNA tych PDE wykazała, że ekspresja genów enzymów hydrolizujących cGMP zmienia się podczas starzenia mózgu. Poziom mRNA PDE2 jest w mózgu starym nieznacznie podwyższony w porównaniu do mózgu dojrzałego. Ekspresja PDE9 jest znacznie silniejsza w mózgu u starych zwierząt, a mRNA PDE5 jest obecne tylko w mózgu dorosłych szczurów, u zwierząt 24 miesięcznych nie stwierdzono ekspresji genu kodującego tą PDE. Na podstawie wyników tej pracy oraz badań Van Staveren i wsp. [2003] można przypuszczać, że mRNA PDE 5 jest obecne w mózgu podczas rozwoju płodowego oraz u zwierząt młodych i dorosłych, natomiast podczas starzenia ekspresja genu kodującego PDE5 jest wyciszana w mózgu. Badania ekspresji PDE 2, 5 i 9 w mózgu starym przeprowadziła oprócz nas dotychczas tylko jedna grupa naukowców z tymże były to mózgi ludzkie [Reyes-Irisarri i wsp. 2007]. Podobnie jak my w tej pracy obserwowano w mózgu starym jedynie mRNA PDE2 i PDE9, a mRNA PDE5 nie zlokalizowano. Co ciekawe Reyes-Irisarri i wsp. [2007] wykazali także, że ekspresja PDE2 i 9 nie zmienia się znacząco w mózgu osób cierpiących na chorobę Alzheimera. Analiza poziomu mRNA PDE9 została przeprowadzona w mózgu dorosłych szczurów przez Van Staveren i Markerink van Ittersum [2005], ich wyniki wykazały ekspresję tej PDE w całym mózgu, głównie w ciałach komórek nerwowych. Najwyższy poziom mRNA PDE9 w obserwowano w komórkach Purkinjego w mózdzku. Ta sama grupa badała również ekspresję PDE 2, 5 i 9 podczas rozwoju mózgu szczura, zaobserwowano że najbardziej rozpowszechnioną PDE hydrolizującą cGMP w mózgu jest PDE9, która ulega ekspresji w całym mózgu, a najwyższy poziom mRNA tej PDE występuje w komórkach Purkinjego w mózdzku. Poziom mRNA PDE2 i PDE5 zmieniał się w różnych częściach mózgu podczas rozwoju, a ekspresję tych PDE podobnie jak PDE9 zlokalizowano głównie w ciałach neuronów [Van Staveren i wsp., 2003]. W badaniach przeprowadzonych na pierwotnych hodowlach neuronów izolowanych z hipokampa i kory mózgu wykazano, że za degradację cAMP i cGMP powstałych w wyniku pobudzenia receptorów NMDA odpowiedzialne są odpowiednio PDE4 i PDE2 [Suvana i O'Donnell, 2002]. PDE 2, 5 i 9 ulegają ekspresji także w neuronach

rdzenia kręgowego szczura [De Vente i wsp., 2006]. Na podstawie wyników niniejszej pracy oraz danych literaturowych można stwierdzić, że w dojrzałym mózgu za hydrolizę cGMP odpowiedzialne są PDE2, PDE5 oraz PDE9, wskazują na to wyniki hybrydyzacji *in situ* oraz badań immunohistochemicznych z użyciem inhibitorów PDE. W zależności od struktury mózgu i rodzaju komórek poziom cGMP może regulować jedna lub więcej izoform PDE. W mózgu starczym nie obserwuje się ekspresji PDE5, ale zwiększa się poziom mRNA PDE2 i PDE9, najbardziej selektywnej z PDE degradujących cGMP. Prawdopodobnie wyższy poziom ekspresji PDE2 i PDE9 jest odpowiedzialny za obniżenie stężenia cGMP podczas starzenia. Zahamowanie PDE2 znacząco zwiększa IR-cGMP w skrawkach mózgu, podobnie IBMX niespecyficzny inhibitor PDE, pomimo że nie hamuje aktywności PDE9 [Soderling i wsp., 1998b] powoduje wzrost poziomu cGMP w mózgu starczym. Możliwe również, że w mózgu starczym dochodzi jednocześnie do zwiększenia aktywności PDE2 i PDE9.

Dysponując wiedzą na temat zmian ekspresji PDE hydrolizujących cGMP podczas starzenia mózgu oraz możliwości podniesienia poziomu cGMP w mózgu za pomocą inhibitorów PDE2 i PDE5 *in vitro*, przeprowadziliśmy serię badań wpływu tych inhibitorów na zdolności poznawcze szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych (*in vivo*). Jednocześnie w celu zrozumienia mechanizmu działania inhibitorów sprawdziliśmy jak zahamowanie aktywności PDE2 i PDE5 wpływa na aktywność podstawową NOS w hipokampie, prążkowiu i korze mózgu badanych zwierząt.

Wyniki naszych badań wykazały, że podskórne podanie selektywnego inhibitora PDE2, Bay 60-7550 poprawia nabywanie i konsolidację pamięci rozpoznawczej u szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych oraz, że neuronalna izoforma NOS jest zaangażowana w ten proces. Zahamowanie aktywności PDE5 przez podskórne podanie zaprinastu poprawia pamięć tylko u szczurów dorosłych (3 miesięcznych), natomiast nie wpływa na zdolności poznawcze 12 miesięcznych i starszych zwierząt. Obydwa inhibitory PDE poprawiają lepiej konsolidację pamięci niż jej nabywanie. Z badań prowadzonych na dorosłych szczurach wiadomo, że analogi cGMP oraz selektywne inhibitory PDE2 oraz PDE5 mogą poprawiać pamięć u szczurów 3-4 miesięcznych [Prickaerts i wsp., 1997; 2002a; 2002b; Boess i wsp., 2004]. Ponadto Boess i wsp. [2004] dowiedli przy użyciu selektywnego inhibitora PDE2, że ta PDE jest głównie odpowiedzialna za hydrolizę cGMP w neuronach w hodowli oraz w skrawkach hipokampa uzyskanych z mózgu dorosłych zwierząt. Wyniki badań

behawioralnych opublikowane na łamach kolejnych kilku prac dowodzą, że wybiórcze zahamowanie aktywności PDE5 u dorosłych szczurów i myszy poprawia konsolidację pamięci [Prickaerts i wsp., 2002b; 2004; Rutten i wsp., 2005; 2007]. Wykazano, że selektywny inhibitor PDE2, Bay 60-7550 podany bezpośrednio po sesji poznawczej poprawia pamięć rozpoznawczą u dorosłych szczurów [Rutten i wsp., 2007]. Dla wywołania poprawy w powstawaniu pamięci autorzy pracy używali bardzo wysokich stężeń inhibitorów od 3 do 10 mg/kg, w niniejszej pracy stosowano zdecydowanie niższe stężenie badanych inhibitorów, 0,3 mg/kg. Nasze wyniki sugerują, że zahamowanie aktywności PDE2 oraz PDE5 u dorosłych, 3 miesięcznych szczurów poprawia zarówno konsolidację jak i nabywanie pamięci. Różnica może wynikać z faktu używania różnych inhibitorów PDE5 oraz innych metod podawania leku. Podczas naszych badań inhibitory PDE podawane były podskórnie, w pracach Prickaerts'a i wsp. doustnie. Wyniki większości prac są zbieżne z otrzymanymi w naszych badaniach. W tej pracy po raz pierwszy zbadano wpływ inhibitorów PDE na pamięć starych zwierząt, u których dochodzi do rzeczywistego pogorszenia zdolności poznawczych na skutek fizjologicznego starzenia organizmu. Po raz pierwszy dowiedliśmy, że zahamowanie aktywności PDE2 poprawia pamięć rozpoznawczą u 12 i 24 miesięcznych szczurów, natomiast inhibitor PDE5 pozostaje bez wpływu. Brak działania zaprinastu na pamięć 12 i 24 miesięcznych szczurów wiąże się z obserwowanym przez nas w niniejszej pracy brakiem ekspresji PDE5 w mózgu starych zwierząt, a przez to brakiem podwyższenia stężenia cGMP po zahamowaniu tego enzymu, co wykazały również nasze badania IR-cGMP *in vitro*. Poprawa pamięci u zwierząt 12 i 24 miesięcznych po podaniu Bay 60-7550 prawdopodobnie wynika z faktu, że mRNA PDE2 jest syntetyzowane w mózgu starym na wysokim poziomie, a PDE2 i PDE9 są odpowiedzialne za hydrolizę cGMP.

W naszych badaniach wykazaliśmy również, że zahamowanie aktywności nNOS przez podanie selektywnego inhibitora NAAN znosi korzystny wpływ inhibitora PDE2 na zdolności poznawcze zwierząt. Podobne wyniki uzyskał Devan i wsp. [2007] podając dorosłym szczurom inhibitor PDE5 sildenafil, a następnie inhibitor NOS, L-NAME. Zahamowanie aktywności PDE5 powodowało poprawę pamięci przestrzennej, a późniejsze zahamowanie NOS znosiło korzystny efekt działania inhibitora PDE5. Wyniki te, podobnie jak otrzymane w niniejszej pracy, sugerują, że sildenafil, selektywny inhibitor PDE5 może służyć za środek wspomagający pamięć u

dorosłych zwierząt przez działanie na ścieżkę sygnałową NO/cGMP zależną od pobudzenia receptora NMDA. W swoich ostatnich badaniach Piedrafita i wsp. [2007] opisali wyniki doświadczeń świadczących potwierdzających znaczenie przekazywania NMDA/NO/cGMP w mechanizmach uczenia się i pamięci. Wykazano również, że proces starzenia zaburza działanie tej ścieżki i pogarsza wyniki osiągane przez zwierzęta w testach. Według wyników tej grupy szczury 7 miesięczne potrzebują zdecydowanie więcej (192 +/- 64%) sesji poznawczych do nauczenia się testu labiryntu Y, a działanie ścieżki sygnałowej wiodącej od pobudzenia receptorów NMDA przez glutaminian do syntezy cGMP jest obniżone o 60 +/- 23% u szczurów 7 miesięcznych w porównaniu z 3 miesięcznymi (dorosłymi). Wyniki Piedrafita i wsp. [2007] przemawiają za teorią tłumaczącą utratę zdolności poznawczych w trakcie starzenia upośledzeniem sygnalizacji NMDA/NO/cGMP. Benett i wsp. [2007] wykazali, że podanie azotanu, związku naśladującego działanie NO w mózgu przywraca możliwości poznawcze szczurom z uszkodzonym układem cholinergicznym przodomózgowia. Wyniki tych autorów potwierdzają fakt, że sygnalizacja NO/cGMP wzmacnia plastyczność synaptyczną w rejonach mózgu zaangażowanych w nabywanie, przechowywanie i konsolidację pamięci, oraz udział cGMP w działaniu układu cholinergicznego. W hipokampie aktywacja receptora muskarynowego powoduje zwiększenie stężenia cGMP [Tonnaer i wsp., 1991]. Ponadto hamowanie potencjału po hiperpolaryzacji zależne od aktywacji receptora muskarynowego w neuronach piramidowych warstwy CA1 jest blokowane przez inhibitory sGC i PKG [Krause i Pedarzani, 2000]. Wyniki te świadczą, że acetylocholina moduluje aktywność neuronalną, przynajmniej częściowo za pośrednictwem NO i cGMP. Dużo lepiej poznana jest rola cGMP w działaniu układu glutaminianergicznego. Z wielu badań elektrofizjologicznych i behawioralnych wiadomo, że receptory NMDA odgrywają bardzo ważną rolę w procesie LTP i mechanizmach uczenia się i pamięci przestrzennej, roboczej i długotrwałej. Zablockowanie receptorów NMDA lub zahamowanie aktywności NOS zaburza zdolności poznawcze badane różnymi rodzajami testów behawioralnych [Castellano i wsp., 2001]. Niektóre zaburzenia spowodowane przez antagonistów receptora NMDA można odwrócić podając zwierzętom L-argininę, donor NO lub analog cGMP [Yamada i wsp., 1996b]. Ponadto w wielu pracach wykazano, że działanie antagonistów receptora NMDA i receptorów cholinergicznym nasila swoje działanie, a agoniści receptora muskarynowego mogą łagodzić niekorzystne działanie

antagonistów receptora NMDA [Castellano i wsp., 2001]. Na podstawie wyników przedstawionych powyżej badań można stwierdzić, że układy neuroprzebieżnikowe, cholinergiczny i glutaminianergiczny biorą udział w plastyczności synaptycznej i mechanizmach uczenia się i pamięci, a sygnalizacja NO/cGMP odgrywa ważną rolę w obydwu z nich.

Inhibitory PDE5 stosowano również u szczurów dorosłych z różnymi zaburzeniami pamięci; według Ercega i wsp. [2005] zaprinast, inhibitor PDE5, którego używaliśmy w tej pracy, przywraca upośledzonym szczurom zdolność do uczenia się i zapamiętywania. Podanie inhibitora PDE5, tadalafilu dorosłym szczurom po udarze mózgu zwiększa poziom cGMP w mózgu nie wpływając jednocześnie na stężenie cAMP. Powoduje jednocześnie zwiększenie proliferacji komórek w strefie podkomorowej SVZ, co sugeruje że cGMP jest zaangażowany w procesy angio i neurogenezy [Zhang i wsp., 2006].

Analogi cAMP nie wpływają korzystnie na pamięć rozpoznawczą dorosłych szczurów [Prickaerts i wsp., 2002a], ale zahamowanie PDE4 (PDE hydrolizującej cAMP) poprawia pamięć krótkotrwałą i nabywanie pamięci [Blokland i wsp., 2006, Rutten i wsp., 2006]. Ponadto wyniki niektórych prac wskazują, że wybiórcze zahamowanie PDE4 przez rolipram w skrawkach hipokampa powoduje wzmocnienie wczesnej fazy LTP oraz przekształcenie jej w długotrwałą LTP oraz LTD i efekt ten jest zależny od receptora NMDA [Navakodde i wsp., 2004; 2005]. W tej pracy pamięć szczurów była badana 2 godziny po sesji poznawczej. Wczesna faza LTP jest zależna między innymi od działania PKA [Lu i wsp., 1999], a zatem również cAMP, natomiast w późniejsze fazy LTP zaangażowane są PKA i PKG. Wiadomo, że PDE2 jest jedną z fosfodiesteraz mogących hydrolizować zarówno cGMP jak i cAMP, także możliwe jest że zahamowanie PDE2 powoduje podniesienie poziomu nie tylko cGMP, ale również cAMP i obydwa nukleotydy mogą przyczyniać się do poprawy pamięci.

Wyniki badań aktywności NOS po podskórnym podaniu inhibitorów PDE zaprezentowane w tej pracy wykazały, że w każdym przypadku kiedy dochodzi do poprawy pamięci, podwyższa się również aktywność podstawowa NOS we frakcji cytozolowej hipokampa mózgu. Badania Dinnermana i wsp. [1994] dowodzą, że fosforylacja nNOS przez PKA lub PKG hamuje aktywność katalityczną neuronalnej syntazy NO. Wyniki tych badaczy sugerują że podniesienie poziomu cGMP (oraz ewentualnie cAMP) za pośrednictwem innego mechanizmu wspomaga plastyczność synaptyczną mózgu. W niniejszej pracy nie zaobserwowaliśmy *in vitro* wpływu

inhibitora PKG na aktywność podstawową NOS w hipokampie pod podaniem inhibitorów PDE2 i nNOS *in vivo*, co sugeruje brak udziału PKG w mechanizmie zwiększenia aktywności NOS. Możliwymi odbiorcami sygnału przekazywanego przez cGMP w takiej sytuacji są kanały jonowe bramkowane cyklicznymi nukleotydami (CNG). Podwyższenie poziomu cGMP może powodować otwarcie kanału wapniowego, a napływ wapnia do wnętrza neuronów stymulować aktywność nNOS i w ten sposób poprawiać zdolności poznawcze zwierząt. Ponadto może dochodzić do aktywacji eNOS przez fosforylację przez PKA [Butt i wsp., 2000], jak również podniesione stężenie cAMP może zwiększać ekspresję genu kodującego nNOS oraz jej syntezę [Boissel i wsp., 2004].

Podczas badań behawioralnych zaobserwowaliśmy, że szczury stare - dorosłe, 12 miesięczne reagują na podanie inhibitorów PDE 2 i 5 podobnie do starych, 24 miesięcznych zwierząt. Vallebuona i Raiteri [1995] w badaniach wpływu starzenia na aktywację NOS i sGC zależną od pobudzenia receptorów NMDA, używali szczurów w tym samym wieku, jak w obecnej pracy. Vallebuona i Raiteri analizowali poziom zewnątrzkomórkowego cGMP w hipokampie i mózdku 3, 12 i 24 miesięcznych zwierząt poddawanych mikrodializom *in vivo*. Ich wyniki wykazały, że synteza cGMP w hipokampie spada aż o 50% w okresie od 3 do 12 miesiąca życia szczurów. Perfuzja NMDA u dorosłych zwierząt wywołuje znaczną odpowiedź objawiającą się wzrostem syntezy cGMP, u starszych zwierząt pojawiają się zaburzenia w odpowiedzi na NMDA dochodzi do nich najpierw w hipokampie (już u 12 miesięcznych szczurów), a później w mózdku [Vallebuona i Raiteri, 1995]. Wyniki tej grupy, podobnie jak nasze sugerują że metabolizm cGMP u szczurów 12 miesięcznych jest bardziej zbliżony do metabolizmu zwierząt starych niż dorosłych.

Wpływ starzenia na zależną od receptora NMDA syntezę NO i cGMP badany był również przez Chalimoniuk i Strosznajder [1998]. Także ich wyniki wykazały, że efekt stymulacji receptora NMDA u szczurów 24 miesięcznych jest zdecydowanie słabszy, niż u dorosłych 4 miesięcznych zwierząt. W mózgu starczym obniżeniu ulega gęstość receptorów NMDA oraz ilość specyficznych miejsc wiązania agonisty i ligandów [Mitchell i Anderson, 1998]. Związanie z wiekiem zmiany gęstości receptorów NMDA obserwowano w korze mózgowej, hipokampie i prążkowie [Tamaru i wsp., 1991; Serra i wsp., 1994]. Ponadto w starczym mózgu dochodzi do przyspieszenia okresu zanikania LTP w hipokampie [Burke i Barnes, 2006], co może

być skutkiem zaobserwowanej przez nas w niniejszej pracy podwyższonej ekspresji PDE2 i PDE9.

Wyniki naszych badań immunohistochemicznych, behawioralnych oraz analizy aktywności NOS wskazują, że poprawa zdolności poznawczych jest wynikiem zwiększenia poziomu cGMP wywołanego przez selektywne zahamowanie tej PDE, która jest ekspresjonowana na wysokim poziomie w mózgu, na danym etapie wiekowym.

Za rozróżnianie nowego obiektu podczas testu pamięci rozpoznawczej odpowiedzialne są muskarynowe receptory cholinergiczne [Besheer i wsp., 2001], a inhibitory AChE poprawiają nabywanie pamięci na temat obiektu [Prickaerts i wsp., 2005]. Wiadomo również, że cGMP jest zaangażowane na poziomie molekularnym w mechanizmy plastyczności synaptycznej leżące u podstaw zdolności uczenia się i pamięci oraz, że jest przekaźnikiem sygnału oddziaływującym z układem cholinergicznym [De Vente, 2004]. W niniejszej pracy wykazaliśmy, że u starych 24 miesięcznych szczurów zahamowanie aktywności PDE2 powoduje znaczący wzrost poziomu cGMP w mózgu i poprawia pamięć rozpoznawczą zwierząt jednocześnie zwiększając aktywność NOS w hipokampie, strukturze mózgu odgrywającej kluczową rolę w procesach poznawczych i zaangażowanej razem z korą okołową w powstawanie pamięci rozpoznawczej [Prusky i wsp., 2004]. Wcześniejsze badania wielu autorów, podobnie jak nasze uzyskane w trakcie tej pracy wskazują na obniżenie poziomu cGMP zwłaszcza w hipokampie starczego mózgu [Puri i Volicer, 1981; Vallebuona i Raiteri, 1995; Chalimoniuk i wsp. 1998; Domek-Łopacińska i wsp., 2005], co prawdopodobnie łącznie ze zmianami w ekspresji i aktywności NOS oraz uwalnianiu NO [Chalimoniuk i wsp. 1998; Jęsko i wsp., 2003] przyczynia się do osłabienia możliwości poznawczych obserwowanych podczas fizjologicznego starzenia.

Na podstawie zaprezentowanych w niniejszej pracy wyników można wnioskować, że podczas starzenia dochodzi do podwyższonej ekspresji oraz prawdopodobnie aktywności PDE2 i PDE9 w mózgu, co prowadzi do obniżenia poziomu cGMP oraz aktywności nNOS regulowanej pośrednio przez stężenie tego nukleotydu. Ponadto nasze wyniki sugerują, że pula nNOS, której aktywność jest regulowana w zależności od stężenia cGMP uczestniczy w plastyczności synaptycznej, procesach uczenia się i pamięci. Poziom mRNA PDE9, najbardziej selektywnej z fosfodiesteraz

hydrolizujących wybiórczo cGMP jest w mózgu starczym wyższy niż u zwierząt dorosłych, ekspresja PDE2 nie zmienia się aż tak bardzo, ale możliwe że podczas starzenia dochodzi do zwiększenia jej aktywności. Po selektywnym zahamowaniu PDE2 w mózgu starczym *in vitro*, IR-cGMP rośnie znacząco i osiąga bardzo wysoki poziom, co świadczy o wysokiej aktywności tego enzymu w mózgu starych szczurów. Zahamowanie PDE2 *in vivo* powoduje poprawę pamięci rozpoznawczej u 3, 12 i 24 miesięcznych zwierząt oraz podwyższa aktywność podstawową NOS w hipokampie. Jednoczesne podanie inhibitora nNOS prowadzi do zniesienia korzystnego działania inhibitora PDE2 na pamięć zwierząt 24 miesięcznych oraz znacząco obniża aktywność NOS, co świadczy o istotnym udziale neuronalnej izoformy syntazy w plastyczności synaptycznej mózgu starczego.

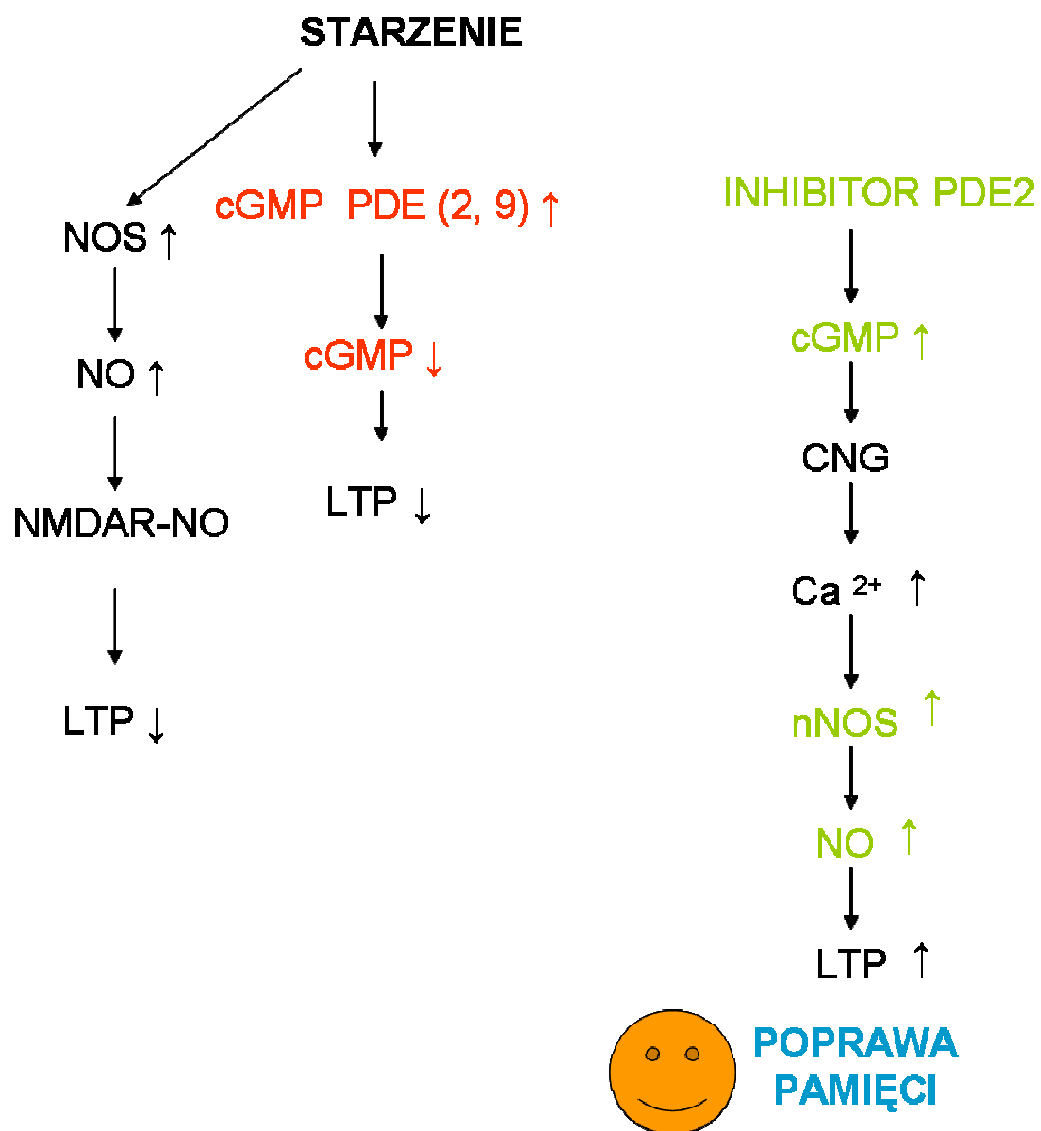
Wykazaliśmy, że niezależnie od użytego inhibitora PDE i badanej grupy wiekowej, za każdym razem poprawa pamięci wiąże się ze zwiększeniem aktywności NOS w hipokampie. Taka obserwacja doprowadziła nas do wniosku, że inhibicja aktywności PDE zwiększa poziom cGMP nie tylko poprzez zahamowanie jego hydrolizy, ale również przez stymulację jego syntezy na szlaku NOS/NO/sGC/cGMP.

Podniesienie aktywności podstawowej NOS po zahamowaniu aktywności PDE może być spowodowana przez podniesiony poziom cGMP, który zmienia przepuszczalność kanału wapniowego CNG, co prowadzi do napływu jonów wapnia do komórki i wzmożonej aktywacji NOS. Doświadczenie z użyciem inhibitora PKG *in vitro* wykazało, że zahamowanie aktywności PKG w homogenacie nie wpływa na podniesioną przez inhibitor PDE2 aktywność NOS, co sugeruje że PKG nie odgrywa w tym procesie istotnej roli. Innym mechanizmem odpowiedzialnym za wzrost aktywności NOS może być aktywacja receptorów NMDA lub AMPA, niemniej jednak doświadczenia przeprowadzone na potrzeby tej pracy nie odpowiadają jednoznacznie na to pytanie, a wyniki literaturowe wskazują na zaburzenia w zależnej od receptorów NMDA aktywacji NOS podczas starzenia [Vallebuona i Raiteri, 1995; Chalimoniuk i Strosznajder, 1998]. Ponadto nie można wykluczyć, że podwyższone stężenie cGMP aktywuje PKG, a kinaza ta przez fosforylację podwyższa aktywność eNOS [Butt i wsp., 2000]. Syntetyzowany przez eNOS w niektórych neuronach piramidowych hipokampa, NO może wpływać na procesy poznawcze przy udziale układu glutaminianergicznego. Ponadto inhibitory PDE mogą powodować podniesienie stężenia cGMP także w naczyniach krwionośnych [Zhang i wsp., 2002]. Może tam dojść do aktywacji PKG fosforylacją i aktywacją

eNOS, rozszerzenia naczyń krwionośnych oraz poprawy krążenia mózgowego. W ten sposób sygnalizacja NO/cGMP w naczyniach krwionośnych może również pośrednio wpływać na pamięć. Wiadomo, że niektóre inhibitory PDE, takie jak na przykład sildenafil i zaprinast mogą hamować działanie transporterów cGMP [Jedlitschky i wsp., 2000; Sundkvist i wsp., 2002]. mRNA jednego z transporterów cGMP, białka MRP5 jest obecne w wielu częściach mózgu oraz w komórkach endotelium tworzących barierę krew mózg [McAleer i wsp., 1999; Zhang i wsp., 2000]. Możliwe zatem, że inhibitory PDE zwiększają stężenie cGMP nie tylko przez hamowanie aktywności fosfodiesteraz, ale również transporterów cyklicznych nukleotydów w mózgu.

Na podstawie wyników naszej pracy najbardziej prawdopodobnym mechanizmem poprawy zdolności poznawczych dzięki zahamowaniu aktywności PDE wydaje się następująca ścieżka sygnałowa: podniesienie poziomu cGMP, zmiana przepuszczalności CNG, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , wzrost aktywności nNOS, synteza NO, aktywacja sGC i synteza cGMP. Być może pula cGMP powstająca na tej drodze stymuluje receptory NMDA, muskarynowe i układy glutaminianergiczny i cholinergiczny.

Zaobserwowane przez nas zmiany w metabolizmie cGMP w procesie starzenia mózgu skłoniły nas do zaproponowania hipotezy zależnego od NO starzenia mózgu (Rycina 29). NO powstający w starczym mózgu nie aktywuje ścieżki sygnałowej prowadzącej od pobudzenia receptora NMDA do aktywacji NOS, a wręcz przeciwnie NO poprzez interakcje z grupami SH receptora NMDA może być odpowiedzialny za obniżenie jego wrażliwości i funkcjonalności. Jednocześnie ekspresja i aktywność PDE 2 i 9 hydrolizujących cGMP jest podwyższona, poziom cGMP jest niski i proces LTP nie przebiega już tak wydajnie i sprawnie jak w dojrzałym mózgu, a zatem zdolności poznawcze starych zwierząt pogarszają się. Użycie selektywnego inhibitora PDE2 przywraca wystarczająco wysoki poziom cGMP, umożliwia napływ jonów Ca^{2+} przez CNG w sposób niezależny od receptorów NMDA, dzięki temu dochodzi do aktywacji nNOS, syntezy NO i poprawienia zdolności poznawczych podczas starzenia. Być może uwalniany na tej drodze NO aktywuje sGC i poprzez cGMP wpływa na aktywność układu cholinergicznego. Niemniej jednak podsumowując należy stwierdzić, że cGMP może wpływać na poprawę zdolności poznawczych także przez udział w innych procesach molekularnych oraz oddziaływanie z innymi układami neurotransmiterowymi.



Rycina 29. Hipoteza starzenia mózgu zależnego od NO i cGMP, z propozycją przywrócenia zadawalających możliwości poznawczych. Obserwacje wynikające z danych zaprezentowanych w niniejszej pracy na schemacie zaznaczono w kolorze.

6. Podsumowanie i wnioski

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki można podsumować i wysunąć następujące wnioski:

1. Poziom immunoreaktywności cGMP syntetyzowanego na szlaku zależnym od NO, w obecności IBMX, w układzie cholinergicznym przodomózgowia maleje podczas rozwoju i starzenia szczurów. Wyniki wskazują, na obniżenie syntezy cGMP w tych neuronach, co może mieć wpływ na upośledzenie działania układu cholinergicznego w procesie fizjologicznego starzenia.
2. Wykazano, że komórki cholinergiczne jądra nakrywkowo konarowo mostowego nie syntetyzują cGMP w odpowiedzi na NO, co wskazuje że jest to jedna z cech różniących tę populację neuronów cholinergicznym od komórek tego układu w przodomózgowiu.
3. Ekspresja fosfodiesteraz hydrolizujących cGMP zmienia się podczas starzenia mózgu. Poziom mRNA dla PDE2 i PDE9 jest wyższy u zwierząt starych niż u dorosłych, natomiast mRNA dla PDE5 nie obserwuje się w mózgu starczym. Wyniki te wskazują, że za hydrolizę cGMP w mózgu starczym odpowiedzialne są PDE2 oraz PDE9.
4. Selektywny inhibitor PDE2, Bay 60-7550 powoduje zwiększenie poziomu immunoreaktywności cGMP w mózгах dojrzałych i starczych. Zahamowanie PDE2 znacząco poprawia pamięć u badanych zwierząt oraz zwiększa aktywność neuronalnej izoformy NOS w hipokampie. Inhibitor PDE2 poprzez podwyższenie poziomu cGMP i aktywności nNOS korzystnie wpływa na możliwości poznawcze dorosłych i starych zwierząt.
5. Zahamowanie aktywności PDE5 prowadzi do zwiększenia poziomu immunoreaktywności cGMP w mózgu dojrzałym. Inhibitor PDE5, zaprinast poprawia pamięć i zwiększa aktywność NOS u zwierząt dorosłych. Wyniki wskazują, że inhibitory PDE5 mogą korzystnie wpływać na zdolności poznawcze u dorosłych osobników.

7. Streszczenie

Synteza cGMP na szlaku przekazywania informacji zależnego od NO leży u podstaw wielu procesów fizjologicznych w CUN, między innymi odgrywa istotną rolę w mechanizmach uczenia się i pamięci. Za regulację sygnalizacji NO/cGMP w mózgu odpowiada pięć rodzin białek. Syntaza NO (NOS) jest odpowiedzialna za uwalnianie NO, endogennego aktywatora rozpuszczalnej cykazy guanylanowej (sGC). W tkance nerwowej NOS syntetyzuje NO z L – argininy w obecności tlenu, związkami powstającym w tej reakcji w ekwimolarnych ilościach z NO jest cytrulina. Dotychczas odkryto trzy podstawowe izoformy NOS: neuronalną (nNOS), indukowaną (iNOS) oraz endotelialną (eNOS). NO łatwo dyfunduje do sąsiednich komórek, gdzie wiąże się z sGC, co powoduje ponad stukrotną stymulację tego enzymu do syntezy cGMP. Cykliczny GMP jako przekaźnik drugorzędowy odgrywa niezwykle istotną rolę w komórkach układu nerwowego i z tego właśnie powodu jego stężenie musi być precyzyjnie i szybko regulowane. Za regulację stężenia cGMP odpowiadają w znacznej mierze 3', 5' – fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów (PDE), które hydrolizują wiązanie fosfodiesterowe. Dotychczas zidentyfikowano 11 rodzin PDE i w sumie 95 różnych izoform tych enzymów. W mózgu za hydrolizę cGMP odpowiedzialne są w głównej mierze PDE 2, 5 i 9. Innymi białkami zaangażowanymi w przekazywanie sygnału przez cGMP są kinazy białkowe zależne od tego nukleotydu (PKG) i bramkowane cGMP kanały jonowe (CNG).

W CUN NO jest uwalniany w warunkach fizjologicznych przede wszystkim w wyniku aktywacji postsynaptycznych receptorów NMDA i funkcjonuje jako przekaźnik zwrotny, który przekazuje informacje do części presynaptycznej zakończeń nerwowych, gdzie aktywuje sGC i poprzez cGMP bierze udział w LTP w hipokampie oraz LTD w mózdzku. NO i cGMP pośredniczą również w przekazywaniu informacji w układzie cholinergicznym, chociaż ich rola w sygnalizacji z udziałem acetylocholiny jest dotychczas słabiej zbadana.

NO i cGMP biorą udział w rozwoju mózgu, zapewniając prawidłową migrację komórek oraz ukierunkowanie wzrostu wypustek nerwowych i unerwienie między innymi hipokampa i kory mózgu. Proces starzenia jest fizjologicznie związany z upośledzeniem zdolności poznawczych, dochodzi do zmian ilości i działania niektórych receptorów, w tym NMDA i cholinergicznym. Ponadto prowadzi do zmian

ekspresji i aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm cGMP oraz stężenia niektórych przekaźników informacji takich jak NO, cGMP, jony wapnia czy glutaminian.

W badaniach prowadzonych na dorosłych zwierzętach, wykazano że analogi cGMP oraz inhibitory hydrolizujących go fosfodiesteraz poprawiają zdolności poznawcze, a inhibitory NOS oraz leki antycholinergiczne upośledzają pamięć. Dotychczas nie zbadano jednak jak zmienia się ekspresja PDE hydrolizujących cGMP oraz jak można poprawić plastyczność synaptyczną w starczym mózgu.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie zdolności układu cholinergicznego mózgu szczura do syntezy cGMP na różnych etapach rozwoju zwierząt oraz podczas starzenia, a także poznanie mechanizmów prowadzących do obniżenia poziomu cGMP w mózgu starczym. Analizowano również wpływ selektywnego zahamowania fosfodiesteraz 2 i 5 na poziom cGMP w mózgu dorosłym i starczym oraz na pamięć rozpoznawczą szczurów. Ponadto badano efekt zahamowania PDE2 i PDE5 na aktywność NOS w różnych częściach mózgu.

Badania prowadzono na następujących modelach doświadczalnych:

- 1) Doświadczenia *in vitro* przeprowadzono na skrawkach mózgu szczurów P1, P4, P21, 3 i 24 miesięcznych, inkubowanych z donorem NO, DEANONO. W celu zbadania zdolności układu cholinergicznego do syntezy cGMP wykonano badania immunohistochemiczne kory czołowej, formacji Broca, prążkowiec, hipokampa i jądra nakrywkowo-konarowo-mostowego z zastosowaniem przeciwciał przeciwko pęcherzykowemu transporterowi acetylocholin (vAChT) i cGMP. Na potrzeby zbadania efektu działania selektywnych inhibitorów PDE2 i PDE5 w mózgu dorosłych i starczych, skrawki inkubowano odpowiednio z Bay 60-7550 w stężeniu 0,1 μ M i sildenafilem w stężeniu 1 μ M.
- 2) Analizę ekspresji PDE 2, 5 i 9 przeprowadzono w skrawkach mózgu 3 i 24 miesięcznych metodą hybrydyzacji *in situ*. Oceniano zmiany poziomu mRNA dla poszczególnych PDE w prążkowiec i korze czołowej mózgu.
- 3) Działanie selektywnych inhibitorów PDE2 i PDE5 oraz nNOS na zdolności poznawcze szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych *in vivo* zbadano przy użyciu testu pamięci rozpoznawczej. Inhibitorami PDE2 i PDE5 zastosowanymi w

tych badaniach były odpowiednio Bay 60-7550 i zaprinast podawane podskórnie w dawce 0,3mg/kg, jako inhibitor nNOS zastosowano NAAN w dawce 1mg/kg. Wpływ inhibitorów na zdolności eksploracyjne zwierząt analizowano przy użyciu testu otwartego pola.

- 4) Wpływ inhibitorów PDE oraz nNOS na aktywność podstawową NOS analizowano w cytozolu z hipokampa, prążkowiec i kory mózgu szczurów 3, 12 i 24 miesięcznych przy użyciu metody radiochemicznej. Aktywność NOS oznaczano przez pomiar radioaktywnej [³H]L-cytruliny powstającej w układzie nerwowym w stechiometrycznym stosunku do NO ze znakowanej [³H]L-argininy w reakcji katalizowanej przez NOS w obecności kofaktorów i jonów wapnia.

Wyniki prezentowane w tej pracy wykazały, że poziom immunoreaktywności cGMP, świadczący o jego stężeniu w mózgu obniża się podczas rozwoju i starzenia zwierząt. Spada również zdolność neuronów cholinergicznym formacji Broca i okolicy przegrody środkowej oraz interneuronów cholinergicznym prążkowiec do syntezy cGMP na drodze zależnej od NO, a ilość włókien cholinergicznym wykazujących immunoreaktywność dla cGMP obniża się. Wykazano też, że neurony cholinergiczne jądra nakrywkowo konarowo mostowego nie syntetyzują cGMP pod wpływem NO na żadnym etapie życia po urodzeniu zwierząt. Analiza ekspresji hydrolizujących cGMP PDE 2, 5 i 9 w mózgach zwierząt 3 i 24 miesięcznych pokazała, że poziom mRNA tych PDE zmienia się w procesie starzenia. Poziom mRNA PDE2 i PDE9 jest w mózgach starczych zdecydowanie wyższy, niż w mózgach dojrzałych, natomiast mRNA PDE5 zlokalizowano w mózgach 3 miesięcznym szczurów, a w mózgach 24 miesięcznym zwierząt nie wykazano jego obecności. Prawdopodobnie zwiększona ekspresja zwłaszcza PDE9, najbardziej selektywnej z PDE hydrolizujących cGMP jest odpowiedzialna za obniżenie jego poziomu w mózgu starczym. Zastosowanie selektywnego inhibitora PDE2, Bay 60-7550 *in vitro* powoduje znaczące zwiększenie IR-cGMP w mózgach dojrzałych i starczych, co świadczy o zwiększonym stężeniu cGMP po zahamowaniu aktywności PDE2. Podskórne podanie Bay 60-7550 3, 12 i 24 miesięcznym szczurom poprawia ich wyniki w teście pamięci rozpoznawczej, wpływając korzystnie zwłaszcza na konsolidację pamięci. Jednocześnie zaobserwowano, że zahamowanie PDE2

podwyższa aktywność podstawową NOS w hipokampie. Zastosowanie selektywnego inhibitora nNOS łącznie z Bay 60-7550 u szczurów 24 miesięcznych nie tylko zmniejsza aktywność NOS w hipokampie, ale również znosi korzystny efekt działania inhibitora PDE2 na pamięć rozpoznawczą. Taki wynik pozwala stwierdzić, że inhibitor PDE2 poprawia zdolności poznawcze nie tylko poprzez bezpośrednie zwiększenie stężenia cGMP w mózgu, ale również poprzez aktywację nNOS. Sildenafil, selektywny inhibitor PDE5 podany *in vitro* zwiększa IR-cGMP w mózгах 3 miesięcznych szczurów, natomiast w mózгах zwierząt 24 miesięcznych pozostaje bez wpływu ze względu na brak obecności mRNA PDE5. Zahamowanie aktywności PDE5 *in vivo* przez zaprinast prowadzi do zwiększenia aktywności NOS i poprawy pamięci u zwierząt 3 miesięcznych, u szczurów 12 i 24 miesięcznych pozostaje bez wpływu. Wykazano również, że żadne z użytych inhibitorów w zastosowanych stężeniach nie wpływają na aktywność lokomotoryczną i eksploracyjną zwierząt.

Otrzymane wyniki wskazują, że równowaga przemian metabolicznych cGMP przesuwana się podczas rozwoju i starzenia mózgu w kierunku degradacji tego nukleotydu. Wysokie stężenie cGMP obserwowane w mózgu we wczesnych etapach rozwoju jest prawdopodobnie niezbędne dla prawidłowej migracji neuronów, a duża zdolność neuronów cholinergiczných przodomózgowia do syntezy cGMP na drodze zależnej od NO umożliwia prawidłowe unerwienie hipokampa i kory mózgu, struktur kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania pamięci. Po wykształceniu unerwienia, w miarę dojrzewania CUN między 21 dniem, a 3 miesiącem życia stężenie cGMP obniża się, tak by u zwierząt dorosłych osiągnąć poziom uznawany za podstawowy, wystarczający dla sprawnej fizjologicznej funkcji mózgu w tym mechanizmów uczenia się i pamięci. Podczas starzenia dochodzi do wzrostu ekspresji i aktywności PDE2 i PDE9 i znacznego obniżenia poziomu cGMP w mózgu. Jednocześnie pomimo zwiększonej aktywności NOS, zależna od pobudzenia receptorów NMDA synteza cGMP obniża się co prowadzi do upośledzenia mechanizmu LTP i zaburzeń zdolności poznawczych. Hamując aktywność PDE2 można przywrócić wystarczająco wysokie stężenie cGMP i poprawić pamięć poprzez wzrost aktywności specyficznej i ważnej dla mechanizmów poznawczych puli nNOS.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Andreeva SG, Dikkes P, Epstein PM, Rosenberg PA. Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain. *J Neurosci*. 2001 Nov 15;21(22):9068-76.
2. Arancio O, Antonova I, Gambaryan S, Lohmann SM, Wood JS, Lawrence DS, Hawkins RD. Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *J Neurosci*. 2001 Jan 1;21(1):143-9.
3. Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):74-80.
4. Arruda Paes PC, de Magalhães L, Camillo MA, Rogero JR, Troncone LR. Ionotropic glutamate receptors regulating labeled acetylcholine release from rat striatal tissue in vitro: possible involvement of receptor modulation in magnesium sensitivity. *Neurosci Res*. 2004 Jul;49(3):289-95.
5. Aznavour N, Mechawar N, Watkins KC, Descarries L. Fine structural features of the acetylcholine innervation in the developing neostriatum of rat. *J Comp Neurol*. 2003 May 26;460(2):280-91.
6. Ballerini P, Di Iorio P, Ciccarelli R, Nargi E, D'Alimonte I, Traversa U, Rathbone MP, Caciagli F. Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *Neuroreport*. 2002 Oct 7;13(14):1789-92.
7. Baratti CM, Kopf SR. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 1996 May;65(3):197-201.
8. Barker GR, Bashir ZI, Brown MW, Warburton EC. A temporally distinct role for group I and group II metabotropic glutamate receptors in object recognition memory. *Learn Mem*. 2006 Mar-Apr;13(2):178-86.
9. Barnstable CJ, Wei JY, Han MH. Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels. *Neurochem Int*. 2004 Nov;45(6):875-84.
10. Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol*. 1994 Jun;4(3):389-99.
11. Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Sep;3(9):710-8.

12. Beavo JA, Reifsnyder DH. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 1990 Apr;11(4):150-5.
13. Beavo JA, Rogers NL, Crofford OB, Hardman JG, Sutherland EW, Newman EV. Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Mol Pharmacol.* 1970 Nov;6(6):597-603.
14. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 1995 Oct;75(4):725-48.
15. Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleiss U, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Schroeder W, Steinke W, Straub A, Stasch JP. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol.* 2001;1:13. Epub 2001 Dec 28.
16. Behrends S, Harteneck C, Schultz G, Koesling D. A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J Biol Chem.* 1995 Sep 8;270(36):21109-13.
17. Bejar C, Wang RH, Weinstock M. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999 Nov 3;383(3):231-40.
18. Beltman J, Sonnenburg WK, Beavo JA. The role of protein phosphorylation in the regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Cell Biochem.* 1993 Nov;127-128:239-53.
19. Bentley JK, Kadlecsek A, Sherbert CH, Seger D, Sonnenburg WK, Charbonneau H, Novack JP, Beavo JA. Molecular cloning of cDNA encoding a "63"-kDa calmodulin-stimulated phosphodiesterase from bovine brain. *J Biol Chem.* 1992 Sep 15;267(26):18676-82.
20. Berg AP, Sen N, Bayliss DA. TrpC3/C7 and Slo2.1 are molecular targets for metabotropic glutamate receptor signaling in rat striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* 2007 Aug 15;27(33):8845-56.

21. Bernabeu R, de Stein ML, Fin C, Izquierdo I, Medina JH. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*. 1995 Jul 31;6(11):1498-1500.
22. Bernabeu R, Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I, Medina JH. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*. 1996 Jan 31;7(2):585-8.
23. Bernabeu R, Schroder N, Quevedo J, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *Neuroreport*. 1997 Jul 7;8(9-10):2221-4.
24. Bertaina-Anglade V, Enjuanes E, Morillon D, Drieu la Rochelle C. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2006 Sep-Oct;54(2):99-105. Epub 2006 Apr 15.
25. Besheer J, Short KR, Bevins RA. Dopaminergic and cholinergic antagonism in a novel-object detection task with rats. *Behav Brain Res*. 2001 Nov 29;126(1-2):211-7.
26. Bidmon HJ, Mohlberg H, Habermann G, Buse E, Zilles K, Behrends S. Cerebellar localization of the NO-receptive soluble guanylyl cyclase subunits-alpha(2)/beta (1) in non-human primates. *Cell Tissue Res*. 2006 Dec;326(3):707-14.
27. Billingsley ML, Polli JW, Balaban CD, Kincaid RL. Developmental expression of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1990 May 1;53(2):253-63.
28. Black AC Jr, Sandquist D, West JR, Wamsley JK, Williams TH. Muscarinic cholinergic stimulation increases cyclic GMP levels in rat hippocampus. *J Neurochem*. 1979 Dec;33(6):1165-8.
29. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973 Jul;232(2):331-56.
30. Blokland A, Prickaerts J, Honig W, de Vente J. State-dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. *Neuroreport*. 1998 Dec 21;9(18):4205-8.

31. Blokland A, Schreiber R, Prickaerts J. Improving memory: a role for phosphodiesterases. *Curr Pharm Des.* 2006;12(20):2511-23.
32. Bloom TJ, Beavo JA. Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):14188-92.
33. Blum-Degen D, Heinemann T, Lan J, Pedersen V, Leblhuber F, Paulus W, Riederer P, Gerlach M. Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. *Brain Res.* 1999 Jul 10;834(1-2):128-35.
34. Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, van Staveren W, de Vente J, Prickaerts J, Blokland A, Koenig G. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology.* 2004 Dec;47(7):1081-92.
35. Böhme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol.* 1991 Jul 9;199(3):379-81.
36. Böhme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 1;90(19):9191-4.
37. Boissel JP, Bros M, Schröck A, Gödtel-Armbrust U, Förstermann U. Cyclic AMP-mediated upregulation of the expression of neuronal NO synthase in human A673 neuroepithelioma cells results in a decrease in the level of bioactive NO production: analysis of the signaling mechanisms that are involved. *Biochemistry.* 2004 Jun 8;43(22):7197-206.
38. Bolger GB, Erdogan S, Jones RE, Loughney K, Scotland G, Hoffmann R, Wilkinson I, Farrell C, Houslay MD. Characterization of five different proteins produced by alternatively spliced mRNAs from the human cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D gene. *Biochem J.* 1997 Dec 1;328 (Pt 2):539-48.
39. Bon C, Böhme GA, Doble A, Stutzmann JM, Blanchard JC. A Role for Nitric Oxide in Long-term Potentiation. *Eur J Neurosci.* 1992;4(5):420-424.
40. Bon CL, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* 2003 Mar 1;23(5):1941-8.

41. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:537-92. Epub 2001 Nov 9.
42. Bradley J, Zhang Y, Bakin R, Lester HA, Ronnett GV, Zinn K. Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J Neurosci.* 1997 Mar 15;17(6):1993-2005.
43. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jan;87(2):682-5.
44. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR., Snyder SH Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-718.
45. Brunton LL, Mayer SE. Extrusion of cyclic AMP from pigeon erythrocytes. *J Biol Chem.* 1979 Oct 10;254(19):9714-20.
46. Buechler WA, Nakane M, Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Jan 15;174(1):351-7.
47. Buño W, Cabezas C, Fernández de Sevilla D. Presynaptic muscarinic control of glutamatergic synaptic transmission. *J Mol Neurosci.* 2006;30(1-2):161-4.
48. Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH, Valtschanoff JG. Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci.* 2002 Oct 15;22(20):8961-70.
49. Burgunder JM, Cheung PT. Expression of soluble guanylyl cyclase gene in adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 1994 Feb 1;6(2):211-7.
50. Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):30-40.
51. Burns, F., Rodger, I. W., Pyne, N. J. The catalytic subunit of protein kinase A triggers activation of the type V cyclic GMP-specific phosphodiesterase from guinea-pig lung. *Biochem J* 1992 Apr 15, 283 (Pt 2): 487-91
52. Butcher RW, Sutherland EW. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem.* 1962 Apr;237:1244-50.

53. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Fröhlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HH. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 2000 Feb 18;275(7):5179-87.
54. Byers D, Davis RL, Kiger JA Jr. Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 1981 Jan 1;289(5793):79-81.
55. Campese VM, Sindhu RK, Ye S, Bai Y, Vaziri ND, Jabbari B. Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Brain Res.* 2007 Feb 23;1134(1):27-32.
56. Castellano C, Cestari V, Ciamei A. NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets.* 2001 Sep;2(3):273-83.
57. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000 Sep;184(3):409-20.
58. Castoldi AF, Manzo L, Costa LG. Cyclic GMP formation induced by muscarinic receptors is mediated by nitric oxide synthesis in rat cortical primary cultures. *Brain Res.* 1993 Apr 30;610(1):57-61.
59. Cha CI, Uhm MR, Shin DH, Chung YH, Baik SH. Immunocytochemical study on the distribution of NOS-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of aged rats. *Neuroreport.* 1998 Jul 13;9(10):2171-4.
60. Cha CI, Sohn SG, Chung YH, Shin C, Baik SH. Region-specific changes of NOS-IR cells in the basal ganglia of the aged rat. *Brain Res.* 2000 Jan 31;854(1-2):239-44.
61. Chalimoniuk M, Strosznajder JB. Aging modulates nitric oxide synthesis and cGMP levels in hippocampus and cerebellum. Effects of amyloid beta peptide. *Mol Chem Neuropathol.* 1998 Aug-Dec;35(1-3):77-95.
62. Chen ZS, Lee K, Kruh GD. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33747-54. Epub 2001 Jul 10.

- 63.** Cherry JA, Davis RL. Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *J Comp Neurol.* 1999 May 3;407(2):287-301.
- 64.** Choi YH, Ekholm D, Krall J, Ahmad F, Degerman E, Manganiello VC, Movsesian MA. Identification of a novel isoform of the cyclic-nucleotide phosphodiesterase PDE3A expressed in vascular smooth-muscle myocytes. *Biochem J.* 2001 Jan 1;353 (Pt 1):41-50.
- 65.** Chutae DL, Villiger JW, Kirton NF. Testing cyclic AMP mediation of memory: reversal of alpha-methyl-p-tyrosine-induced amnesia. *Psychopharmacology (Berl).* 1981;74(2):129-31.
- 66.** Colicelli J, Birchmeier C, Michaeli T, O'Neill K, Riggs M, Wigler M. Isolation and characterization of a mammalian gene encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 May;86(10):3599-603.
- 67.** Contractor A, Heinemann SF. Glutamate receptor trafficking in synaptic plasticity. *Sci STKE.* 2002 Oct 29;2002(156):RE14.
- 68.** Corbin JD, Francis SH, Webb DJ. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology.* 2002 Sep;60(2 Suppl 2):4-11.
- 69.** Danysz W, Wroblewski JT, Brooker G, Costa E. Modulation of glutamate receptors by phencyclidine and glycine in the rat cerebellum: cGMP increase in vivo. *Brain Res.* 1989 Feb 13;479(2):270-6.
- 70.** Czapski GA, Cakala M, Chalimoniuk M, Gajkowska B, Strosznajder JB. Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. *J Neurosci Res.* 2007 Jun;85(8):1694-703.
- 71.** Danysz W, Zajackowski W, Parsons CG. Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav Pharmacol.* 1995 Aug;6(5 And 6):455-474.
- 72.** Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci.* 1994 Sep;14(9):5147-59.
- 73.** Davoren PR, Sutherland EW. The effect of L-epinephrine and other agents on the synthesis and release of adenosine 3',5'-phosphate by whole pigeon erythrocytes. *J Biol Chem.* 1963 Sep;238:3009-15.

- 74.** De Vente J, Hopkins DA, Markerink-Van Ittersum M, Emson PC, Schmidt HH, Steinbusch HW. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience*. 1998a Nov;87(1):207-41.
- 75.** De Vente J, Markerink-van Ittersum M, van Abeelen J, Emson PC, Axer H, Steinbusch HW. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain: effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis. *Eur J Neurosci*. 2000a Feb;12(2):507-19.
- 76.** De Vente J., Steinbusch H.W.M., Nitric oxide-cGMP signaling in the rat brain, in: H.W.M. Steinbusch, J. de Vente, S.R. Vincent (Eds.), *Handb. Chem. Neuroanat.*, vol. 17, Elsevier, 2000b, pp. 355–415.
- 77.** De Vente J, Asan E, Gambaryan S, Markerink-van Ittersum M, Axer H, Gallatz K, Lohmann SM, Palkovits M. Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience*. 2001a;108(1):27-49.
- 78.** De Vente J, Markerink-van Ittersum M, Axer H, Steinbusch HW. Nitric-oxide-induced cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat brain. *Exp Brain Res*. 2001b Feb;136(4):480-91.
- 79.** De Vente J. cGMP: a second messenger for acetylcholine in the brain? *Neurochem Int*. 2004 Nov;45(6):799-812.
- 80.** De Vente J, Markerink-van Ittersum M, Vles JS. The role of phosphodiesterase isoforms 2, 5, and 9 in the regulation of NO-dependent and NO-independent cGMP production in the rat cervical spinal cord. *J Chem Neuroanat*. 2006 Jun;31(4):275-303. Epub 2006 Apr 18.
- 81.** Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem*. 1997 Mar 14;272(11):6823-6.
- 82.** De-Mello N, Carobrez AP. Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behav Pharmacol*. 2002 Mar;13(2):139-48.
- 83.** Demyanenko GP, Halberstadt AI, Pryzwansky KB, Werner C, Hofmann F, Maness PF. Abnormal neocortical development in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Nov 7;160(1):1-8.
- 84.** Devan BD, Pistell PJ, Daffin LW Jr, Nelson CM, Duffy KB, Bowker JL, Bharati IS, Sierra-Mercado D, Spangler EL, Ingram DK. Sildenafil citrate attenuates a

complex maze impairment induced by intracerebroventricular infusion of the NOS inhibitor Nomega-nitro-L-arginine methyl ester. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jun 1;563(1-3):134-40.

- 85.** Diaz del Guante MA, Cruz-Morales SE, Prado-Alcalá RA. Time-dependent effects of cholinergic blockade of the striatum on memory. *Neurosci Lett.* 1991 Jan 14;122(1):79-82.
- 86.** Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson V, Snyder SH. Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology* 1994; 33(11): 1245-1251.
- 87.** Ding JD, Burette A, Nedvetsky PI, Schmidt HH, Weinberg RJ. Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2004 May 10;472(4):437-48.
- 88.** Ding JD, Burette A, Weinberg RJ. Expression of soluble guanylyl cyclase in rat cerebral cortex during postnatal development. *J Comp Neurol.* 2005 May 9;485(3):255-65.
- 89.** Domek-Łopacińska K, Strosznajder JB. Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. *J Physiol Pharmacol.* 2005 Mar;56 Suppl 2:15-34.
- 90.** Domek-Łopacińska K, van de Waarenburg M, Markerink-van Ittersum M, Steinbusch HW, de Vente J. Nitric oxide-induced cGMP synthesis in the cholinergic system during the development and aging of the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005 Aug 8;158(1-2):72- 81.
- 91.** Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 1999 Jan;55(1):29-62.
- 92.** Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol.* 1974 Feb;30(2):113-21.
- 93.** Drachman DA. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology.* 1977 Aug;27(8):783-90.
- 94.** Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn WG, Benzer S. *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 May;73(5):1684-8.
- 95.** Dundore RL, Clas DM, Wheeler LT, Habeeb PG, Bode DC, Buchholz RA, Silver PJ, Pagani ED. Zaprinast increases cyclic GMP levels in plasma and in aortic tissue of rats. *Eur J Pharmacol.* 1993 Nov 16;249(3):293-7.

96. El-Husseini AE, Bladen C, Vincent SR. Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem.* 1995 Jun;64(6):2814-7.
97. El-Husseini AE, Williams J, Reiner PB, Pelech S, Vincent SR. Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat.* 1999 Sep;17(1):45-55.
98. Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 31, 47-59.
99. Essayan DM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Nov;108(5):671-80.
100. Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips SC. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3702-7.
101. Feany MB. Rescue of the learning defect in *dunce*, a *Drosophila* learning mutant, by an allele of *rutabaga*, a second learning mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Apr;87(7):2795-9.
102. Feany MB, Quinn WG. A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Science.* 1995 May 12;268(5212):869-73.
103. Feil R, Hartmann J, Luo C, Wolfsgruber W, Schilling K, Feil S, Barski JJ, Meyer M, Konnerth A, De Zeeuw CI, Hofmann F. Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. *J Cell Biol.* 2003 Oct 27;163(2):295-302.
104. Feil R, Kleppisch T. NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;(184):529-60.
105. Ferrendelli JA, Steiner AL, McDougal DB Jr, Kipnis DM. The effect of oxotremorine and atropine on cGMP and cAMP levels in mouse cerebral cortex and cerebellum. *Biochem Biophys Res Commun.* 1970 Nov 25;41(4):1061-7.
106. Fernández de Sevilla D, Cabezas C, de Prada AN, Sánchez-Jiménez A, Buño W. Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol.* 2002 Nov 15;545(Pt 1):51-63.

107. Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature*. 1985 Jan 24-30;313(6000):310-3.
108. Fin C, da Cunha C, Bromberg E, Schmitz PK, Bianchin M, Medina JH, Izquierdo I. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiol Learn Mem*. 1995 Mar;63(2):113-5.
109. Firestein BL, Bredt DS. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase and phosphofructokinase-M. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):10545-50.
110. Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB. Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 a May 29;246(3):570-7.
111. Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem*. 1998b Jun 19;273(25):15559-64.
112. Florio VA, Sonnenburg WK, Johnson R, Kwak KS, Jensen GS, Walsh KA, Beavo JA. Phosphorylation of the 61-kDa calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase at serine 120 reduces its affinity for calmodulin. *Biochemistry*. 1994 Aug 2;33(30):8948-54.
113. Florio SK, Prusti RK, Beavo JA. Solubilization of membrane-bound rod phosphodiesterase by the rod phosphodiesterase recombinant delta subunit. *J Biol Chem*. 1996 Sep 27;271(39):24036-47.
114. Fontana DJ, Inouye GT, Johnson RM. Linopirdine (DuP 996) improves performance in several tests of learning and memory by modulation of cholinergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994 Dec;49(4):1075-82.
115. Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*. 1998 Jul;12(10):773-90.
116. Francis SH, Turko IV, Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;65:1-52.
117. Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, Omori K. Cloning and characterization of a novel human

- phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem.* 1999a Jun 25;274(26):18438-45.
- 118.** Fujishige K, Kotera J, Omori K. a Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A. *Eur J Biochem.* 1999b Dec;266(3):1118-27.
- 119.** Furuyama T, Iwahashi Y, Tano Y, Takagi H, Inagaki S. Localization of 63-kDa calmodulin-stimulated phosphodiesterase mRNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994 Oct;26(1-2):331-6.
- 120.** Garbers DL. Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem.* 1979 Jan 10;254(1):240-3.
- 121.** Gardner C, Robas N, Cawkill D, Fidock M. Cloning and characterization of the human and mouse PDE7B, a novel cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 May 27;272(1):186-92.
- 122.** Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 1988 Nov 24;336(6197):385-8.
- 123.** Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991 Feb;14(2):60-7.
- 124.** Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1995a; 57:683-706.
- 125.** Garthwaite J. Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci.* 1995b Feb;18(2):51-2.
- 126.** Geula C, Schatz CR, Mesulam MM. Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D28k within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. *Neuroscience.* 1993 May;54(2):461-76.
- 127.** Gibbs SM, Truman JW. Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron.* 1998 Jan;20(1):83-93.
- 128.** Gibbs SM, Becker A, Hardy RW, Truman JW. Soluble guanylate cyclase is required during development for visual system function in *Drosophila*. *J Neurosci.* 2001 Oct 1;21(19):7705-14.

- 129.** Gillespie PG, Beavo JA. Characterization of a bovine cone photoreceptor phosphodiesterase purified by cyclic GMP-sepharose chromatography. *J Biol Chem.* 1988 Jun 15;263(17):8133-41.
- 130.** Gillespie PG, Beavo JA. Inhibition and stimulation of photoreceptor phosphodiesterases by dipyridamole and M&B 22,948. *Mol Pharmacol.* 1989 Nov;36(5):773-81.
- 131.** Giuili G, Luzi A, Poyard M, Guellaën G. Expression of mouse brain soluble guanylyl cyclase and NO synthase during ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994 Sep 16;81(2):269-83.
- 132.** Goldbach R, Allgaier C, Heimrich B, Jackisch R. Postnatal development of muscarinic autoreceptors modulating acetylcholine release in the septohippocampal cholinergic system. I. Axon terminal region: hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998 Jun 15;108(1-2):23-30.
- 133.** Gopal VK, Francis SH, Corbin JD. Allosteric sites of phosphodiesterase-5 (PDE5). A potential role in negative feedback regulation of cGMP signaling in corpus cavernosum. *Eur J Biochem.* 2001 Jun;268(11):3304-12.
- 134.** Guipponi M, Scott HS, Kudoh J, Kawasaki K, Shibuya K, Shintani A, Asakawa S, Chen H, Lalioti MD, Rossier C, Minoshima S, Shimizu N, Antonarakis SE. Identification and characterization of a novel cyclic nucleotide phosphodiesterase gene (PDE9A) that maps to 21q22.3: alternative splicing of mRNA transcripts, genomic structure and sequence. *Hum Genet.* 1998 Oct;103(4):386-92.
- 135.** Gutiérrez R, De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F. Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learn Mem.* 2004 Jan-Feb;11(1):95-101.
- 136.** Haanen C. Sulindac and its derivatives: a novel class of anticancer agents. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001 May;2(5):677-83.
- 137.** Hah JM, Roman LJ, Martíšek P, Silverman RB. Reduced amide bond peptidomimetics. (4S)-N-(4-amino-5-[aminoalkyl]aminopentyl)-N' nitroguanidines, potent and highly selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *J Med Chem.* 2001 Aug 2;44(16):2667-70.

- 138.** Han P, Zhu X, Michaeli T. Alternative splicing of the high affinity cAMP-specific phosphodiesterase (PDE7A) mRNA in human skeletal muscle and heart. *J Biol Chem.* 1997 Jun 27;272(26):16152-7.
- 139.** Harteneck C, Koesling D, Söling A, Schultz G, Böhme E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.* 1990 Oct 15;272(1-2):221-3.
- 140.** Hartlage-Rübsamen M, Schliebs R. Rat basal forebrain cholinergic lesion affects neuronal nitric oxide synthase activity in hippocampal and neocortical target regions. *Brain Res.* 2001 Jan 19;889(1-2):155-64.
- 141.** Hayashi M, Matsushima K, Ohashi H, Tsunoda H, Murase S, Kawarada Y, Tanaka T. Molecular cloning and characterization of human PDE8B, a novel thyroid-specific isozyme of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Sep 29;250(3):751-6.
- 142.** Hayashi F, Matsuura I, Kachi S, Maeda T, Yamamoto M, Fujii Y, Liu H, Yamazaki M, Usukura J, Yamazaki A. Phosphorylation by cyclin-dependent protein kinase 5 of the regulatory subunit of retinal cGMP phosphodiesterase. II. Its role in the turnoff of phosphodiesterase in vivo. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20;275(42):32958-65.
- 143.** Haynes L, Yau KW. Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. *Nature.* 1985 Sep 5-11;317(6032):61-4.
- 144.** Hell JW, Appleyard SM, Yokoyama CT, Warner C, Catterall WA. Differential phosphorylation of two size forms of the N-type calcium channel alpha 1 subunit which have different COOH termini. *J Biol Chem.* 1994 Mar 11;269(10):7390-6.
- 145.** Heneka MT, Feinstein DL. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol.* 2001 Mar 1;114(1-2):8-18.
- 146.** Herman JP, Dolgas CM, Marcinek R, Langub MC Jr. Expression and glucocorticoid regulation of natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C) mRNA in rat brain and choroid plexus. *J Chem Neuroanat.* 1996a Oct;11(4):257-65.
- 147.** Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC Jr. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1996b May 27;369(2):165-87.

148. Hetman JM, Robas N, Baxendale R, Fidock M, Phillips SC, Soderling SH, Beavo JA. Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000a Nov 7;97(23):12891-5.
149. Hetman JM, Soderling SH, Glavas NA, Beavo JA. Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000b Jan 4;97(1):472-6.
150. Hirrlinger J, König J, Dringen R. Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem*. 2002 Aug;82(3):716-9.
151. Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Dec;18(12):484-91.
152. Hofmann F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 2005 Jan 7;280(1):1-4. Epub 2004 Nov 15.
153. Hölscher C, Rose SP. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neurosci Lett*. 1992 Oct 12;145(2):165-7.
154. Hölscher C. Different strains of rats show different sensitivity to block of long-term potentiation by nitric oxide synthase inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 2002 Dec 20;457(2-3):99-106.
155. Holtzman DM, Kilbridge J, Bredt DS, Black SM, Li Y, Clary DO, Reichardt LF, Mobley WC. NOS induction by NGF in basal forebrain cholinergic neurones: evidence for regulation of brain NOS by a neurotrophin. *Neurobiol Dis*. 1994 Nov;1(1-2):51-60.
156. Hosler JS, Buxton KL, Smith BH. Impairment of olfactory discrimination by blockade of GABA and nitric oxide activity in the honey bee antennal lobes. *Behav Neurosci*. 2000 Jun;114(3):514-25.
157. Huang AM, Lee EH. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995 Mar;50(3):327-32.
158. Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G, Böhme E. Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem*. 1990 Jun 20;190(2):273-8.

- 159.** Ibarra C, Nedvetsky PI, Gerlach M, Riederer P, Schmidt HH. Regional and age-dependent expression of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in the human brain. *Brain Res.* 2001 Jul 13;907(1-2):54-60.
- 160.** Iwahashi Y, Furuyama T, Tano Y, Ishimoto I, Shimomura Y, Inagaki S. Differential distribution of mRNA encoding cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996 May;38(1):14-24.
- 161.** Izquierdo I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB J.* 1994 Nov;8(14):1139-45.
- 162.** Jaffe K, Blanco ME. Involvement of amino acids, opioids, nitric oxide, and NMDA receptors in learning and memory consolidation in crickets. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994 Mar;47(3):493-6.
- 163.** Jarchau T, Häusler C, Markert T, Pöhler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, Lohmann SM, Walter U. Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 27;91(20):9426-30.
- 164.** Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30069-74.
- 165.** Jesko H, Chalimoniuk M, Strosznajder JB. Activation of constitutive nitric oxide synthase(s) and absence of inducible isoform in aged rat brain. *Neurochem Int.* 2003 Mar;42(4):315-22.
- 166.** Julifs DM, Fülle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3388-95.
- 167.** Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, Waldman SA, Murad F. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem.* 1986 Jun 5;261(16):7236-41.
- 168.** Kasuya J, Liang SJ, Goko H, Park SH, Kato K, Xu ZD, Hockman S, Manganiello VC, Fujita-Yamaguchi Y. Cardiac type cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3A) gene structure: similarity and difference to

adipocyte type PDE3B gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Feb 24;268(3):827-34.

169. Katzoff A, Ben-Gedalya T, Susswein AJ. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in aplysia. *J Neurosci.* 2002 Nov 1;22(21):9581-94.
170. Kendrick KM, Guevara-Guzman R, Zorrilla J, Hinton MR, Broad KD, Mimmack M, Ohkura S. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature.* 1997 Aug 14;388(6643):670-4.
171. Kimura H, Murad F. Two forms of guanylate cyclase in mammalian tissues and possible mechanisms for their regulation. *Metabolism.* 1975 Mar;24(3):439-45.
172. Kincaid RL, Balaban CD, Billingsley ML. Differential localization of calmodulin-dependent enzymes in rat brain: evidence for selective expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase in specific neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Feb;84(4):1118-22.
173. Kingston PA, Zufall F, Barnstable CJ. Rat hippocampal neurons express genes for both rod retinal and olfactory cyclic nucleotide-gated channels: novel targets for cAMP/cGMP function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17;93(19):10440-5.
174. Kingston PA, Zufall F, Barnstable CJ. Widespread expression of olfactory cyclic nucleotide-gated channel genes in rat brain: implications for neuronal signalling. *Synapse.* 1999 Apr;32(1):1-12.
175. Kinnier WJ, Chuang DM, Cheney DL, Costa E. Hippocampal distribution of acetylcholine, muscarinic receptors and cyclic GMP. *Neuropharmacology.* 1980 Nov;19(11):1119-23.
176. Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montkowski A, Fässler R, Hofmann F. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci.* 1999 Jan 1;19(1):48-55.
177. Kleppisch T, Wolfsgruber W, Feil S, Allmann R, Wotjak CT, Goebbels S, Nave KA, Hofmann F, Feil R. Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of

long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci.* 2003 Jul 9;23(14):6005-12.

- 178.** Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5159-62.
- 179.** Koesling D, Herz J, Gausepohl H, Niroomand F, Hinsch KD, Mülsch A, Böhme E, Schultz G, Frank R. The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.* 1988 Oct 24;239(1):29-34.
- 180.** Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1997 Aug 15;57(16):3537-47.
- 181.** Korzhevskii DE, Otellin VA, Grigor'ev IP, Petrova ES, Gilerovich EG, Zin'kova NN. Immunocytochemical demonstration of neuronal NO-synthase in rat brain cells. *Morfologiya.* 2007;132(4):77-80.
- 182.** Kosiorek, P., Hryniewicz, A., Bialuk, I., Zawadzka, A., Winnicka, M.M., 2003. Cannabinoids alter recognition memory in rats. *Pol J Pharmacol.* 55, 903-10.
- 183.** Kotera J, Yanaka N, Fujishige K, Imai Y, Akatsuka H, Ishizuka T, Kawashima K, Omori K. Expression of rat cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase mRNA in Purkinje cell layers during postnatal neuronal development. *Eur J Biochem.* 1997 Oct 15;249(2):434-42.
- 184.** Kotera J, Fujishige K, Imai Y, Kawai E, Michibata H, Akatsuka H, Yanaka N, Omori K. Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. *Eur J Biochem.* 1999a Jun;262(3):866-73.
- 185.** Kotera J, Fujishige K, Yuasa K, Omori K. Characterization and phosphorylation of PDE10A2, a novel alternative splice variant of human phosphodiesterase that hydrolyzes cAMP and cGMP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999b Aug 11;261(3):551-7.

- 186.** Kotera J, Grimes KA, Corbin JD, Francis SH. cGMP-dependent protein kinase protects cGMP from hydrolysis by phosphodiesterase-5. *Biochem J.* 2003 Jun 1;372(Pt 2):419-26.
- 187.** Krause M, Pedarzani P. A protein phosphatase is involved in the cholinergic suppression of the Ca(2+)-activated K(+) current *sl(AHP)* in hippocampal pyramidal neurons. *Neuropharmacology.* 2000 Apr 27;39(7):1274-83.
- 188.** Kütthe A, Eckel H, Stief CG, Uckert S, Forssmann WG, Jonas U, Mägert HJ. Molecular biological characterization of phosphodiesterase 3A from human corpus cavernosum. *Chem Biol Interact.* 1999 May 14;119-120:593-8.
- 189.** Kuzmiski JB, MacVicar BA. Cyclic nucleotide-gated channels contribute to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2001 Nov 15;21(22):8707-14.
- 190.** La Porta CA, Comolli R. Age-dependent modulation of PKC isoforms and NOS activity and expression in rat cortex, striatum, and hippocampus. *Exp Gerontol.* 1999 Nov;34(7):863-74.
- 191.** Li N, Florio SK, Pettenati MJ, Rao PN, Beavo JA, Baehr W. Characterization of human and mouse rod cGMP phosphodiesterase delta subunit (PDE6D) and chromosomal localization of the human gene. *Genomics.* 1998 Apr 1;49(1):76-82.
- 192.** Lin CS, Lau A, Tu R, Lue TF. Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Feb 16;268(2):628-35.
- 193.** Lin CS, Chow S, Lau A, Tu R, Lue TF. Human PDE5A gene encodes three PDE5 isoforms from two alternate promoters. *Int J Impot Res.* 2002 Feb;14(1):15-24.
- 194.** Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 1993 Feb 1;7(2):328-38.
- 195.** Liu Y, Ruoho AE, Rao VD and Hurley JH. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: Modeling and mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 94: 13414-13419.
- 196.** Liu L, Li H, Underwood T, Lloyd M, David M, Sperl G, Pamukcu R, Thompson WJ. Cyclic GMP-dependent protein kinase activation and induction

- by exisulind and CP461 in colon tumor cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Nov;299(2):583-92.
- 197.** Lohmann SM, Walter U, Miller PE, Greengard P, De Camilli P. Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jan;78(1):653-7.
- 198.** Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*. 1997 Aug;22(8):307-12.
- 199.** Loughney K, Martins TJ, Harris EA, Sadhu K, Hicks JB, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K. Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem*. 1996 Jan 12;271(2):796-806.
- 200.** Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, Jones BA, Howard ML, McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Francis SH, Corbin JD, Beavo JA, Ferguson K. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene*. 1998 Aug 17;216(1):139-47.
- 201.** Loughney K, Snyder PB, Uher L, Rosman GJ, Ferguson K, Florio VA. Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene*. 1999 Jun 24;234(1):109-17.
- 202.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- 203.** Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci*. 1999 Dec 1;19(23):10250-61.
- 204.** Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*. 2000 Sep;52(3):375-414.
- 205.** Ludkiewicz B, Wójcik S, Spodnik E, Domaradzka-Pytel B, Moryś J. Cholinergic innervation and calretinin-immunoreactive neurones in the hippocampus during postnatal development of the rat brain. *Folia Morphol (Warsz)*. 2002;61(1):7-14.

- 206.** Luft T, Amaral OB, Schwartzmann G, Roesler R. Transient disruption of fear-related memory by post-retrieval inactivation of gastrin-releasing Peptide or N-methyl-d-aspartate receptors in the hippocampus. *Curr Neurovasc Res.* 2008 Feb;5(1):21-7.
- 207.** Lugnier C, Gauthier C, Le Bec A, Soustre H. Cyclic nucleotide phosphodiesterases from frog atrial fibers: isolation and drug sensitivities. *Am J Physiol.* 1992 Mar;262(3 Pt 2):H654-60.
- 208.** Lydic R, Garza-Grande R, Struthers R, Baghdoyan HA. Nitric oxide in B6 mouse and nitric oxide-sensitive soluble guanylate cyclase in cat modulate acetylcholine release in pontine reticular formation. *J Appl Physiol.* 2006 May;100(5):1666-73. Epub 2006 Jan 19.
- 209.** Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):87-136.
- 210.** Manahan-Vaughan D, von Haebler D, Winter C, Juckel G, Heinemann U. A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats. *Hippocampus.* 2008;18(2):125-34.
- 211.** Manseau F, Danik M, Williams S. A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. *J Physiol.* 2005 Aug 1;566(Pt 3):865-84. Epub 2005 May 26.
- 212.** Markerink-Van Ittersum M, Steinbusch HW, De Vente J. Region-specific developmental patterns of atrial natriuretic factor- and nitric oxide-activated guanylyl cyclases in the postnatal frontal rat brain. *Neuroscience.* 1997 May;78(2):571-87.
- 213.** Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG, Beavo JA. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):13260-5. Epub 2002 Sep 23.
- 214.** May-Simera H, Levin ED. NMDA systems in the amygdala and piriform cortex and nicotinic effects on memory function. *Brain Res Cogn Brain Res.* 2003 Jul;17(2):475-83.

- 215.** Mayer B, Klatt P, Böhme E, Schmidt K. Regulation of neuronal nitric oxide and cyclic GMP formation by Ca²⁺. *J Neurochem.* 1992 Dec;59(6):2024-9.
- 216.** McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):23541-8.
- 217.** McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Kadlecek A, Seger D, Trong HL, Colbran JL, Thomas MK, Walsh KA, Francis SH, Corbin JD, et al. The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J Biol Chem.* 1993 Oct 25;268(30):22863-73.
- 218.** McCann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S, Rettorri V. The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp Gerontol.* 1998 Nov-Dec;33(7-8):813-26.
- 219.** McCoy PA, McMahon LL. Muscarinic receptor dependent long-term depression in rat visual cortex is PKC independent but requires ERK1/2 activation and protein synthesis. *J Neurophysiol.* 2007 Oct;98(4):1862-70.
- 220.** McCutchen E, Scheiderer CL, Dobrunz LE, McMahon LL. Coexistence of muscarinic long-term depression with electrically induced long-term potentiation and depression at CA3-CA1 synapses. *J Neurophysiol.* 2006 Dec;96(6):3114-21. Epub 2006 Sep 27.
- 221.** MacDonald JF, Jackson MF, Beazely MA. Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Crit Rev Neurobiol.* 2006;18(1-2):71-84.
- 222.** McEntee WJ, Crook TH. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl).* 1993;111(4):391-401.
- 223.** Meacci E, Taira M, Moos M Jr, Smith CJ, Movsesian MA, Degerman E, Belfrage P, Manganiello V. Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):3721-5.
- 224.** Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature.* 1994 May 26;369(6478):336-9.

- 225.** Michaeli T, Bloom TJ, Martins T, Loughney K, Ferguson K, Riggs M, Rodgers L, Beavo JA, Wigler M. Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1993 Jun 15;268(17):12925-32.
- 226.** Michibata H, Yanaka N, Kanoh Y, Okumura K, Omori K. Human Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphodiesterase PDE1A: novel splice variants, their specific expression, genomic organization, and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Jan 26;1517(2):278-87.
- 227.** Miró X, Pérez-Torres S, Palacios JM, Puigdomènech P, Mengod G. Differential distribution of cAMP-specific phosphodiesterase 7A mRNA in rat brain and peripheral organs. *Synapse*. 2001 Jun 1;40(3):201-14.
- 228.** Mitchell JJ, Anderson KJ. Age-related changes in [3H]MK-801 binding in the Fischer 344 rat brain. *Neurobiol Aging*. 1998 May-Jun;19(3):259-65.
- 229.** Mo E, Amin H, Bianco IH, Garthwaite J. Kinetics of a cellular nitric oxide/cGMP/phosphodiesterase-5 pathway. *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26149-58. Epub 2004 Apr 9.
- 230.** Mollace V, Rodino P, Massoud R, Rotiroti D, Nistico G. Age-dependent changes of NO synthase activity in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Oct 24;215(3):822-7.
- 231.** Monaco L, Vicini E, Conti M. Structure of two rat genes coding for closely related rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterases. Multiple mRNA variants originate from alternative splicing and multiple start sites. *J Biol Chem*. 1994 Jan 7;269(1):347-57.
- 232.** Monfort P, Muñoz MD, Kosenko E, Felipe V. Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. *J Neurosci*. 2002 Dec 1;22(23):10116-22.
- 233.** Müller U. Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron*. 1996 Mar;16(3):541-9.
- 234.** Murashima S, Tanaka T, Hockman S, Manganiello V. Characterization of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine brain:

purification of a distinct cGMP-stimulated isoenzyme. *Biochemistry*. 1990 Jun 5;29(22):5285-92.

- 235.** Myslivecek J, Hassmannová J, Barcal J, Safanda J, Zalud V. Inhibitory learning and memory in newborn rats influenced by nitric oxide. *Neuroscience*. 1996 Mar;71(2):299-312.
- 236.** Nakamizo T, Kawamata J, Yoshida K, Kawai Y, Kanki R, Sawada H, Kihara T, Yamashita H, Shibasaki H, Akaike A, Shimohama S. Phosphodiesterase inhibitors are neuroprotective to cultured spinal motor neurons. *J Neurosci Res*. 2003 Feb 15;71(4):485-95.
- 237.** Nakamura T, Gold GH. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*. 1987 Jan 29-Feb 4;325(6103):442-4.
- 238.** Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K, Murad F. Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Dec 30;157(3):1139-47.
- 239.** Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*. 1990 Oct 5;265(28):16841-5.
- 240.** Navakkode S, Sajikumar S, Frey JU. The type IV-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and its effect on hippocampal long-term potentiation and synaptic tagging. *J Neurosci*. 2004 Sep 1;24(35):7740-4.
- 241.** Navakkode S, Sajikumar S, Frey JU. Mitogen-activated protein kinase-mediated reinforcement of hippocampal early long-term depression by the type IV-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and its effect on synaptic tagging. *J Neurosci*. 2005 Nov 16;25(46):10664-70.
- 242.** Némoz G, Zhang R, Sette C, Conti M. Identification of cyclic AMP-phosphodiesterase variants from the PDE4D gene expressed in human peripheral mononuclear cells. *FEBS Lett*. 1996 Apr 8;384(1):97-102.
- 243.** Nilsson OG, Gage FH. Anticholinergic sensitivity in the aging rat septohippocampal system as assessed in a spatial memory task. *Neurobiol Aging*. 1993 Sep-Oct;14(5):487-97.
- 244.** Nordström O, Alberts P, Westlind A, Undén A, Bartfai T. Presynaptic antagonist-postsynaptic agonist at muscarinic cholinergic synapses. N-methyl-

N-(1-methyl-4-pyrrolidino-2-butynyl)acetamide. *Mol Pharmacol.* 1983 Jul;24(1):1-5.

- 245.** Obernolte R, Ratzliff J, Baecker PA, Daniels DV, Zuppan P, Jarnagin K, Shelton ER. Multiple splice variants of phosphodiesterase PDE4C cloned from human lung and testis. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Sep 12;1353(3):287-97.
- 246.** Ohno M, Watanabe S. Concurrent blockade of hippocampal metabotropic glutamate and N-methyl-D-aspartate receptors disrupts working memory in the rat. *Neuroscience.* 1996 Jan;70(2):303-11.
- 247.** Owens RJ, Lumb S, Rees-Milton K, Russell A, Baldock D, Lang V, Crabbe T, Ballesteros M, Perry MJ. Molecular cloning and expression of a human phosphodiesterase 4C. *Cell Signal.* 1997 Dec;9(8):575-85.
- 248.** Pagani ED, VanAller GS, O'Connor B, Silver PJ. Reversal of nitroglycerin tolerance in vitro by the cGMP-phosphodiesterase inhibitor zaprinast. *Eur J Pharmacol.* 1993 Oct 19;243(2):141-7.
- 249.** Paul V, Reddy L, Ekambaram P. A reversal by L-arginine and sodium nitroprusside of ageing-induced memory impairment in rats by increasing nitric oxide concentration in the hippocampus. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2005 Apr;49(2):179-86.
- 250.** Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;135:105-49.
- 251.** Philippu A, Prast H. Role of histaminergic and cholinergic transmission in cognitive processes. *Drug News Perspect.* 2001a Nov;14(9):523-9.
- 252.** Phillis JW, O'Regan MH. A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004 Jan;44(1):13-47.
- 253.** Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 2001b May;64(1):51-68
- 254.** Piedrafita B, Cauli O, Montoliu C, Felipe V. The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain in vivo and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats. *Learn Mem.* 2007 Apr 5;14(4):254-8.

- 255.** Pifarré P, García A, Mengod G. Species differences in the localization of soluble guanylyl cyclase subunits in monkey and rat brain. *J Comp Neurol.* 2007 Feb 10;500(5):942-57.
- 256.** Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Muller EE. Effects of the nitric oxide donor molsidomine on different memory components as assessed in the object-recognition task in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2002 Jul;162(3):239-45. Epub 2002 May 14.
- 257.** Podda MV, D'Ascenzo M, Leone L, Piacentini R, Azzena GB, Grassi C. Functional role of cyclic nucleotide-gated channels in rat medial vestibular nucleus neurons. *J Physiol.* 2008 Feb 1;586(3):803-15. Epub 2007 Nov 29.
- 258.** Polleux F, Morrow T, Ghosh A. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):567-73.
- 259.** Polli JW, Kincaid RL. Molecular cloning of DNA encoding a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 15;89(22):11079-83.
- 260.** Polli JW, Kincaid RL. Expression of a calmodulin-dependent phosphodiesterase isoform (PDE1B1) correlates with brain regions having extensive dopaminergic innervation. *J Neurosci.* 1994 Mar;14(3 Pt 1):1251-61.
- 261.** Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. *J Neurochem.* 1998 Jul;71(1):266-73.
- 262.** Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 2001 May;64(1):51-68.
- 263.** Prendergast MA, Terry AV Jr, Jackson WJ, Buccafusco JJ. Nitric oxide synthase inhibition impairs delayed recall in mature monkeys. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997 Jan;56(1):81-7.
- 264.** Prickaerts J, Steinbusch HW, Smits JF, de Vente J. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *Eur J Pharmacol.* 1997 Oct 22;337(2-3):125-36.
- 265.** Prickaerts J, de Vente J, Honig W, Steinbusch HW, Blokland A. cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur J Pharmacol.* 2002a Feb 1;436(1-2):83-7.

- 266.** Prickaerts J, van Staveren WC, Sik A, Markerink-van Ittersum M, Niewöhner U, van der Staay FJ, Blokland A, de Vente J. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. *Neuroscience*. 2002b;113(2):351-61.
- 267.** Prickaerts J, Sik A, van Staveren WC, Koopmans G, Steinbusch HW, van der Staay FJ, de Vente J, Blokland A. Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem Int*. 2004 Nov;45(6):915-28.
- 268.** Prickaerts J, Sik A, van der Staay FJ, de Vente J, Blokland A. Dissociable effects of acetylcholinesterase inhibitors and phosphodiesterase type 5 inhibitors on object recognition memory: acquisition versus consolidation. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Feb;177(4):381-90.
- 269.** Prusky GT, Douglas RM, Nelson L, Shabanpoor A, Sutherland RJ. Visual memory task for rats reveals an essential role for hippocampus and perirhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):5064-8.
- 270.** Puri SK, Volicer L. Age-related changes of cyclic nucleotide levels in rat brain regions. *Mech Ageing Dev*. 1981 Mar;15(3):239-42.
- 271.** Reinhardt RR, Bondy CA. Differential cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in developing and mature rat brain. *Neuroscience*. 1996 May;72(2):567-78.
- 272.** Rena G, Begg F, Ross A, MacKenzie C, McPhee I, Campbell L, Huston E, Sullivan M, Houslay MD. Molecular cloning, genomic positioning, promoter identification, and characterization of the novel cyclic AMP-specific phosphodiesterase PDE4A10. *Mol Pharmacol*. 2001 May;59(5):996-1011.
- 273.** Rentero C, Monfort A, Puigdomènech P. Identification and distribution of different mRNA variants produced by differential splicing in the human phosphodiesterase 9A gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 14;301(3):686-92.
- 274.** Repaske DR, Corbin JG, Conti M, Goy MF. A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience*. 1993 Oct;56(3):673-86.

- 275.** Reyes-Irisarri E, Markerink-Van Ittersum M, Mengod G, de Vente J. Expression of the cGMP-specific phosphodiesterases 2 and 9 in normal and Alzheimer's disease human brains. *Eur J Neurosci.* 2007 Jun;25(11):3332-8.
- 276.** Robertson JD, Bonaventura J, Kohm AP. Nitric oxide is required for tactile learning in *Octopus vulgaris*. *Proc Biol Sci.* 1994 Jun 22;256(1347):269-73.
- 277.** Rosman GJ, Martins TJ, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K, Loughney K. Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene.* 1997 May 20;191(1):89-95.
- 278.** Roussinov KS, Yonkov DI. Cholinergic mechanisms in the learning and memory facilitating effect of caffeine. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.* 1976;2(3):61-8.
- 279.** Rutten K, Vente JD, Sik A, Ittersum MM, Prickaerts J, Blokland A. The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices. *Behav Brain Res.* 2005 Oct 14;164(1):11-6.
- 280.** Rutten K, Prickaerts J, Blokland A. Rolipram reverses scopolamine-induced and time-dependent memory deficits in object recognition by different mechanisms of action. *Neurobiol Learn Mem.* 2006 Mar;85(2):132-8. Epub 2005 Oct 20.
- 281.** Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Hofmann F, Beavo JA. Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3310-7. Epub 2001 Nov 26.
- 282.** Saldou N, Baecker PA, Li B, Yuan Z, Obernolte R, Ratzliff J, Osen E, Jarnagin K, Shelton ER. Purification and physical characterization of cloned human cAMP phosphodiesterases PDE-4D and -4C. *Cell Biochem Biophys.* 1998;28(2-3):187-217.
- 283.** Samama B, Boehm N. Inhibition of nitric oxide synthase impairs early olfactory associative learning in newborn rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1999 Mar;71(2):219-31.

- 284.** Sandberg K, Berry CJ, Eugster E, Rogers TB. A role for cGMP during tetanus toxin blockade of acetylcholine release in the rat pheochromocytoma (PC12) cell line. *J Neurosci.* 1989 Nov;9(11):3946-54
- 285.** Sasaki T, Kotera J, Yuasa K, Omori K. Identification of human PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 May 19;271(3):575-83.
- 286.** Schachtner J, Homberg U, Truman JW. Regulation of cyclic GMP elevation in the developing antennal lobe of the Sphinx moth, *Manduca sexta*. *J Neurobiol.* 1999 Nov 15;41(3):359-75.
- 287.** Schmidt MJ, Thornberry JF. Cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in vitro in brain regions of young, old and aged rats. *Brain Res.* 1978 Jan 6;139(1):169-77.
- 288.** Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem.* 1992 Oct;40(10):1439-56.
- 289.** Schmidt K, Schrammel A, Koesling D, Mayer B. Molecular mechanisms involved in the synergistic activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 and nitric oxide in endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 2001 Feb;59(2):220-4.
- 290.** Scholz NL, Chang ES, Graubard K, Truman JW. The NO/cGMP pathway and the development of neural networks in postembryonic lobsters. *J Neurobiol.* 1998 Feb 15;34(3):208-26.
- 291.** Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science.* 1991 Dec 6;254(5037):1503-6.
- 292.** Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1957 Feb;20(1):11-21.
- 293.** Semba K, Fibiger HC. Organization of central cholinergic systems. *Prog Brain Res.* 1989;79:37-63.
- 294.** Serra M, Ghiani CA, Foddi MC, Motzo C, Biggio G. Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Neurochem Res.* 1994 Apr;19(4):483-7.

- 295.** Shimizu-Albergine M, Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Wolfsgruber W, Hofmann F, Beavo JA. Individual cerebellar Purkinje cells express different cGMP phosphodiesterases (PDEs): in vivo phosphorylation of cGMP-specific PDE (PDE5) as an indicator of cGMP-dependent protein kinase (PKG) activation. *J Neurosci.* 2003 Jul 23;23(16):6452-9.
- 296.** Shitsukawa K, Andersen CB, Richard FJ, Horner AK, Wiersma A, van Duin M, Conti M. Cloning and characterization of the cyclic guanosine monophosphate-inhibited phosphodiesterase PDE3A expressed in mouse oocyte. *Biol Reprod.* 2001 Jul;65(1):188-96.
- 297.** Simpson PJ, Miller I, Moon C, Hanlon AL, Liebl DJ, Ronnett GV. Atrial natriuretic peptide type C induces a cell-cycle switch from proliferation to differentiation in brain-derived neurotrophic factor- or nerve growth factor-primed olfactory receptor neurons. *J Neurosci.* 2002 Jul 1;22(13):5536-51.
- 298.** Silva AJ. Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *J Neurobiol.* 2003 Jan;54(1):224-37.
- 299.** Smith ML, Deadwyler SA, Booze RM. 3-D reconstruction of the cholinergic basal forebrain system in young and aged rats. *Neurobiol Aging.* 1993 Jul-Aug;14(4):389-92.
- 300.** Smith ML, Booze RM. Cholinergic and GABAergic neurons in the nucleus basalis region of young and aged rats. *Neuroscience.* 1995 Aug;67(3):679-88.
- 301.** Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, Walter U. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998 Jul;358(1):134-9.
- 302.** Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998a Jul 21;95(15):8991-6.
- 303.** Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem.* 1998b Jun 19;273(25):15553-8.

- 304.** Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):7071-6.
- 305.** Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Apr;12(2):174-9.
- 306.** Son H, Lu YF, Zhuo M, Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. The specific role of cGMP in hippocampal LTP. *Learn Mem*. 1998 Jul-Aug;5(3):231-45.
- 307.** Sonnenburg WK, Mullaney PJ, Beavo JA. Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *J Biol Chem*. 1991 Sep 15;266(26):17655-61.
- 308.** Sonnenburg WK, Seger D, Beavo JA. Molecular cloning of a cDNA encoding the "61-kDa" calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. Tissue-specific expression of structurally related isoforms. *J Biol Chem*. 1993 Jan 5;268(1):645-52.
- 309.** Sonnenburg WK, Seger D, Kwak KS, Huang J, Charbonneau H, Beavo JA. Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem*. 1995 Dec 29;270(52):30989-1000.
- 310.** Southam E, Garthwaite J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology*. 1993 Nov;32(11):1267-77.
- 311.** Stacey P, Rulten S, Dapling A, Phillips SC. Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jun 18;247(2):249-54.
- 312.** Stanton PK. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus*. 1996;6(1):35-42.
- 313.** Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*. 1994 May 10;33(18):5636-40.
- 314.** Stone JR, Marletta MA. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*. 1995 Nov 14;34(45):14668-74.

- 315.** Strosznajder JB, Mossakowski MJ. Mózg a starzenie. Centrum Upowszechniania Nauki PAN, 2001: 83-87
- 316.** Sturton G, Fitzgerald M. Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of COPD. *Chest*. 2002 May;121(5 Suppl):192S-196S.
- 317.** Sugaya K, McKinney M. Nitric oxide synthase gene expression in cholinergic neurons in the rat brain examined by combined immunocytochemistry and in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994 Apr;23(1-2):111-25.
- 318.** Sundkvist E, Jaeger R, Sager G. Pharmacological characterization of the ATP-dependent low K(m) guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) transporter in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol*. 2002 Mar 1;63(5):945-9.
- 319.** Suvarna NU, O'Donnell JM. Hydrolysis of N-methyl-D-aspartate receptor-stimulated cAMP and cGMP by PDE4 and PDE2 phosphodiesterases in primary neuronal cultures of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Jul;302(1):249-56.
- 320.** Swinnen JV, Joseph DR, Conti M. The mRNA encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by hormones and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(21):8197-201.
- 321.** Taira M, Hockman SC, Calvo JC, Taira M, Belfrage P, Manganiello VC. Molecular cloning of the rat adipocyte hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem*. 1993 Sep 5;268(25):18573-9.
- 322.** Tamaru M, Yoneda Y, Ogita K, Shimizu J, Nagata Y. Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res*. 1991 Feb 22;542(1):83-90.
- 323.** Tanaka J, Markerink-van Ittersum M, Steinbusch HW, De Vente J. Nitric oxide-mediated cGMP synthesis in oligodendrocytes in the developing rat brain. *Glia*. 1997 Apr;19(4):286-97.
- 324.** Teyke T. Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail *Helix pomatia*. *Neurosci Lett*. 1996 Mar 8;206(1):29-32.

- 325.** Thomas MK, Francis SH, Corbin JD. Characterization of a purified bovine lung cGMP-binding cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 1990 Sep 5;265(25):14964-70.
- 326.** Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR, Dawson TM, Dawson VL [1997] Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 2676-2680.
- 327.** Tonnaer JA, Cheung CL, De Boer T. cGMP formation and phosphoinositide turnover in rat brain slices are mediated by pharmacologically distinct muscarinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol.* 1991 Jul 12;207(3):183-8.
- 328.** Truman JW, De Vente J, Ball EE. Nitric oxide-sensitive guanylate cyclase activity is associated with the maturational phase of neuronal development in insects. *Development.* 1996 Dec;122(12):3949-58.
- 329.** Udovichenko IP, Cunnick J, Gonzales K, Takemoto DJ. Phosphorylation of bovine rod photoreceptor cyclic GMP phosphodiesterase. *Biochem J.* 1993 Oct 1;295 (Pt 1):49-55.
- 330.** Uhler MD. Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem.* 1993 Jun 25;268(18):13586-91.
- 331.** Vallebuona F, Raiteri M. Age-related changes in the NMDA receptor/nitric oxide/cGMP pathway in the hippocampus and cerebellum of freely moving rats subjected to transcerebral microdialysis. *Eur J Neurosci.* 1995 Apr 1;7(4):694-701.
- 332.** Van Staveren WC, Steinbusch HW, Markerink-Van Ittersum M, Repaske DR, Goy MF, Kotera J, Omori K, Beavo JA, De Vente J. mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol.* 2003 Dec 22;467(4):566-80.
- 333.** Van Staveren WC, Steinbusch HW, Markerink-van Ittersum M, Behrends S, de Vente J. Species differences in the localization of cGMP-producing and NO-responsive elements in the mouse and rat hippocampus using cGMP immunocytochemistry. *Eur J Neurosci.* 2004 Apr;19(8):2155-68.

- 334.** Van Staveren WC, Markerink-van Ittersum M. Localization of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-hydrolyzing phosphodiesterase type 9 in rat brain by nonradioactive in situ hybridization. *Methods Mol Biol.* 2005;307:75-84.
- 335.** Van Wagenen S, Rehder V. Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide. *J Neurobiol.* 1999 May;39(2):168-85.
- 336.** Vernet D, Bonavera JJ, Swerdloff RS, Gonzalez-Cadavid NF, Wang C. Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain regions of aging rats. *Endocrinology.* 1998 Jul;139(7):3254-61.
- 337.** Villiger JW, Dunn AJ. Phosphodiesterase inhibitors facilitate memory for passive avoidance conditioning. *Behav Neural Biol.* 1981 Mar;31(3):354-9.
- 338.** Wainer BH, Steininger TL, Roback JD, Burke-Watson MA, Mufson EJ, Kordower J. Ascending cholinergic pathways: functional organization and implications for disease models. *Prog Brain Res.* 1993;98:9-30.
- 339.** Wang P, Myers JG, Wu P, Cheewatrakoolpong B, Egan RW, Billah MM. Expression, purification, and characterization of human cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4) subtypes A, B, C, and D. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 May 19;234(2):320-4.
- 340.** Wang P, Wu P, Egan RW, Billah MM. Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution. *Gene.* 2001 Dec 12;280(1-2):183-94.
- 341.** Wang W, Acland GM, Aguirre GD, Ray K. Cloning and characterization of the cDNA and gene encoding the gamma-subunit of cGMP-phosphodiesterase in canine retinal rod photoreceptor cells. *Gene.* 1996 Nov 28;181(1-2):1-5.
- 342.** Watkins JC, Jane DE. The glutamate story. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S100-8.
- 343.** Wedel B, Garbers D. The guanylyl cyclase family at Y2K. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:215-33.
- 344.** Wei JW, Chang CM, Chang LW. Differential responses in cyclic GMP formation induced by excitatory amino acids (EAA) and sodium nitroprusside

- (SNP) in various regions of the brain and of rats of varied age. *Int J Biochem.* 1993 Nov;25(11):1579-85.
- 345.** Wei JY, Roy DS, Leconte L, Barnstable CJ. Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1998 Oct;56(1):37-64.
- 346.** Werner C, Raivich G, Cowen M, Strekalova T, Sillaber I, Buters JT, Spanagel R, Hofmann F. Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur J Neurosci.* 2004 Dec;20(12):3498-506.
- 347.** Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F. The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 1989 Jul 17;251(1-2):191-6.
- 348.** Wiemer G, Hellwich U, Wellstein A, Dietz J, Hellwich M, Palm D. Energy-dependent extrusion of cyclic 3',5'-adenosine-monophosphate. A drug-sensitive regulatory mechanism for the intracellular nucleotide concentration in rat erythrocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1982 Dec;321(4):239-46.
- 349.** Wiemer G, Becker R, Gerhards H, Hock F, Stechl J, Rüger W. Effects of Hoe 065, a compound structurally related to inhibitors of angiotensin converting enzyme, on acetylcholine metabolism in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 1989 Jul 4;166(1):31-9.
- 350.** Wood PL, Rao TS. A review of in vivo modulation of cerebellar cGMP levels by excitatory amino acid receptors: role of NMDA, quisqualate and kainate subtypes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1991;15(2):229-35.
- 351.** Wood PL, Ryan R, Li M. NMDA-, but not kainate- or quisqualate-dependent increases in cerebellar cGMP are dependent upon monoaminergic innervation. *Life Sci.* 1992;51(26):PL267-70.
- 352.** Yamada K, Noda Y, Nakayama S, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol.* 1995 Jul;115(5):852-8.

- 353.** Yamada K, Noda Y, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima T. Reduction in the number of NADPH-diaphorase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats. *Neurosci Res.* 1996a Mar;24(4):393-402.
- 354.** Yamada K, Hiramatsu M, Noda Y, Mamiya T, Murai M, Kameyama T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, Nabeshima T. Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neuroscience.* 1996 Sep;74(2):365-74.
- 355.** Yan C, Bentley JK, Sonnenburg WK, Beavo JA. Differential expression of the 61 kDa and 63 kDa calmodulin-dependent phosphodiesterases in the mouse brain. *J Neurosci.* 1994 Mar;14(3 Pt 1):973-84.
- 356.** Yan C, Zhao AZ, Bentley JK, Beavo JA. The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner. *J Biol Chem.* 1996 Oct 11;271(41):25699-706.
- 357.** Yang Q, Paskind M, Bolger G, Thompson WJ, Repaske DR, Cutler LS, Epstein PM. A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Dec 30;205(3):1850-8.
- 358.** Yu J, Wolda SL, Frazier AL, Florio VA, Martins TJ, Snyder PB, Harris EA, McCaw KN, Farrell CA, Steiner B, Bentley JK, Beavo JA, Ferguson K, Gelinias R. Identification and characterisation of a human calmodulin-stimulated phosphodiesterase PDE1B1. *Cell Signal.* 1997 Nov;9(7):519-29.
- 359.** Yu W, Juang S, Lee J, Liu T, Cheng J. Decrease of neuronal nitric oxide synthase in the cerebellum of aged rats. *Neurosci Lett.* 2000 Sep 8;291(1):37-40.
- 360.** Yuasa K, Kotera J, Fujishige K, Michibata H, Sasaki T, Omori K. Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31469-79.
- 361.** Yuasa K, Ohgaru T, Asahina M, Omori K. Identification of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A (PDE11A): comparison of rat and human PDE11A splicing variants. *Eur J Biochem.* 2001 Aug;268(16):4440-8.

- 362.** Zhang R, Wang Y, Zhang L, Zhang Z, Tsang W, Lu M, Zhang L, Chopp M. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke*. 2002 Nov;33(11):2675-80.
- 363.** Zhang Y, Han H, Elmquist WF, Miller DW. Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*. 2000 Sep 8;876(1-2):148-53.
- 364.** Zhang L, Zhang Z, Zhang RL, Cui Y, LaPointe MC, Silver B, Chopp M. Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. *Brain Res*. 2006 Nov 6;1118(1):192-8.
- 365.** Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*. 1994 Apr 14;368(6472):635-9.
- 366.** Zou LB, Yamada K, Tanaka T, Kameyama T, Nabeshima T. Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology*. 1998;37(3):323-30.
- 367.** Zufall F, Firestein S, Shepherd GM. Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1994;23:577-607.
- 368.** Zufall F, Leinders-Zufall T. Identification of a long-lasting form of odor adaptation that depends on the carbon Monoxide/cGMP second-messenger system. *J Neurosci*. 1997 Apr 15;17(8):2703-12.