



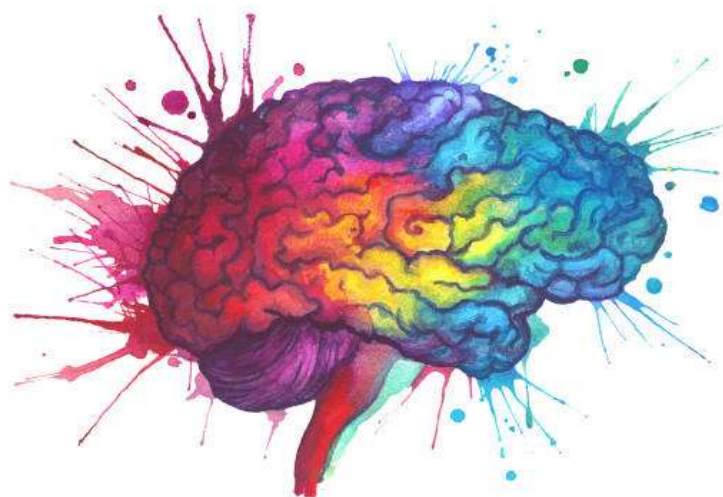
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο αναστολέας του μονοξειδίου του αζώτου (NO) 7-νιτροϊνδαζόλη (7-NI) ανταγωνίζεται τη κοινωνική απόσυρση και τα γνωσιακά ελλείμματα επαγόμενα από τον αποκλεισμό του NMDA υποδοχέα στον επίμυ

The Nitric Oxide (NO) Inhibitor 7-Nitroindazole Counteracts Social Withdrawal and Cognition Deficits Induced by Blockade of the NMDA Receptor in the Rat



ΛΑΡΙΣΑ, 2024

Στύλα Αγγελική - Μεταξία του Στέργιου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

☐ Πιτσίκας Νικόλαος, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

☐ Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπουσα)

☐ Δήμας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

Περιεχόμενα	
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ	6
• Διαγνωστικά Κριτήρια της Σχιζοφρένειας.....	9
1.1.1. Αίτια και Παθοφυσιολογία της Σχιζοφρένειας.....	11
• Γενετική Βάση.....	11
• Περιβαλλοντικοί Παράγοντες	11
• Διαταραχές στη Νευροδιαβίβαση	12
-Ντοπαμινεργική Υπόθεση.....	12
- GABAεργική Υπόθεση	13
-Σεροτονινεργική υπόθεση	13
-Γλουταμινεργική Υπόθεση	14
1.2. Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις	15
1.2.1. Αντιψυχωσικά φάρμακα	15
α) Τα αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς	15
β) Τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς.....	15
γ) Τα αντιψυχωσικά τρίτης γενιάς	16
1.3. Μονοξείδιο του αζώτου (NO).....	17
1.3.1. Σύνθεση NO και σηματοδότηση	17
• Σύνθεση NO	17
• Συνθάση του NO	17
• Σηματοδότηση μέσω NO.....	18
A) Σηματοδότηση μέσω της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης (sGC)	18
B) S-νιτροσυλίωση πρωτεϊνών.....	19
1.3.2. Νευροπροστασία και Νευροτοξικότητα του NO.....	21
• Νευροπροστατευτική δράση του NO.....	21
α) S-νιτροσυλίωση κασπάσης 3 και υπομονάδων NR1, NR2	21
β) Επίδραση του NO στην οδό sGC- cGMP- PKG.....	21
γ) Επίδραση του NO στην οξυγενάση της αίμης-1 (HO-1)	21
• Νευροτοξικότητα του NO	21
1.3.3. Μονοξείδιο του αζώτου (NO) και Σχιζοφρένεια	22
• Γενετικές μελέτες.....	23

• Πολυμορφισμοί του γονιδίου NOS1	23	
• Ιστοχημικές μελέτες	23	
• Βιοχημικές μελέτες	24	
1.3.4. Αναστολείς της NOS	24	
• Φαρμακολογικές δράσεις των αναστολέων της NOS	25	
• 7-NI	25	
1.3.5. Αναστολείς της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και Σχιζοφρένεια	26	
Προκλινικές μελέτες 7NI και σχιζοφρένεια	26	
ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	28	
2.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	28	
2.1. Πειραματόζωα	28	
2.2. Συμπεριφορικές Τεχνικές	29	
2.2.1.Πειραματικά	πρότυπα	σχιζοφρένειας
.....		
A) Κοινωνική Απόσυρση (Social Withdrawal).....	29	
• Πειραματικό Πρωτόκολλο ΤΚΑ.....	30	
B)Χωρική αναγνωριστική μνήμη.....	30	
• Πειραματικό Πρωτόκολλο ΤΘΑ	30	
Γ)Μη χωρική αναγνωριστική μνήμη.....	32	
• Πειραματικό Πρωτόκολλο ΤΑΑ.....	32	
• Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου (ΤΑΑ) + χρονο-εξαρτώμενη αμνησία.....	32	
Δ)Συναισθηματική μνήμη	34	
• Πειραματικό πρωτόκολλο ΤΠΑ.....	34	
2.3.Αντιδραστήρια	35	
2.4.Πειραματική		διαδικασία
.....		
2.4.1. Πείραμα 1: Επίδραση της 7-NI επί των ελλειμμάτων χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από την κεταμίνη στον επίμυ (ΤΘΑ).	36	
2.4.2. Πείραμα 2: Επίδραση της 7-NI επί των επαγόμενων από την MK-801 ελλειμμάτων συναισθηματικής μνήμης στο τεστ παθητικής αποφυγής (ΤΠΑ).	36	
2.4.3. Πείραμα 3: Επίδραση της 7-NI επί της επαγόμενης από την κεταμίνη κοινωνικής απόσυρσης (ΤΚΑ).....	37	
2.4.4. Πείραμα 4: Επίδραση της χορήγησης μη δραστικών δόσεων της 7-NI επί της χρονοεξαρτώμενης αμνησίας (ΤΘΑ).	38	
2.4.5. Πείραμα 5: Επίδραση της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων 7-NI και κλοζαπίνης στα επαγόμενα από την κεταμίνη ελλείμματα απόδοσης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ΤΑΑ).	38	

2.5 Στατιστική Ανάλυση	39
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
3.1. Πείραμα 1: Επίδραση της 7-NI επί των ελλειμμάτων χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από την κεταμίνη στον επίμυ (ΤΘΑ).	40
3.2. Πείραμα 2: Επίδραση της 7-NI επί των επαγόμενων από την MK-801 ελλειμμάτων συναισθηματικής μνήμης στο τεστ παθητικής αποφυγής (ΤΠΑ).	41
3.3. Πείραμα 3: Επίδραση της 7-NI επί της επαγόμενης από την κεταμίνη κοινωνικής απόσυρσης (ΤΚΑ).	42
3.4. Πείραμα 4: Επίδραση της χορήγησης μη δραστικών δόσεων της 7-NI επί της χρονοεξαρθρώμενης αμνησίας (ΤΘΑ).	44
3.5. Πείραμα 5: Επίδραση της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων 7-NI και κλοζαπίνης στα επαγόμενα από την κεταμίνη ελλείμματα απόδοσης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ΤΑΑ).	46
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
• Κοινωνική Απόσυρση.....	47
• Ελλείμματα χωρικής αναγνωριστικής μνήμης.....	48
• Ελλείμματα συναισθηματικής μνήμης	49
• Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της 7-NI.....	49
• Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της συνδυαστικής θεραπείας	50
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τα πειράματα για την συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Πιτσίκια Νικόλαο, Καθηγητή Φαρμακολογίας του τμήματος για την άρτια συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της ετοιμασίας και της υλοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας για την πολύτιμη βοήθεια του και τον χρόνο που διέθεσε, καθοδηγώντας με και υποστηρίζοντάς με ανελλιπώς. Θα ήταν παράλειψη να μην αποδώσω τις κατάλληλες ευχαριστίες και τους υπόλοιπους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής, κύριο Δήμα Κωνσταντίνο, Καθηγητή Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ., και κυρία Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Π.Θ. Επιπροσθέτως, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω σε όλους τους καθηγητές του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με βοήθησαν να χαράξω τη δική

μου επιστημονική πορεία κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και για τις πολύτιμες γνώσεις σε έναν τόσο εξελισσόμενο και υποσχόμενο τομέα που μου μεταλαμπαδεύτηκαν. Κρίνεται αναγκαίο τέλος να εκφράσω την συγκίνηση και ευγνωμοσύνη μου στους φίλους και στην οικογένειά μου που ήταν συνέχεια υποστηρικτές μου, τόσο ηθικά και ψυχολογικά, όσο και πρακτικά για την πραγματοποίηση του ερευνητικού μου έργου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπερπαραγωγή του αερίου μονοξειδίου του αζώτου (NO) θεωρείται να σχετίζεται με τη σχιζοφρένεια, μια πολυπαραγοντική ψυχική διαταραχή. Οι αναστολές μονοξειδίου του αζώτου έχουν ως βασικό ρόλο τη μείωση των επιπέδων του NO στο κύτταρο και συνεπώς, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στις προσπάθειες για τη θεραπεία της νόσου αυτής. Ο σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας είναι να εξετάσει **κατά πόσο ο αναστολέας της συνθάσης του NO (NOS) 7-νιτροϊνδαζόλη (7-NI) έχει τη δυνατότητα να περιορίσει κάποια από τα συμπτώματα που μιμούνται αυτά της σχιζοφρένειας και τα οποία έχουν επαχθεί από τους ανταγωνιστές του N-μεθυλ-D-ασπαρτικού (NMDA) υποδοχέα κεταμίνη και διζοσιλπίνη (MK-801).** Η ικανότητα της 7-NI να περιορίσει την κοινωνική απόσυρση και τα γνωσιακά ελλείμματα τα οποία επάγονται από την κεταμίνη και την MK-801, αξιολογήθηκε μέσω συμπεριφορικών δοκιμασιών όπως είναι το Τεστ Κοινωνικής Αλληλεπίδρασης (SIT), το Τεστ Θέσης Αντικειμένου (OLT), και το Τεστ Παθητικής Αποφυγής (STPAT) στους επίμυες. Επιπλέον, στα πλαίσια της μελέτης αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα χορήγησης του συνδυασμού αδρανών δόσεων της 7-NI και του άτυπου νευροληπτικού κλοζαπίνη (CLZ) στα ελλείμματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης με τη βοήθεια του Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου (ORT). Τα αποτελέσματα φανέρωσαν πως η 7-NI μειώνει τα συμπεριφορικά ελλείμματα που προκαλούνται από ανταγωνιστές του NMDA υποδοχέα στον επίμυ. Επιπλέον, η συγχορήγηση αδρανών δόσεων 7-NI και CLZ εξουδετέρωσε την χρονοεξαρτώμενη αμνησία και τα ελλείμματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης οφειλόμενα στη χορήγηση κεταμίνης. Συνεπώς, τα τρέχοντα ευρήματα υποδηλώνουν πως η 7-NI ανταγωνίζεται τα ελλείμματα του γλουταμινικού συστήματος, καθώς μειώνει τα αρνητικά συμπτώματα και τα γνωσιακά ελλείμματα σε ζωικά πρότυπα της σχιζοφρένειας. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τη δυνατότητα της 7-NI ως επικουρικού φαρμάκου για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας.

ABSTRACT

The hyperproduction of nitric oxide (NO) gas appears to be linked to schizophrenia, a serious psychiatric disorder. Nitric oxide inhibitors can normalize and restore NO levels and might be therefore useful in therapeutic approaches to the disease. The aim of the present study is to determine whether the inhibitor of NO synthase (NOS) 7-nitroindazole (7-NI) can reduce schizophrenic-like symptoms induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockade using the antagonist ketamine in the rat. To assess the ability of **7-NI to reduce social withdrawal, spatial recognition memory and emotional memory deficits induced by the NMDA receptor antagonists ketamine and dizocilpine (MK-801)**, tests such as the Social Interaction Test (SIT), the Object Location Test (OLT) and the Passive Avoidance Test (STPAT) were performed. Furthermore, within the framework of the study, the effectiveness of the combination of non-active doses of 7-NI and clozapine on non-spatial recognition memory deficits was evaluated in the Object Recognition Test (ORT). The results showed that 7-NI reduces social withdrawal and spatial recognition memory deficits, induced by ketamine in the rat. In addition, co-administration of sub-effective doses of 7-NI and clozapine reversed ketamine-induced and delay-dependent nonspatial recognition memory deficits. Consequently, the current findings suggest that 7-NI is sensitive to hypofunction of the glutamate system, as it reduces negative symptoms and cognitive deficits in animal models that mimic schizophrenia. The results support the potential use of 7-NI as an adjunctive drug for the treatment of schizophrenia.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ

Η σχιζοφρένεια είναι μια **σοβαρή ψυχική ασθένεια** που επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο ένα άτομο σκέφτεται, αισθάνεται και συμπεριφέρεται. Τα άτομα με σχιζοφρένεια ενδεχομένως να φαίνεται ότι έχουν χάσει την επαφή με την πραγματικότητα, γεγονός ιδιαίτερα ανησυχητικό τόσο για τους ίδιους, όσο και τον κοινωνικό τους περίγυρο. Τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας μπορεί να καθιστούν δύσκολη τη συμμετοχή σε συνήθεις δραστηριότητες, αλλά υπάρχουν, ως έναν βαθμό, αποτελεσματικές θεραπείες. Αρκετοί από τους ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία

μπορούν να επαναλειτουργήσουν κοινωνικά και να επαναφέρουν τις καθημερινές τους δραστηριότητες.

Τα γεγονότα που ακολούθησαν για να διαμορφωθεί η έννοια της σχιζοφρένειας όπως γνωρίζουμε σήμερα, είναι τα εξής:

- **Πρώιμες παρατηρήσεις:** Πρόκειται για ιστορικές αναφορές συμπεριφορών που προσομοιάζουν τη διαταραχή και καταγράφηκαν ήδη από την αρχαιότητα.
- **18ος και 19ος αιώνες:** Η σύγχρονη έννοια της σχιζοφρένειας ξεκίνησε να διαμορφώνεται με κυρίαρχο τον Emil Kraepelin που τη διαφοροποίησε από ψυχικές ασθένειες, όπως η διπολική διαταραχή και τον Eugen Bleuler, που εισήγαγε τον όρο το 1911, δίνοντας έμφαση στη διάσπαση των νοητικών λειτουργιών.
- **20ός αιώνας:** Η φροϋδική ψυχανάλυση, η επιστημονική έρευνα για την κατανόηση της βιολογικής πολυπλοκότητας του εγκεφάλου και οι κοινωνικοπολιτισμικοί παράγοντες συνέβαλαν στην κατανόηση της διαταραχής. Στα μέσα του αιώνα αυτού εμφανίστηκαν τα αντιψυχωσικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα.
- **Εξελίξεις στην κατανόηση:** Οι επιστήμονες έχουν αρχίσει να προσδιορίζουν κάποιες από τις εγκεφαλικές ανωμαλίες και την αιτιοπαθογένεια της νόσου, χωρίς ωστόσο την εξακρίβωση τους.
- **Σύγχρονες προκλήσεις:** Δυστυχώς η σχιζοφρένεια αποτελεί ακόμα μια από τις σημαντικότερες ψυχικές διαταραχές, τροχοπέδη στην ομαλή καθημερινότητα των πασχόντων. Με την πρόοδο ωστόσο της έρευνας, οι θεραπείες βρίσκονται σε υποσχόμενο σημείο.

Τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας μπορεί να διαφέρουν από άτομο σε άτομο, αλλά γενικά εμπίπτουν σε τρεις κύριες κατηγορίες: θετικά, αρνητικά και γνωσιακά ελλείμματα.

Τα **θετικά συμπτώματα** σχετίζονται με **αυξημένη δραστηριότητα ντοπαμίνης** στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου και περιλαμβάνουν:

Α) Ψευδαισθήσεις: Όταν ένα άτομο βλέπει, ακούει, μυρίζει, γεύεται, αισθάνεται και ακροάζεται πράγματα που δεν υπάρχουν στην πραγματικότητα.

Β) Διαταραχή της σκέψης: Όταν ένα άτομο έχει τρόπους σκέψης που είναι ασυνήθιστοι ή παράλογοι, καθώς και πρόβλημα στην οργάνωση των σκέψεων και της ομιλίας.

Γ) Διαταραχή της κίνησης: Όταν ένα άτομο παρουσιάζει μη φυσιολογικές κινήσεις του σώματος.

Τα **αρνητικά συμπτώματα** που σχετίζονται με **υπολειτουργία γλουταμινεργικού και ντοπαμινεργικού συστήματος** στον προμετωπιαίο φλοιό είναι πιο δύσκολο να

διαγνωστούν, αλλά συνδέονται με υψηλή νοσηρότητα, καθώς διαταράσσουν τα συναισθήματα και τη συμπεριφορά του ασθενούς και περιλαμβάνουν:

A) Απώλεια κινήτρων

B) Απώλεια ενδιαφέροντος ή απόλαυσης στις καθημερινές δραστηριότητες

Γ) Απόσυρση από την κοινωνική ζωή

Δ) Δυσκολία στην εκδήλωση συναισθημάτων και στη φυσιολογική λειτουργία

E) Παραμέληση υγιεινής

ΣΤ) Αλογία, ανηδονία

Z) Απάθεια

Αυτά τα συμπτώματα μερικές φορές συγχέονται με συμπτώματα κατάθλιψης ή άλλων ψυχικών ασθενειών.

Τα **γνωσιακά ελλείμματα** περιλαμβάνουν προβλήματα:

A) Στην επεξεργασία πληροφοριών για τη λήψη αποφάσεων

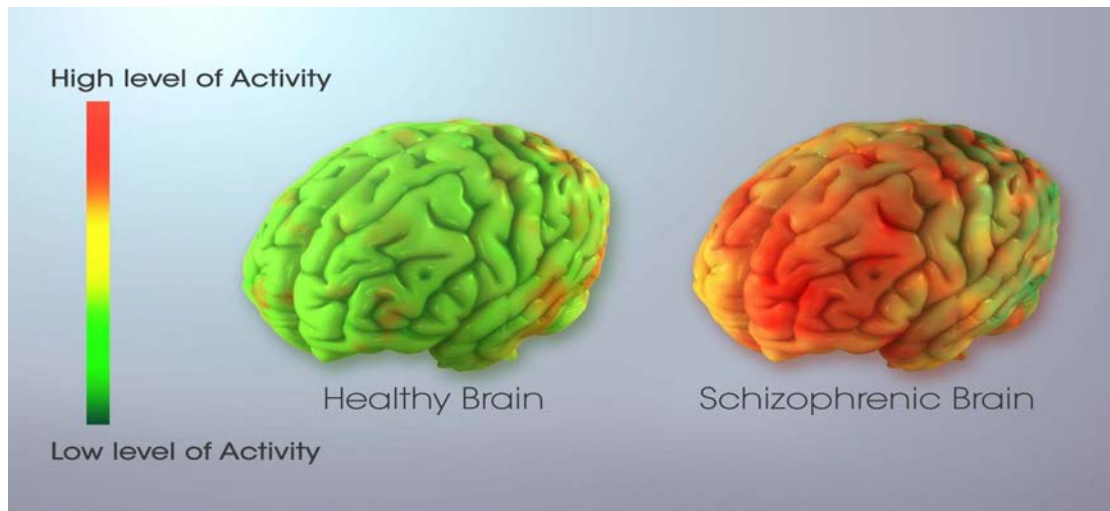
B) Στη συγκέντρωση ή προσοχή

Γ) Στη μνήμη και εκτελεστική λειτουργία

Τα περισσότερα άτομα βιώνουν μια περίοδο προδρομικών συμπτωμάτων πριν από τη διάγνωση της σχιζοφρένειας, που περιλαμβάνουν αλλαγές στη νόηση, τη συμπεριφορά και τη λειτουργία.

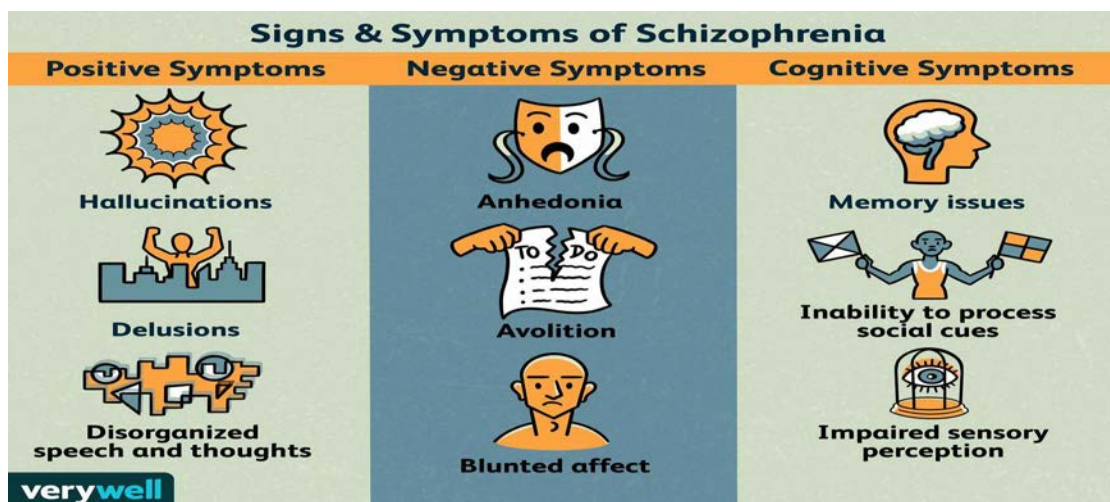
Σύμφωνα με αποτέλεσμα κλινικών μελετών, τα σύγχρονα νευροληπτικά (τυπικά και άτυπα) είναι σε θέση να ανακουφίσουν τα θετικά συμπτώματα, αλλά είναι αναποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των αρνητικών συμπτωμάτων και των γνωστικών ελλειμμάτων των σχιζοφρενών ασθενών.

Τα βελτιωμένα διαγνωστικά εργαλεία, η έλευση των άτυπων αντιψυχωσικών και η ανάπτυξη ψυχοκοινωνικών θεραπειών έχουν καταστήσει δυνατή την έρευνα παρέμβασης σε άτομα με εξαιρετικά υψηλό κίνδυνο για την ανάπτυξη σχιζοφρένειας. Ωστόσο, τα αντιψυχωσικά φάρμακα δεν έχουν ακόμη εγκριθεί για τέτοιους πληθυσμούς, κυρίως επειδή η παρατεταμένη έκθεση σε αυτά έχει συσχετιστεί με διάφορες παρενέργειες, όπως η αύξηση του σωματικού βάρους, το μεταβολικό σύνδρομο, η υπερλιπιδαιμία κ.α. Οι περισσότεροι προδρομικοί ασθενείς δεν λαμβάνουν καμία ή, αν λαμβάνουν, πολύ σύντομη αντιψυχωσική αγωγή, λόγω ανησυχιών για την ασφάλεια. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει εγκεκριμένη φαρμακευτική αγωγή για την προδρομική σχιζοφρένεια. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη στρατηγικής έγκαιρης διάγνωσης και παρέμβασης είναι πολύ σημαντική.



Scientific Animations. "Schizophrenia & Bipolar Disorder Overlap." <https://www.scientificanimations.com/schizophrenia-bipolar-disorder-overlap-3d-medical-animation/uncategorized/>

Εικόνα 1: Οι σχιζοφρενείς εμφανίζουν αυξημένη εγκεφαλική δραστηριότητα σε σχέση με τους υγιείς.



Verywell Health. "Schizophrenia Symptoms." <https://www.verywellhealth.com/schizophrenia-symptoms-8551091>

Εικόνα 2: Συμπτώματα σχιζοφρένειας

Διαγνωστικά Κριτήρια της Σχιζοφρένειας

Τα επίσημα διαγνωστικά κριτήρια του **DMS-5** (Διαγνωστικό και Στατιστικό Εγχειρίδιο Ψυχικών Διαταραχών) για τη σχιζοφρένεια είναι τα παρακάτω:

1) Δύο (ή περισσότερα) από τα ακόλουθα, καθένα από τα οποία είναι παρόν για σημαντικό χρονικό διάστημα **κατά τη διάρκεια 1 μηνός** (ή λιγότερο αν αντιμετωπιστεί επιτυχώς) και ονομάζονται **συμπτώματα ενεργού φάσης**.

A) Παραληρητικές ιδέες

Β)Ψευδαισθήσεις

Γ)Αποδιοργανωμένη ομιλία

Δ)Βαριά αποδιοργανωμένη ή κατατονική συμπεριφορά

Ε)Αρνητικά συμπτώματα

2)Συνεχή σημεία της διαταραχής επιμένουν **για τουλάχιστον 6 μήνες**. Η συγκεκριμένη περίοδος των 6 μηνών πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 1 μήνα(ή και λιγότερο εάν έχει αντιμετωπιστεί επιτυχώς) συμπτωμάτων ενεργού φάσης και μπορεί επίσης να περιλαμβάνει περιόδους προδρομικών ή υπολειμματικών συμπτωμάτων. Κατά τη διάρκεια αυτών των περιόδων, τα σημεία της διαταραχής μπορεί να εκδηλώνονται μόνο με αρνητικά συμπτώματα ή με δύο ή περισσότερα συμπτώματα που απαριθμούνται παραπάνω και εμφανίζονται με εξασθενημένη μορφή.

3) Για ένα **σημαντικό χρονικό διάστημα από την έναρξη της διαταραχής**, το επίπεδο της λειτουργικότητας σε έναν ή περισσότερους σημαντικούς τομείς, όπως ο επαγγελματικός, οι κοινωνικός ή αυτοεξυπηρέτηση είναι αισθητά χαμηλότερο από το επίπεδο που είχε επιτευχθεί πριν από την έναρξη της διαταραχής (ή όταν η έναρξη της είναι σε παιδική ή εφηβική ηλικία και δεν παρατηρείται το αναμενόμενο επίπεδο κοινωνικότητας, διαπροσωπικών σχέσεων ή ακαδημαϊκής απόδοσης).

4) Σχιζοδιαταραχή και καταθλιπτική ή διπολική διαταραχή με ψυχωτικά χαρακτηριστικά.

5) Η διαταραχή **δεν αποδίδεται στις φυσιολογικές επιδράσεις μιας ουσίας** (π.χ.ναρκωτικών ουσιών, φαρμάκων) ή άλλου ιατρικού λόγου.

6) Εάν υπάρχει **ιστορικό διαταραχής του φάσματος του αυτισμού ή διαταραχής της επικοινωνίας** με έναρξη στην παιδική ηλικία, η πρόσθετη διάγνωση της σχιζοφρένειας τίθεται μόνο εάν εμφανείς παραληρητικές ιδέες ή ψευδαισθήσεις, εκτός από τα άλλα απαιτούμενα συμπτώματα της σχιζοφρένειας, είναι επίσης παρούσες για τουλάχιστον 1 μήνα (ή λιγότερο εάν έχουν υποβληθεί σε επιτυχή θεραπεία).

1.1.1. Αίτια και Παθοφυσιολογία της Σχιζοφρένειας

Τα αίτια και η παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας παραμένουν ακόμη ασαφή. Ωστόσο, η σχιζοφρένεια αποτελεί μια σύνθετη νευροαναπτυξιακή διαταραχή στην οποία έχουν κρίσιμο αντίκτυπο τόσο οι γενετικοί, όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (Lewis et al., 2000). Επιπλέον, **η δυσλειτουργία διαφόρων νευροδιαβιβαστών** όπως η Ντοπαμίνη (DA), το Γλουταμικό (Glu), η Ακετυλοχολίνη (ACh), η Σεροτονίνη (5-HT) και το GABA έχει διαπιστωθεί πως σχετίζονται με την εμφάνισή της (Zoupa & Pitsikas, 2021).

Γενετική Βάση

Η γενετική συμβολή στη σχιζοφρένεια αναγνωρίζεται πλέον ότι είναι σε μεγάλο βαθμό πολυγονιδιακή. Ο σημειακός επιπολασμός της σχιζοφρένειας είναι το ποσοστό του πληθυσμού σε μια χρονική στιγμή που έχει τη διαταραχή και κυμαίνεται στους 5/1000. Ο επιπολασμός φαίνεται να είναι ίσος σε άνδρες και γυναίκες, αν και η έναρξη των συμπτωμάτων εμφανίζεται σε μικρότερη ηλικία στους άνδρες απ' ό,τι στις γυναίκες. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος της νόσου είναι περίπου 10% για έναν συγγενή πρώτου βαθμού και 3% για έναν συγγενή δεύτερου βαθμού. Στην περίπτωση των μονοζυγωτικών διδύμων, ο κίνδυνος ο ένας δίδυμος να πάσχει από σχιζοφρένεια αν ο άλλος έχει τη διαταραχή είναι 48%, ενώ ο κίνδυνος είναι 12% έως 14% στους διζυγωτικούς διδύμους. Αν και οι δύο γονείς πάσχουν από σχιζοφρένεια, ο κίνδυνος να δημιουργήσουν παιδί με σχιζοφρένεια είναι περίπου 40%.

Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Οι παράγοντες της γέννησης και της πρώιμης ζωής έχουν επίσης σημαντικό αιτιολογικό ρόλο, καθώς μπορεί να αυξήσουν τις πιθανότητες εμφάνισης της νόσου. Ορισμένοι από αυτούς σχετίζονται με:

- 1)Αναπτυξιακές ανωμαλίες στην παιδική ηλικία
- 2)Εποχή γέννησης
- 3)Επιπλοκές κατά τη γέννηση
- 4)Ηλικία των γονέων
- 5)Αυτοάνοσα νοσήματα
- 5)Εθνικότητα
- 6)Χρήση κάνναβης
- 7)Αστική κατοικία

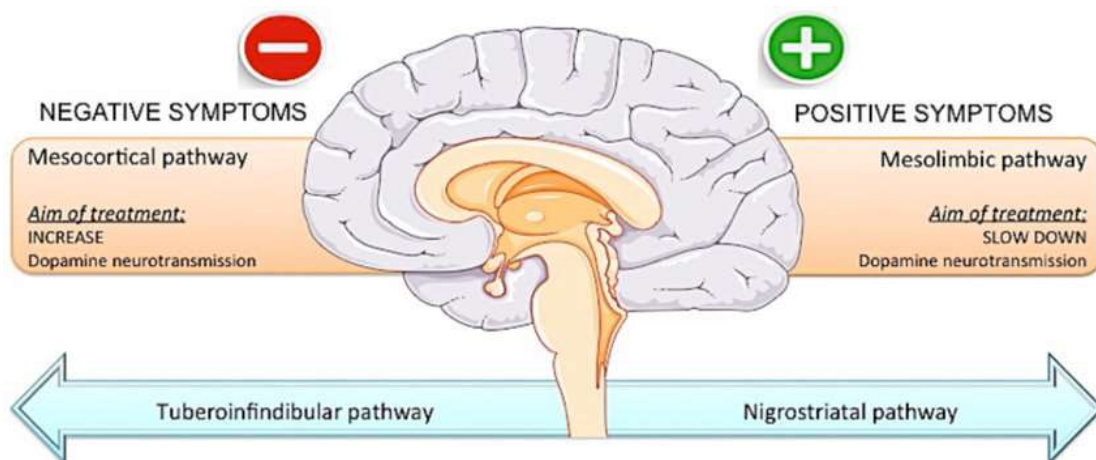
Διαταραχές στη Νευροδιαβίβαση

Ντοπαμινεργική Υπόθεση

Η ντοπαμίνη είναι νευροδιαβιβαστής που ανήκει στην οικογένεια των κατεχολαμινών, παράγεται στην μέλαινα ουσία και στις κοιλιακές τμηματικές περιοχές του εγκεφάλου και οι μεταβολές της σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια.

Η "υπόθεση της ντοπαμίνης" δηλώνει ότι η υπερδραστήρια μετάδοση της ντοπαμίνης οδηγεί σε σχιζοφρενικά συμπτώματα. Ο αποκλεισμός των υποδοχέων της ντοπαμίνης με χλωροπρομαζίνη και αλοπεριδόλη, που προτάθηκε το 1963 από τους Arvid Carlsson και Margit Lindqvist, αποτέλεσε ακρογωνιαίο λίθο στην ψυχιατρική.

- Τα **θετικά** συμπτώματα της σχιζοφρένειας περιλαμβάνουν ψευδαισθήσεις και παραληρητικές ιδέες ως αποτέλεσμα της αυξημένης ντοπαμινεργικής δραστηριότητας της μεσομεταιχμιακής οδού με τελικό αποτέλεσμα **την ενεργοποίηση του υποδοχέα D2 στον επικλινή πυρήνα**, μια δομή του εγκεφάλου που βρίσκεται μέσα στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα. Ο επικλινής πυρήνας θεωρείται το κέντρο ευχαρίστησης του εγκεφάλου για τον πρωταρχικό του ρόλο στη θετική επίδραση και τα συναισθήματα ανταμοιβής.
- Τα **αρνητικά** συμπτώματα της σχιζοφρένειας οφείλονται στη **μειωμένη ενεργοποίηση των υποδοχέων D1 στον προμετωπιαίο φλοιό** και στη μειωμένη δραστηριότητα του πυρήνα του ουραίου σώματος. Οι μεταβολές στους D3 υποδοχείς μπορεί επίσης να εμπλέκονται στα αρνητικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας.



ResearchGate. "Dopaminergic Hypothesis of Schizophrenia." https://www.researchgate.net/figure/Dopaminergic-Hypothesis-of-Schizophrenia-While-hyperactivation-of-the-dopaminergic_fig2_322256052

Εικόνα 3 : Η ντοπαμινεργική υπόθεση της σχιζοφρένειας. Ενώ η υπερενεργοποίηση της ντοπαμινεργικής μεσομεταιχμιακής οδού προκαλεί θετικά συμπτώματα σχιζοφρένειας μέσω αυξημένης διέγερσης των υποδοχέων D2, η υποενεργοποίηση της ντοπαμινεργικής μεσοφλοιώδους οδού προκαλεί αρνητικά και γνωστικά συμπτώματα με μειωμένη ενεργοποίηση των υποδοχέων D1. Το ιδανικό θεραπευτικό σχήμα θα πρέπει να μειώνει την ενεργοποίηση της μεσομεταιχμιακής οδού, ενώ θα πρέπει να αυξάνει τη διέγερση των φλοιωδών περιοχών.

GABAεργική Υπόθεση

Το GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) συντίθεται με αποκαρβοξυλίωση γλουταμικού από την αποκαρβοξυλάση γλουταμινικού οξέος (GAD). Με βάση το μοριακό του βάρος, είναι δυνατό να διακρίνουμε δύο ισότυπους, τον ισότυπο GAD65 των 65 kDa και τον ισότυπο GAD67 των 67 kDa, που εμπλέκονται σε διαφορετικές πτυχές της GABAεργικής νευροδιαβίβασης. Το **GAD65** είναι υπεύθυνο για την ταχεία σύνθεση του GABA σε περιόδους υψηλής συναπτικής ζήτησης. Εντοπίζεται κυρίως στα άκρα του νευράξονα και στις μεμβράνες των συναπτικών κυστιδίων και επομένως σχετίζεται κυρίως με τη συσκευασία και την απελευθέρωση του. Το **GAD67** είναι υπεύθυνο για τα βασικά επίπεδα GABA και την πλειοψηφία της σύνθεσης του, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Τα συγκλίνοντα στοιχεία συνεπάγονται αλλαγές τόσο στα προσυναπτικά όσο και στα μετασυναπτικά συστατικά της νευροδιαβίβασης GABA για να εκπληρώσουν έναν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας. Πολλαπλές ερευνητικές τοποθεσίες που χρησιμοποιούν in situ υβριδισμό, μικροσυστοιχία DNA ή ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο έχουν σταθερά βρει μειωμένα επίπεδα mRNA GAD67 ή μειωμένη πυκνότητα νευρώνων θετικών για GAD67 mRNA στον ραχιοπλευρικό προμετωπιαίο φλοιό (DLPFC) ως ένα από τα πιο συνεπή ευρήματα σε σχέση με παθολογικές αλλαγές στη σχιζοφρένεια.

Σεροτονινεργική υπόθεση

Η χρόνια εκτεταμένη **σεροτονεργική υπερδιέγερση που προκαλείται από το στρες** στον εγκεφαλικό φλοιό στη σχιζοφρένεια, ιδίως στον πρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου (ACC) και στον ραχιαίο μετωπιαίο λοβό, είναι η βασική αιτία της νόσου.

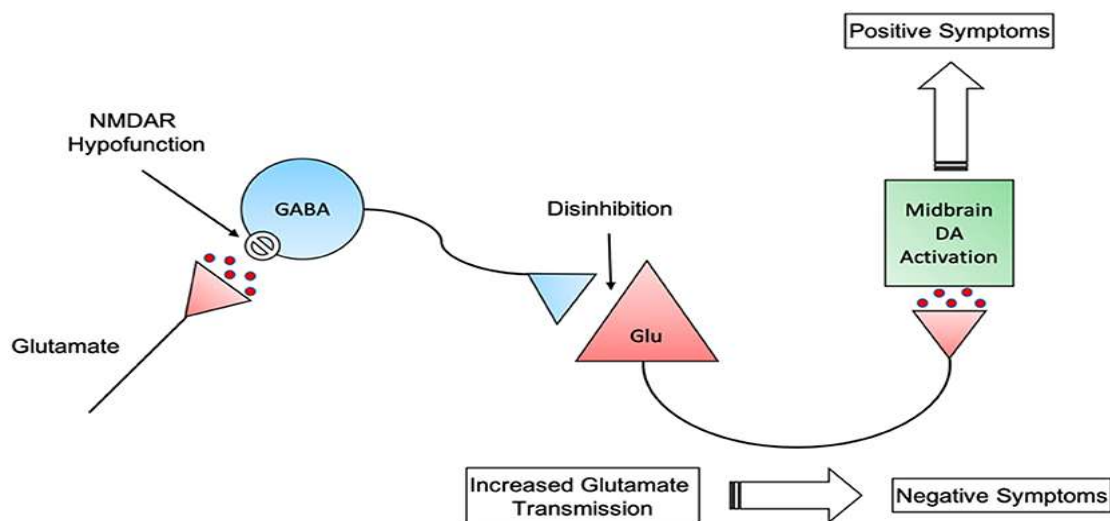
- Υποδοχείς 5-HT1A: Η **αύξηση της πυκνότητας** τους στο PFC είναι μια από τις πιο σταθερές αλλαγές των παραμέτρων 5-HT στη σχιζοφρένεια, όπως προσδιορίζονται σε μεταθανάτιες μελέτες (Bantick et al., 2001; Weinberger and Laruelle, 20).
- Υποδοχείς 5-HT2A: Οι πιο εντατικά ερευνημένοι υποδοχείς 5-HT σε μεταθανάτιες μελέτες σχιζοφρένειας τα τελευταία 30 χρόνια. Δεκατέσσερις από τις δεκαοκτώ μεταθανάτιες μελέτες ανέφεραν ότι βρήκαν **μειωμένη πυκνότητα** υποδοχέα 5-HT2A (ή μειωμένη έκφραση mRNA του υποδοχέα 5-

HT2A) σε περιοχές του φλοιού, ειδικά στον μετωπιαίο φλοιό, ασθενών με σχιζοφρένεια.

Γλουταμινεργική Υπόθεση

Το γλουταμινικό αναγνωρίζεται ως ένας **σημαντικός διεγερτικός νευροδιαβιβαστής** στον εγκέφαλο. Ενεργοποιεί μεταβοτροπικούς (mGlu) υποδοχείς συνδεδεμένους με πρωτεΐνες G και ιοντοτροπικούς υποδοχείς. Οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς χωρίζονται σε τρεις υποτύπους με βάση την ευαισθησία τους σε εκλεκτικούς συνδέτες υψηλής συγγένειας: NMDAR, υποδοχείς α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-ισοξαζολ-4-προπιονικού (AMPA) και υποδοχείς καϊνικού οξέος.

Η σχιζοφρένεια είναι αποτέλεσμα υπολειτουργίας των γλουταμινικών υποδοχέων NMDAR των GABA ενδονευρώνων του φλοιού του εγκεφάλου και συνεπώς του ίδιου του γλουταμινεργικού συστήματος, με επιπτώσεις στη μορφολογία του εγκεφάλου, που προκαλούν δομικές ανωμαλίες και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και ψύχωση. Η υπόθεση του γλουταμινικού της σχιζοφρένειας προτάθηκε αρχικά με βάση την παρατήρηση ότι οι ανταγωνιστές των υποδοχέων NMDA (πχ η κεταμίνη) προκαλούσαν σε υγιή άτομα θετικά και αρνητικά συμπτώματα που έμοιαζαν με τη σχιζοφρένεια (Halberstadt, 1995- Krystal et al., 1994).



Sivaraman, V., Kumaran, S. S., Kumar, V., Siddiq, S., Kotini, A., Pudit, N., & Sharma, P. S. (2021). Investigating potential role of nitric oxide in psychiatry - A narrative review. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 703452. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2021.703452>

Εικόνα 4: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της GABAεργικής αναστολής των γλουταμινεργικών νευρώνων και της επακόλουθης διέγερσης των ντοπαμινεργικών νευρώνων του μέσου εγκεφάλου.

1.2. Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις

1.2.1. Αντιψυχωσικά φάρμακα

Υπολογίζεται ότι το 20-30% των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με σχιζοφρένεια παρουσιάζουν **αντίσταση στη θεραπεία**. Όπως ήδη αναφέραμε, οι περισσότεροι προδρομικοί ασθενείς δεν λαμβάνουν καμία ή πολύ σύντομη, αν λαμβάνουν, αντιψυχωσική αγωγή, λόγω ανησυχιών για την ασφάλεια. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει εγκεκριμένη φαρμακευτική αγωγή για τη σχιζοφρένεια, αλλά έχουν καταγραφεί αρκετές περιπτώσεις αντιψυχωσικών φαρμάκων που συνέβαλαν στην καταπολέμηση αρκετών από των συμπτωμάτων της ασθένειας. Ωστόσο, η ανάπτυξη στρατηγικής έγκαιρης διάγνωσης και παρέμβασης είναι πολύ σημαντική.

α) Τα αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς

Γνωστά και ως "τυπικά αντιψυχωσικά", αυτά τα φάρμακα ήταν τα πρώτα είδη φαρμάκων που αναπτύχθηκαν για τη θεραπεία της ψύχωσης, ενώ τα περισσότερα δεν χρησιμοποιούνται σήμερα για τον σκοπό αυτό. Ο μηχανισμός τους περιλαμβάνει τον ανταγωνισμό αποκλειστικά των υποδοχέων D2 της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο και ανακουφίζουν **μόνο τα θετικά συμπτώματα**. Ωστόσο, δημιουργούν πολυάριθμες μη ανεκτές παρενέργειες, όπως παρκινσονισμό (συμπεριλαμβανομένου του τρόμου, της ακαμψίας, της βραδυκινησίας), ακαθυσία, δυστονία και υπερπρολακτιναιμία. Παραδείγματα αποτελούν η χλωροπρομαζίνη, φλουφαιναζίνη, αλοπεριδόλη.

β) Τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς

Γνωστά και ως "άτυπα αντιψυχωσικά", αποτελούν τώρα τα κύρια φάρμακα για τη θεραπεία της ψύχωσης, επειδή έχουν λιγότερες παρενέργειες. Στοχεύουν τόσο στους υποδοχείς της ντοπαμίνης D2 με μέτριο έως υψηλό ανταγωνισμό όσο και στους υποδοχείς της σεροτονίνης 5HT2A με υψηλό ανταγωνισμό και έχει προταθεί ότι υπερτερούν των συμβατικών παραγόντων όσον αφορά την αποτελεσματικότητα για τα θετικά συμπτώματα και **ίσως για τα αρνητικά συμπτώματα**. Δυστυχώς, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών είναι ανθεκτικοί ή ανταποκρίνονται μόνο εν μέρει στα διαθέσιμα φάρμακα. Επιπλέον, το προφίλ παρενεργειών των αντιψυχωσικών δεύτερης γενιάς, όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερλιπιδαιμία, το μεταβολικό σύνδρομο και ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος, περιορίζουν την κλινική τους χρήση και η μακροχρόνια χρήση αντιψυχωσικών σχετίζεται με γνωστική εξασθένηση. Κάποια

βασικά παραδείγματα, αποτελούν η ιλοπεριδόνη, η λουματεπερόνη, κλοζαπίνη, ρισπεριδόνη και η ολανζαπίνη.

γ)Τα αντιψυχωσικά τρίτης γενιάς

Τα φάρμακα αυτά παρουσιάζουν χαμηλό-μερικό ανταγωνισμό των D2 και υψηλό ανταγωνισμό των 5-HT_{2A} υποδοχέων. Βασικά παραδείγματα αντιψυχωσικών τρίτης γενιάς αποτελούν η αριπιπραζόλη, που μπορεί να συνδυαστεί με την κλοζαπίνη λόγω των διαφορετικών φαρμακοδυναμικών προφίλ, τα οποία φαίνεται να αλληλοσυμπληρώνονται. Επίσης, η βρεξπιπραζόλη θα μπορούσε να προστεθεί στην κλοζαπίνη λόγω του διαφορετικού προφίλ πρόσδεσής της στους υποδοχείς και του χαμηλότερου κινδύνου φαρμακοκινητικών αλληλεπιδράσεων και τέλος η καριπραζίνη μπορεί να μειώσει τα αρνητικά συμπτώματα σε ασθενείς με σχιζοφρένεια που δεν ανταποκρίνονται σε άλλα άτυπα αντιψυχωσικά.

Ο μερικός ανταγωνισμός προς τους D2 υποδοχείς προσφέρει **τουλάχιστον τρία δυνητικά πλεονεκτήματα** σε σύγκριση με τους παραδοσιακής προσέγγισης ανταγωνιστές:

i) Σε περιπτώσεις μεσομεταιχμιακής ντοπαμινεργικής υπερδραστηριότητας που συνδέεται με θετικά συμπτώματα, ο μερικός αγωνιστής ανταγωνίζεται την ντοπαμίνη για τους υποδοχείς. Αυτός ο ανταγωνισμός εκτοπίζει την ντοπαμίνη, μειώνοντας την υπερβολική δραστηριότητα του συστήματος και επαναφέροντάς το σε ένα "φυσιολογικό εύρος".

ii)Οι επιδράσεις του μερικού αγωνιστή δεν περιλαμβάνουν συνήθως σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως εξωπυραμидικά συμπτώματα ή υπερπρολακτιναιμία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η εγγενής δραστηριότητα του μορίου αποτρέπει τη σημαντική μείωση της ντοπαμινεργικής λειτουργικότητας σε επίπεδο ραβδωτού σώματος και υπόφυσης.

iii)Λόγω των εγγενών δραστηριοτήτων τους, οι μερικοί αγωνιστές μπορούν να ενισχύσουν την εξασθενημένη ντοπαμινεργική μετάδοση στον προμετωπιαίο φλοιό. Αυτή η ενίσχυση θα μπορούσε να βελτιώσει τις γνωστικές δυσλειτουργίες και τα συμπτώματα που συνδέονται με τη μειωμένη ντοπαμινεργική λειτουργικότητα.

1.3.Μονοξείδιο του αζώτου (NO)

Το 1987 έγινε η εντυπωσιακή ανακάλυψη ότι το μικρό δραστικό ριζικό μόριο του μονοξειδίου του αζώτου (-NO) παράγεται ειδικά και λειτουργεί ως σημαντικός αγγelioφόρος στο καρδιαγγειακό σύστημα των θηλαστικών. Το -NO έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

A)Είναι ρίζα (περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο).

B) Έχει πολύ σύντομη περίοδο ημιζωής - μερικά δευτερόλεπτα σε υδατικό μέσο. Ωστόσο, τοποθετημένο σε αναερόβιες συνθήκες, η ρίζα αυτή δεν διασπάται για περισσότερο από 15s.

Γ) Αντιδρά με αξιοσημείωτους ρυθμούς με δύο μόνο μοριακούς στόχους, τα μόρια που διαθέτουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και τα μέταλλα μετάπτωσης.

Δ) Η χημεία του -NO κυριαρχείται από αντιδράσεις οξειδωσης-αναγωγής, οι οποίες μπορούν να παράγουν άλλα είδη οξειδίων του αζώτου με πολύ μεγαλύτερη αντιδραστικότητα από το ίδιο το -NO.

E) Είναι εξαιρετικά διαχυτό στο βιολογικό περιβάλλον και κινείται μέσα στα κύτταρα, επιτρέποντάς το να δράσει σε έναν άφθονο όγκο και περιορίζεται μόνο από την απορρόπηση ή την αποικοδόμηση.

ΣΤ) Εμπλέκεται στη ρύθμιση της απελευθέρωσης διαφορετικών νευροδιαβιβαστών: Συγκεκριμένα, διεγείρει την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο και στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα, όχι άμεσα, αλλά μέσω της διέγερσης των παρακείμενων γλουταμινεργικών νευρώνων. Οι βασικές συγκεντρώσεις NO μειώνουν και τα υψηλά επίπεδα αυξάνουν, την εκροή GABA σε διεργασίες που εξαρτώνται από το ασβέστιο και το νάτριο.

1.3.1.Σύνθεση NO και σηματοδότηση

Σύνθεση NO

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) απελευθερώνεται κατά τη μετατροπή της L- αργινίνης σε L-κιτρουλίνη υπό την επίδραση της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) (Ghafourifar and Cadenas, 2005). Η αντίδραση εξελίσσεται παρουσία οξυγόνου (O₂), NADPH, φλαβινικού μονονουκλεοτιδίου (FMN), καθώς και αίμης, θειόλης και τετραϋδροβιοπτερίνης ως συμπαράγοντες (Akyol et al., 2004- Giralddi-Guimarães, 2004).

Συνθάση του NO

Το **NOS, δηλαδή η συνθάση του NO** είναι το ένζυμο που απαιτείται για τη σύνθεση του και έχουν αναγνωριστεί τρεις ισομορφές του που κωδικοποιούνται σε διαφορετικά γονίδια:

- 1) νευρωνικό NOS (NOS, NOS τύπου I) που βρίσκεται σε νευρωνικό ιστό
 - 2) επαγωγίσιμη NOS (iNOS, NOS τύπου II) του οποίου η σύνθεση επάγεται από προφλεγμονώδεις παράγοντες (κυτταροκίνες ή ενδοτοξίνη)
 - 3) ενδοθηλιακά NOS (eNOS, NOS τύπου III), που εκφράζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα
- Τα NOS και eNOS εκφράζονται συστατικά και απαιτούν ασβέστιο (Ca) και καλμοδουλίνη για τη λειτουργία τους ενώ η δραστηριότητα του iNOS είναι ανεξάρτητη από αυτά.



Lancaster, J. R. Jr. (2021). Nitric oxide: Introduction - Synthesis and biological significance. University of Reading. <https://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/no/synthesis.htm>

Εικόνα 5: Διαδικασία σύνθεσης του NO από τους διάφορους τύπους συνθασών.

Σηματοδότηση μέσω NO

Αφού συντεθεί το NO, συμμετέχει στον μεταβολισμό μέσω τριών σηματοδοτικών μονοπατιών, οδηγώντας κάθε φορά στην ενεργοποίηση διαφορετικών μορίων-στόχων και στην εκτέλεση διαφορετικών λειτουργιών.

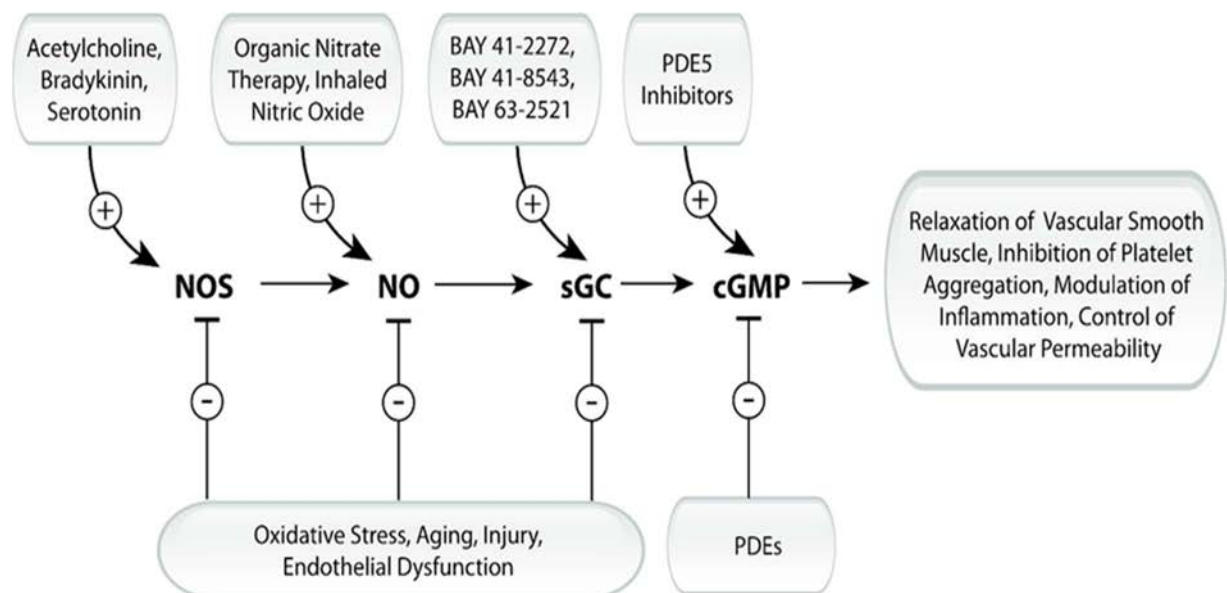
Α) Σηματοδότηση μέσω της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης (sGC)

Η διαλυτή γουανυλική κυκλάση (sGC), απαιτείται για τις περισσότερες επιδράσεις του NO. Όταν το NO δεσμεύεται σε μια ομάδα αίμης στο ένζυμο αυτό, η sGC ενεργοποιείται και παράγεται κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP).

Το cGMP στη συνέχεια ενεργοποιεί:

- μια εξαρτώμενη από cGMP πρωτεϊνική κινάση (PKG), η οποία φωσφορυλιώνει διαφορετικές πρωτεΐνες.
- άμεση ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών, όπως η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP)-εξαρτώμενη κινάση (PKA).

Η διάσπαση του cGMP από τη φωσφοδιεστεράση τερματίζει τη NO/sGC σηματοδότηση. Επομένως, όπως πολλοί συμβατικοί νευροδιαβιβαστές, το NO δρα μέσω δεύτερου αγγελιοφόρου και ενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν τους μεταγραφικούς παράγοντες και την πρωτεϊνοσύνθεση.



ResearchGate. "NO-sGC-cGMP Pathway." https://www.researchgate.net/figure/NO-sGC-cGMP-pathway-Agonists-such-as-acetylcholine-bradykinin-and-serotonin-encourage_fig1_236083742

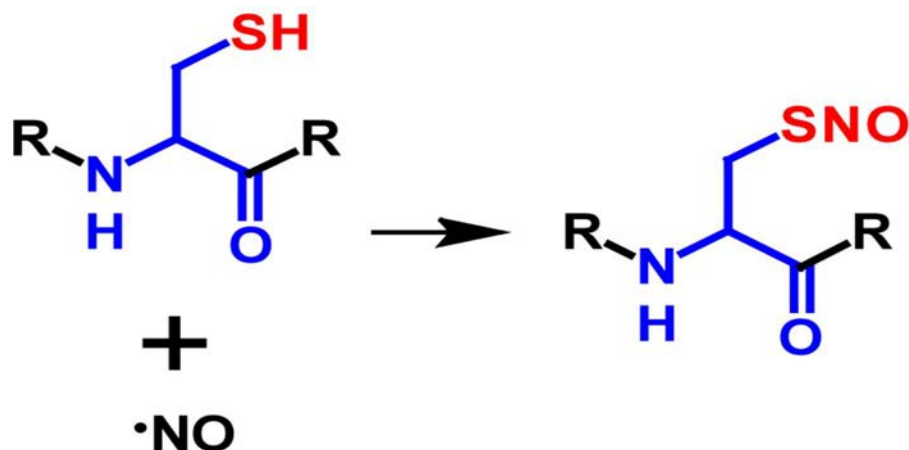
Εικόνα 6: Οδός NO-sGC-cGMP. Οι αγωνιστές όπως η ακετυλοχολίνη, η βραδυκίνη και η σεροτονίνη ενθαρρύνουν την παραγωγή μονοξειδίου NO μέσω της NOS. Η θεραπεία με οργανικά νιτρικά άλατα και το εισπνεόμενο NO μπορούν να διεγείρουν την sGC όταν το τμήμα αίμης της βρίσκεται σε μειωμένη (σιδηρούχα) κατάσταση. Οι νέοι μη NO-εξαρτώμενοι διεγέρτες της sGC μπορούν να αυξήσουν τη δραστηριότητα της sGC. Η ενεργοποιημένη sGC διεγείρει την παραγωγή του cGMP, το οποίο μέσω μεταγενέστερων μηχανισμών προκαλεί χαλάρωση του αγγειακού λείου μυός, αναστολή της συσώρευσης αιμοπεταλίων, διαμόρφωση της φλεγμονής και έλεγχο της αγγειακής διαπερατότητας. Η οξείδωση του τμήματος αίμης στην sGC από το στρες, τη γήρανση, τον τραυματισμό και την ανάπτυξη ανοχής από τα οργανικά νιτρικά μειώνει την ενεργοποίηση της sGC. Οι PDEs φωσφοριεστεράσες διασπούν το cGMP, ενώ οι αναστολείς της PDEs αποτρέπουν τη διάσπαση του.

Ωστόσο, η sGC μπορεί να μην είναι ο μόνος φυσιολογικός στόχος για τις βιολογικές επιδράσεις του NO και έχουν περιγραφεί εναλλακτικοί μηχανισμοί ανεξάρτητοι από sGC. Ορισμένοι από αυτούς είναι:

B) S-νιτροσυλίωση πρωτεϊνών

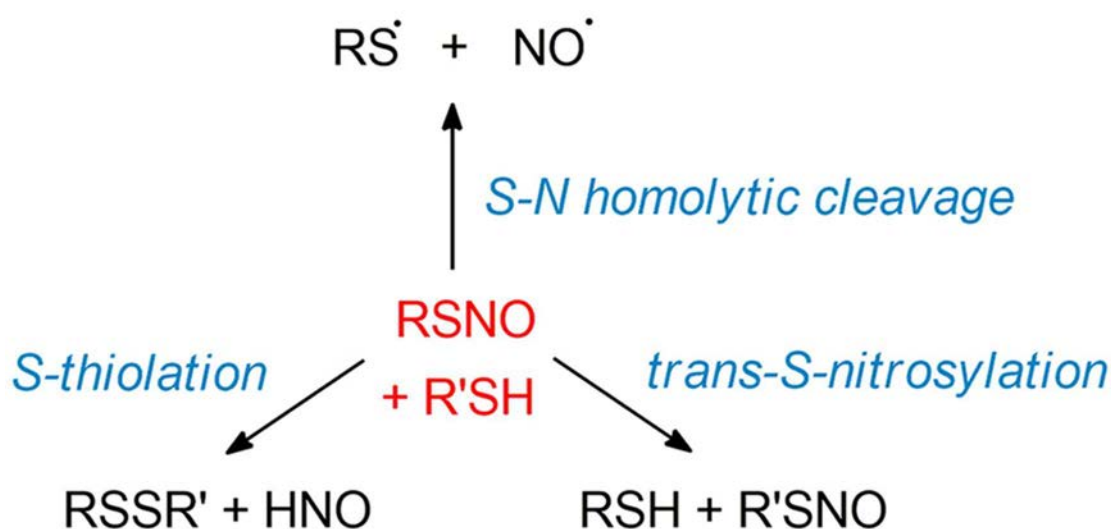
Η S-νιτροσυλίωση είναι μια ταχέως αναστρέψιμη και επακριβώς στοχευμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, κατά την οποία το μονοξείδιο του αζώτου (NO) συνδέεται ομοιοπολικά με μια ομάδα θειόλης μιας πρωτεϊνικής κυστεΐνης (S-NO). Μέχρι σήμερα έχει αποδειχθεί ότι περίπου 1000 πρωτεΐνες τροποποιούνται με S-νιτροσυλίωση (Stamler & Hess, 2010), η οποία ασκεί βαθιές επιδράσεις στην κυτταρική σηματοδότηση και τη συνολική απόκριση στο μικροπεριβάλλον (Foster, Hess, & Stamler, 2009). Τα αποτελέσματα της τροποποίησης αυτής, περιλαμβάνουν

την σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η S-νιτροσυλίωση φαίνεται να εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, διαβήτη, και διάφορες νευροεκφυλιστικές, καρδιαγγειακές, μυϊκές ή αναπνευστικές παθήσεις.



Protpi Blog. "S-Nitrosylation." <https://www.protpi.ch/blog/bioinformatics/2022/05/s-nitrosylation/>

Εικόνα 7: Μηχανισμός της S-νιτροσυλίωσης. Πρώτον, μια θειόλη ενός υπολείμματος κυστεΐνης αποπρωτονιώνεται. Στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο άλας αντιδρά με ένα μόριο NO με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας S-νιτροσθειόλης (RSNO).



ResearchGate. "SNO Reactivity." https://www.researchgate.net/figure/SNO-reactivity-We-here-illustrated-the-main-reactions-involving-RSNOs-Top-homolytic_fig5_327018660

Εικόνα 8: Αντιδραστικότητα SNO: Κύριες αντιδράσεις που αφορούν τα RSNOs. Επάνω: **ομολυτική διάσπαση** του δεσμού S-N, η οποία συνίσταται στην απώλεια οξειδίου του αζώτου με ένα εναπομείναν είδος ρίζας Θείου. Αριστερά: **S-θειοποίηση** μεταξύ RSNO και μιας θειόλης R'SH, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας δισουλφιδικής γέφυρας RSSR' και μιας νιτροξυλικής μονάδας HNO. Δεξιά: Διαδικασία **S-τρανσνιτροσυλίωσης** που προκαλεί τη μεταφορά NO από RSNO σε θειόλη R'SH.

1.3.2. Νευροπροστασία και Νευροτοξικότητα του NO

Το NO, όντας ένας αέριος νευροδιαβιβαστής που διαχέεται μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών, έχει διττό ρόλο, τόσο νευροπροστατευτικό, όσο και νευροτοξικό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις συμβάλλει στην επίτευξη βασικών και φυσιολογικών λειτουργιών εντός των κυττάρων, όπως διαστολή αιμοφόρων αγγείων, αύξηση της παροχής αίματος και ελάττωση της αρτηριακής πίεσης. Σε υψηλές, τοξικές συγκεντρώσεις παράγει δραστικές ρίζες αζώτου που οξειδώνουν βιομόρια και συμμετέχει στην κυκλοφορική ανεπάρκεια που λαμβάνει χώρα σε συστηματικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις και μπορεί να είναι κυτταροτοξική για τους περιβάλλοντες ιστούς.

Νευροπροστατευτική δράση του NO

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παρέχει νευροπροστασία μέσω διάφορων μηχανισμών.

α) S-νιτροσυλίωση κασπάσης 3 και υπομονάδων NR1, NR2

Το NO **S-νιτροσυλώνει** την κασπάση 3 και τις υπομονάδες NR1 και NR2 του υποδοχέα NMDA. Το αποτέλεσμα αυτών των αντιδράσεων αποτελεί η αναστολή της εισροής Ca^{2+} μέσω των NMDARs και της δραστηριότητας της κασπάσης 3, οδηγώντας σε μείωση του κυτταρικού θανάτου.

β) Επίδραση του NO στην οδό sGC- cGMP- PKG

Διεγείρει τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση (sGC)-κυκλική GMP (cGMP)-πρωτεϊνικής κινάσης G (PKG). Στόχος αποτελεί το NO να ενεργοποιήσει την CREB (cyclic-AMP-responsive-element-binding protein) και την Akt, δύο πρωτεΐνες που εμπλέκονται κυρίως στη νευροπροστασία.

γ) Επίδραση του NO στην οξυγενάση της αίμης-1 (HO-1)

Το NO **επάγει** τη δραστηριότητα της αιμοξυγενάσης 1 (HO-1), η οποία παράγει μια πρόδρομη ουσία του ισχυρού αντιοξειδωτικού και αντινιτροποιητικού μορίου της χολερυθρίνης. Η HO-1 επάγεται από πολλά ερεθίσματα, όπως η υπεροξία, η υποξία, ο LPS και το οξειδωτικό στρες.

Νευροτοξικότητα του NO

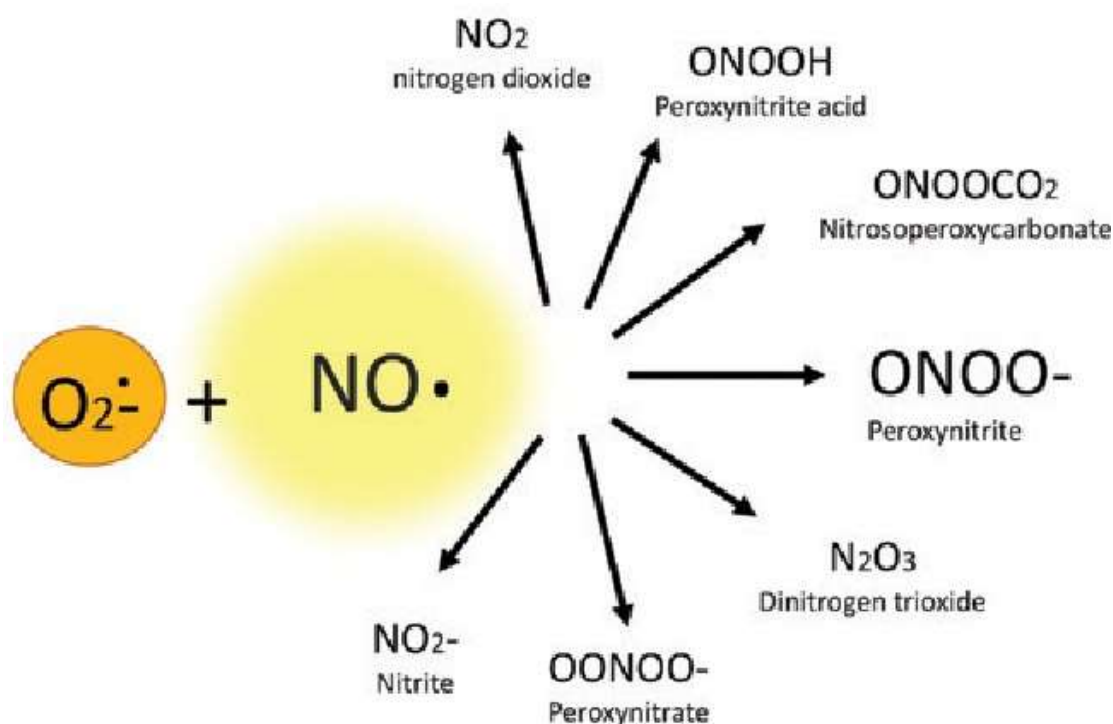
Οι υψηλές συγκεντρώσεις NO μεσολαβούν στη νευροτοξικότητα του και μπορούν να προκαλέσουν νευρικό θάνατο μέσω:

Α) οξειδωτικού στρες

Β) παραγωγής αντιδραστικών ενδιάμεσων προϊόντων οξυγόνου

Γ) εξασθένησης των αντιοξειδωτικών συστημάτων

Το NO φαίνεται να εμπλέκεται στον νευροεκφυλισμό μέσω μιας μη ενζυμικής αντίδρασης με το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), σχηματίζοντας **υπεροξυνιτρώδη ($ONOO^{\cdot-}$)**, έναν ιδιαίτερα αντιδραστικό και ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα.



Semanticscholar. "Dr. NO and Mr. Toxic – the versatile role of nitric oxide in the nucleus accumbens." <https://www.semanticscholar.org/paper/Dr.-NO-and-Mr.-Toxic-%E2%80%93-the-versatile-role-of-nitric-Porrini-Ramaraao/a664bd7b0d8e3b8f4bb09f8a2d94e99c0b3bd973>

Εικόνα 9: Σχηματισμός δραστικών ριζών αζώτου (RNS). Όταν υπάρχουν NO και υπεροξείδιο, μπορούν να αντιδράσουν για να δημιουργήσουν $ONOO^{\cdot-}$ που είναι ιδιαίτερα δραστικά. Από την άλλη πλευρά, το NO, το υπεροξείδιο και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2) σχηματίζουν τριοξείδιο του διναζώτου (N_2O_3) και υπεροξυνιτρικό άλας ($NO_4^{\cdot-}$). Το υπεροξυνιτρικό διασπάται δίνοντας νιτρώδη και οξυγόνο. Συνολικά, πρόκειται για ισχυρούς νιτρωτικούς και οξειδωτικούς παράγοντες που μπορούν να δράσουν σε πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα.

1.3.3. Μονοξείδιο του αζώτου (NO) και Σχιζοφρένεια

Το NO μπορεί να εμπλέκεται στη σχιζοφρένεια με:

Α) την ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA

Β) τις αλληλεπιδράσεις με τα ντοπαμινεργικά και σεροτονινεργικά συστήματα

Η μη φυσιολογική λειτουργία αυτών των δύο συστημάτων απασχολεί την επιστημονική κοινότητα σχετικά με τον ρόλο της στην παθογένεια της σχιζοφρένειας, όπου είτε υψηλές είτε χαμηλές συγκεντρώσεις ΝΟ παρατηρούνται και **η πραγματική κατεύθυνση των ανωμαλιών δεν είναι ακόμη σαφής.**

Γενετικές μελέτες

Οι γενετικές μελέτες υποδηλώνουν ότι **οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της NOS** πιθανώς συνδέονται με τη σχιζοφρένεια και λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού (PFC). Στο πλαίσιο αυτό, έχει αναφερθεί ότι και οι NOS θετικοί ραβδωτοί ενδονευρώνες μειώνονται στη σχιζοφρένεια.

Πολυμορφισμοί του γονιδίου NOS1

Το ΝΟ συντίθεται κυρίως από τη νευρωνική συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS1) στον εγκέφαλο και ο γονιδιακός τόπος του, 12q24.2, έχει προσελκύσει μεγάλη προσοχή ως σημαντική περιοχή σύνδεσης για τη σχιζοφρένεια. Οι γενετικές παραλλαγές της NOS1 έχουν επίσης συσχετιστεί με τη σχιζοφρένεια και παρατηρήθηκε διαφορική έκφραση της NOS1 στον μεταθανάτιο εγκέφαλο σχιζοφρενών ασθενών.

1) Ένας υποτιθέμενος cis-ενεργός πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου G-84A (SNP; rs41279104) στην περιοχή υποκινητή του εξονίου 1c του γονιδίου NOS1 σχετίζεται με τα επίπεδα ανοσοαντιδραστικότητας του NOS1 σε μεταθανάτια δείγματα προμετωπιαίου φλοιού, ανεξάρτητα από τον φαινότυπο της νόσου.

2) Οι Reif et al (2006, 2009) βρήκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ δύο πολυμορφισμών στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου NOS1 (ένας VNTR και rs41279104) και της σχιζοφρένειας.

3) Μια μελέτη συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος εντόπισε SNP (rs6490121) στο ιντρόνιο 2 ως ένα από τα πιο σημαντικά SNPs που εμφάνισαν συσχετίσεις με την σχιζοφρένεια.

Ιστοχημικές μελέτες

Οι μελέτες αυτές ανέφεραν μια **ανώμαλη κατανομή** των νιτροεργικών νευρώνων στους μετωπιαίους και κροταφικούς λοβούς των σχιζοφρενών, στους οποίους το φυσιολογικό μοτίβο της νευρωνικής μετανάστευσης στον αναπτυσσόμενο εγκεφαλικό φλοιό μπορεί κατά κάποιο τρόπο να διαταράσσεται. Υψηλά επίπεδα ΝΟ στο PFC και στο ραβδωτό σώμα σχιζοφρενών έχουν βρεθεί σε μεταθανάτιες μελέτες.

Τα επίπεδα NO είναι επίσης υψηλά στα ερυθρά αιμοσφαίρια στους ασθενείς με σχιζοφρένεια.

Βιοχημικές μελέτες

Τα βιοχημικά ευρήματα φαίνεται να προτείνουν ένα ρόλο του NO στη σχιζοφρένεια. Υψηλά επίπεδα μεταβολιτών του NO, όπως νιτρώδη και νιτρικά, έχουν αναφερθεί στο πλάσμα και στον ορό των σχιζοφρενών. Η επιδείνωση της ακεραιότητας της συναπτικής συνδεσμολογίας του εγκεφάλου και η δυσλειτουργία διαφόρων νευροδιαβιβαστών είναι συχνές στη σχιζοφρένεια, οπότε αυτές οι αυξημένες συγκεντρώσεις NO ενδέχεται να διαταράσσουν εν μέρει τη νευροκυκλοφορία. Τέλος, η νευρωνική βλάβη, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η μη φυσιολογική νευροδιαβίβαση με τη μεσολάβηση γλουταμινικού και η μικρογλοιακή φλεγμονή έχουν συσχετιστεί με υψηλά επίπεδα NO. Συνεπώς, η μείωση της δραστηριότητας της NOS στη σχιζοφρένεια μπορεί να είναι ευεργετική, οπότε οι αναστολείς της NOS που μειώνουν αυτή τη δραστηριότητα μπορεί να είναι υποψήφιοι για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας.

1.3.4. Αναστολείς της NOS

Οι αναστολείς της NOS εμποδίζουν τη βιολογική δράση του NO, διαφέροντας σε μεγάλο βαθμό ως προς την ισχύ και την επιλεκτικότητα των ισομορφών.

1) **Τα γουανιδινο-υποκατεστημένα ανάλογα της L-αργινίνης** (π.χ. L-NMMA (μονομεθυλαργινίνη), L-N^o νιτροαργινίνη και ο μεθυλεστέρας της, L-NOARG και L-NAME) αναστέλλουν έντονα τη NOS in vitro και in vivo, αλλά αυτή η κατηγορία ενώσεων παρουσιάζει μικρή εκλεκτικότητα έναντι των διακριτών ισομορφών της.

2) **Τα παράγωγα αμινοξέων** μπορούν επίσης να μπλοκάρουν το NOS. Δύο αρκετά ισχυροί αναστολείς της NOS είναι η L-N-ιμινοαίθυλο-λορνιθίνη (L-NIO) που παρουσιάζει κάποια συγγένεια για την eNOS και η L-N6-ιμινοαιθυλολυσίνη (L-NIL) που είναι σχετικά εκλεκτική για την iNOS.

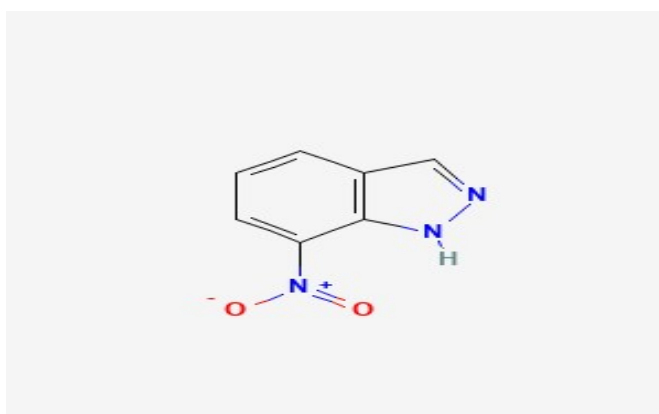
3) **Υποκατεστημένες ενώσεις κιτρουλίνης**, όπως η θειοκιτρουλίνη και οι αλκυλοθειοκιτρουλίνες (π.χ. S-μεθυλ και S-αιθυλθειοκιτρουλίνη, SMTC και SETC).

4) **Ορισμένες ετεροκυκλικές ενώσεις** με διαφορετική χημική φύση. Υπάρχει η ομάδα **νιτροϊνδαζόλης των συγχωνευμένων ετεροκυκλών** [π.χ. 7-NI (7-nitroindazole), L-NPA (N^o-propyl-L-arginine), 3-bromo-7-nitroindazole και 2,7-dinitroindazole] και το ιμιδαζόλιο με τα υποκατεστημένα παράγωγά του [π.χ. TRIM (1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole)], που αναστέλλουν ισχυρά τη NOS. Η αμινογουανιδίνη, η 1400W (3-αμινο-μεθυλο-βενζυλακεταμιδίνη) και ορισμένες S-αλκυλιωμένες ισο-θειουρίες αναστέλλουν επιλεκτικά την ισομορφή iNOS.

Φαρμακολογικές δράσεις των αναστολέων της NOS

Οι μη εκλεκτικοί αναστολείς και οι αναστολείς της eNOS εμποδίζουν την eNOS, μειώνοντας την ενδοθηλιακή αγγειοδιαστολή και αυξάνοντας την αρτηριακή πίεση. Οι αναστολείς της iNOS αυξάνουν την αρτηριακή πίεση σε σηπτικό σοκ και οι αναστολείς της NOS έχουν αναλγητική δράση και μπορούν επίσης να μειώσουν το μέγεθος του εμφράγματος σε ζωικά μοντέλα εστιακής ισχαιμίας και έχουν νευροπροστατευτική δράση σε ζωικά μοντέλα της νόσου Parkinson και της νόσου Alzheimer.

7-NI



PubChem (no date) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Εικόνα 10: Δομή μορίου 7-NI.

Η 7-NI είναι εκλεκτικός **αναστολέας της νευρωνικής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (nNOS)** που δρα αναλγητικά χωρίς να αυξάνει την αρτηριακή πίεση. Πρόκειται για μια ετεροκυκλική ένωση, η οποία αναστέλλει την NOS ανταγωνιζόμενη τόσο την L-αργινίνη όσο και την τετραϋδροβιοπτερίνη και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως εκλεκτικός αναστολέας. Υπάρχει ένας αριθμός μελετών που δείχνουν την ευεργετική επίδραση της αναστολής της δραστηριότητας της NOS ως μέσο μείωσης της επαγόμενης από NO/NMDA νευροτοξικότητας και την άμβλυνση της ανοχής και της απόσυρσης από ψυχοδραστικούς παράγοντες.

1.3.5. Αναστολείς της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και Σχιζοφρένεια

Το NO όπως αναφέρθηκε εμπλέκεται στην αποθήκευση, πρόσληψη και απελευθέρωση μεσολαβητών και νευροδιαβιβαστών, καθώς και στην υπεροξειδωση και το αντιδραστικό οξειδωτικό στρες. Οι έρευνες αποκαλύπτουν σημαντικές διαταραχές στα επίπεδα του NO στις δομές του εγκεφάλου (παρεγκεφαλίδα, υποθάλαμος, ιππόκαμπος, ραβδωτό σώμα) και στα υγρά των ατόμων με σχιζοφρένεια. Δεδομένου του ρόλου του NO στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, οι μεταβολές αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε νευροαναπτυξιακές μεταβολές που σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια. Συνεπώς γίνεται αντιληπτή μια σύνδεση των ενώσεων που αναστέλλουν την παραγωγή του NO και της δυσμενούς αυτής νόσου.

Οργανισμός μοντέλο	Φάρμακο	Δοσολογία (mg/kg)	Οδός Χορήγησης	Συμπεριφορική τεχνική	Αποτελέσματα	Πηγή
Ποντίκι	7-NI MK-801	100mg/kg 1 mg/kg	Ενδοπεριτοναϊκή, οξεία	Κινητική δραστηριότητα	Ανταγωνισμός της υπερκινητικότητας της MK-801	Deutsch, S. et al, 1996
Αρουραίος	7-NI Φαινκυκλιδίνη (PCP)	10 mg/kg 3mg/kg	Ενδοπεριτοναϊκή, οξεία Υποδόρια, οξεία	PPI	Μείωση των ελλειμμάτων προσοχής που προκαλούνται από PCP	Wiley et al, 1998
Αρουραίος	7-NI 7-NI Μεθυλφαινιδάτη	3,10,30, 60 mg/kg 5 00 mg/kg 30 mg/kg	Ενδοπεριτοναϊκή, οξεία	PPI	Αντιστροφή των ελλειμμάτων προσοχής που προκαλούνται από τη μεθυλφαινιδάτη	Palson et al, 2010
Αρουραίος	7-NI απομορφίνη	0.3,1 mg/kg 1 mg/kg	Ενδοπεριτοναϊκή, οξεία	NORT	Αντιστροφή των προκαλούμενων από την απομορφίνη ελλειμμάτων αναγνωριστικής μνήμης	Pitsikas et al, 2012
Ποντίκι	7-NI απομορφίνη	3.6 mg/kg 1 mg/kg	Ενδοπεριτοναϊκή, οξεία Υποδόρια, οξεία	Στερεοτυπίες Αναρρίχησης	Άμβλυνση των προκαλούμενων από την απομορφίνη στερεοτυπιών και της αναρρίχησης	Pereira et al, 2011

Πίνακας 1: Αποτελέσματα προκλινικών μελετών για τη δράση της 7-NI σε πειραματικά πρότυπα σχιζοφρένειας. Η 7-NI είναι ικανή να αντιμετωπίσει τις ψυχοσεομιμητικές συμπεριφορές που προκαλούνται από τους ανταγωνιστές του NMDA υποδοχέα MK-801 και PCP, καθώς και του αγωνιστή του D1/D2 ντοπαμινεργικού υποδοχέα απομορφίνη στους επίμυες. Δυστυχώς, μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί αν η 7-NI μπορεί να αντιμετωπίσει τα αρνητικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας.

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας, αποτελεί η **διερεύνηση της ικανότητας του αναστολέα της NOS 7-NI, να ανταγωνιστεί τα προκαλούμενα από την κεταμίνη και την MK-801 συμπτώματα, όπως η κοινωνική απόσυρση και τα ελλείμματα της αναγνωριστικής και συναισθηματικής μνήμης**. Επίσης, μελετήθηκε αν η συγχορήγηση αδρανών δόσεων 7-NI και άτυπου αντιψυχωσικού κλοζαπίνης, μπορούν να ανταγωνιστούν γνωσιακά ελλείμματα που προκαλούνται από την κεταμίνη. Οι πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν σε προκλινικά πρότυπα που αντανάκλουν αρνητικά συμπτώματα και γνωσιακά ελλείμματα της σχιζοφρένειας, θα αναλυθούν στη συνέχεια.

2.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1. Πειραματόζωα

Για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί αλφικοί επίμυες, του γένους Wistar rat (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ), ηλικίας 3 μηνών και βάρους 250-300 g (Εικόνα).

Οι επίμυες ήταν τοποθετημένοι ανά τριάδες σε κλουβιά διαστάσεων 47,5 cm μήκος x 20,5 cm ύψος x 27 cm πλάτος, τα οποία ήταν κατασκευασμένα από πολυανθρακικό (Makrolon). Οι επίμυες είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε φαγητό και νερό. Τα κλουβιά τους είχαν τοποθετηθεί σε ειδικό κλιματιζόμενο δωμάτιο, με **ελεγχόμενη θερμοκρασία** του εύρους 21 ± 1 °C και 50-55% υγρασία. Τέλος, υπήρχε ρυθμιζόμενος κύκλος φωτός/σκότους (12 h φως/12 h σκοτάδι) και με τα φώτα να ανοίγουν στις 7 π.μ.

Ο χειρισμός των πειραματόζωων έγινε σύμφωνα με διεθνείς (EEC Council Directive 86/609, JL 358, 1, December 12, 1987) και εθνικούς (Animal Act, P.D. 160/91) κανονισμούς, όπως ορίζονται από τα νομικά πλαίσια του κράτους και της Ευρωπαϊκής Ένωσης.



Istock photo

Εικόνα 11: Επίμυς (Wistar rat)

2.2. Συμπεριφορικές Τεχνικές

Αξιοποιήθηκαν προκλινικά πειραματικά πρότυπα, τα οποία προκαλούν στους επίμυες ορισμένα από τα αρνητικά και τα γνωστικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας, με τη συμβολή φαρμάκων, που συμμετέχουν στον αποκλεισμό του NMDA υποδοχέα του γλουταμινεργικού συστήματος.

2.2.1. Πειραματικά πρότυπα σχιζοφρένειας

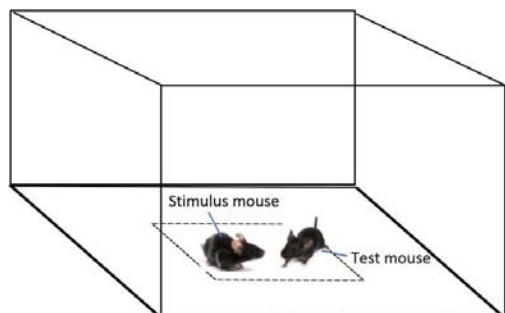
A) Κοινωνική Απόσυρση (Social Withdrawal)

Η κοινωνική απόσυρση είναι ένα από τα κύρια αρνητικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας και τα πιο ευρέως μελετημένα σε ζωικά μοντέλα, παρουσιάζοντας σημαντικό αντίκτυπο στη λειτουργικότητα του ασθενούς (Puig et al., 2008). Η ίδια προκαλεί σημαντική διαταραχή της συμπεριφοράς των ασθενών, καθώς παρατηρείται ότι συχνά ζουν μόνοι τους, με λίγες κοινωνικές επαφές και γενικά αποφεύγουν την κοινωνική αλληλεπίδραση.

Το **Τεστ Κοινωνικής Αλληλεπίδρασης (TKA)**, αποτελεί ένα έγκυρο και μετρήσιμο πειραματικό πρότυπο της κοινωνικής απόσυρσης στα τρωκτικά.

Πειραματικό Πρωτόκολλο ΤΚΑ

Οι αρουραίοι προερχόμενοι από διαφορετικά κλουβιά τοποθετούνται ανά ζεύγη σε ένα **κλωβό κινητικής δραστηριότητας** κατασκευασμένο από Plexiglas με τις ακόλουθες διαστάσεις: 50cm μήκος x 33cm ύψος x 50cm πλάτος. Στο κλωβό αυτό καταγράφεται η κινητική δραστηριότητα (βήματα) των επίμυων μέσω μιας συσκευής που είναι συνδεδεμένη με την επιφάνεια κίνησης των αρουραίων, καθώς και ο χρόνος που αφιερώνεται για την αλληλεπίδραση μεταξύ τους (μυρωδιά, περιποίηση, παρακολούθηση, στήριξη, πάλη, αυτοκαθαρισμός). Η διαδικασία πραγματοποιείται μια μόνο φορά για τον κάθε αρουραίο και έχει διάρκεια 10 λεπτών.



Kraeuter, A.-K., Guest, P.C. and Saranyai, Z. (1970) Free dyadic social interaction test in mice, SpringerLink. Available at: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8994-2_8.

Εικόνα 12: Στο Τεστ Κοινωνικής Αλληλεπίδρασης επιτυγχάνεται η τοποθέτηση των επίμυων στον κλωβό για μέτρηση της κοινωνικής τους αλληλεπίδρασης και της κινητικής τους δραστηριότητας.

Β)Χωρική αναγνωριστική μνήμη

Η χωρική αναγνωριστική μνήμη επιτρέπει σε ένα άτομο να θυμάται διαφορετικές τοποθεσίες και η βασική περιοχή του εγκεφάλου που συμμετέχει στην επεξεργασία των χωρικών πληροφοριών είναι ο ιππόκαμπος. Οι διαταραχές, όπως τα ελλείμματα της μνήμης αυτής προέρχονται εξίσου από δυσλειτουργίες του γλουταμινεργικού συστήματος, όπως αποκλεισμός του NMDA υποδοχέα και αναφέρονται στα γνωστικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας. Ένας δείκτης για τη μέτρηση χωρικής αναγνωριστικής μνήμης στην παρούσα εργασία, αποτέλεσε το **Τεστ Θέσης Αντικειμένου (ΤΘΑ)**, μελετώντας τον ρόλο της 7-NI στην αντιμετώπιση της διαταραχής αυτής.

Πειραματικό Πρωτόκολλο ΤΘΑ

Η συγκεκριμένη πειραματική δοκιμασία έλαβε χώρα σε ένα ανοικτό πεδίο, κατασκευασμένο από Plexiglas (80cm μήκος x 50cm υψος x 60cm πλάτος), με τον εσωτερικό χώρο της συσκευής να φωτίζεται ομοιόμορφα από μία λάμπα 60W τοποθετημένη σε απόσταση 60cm.

Την εβδομάδα που προηγήθηκε του τεστ, οι επίμυες εξοικειώθηκαν με τη πειραματική συσκευή (**habituation**). Τα αντικείμενα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν κατασκευαστεί από τρία υλικά και διέθεταν επίσης τρία διαφορετικά σχήματα: γυάλινη πυραμίδα, πλαστικός κύλινδρος και μεταλλικός κύβος.

Το τεστ έλαβε χώρα σε δύο διαφορετικές φάσεις (T1 και T2), με διάρκεια 2 λεπτών η κάθε μια φάση. Στην **T1**, τοποθετήθηκαν σε αντιδιαμετρικές γωνίες του ανοιχτού **πλαισίου δύο πανομοιότυπα αντικείμενα**, απέχοντας 10 εκατοστά από τα άκρα του. Ο κάθε επίμυς τοποθετήθηκε με προσοχή στο κέντρο του ανοικτού πεδίου και μετρήθηκε για δύο λεπτά με χρονόμετρο η εξερεύνηση των αντικειμένων και στη συνέχεια επέστρεψε στο κλουβί. **Μία ώρα μετά την ολοκλήρωση της T1, ξεκίνησε η T2 φάση.** Στην T2, το ένα αντικείμενο παρέμεινε στην ίδια, γνώριμη πλέον για τον επίμυ θέση (ΓΘ) και **το δεύτερο αντικείμενο τοποθετήθηκε σε μία νέα θέση (ΝΘ), στην ακριβώς απέναντι γωνία** για να μην είναι γνώριμο από τον επίμυ, ακολουθώντας μετά το πέρας των δύο λεπτών την ίδια διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω. Τα αντικείμενα τοποθετήθηκαν σε **όλες τις γωνίες και με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς**, ώστε να εξαιρεθεί η πιθανότητα προτίμησης κάποιας συγκεκριμένης θέσης ή αντικειμένου από τους επίμυες.

Ο υπολογισμός του χρόνου εξερεύνησης έγινε με τη βοήθεια της εξερευνητικής συμπεριφοράς, δηλαδή την όσφρηση ή το άγγιγμα του αντικειμένου από τον επίμυ με τη μύτη του σε απόσταση δύο εκατοστών ή και μικρότερη.

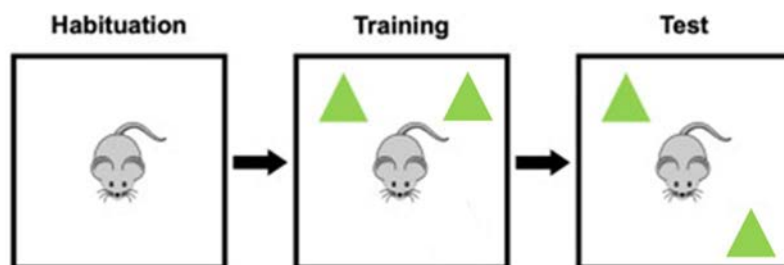
Η προτίμηση για τη νέα θέση του αντικειμένου και συνεπώς την ένδειξη της μνήμης του επίμυ, προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του **δείκτη διάκρισης (index D)**. Ο συγκεκριμένος δείκτης υπολογίστηκε από τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{IndexD} = (\text{ΝΘ} - \text{ΓΘ}) / (\text{ΝΘ} + \text{ΓΘ}) \text{ όπου:}$$

ΝΘ = ο χρόνος εξερεύνησης της **νέας θέσης** του αντικειμένου

ΓΘ = ο χρόνος εξερεύνησης της **γνώριμης θέσης** του αντικειμένου

(ΝΘ + ΓΘ) = ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης και **των δύο θέσεων** των αντικειμένων στη φάση **T2**



Remake image: ScienceDirect. "Novel Object Recognition Test." <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/novel-object-recognition-test>

Εικόνα 13: Στο Τεστ Θέσης Αντικειμένου εκτελούνται τρία στάδια: Α) Εξοικείωση του επίμυ με τον πειραματικό χώρο απουσία αντικειμένων Β)Εκτέλεση της φάσης T1 στον

πειραματικό χώρο με τον πρώτο συνδυασμό αντικειμένων (ΓΘ1 και ΓΘ2) Γ)Εκτέλεση της φάσης T2 στον χώρο με τον δεύτερο συνδυασμό αντικειμένων (ΓΘ1 και ΝΘ2)

Γ)Μη χωρική αναγνωριστική μνήμη

Η μη χωρική αναγνωριστική μνήμη αποτελεί το είδος της μνήμης που σχετίζεται με την αναγνώριση του περιεχομένου των δεδομένων και όχι με τη φυσική τους τοποθεσία (δηλαδή η ικανότητα ενός ατόμου να ανακαλεί αντικείμενα ή πρόσωπα χωρίς την ύπαρξη χωρικής αναφοράς). Έχει παρατηρηθεί διαταραχή της μνήμης αυτής σε σχιζοφρενείς ασθενείς, κυρίως λόγω μη ομαλής λειτουργίας νευρολογικών περιοχών στον εγκέφαλο που σχετίζονται με την αναγνώριση αντικειμένων. Τα ελλείμματα της μνήμης αυτής προέρχονται εξίσου από δυσλειτουργίες του γλουταμινεργικού συστήματος, όπως η χορήγηση ανταγωνιστών του NMDA υποδοχέα (πχ κεταμίνη) και συμπεριλαμβάνονται στα γνωστικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας. Ένας δείκτης για τη μέτρηση της μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης στην παρούσα εργασία, αποτέλεσε το **Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου (TAA)**, μελετώντας έτσι τον ρόλο της 7-NI στην αντιμετώπιση της διαταραχής αυτής. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης, διερευνήθηκε κατά πόσο η ταυτόχρονη χορήγηση **αδρανών δόσεων** 7-NI και κλοζαπίνης, μπορεί να ανταγωνιστεί τα χρονο-εξαρτώμενα και τα προκληθέντα από χορήγηση κεταμίνης ελλείμματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης.

Πειραματικό Πρωτόκολλο TAA

Μέσω της δοκιμασίας αυτής, εκτιμάται η ικανότητα των επίμυων να ανακαλούν στη μνήμη τους ένα ήδη γνώριμο αντικείμενο, καθώς και να μπορέσουν να το διαχωρίσουν από ένα νέο που έχει προστεθεί σε έναν ήδη εξερευνημένο χώρο. Τα μέσα και ο σχεδιασμός του πειράματος είναι ίδιος με του ΤΘΑ.

Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου (TAA) + χρονο-εξαρτώμενη αμνησία

Τις δύο προηγούμενες μέρες του πειράματος, όλοι οι αρουραίοι μεταφέρθηκαν στο ανοικτό πεδίο για 2 λεπτά με σκοπό να εξερευνήσουν τον χώρο απουσία αντικειμένων (**habituation**). Η πειραματική διαδικασία αποτελούνταν πάλι από δύο φάσεις (T1 και T2), κάθε μια από τις οποίες είχε διάρκεια 2 λεπτών για τον κάθε επίμυ και μετρήθηκε με ακρίβεια με τη βοήθεια χρονομέτρου. **Κατά την T1** τοποθετήθηκαν **δύο πανομοιότυπα αντικείμενα (Γ1 και Γ2)** στα δύο άκρα από τη μια πλευρά της συσκευής και απείχαν 10 εκατοστά από τα τοιχώματά της. Οι επίμυες μεταφέρθηκαν στο κέντρο της συσκευής και ο χρόνος εξερεύνησης των αντικειμένων καταγράφηκε. Κατόπιν, μεσολάβησε το **ενδιάμεσο διάστημα των 24 ωρών** και στη συνέχεια

πραγματοποιήθηκε η δεύτερη φάση T2. Κατά την T2, το ένα από τα δύο (Γ) αντικείμενα της T1, αντικαταστάθηκε από ένα καινούριο αντικείμενο (N). Ο επίμυς επανατοποθετήθηκε στο κέντρο του κουτιού και εξερεύνησε το γνώριμο και το νέο αντικείμενο (Γ και N). Τα αντικείμενα συνδυάστηκαν με όλους τους δυνατούς τρόπους, ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα προτίμησης μιας συγκεκριμένης θέσης ή αντικειμένου από τα ζώα.

Ο προσδιορισμός του χρόνου εξερεύνησης έγινε με τη βοήθεια της εξερευνητικής συμπεριφοράς, δηλαδή την όσφρηση ή το άγγιγμα του αντικειμένου από τον επίμυ με τη μύτη του σε απόσταση δύο εκατοστών ή μικρότερη.

Η προτίμηση για το **νέο αντικείμενο** προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του **δείκτη διάκρισης (index D)**. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε με τη βοήθεια του ακόλουθου τύπου: $D = (N - \Gamma) / (N + \Gamma)$ όπου:

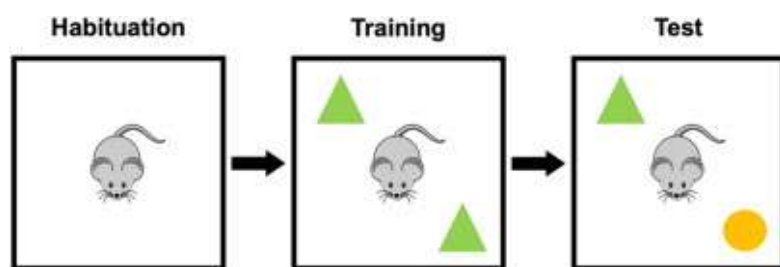
N: ο χρόνος εξερεύνησης του **νέου αντικειμένου**

Γ: ο χρόνος εξερεύνησης του ήδη **γνωστού αντικειμένου**

(N + Γ) : ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης **και των δύο αντικειμένων** στη φάση T2

Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου (TAA) + αμνησία οφειλόμενη στη χορήγηση κεταμίνης

Στη δοκιμασία αυτή πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω με τη μόνη διαφορά πως το ενδιαμέσο διάστημα μεταξύ T1 και T2 είναι μία ώρα.



ScienceDirect. "Novel Object Recognition Test." <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/novel-object-recognition-test>

Εικόνα 14: Στο Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου εκτελούνται τρία στάδια: Α) Εξοικείωση του επίμυ με τον πειραματικό χώρο απουσία αντικειμένων, Β) Εκτέλεση της φάσης T1 στον πειραματικό χώρο με τον πρώτο συνδυασμό αντικειμένων (Γ1 και Γ2), Γ) Εκτέλεση της φάσης T2 στον χώρο με τον δεύτερο συνδυασμό αντικειμένων (Γ και N)

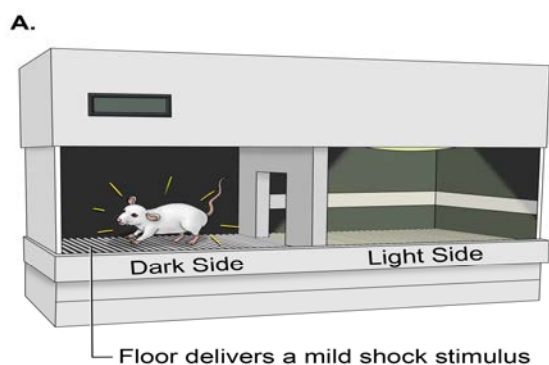
Δ) Συναισθηματική μνήμη

Με τον όρο "συναισθηματική μνήμη" υποδηλώνεται η ανάμνηση εμπειριών που προκάλεσαν κάποια συναισθηματική αντίδραση. Αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η MK-801 μπορεί να προκαλέσει ελλείμματα στην συναισθηματική μνήμη που προσομοιάζουν αυτά των ασθενών της σχιζοφρένειας. Ένας δείκτης για τη μέτρηση της συναισθηματικής μνήμης στην παρούσα εργασία, αποτέλεσε **το τεστ παθητικής αποφυγής (Step through passive avoidance test, STPAT)**, διερευνώντας την επίδραση της οξείας χορήγησης 7-NI στην αναστολή της απώλειας συναισθηματικής μνήμης, που έχει προηγουμένως επαχθεί από την MK-801.

Πειραματικό πρωτόκολλο ΤΠΑ

Η συσκευή διεξαγωγής του πειράματος αποτελείται από ένα ορθογώνιο **κουτί** με τις ακόλουθες διαστάσεις: 50cm μήκος x 50cm πλάτος x 50cm ύψος, είναι κατασκευασμένη από Plexiglas και είναι συνδεδεμένη με μία **πλατφόρμα**. Πάνω από την πλατφόρμα σε απόσταση 20 εκατοστών είναι κατάλληλα τοποθετημένη μια **λάμπα** 60W. Το ορθογώνιο κουτί χωριζόταν από την πλατφόρμα με μία μικρή πόρτα. Το δάπεδο της συσκευής αποτελείται από 17 **ράβδους**, κατασκευασμένες από ανοξείδωτο ατσάλι. Μία **απομονωμένη γεννήτρια** χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση ηλεκτρικών διεγέρσεων στους επίμυες, μέσω των ράβδων του δαπέδου.

Διαδικαστικά, την πρώτη μέρα, ο κάθε επίμυς μεταφέρεται στο φωτισμένο (εχθρικό) σημείο της πλατφόρμας, μέχρι να εισέλθει στο σκοτεινό (φιλικό) προς αυτόν δωμάτιο μέσω της ανοιχτής πόρτας. Μόλις το ζώο εισέλθει στο σκοτεινό δωμάτιο, η πόρτα κλείνει και απευθείας χορηγείται ηλεκτροσόκ της τάξης των 0,6mA και διάρκειας 1 δευτερολέπτου. Παράλληλα, γίνεται με χρονόμετρο η καταμέτρηση του χρόνου που απαιτήθηκε για τον επίμυ να εισέλθει στο σκοτεινό δωμάτιο (**pre-shock latency**). Τα πειραματόζωα αμέσως μετά τη χορήγηση ηλεκτρικού σοκ επιστρέφουν με προσοχή στα κλουβιά τους και επιτελείται προσεχτικός καθαρισμός του χώρου του πειράματος. Μετά το πέρασμα 24 ωρών πραγματοποιήθηκε **ο έλεγχος της μνήμης** κατά τη διάρκεια του οποίου οι επίμυες με την ίδια διαδικασία μεταφέρονται στο ίδιο σημείο της φωτισμένης πλατφόρμας και καταγράφεται ο χρόνος παραμονής τους σε αυτήν. Η δοκιμασία έληγε όταν συμπληρώνονταν 180 δευτερόλεπτα της παραμονής του επίμυ στη πλατφόρμα ή όταν ο ίδιος εισερχόταν στη σκοτεινή αίθουσα, στην οποία είχε δεχθεί τον ηλεκτρικό ερεθισμό τη προηγούμενη ημέρα (**step-through latency**).



Augusta University. "Passive Avoidance Test." <https://www.augusta.edu/research/core/sabc/test-passive-avoidance.php>

Εικόνα 15: Στο τεστ παθητικής αποφυγής τα πειραματόζωα μαθαίνουν να αποφεύγουν ένα ήπιο απεχθές ερέθισμα (π.χ. εφαρμογή ηλεκτροσοκ) παραμένοντας στη φωτισμένη φιλική προς αυτά πλευρά ενός θαλάμου δύο διαμερισμάτων απομακρυσμένα από τη σκοτεινή (μη φιλική) πλευρά.

2.3. Αντιδραστήρια

Στην πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της NOS **7-NI**, το άτυπο αντιψυχωσικό **κλοζαπίνη** (Sigma, St. Louis, MO, USA) και οι ανταγωνιστές του NMDA υποδοχέα υδροχλωρική **κεταμίνη** και **MK-801**. Η κλοζαπίνη και η κεταμίνη διαλύθηκαν σε φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%). Η κλοζαπίνη διαλύθηκε επίσης και σε μικρό όγκο οξικού οξέος (CH₃COOH). Επίσης, έγινε προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου (4M), με σκοπό το pH να προσεγγίσει την τιμή 7. Η παρασκευή των διαλυμάτων των αντιδραστηρίων πραγματοποιούνταν **την ίδια ημέρα** με την πειραματική διαδικασία και η χορήγησή τους γινόταν **ενδοπεριτοναϊκά, (i.p.)** και σε όγκο 1 ml/kg. Στα ζώα ελέγχου (μάρτυρες) χορηγήθηκε ανάλογος όγκος φυσιολογικού ορού.

2.4. Πειραματική διαδικασία

Το σύνολο των δοκιμασιών εκτελέστηκαν μεταξύ 10:00 και 15:00. Ο πειραματικός σχεδιασμός μέσω του οποίου χωρίστηκαν τα ζώα σε ομάδες των τριών ανά κλουβί, προέκυψε με τη βοήθεια ενός **εντελώς τυχαιοποιημένου σχεδιασμού (CRD: Completely Randomized Design)**. Η **καταγραφή** ορισμένων δοκιμασιών έγινε με τη συμβολή βιντεοκάμερας και η **ανάλυση** των παραχθέντων δεδομένων έγινε από ένα παρατηρητή, ο οποίος για την επιβεβαίωση των ορθότητας των αποτελεσμάτων δεν

γνώριζε τον συνδυασμό των αντιδραστηρίων που είχαν χορηγηθεί σε κάθε πειραματόζωο.

2.4.1. Πείραμα 1: Επίδραση της 7-NI επί των ελλειμμάτων χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από την κεταμίνη στον επίμυ (ΤΘΑ).

Μετά την πραγματοποίηση της πρώτης φάσης T1 του Τεστ Θέσης Αντικειμένου (ΤΘΑ), ξεκίνησε η χορήγηση των φαρμάκων προκειμένου να μελετηθεί η επίδρασή τους στην χωρική αναγνωριστική μνήμη. Αρχικά, χορηγήθηκε κεταμίνη ή φυσιολογικός ορός (vehicle), ανάλογα την πειραματική ομάδα. Η δόση της κεταμίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν (3 mg/kg), καθώς έχει διαπιστωθεί πως **αυτή η δόση προκαλεί ελλείμματα χωρικής αναγνωριστικής μνήμης στον επίμυ χωρίς να συνοδεύονται από παρενέργειες (REFERENCE)**. Μετά από το χρονικό διάστημα των 5-10 δευτερολέπτων έγινε άμεση χορήγηση της 7-NI με επιλεγμένες δόσεις των 1mg/kg και 3mg/kg.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε 6 πειραματικές ομάδες και η καθεμία αποτελούνταν από 8 αρουραίους. Οι πειραματικές ομάδες σύμφωνα με τη φαρμακευτική αγωγή που τους χορηγήθηκε, ήταν οι ακόλουθες:

Πειραματικές ομάδες	1 ^η Έγχυση	2 ^η Έγχυση
1	Φυσιολογικός ορός	Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός	7-NI (1 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός	7-NI (3 mg/kg)
4	Φυσιολογικός ορός	Κεταμίνη (3 mg/kg)
5	Κεταμίνη (3 mg/kg)	7-NI (1 mg/kg)
6	Κεταμίνη (3 mg/kg)	7-NI (3 mg/kg)

2.4.2. Πείραμα 2: Επίδραση της 7-NI επί των επαγόμενων από την MK-801 ελλειμμάτων συναισθηματικής μνήμης στο τεστ παθητικής αποφυγής (ΤΠΑ).

Η χορήγηση των φαρμάκων έγινε 40 λεπτά πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Η χορήγηση της 7-NI έγινε άμεσα σε διάστημα 5-10s μετά τη χορήγηση του φυσιολογικού ορού ή της MK-801. Οι δόσεις 7-NI που χορηγήθηκαν ήταν (1 και 3 mg/kg) και της MK-801 (0.1 mg/kg), καθώς σε αυτή τη δόση η MK-801 διασπά τη

συναισθηματική μνήμη των επίμυων στο ΤΠΑ , χωρίς την επακόλουθη πρόκληση επιπλέον ανεπιθύμητων παρενεργειών.

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε έξι πειραματικές ομάδες, από οχτώ ζώα στην κάθε μια και η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθήθηκε σημειώνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πειραματικές ομάδες	Φαρμακευτική αγωγή
1	Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός + 7-NI (1mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός + 7-NI (3mg/kg)
4	Φυσιολογικός ορός + MK-801 (0.1mg/kg)
5	MK-801 (0.1mg/kg) + 7-NI (1 mg/kg)
6	MK-801 (0.1 mg/kg) + 7-NI (3 mg/kg)

2.4.3. Πείραμα 3: Επίδραση της 7-NI επί της επαγόμενης από την κεταμίνη κοινωνικής απόσυρσης (ΤΚΑ).

Η κεταμίνη (8 mg/kg X 3 ημέρες, ενδοπεριτοναϊκά), προκαλεί το φαινόμενο της κοινωνικής απόσυρσης στους επίμυες (REFERENCE). Τις πρώτες δύο ημέρες του πειράματος χορηγήθηκε η κεταμίνη και ο φυσιολογικός ορός. Την τρίτη μέρα, μισή ώρα πριν την πραγματοποίηση του Τεστ Κοινωνικής Αλληλεπίδρασης, χορηγήθηκε αρχικά στο κάθε ζώο κεταμίνη (8 mg/kg) για την πρόκληση της κοινωνικής απόσυρσης ή φυσιολογικός ορός (vehicle) και μετά από διάστημα 5-10 δευτερολέπτων, τους χορηγήθηκε η 7-NI (1 και 3 mg/kg) για τον προσδιορισμό της ικανότητας της να βελτιώνει τη προκληθείσα από τη κεταμίνη κοινωνική απόσυρση. Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε έξι πειραματικές ομάδες, από οχτώ ζώα στην κάθε μια και η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθήθηκε σημειώνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πειραματικές ομάδες	1 ^η Έγχυση	2 ^η Έγχυση
1	Φυσιολογικός ορός	Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός	7-NI (1 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός	7-NI (3 mg/kg)
4	Φυσιολογικός ορός	Κεταμίνη (8 mg/kg)
5	Κεταμίνη (8 mg/kg)	7-NI (1 mg/kg)
6	Κεταμίνη (8 mg/kg)	7-NI (3 mg/kg)

2.4.4. Πείραμα 4: Επίδραση της χορήγησης μη δραστικών δόσεων της 7-NI επί της χρονοεξαρτώμενης αμνησίας (ΤΘΑ).

Μετά την πραγματοποίηση της πρώτης φάσης T1 του Τεστ Θέσης Αντικειμένου (ΤΘΑ), ακολούθησε η φαρμακευτική αγωγή για να μελετηθεί η επίδραση της επί της μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης. Στην συγκεκριμένη δοκιμασία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και μετά το πέρας κάποιων δευτερολέπτων, έγινε χορήγηση δύο δόσεων της 7-NI (0.1 mg/kg και 0.3 mg/kg), με σκοπό να βρεθεί **ποια από τις δύο δόσεις είναι αναποτελεσματική** για να χρησιμοποιηθεί σε μετέπειτα πειράματα σε συνδυασμό με αδρανείς δόσεις αντιψυχωσικών δεύτερης γενιάς.

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις πειραματικές ομάδες, από έξι ζώα στην κάθε μια και η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθήθηκε σημειώνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πειραματικές ομάδες	Φαρμακευτική αγωγή
1	Φυσιολογικός ορός
2	7NI (0.1 mg/kg)
3	7NI (0.3 mg/kg)

2.4.5. Πείραμα 5: Επίδραση της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων 7-NI και κλοζαπίνης στα επαγόμενα από την κεταμίνη ελλείμματα απόδοσης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ΤΑΑ).

Η φαρμακευτική αγωγή χορηγήθηκε στους επίμυες μόλις ολοκληρώθηκε η πρώτη φάση T1 του Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου (ΤΑΑ) με ενδιαμέσο διάστημα 1 ώρας μέχρι τη δεύτερη φάση T2. Οι μη δραστικές δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 7-NI (0.1 mg/kg) και κλοζαπίνη (0.1 mg/kg). Μετά από χρονικό διάστημα 5-10 δευτερολέπτων από τη χορήγηση της 7-NI ή του φυσιολογικού ορού πραγματοποιήθηκε η έγχυση κλοζαπίνης στους επίμυες. Η δόση της κεταμίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν (3 mg/kg), ικανή να προκαλέσει τα ελλείμματα απόδοσης για τη συγκεκριμένη δοκιμασία.

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε 4 πειραματικές ομάδες και στην κάθε μία υπήρχαν 8 αρουραίοι. Οι πειραματικές ομάδες σύμφωνα με τη φαρμακευτική αγωγή που τους χορηγήθηκε, ήταν οι ακόλουθες:

Πειραματικές ομάδες	1η Έγχυση	2η Έγχυση	3η Έγχυση
1	Φυσιολογικός ορός	Φυσιολογικός ορός	Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός	7-NI (0.1 mg/kg)	Κλοζαπίνη(0.1 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός	Φυσιολογικός ορός	Κεταμίνη(3 mg/kg)
4	Κεταμίνη(3 mg/kg)	7-NI (0.1 mg/kg)	Κλοζαπίνη(0.1 mg/kg)

2.5 Στατιστική Ανάλυση

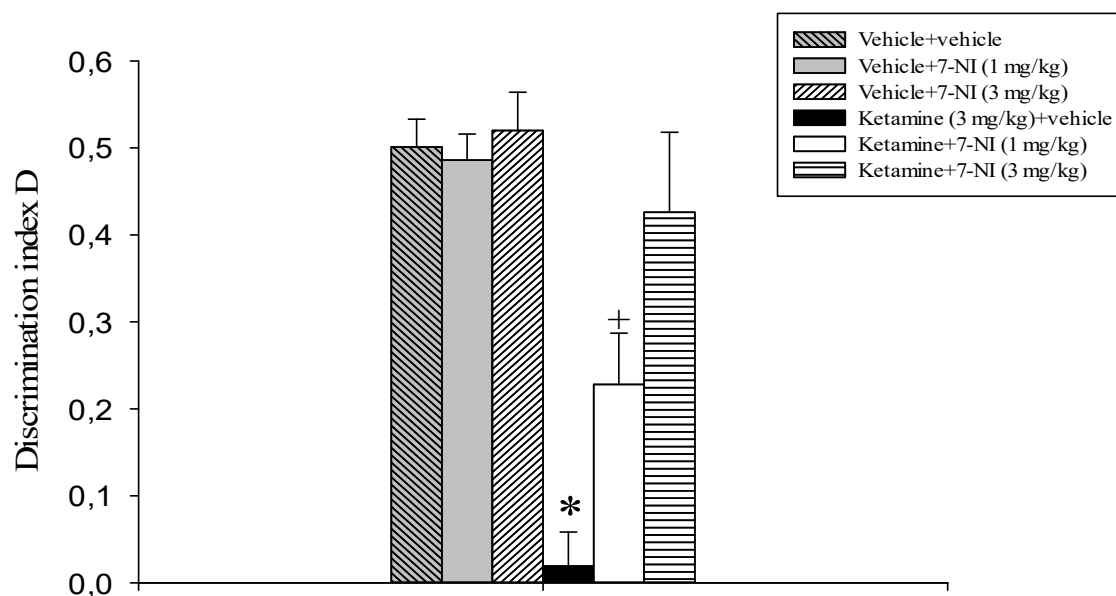
Τα δεδομένα των πειραμάτων εμφανίστηκαν **ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα (S.E.M.)** και υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της αμφίδρομης ανάλυσης διασποράς (two-way ANOVA). Οι post-hoc συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων πειραματικών ομάδων με τη χρήση του Tukey's t τεστ εφόσον υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ κεταμίνης και 7-NI ή 7-NI και κλοζαπίνης ή κεταμίνης και συνδυαστικής θεραπείας με κλοζαπίνη + 7-NI. **Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές $p < 0.05$.**

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πείραμα 1: Επίδραση της 7-NI επί των ελλειμμάτων χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από την κεταμίνη στον επίμυ (ΤΘΑ).

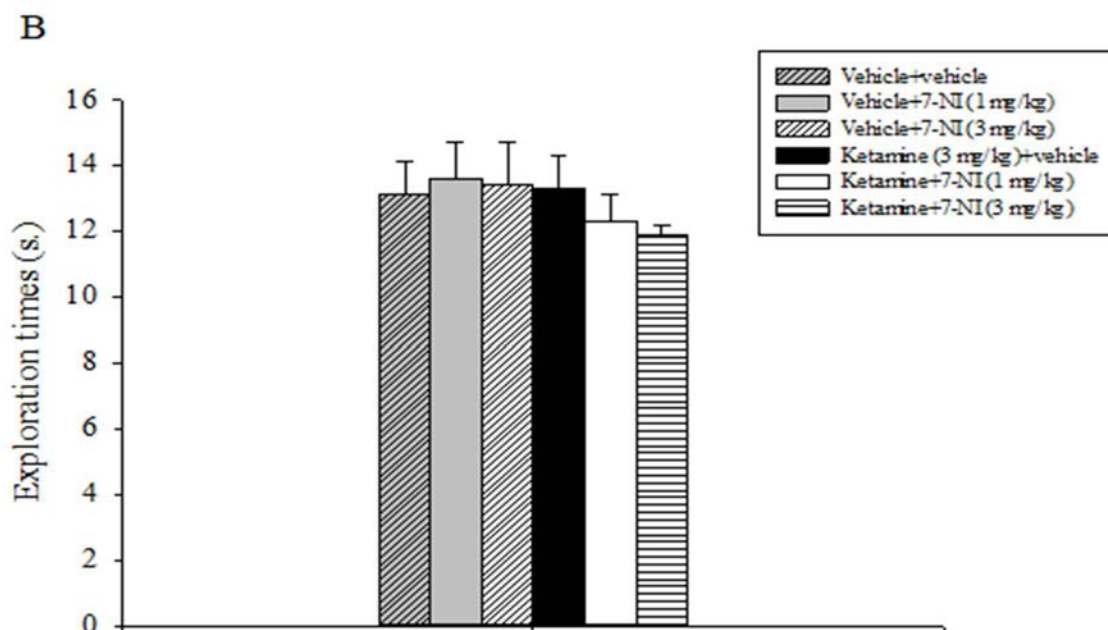
Σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων του δείκτη διάκρισης (Discrimination index D), παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα στη δράση της κεταμίνης ($F_{1,48} = 40.396$, $p < 0.001$), της 7-NI ($F_{2,47} = 7.890$, $p = 0.001$) και της αλληλεπίδρασης κεταμίνης – 7-NI ($F_{2,47} = 6.628$, $p = 0.03$). Ακόμη, η post-hoc ανάλυση φανέρωσε πως η πειραματική ομάδα που έλαβε κεταμίνη και φυσιολογικό ορό, παρουσίασε το μικρότερο δείκτη διάκρισης (Index D) σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες (Διάγραμμα 1Α).

Fig. 1
A



Διάγραμμα 1Α: Δείκτης διάκρισης στη φάση T2 του ΤΘΑ. * $p < 0.05$ έναντι όλων των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων.

Επίσης, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του συνολικού χρόνου εξερεύνησης των αντικειμένων στην T2 δεν έδειξε καμία διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων (Διάγραμμα 1Β).



Διάγραμμα 1B: Χρόνος εξερεύνησης αντικειμένων της κάθε πειραματικής ομάδας κατά τη διάρκεια της T2.

3.2. Πείραμα 2: Επίδραση της 7-NI επί των επαγόμενων από την MK-801 ελλειμμάτων συναισθηματικής μνήμης στο τεστ παθητικής αποφυγής (ΤΠΑ).

Πίνακας 1: Ο χρόνος εισόδου στην σκοτεινή αίθουσα πριν το ηλεκτροσόκ δεν διέφερε ιδιαίτερα ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες. Αντιθέτως το τεστ Kruskal-Wallis έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη δοκιμασία ελέγχου μνήμης: $H(5) = 21,128$, $p < 0,001$. Εκ των υστέρων μελέτη των δεδομένων έδειξε ότι η πειραματική ομάδα που έλαβε MK-801 και φυσιολογικό ορό παρέμεινε λιγότερο χρόνο στην φωτισμένη πλατφόρμα σε σύγκριση με τις ομάδες που έλαβαν MK-801 + 7-NI 1 mg/kg και MK-801 + 7-NI 3 mg/kg, αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την προκαλούμενη από την MK-801 διαταραχή (μείωση) της συναισθηματικής μνήμης και τον ανταγωνισμό της από τη 7-NI (Πίνακας 1).

Table 1. Pre-shock and retention latencies expressed by different groups of rats in the step-through passive avoidance test

Treatment	Pre-shock latencies (s.)	Retention latencies (s.)
Vehicle+vehicle	33.5 (22.25-46.5)	180 (180-180)
Vehicle+7-NI (1 mg/kg)	42 (26.5-56)	180 (180-180)
Vehicle+7-NI (3 mg/kg)	41 (28.5-50)	180 (180-180)
MK-801 (0.1 mg/kg)+vehicle	32.5 (15.75-49.25)	53 (28.5-86.5)*
MK-801+7-NI (1 mg/kg)	43.5 (19.5-75.75)	85 (63-180)
MK-801+7-NI (3 mg/kg)	39.5 (30.25-44.25)	180 (180-180)

Data are expressed as medians and interquartile ranges of 8 rats per treatment group

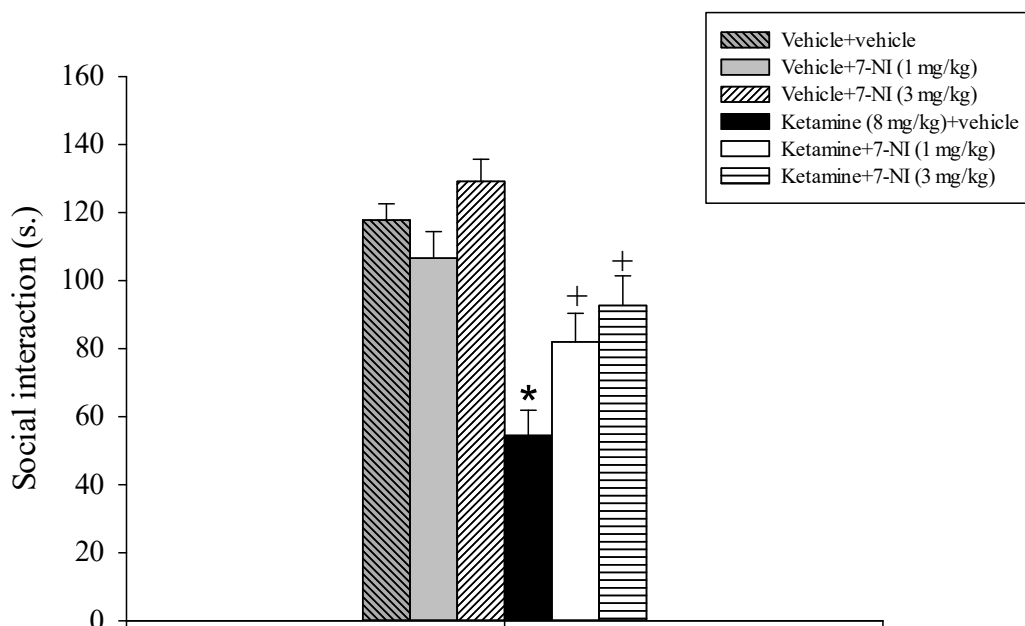
* $p < 0.05$ vs. all the other groups.

Πίνακας 1: Καταγραφή του χρόνου εισόδου στο σκοτεινό περιβάλλον των επίμυων πριν τη χορήγηση ηλεκτροσόκ (Pre- shock latencies) και 24 ώρες κατά τη διαδικασία ανάκλησης μνήμης (Retention latencies).

3.3. Πείραμα 3: Επίδραση της 7-NI επί της επαγόμενης από την κεταμίνη κοινωνικής απόσυρσης (TKA).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος καταδεικνύει τη στατιστική σημαντικότητα της κεταμίνης ($F_{1,47}=47.208$, $p < 0.001$), της 7-NI ($F_{2,47}=5.822$, $p < 0.001$) καθώς και της αλληλεπίδρασης των δύο παραπάνω φαρμάκων ($F_{2,47}=3.583$, $p < 0.05$). Συμπερασματικά λοιπόν, **ο συνδυασμός 7-NI και κεταμίνης προκάλεσε στατιστικά σημαντικές κοινωνικές αλληλεπιδράσεις** και πιο συγκεκριμένα η 7-NI μετρίασε την κοινωνική απόσυρση που προκλήθηκε από την χορήγηση της κεταμίνης. Τα αποτελέσματα του διαγράμματος δείχνουν πως τα ζεύγη επίμυων που έλαβαν κεταμίνη (8 mg/kg) και φυσιολογικό ορό σημείωσαν την χαμηλότερη κοινωνική αλληλεπίδραση σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως τα ζεύγη ζώων που έλαβαν κεταμίνη + 7-NI (1 ή 3 mg/kg), παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα κοινωνικής αλληλεπίδρασης σε σύγκριση με τα ζεύγη που τους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός + 7-NI (1 ή 3 mg/kg), (Διάγραμμα 2Α).

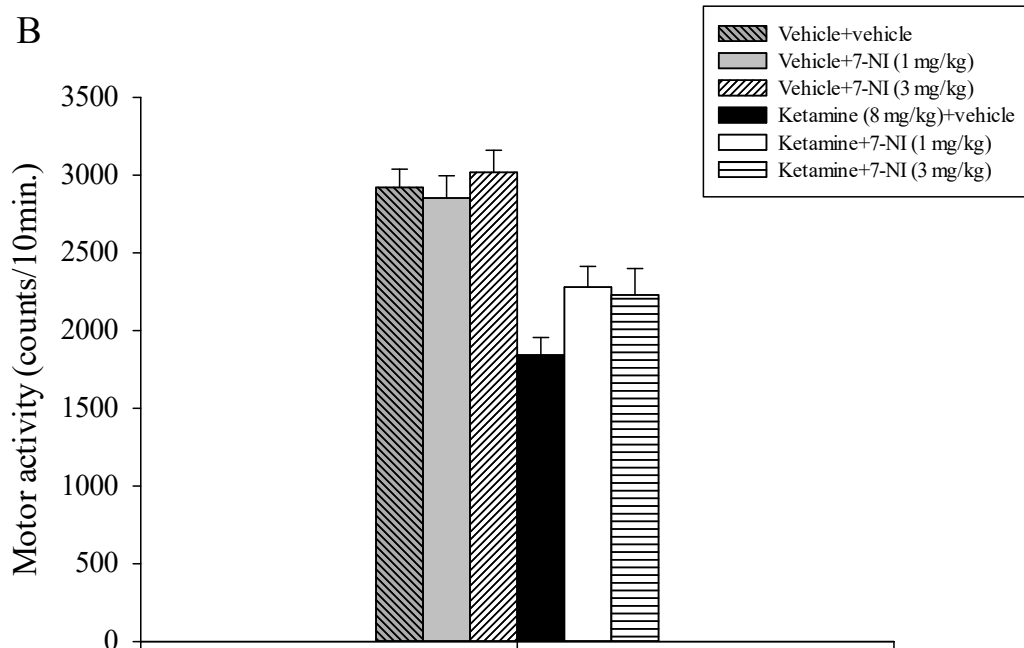
Fig. 2
A



Διάγραμμα 2A: Συνολικός χρόνος κοινωνικής αλληλεπίδρασης των επίμυων.

* $p < 0.05$ έναντι όλων των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων, + $p < 0.05$ έναντι των: (Φυσιολ. ορός + Φυσιολ. ορός), (Φυσιολ. ορός + 7-NI με 1 και 3 mg/kg) ομάδων

Σχετικά με την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων, σημειώθηκε στατιστική σημαντικότητα μόνο στη δράση της κεταμίνης ($F_{1,47}=51.965$ $p<0.001$). Ωστόσο, δεν αναφέρθηκε στατιστικά σημαντική κινητική δραστηριότητα των ζώων μετά από χορήγηση της 7-NI ($F_{2,47}=1.670$, $p=0.201$), καθώς και μετά την αλληλεπίδραση κεταμίνης – 7-NI ($F_{2,47}= 1.681$ $p=0.199$). Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως η κεταμίνη προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων στους οποίους χορηγήθηκε σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου στις οποίες δεν είχε χορηγηθεί κεταμίνη. Άρα, **επιβεβαιώνεται πως η ικανότητα της 7-NI να μετριάζει την κοινωνική απόσυρση των επίμυων δεν οφείλεται στην υπερκινητικότητα τους** (Διάγραμμα 2B).

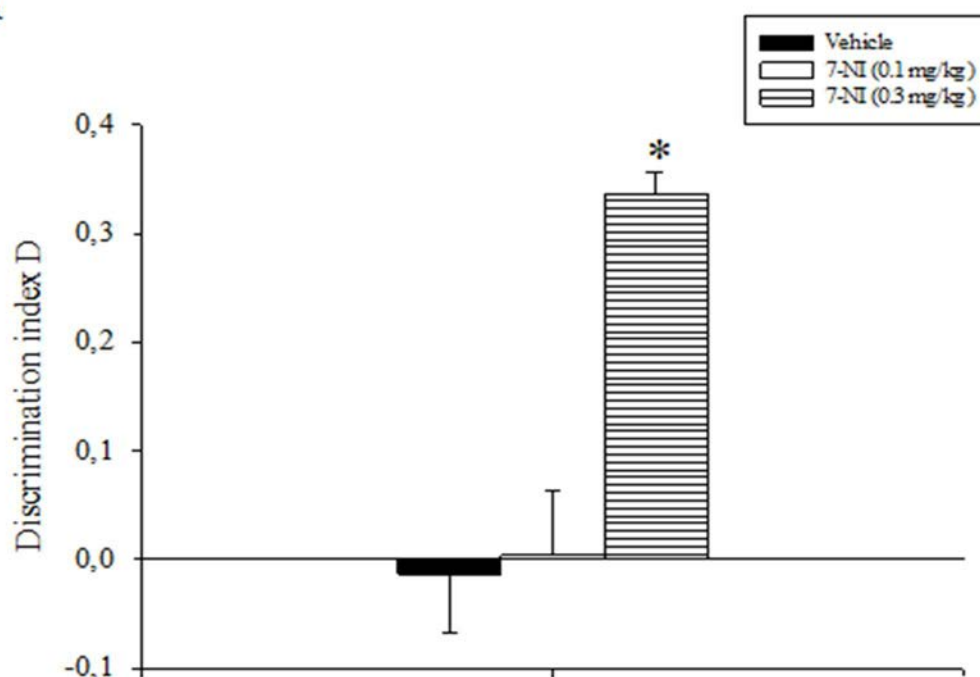


Διάγραμμα 2B: Η κινητική δραστηριότητα των διαφόρων πειραματικών ομάδων των επίμυων στο ΤΚΑ.

3.4. Πείραμα 4: Επίδραση της χορήγησης μη δραστικών δόσεων της 7-NI επί της χρονοεξαρτώμενης αμνησίας (ΤΘΑ).

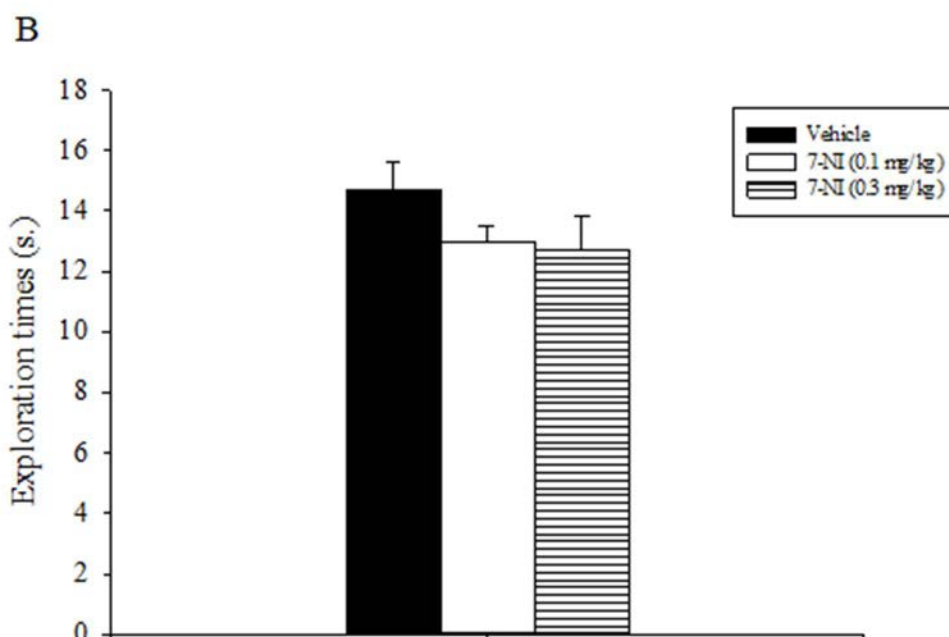
Σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων του δείκτη διάκρισης (Discrimination index D), παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα στη δράση της 7-NI, όπου $F = 13,257$ ($p < 0.001$). Μεταγενέστερες αναλύσεις των δεδομένων του πειράματος υπέδειξαν ότι τα ζώα της πειραματικής ομάδας που έλαβαν 0.3 mg/kg 7-NI παρουσίασαν τον υψηλότερο δείκτη διάκρισης, διαφέροντας σημαντικά από τις υπόλοιπες ομάδες (Διάγραμμα 3A). Επιπλέον τα παρόντα αποτελέσματα τεκμηριώνουν ότι η μικρότερη δόση της 7-NI (0.1 mg/kg) είναι αναποτελεσματική.

Fig. 3
A



Διάγραμμα 3Α: Δείκτης διάκρισης στη φάση T2 του TAA. * $p < 0.05$ έναντι όλων των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων.

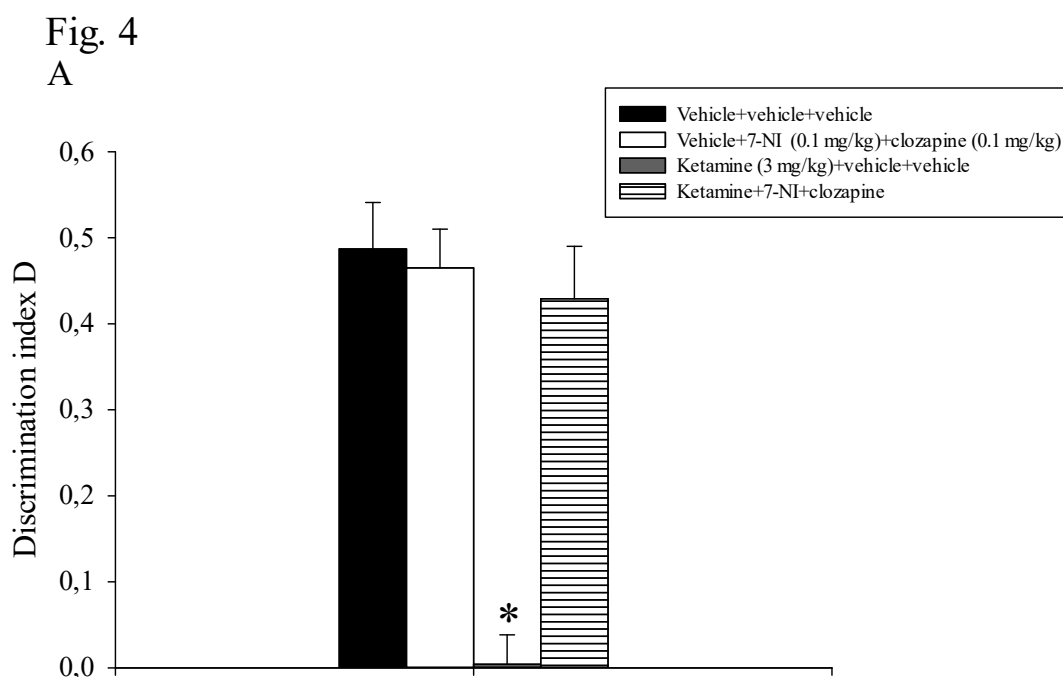
Επίσης, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του συνολικού χρόνου εξερεύνησης των αντικειμένων **δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά** μεταξύ των πειραματικών ομάδων (Διάγραμμα 3Β).



Διάγραμμα 3B: Χρόνος εξερεύνησης αντικειμένων της κάθε πειραματικής ομάδας κατά τη διάρκεια της T2.

3.5. Πείραμα 5: Επίδραση της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων 7-NI και κλοζαπίνης στα επαγόμενα από την κεταμίνη ελλείμματα απόδοσης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (TAA).

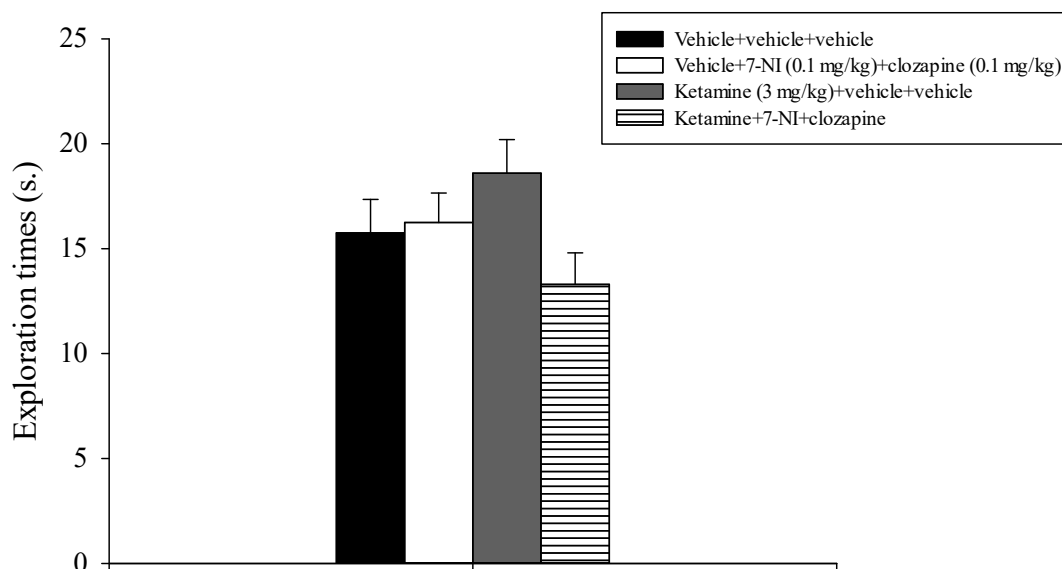
Η ανάλυση του δείκτη διάκρισης D (index D) αποκάλυψε στατιστικά σημαντική επίδραση της κεταμίνης $F_{1,31} = 27.760$, $p < 0.001$, του συνδυασμού 7-NI και κλοζαπίνης $F_{1,31} = 16.682$, $p < 0.001$, και σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην κεταμίνη και τον συνδυασμό μη δραστικών δόσεων 7-NI και κλοζαπίνης $F_{1,31} = 20.574$, $p < 0.001$. Αναλύσεις μετέπειτα των δεδομένων του πειράματος έδειξαν ότι τα ζώα της πειραματικής ομάδας που έλαβαν κεταμίνη + φυσιολογικό ορό + φυσιολογικό ορό **δεν είχαν την ικανότητα να ξεχωρίσουν το νέο από το γνώριμο αντικείμενο, σε αντίθεση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες, συμπεριλαμβανομένης της ομάδας που έλαβε κεταμίνη + 7-NI + κλοζαπίνη** (Διάγραμμα 4A).



Διάγραμμα 4A: Δείκτης διάκρισης κατά την δεύτερη φάση T2 του TAA.

Επιπλέον, η ανάλυση των αποτελεσμάτων του συνολικού χρόνου εξερεύνησης στην T2 **δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά** μεταξύ των πειραματικών ομάδων (Διάγραμμα 4B).

B



Διάγραμμα 4B: Χρόνος εξερεύνησης αντικειμένων της κάθε πειραματικής ομάδας κατά τη διάρκεια της T2.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σχιζοφρένεια όπως ήδη έχουμε αναφέρει αποτελεί μια ιδιαίτερα σύνθετη και πολυπαραγοντική διαταραχή, της οποίας **δεν υπάρχει προς το παρόν θεραπεία που να συμβάλει στην εξάλειψη όλων των συμπτωμάτων**. Η χρήση πειραματόζων στα πλαίσια προκλινικών μελετών έχει υπάρξει ιδιαίτερα κρίσιμη στην κατανόηση της νευροβιολογίας του εγκεφάλου των ασθενών και συνεπώς στην επιλογή των κατάλληλων νέων φαρμάκων που θα μπορέσουν να συνδυαστούν μελλοντικά με ήδη υπάρχοντα αντιψυχωσικά για την επίτευξη μέγιστων αποτελεσμάτων.

Κοινωνική Απόσυρση

Στο Τεστ Κοινωνικής Αλληλεπίδρασης (TKA), η δόση της κεταμίνης (8 mg/kg) που χορηγήθηκε αποδείχθηκε πως συνέβαλε στην μύηση των συμπτωμάτων κοινωνικής απόσυρσης στους επίμυες, η οποία χορηγήθηκε είτε σε συνδυασμό με ορό, είτε με 7-NI και επιπλέον ήταν η μόνη που προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κινητικής δραστηριότητας ζώων. Επιπροσθέτως, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως το αποτέλεσμα της δράσης της κεταμίνης στο TKA δεν μπορεί να ερμηνευτεί στη δράση της σχετικά με το άγχος, καθώς η ίδια δοσολογία της κεταμίνης (8 mg/kg), δεν επηρέασε την απόδοση των επίμυων σε προκλινικά μοντέλα άγχους. Συγχρόνως, **η χορήγηση της 7-NI (1 και 3 mg/kg) συνέβαλε στη μείωση, όχι όμως στην πλήρη αναστροφή των συμπτωμάτων της κοινωνικής απόσυρσης που επέφερε η**

κεταμίνη, τα οποία μελετήθηκαν καθώς συμπεριλαμβάνονται στα αρνητικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας. Συγκεκριμένα, οι πειραματικές ομάδες που έλαβαν κεταμίνη + 7-NI (1 και 3 mg/kg) εμφάνισαν στατιστικά χαμηλότερη αλληλεπίδραση σε σύγκριση με ομάδες των μαρτύρων, στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί κεταμίνη.

Ελλείμματα χωρικής αναγνωριστικής μνήμης

Στο Τεστ Θέσης Αντικειμένου (ΤΘΑ) η κεταμίνη (3 mg/kg) προκάλεσε ελλείμματα χωρικής αναγνωριστικής μνήμης, ενώ η **7-NI (1 και 3 mg/kg) μπόρεσε να αναστρέψει τα ελλείμματα** αυτά.

-Ελλείμματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης - δράση μη δραστικών δόσεων 7-NI και κλοζαπίνης

- **Χρονοεξαρτώμενη Αμνησία**

Σε αρχική φάση έγινε η μελέτη της χρονοεξαρτώμενης αμνησίας, δηλαδή των διαταραχών της μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης, μεταξύ του διαλείμματος των 24 ωρών ανάμεσα στη φάση T1 και T2 του πειράματος. Διεξήχθη λοιπόν το συμπέρασμα πως τα ελλείμματα αυτά, **αναστράφηκαν έπειτα από τη συγχορήγηση των μη δραστικών δόσεων 7-NI (0.1 mg/kg) – κλοζαπίνης (0.1 mg/kg).**

- **Ελλείμματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από κεταμίνη**

Το ΤΑΑ πραγματοποιήθηκε επίσης για τη διερεύνηση των ελλειμμάτων της μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης, τα οποία προκάλεσε η χορήγηση του ανταγωνιστή του NMDA υποδοχέα κεταμίνη (3 mg/kg). **Τα συμπτώματα αναστράφηκαν έπειτα από τη συγχορήγηση των μη δραστικών δόσεων 7-NI (0.1mg/kg) – κλοζαπίνης (0.1mg/kg)** όπως και στην παραπάνω περίπτωση. Διαπιστώθηκε λοιπόν, πως η ταυτόχρονη συνδυαστική χορήγηση ενός αναστολέα της NOS 7-NI και ενός άτυπου αντιψυχωσικού κλοζαπίνη σε προκλινικά μοντέλα, ανακουφίζει τα γνωσιακά ελλείμματα. Επομένως, η συνδυαστική χορήγηση των μη δραστικών δόσεων έχει συνεργιστική επίδραση και απαιτείται περεταίρω μελέτη για τη διερεύνηση της κλινικής χρησιμότητας του αποτελέσματος αυτού.

Ελλείμματα συναισθηματικής μνήμης

Η δόση της MK-801 (0.1 mg/kg) που χορηγήθηκε στη δοκιμασία παθητικής αποφυγής προκάλεσε διαταραχές στη συναισθηματική μνήμη των επίμυων, άλλο ένα χαρακτηριστικό που ανήκει στα αρνητικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας. **Η χορήγηση της 7-NI μετρίασε τις αρνητικές επιδράσεις της MK-801 στη συναισθηματική μνήμη.**

Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της 7-NI

Μέχρι σήμερα είναι **άγνωστος** ο τρόπος με τον οποίο η 7-NI μπορεί να μετριάσει τα συμπεριφορικά ελλείμματα που έχουν δημιουργηθεί από την χορήγηση της κεταμίνης και άλλων ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων. Σε γενικό πλαίσιο, οι σχιζοφρενικές επιδράσεις των ανταγωνιστών των υποδοχέων NMDA περιλαμβάνουν αυξήσεις στα επίπεδα του γλουταμικού, υπερκινητικότητα, στερεοτυπία, κοινωνική απόσυρση και γνωσιακά ελλείμματα και οι αντίστοιχες συμπεριφορικές επιδράσεις οφείλονται εν μέρει σε αύξηση της δραστηριότητας του NO. Αναφέρθηκε επίσης μια NO-εξαρτώμενη **αύξηση της σηματοδότησης cGMP** στο PFC ποντικού μετά από χορήγηση της PCP. Το L-NAME μετρίασε επίσης τα ελλείμματα προσοχής που προκλήθηκαν από την PCP, μειώνοντας την επαγόμενη από την PCP υπερπαραγωγή cGMP στο PFC του ποντικού. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο μη εκλεκτικός αναστολέας της NOS L-NAME και οι αναστολείς της iNOS AG και EGCG μείωσαν την υπερβολική εκροή γλουταμινικού από το PFC ως απόκριση στην MK-801 και την PCP. Τέλος, υπό το πρίσμα των στοιχείων ότι το NO εμπλέκεται στη φλεγμονή, μια εναλλακτική εξήγηση των αποτελεσμάτων των αναστολέων NOS σε προκλινικά πρότυπα σχιζοφρένειας θα μπορούσε να βασίζεται στις τεκμηριωμένες αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Αυτές έχουν περιγραφεί σε διάφορα προκλινικά πρότυπα ισχαιμίας του εγκεφάλου, της νόσου του Πάρκινσον και της νόσου του Alzheimer. Παρά το γεγονός πως η παθογένεια της σχιζοφρένειας παραμένει άγνωστη, έχει προταθεί μια **σύνδεση της με το οξειδωτικό στρες**. Σε γενική παραδοχή, οι ανταγωνιστές του γλουταμινικού συστήματος φαίνεται να αυξάνουν το οξειδωτικό στρες στα τρωκτικά. Έχει επίσης **σημειωθεί ισχυρή αντιοξειδωτική δράση** της 7-NI και του μη εκλεκτικού αναστολέα της NOS L-NAME, ο οποίος απέτρεψε το επαγόμενο από τη μεθαμφεταμίνη οξειδωτικό στρες. Το γεγονός ότι οι αναστολείς της NOS μπορούν να εξουδετερώσουν τις ψυχοσεομιμητικές επιδράσεις του γλουταμινικού συστήματος μπορεί να σχετίζεται με το αντιοξειδωτικό τους προφίλ, αλλά αυτό προφανώς πρέπει να επιβεβαιωθεί.

Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της συνδυαστικής θεραπείας

Για να μπορέσει να διερευνηθεί το κατά πόσο η συνδυαστική δράση της 7-NI με τα άτυπα αντιψυχωσικά θα επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση των συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας, θα πρέπει αρχικά να κατανοηθεί ο μηχανισμός δράσης τους **σε σχέση με τη νευροδιαβίβαση** στον εγκέφαλο. Έτσι, η συγχορήγηση 7-NI με άτυπα αντιψυχωσικά (πχ ρισπεριδόνη), βρέθηκε ότι ενισχύει την έκλυση DA εξηγώντας πιθανώς την αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπείας στη βελτίωση των ελλειμμάτων αναγνωριστικής μνήμης. Ένας άλλος μηχανισμός δράσης συνδυαστικής θεραπείας πιθανώς να οφείλεται στην **διεγερτική δράση της 7-NI και της κλοζαπίνης στην απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης**. Η ακετυλοχολίνη πρόκειται για έναν νευροδιαβιβαστή που εμπλέκεται στη μνήμη, τη μάθηση και την προσοχή, δηλαδή τις γνωστικές λειτουργίες. Συνεπώς, η δράση της 7-NI και των αντιψυχωσικών μπορεί να επηρεάσει την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης στον εγκέφαλο και να συμβάλουν στη βελτίωση των συμπτωμάτων των ψυχικών διαταραχών. Η συγκεκριμένη έρευνα παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, οι συμπεριφορικές επιδράσεις της 7-NI σε συνδυασμό με την κλοζαπίνη σε προκλινικά μοντέλα σχιζοφρένειας, προσομοιάζουν μόνο την υπολειτουργία του γλουταμινεργικού συστήματος. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά παραδείγματα αναγνωριστικής μνήμης για τον έλεγχο του ρόλου της 7-NI μόνο σε νεαρούς αρσενικούς αρουραίους. Κρίνεται συνεπώς αναγκαία η **διεξαγωγή περαιτέρω ερευνών για τη συνδυαστική δράση των φαρμάκων**, τόσο σε ηλικιωμένα όσο και σε θηλυκά τρωκτικά, καθώς και σε διάφορα μοντέλα σχιζοφρένειας όπως νευροαναπτυξιακά και φαρμακολογικά και τη συσχέτισή τους με περισσότερους νευροδιαβιβαστές και με περισσότερους αναστολείς της συνθάσης του NO.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της έρευνας υποδεικνύουν πως ο αναστολέας της NOS **7-NI μετρίασε την κοινωνική απόσυρση και τα ελλείμματα της αναγνωριστικής και συναισθηματικής μνήμης που προκαλούνται με τον αποκλεισμό του NMDA υποδοχέα** και συνεπώς μπορεί να προσφέρει οφέλη στη θεραπεία της σχιζοφρένειας. Τα παραπάνω είναι αρκετά σημαντικά, καθώς οι επιδράσεις της 7-NI σημειώθηκαν σε προκλινικά μοντέλα σχιζοφρένειας που μιμούνται τα αρνητικά συμπτώματα της νόσου, όπως τα γνωσιακά και συναισθηματικά ελλείμματα, καθώς και η κοινωνική απόσυρση. Αναφέρθηκε **επίσης η ικανότητα της 7-NI να συνδυάζεται στην αδρανή της δόση με αυτή του άτυπου νευροληπτικού κλοζαπίνη** ενισχύοντας την δράση του και ανοίγοντας νέους δρόμους για μελλοντικές θεραπευτικές στρατηγικές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- *Schizophrenia* (no date) *National Institute of Mental Health*. Available at: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia> (Accessed: 27 May 2024).
- PJ,, J.S.M. (no date) *Schizophrenia, Lancet (London, England)*. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35093231/> (Accessed: 27 May 2024).
- *Schizophrenia*. (n.d.). National Institute of Mental Health (NIMH). <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia>
- Sciencedirect. (n.d.). Mesocortical Pathway. In *Encyclopedia of Neuroscience*. Retrieved _____ from <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/mesocortical-pathway>
- Pitsikas, N. (2016). The Role of Nitric Oxide Synthase Inhibitors in Schizophrenia. *Current Medicinal Chemistry*, 23(24), 2692–2705. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160812151054>
- Gödecke A, Decking UK, Ding Z, Schrader J. Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology of NOS in the Heart. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:2085-105. doi: 10.2741/3846. PMID: 21196129; PMCID: PMC4159061.

- Choi D, Park J, Jang H, et al. S-Nitrosylation of CD44 Enhances MMP-9 Activity and Promotes Tumor Invasion by Chronic Hypoxia in OSCC. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6):784. doi: 10.3390/cancers11060784. PMID: 31195617; PMCID: PMC6400883.
- Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells*. 2010;29(5):435-42. doi: 10.1007/s10059-010-0052-4. PMID: 20458643; PMCID: PMC4032934.
- Friebe A, Koesling D. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. *Nitric Oxide*. 2009;21(4):149-56. doi: 10.1016/j.niox.2009.09.005. PMID: 19751713.
- Asbahi H, Pavan C, Ghasemian A, et al. S-Nitrosothiol profiling reveals differential protein pathways and metabolic adaptation during cell cycle in *Trypanosoma cruzi*. *Redox Biol*. 2022;54:102141. doi: 10.1016/j.redox.2021.102141. PMID: 34953855.
- Sun B, Xu W, Tang JH, Fu P. Levels of protein-induced hypoxia reverse S-nitrosylation in MCF-7 cells. *J Biol Chem*. 2021;296:100862. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100862. PMID: 34174633.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, et al. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(1):444-8. doi: 10.1073/pnas.89.1.444. PMID: 1729705; PMCID: PMC48224.
- Desbonnet, L. (2016). Mouse Models of Schizophrenia. In *Handbook of behavioral neuroscience* (pp. 267–284). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800981-9.00016-x>

- Tandon, N., & Tandon, R. (2019). Using machine learning to explain the heterogeneity of schizophrenia. Realizing the promise and avoiding the hype. *Schizophrenia Research, 214*, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.08.032>
- De Jonge, J. C., Vinkers, C. H., Pol, H. E. H., & Marsman, A. (2017). GABAergic Mechanisms in Schizophrenia: Linking Postmortem and In Vivo Studies. *Frontiers in Psychiatry, 8*. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00118>
- DSM-5 Criteria: Schizophrenia
- Erick Messias, MD, PhD,¹ Chuan-Yu Chen, Ph.D,² and William W. Eaton, Ph.D.³. Epidemiology of Schizophrenia: Review of Findings and Myths, NIH, doi: 10.1016/j.psc.2007.04.007
- Shah, Zahir; Brown, Lyn M (2017). "Metabolic Profiling of Hepatocellular Carcinoma in United Arab Emirates". United Arab Emirates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5554536/>
- Zuccoli ML, Crippa A, Dondi A, Bonati E. Tractotomy in severe Parkinson's disease: A 6-year follow-up study. *Neurol Sci.* 2014;35(8):1271-1274. doi:10.1007/s10072-014-1727-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4159061/>
- Stover JF, Kempinski O. Anesthesia increases circulating glutamate in neurointensive care patients. *Neurosci Lett.* 2013;539:81-86. doi:10.1016/j.neulet.2013.01.005. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030698771300131X>
- Olney JW, Farber NB. Glutamate hypothesis of schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry.* 1995;3(5):241-253. doi:10.3109/10673229509030591. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/glutamate-hypothesis-of-schizophrenia>

- Schuffel W, Simons CJP, Wichers M, van Os J, Marcelis M, Healthy individuals without auditory verbal hallucinations (AVH) report great similarity to AVH on anomalous sensory experiences and frontal/basal-ganglia resting-state functional connectivity_a transcultural neuroscience study, *Psychiatra Clinica, Neurosciences*, DOI: 10.1111/pcn.12823
- Cleveland Clinic, Antipsychotic Medications, <https://my.clevelandclinic.org/health/treatments/24692-antipsychotic-medications>
- Segura P, Cerrato V, Pérez J, et al. New Frontiers in the pharmacological management of schizoaffective disorder: Role of brexpiprazole, *Journal of Clinical Medicine*, 2021; 12(3):339, DOI: 10.3390/jcm12030339
- DrugBank, Aripiprazole, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00334>
- Krzystanek M, Skołacka K, Rutkowski K, Psychotic Disorders in Neurodegenerative Diseases, *Journal of Clinical Medicine*, 2021; 10(4):238, DOI: 10.3390/jcm10040238
- DrugBank, Aripiprazole, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00334>
- Baker JT, Holmes SE, Masters GA, et al. Disruption of cortical association networks in Schizophrenia and Psychotic Bipolar Disorder, *JAMA Psychiatry*, 2016; 73(7):609-618. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2016.0276.
- Porrini, V., Ramarao, N., Pellegrini-Giampietro, D. E., & Borsani, E. (2007). Dr. NO and Mr. Toxic – the versatile role of nitric oxide. *Toxicology*, 233(1-3), 61-71. <https://www.semanticscholar.org/paper/Dr.-NO-and-Mr.-Toxic-%E2%80%93-the-versatile-role-of-nitric-Porrini-Ramarao/a664bd7b0d8e3b8f4bb09f8a2d94e99c0b3bd973>

- Marteau, R., Aquino, R., M., De Sa, L. L., & Cipriani, F. M. (2015). Nitric Oxide Synthase Inhibition Improves the Memory Deficit in a Mouse Reversible Model of Chronic Psychosocial Stress. *PloS one*, 10(12), e0142044. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4426711/>
- Kalisch, R., & Koren, T. (2010). An alpha5 subunit selective GABAA receptor antagonist enhances cognitive performance in a bi-directional task specifically designed to detect baclofen-induced deficits. *European neuropsychopharmacology*, 20, S511. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0920996410012995>
- Vialou, V., Feng, J., Robison, A. J., & Nestler, E. J. (2014). Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 213-236. <https://www.nature.com/articles/npp2014323>
- PubChem. (n.d.). 7-Nitroindazole. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=1893&t=l>
- U.S. National Library of Medicine. (n.d.). 7-Nitroindazole - Mesh. Retrieved from <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=7-nitroindazole>
- Sandi, C., & Haller, J. (2015). Stress and the social brain: Behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(5), 290-304. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4419-1428-6_1008
- File, S. E. (1998). The social interaction test of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(7), 985-995. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/social-interaction-test>
- Granholm, A. C., Sanders, L. A., Crnic, L. S. (2000). Loss of cholinergic input to the hippocampus parallels spatial memory impairment in aged rats. *Soc Neurosci*

Abstracts 26, 648. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/spatial-memory>

- Baud, A., Otsuki, L., Hasler, R., Kondo, M., & Shakhman, O. (2021). Differentially induced hyperacetylation of histone H3 at monoaminergic gene promoters by acute and chronic aripiprazole treatment in an animal model of mania. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 24(S1), 407. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9930192/>
- Zelena, D. (2018). Interpretation of implications from the increased cell density in the nucleus accumbens shell following neonatal whisker cutting in the rat. *Cohort Effect and Hypothesis: Behavioral and Neuroendocrine Implications. Journal of Neuroendocrinology*, 30(3), e12584. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5672628/>
- Comim, C. M., Petronilho, F., Gavioli, E. C., Gavioli, E. C., & Quevedo, J. (2002). Nitric oxide and behavior: From neurotransmitters to neuroplasticity. *Experimental Neurology*, 196(1), 139-145. <https://doi.org/10.1006/exnr.2005.8002>
- Moncrief, A. M., Hard, M. L., Galpin, J. S., Pavan, S., Ashmeade, T., & Crean, S. (2015). Mechanism of action of risperidone: a dopamine D2 and serotonin 5-HT2A receptor antagonist. *Psychopharmacology Institute*. <https://psychopharmacologyinstitute.com/publication/mechanism-of-action-of-risperidone-2126>
- Al-Hasani, A. S., & Al-Mohannadi, S. (2021). Nitric oxide: Possible link between gut microbiome, mental health and psychiatric disorders - A narrative review. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 8318519. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8318519/>
- Li S, Wang KN, Li H, Li L, Wang JM. Antidepressant effect of different schedules of ketamine in rats. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007 Dec;8(12):916-24. doi: 10.1631/jzus.2007.B0916. PMID: 18164516.

- Zhang L, Wang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Therapeutic effect of a modified EMPM1.3 on ischemic brain damage in rats. Chin J Traumatol. 2001 Aug;4(3):170-5. PMID: 12587597; PMCID: PMC10659654.

