

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή εργασία

Ο δότης του μονοξειδίου του αζώτου μολσιδομίνη ανταγωνίζεται γνωσιακά ελλείμματα επαγόμενα από τον αγωνιστή των D1/D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων απομορφίνη στον επίμυ.

The Nitric Oxide (NO) Donor Molsidomine Attenuates Memory Impairments Induced by the D1/D2 Dopaminergic Receptor Agonist Apomorphine in the Rat

Βαρτζώκα Φωτεινή
Λάρισα, 2024

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)

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Σχιζοφρένεια.....	9
1.2 Διάγνωση.....	10
1.3 Αιτιοπαθολογία της Σχιζοφρένειας.....	11
1.3.1 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες.....	11
1.3.2 Γενετικοί Παράγοντες.....	11
1.3.3 Οξειδωτικό στρες.....	12
1.4 Διαταραχές στη Νευροδιαβίβαση.....	12
1.4.1 Ντοπαμινεργική υπόθεση.....	12
1.4.2 Γλουταμινεργική υπόθεση.....	14
1.4.3 Σεροτονινεργική υπόθεση.....	14
1.4.4 GABAεργική υπόθεση.....	14
1.5 Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	15
1.5.1 Αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς.....	16
1.5.2 Αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς.....	16
1.5.3 Αντιψυχωσικά τρίτης γενιάς.....	17
1.6 Ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιψυχωσικά.....	18
1.6.1 Κλοζαπίνη.....	18
1.6.2 Ρισπεριδόνη.....	18
1.7 Μονοξείδιο του αζώτου (NO).....	18
1.7.1 Σύνθεση του NO.....	19
1.7.2 Κύριοι στόχοι του NO.....	20
1.8 Νευροπροστατευτική δράση του NO.....	22
1.9 Νευροτοξική δράση του NO.....	22
1.10 NO και σχιζοφρένεια.....	23
1.10.1 Ιστοχημικές μελέτες.....	23
1.10.2 Γενετικές μελέτες.....	23
1.10.3 Βιοχημικές μελέτες.....	24
1.11 Δότες του NO.....	24
1.12 Μολιδομίνη.....	28
1.12.1 Προκλινικές μελέτες.....	29
2. Στόχος της μελέτης.....	30
3. Μέθοδοι και Υλικά.....	31

3.1 Πειραματόζωα.....	31
3.2 Φάρμακα.....	32
3.3 Πειραματικά μοντέλα σχιζοφρένειας.....	34
3.3.1 Χωρική αναγνωριστική μνήμη.....	34
Τεστ Θέσης Αντικειμένου (OLT).....	34
3.3.2 Συναισθηματική μνήμη.....	37
Τεστ παθητικής αποφυγής (STPAT).....	37
3.3.3 Μη χωρική αναγνωριστική μνήμη.....	38
Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου (ORT).....	39
4. Πειραματική διαδικασία.....	41
4.1 Πείραμα 1: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μολσιδομίνης στην εξασθένηση επαγόμενων από απομορφίνη ελλειμάτων απόδοσης στο τεστ θέσης αντικειμένου (OLT).....	41
4.2 Πείραμα 2: Επίδραση οξείας χορήγησης μολσιδομίνης στην εξασθένηση επαγόμενων από απομορφίνη ελλειμάτων απόδοσης στο τεστ παθητικής αποφυγής (STPAT).....	42
4.3 Πείραμα 3: Επίδραση της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και κλοζαπίνης στα επαγόμενα από απομορφίνη ελλείματα απόδοσης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT).....	42
4.4 Πείραμα 4: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στην φυσιολογική απώλεια μνήμης, εξεταζόμενες στο τεστ θέσης αντικειμένου (ORT).....	43
4.5 Πείραμα 5: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στα επαγόμενα από την απομορφίνη ελλείματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης εξεταζόμενα στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT).....	44
4.6 Στατιστική ανάλυση.....	45
5. Αποτελέσματα.....	45
5.1 Πείραμα 1: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μολσιδομίνης στην εξασθένηση επαγόμενων από την απομορφίνη ελλειμάτων απόδοσης στο τεστ θέσης αντικειμένου (OLT).....	45
5.2 Πείραμα 2: Επίδραση οξείας χορήγησης μολσιδομίνης στην εξασθένηση των επαγόμενων από την απομορφίνη ελλειμάτων απόδοσης στο τεστ παθητικής αποφυγής (STPAT).....	47
5.3 Πείραμα 3: Επίδραση της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και κλοζαπίνης στα επαγόμενα από την απομορφίνη ελλείματα απόδοσης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT).....	48
5.4 Πείραμα 4: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στην φυσιολογική απώλεια μνήμης, εξεταζόμενες στο τεστ θέσης αντικειμένου (ORT).....	50
5.5 Πείραμα 5: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στα επαγόμενα από την απομορφίνη ελλείματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης εξεταζόμενα στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT).....	51
6. Συζήτηση.....	53
6.1 Τεστ θέσης αντικειμένου (Object Location Task).....	53
6.2 Δοκιμασία παθητικής αποφυγής (Step-Through Passive Avoidance Task).....	54

6.3 Τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (Object Recognition Task).....	54
6.4 Μηχανισμός δράσης της μολσιδομίνης.....	54
6.5 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της συνδυαστικής θεραπείας.....	55
7. Συμπεράσματα.....	56
8. Ευχαριστίες	
9. Βιβλιογραφία.....	56

Περίληψη

Η σχιζοφρένεια είναι μια σοβαρή ψυχιατρική διαταραχή η οποία επηρεάζει περίπου το 1% του παγκόσμιου πληθυσμού. Χαμηλά επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) φαίνεται να συνδέονται με την παθογένεια της διαταραχής αυτής, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι δότες του NO μπορούν να επαναφέρουν στα φυσιολογικά τα επίπεδα του NO στους σχιζοφρενείς. Η μολσιδομίνη είναι δότης NO και στην παρούσα μελέτη μελετάται η ικανότητα της να αναστρέφει την αμνησιακή επίδραση του αγωνιστή των D1/D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων απομορφίνη. Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της μολσιδομίνης στα ελλείμματα χωρικής μνήμης επαγόμενα από την απομορφίνη χρησιμοποιήθηκε το τεστ θέσης αντικειμένου. Η επίδραση της μολσιδομίνης στα ελλείμματα συναισθηματικής μνήμης επαγόμενα από απομορφίνη προσδιορίστηκε μέσω της δοκιμασίας παθητικής αποφυγής. Επίσης χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός της μολσιδομίνης και των άτυπων αντιψυχωσικών κλοζαπίνης και ρισπεριδόνης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου για την εξέταση της επίδρασης του συνδυασμού αυτού στην χρονοεξαρτώμενη και στην επαγόμενη από απομορφίνη απώλεια μνήμης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μολσιδομίνη ανέστρεψε την επίδραση της απομορφίνης τόσο στην χωρική μνήμη όσο και στην συναισθηματική μνήμη. Επίσης ο συνδυασμός μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και κλοζαπίνης/ριςπεριδόνης βελτίωσε την μη χωρική αναγνωριστική μνήμη και μετά από χορήγηση απομορφίνης αλλά και μετά από χρονοεξαρτώμενη απώλεια μνήμης. Το συμπέρασμα επομένως είναι ότι η μολσιδομίνη μπορεί να εξασθενήσει γνωσιακά ελλείμματα επαγόμενα από την δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος και μπορεί να αποτελέσει ένα νέο υποσχόμενο φάρμακο στην θεραπεία των ανάλογων συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας.

Abstract

Several lines of evidence suggest that scarcity of the gaseous molecule nitric oxide (NO) is associated with the pathogenesis of schizophrenia. Therefore, compounds, such as NO donors, that can normalize NO levels might be of utility for the treatment of this pathology. It has been previously shown that the NO donor molsidomine attenuated schizophrenia-like behavioral deficits caused by glutamate hypofunction in rats. The aim of the current study was to investigate the efficacy of molsidomine and that of the joint administration of this NO donor with sub-effective doses of the non-typical antipsychotics clozapine and risperidone to counteract memory deficits associated with dysregulation of the brain dopaminergic system in rats. Molsidomine (2 and 4 mg/kg) attenuated spatial recognition and emotional memory deficits induced by the mixed dopamine (DA) D1/D2 receptor agonist apomorphine (0.5 mg/kg). Further, the joint administration of sub-effective doses of molsidomine (1 mg/kg) with those of clozapine (0.1 mg/kg) or risperidone (0.03 mg/kg) counteracted non-spatial recognition memory impairments caused by apomorphine. The present findings propose that molsidomine is sensitive to DA dysregulation since it attenuates memory deficits induced by apomorphine. Further, the current findings reinforce the potential of molsidomine as a complementary molecule for the treatment of schizophrenia

1. Εισαγωγή

1.1 Σχιζοφρένεια

Η σχιζοφρένεια είναι μια πολύπλοκη ψυχιατρική διαταραχή, η οποία υπολογίζεται ότι επηρεάζει το 1% του πληθυσμού και με πλήθος διαφορετικών συμπτωμάτων. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων στους ασθενείς ξεκινά στα όψιμα χρόνια της εφηβείας έως και το τέλος της τρίτης δεκαετίας της ζωής τους, ενώ σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να συμβεί πριν την εφηβεία. Στους άνδρες η έναρξη των συμπτωμάτων συμβαίνει σύντομα μετά την συμπλήρωση του 20ου έτους, ενώ στις γυναίκες πέντε με έξι χρόνια αργότερα, αλλά η συχνότητα της διαταραχής είναι όμοια και για τα δύο φύλα. (1) Η εμφάνιση αυτής της διαταραχής συχνά επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: θετικά, αρνητικά συμπτώματα και γνωσιακά ελλείμματα. Τα θετικά συμπτώματα σχετίζονται με αυξημένη νευροδιαβίβαση ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα και χαρακτηρίζονται από παραμόρφωση ή υπερβολή των φυσιολογικών λειτουργιών (2). Στα θετικά συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται οι ψευδαισθήσεις, ο αποδιοργανωμένος λόγος και επικοινωνία, οι παραληρηματικές ιδέες, και η κατάφωρα αποδιοργανωμένη ή κατατονική συμπεριφορά (1). Τα αρνητικά συμπτώματα και τα γνωσιακά ελλείμματα είναι αποτέλεσμα της υποδιέγερσης του D1 ντοπαμινεργικού υποδοχέα στον προμετωπιαίο φλοιό και χαρακτηρίζονται ως μείωση ή απώλεια φυσιολογικών λειτουργιών. Στα αρνητικά συμπτώματα συγκαταλέγονται η κοινωνική απόσυρση και οι περιορισμοί στο εύρος και στην ένταση της συναισθηματικής έκφρασης, στην ευχέρεια λόγου και σκέψης (αλογία), και στην έναρξη στοχοθετημένης συμπεριφοράς (αβουλία), ενώ τα γνωσιακά ελλείμματα αφορούν προβλήματα μνήμης και ελλειμματικής προσοχής.

Η πλειοψηφία των φαρμάκων που χορηγούνται για την αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας είναι ανταγωνιστές υποδοχέων ντοπαμίνης. Τα διαθέσιμα φάρμακα έχουν πολλά μειονεκτήματα όσον αφορά την αποτελεσματικότητά τους και ποικιλία παρενεργειών. Ενώ ανακουφίζουν τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας, δεν είναι το ίδιο αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των αρνητικών συμπτωμάτων και των γνωσιακών ελλειμμάτων και παράλληλα ένα 30% των ασθενών εμφανίζει ανθεκτικότητα. Τα τυπικά αντιψυχωσικά έχουν συσχετιστεί με παρκινσονισμό, ενώ τα ατυπικά αντιψυχωσικά με την αύξηση του

σωματικού βάρους το οποίο συνεπάγεται υπερλιπιδαιμία, διαβήτη και καρδιαγγειακά προβλήματα. (2,3) Είναι επομένως μείζονος σημασίας η εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο εύρος συμπτωμάτων χωρίς να εμφανίζουν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

1.2 Διάγνωση

Σύμφωνα με το διαγνωστικό και στατιστικό εγχειρίδιο ψυχικών διαταραχών (DSM) τα διαγνωστικά κριτήρια της σχιζοφρένειας είναι τα εξής:

A. Πρέπει ο ασθενής να εμφανίσει δύο ή περισσότερα συμπτώματα από τα παρακάτω, ένα από τα οποία πρέπει να ανήκει στα τρία πρώτα, για σημαντικό διάστημα κατά τη διάρκεια ενός μήνα.

1. Παραληρητικές ιδέες
2. Ψευδαισθήσεις
3. Κατάφωρα αποδιοργανωμένη ή κατατονική συμπεριφορά
4. Αρνητικά συμπτώματα

B. Για σημαντικό χρονικό διάστημα μετά την πρώτη εμφάνιση συμπτωμάτων, η απόδοση του ασθενή σε έναν ή περισσότερους τομείς της ζωής του όπως η εργασία, οι διαπροσωπικές σχέσεις ή η προσωπική φροντίδα, είναι σημαντικά χαμηλότερη από ότι πριν την έναρξη των συμπτωμάτων.

Γ. Συνεχής ύπαρξη ενδείξεων της ασθένειας για τουλάχιστον έξι μήνες. Αυτοί οι έξι μήνες πρέπει να περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα μήνα συμπτωμάτων και μπορεί να συμπεριλαμβάνουν και περιόδους προδρομικών ή υπολειμματικών συμπτωμάτων. Κατά τη διάρκεια αυτών των περιόδων, οι ενδείξεις μπορεί να εμφανίζονται ως αρνητικά συμπτώματα ή και ως εξασθενημένα θετικά συμπτώματα.

Δ. Η σχιζοσυναισθηματική διαταραχή και η καταθλιπτική ή διπολική διαταραχή με ψυχωσικά χαρακτηριστικά έχουν αποκλειστεί.

Ε. Τα συμπτώματα δεν αποδίδονται σε χρήση ουσιών ή άλλο ιατρικό λόγο

ΣΤ. Εάν υπάρχει ιστορικό αυτισμού ή επικοινωνιακής διαταραχής στην παιδική ηλικία, η πρόσθετη διάγνωση σχιζοφρένειας γίνεται μόνο εάν υπάρχουν εμφανείς παραληρητικές ιδέες ή ψευδαισθήσεις, εκτός από τα άλλα απαιτούμενα για τη διάγνωση συμπτώματα, για τουλάχιστον ένα μήνα.

1.3 Αιτιοπαθολογία της Σχιζοφρένειας

Τα ακριβή αίτια της σχιζοφρένειας δεν είναι ακόμα σαφή, καθώς εμπλέκονται πολλοί παράγοντες στην ανάπτυξη της ασθένειας. Έχει παρατηρηθεί επίδραση του περιβάλλοντος, του γενετικού υποβάθρου, καθώς και νευροαναπτυξιακών διαταραχών.(3) Επίσης έχει προταθεί η εμπλοκή του οξειδωτικού στρες (4) ενώ η δυσλειτουργία διαφόρων νευροδιαβιβαστών, όπως η ντοπαμίνη, το γλουταμικό, το GABA και η σεροτονίνη έχει αποδειχθεί ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. (5)

1.3.1 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που συνδέουν την εμφάνιση της σχιζοφρένειας με επιπλοκές στην κύηση και τον τοκετό, καθώς και με την κατάχρηση ουσιών ή την έκθεση σε τοξικούς παράγοντες και ιογενείς λοιμώξεις. Ωστόσο δεν είναι σαφές εάν τα παραπάνω αποτελούν αίτια για την ανάπτυξη σχιζοφρένειας ή αν επισπεύδουν την εμφάνισή της. Επίσης φαίνεται να υπάρχει σύνδεση με την εμφάνιση της σχιζοφρένειας και το περιβάλλον γέννησης και ανατροφής, καθώς τα ποσοστά των σχιζοφρενών είναι υψηλότερα σε μεγάλες πόλεις από ότι σε αγροτικές περιοχές. (6)

1.3.2 Γενετικοί Παράγοντες

Έχουν διεξαχθεί αρκετές έρευνες για την συσχέτιση της σχιζοφρένειας με γενετικούς παράγοντες, στις οποίες έχουν εξετασθεί μέλη της ίδιας οικογένειας, καθώς και μονοζυγωτικά δίδυμα. Ωστόσο οι γενετικοί παράγοντες είναι δύσκολο να διαχωριστούν από τους περιβαλλοντικούς όταν εξετάζονται οικογένειες που ζουν στο ίδιο ή παρόμοιο περιβάλλον. Παρόλα αυτά το ο κίνδυνος εμφάνισης σχιζοφρένειας αυξάνεται σε 10% σε

συγγενείς πρώτου βαθμού σχιζοφρενών, σε 40% σε μονοζυγωτικά δίδυμα και σε 48% σε παιδιά με δύο γονείς που πάσχουν από σχιζοφρένεια. (6) Η σχιζοφρένεια πιθανολογείται ότι οφείλεται σε πολλαπλούς γενετικούς παράγοντες, καθένας από τους οποίους συνεισφέρει σε πολύ μικρό βαθμό στον τελικό φαινότυπο. Τα δεδομένα των ερευνών που γίνονται σε μονοζυγωτικά δίδυμα υποδηλώνει επίσης την επίδραση επιγενετικών παραγόντων. Είναι μεγάλος ο αριθμός των γονιδίων που θεωρούνται ύποπτα για την εμφάνιση της ασθένειας, αλλά δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος. (7)

1.3.3 Οξειδωτικό στρες

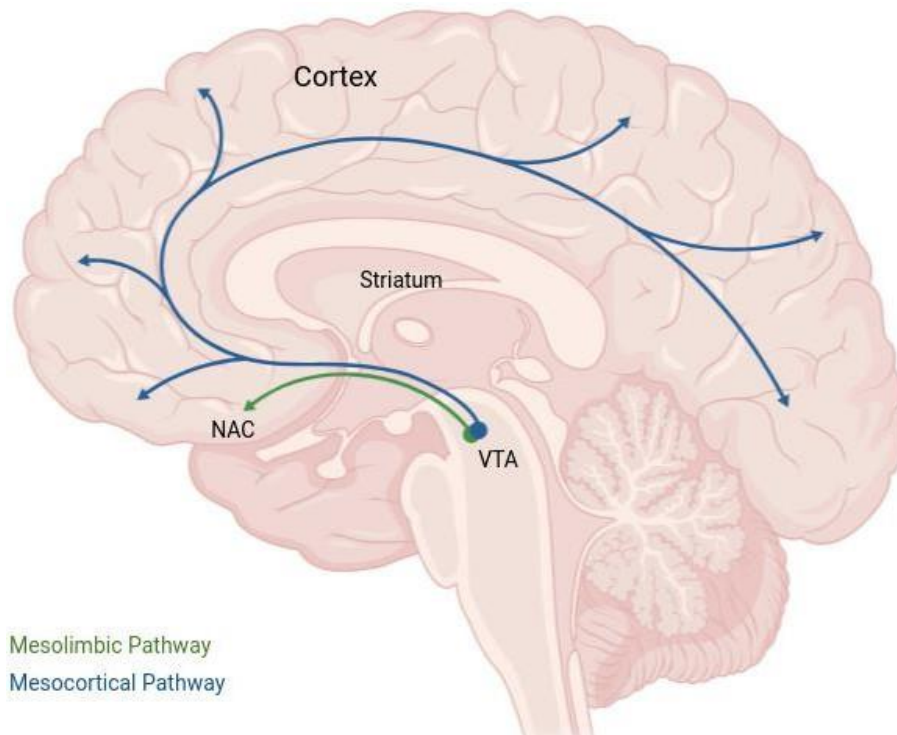
Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και οξείδωση μορίων όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και DNA. Η επίδραση του οξειδωτικού στρες στη λειτουργία και την βιωσιμότητα των κυττάρων είναι ο λόγος για τον οποίο το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την επιδεινωτική πρόοδο της νόσου. (8)

1.4 Διαταραχές στη Νευροδιαβίβαση

1.4.1 Ντοπαμινεργική υπόθεση

Η ντοπαμινεργική υπόθεση προτάθηκε πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960 με την διαπίστωση ότι αντιψυχωσικοί παράγοντες μπλοκάρουν ντοπαμινεργικούς υποδοχείς. Ενισχύθηκε αργότερα με την ανακάλυψη ότι οι αμφεταμίνες, οι οποίες είναι ουσίες που αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ντοπαμίνης, προκαλούν ψύχωση. Η υπόθεση αυτή θεμελιώθηκε το 1970, με τα κλινικά δεδομένα που έδειχναν την αποτελεσματικότητα και την υψηλή συγγένεια των αντιψυχωσικών με τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς. Αντικρουόμενα στοιχεία της αρχικής ντοπαμινεργικής υπόθεσης ωστόσο οδήγησαν σε εκ νέου διατύπωσή της. Σύμφωνα με την σύγχρονη ντοπαμινεργική υπόθεση, τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας είναι το αποτέλεσμα της υπερδιέγερσης του υποδοχέα D2

του επικλινή πυρήνα λόγω αυξημένης δραστηριότητας της μεσομεταιχμιακής οδού, ενώ τα αρνητικά συμπτώματα και οι γνωσιακές διαταραχές οφείλονται στην υποδιέγερση του υποδοχέα D1 του προμετωπιαίου φλοιού που προκαλείται από μειωμένη δραστηριότητα της μεσοφλοιώδους οδού.



Εικόνα 1: Η μεσοφλοιώδης οδός (mesocortical) είναι η ντοπαμινεργική οδός που συνδέει την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή με τον προμετωπιαίο φλοιό. Η μεσομεταιχμιακή οδός (mesolimbic) είναι η ντοπαμινεργική οδός που συνδέει την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή με τον επικλινή πυρήνα.

Παρά τον μεγάλο όγκο αποδείξεων που στηρίζουν την ντοπαμινεργική υπόθεση, υπάρχουν και στοιχεία που δεν συνάδουν με αυτή, όπως είναι η ιδιαίτερα υψηλή αποτελεσματικότητα του αντιψυχωσικού κλοζαπίνη, η οποία εμφανίζει εξαιρετικά χαμηλή συγγένεια με τον D2 υποδοχέα.

1.4.2 Γλουταμινεργική υπόθεση

Υπάρχουν επαρκείς πειραματικές αποδείξεις που προτείνουν ότι η υπολειτουργία του γλουταμινεργικού συστήματος εμπλέκεται στη σχιζοφρένεια. Η μη φυσιολογική μεταγωγή του γλουταμινεργικού συστήματος οδηγεί σε δευτερογενή ντοπαμινεργική δυσλειτουργία στο ραβδωτό σώμα και τον προμετωπιαίο φλοιό. (10) Δυσλειτουργία του γλουταμινεργικού συστήματος επηρεάζει την λειτουργία των υποδοχέων NMDA. Οι NMDA υποδοχείς είναι προσδετο-εξαρτώμενοι δίαυλοι ιόντων που είναι σημαντικοί για τη διεγερτική νευροδιαβίβαση. Ανταγωνιστές των υποδοχέων αυτών όπως η φαινκυκλιδίνη και η κεταμίνη επάγουν συμπτώματα παρόμοια με αυτά της σχιζοφρένειας. Επιπλέον, πειράματα με ουσίες οι οποίες αυξάνουν την λειτουργία των NMDA υποδοχέων έχει φανεί να εξασθενούν τα συμπτώματα αυτά. Δυσλειτουργία των NMDA υποδοχέων επίσης οδηγεί σε μορφολογικές και δομικές αλλαγές οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε ψύχωση. (2)

1.4.3 Σεροτονινεργική υπόθεση

Η σεροτονινεργική υπόθεση της σχιζοφρένειας ήταν αποτέλεσμα της επίδρασης του παραισθησιογόνου διαιθυλαμιδίου του λυσεργικού οξέος (LSD), του οποίου ο μηχανισμός συνδέεται με την δράση της σεροτονίνης. Έχει προταθεί ότι η υπερφόρτωση σεροτονίνης ως αποτέλεσμα του άγχους μπορεί να επιδράσει αρνητικά στους νευρώνες του φλοιού στη σχιζοφρένεια. Σεροτονινεργικοί ανταγωνιστές του 5-HT_{2A} υποδοχέα φαίνεται να ανακουφίζουν τις εξωπυραμидικές παρενέργειες των αντιψυχωσικών φαρμάκων. Παρόλο που δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι μηχανισμοί με τους οποίους η σηματοδότηση της σεροτονίνης επηρεάζει τη σχιζοφρένεια, οι υποδοχείς 5-HT₃ και 5-HT₆ αποτελούν πολλά υποσχόμενους στόχους για την ανάπτυξη νέων αντιψυχωσικών που θα ανακουφίζουν τα αρνητικά και γνωσιακά συμπτώματα της νόσου. (2)

1.4.4 GABAεργική υπόθεση

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο ρόλος του στη σχιζοφρένεια λαμβάνει όλο και περισσότερη προσοχή. Οι GABAεργικοί ενδονευρώνες είναι απαραίτητοι για την καταστολή του ΚΝΣ, καθώς είναι υπεύθυνοι για το συγχρονισμό και τις ταλαντώσεις δραστηριότητας

των νευρώνων, ελέγχοντας έτσι λειτουργίες όπως η μνήμη, η αντίληψη και άλλους γνωσιακούς μηχανισμούς. Μεταθανάτιες μελέτες υποστήριξαν ότι ανωμαλίες στη GABAεργική λειτουργία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεση της σχιζοφρένειας. Είναι σημαντικό ότι η μείωση της αποκαρβοξυλάσης γλουταμινικού οξέος-67, ένα συνθετικό ένζυμο GABA παρατηρήθηκε σε μέρη του εγκεφάλου που συνδέονται με κρίσιμες γνωστικές λειτουργίες. Η μείωση της μεταγωγής μέσω του υποδοχέα νευροτροφίνης TrkB οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση GABA σε υποπληθυσμό νευρώνων GABA που περιέχει παρβαλβουμίνη στον ραχιαίο προμετωπιαίο φλοιό ασθενών με σχιζοφρένεια. Παρά τις αντισταθμιστικές αποκρίσεις, η προκύπτουσα αλλαγή στην περισωματική αναστολή των πυραμιδικών νευρώνων οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα των μηχανισμών που είναι απαραίτητοι για τη λειτουργική μνήμη. Σε κλινικές μελέτες η χορήγηση αγωνιστών του GABA φάνηκε να εξασθενούν τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας. Ωστόσο η αλληλεπίδραση του GABA με άλλους νευροδιαβιβαστές δεν είναι ακόμα σαφής.

1.5 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Λόγω της περιορισμένης κατανόησης της σχιζοφρένειας, η θεραπεία που ακολουθείται είναι συμπτωματική, δηλαδή έχει ως στόχο την εξομάλυνση των συμπτωμάτων. Τα φάρμακα που χορηγούνται αναφέρονται ως αντιψυχωσικά, αλλά χρησιμοποιούνται και εκτός των περιπτώσεων σχιζοφρένειας, όπως σε περιπτώσεις μανίας, εγκεφαλικών βλαβών, παραληρήματος και άλλων οξέων συμπεριφορικών διαταραχών. Τα περισσότερα αντιψυχωσικά είναι ανταγωνιστές των D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων, αν και αρκετά εμφανίζουν συγγένεια και για τους 5-HT_{2A} σεροτονινεργικούς υποδοχείς, γεγονός το οποίο μπορεί να εμφανίζει αντίκτυπο στην κλινική τους αποτελεσματικότητα. Η παρούσες θεραπευτικές προσεγγίσεις εμφανίζουν αρκετά προβλήματα όσον αφορά την αποτελεσματικότητά τους και τις παρενέργειες που εμφανίζουν. Πολλοί ασθενείς χρειάζονται θεραπεία με αντιψυχωσικά για όλη τους τη ζωή. Ενώ τα αντιψυχωσικά, ή νευροληπτικά, είναι αποτελεσματικά έναντι των θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας και προλαμβάνουν την υποτροπή, δεν εμφανίζουν την ίδια ικανότητα στην αντιμετώπιση των αρνητικών συμπτωμάτων και των γνωσιακών ελλειμμάτων.

Είναι πλέον εμφανές ότι η ποιότητα ζωής των ασθενών έχει βελτιωθεί μετά την χρήση των αντιψυχωσικών φαρμάκων. Αυτό φαίνεται κυρίως από την μείωση των νοσηλευόμενων σε ψυχιατρικές κλινικές σχιζοφρενών στις δεκαετίες του 1950 και του 1960, το οποίο είναι αποτέλεσμα της χρήσης αντιψυχωσικών σε συνδυασμό με την αλλαγή των πρωτοκόλλων συμπεριφοράς απέναντι στους ασθενείς. Όμως, τα παρόντα φάρμακα εμφανίζουν ακόμα πολλά προβλήματα, όπως είναι η ανθεκτικότητα μεγάλου ποσοστού των ασθενών απέναντί τους, η ανικανότητά τους να αντιμετωπίσουν τα αρνητικά συμπτώματα και ο μεγάλος αριθμός παρενεργειών που εμφανίζουν, όπως τα εξωπυραμидικά συμπτώματα, οι ηρεμιστικές και ενδοκρινικές επιδράσεις, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν σε μη συμμόρφωση των ασθενών με τις φαρμακευτικές τους οδηγίες. (2)

1.5.1 Αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς

Η ιστορία των αντιψυχωσικών πρώτης γενιάς (ή τυπικών αντιψυχωσικών) ξεκινά με την ανακάλυψη της χλωροπρομαζίνης, η οποία ανήκει στις φαινοδιαζίνες. Γενικά τα νευροληπτικά πρώτης γενιάς δρουν μέσω του αποκλεισμού όλων των D2 υποδοχέων στον εγκέφαλο, χωρίς όμως να εμφανίζουν εκλεκτικότητα για κάποιο συγκεκριμένο ντοπαμινεργικό μονοπάτι στο ΚΝΣ, οδηγώντας έτσι σε ποικιλία παρενεργειών, όπως εξωπυραμидικά συμπτώματα και αύξηση προλακτίνης. Τα αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς χωρίζονται σε κατηγορίες, κυριότερες από τις οποίες είναι οι φαινοδιαζίνες, οι βουτυροφαινόνες και οι θειοξανθίνες. (2)

1.5.2 Αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς

Το πρώτο αντιψυχωσικό δεύτερης γενιάς (ή άτυπο αντιψυχωσικό) που εγκρίθηκε από τον FDA ήταν η κλοζαπίνη. Άλλα φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι η ρισπεριδόνη, η ολανζαπίνη, κουετιαπίνη, παλιπεριδόνη, ζιπρασιδόνη και η μολινδόνη. Γενικά, τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς, σε σύγκριση με αυτά της πρώτης, είναι πιο ικανά στον αποκλεισμό των 5-HT_{2A} υποδοχέων έναντι των D2, κι επίσης εμφανίζουν ασθενέστερο αποκλεισμό των D2 υποδοχέων σε σύγκριση με τα πρώτης γενιάς, το οποίο οδηγεί και σε εξασθενημένα εξωπυραμидικά συμπτώματα. (2) Υπάρχει επίσης η υπόθεση ότι τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τους

ντοπαμινεργικούς υποδοχείς του φλοιού και μεταιχμιακών περιοχών. (11) Εκτός από τη σχιζοφρένεια, τα άτυπα αντιψυχωσικά χρησιμοποιούνται σε άλλες ασθένειες, όπως η διπολική διαταραχή, η αγχώδης διαταραχή, η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή, η διέγερση που σχετίζεται με την άνοια και τη διαταραχή του φάσματος του αυτισμού. Τις τελευταίες δεκαετίες τα αντιψυχωσικά πρώτης γενιάς έχουν σχεδόν πλήρως αντικατασταθεί από τα αντιψυχωσικά δεύτερης γενιάς, κυρίως λόγω των μειωμένων εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων που εμφανίζουν λόγω της ανταγωνιστικής τους δράση στον 5-HT_{2A} υποδοχέα.(2)

1.5.3 Αντιψυχωσικά τρίτης γενιάς

Στα αντιψυχωσικά τρίτης γενιάς συγκαταλέγονται η αραπιπραζόλη, η καριπραζίνη και η μπρεξιπραζόλη. Τα φάρμακα αυτά έχουν ξεχωριστεί σε διαφορετική κατηγορία λόγω του διαφορετικού μηχανισμού δράσης τους. Σε αντίθεση με τα άλλα νευροληπτικά, τα τρίτης γενιάς δεν είναι D₂ ανταγωνιστές, αλλά D₂ μερικοί αγωνιστές. Οι ιδιότητες μερικού αγωνιστή της αραπιπραζόλης οδηγούν στην καταστολή της συσσώρευσης cAMP και σε περιπτώσεις υψηλής εξωκυτταρικής συγκέντρωσης ντοπαμίνης, για παράδειγμα σε μεσομεταιχμιακές περιοχές, η αραπιπραζόλη δρα ως ανταγωνιστής και μειώνει την δράση της ντοπαμίνης, οδηγώντας σε κλινικά οφέλη. Από την άλλη, σε περιπτώσεις χαμηλής εξωκυττάριας συγκέντρωσης ντοπαμίνης, η αραπιπραζόλη μπορεί να συνδεθεί σε υποδοχείς ντοπαμίνης και να τους ενεργοποιήσει μερικώς, σταθεροποιώντας έτσι τα επίπεδα ντοπαμίνης. Η αραπιπραζόλη επίσης εμφανίζει ασθενέστερα εξωπυραμιδικά συμπτώματα από άλλα αντιψυχωσικά, καθώς και χαμηλότερη αύξηση βάρους, γλυκόζης και χοληστερόλης σε σύγκριση με την κλοζαπίνη, τη ρισπεριδόνη και την αλοπεριδόλη.

Η εισαγωγή νέων αντιψυχωσικών στην κλινική πρακτική έχει συμβάλει κυρίως στην μείωση των εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων. Ωστόσο η χρησιμότητα αντικατάστασης των τυπικών αντιψυχωσικών από τα άτυπα είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Άλλοι ασθενείς ανταποκρίνονται καλύτερα στα άτυπα και άλλοι καλύτερα στα τυπικά αντιψυχωσικά. Ωστόσο απαιτείται επιπλέον έρευνα, και εξετάζονται νέες ουσίες για την αποτελεσματικότητά τους στην θεραπεία της σχιζοφρένειας.

1.6 Ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιψυχωσικά

1.6.1 Κλοζαπίνη

Η κλοζαπίνη είναι αντιψυχωσικό δεύτερης γενιάς, το οποίο παρουσιάζει σχετική αποτελεσματικότητα σε ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε άλλα αντιψυχωσικά. Η κλοζαπίνη ήταν το πρώτο αντιψυχωσικό που εμφάνισε μικρή άμβλυνση των αρνητικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας, εμφανίζοντας ελάχιστα εξωπυραμидικά συμπτώματα. Αυτές οι ιδιότητες της οφείλονται στην δράση της ως ανταγωνιστής των D_4 και $5-HT_{2A}$ υποδοχέων. Συνολικά η κλοζαπίνη συνδέεται στους D_{1-5} υποδοχείς με συγγένεια δέκα φορές μεγαλύτερη για τους D_4 από ότι για τους D_2 . Είναι επίσης μερικός αγωνιστής των $5-HT_{1A}$ γεγονός το οποίο φαίνεται να οφείλεται για την επίδρασή της στα αρνητικά και τα γνωσιακά συμπτώματα. Όμως η κλοζαπίνη χορηγείται σε ασθενείς που έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον δύο άλλα αντιψυχωσικά, καθώς μπορεί να προκαλέσει ακοκκιοκυτταραιμία, η οποία είναι θανατηφόρα. (2)

1.6.2 Ρισπεριδόνη

Η ρισπεριδόνη είναι από τα νεότερα άτυπα αντιψυχωσικά. Η θεραπευτική της δράση οφείλεται στον ανταγωνισμό των D_2 και των $5-HT_{2A}$, με τον ανταγωνισμό για τον $5-HT_{2A}$ πολύ πιο έντονο από ότι για τον D_2 . Η χρήση της ρισπεριδόνης μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων προλακτίνης, σε αρρυθμία, άγχος, πονοκεφάλους, αϋπνία, αύξηση βάρους, καταστολή, κόπωση και γαστρεντερικά προβλήματα. Παρόλα αυτά, η ρισπεριδόνη είναι από τα αντιψυχωσικά που χορηγούνται πιο συχνά, καθώς εκτός από τα θετικά συμπτώματα, ανακουφίζει ελαφρώς και τα αρνητικά, και εμφανίζει και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες. Ο ενεργός μεταβολίτης της ρισπεριδόνης είναι η παλιπεριδόνη, η οποία δρα στο ίδιο φάσμα υποδοχέων. (2)

1.7 Μονοξείδιο του αζώτου (NO).

Το NO είναι ένα αέριο διαλυτό και ελεύθερα διάχυτο, ωστόσο, διακρίνεται για την περιορισμένη διάρκεια ζωής του (3-5s). Στον εγκέφαλο, αναλαμβάνει έναν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο ως νευροδιαβιβαστής μεταξύ νευρικών κυττάρων, επιτρέποντας την ενίσχυση της προσυναπτικής απελευθέρωσης γλουταμικού μέσω της βοήθειας της γουανυλικής κυκλάσης. (12) Αναγνωρίστηκε ως ένας παράγοντας που προκαλεί χαλάρωση των αιμοφόρων αγγείων και προέρχεται από το ενδοθήλιο. Επίδρα σε ποικίλες

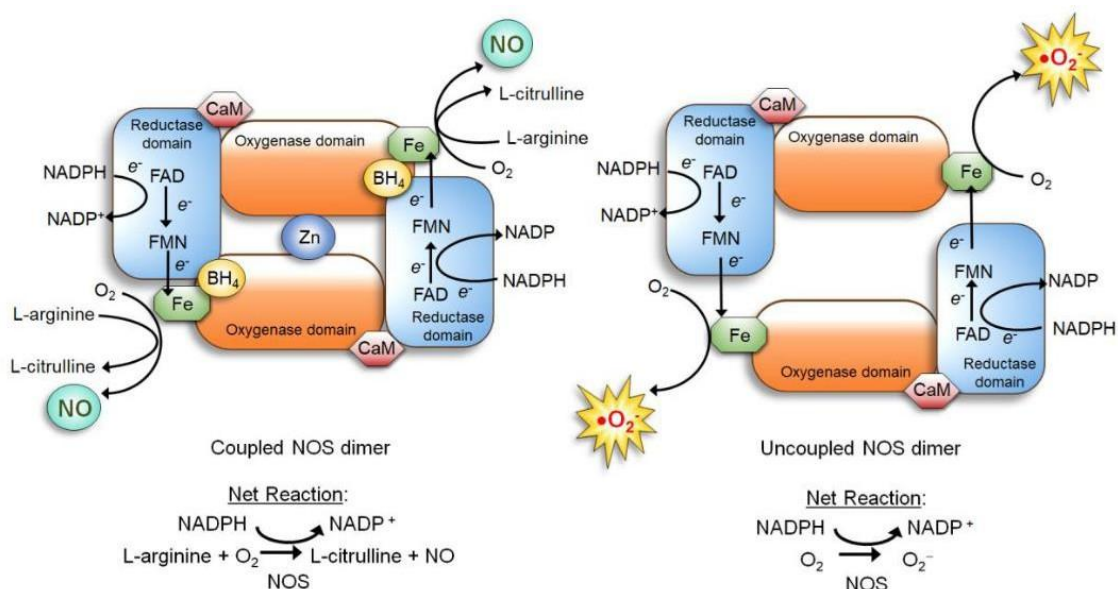
φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής ανοσίας, του αγγειακού τόνου και της νευροδιαβίβασης. (13)

1.7.1 Σύνθεση του NO

Το ενδογενές NO παράγεται από την μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη με τη βοήθεια της εξαρτώμενης από καλμοδουλίνη συνθάσης του NO. Έχουν βρεθεί τρεις διαφορετικές ισομορφές της NOS, η eNOS που εκφράζεται στο ενδοθήλιο (προϊόν του γονιδίου NOS3), η nNOS που εκφράζεται στον νευρικό ιστό (προϊόν του γονιδίου NOS1) και η iNOS (επαγόμενη NOS, προϊόν του γονιδίου NOS2), η οποία επάγεται από προφλεγμονώδεις παράγοντες. Οι δραστηριότητες των nNOS και eNOS διεγείρονται από αυξήσεις στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο, ενώ η έκφραση iNOS απαιτεί μεταγραφική ενεργοποίηση επαγόμενη από διαφορετικούς συνδυασμούς κυτοκινών. (14)

Η σύνθεση του NO προκύπτει από τη μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη. Αυτή η διαδικασία οξειδωσης καταλύεται από το ένζυμο NOS, το οποίο είναι διμερές. Το ένζυμο αυτό αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μορφολογικά μονομερή, τα οποία περιλαμβάνουν μια καρβοξυτελική επικράτεια αναγωγής και μια αμινοτελική επικράτεια οξυγενάσης. (15) Η επικράτεια αναγωγής περιλαμβάνει θέσεις πρόσδεσης για τα ακόλουθα μόρια: δινουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης (FAD), μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης (FMN) και την περιοχή πρόσδεσης καλμοδουλίνης (CaM), φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NADP⁺/NADPH). Αντίστοιχα, η επικράτεια οξυγενάσης περιλαμβάνει θέσεις πρόσδεσης για τα ακόλουθα μόρια: υπόστρωμα L-αργινίνης, τετραυδροβιοπτερίνη (H4B) και αίμη. (16)

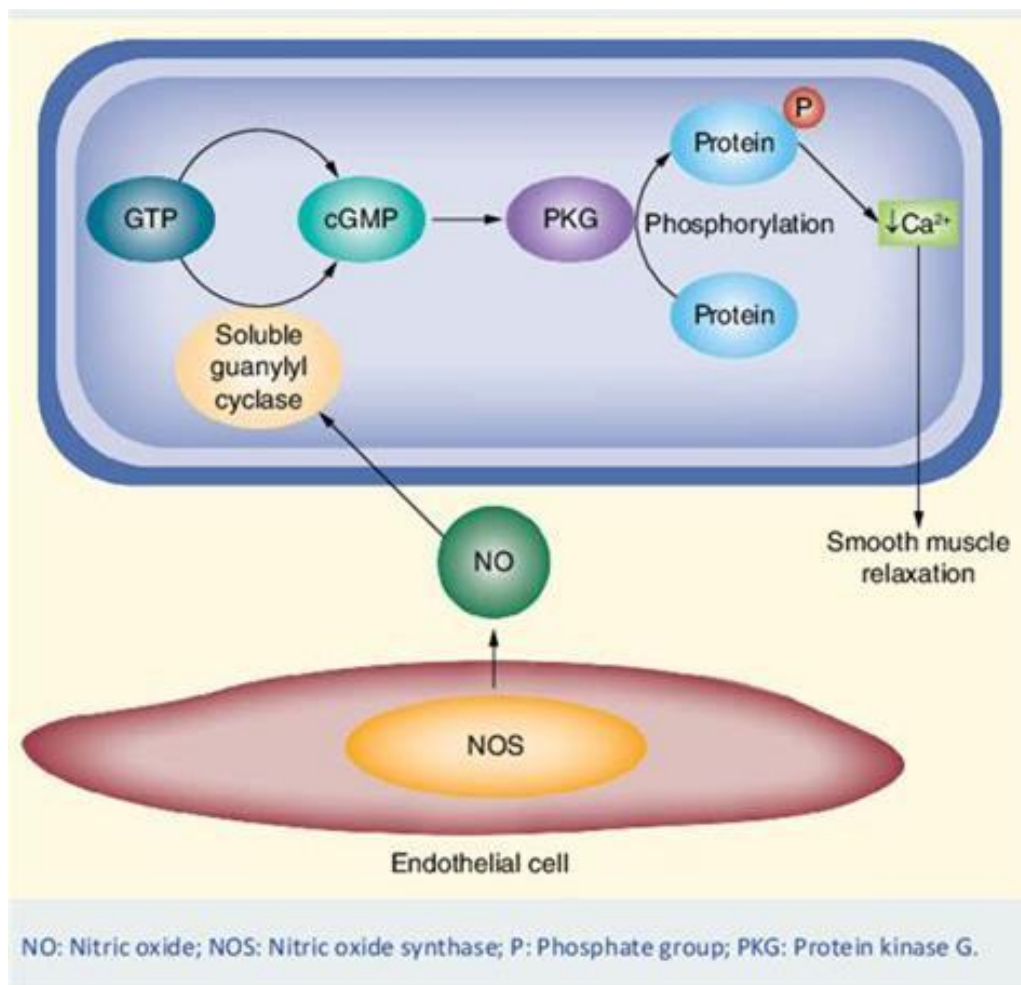
Η σύνθεση του NO προκύπτει μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA. Στη συνέχεια, το Ca²⁺ σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την καλμοδουλίνη. Αυτό το σύμπλεγμα συνδέεται και ενεργοποιεί το ένζυμο nNOS. Έπειτα με την συμβολή των προαναφερθέντων συμπαραγόντων παράγεται η L-κιτρουλίνη απελευθερώνοντας το NO. (13)



Εικόνα 2: Απεικόνιση της NOS και της διαδικασίας σύνθεσης του NO (17)

1.7.2 Κύριοι στόχοι του NO

Η διαλυτή γουανυλική κυκλάση (sGC) είναι αναγκαία για την πλειοψηφία των αντιδράσεων που οφείλονται στο NO. Η σύνδεση του NO σε ομάδα αίμης του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP), η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από cGMP κινάση PKG, οδηγώντας έμμεσα στην φωσφορυλίωση αρκετών διαφορετικών πρωτεϊνών στόχων. Το cGMP επίσης ενεργοποιεί πρωτεϊνικές κινάσες όπως η PKA. Με αυτόν τον τρόπο, το NO δρα μέσω δεύτερων αγγελιαφόρων και επιδρά σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, οδηγώντας σε ποικιλία αποκρίσεων. (13) Η σημασία του cGMP στη σηματοδότηση του NO έχει οδηγήσει στη μελέτη των καταβολικών του ενζύμων. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι μέλη της οικογένειας των φωσφοδιεστερασών, με την PDE5 να έχει την μεγαλύτερη επιλεκτικότητα για το cGMP. Η PDE5 είναι επίσης η καλύτερα μελετημένη φωσφοδιεστεράση, λόγω της ύπαρξης υψηλά επιλεκτικών αναστολέων για αυτή. Η PDE5 υδρολύει το cGMP που παράγεται από το NO, λήγοντας την δράση του. Αναστολείς της έχουν εγκριθεί για φαρμακευτική χρήση έναντι της στυτικής δυσλειτουργίας και της πνευμονικής υπέρτασης. (18) Επίσης, μελέτες που χρησιμοποίησαν ζωικά μοντέλα σχετιζόμενα με συμπτώματα της σχιζοφρένειας έδειξαν θετική επίδραση των αναστολέων PDE5 στη γνωστική λειτουργία των ζώων. (19,20)



Εικόνα 3: Σηματοδοτικό μονοπάτι NO.

Μία άλλη σημαντική λειτουργία του NO είναι η **S-νιτροσυλίωση** της θειόλης πλευρικών ομάδων κυστεΐνης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι πλευρικές αλυσίδες θειόλης που περιέχονται στα υπολείμματα κυστεΐνης εντός των πρωτεϊνών μπορούν να υποστούν μεταβολή μέσω της προσθήκης μιας ομάδας NO. Το NO από μόνο του δεν έχει οξειδωτικές ιδιότητες και δεν αντιδρά έντονα με μια πρωτεϊνική θειόλη. Επομένως, για την πλειοψηφία των περιπτώσεων όπου συμβαίνει η S-νιτροσυλίωση, το NO αντιδρά πρώτα με το οξυγόνο για να αυξήσει την κατάσταση οξείδωσης, και μετά αντιδρά με μια θειόλη.(21)

1.8 Νευροπροστατευτική δράση του NO

Η νευροπροστατευτική δράση του NO οφείλεται σε ποικιλία διαφορετικών μηχανισμών.

- 1 Η κινάση Akt και ο μεταγραφικός παράγοντας CREB έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στο μονοπάτι επιβίωσης που επάγεται από το NO. Και οι δύο πρωτεΐνες είναι σημαντικές ως μετατροπείς σημάτων της επιβίωσης επαγόμενης από νευροτροφίνες και για την προστασία από διάφορες νευροεκφυλιστικές προκλήσεις, και αυτή τους η ομοιότητα συμβάλλει στον νευροπροστατευτικό ρόλο του NO. Η επίδραση του NO τόσο στο Akt όσο και στο CREB φαίνεται ότι μεσολαβείται από το cGMP και τη διαδοχική διέγερση της πρωτεϊνικής κινάσης G (PKG), η οποία είναι ένα κρίσιμο ενδιάμεσο στην μεσολαβούμενη από το NO ενεργοποίηση του Akt και του CREB.
- 2 Η αναστολή της σύνθεσης του NO έχει ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης 3. Το NO παρέχει επίσης νευροπροστασία στο μεσολαβούμενο από NMDA μοντέλο νευροτοξικότητας, στο οποίο η παρατεταμένη διέγερση των υποδοχέων NMDA προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Το NO προστατεύει από τον κυτταρικό θάνατο με S-νιτροσυλίωση τις υπομονάδες NR1 και NR2 του υποδοχέα NMDA, μειώνοντας την ενδοκυτταρική εισροή Ca^{2+} που ευθύνεται για τον νευρωνικό θάνατο.
- 3 Το NO μπορεί επίσης να προσφέρει κυτταροπροστασία μέσω της αναστολής της δραστηριότητας κασπασών νιτροσυλιωνοντας κυστεΐνες του καταλυτικού κέντρου τους. Η S-νιτροζυλίωση έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη δραστηριότητα των κασπασών σε πολλές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων.
- 4 Η επαγωγή της οξυγενάσης της αίμης 1 (HO-1) θεωρείται πρώιμο γεγονός στην κυτταρική απόκριση στο οξειδωτικό στρες και έχει νευροπροστατευτική λειτουργία. Το NO έχει φανεί να επάγει την παραγωγή HO-1 στον εγκέφαλο.

1.9 Νευροτοξική δράση του NO

Όταν το NO παράγεται σε μεγάλες ποσότητες για παρατεταμένα διαστήματα, μπορεί να προκαλέσει νευροτοξικότητα. Το NO μπορεί να αντιδράσει με ανιόντα υπεροξειδίου (O_2^-)

σχηματίζοντας υπεροξυνιτρικό (ONOO-) το οποίο είναι ισχυρό οξειδωτικό το οποίο αντιδρά με κυτταρικές πρωτεΐνες και οδηγεί σε καταστροφή κυτταρικών συστατικών. Επιπλέον, το NO έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί την κυκλοοξυγενάση, η οποία αυξορρυθμίζεται στα εγκεφαλικά κύτταρα υπό προφλεγμονώδεις συνθήκες. Κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου της κυκλοοξυγενάσης, συμβαίνουν η απελευθέρωση ελεύθερων ριζών και ο σχηματισμός προσταγλανδινών, δύο γεγονότα που σχετίζονται στενά με ανάπτυξη νευροφλεγμονής.

1.10 NO και σχιζοφρένεια

Πολυάριθμα ευρήματα υποδεικνύουν τη συμμετοχή του NO στη σχιζοφρένεια. Το NO παίζει κρίσιμο ρόλο ως δεύτερος αγγελιοφόρος στην ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA, επηρεάζοντας τόσο τα ντοπαμινεργικά όσο και τα σεροτονινεργικά μονοπάτια. Η απορρύθμιση των μονοπατιών αυτών έχει προταθεί ότι συμβάλλει στους μηχανισμούς της σχιζοφρένειας. Η συσχέτιση μεταξύ των μη φυσιολογικών επιπέδων NO και της σχιζοφρένειας είναι προφανής, με τόσο τα υπερβολικά όσο και τα ελλειπή επίπεδα NO να εμπλέκονται στην παθολογία. (22)

1.10.1 Ιστοχημικές μελέτες

Ιστοχημικές αναλύσεις έχουν αποδείξει ανωμαλίες στην κατανομή των νιτρεργικών νευρώνων στον μετωπιαίο και κροταφικό λοβό σε ασθενείς με σχιζοφρένεια. Μελέτες μετά τον θάνατο έχουν αναφέρει μείωση των νιτρεργικών νευρώνων στο ραβδωτό σώμα και σε νευρώνες που εκφράζουν NOS στον υποθάλαμο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μειωμένη εξαρτώμενη από Ca^{2+} δραστηριότητα του ενζύμου NOS, στον προμετωπιαίο φλοιό των ασθενών που πάσχουν από σχιζοφρένεια. (22)

1.10.2 Γενετικές μελέτες

Υπάρχουν γενετικές μελέτες που υποστηρίζουν την ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιο NOS1 που οδηγεί στην σύνθεση nNOS οι οποίοι παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της σχιζοφρένειας και της διπολικής διαταραχής. (23)

Μερικοί από τους πολυμορφισμούς του NOS1 που φαίνεται να σχετίζονται με την σχιζοφρένεια:

- C276T στο εξώνιο 29. Η συχνότητα του αλληλομόρφου αυτού διέφερε σημαντικά σε ανάμεσα σε σχιζοφρενείς και άτομα ελέγχου. (24)
- VNTR, G-84A. Ο πολυμορφισμός G-84A έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση της σχιζοφρένειας. (23)
- Rs3782206. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετιστεί με τη σχιζοφρένεια, και ιδίως τον παρανοϊκό τύπο σχιζοφρένειας. (25)
- Rs41279104. Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με τον πολυμορφισμό αυτό και την εμφάνιση της σχιζοφρένειας. (26)

1.10.3 Βιοχημικές μελέτες

Μετά από εξέταση του εγκαφαλονωτιαίου υγρού σχιζοφρενών έχει εντοπιστεί μείωση των νιτρικών και νιτρωδών, οι οποίοι είναι οι σταθεροί μεταβολίτες του NO, σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου. Επομένως παρατηρείται μειωμένη δράση του NO στο ΚΝΣ σχιζοφρενών. (27) Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν το γονίδιο του ενζύμου nNOS έχουν δείξει επίσης μείωση της γνωστικής λειτουργίας σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου, τονίζοντας την σημασία του NO στην μάθηση και στη μνήμη. (28) Επίσης, η μείωση των μεταβολιτών του NO στα βιολογικά υγρά ασθενών με σχιζοφρένεια έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τα αρνητικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας. (29)

Τα παραπάνω προτείνουν ότι οι δότες του NO μπορούν να αποτελέσουν μια ενδιαφέρουσα θεραπευτική προσέγγιση έναντι της σχιζοφρένειας.

1.11 Δότες του NO

Το κοινό χαρακτηριστικό των δοτών NO είναι ότι απελευθερώνουν NO ή ενώσεις που σχετίζονται με το NO όπως το ιόν νιτροσωνίου (NO^+) ή το νιτροξυλικό ανιόν (NO^-), ανεξάρτητα από τις ενδογενείς πηγές τους. Ωστόσο είναι μια ετερογενής ομάδα ενώσεων με διαφορετικά φαρμακοκινητικά και δυναμικά προφίλ, που καθορίζουν την έκταση και το

είδος της βιολογικής τους δράσης. Συγκεκριμένα, αυτές οι ενώσεις διαφέρουν όσον αφορά τον τρόπο απελευθέρωσης του NO, τη χρονική διάρκεια της απελευθέρωσής του, την ποσότητα του παραγόμενου NO, καθώς και τα προϊόντα που προκύπτουν από τον μεταβολισμό τους. (30) Οι δότες του NO δρουν σε αγγειακό επίπεδο αυξάνοντας την φλεβική χωρητικότητα και την στεφανιαία αγγειοδιαστολή. Αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιούνται εκτενώς στην κλινική πρακτική για τη διαχείριση της υπέρτασης και των καρδιαγγειακών παθήσεων. (13) Επιπλέον οι ενώσεις αυτές έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, γεγονός το οποίο τις καθιστά χρήσιμους νευροπροστατευτικούς παράγοντες και πιθανά μέλη συνδυαστικής θεραπείας για νευροεκφυλιστικές ασθένειες. (31)

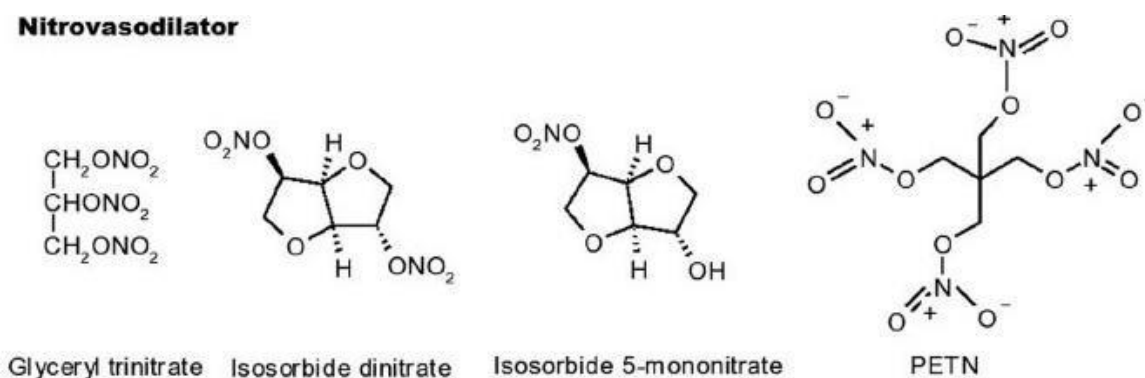
Όλοι οι δότες NO είναι προφάρμακα και εξαρτώνται από την *in vivo* παραγωγή NO για να εξασκήσουν την φαρμακολογική τους δράση.

Οι δότες του NO χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

1 Οργανικά Νιτρικά

Είναι οι παλαιότεροι γνωστοί δότες NO και είναι εστέρες νιτρικών οξέων. Αυτά τα αγγειοδιασταλτικά απελευθερώνουν NO *in vivo*, ενισχύοντας έτσι την παραγωγή cGMP και οδηγώντας στην χάλαση των λείων μυών. Τα οργανικά νιτρικά απαιτούν είτε ενζυματική είτε μη ενζυματική βιοενεργοποίηση για την απελευθέρωση NO. Είναι πιθανό ότι πολλαπλές ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές οδοί συμβάλλουν στον σχηματισμό NO από αυτές τις ενώσεις, αλλά η σχετική σημασία των μεμονωμένων μεταβολικών συστημάτων παραμένει ελάχιστα κατανοητή. Πιστεύεται ότι η βιοενεργοποίηση των οργανικών νιτρικών μεσολαβείται από την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης του κυτοχρώματος P-450. (32)

Nitrovasodilator

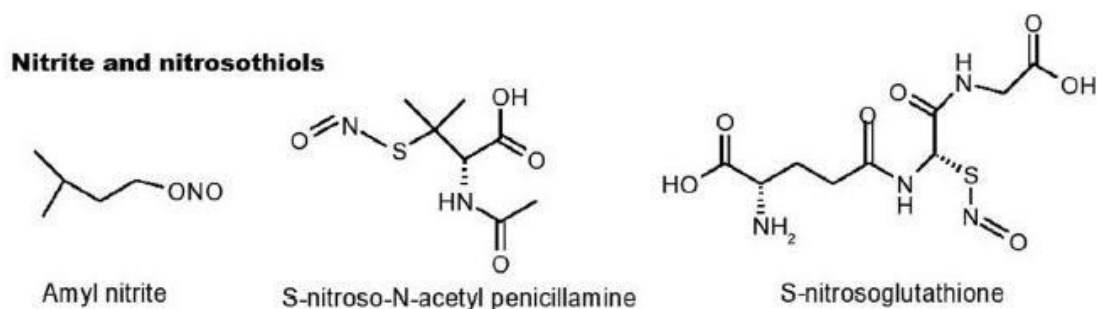


Εικόνα 4: Χημική δομή οργανικών νιτρικών. Με τη σειρά: Τρινιτρικό γλυκερύλιο, δινιτρικός

ισοσορβίτης, 5-μονονιτρικός ισοσορβίτης, νιτρικός πενταερυθρίτης.

2 Οργανικά Νιτρώδη και S-Νιτροσοθειόλες

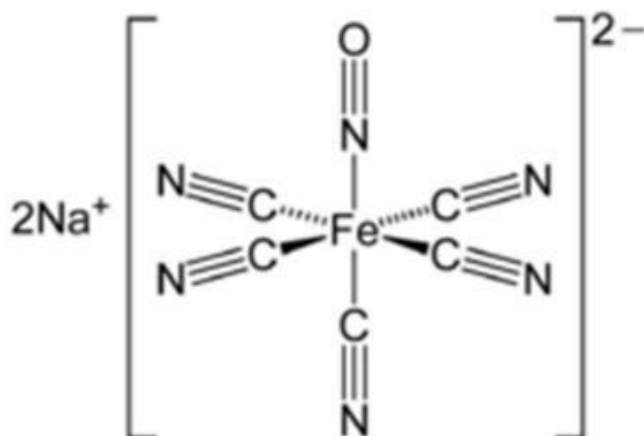
Τα οργανικά νιτρώδη είναι εστέρες νιτρώδους οξέως. Αντιδρούν με ομάδες θειόλης για να σχηματίσουν S-νιτροσοθειόλες οι οποίες αποσυντίθενται για να σχηματίσουν NO. Η διαδικασία αυτή ενισχύεται από τη θερμότητα, το φως και από μεταλλικά ιόντα.



Εικόνα 5: Χημική δομή οργανικών νιτρώδων και νιτροσοθειολών. Με τη σειρά: Νιτρικό αμύλιο, S-νιτροζο-N-ακετυλοπενικιλλαμίνη, S-νιτροσογλουταθειόνη

Νιτροπρωσσικό Νάτριο (SNP)

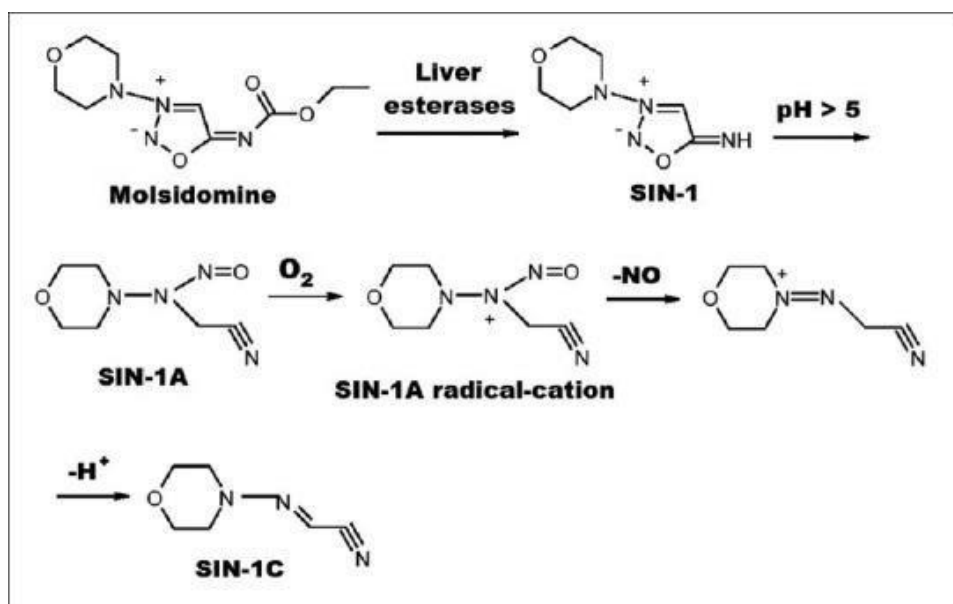
Αναγωγικοί παράγοντες όπως οι θειόλες, που είναι άφθονες στον οργανισμό, μπορούν να απελευθερώσουν μεγάλες ποσότητες NO αυθόρμητα από το νιτροπρωσσικό νάτριο χωρίς την διαμεσολάβηση ενζύμου. (34) Το SNP ασκεί τη δράση του στο αγγειακό σύστημα αυξάνοντας την αγγειακή χωρητικότητα και τη στεφανιαία αγγειοδιαστολή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται συχνά για τη θεραπεία της υπέρτασης και της καρδιακής ανεπάρκειας. (3)



Εικόνα 6: Χημική δομή του SNP.

3 Συδνονιμίνες

Οι συδνονιμίνες αποσυντίθενται γρήγορα για να απελευθερώσουν NO χωρίς να χρειάζονται συμπαράγοντες όπως οι θειόλες. Η πιο γνωστή συδνονιμίνη είναι η SIN-1, ηπατικός μεταβολίτης της μολσιδομίνης. Το πρώτο βήμα στον μετασχηματισμό του SIN-1 είναι η εξαρτώμενη από το pH μετατροπή στον ανοιχτό δακτύλιο SIN-1A. Αυτή η ένωση απελευθερώνει NO μετά από αντίδραση με μοριακό οξυγόνο. (32)



Εικόνα 7: Μεταβολισμός της μολσιδομίνης.

CAS 936

C87-3754

4 ΝΟΝΟικά άλατα

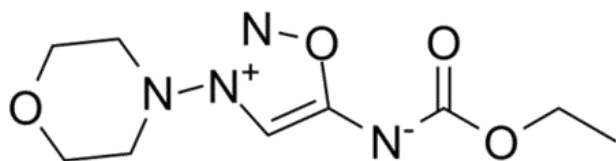
NONOates


DEA/NO


DETA/NO


MAHMA/NO

Η Μολσιδομίνη είναι ένας δότης του NO που ανήκει στις συδονιμίνες. Είναι προφάρμακο και μετατρέπεται ταχέως στον ενεργό μεταβολίτη της στον οργανισμό, την 3-μορφολινοσυδονιμίνη (SIN-1), η οποία με τη σειρά της απελευθερώνει το NO. Η μολσιδομίνη εμφανίζει εκτενέστερη διάρκεια δράσης, δύο ωρών, σε σύγκριση με άλλους δότες NO όπως το SNP. Η μολσιδομίνη χρησιμοποιείται κλινικά για την θεραπεία της στηθάγχης και της υπέρτασης. (22)



1.12.1 Προκλινικές μελέτες

Διάφορες μελέτες έχουν αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα της μολσιδομίνης σε ζωικά μοντέλα που προσεγγίζουν τα γνωσιακά ελλείμματα που σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια. Συγκεκριμένα, φάνηκε η μολσιδομίνη να εξασθενεί αταξία και ελλείμματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης προκαλούμενα από τον ανταγωνιστή του NMDA υποδοχέα MK-801, αλλά και ελλείμματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης προκαλούμενα από τον αγωνιστή των D1/D2 υποδοχέων απομορφίνη. (24) Επίσης, νεότερες μελέτες δείχνουν ότι η μολσιδομίνη μπορεί να εξασθενήσει κοινωνική απόσυρση και ελλείμματα χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από τον ανταγωνιστή του NMDA υποδοχέα κεταμίνη, και σε συνδυασμό με το άτυπο αντιψυχωσικό κλοζαπίνη σε μη δραστικές δόσεις μπορεί να εξασθενήσει ελλείμματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από κεταμίνη. (12) Οι προκλινικές αυτές μελέτες συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ζωικό μοντέλο	Φάρμακα	Συμπεριφορική τεχνική	Αποτελέσματα	
Αρουραίος	Μολσιδομίνη (2,4 mg/kg) MK-801 (0.1,0,2 mg/kg)	Κινητική δραστηριότητα	Εξασθένηση της αταξίας και στερεοτυπιών επαγομένων από το MK-801	Pitsikas et al., 2006 (33)
Αρουραίος	Μολσιδομίνη (4 mg/kg) MK-801 (0.1 mg/kg)	Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (ORT)	Εξασθένηση ελλειμμάτων μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγομένων από το MK-801	Pitsikas et al., 2006
	Μολσιδομίνη (2,4 mg/kg)		Εξασθένηση ελλειμμάτων	

Αρουραίος	Απομορφίνη (1 mg/kg)	Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (ORT)	μνήμης επαγόμενων από την απομορφίνη	Gourgiotis et al., 2012 (34)
Αρουραίος	Μολσιδομίνη (2,4 mg/kg) Κεταμίνη (2,4 mg/kg)	Δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδραση ς (SIT)	Μείωση της κοινωνικής απόσυρσης επαγόμενης από την κεταμίνη	Katsanou et al., 2023 (10)
Αρουραίος	Μολσιδομίνη (2,4 mg/kg) Κεταμίνη (2,4 mg/kg)	Δοκιμασία θέσης αντικειμένου (OLT)	Εξασθένηση των ελλειμάτων χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενων από τη κεταμίνη	Katsanou et al., 2023 (10)
Αρουραίος	Μολσιδομίνη (1 mg/kg) Κλοζαπίνη (0.1 mg/kg)	Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (ORT)	Εξασθένηση της φυσιολογικής μνήμης	Katsanou et al., 2023 (10)
Αρουραίος	Μολσιδομίνη (1 mg/kg) Κλοζαπίνη (0.1 mg/kg) Κεταμίνη (3 mg/kg)	Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (ORT)	Εξασθένηση ελλειμμάτων μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενων από τη κεταμίνη	Katsanou et al., 2023 (10)

2. Στόχος της μελέτης

Οι ποικίλες παρενέργειες που προκαλούνται από τις παρούσες θεραπευτικές προσεγγίσεις της σχιζοφρένειας και ο μεγάλος αριθμός ασθενών που δεν ανταποκρίνονται σε αυτές τις θεραπείες καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για την εύρεση νέων τακτικών για την

ανακούφιση των συμπτωμάτων της, ιδίως των αρνητικών και των γνωσιακών ελλειμμάτων, τα οποία έως τώρα της νόσου τα οποία έως τώρα δεν αντιμετωπίζονται ικανοποιητικά. Τα παρατηρηθέντα χαμηλά επίπεδα NO σε ασθενείς με σχιζοφρένεια προτείνουν τους δότες του NO ως πιθανές νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις για αυτή τη ψυχιατρική διαταραχή. Μεγάλος όγκος πληροφοριών στηρίζει την ανάμειξη της υπολειτουργίας των D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων στην ανάπτυξη των γνωσιακών ελλειμμάτων και των ελλειμμάτων μνήμης. Ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εξέταση της ικανότητας του δότη NO μολιδομίνη να μειώσει ελλείματα μνήμης επαγόμενα από τον αγωνιστή των D1/D2 υποδοχέων απομορφίνη στον επίμυ. Επίσης στόχος είναι και η εξέταση της επίδρασης της συνδυαστικής χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολιδομίνης και των αντιψυχωσικών κλοζαπίνης και ρισπεριδόνης στα ελλείματα μνήμης επαγόμενα από την απομορφίνη. Οι μέθοδοι που αξιοποιήθηκαν αναλύονται στις επόμενες ενότητες.

3. Μέθοδοι και Υλικά

3.1 Πειραματόζωα

Για τα παρόντα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί πληθυσμοί αρσενικών επίμυων, του γένους Wistar, ηλικίας τριών μηνών και βάρους 250-300g (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ). Οι επίμυες διέμεναν ανα τρεις σε κλουβιά Makrolon κατασκευασμένα από πολυανθρακικό και διαστάσεων (47,5 cm μήκος x 20.5 cm ύψος x 27 cm πλάτος) με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Το περιβάλλον ήταν σταθερό με θερμοκρασία $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 50-55% υγρασία, ρυθμιζόμενο κύκλο φωτός/σκότους σε 12 h φως/12 h σκοτάδι και με τα φώτα να ανάβουν αυτόματα στις 7 π.μ.

Τα πειράματα που συμπεριλαμβάνουν ζώα και την φροντίδα τους διεξήχθησαν σύμφωνα με διεθνής και εθνικές οδηγίες (Animal Act, P.D. 160/91) και σύμφωνα με τη διεθνή νομοθεσία και πολιτική (EEC Council Directive 86/609, JL 358, 1, 12 December 1987). Η

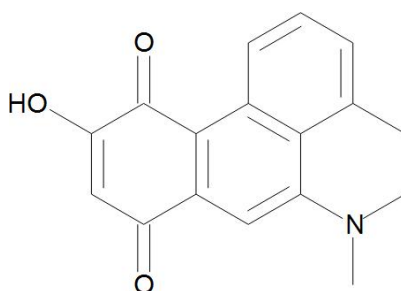
παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από την τοπική επιτροπή (Prefecture of Larissa, Greece, protocol number 58379/13 February 2023).



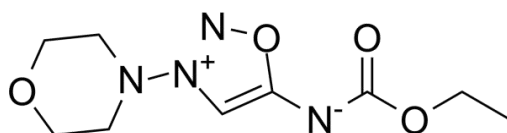
Εικόνα 9: Επίμυς Wistar.

3.2 Φάρμακα

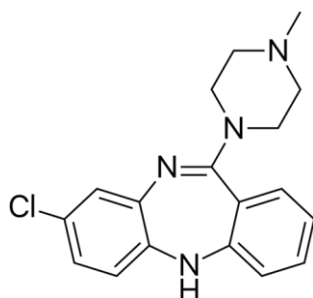
- Η υδροχλωρική απομορφίνη διαλύθηκε σε φυσιολογικό ορό (NaCl 0,9%) που περιείχε 0.1% ασκορβικό οξύ για την απότρεψη της οξείδωσης.



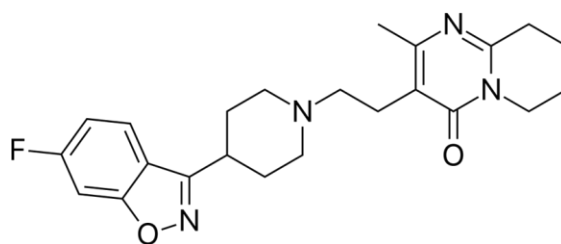
- Ο δότης του NO μολσιδομίνη (Sigma, St. Louis, MO, USA) διαλύθηκε σε φυσιολογικό ορό (NaCl 0,9%)



- Τα αντιψυχωσικά κλοζαπίνη και η ρισπεριδόνη (Sigma, St. Louis, MO, USA) διαλύθηκαν στον ελάχιστο όγκο οξικού οξέος, προστέθηκε φυσιολογικός ορός (NaCl 0,9%) για την συμπλήρωση του όγκου και το pH προσαρμόστηκε στο 7 με την χρήση 0.1 M NaOH.



Κλοζαπίνη



Ρισπεριδόνη

Όλα τα φάρμακα παρασκευάστηκαν την ημέρα της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας. Η χορήγηση έγινε ενδοπεριτοναϊκά σε όγκο 1 mL/kg. Σε όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα τα ζώα ελέγχου έλαβαν ανάλογο όγκο φυσιολογικού ορού (NaCl 0,9%).

3.3 Πειραματικά μοντέλα σχιζοφρένειας

Καθώς ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της μολσιδομίνης στα ελλείματα μνήμης που εκδηλώνονται στη σχιζοφρένεια, οφειλόμενα στην υποδιέργερση των D2 υποδοχέων, χρησιμοποιήθηκαν προκλινικά πειραματικά μοντέλα τα οποία μιμούνται αυτά τα ελλείματα μνήμης στους επίμυες. Η χρήση του D1/D2 αγωνιστή απομορφίνη προκαλεί στους επίμυες ελλείματα συναισθηματικής, χωρικής και μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης ανάλογα με αυτά που εμφανίζουν οι σχιζοφρενείς, στους επίμυες. (34)

3.3.1 Χωρική αναγνωριστική μνήμη

Η χωρική αναγνωριστική μνήμη σχετίζεται με την ικανότητα ενός οργανισμού να θυμάται τη θέση των αντικειμένων στο χώρο, ή να αναγνωρίζει σημεία αναφοράς με σκοπό τον προσανατολισμό του. Η χωρική αναγνωριστική μνήμη υπονομεύεται στις περιπτώσεις σχιζοφρένειας, ενώ έχει βρεθεί ότι η χρήση απομορφίνης μπορεί να μιμηθεί τα ελλείματα αυτά στους επίμυες, καθώς έχει παρατηρηθεί σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος και στα ελλείματα μνήμης. (34,35) Το πείραμα που αξιοποιήθηκε για την εξέταση της επίδρασης της μολσιδομίνης στα ελλείματα χωρικής μνήμης επαγόμενα από απομορφίνη ήταν το Τεστ Θέσης Αντικειμένου (Object Location Task).

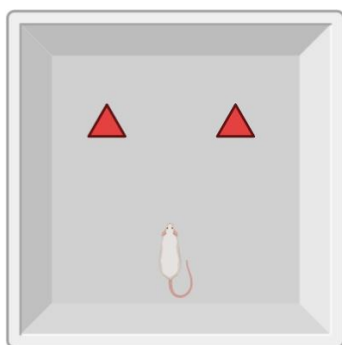
Τεστ Θέσης Αντικειμένου (OLT)

Η πειραματική συσκευή είναι κατασκευασμένη από Plexiglass (80cm μήκος x 50cm ύψος x 60cm πλάτος). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μια μεγάλη αίθουσα παρατήρησης, και γύρω από τον χώρο διεξαγωγής του πειράματος τοποθετήθηκαν μεγάλα αντικείμενα για να

βοηθήσουν τους επίμυες κατά την διάρκεια της δοκιμασίας. Τα αντικείμενα αυτά παρέμειναν στην ίδια θέση καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, και ήταν διαφορετικού σχήματος και υφής, αλλά κανένα από αυτά δεν θα μπορούσε να μετακινηθεί από επίμυ.

Κατά τη διάρκεια της εβδομάδας πριν την διεξαγωγή του πειράματος πραγματοποιήθηκε εξοικείωση με το ανθρώπινο χέρι. Για τρεις συνεχόμενες μέρες και δυο φορές την ημέρα γινόταν χειρισμός (handling) των ζώων, και πριν την δοκιμασία έγινε και εξοικείωση των επίμυων με τον χώρο διεξαγωγής του πειράματος. Η εξοικείωση αυτή έγινε με την τοποθέτηση των επίμυων στον χώρο διεξαγωγής του πειράματος για 2 λεπτά, για τρεις συνεχόμενες ημέρες.

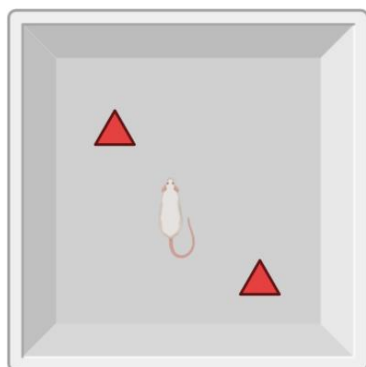
Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από δύο ξεχωριστές δοκιμασίες. Η πρώτη ονομάζεται T1 (sample trial) και συμπεριλαμβάνει την τοποθέτηση δύο πανομοιότυπων αντικειμένων σε διαφορετικές γωνίες της κατασκευής. Οι επίμυες έπειτα τοποθετούνται μέσα στην κατασκευή και τους επιτρέπεται να εξερευνήσουν τα αντικείμενα για 2 λεπτά.



Created in BioRender.com bio

Εικόνα 10: Δοκιμασία T1 του OLT

Ανάμεσα στην πρώτη και την δεύτερη δοκιμασία T2 (choice trial) διαμεσολαβεί ένα διάλειμμα διάρκειας μίας ώρας (ITI=1h). Η δεύτερη δοκιμασία συμπεριλαμβάνει την τοποθέτηση των ίδιων αντικειμένων στην κατασκευή. Το ένα τοποθετείται στην ίδια γνώριμη θέση με πριν (FL) και το δεύτερο θα τοποθετηθεί σε καινούρια τοποθεσία, σε διαφορετική γωνία της κατασκευής (NL).



Created in BioRender.com bio

Εικόνα 11: Δοκιμασία T2 του OLT

Για να αποφευχθούν τυχόν ψευδή αποτελέσματα λόγω της προτίμησης των επίμυων για κάποια συγκεκριμένη τοποθεσία, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί και αλλαγές τοποθεσίας.

Η εξερεύνηση των αντικειμένων ορίζεται ακολούθως: η προσέγγιση των αντικειμένων με τη μύτη σε απόσταση δύο εκατοστών ή μικρότερη και το άγγιγμα των αντικειμένων με τη μύτη. Διαφορετική προσέγγιση και άγγιγμα του αντικειμένου δεν θεωρήθηκε εξερευνητική συμπεριφορά.

Ο προσδιορισμός του χρόνου εξερεύνησης έγινε με την χρήση χρονομέτρου. Η διάκριση ανάμεσα στην γνώριμη και την νέα τοποθεσία μετρήθηκε συγκρίνοντας το χρόνο εξερεύνησης των αντικειμένων που βρίσκονταν σε αυτές τις δύο τοποθεσίες. Επειδή οι χρόνοι εξερεύνησης των αντικειμένων μπορεί να επηρεαστούν από τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης κάθε ζώου, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης διάκρισης (discrimination index, Index D) ο οποίος είναι δείκτης προτίμησης της NL από την FL και υπολογίζεται με τον τύπο:

$$D = (NL - FL)/(NL + FL),$$

Όπου NL είναι ο χρόνος εξερεύνησης της νέας τοποθεσίας, FL είναι ο χρόνος εξερεύνησης της γνώριμης τοποθεσίας και το άθροισμά τους αντιπροσωπεύει τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης. Επιτυχής αναγνώριση θεωρείται όταν οι επίμυες περνούν συνεπώς περισσότερο χρόνο εξερευνώντας την νέα τοποθεσία. (10)

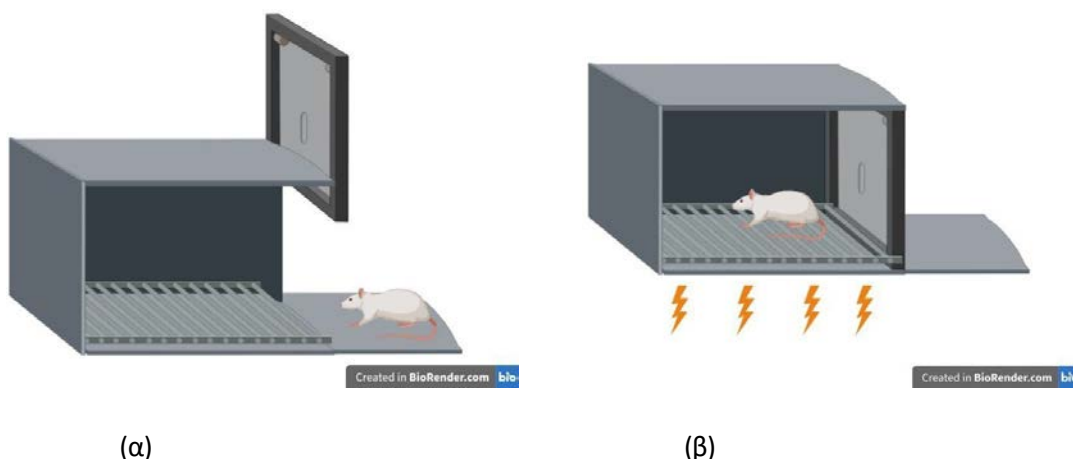
3.3.2 Συναισθηματική μνήμη

Η συναισθηματική μνήμη αναφέρεται στη διαδικασία κωδικοποίησης, αποθήκευσης και ανάκτησης αναμνήσεων που σχετίζονται με ισχυρές συναισθηματικές εμπειρίες. Οι αναμνήσεις αυτές, ούσες συναισθηματικά φορτισμένες, ανακαλώνται πολύ εύκολα και επηρεάζουν την λήψη αποφάσεων και τις πράξεις ενός ατόμου. (37) Πλήθος ερευνών δείχνει ότι η απομορφίνη μπορεί να προκαλέσει ελλείματα στην συναισθηματική μνήμη ανάλογα με αυτά που εμφανίζουν οι ασθενείς με σχιζοφρένεια. (38,39) Στην παρούσα μελέτη, εξετάζουμε την επίδραση της οξείας χορήγησης μολσιδομίνης επί της απώλειας συναισθηματικής μνήμης επαγόμενης από την απομορφίνη χρησιμοποιώντας το τεστ παθητικής αποφυγής (Step through passive avoidance test, STPAT). (40)

Τεστ παθητικής αποφυγής (STPAT)

Το τεστ παθητικής αποφυγής είναι ένα πείραμα που συμπεριλαμβάνει μόνο μία δοκιμασία και εξετάζει την συναισθηματική μνήμη.(42) Η συσκευή διεξαγωγής του πειράματος αποτελείται από ένα μεγάλο κουτί με δάπεδο σε μορφή σχάρας (50cm μήκος x 50cm πλάτος x 50cm ύψος) φτιαγμένο από Plexiglas και ενωμένο με μία πλατφόρμα η οποία φωτίζεται από λάμπα 60W, τοποθετημένη 20cm πάνω από την πλατφόρμα. Το κουτί χωριζόταν από την πλατφόρμα με μία πόρτα τύπου γκιλοτίνα. Η σχάρα μετέδιδε ηλεκτρικά σοκ μέσω μίας απομονωμένης γεννήτριας.

Η διαδικασία έχει ως εξής: Την πρώτη μέρα, όπου πραγματοποιείται η εκπαίδευση των επίμυων, κάθε ζώο τοποθετείται προσεκτικά πάνω στην φωτισμένη πλατφόρμα, και μετά από δέκα δευτερόλεπτα ανοίγει η πόρτα που οδηγεί στο σκοτεινό δωμάτιο. Μόλις ο επίμυς μπει στο σκοτεινό δωμάτιο, κλείνει η πόρτα και χορηγείται ένα ηλεκτροσόκ 0,6mA για 1s.(38) Ο χρόνος που χρειάστηκε κάθε επίμυς για να μπει στο δωμάτιο πριν δεχθεί την ηλεκτρική διέγερση καταγράφεται με ένα χρονόμετρο (pre-shock latency). Οι επίμυες αμέσως μετά το σοκ απομακρύνονται από τη συσκευή και επιστρέφονται στο κλουβί τους.



Εικόνα 12: (α) Τοποθέτηση του επίμου στην φωτισμένη πλατφόρμα, (β) ηλεκτρική διέγερση μετά την είσοδο του επίμου στην σκοτεινή αίθουσα στο στάδιο εκπαίδευσης του STPAT.

Μετά από 24 ώρες πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος μνήμης, όπου οι επίμους τοποθετήθηκαν με τον ίδιο τρόπο στην φωτισμένη πλατφόρμα, και καταγράφεται ο χρόνος παραμονής των πειραματοζώων στη φωτισμένη πλατφόρμα. Η δοκιμασία έληγε όταν συμπληρώνονταν 180 s. παραμονής του επίμου στη πλατφόρμα ή όταν ο επίμους εισερχόταν στη σκοτεινή αίθουσα στην οποία είχε δεχθεί τον ηλεκτρικό ερεθισμό τη προηγούμενη ημέρα που χρειάστηκαν για να μπουν στην σκοτεινή αίθουσα (step-through latency) (41)

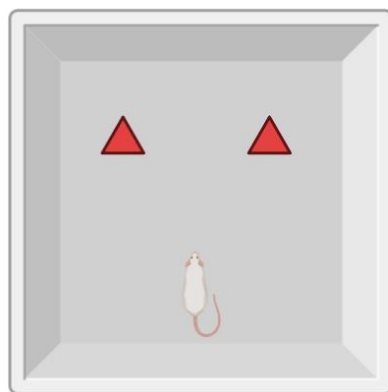
3.3.3 Μη χωρική αναγνωριστική μνήμη

Μη χωρική αναγνωριστική μνήμη είναι μια από της γνωσιακές διεργασίες οι οποίες επηρεάζονται αρνητικά στη σχιζοφρένεια. Σχετίζεται με την ικανότητα αναγνώρισης αντικειμένων. Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση απομορφίνης μπορεί να προκαλέσει ελλείματα στην μη χωρική αναγνωριστική μνήμη, ανάλογα με αυτά που εμφανίζονται στη σχιζοφρένεια (38). Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται η επίδραση του συνδυασμού μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και κλοζαπίνης στα ελλείματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από την απομορφίνη και του συνδυασμού μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στα ελλείματα προκαλούμενα από τη φυσιολογική απώλεια μνήμης αλλά και επαγόμενα από απομορφίνη. Για την εξέταση των παραπάνω χρησιμοποιήθηκε το Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου.

Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου (ORT)

Το τεστ αναγνώρισης αντικειμένου εξετάζει την ικανότητα των επίμυων να αναγνωρίζουν καινούρια αντικείμενα και να τα ξεχωρίζουν από ήδη γνωστά. Η πειραματική συσκευή ήταν ίδια με αυτή του OLT. Παρομοίως, πραγματοποιήθηκε χειρισμός (handling) των ζώων την εβδομάδα πριν το πείραμα δύο φορές την ημέρα για τρεις συνεχόμενες ημέρες, με σκοπό την εξοικείωσή τους με το ανθρώπινο χέρι. Επίσης έγινε εξοικείωση με τον χώρο του πειράματος για δύο λεπτά κάθε μέρα, για τρεις συνεχόμενες ημέρες.

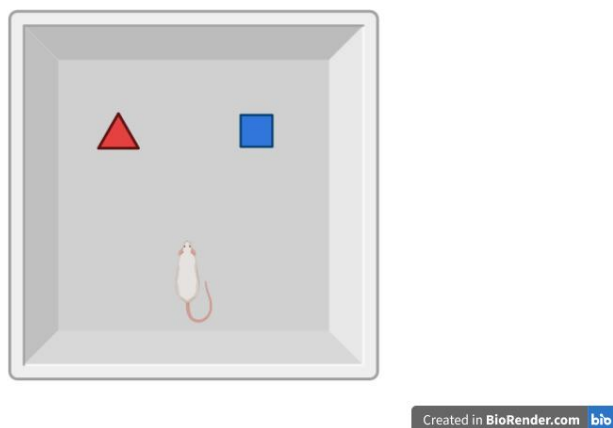
Το πείραμα αυτό αποτελείται επίσης από δύο δοκιμασίες που διαρκούν 2 λεπτά, την T1 (sample trial) και την T2 (choice trial). Κατά την T1 δοκιμασία τοποθετούνται δύο πανομοιότυπα αντικείμενα (F1 και F2) στις δύο γωνίες της κατασκευής που απέχουν 10cm από τα τοιχώματα. Ο επίμυς τοποθετείται στο κέντρο της κατασκευής και έχει 2 λεπτά να εξερευνήσει τα αντικείμενα. Έπειτα επιστρέφεται στο κλουβί του και ακολουθεί ένα διάλειμμα διάρκειας μίας ώρας (ITI). Στην περίπτωση της χρονοεξαρτώμενης απώλειας μνήμης το ITI είναι 24 ώρες, ενώ όταν εξετάζουμε με την βοήθεια της απώλειας μνήμης που οφείλεται στην απομορφίνη τότε το ITI είναι δύο ώρες.



Created in BioRender.com bio

Εικόνα 13: Δοκιμασία T1 του ORT

Κατά την T2 δοκιμασία ο επίμυς τοποθετείται πάλι στο κέντρο της κατασκευής αλλά αυτή τη φορά τοποθετούνται δύο διαφορετικά αντικείμενα στις γωνίες, ένα ήδη γνώριμο (F) και ένα καινούριο αντικείμενο (N).



Εικόνα 14: Δοκιμασία T2 του ORT

Και για τις δύο δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί αντικειμένων κάθε φορά, ώστε να αποφευχθεί τυχόν σφάλμα οφειλόμενο στην προτίμηση κάποιου συγκεκριμένου αντικειμένου από τους επίμυες.

Για την χρονομέτρηση της εξερεύνησης των αντικειμένων F1, F2, F και N χρησιμοποιήθηκε χρονόμετρο. Η διάκριση ανάμεσα στα δύο αντικείμενα F και N κατά τη διάρκεια της T2 υπολογίστηκε συγκρίνοντας τους χρόνους που αξιοποιήθηκαν εξερευνώντας το γνώριμο αντικείμενο F και το καινούριο αντικείμενο N. Επειδή οι χρόνοι εξερεύνησης μπορεί να επηρεαστούν από την συνολική εξερευνητική δραστηριότητα, υπολογίστηκε ο δείκτης διάκρισης D, όπως και στο OLT. Εδώ το index D υπολογίζεται ακολούθως:

$$D = (N - F)/(N + F),$$

Όπου N είναι ο χρόνος εξερεύνησης του νέου αντικειμένου, F ο χρόνος εξερεύνησης του γνώριμου αντικειμένου και το άθροισμα αυτών αντιπροσωπεύει την συνολική εξερευνητική δραστηριότητα. Επιτυχής αναγνώριση θεωρείται όταν οι επίμυες περνούν συνεπώς περισσότερο χρόνο εξερευνώντας το νέο αντικείμενο. (10)

4. Πειραματική διαδικασία

Όλα τα πειράματα έγιναν ανάμεσα στις 10:00 και 15:00, κατά την διάρκεια της φωτεινής φάσης του κύκλου σκότους/φωτός. Η αξιολόγηση των δεδομένων έγιναν από ερευνητή που δεν γνώριζε την φαρμακευτική αγωγή.

4.1 Πείραμα 1: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μολσιδομίνης στην εξασθένηση επαγόμενων από απομορφίνη ελλειμάτων απόδοσης στο τεστ θέσης αντικειμένου (OLT).

Η χορήγηση των φαρμάκων έγινε αμέσως μετά την πρώτη δοκιμασία του πειράματος T1. Η μολσιδομίνη χορηγήθηκε 5-10s μετά την χορήγηση του ορού ή της απομορφίνης αντίστοιχα. Η μολσιδομίνη χορηγήθηκε σε δόσεις 2 και 4 mg/kg. Η δόση απομορφίνης που χορηγήθηκε ήταν 0.5mg/kg, καθώς σε αυτή τη συγκέντρωση η απομορφίνη έχει φανεί να επηρεάζει αρνητικά την απόδοση των επίμυων στο OLT χωρίς να προκαλεί παρενέργειες. Ο χρόνος που επιλέχθηκε ανάμεσα στις δοκιμασίες T1 και T2 (ITI) ήταν δύο ώρες, καθώς τα ζώα ελέγχου σε αυτό το χρονικό διάστημα έχουν άθικτη χωρική αναγνωριστική μνήμη. (38)

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε έξι πειραματικές ομάδες, με οχτώ επίμυες σε κάθε ομάδα, και η φαρμακευτική αγωγή που χορηγήθηκε παρατίθεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πειραματικές ομάδες	Φαρμακευτική αγωγή
1	Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός + Μολσιδομίνη (2 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός + Μολσιδομίνη (4 mg/kg)
4	Φυσιολογικός ορός + Απομορφίνη (0.5 mg/kg)
5	Απομορφίνη (0.5 mg/kg) + Μολσιδομίνη (2 mg/kg)
6	Απομορφίνη (0.5 mg/kg) + Μολσιδομίνη (4 mg/kg)

4.2 Πείραμα 2: Επίδραση οξείας χορήγησης μολσιδομίνης στην εξασθένηση επαγόμενων από απομορφίνη ελλειμάτων απόδοσης στο τεστ παθητικής αποφυγής (STPAT)

Η χορήγηση της φαρμακευτικής αγωγής έγινε 40 λεπτά πριν την εκπαιδευτική διαδικασία την πρώτη μέρα του πειράματος. Η μολσιδομίνη χορηγήθηκε 5-10s μετά τον φυσιολογικό ορό ή την απομορφίνη αντίστοιχα. Οι δόσεις μολσιδομίνης που χορηγήθηκαν ήταν 2-4 mg/kg και η της απομορφίνης 0.5 mg/kg καθώς σε αυτή τη δόση η απομορφίνη επηρεάζει αρνητικά την απόδοση των επίμυων στο STPAT χωρίς να προκαλεί παρενέργειες. (41)

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

Πειραματικές ομάδες	Φαρμακευτική αγωγή
1	Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός + Μολσιδομίνη (2 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός + Μολσιδομίνη (4 mg/kg)
4	Φυσιολογικός ορός + Απομορφίνη (0.5 mg/kg)
5	Απομορφίνη (0.5 mg/kg) + Μολσιδομίνη (2 mg/kg)
6	Απομορφίνη (0.5 mg/kg) + Μολσιδομίνη (4 mg/kg)

4.3 Πείραμα 3: Επίδραση της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και κλοζαπίνης στα επαγόμενα από απομορφίνη ελλείματα απόδοσης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT)

Η φαρμακευτική αγωγή χορηγήθηκε αμέσως μετά την πρώτη δοκιμασία T1. Η μολσιδομίνη χορηγήθηκε 5-10s μετά τη χορήγηση του φυσιολογικού ορού ή της απομορφίνης αντίστοιχα. Η κλοζαπίνη χορηγήθηκε 5-10s μετά τη μολσιδομίνη. Οι μη δραστικές δόσεις μολσιδομίνης (1 mg/kg) και κλοζαπίνης (0.1 mg/kg) επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενες μελέτες. (10,39) Η δόση της απομορφίνης που επιλέχθηκε (0.5 mg/kg) έχει βρεθεί ότι επηρεάζει αρνητικά την απόδοση των επίμυων στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT) χωρίς να προκαλεί παρενέργειες. Σε αυτό το πείραμα ο χρόνος που επιλέχθηκε ανάμεσα στο T1 και T2 (ITI) ήταν δύο ώρες, καθώς σε αυτό το διάστημα τα ζώα ελέγχου έχουν άθικτη μη χωρική αναγνωριστική μνήμη. (39)

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε τέσσερις πειραματικές ομάδες, αποτελούμενες από οχτώ ζώα η καθεμία, και η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθήθηκε φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πειραματικές ομάδες	Φαρμακευτική αγωγή
1	Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός + Μολσιδομίνη (1 mg/kg) + Κλοζαπίνη (0.1 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός + Απομορφίνη (0.5 mg/kg)
4	Απομορφίνη (0.5 mg/kg) + Μολσιδομίνη (1 mg/kg) + Κλοζαπίνη (0.1 mg/kg)

4.4 Πείραμα 4: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στην φυσιολογική απώλεια μνήμης, εξεταζόμενες στο τεστ θέσης αντικειμένου (ORT)

Τα φάρμακα χορηγήθηκαν αμέσως μετά την πρώτη δοκιμασία T1. Η ρισπεριδόνη χορηγήθηκε 5-10s μετά την χορήγηση του φυσιολογικού ορού ή της μολσιδομίνης αντίστοιχα. Οι μη δραστικές δόσεις μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενες μελέτες. (10,43)

Ο χρόνος που επιλέχθηκε να μεσολαβήσει ανάμεσα στα T1 και T2 (ITI) ήταν 24 ώρες, καθώς στον επίμυ σε αυτό το χρονικό διάστημα χάνεται εντελώς η μη χωρική αναγνωριστική μνήμη. (10)

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε τέσσερις πειραματικές ομάδες, με οχτώ επίμυες σε κάθε ομάδα. Η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθήθηκε φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πειραματική ομάδα	Φαρμακευτική αγωγή
1	Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός + Μολσιδομίνη (1 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός + Ρισπεριδόνη (0.03 mg/kg)
4	Μολσιδομίνη (1 mg/kg) + Ρισπεριδόνη (0.03 mg/kg)

4.5 Πείραμα 5: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στα επαγόμενα από την απομορφίνη ελλείματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης εξεταζόμενα στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT).

Η χορήγηση των φαρμάκων έγινε αμέσως μετά την δοκιμασία T1. Η μολσιδομίνη χορηγήθηκε 5-10s μετά τον φυσιολογικό ορό ή την απομορφίνη αντίστοιχα. Η ρισπεριδόνη χορηγήθηκε 5-10s μετά την μολσιδομίνη. Η δόση της απομορφίνης (0.5 mg/kg) επιλέχθηκε με βάση προηγούμενη μελέτη που έχει δείξει ότι η απομορφίνη μπορεί να προκαλέσει ελλείματα στην απόδοση των επίμυων στο ORT χωρίς να προκαλεί παρενέργειες. (38) Οι δόσεις της μολσιδομίνης (1 mg/kg) και της ρισπεριδόνης (0.03 mg/kg) επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενες μελέτες. (10,43)

Σε αυτή τη μελέτη, ο χρόνος που επιλέχθηκε ανάμεσα στα T1 και T2 (ITI) ήταν οι δύο ώρες, καθώς σε αυτό το χρονικό διάστημα τα ζώα ελέγχου έχουν άθικτη μη χωρική αναγνωριστική μνήμη. (39)

Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 4 πειραματικές ομάδες, με κάθε ομάδα να αποτελείται από 8 επίμυες. Η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθήθηκε φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πειραματική ομάδα	Φαρμακευτική αγωγή
1	Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός
2	Απομορφίνη (0.5 mg/kg) + Φυσιολογικός ορός + Φυσιολογικός ορός
3	Φυσιολογικός ορός + Μολσιδομίνη (1 mg/kg) + Ρισπεριδόνη (0.03 mg/kg)
4	Απομορφίνη (0.5 mg/kg) + Μολσιδομίνη (1 mg/kg) + Ρισπεριδόνη (0.03 mg/kg)

4.6 Στατιστική ανάλυση

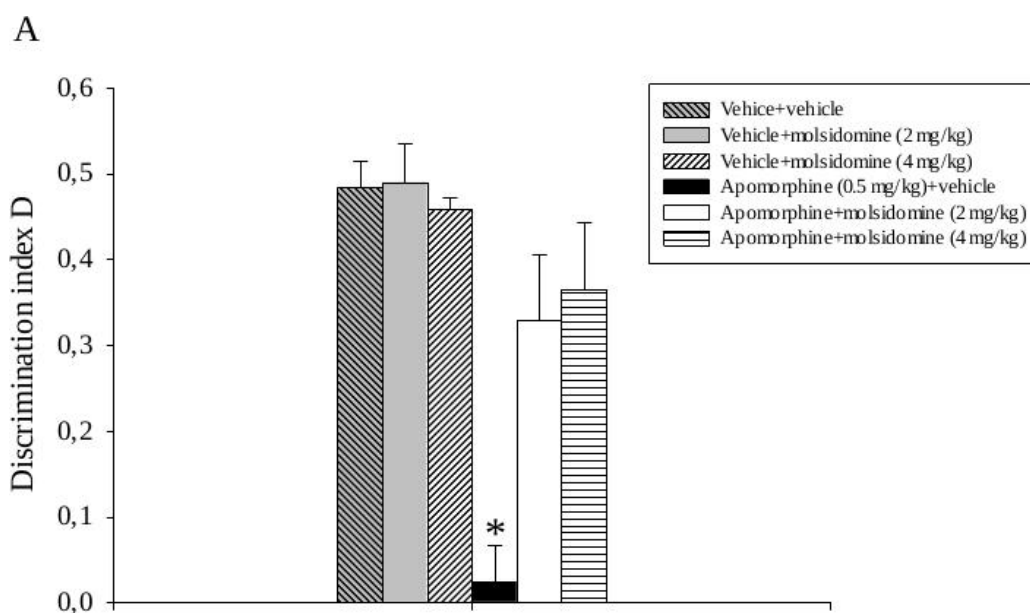
Τα δεδομένα των πειραμάτων 1, 3, 4 και 5 εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα (S.E.M.) και υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας αμφίδρομη ανάλυση διασποράς (Two-way ANOVA). Οι εκ των υστέρων συγκρίσεις μεταξύ των μέσων θεραπείας έγιναν χρησιμοποιώντας το Tukey's t τεστ, αλλά μόνο όταν επιτεύχθηκε σημαντική αλληλεπίδραση.

Τα δεδομένα του πειράματος 2 εκφράστηκαν ως διάμεσοι και διατεταρτημοριακά εύρη. Οι χρόνοι καθυστέρησης εισόδου πριν και μετά το σοκ αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μη παραμετρική δοκιμή Kruskal–Wallis. Οι εκ των υστέρων συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ Dunn. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές $p < 0.05$.

5. Αποτελέσματα

5.1 Πείραμα 1: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μολσιδομίνης στην εξασθένηση επαγόμενων από την απομορφίνη ελλειμάτων απόδοσης στο τεστ θέσης αντικειμένου (OLT).

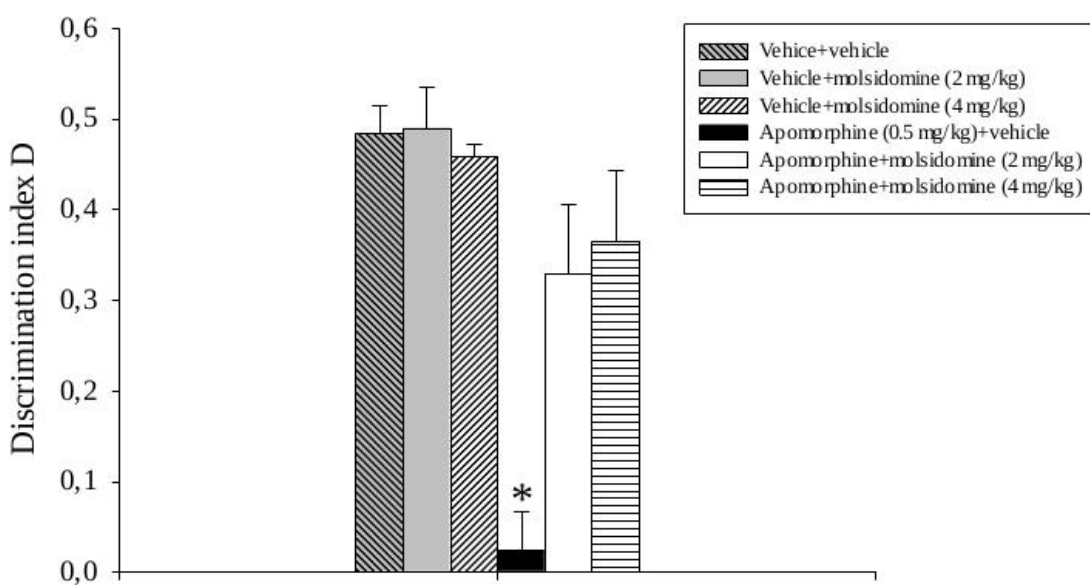
Στατιστική ανάλυση των δεδομένων του δείκτη διάκρισης D (index D) έδειξαν την στατιστική σημαντικότητα της απομορφίνης ($F(1,47) = 25.149$, $p < 0.001$), της μολσιδομίνης ($F(1,47) = 25.149$, $p < 0.001$) και της αλληλεπίδρασης απομορφίνης και μολσιδομίνης ($F(2,47) = 6.769$, $p = 0.003$). Η post-hoc ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε ότι τα ζώα που έλαβαν απομορφίνη και φυσιολογικό ορό ήταν ανίκανα να ξεχωρίσουν το νέο από το γνώριμο αντικείμενο, σε αντίθεση με όλες τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των ομάδων που έλαβαν απομορφίνη + μολσιδομίνη 2 mg/kg και απομορφίνη + μολσιδομίνη 4 mg/kg.



Εικόνα 15:

Fig. 1

A

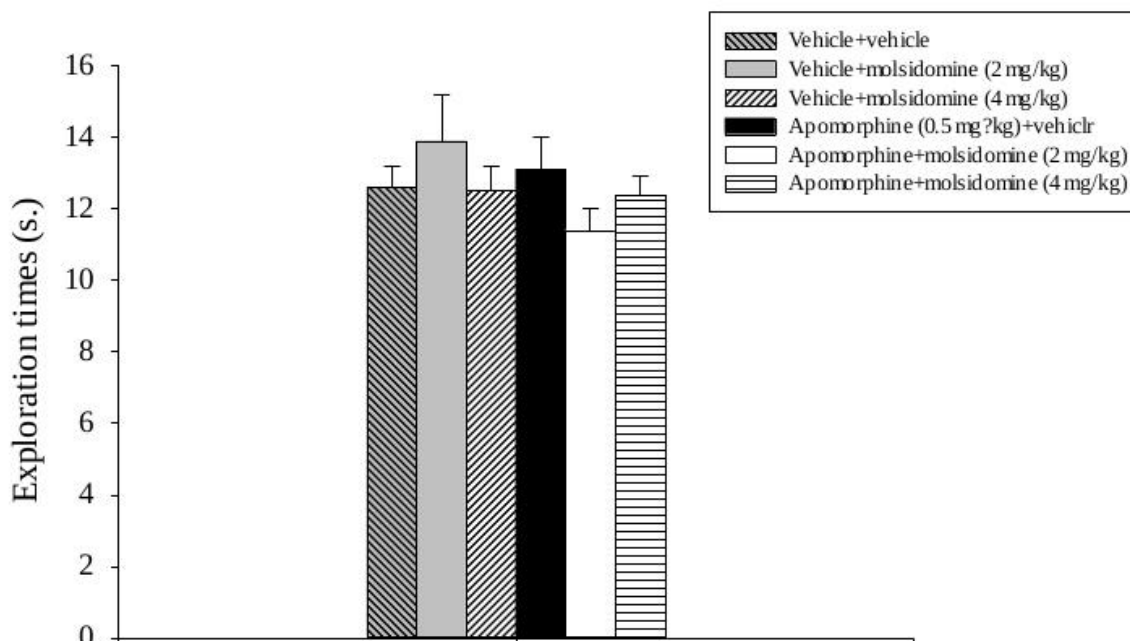


Δείκτης διάκρισης κατά την δεύτερη φάση T2 του OLT. * $p < 0.05$ έναντι όλων των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων

Η αξιολόγηση των δεδομένων της εξερευνητικής δραστηριότητας που εκφράστηκε από τις διαφορετικές πειραματικές ομάδες κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας T2 δεν έδειξε

στατιστικά σημαντική επίδραση της απομορφίνης, της μολσιδομίνης ή του συνδυασμού τους στην εξερευνητική ικανότητα των ζώων.

B



Εικόνα 16: Τεστ Θέσης Αντικειμένου. Συνολική εξερευνητική δραστηριότητα των διαφορετικών πειραματικών ομάδων.

5.2 Πείραμα 2: Επίδραση οξείας χορήγησης μολσιδομίνης στην εξασθένηση των επαγόμενων από την απομορφίνη ελλειμάτων απόδοσης στο τεστ παθητικής αποφυγής (STRAT)

Ο χρόνος εισόδου στην σκοτεινή αίθουσα πριν την ηλεκτρική διέγερση δεν διέφερε ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες $H(5) = 0.586$; $p = 0.989$. Αντιθέτως το τεστ Kruskal-Wallis έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη δοκιμασία ελέγχου μνήμης: $H(5) = 19.157$, $p = 0.002$. Εκ των υστέρων μελέτη των δεδομένων έδειξε ότι η πειραματική ομάδα που έλαβε απομορφίνη και φυσιολογικό ορό παρέμεινε λιγότερο χρόνο στην φωτισμένη πλατφόρμα σε σύγκριση με τις ομάδες που έλαβαν απομορφίνη + μολσιδομίνη 2 mg/kg και απομορφίνη + μολσιδομίνη 4 mg/kg αναδεικνύοντας συνεπώς την επαγόμενη από την απομορφίνη εξασθένηση της συναισθηματικής μνήμης και τον ανταγωνισμό της από τη μολσιδομίνη.

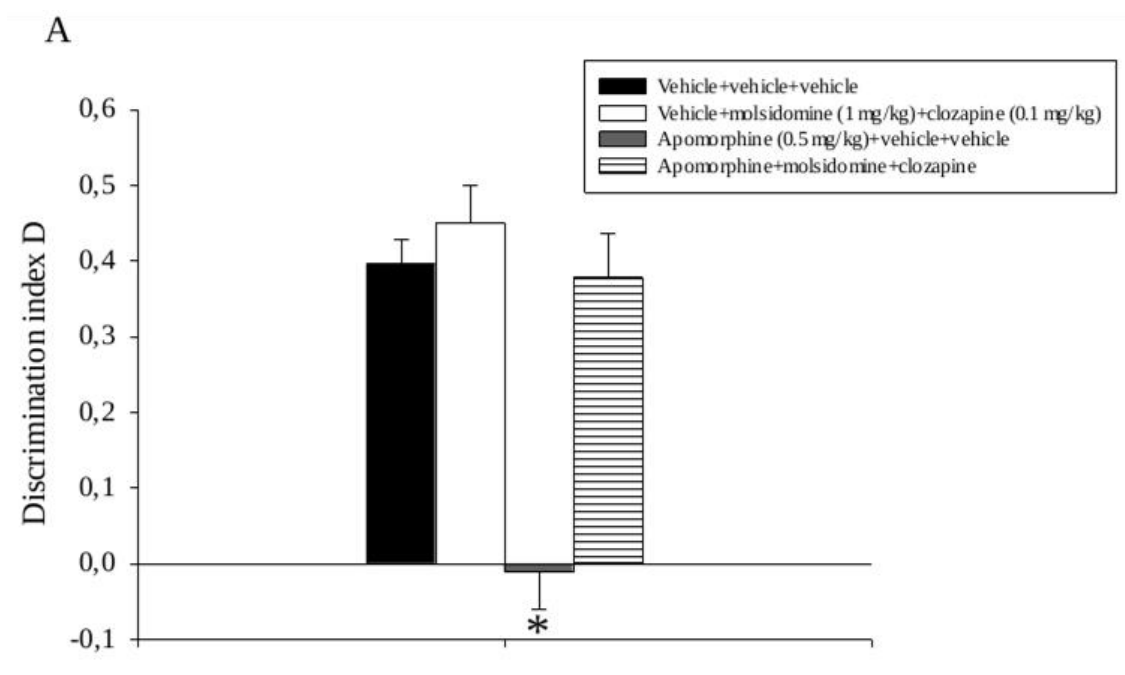
Treatment	Pre-Shock Latencies (s.)	Retention Latencies (s.)
Vehicle+vehicle	24 (13.75–58.5)	180 (180–180)
Vehicle+molsidomine (2 mg/kg)	30.5 (15.75–47.25)	180 (180–180)
Vehicle+molsidomine (4 mg/kg)	31.5 (12.25–62.25)	180 (180–180)
Apomorphine (0.5 mg/kg) + vehicle	30 (25.75–45.75)	40.5 (15.5–70) *
Apomorphine+molsidomine (2 mg/kg)	32 (13.25–47)	93 (67.75–180)
Apomorphine+molsidomine (4 mg/kg)	30 (22.25–52.25)	180 (34.5–180)

Data are expressed as medians and interquartile ranges of 8 rats per treatment group. * $p < 0.05$ vs. all the other groups.

Πίνακας 1: χρόνοι εισόδου πριν και μετά την ηλεκτρική διέγερση στο STPAT.

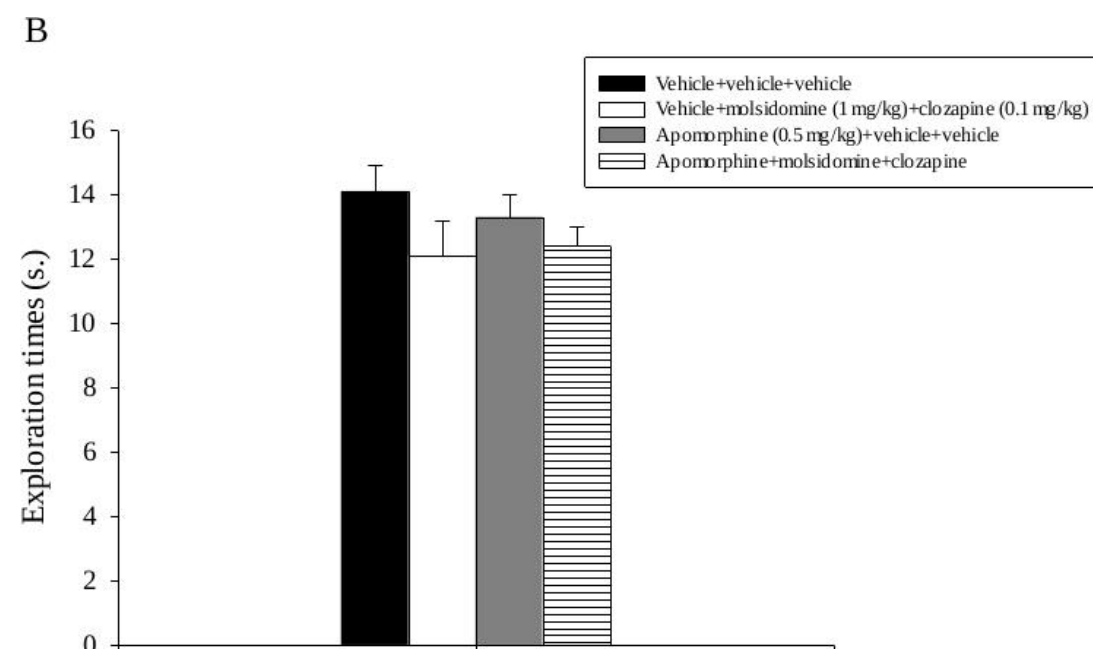
5.3 Πείραμα 3: Επίδραση της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και κλοζαπίνης στα επαγόμενα από την απομορφίνη ελλείματα απόδοσης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT)

Η ανάλυση του δείκτη διάκρισης D (index D) αποκάλυψε στατιστικά σημαντική επίδραση της απομορφίνης $F(1,31) = 35.071$, $p < 0.001$, του συνδυασμού μολσιδομίνης και κλοζαπίνης $F(1,31) = 30.881$, $p < 0.001$, και σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην απομορφίνη και τον συνδυασμό μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και κλοζαπίνης $F(1,31) = 6.544$, $p = 0.016$. Εκ των υστέρων αναλύσεις των δεδομένων του πειράματος έδειξαν ότι τα ζώα της πειραματικής ομάδας που έλαβε απομορφίνη + 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 απομορφίνη + μολσιδομίνη + κλοζαπίνη.



Εικόνα 17: Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου. Δείκτης διάκρισης κατά την δεύτερη φάση T2 του ORT

Ανάλυση των δεδομένων της εξερευνητικής δραστηριότητας που έδειξαν οι διαφορετικές πειραματικές ομάδες κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας T2 δεν κατέδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της απομορφίνης, της μολσιδομίνης, της κλοζαπίνης ή του συνδυασμού τους.

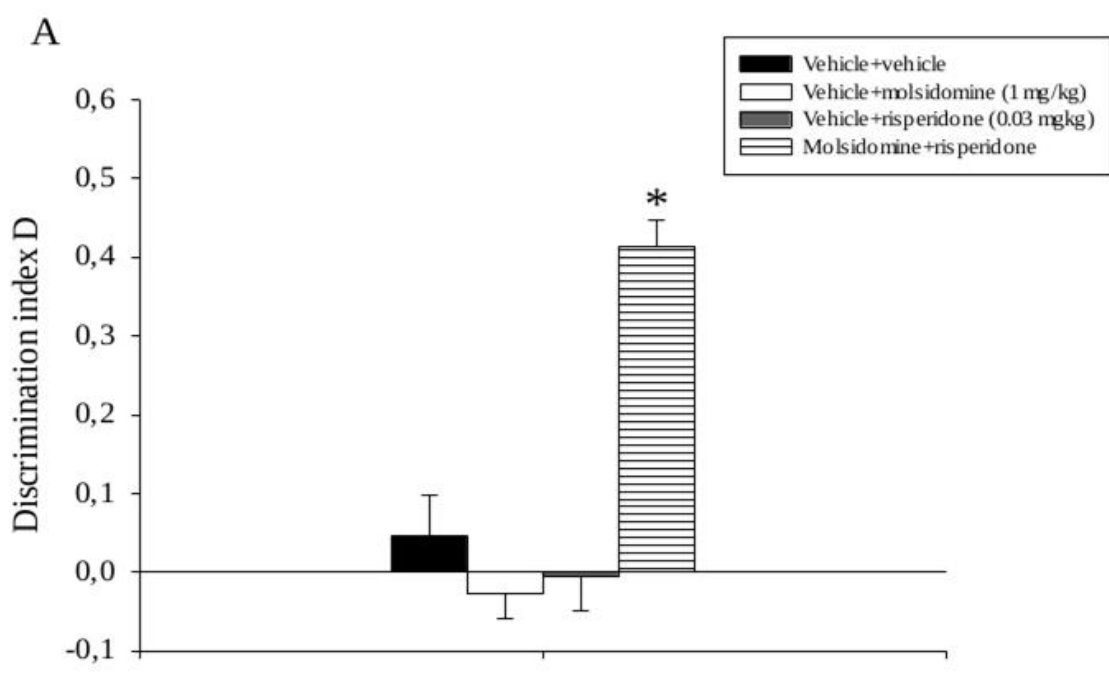


Εικόνα 18: Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου. Συνολική εξερευνητική δραστηριότητα των διαφορετικών πειραματικών ομάδων.

5.4 Πείραμα 4: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στην φυσιολογική απώλεια μνήμης, εξεταζόμενες στο τεστ θέσης αντικειμένου (ORT)

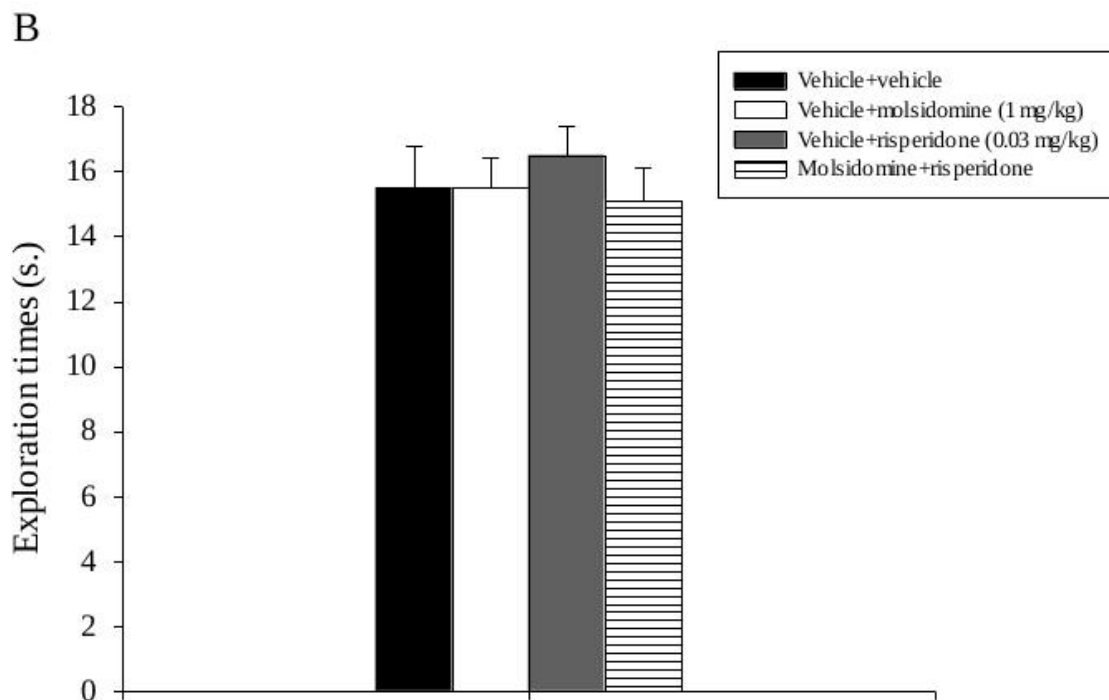
Στατιστικές αναλύσεις που διεξήχθησαν στα δεδομένα του δείκτη διάκρισης D

αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική επίδραση της μολσιδομίνης ($F(1,31) = 21.813$, $p < 0.001$), της ρισπεριδόνης ($F(1,31) = 18.109$, $p < 0.001$, και σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο ουσίες ($F(1,31) = 34.955$, $p < 0.001$). Εκ των υστέρων συγκρίσεις των δεδομένων που διεξήχθησαν έδειξαν ότι τα ζώα που έλαβαν τον συνδυασμό μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης εμφάνισαν υψηλότερο δείκτη διάκρισης D σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες.



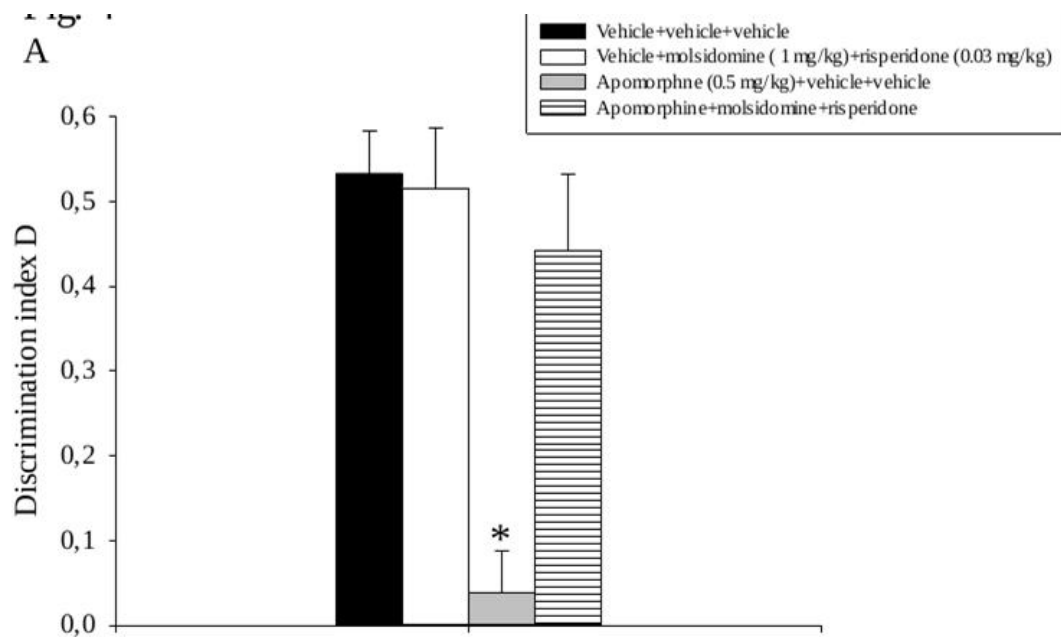
Εικόνα 19: Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου. Δείκτης διάκρισης κατά την δεύτερη φάση T2 του ORT

Η συνολική αξιολόγηση των δεδομένων της εξερευνητικής δραστηριότητας που εκδηλώθηκε από τις διαφορετικές πειραματικές ομάδες κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας T2 δεν έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση των φαρμάκων στην εξερευνητική δραστηριότητα.



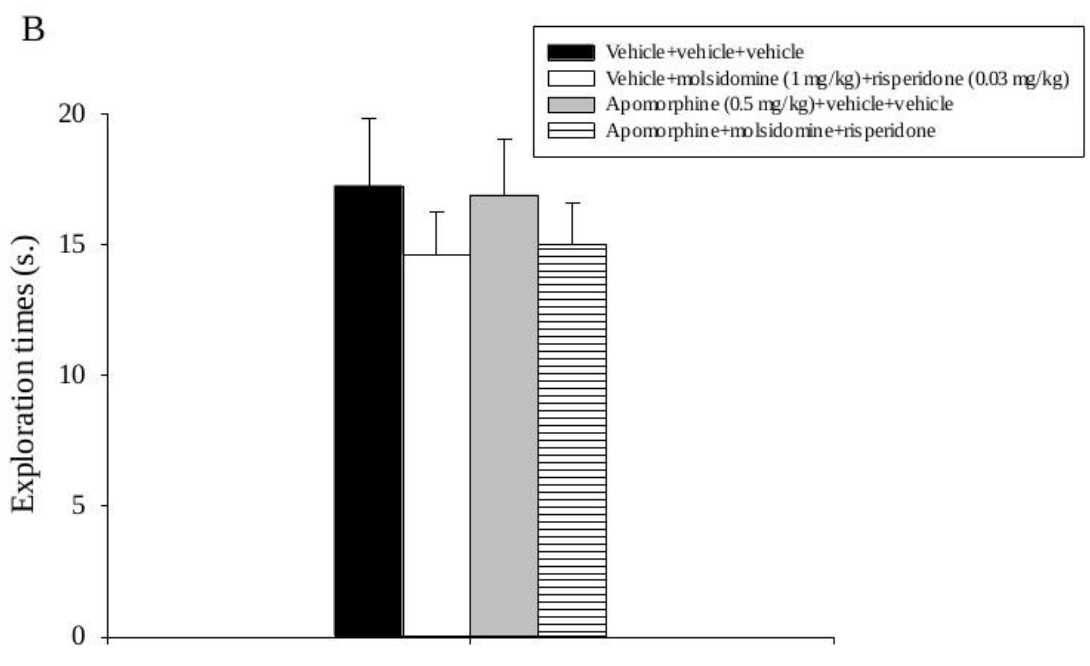
Εικόνα 20: Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου. Συνολική εξερευνητική δραστηριότητα των διαφορετικών πειραματικών ομάδων.

5.5 Πείραμα 5: Επιδράσεις της οξείας χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στα επαγόμενα από την απομορφίνη ελλείματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης εξεταζόμενα στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (ORT). Η αξιολόγηση των δεδομένων του δείκτη διάκρισης D έδειξαν στατιστικά σημαντική επίδραση της απομορφίνης ($F(1,31) = 18.481, p < 0.001$), του συνδυασμού μολσιδομίνης + ρισπεριδόνης ($F(1,31) = 8.608, p = 0.007$), και σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην απομορφίνη και στο συνδυασμό μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης ($F(1,31) = 10.244, p = 0.003$). Εκ των υστέρων συγκρίσεις των δεδομένων έδειξαν ότι η πειραματική ομάδα που έλαβε απομορφίνη + φυσιολογικό ορό + φυσιολογικό ορό εξέφρασαν χαμηλότερο δείκτη διάκρισης D σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένης της ομάδας που έλαβε απομορφίνη + μολσιδομίνη + ρισπεριδόνη.



Εικόνα 21: Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου. Δείκτης διάκρισης κατά την δεύτερη φάση T2 του ORT

Στατιστική ανάλυση που διεξήχθη στα δεδομένα της εξερευνητικής δραστηριότητας που εμφάνισαν οι διαφορετικές πειραματικές ομάδες στη δοκιμασία T2 δεν έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση των φαρμάκων που χορηγήθηκαν επί της εξερευνητικής δραστηριότητας.



Εικόνα 22: Τεστ Αναγνώρισης Αντικειμένου. Συνολική εξερευνητική δραστηριότητα των διαφορετικών πειραματικών ομάδων.

6. Συζήτηση

6.1 Τεστ θέσης αντικειμένου (Object Location Task)

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (36), η απομορφίνη επηρέασε αρνητικά την απόδοση των επίμυων στο τεστ θέσης αντικειμένου, το οποίο εξετάζει την χωρική αναγνωριστική μνήμη των πειραματοζώων, η οποία είναι μία από τις λειτουργίες που επηρεάζονται αρνητικά στους ασθενείς με σχιζοφρένεια. Επομένως η απομορφίνη είναι κατάλληλη ουσία για τη δημιουργία πειραματικών μοντέλων για τα γνωσιακά ελλείματα προκαλούμενα από σχιζοφρένεια. Η μολισδομίνη, και στις δύο δόσεις που εξετάστηκε (2 και 4 mg/kg) βελτίωσε αυτά τα ελλείματα χωρικής μνήμης που προκλήθηκαν από την απομορφίνη. Επομένως τα ευρήματα αυτού του πειράματος βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (10).

6.2 Δοκιμασία παθητικής αποφυγής (Step-Through Passive Avoidance Task)

Σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες, (35,36) η δόση της απομορφίνης (0.5mg/kg) που χορηγήθηκε στη δοκιμασία παθητικής αποφυγής είχε αρνητική επίδραση στη συναισθηματική μνήμη των επίμυων, άλλη μία λειτουργία που επηρεάζεται σε περιπτώσεις σχιζοφρένειας. Η χορήγηση της μολσιδομίνης ανταγωνίστηκε την αρνητική επίδραση της απομορφίνης στη συναισθηματική μνήμη.

6.3 Τεστ αναγνώρισης αντικειμένου (Object Recognition Task)

Όταν εξετάσθηκε η επίδραση της χορήγησης μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης στο τεστ αναγνώρισης αντικειμένου, στο οποίο αξιολογήθηκε η χρονοεξαρτώμενη απώλεια μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης, φάνηκε ότι ο συνδυασμός των δύο αυτών φαρμάκων βελτίωσε την μνήμη των επίμυων, ενώ οι μη δραστικές δόσεις μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης ξεχωριστά, δεν επηρέασαν την απώλεια μνήμης σε κανένα βαθμό.

Ακολούθως, στα πειράματα που εξετάσθηκε η ικανότητα του συνδυασμού μη δραστικών δόσεων μολσιδομίνης και ρισπεριδόνης ή κλοζαπίνης να εξασθενεί τα ελλείματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης προκαλούμενα από την απομορφίνη, αποδείχθηκε ότι οι δύο αυτές συνδυαστικές θεραπείες έχουν την δυνατότητα να ανακουφίσουν την αρνητική επίδραση της απομορφίνης στην μη χωρική αναγνωριστική μνήμη. Οι μη δραστικές δόσεις των φαρμάκων αυτών, όταν χορηγήθηκαν ξεχωριστά, δεν οδήγησαν σε κάποιο αποτέλεσμα.

6.4 Μηχανισμός δράσης της μολσιδομίνης

Οι επιβλαβείς επιδράσεις της απομορφίνης στη μνήμη αποδίδονται στην ενεργοποίηση των D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων στον προμετωπιαίο φλοιό. Επίσης, η απομορφίνη φαίνεται να έχει ανασταλτική επίδραση στην μακροχρόνια ενδυνάμωση (MXE), μια διαδικασία που συμμετέχει στην εδραίωση της συναπτικής πλαστικότητας. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η μολσιδομίνη εξασθενεί τις επιδράσεις της απομορφίνης δεν είναι ακόμα κατανοητοί. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι δότες του NO επάγουν την μακροχρόνια ενδυνάμωση και αυτό αποτελεί μια ένδειξη ενίσχυσης της μνημονικής λειτουργίας (44).

Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι και ο συσχετισμός με την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) μπορεί να εμπλέκεται στη δράση της μολσιδομίνης επί της μνήμης. Συγκεκριμένα, οι αρνητικές επιδράσεις της απομορφίνης και του ενισχυτή απελευθέρωσης ντοπαμίνης αμφεταμίνης επί της προσοχής που τεκμηριώθηκαν σε ποντικούς είναι συνδεδεμένες με αυξημένα επίπεδα cAMP. Ο δότης NO SNP εξουδετέρωσε αυτά τα ελλείματα προσοχής και επανάφερε τα επίπεδα cAMP στη κανονικότητα. (45) Έχει προταθεί επίσης ότι οι δότες NO μπορεί να μειώνουν την επίδραση της απομορφίνης αναστέλλοντας την υπερενεργοποίηση των D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων. (34) Μία άλλη υπόθεση είναι ότι η αντιοξειδωτικές ιδιότητες της μολσιδομίνης μπορεί να είναι η αιτία για τις ευεργετικές τις ιδιότητες, εάν ληφθεί υπόψιν ο συσχετισμός της σχιζοφρένειας με το οξειδωτικό στρες και οι προοξειδωτικές ιδιότητες της απομορφίνης.

6.5 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της συνδυαστικής θεραπείας

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η συνδυαστική θεραπεία που δοκιμάστηκε στην παρούσα μελέτη δρα, δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί. Ωστόσο έχει φανεί ότι τόσο η κλοζαπίνη όσο και η ρισπεριδόνη προάγουν την παραγωγή ντοπαμίνης στο προμετωπιαίο φλοιό και στον υπόκαμπο επίμυων. Σε αυτή τη λειτουργία τους θεωρείται ότι οφείλεται η ευεργετική τους δράση στις περιπτώσεις σχιζοφρένειας. (46) Στηρίζοντας τα προηγούμενα, έχει φανεί ότι ο δότης NO SNP μπορεί να ενισχύσει τη δράση της ρισπεριδόνης ενάντια στα συμπτώματα της σχιζοφρένειας, επάγωντας της μεσολαβούμενη από ρισπεριδόνη εκροή ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. (45) Μία άλλη εξήγηση για την αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής θεραπείας μπορεί να είναι η διεγερτική δράση της μολσιδομίνης και των άτυπων αντιψυχωσικών στη χολινεργική μεταγωγή. Έχει παρατηρηθεί ότι η μολσιδομίνη, η ρισπεριδόνη και η κλοζαπίνη διεγείρουν την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, η οποία είναι ένας νευροδιαβιβαστής που εμπλέκεται σημαντικά στις γνωστικές λειτουργίες. (47,48ⁱ) Σημαντικό ρόλο ίσως διαδραματίζουν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαρμάκων αυτών.

7. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η μολσιδομίνη μπορεί να ανταγωνιστεί ελλείματα χωρικής αναγνωριστικής και συναισθηματικής μνήμης επαγόμενα από την απομορφίνη, καθώς και ότι η συνδυαστική θεραπεία μολσιδομίνης με ρισπεριδόνη ή κλοζαπίνη μπορεί να μειώσει ελλείματα μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης επαγόμενα από την απομορφίνη ή από την φυσιολογική απώλεια μνήμης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολλά υποσχόμενα για την ανάπτυξη νέων, πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη σχιζοφρένεια. Ωστόσο υπάρχουν πολλά εμπόδια ακόμα, καθώς χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνιση των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών δράσης των φαρμάκων αυτών.

8. Ευχαριστίες

Η παρούσα έρευνα και τα ευρήματά της δεν θα είχαν πραγματοποιηθεί χωρίς την συμβολή, την καθοδήγηση και την υπομονή του επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Πιτσικά Νικόλαο, του οποίου οι συμβουλές και διδασκαλία ήταν ο λόγος για τον οποίο ολοκληρώθηκε η εργασία αυτή με επιτυχία. Εκφράζω απεριόριστη ευγνωμοσύνη για την υποστήριξη που προσέφερε και για την πολύτιμη γνώση μου ενθάρρυνε να αποκτήσω. Ευχαριστίες επίσης για τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου κύριο Δήμα Αναστάσιο και κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά για την συμμετοχή και στήριξή τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο για την άψογη συνεργασία και ιδιαίτερος τον κύριο Μπέγα Ηλία για την πολύτιμη βοήθειά του στην ολοκλήρωση των πειραμάτων μας.

9. Βιβλιογραφία

1. American Psychiatry Association, 2013.
2. Stępnicki, P., Kondej, M., & Kaczor, A. A. (2018). Current concepts and treatments of schizophrenia. *Molecules*, 23
3. Zoupa, E., & Pitsikas, N. (2021). The nitric oxide (No) donor sodium nitroprusside (snp) and its potential for the schizophrenia therapy: Lights and shadows. *Molecules*, 26(11). <https://doi.org/10.3390/molecules26113196>
4. Byron K.Y. Bitanirwe, Tsung-Ung W. Woo, Oxidative stress in schizophrenia: An

integrated approach, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Volume 35, Issue 3, 2011, Pages 878-893, ISSN 0149-7634, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.008>.

5. Steeds, H.; Carhart-Harris, R.L.; Stone, J.M. Drug models of schizophrenia. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 2015, 5, 43–58 DOI: 10.1177/ 2045125314557797
6. McDonald, C., & Murray, R. M. (2000). Early and late environmental risk factors for schizophrenia. *Brain Research Reviews*, 31(2-3), 130-137.
7. Gejman PV, Sanders AR, Duan J. The role of genetics in the etiology of schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* 2010 Mar;33(1):35-66. doi: 10.1016/j.psc.2009.12.003. PMID: 20159339; PMCID: PMC2826121.
8. Bitanirwe, B. K., & Woo, T. W. (2011). Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(3),78-893

9. Lau, C. I., Wang, H. C., Hsu, J. L., & Liu, M. E. (2013). Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia?. *Reviews in the Neurosciences*, 24(4), 389-400.
10. Katsanou, L., Fragkiadaki, E., Kampouris, S., Konstanta, A., Vontzou, A., & Pitsikas, N. (2023). The Nitric Oxide (NO) Donor Molsidomine Counteract Social Withdrawal and Cognition Deficits Induced by Blockade of the NMDA Receptor in the Rat. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6866.
11.]\==][. *Pharmacol Rev.* 2001 Mar;53(1):119-33. PMID: 11171942.
12. Garthwaite, J.; Charles, S.L.; Chess-Williams, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988, 336, 385–387.
13. Nikolaos Pitsikas, The role of nitric oxide (NO) donors in anxiety. *Lights and shadows, Nitric Oxide*, Volume 77, 2018, Pages 6-11, ISSN 1089-8603, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.04.002>.
14. Bredt, D. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*, 31(6), 577-596. doi: 10.1080/10715769900301161
15. Hemmens B, Mayer B. (1998). Enzymology of nitric oxide synthases. In: Titheradge M, editor, *Methods in molecular biology. Nitric oxide protocols*, 1st ed, Totowa, NJ: Humana Press. pp. 1–32.
16. Stuehr DJ. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339–359.
17. Moens, A.L.; Kass, D.A. Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26, 2439–2444.
18. David A. Kass, Eiki Takimoto, Takahiro Nagayama, Hunter C. Champion, Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling, *Cardiovascular Research*, Volume 75, Issue 2, July 2007, Pages 303–314, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.02.031>
19. Rodefer JS, Saland SK, Eckrich SJ. Selective phosphodiesterase inhibitors improve performance on the ED/ID cognitive task in rats. *Neuropharmacology* 2012; 62: 1182-90
20. Reneerkens OA, Rutten K, Akkerman S, et al. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition improves object recognition memory: indications for central and peripheral mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* 2012; 97: 370-9.
21. Fernando, V., Zheng, X., Walia, Y., Sharma, V., Letson, J., & Furuta, S. (2019). S-nitrosylation: An emerging paradigm of redox signaling. *Antioxidants*, 8(9)
22. Nikolaos Pitsikas, The role of nitric oxide donors in schizophrenia: Basic studies and clinical applications, *European Journal of Pharmacology*, Volume 766, 2015, Pages 106-113, ISSN 0014-2999, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.045>.

23. Reif, A., Herterich, S., Strobel, A. *et al.* A neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function. *Mol Psychiatry* **11**, 286–300 (2006). <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001779>
24. Shinkai, T., Ohmori, O., Hori, H., and Nakamura, J. (2002). Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **7**, 560–563. doi: 10.1038/sj.mp.4001041
25. Tang, W., Huang, K., Tang, R., Zhou, G., Fang, C., Zhang, J., et al. (2008). Evidence for association between the 5' flank of the NOS1 gene and schizophrenia in the Chinese population. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **11**, 1063–1071. doi: 10.1017/S1461145708008924
26. Cui, H., Nishiguchi, N., Yanagi, M., Fukutake, M., Mouri, K., Kitamura, N., et al. (2010). A putative cis-acting polymorphism in the NOS1 gene is associated with schizophrenia and NOS1 immunoreactivity in the postmortem brain. *Schizophr. Res.* **121**, 172–178. doi: 10.1016/j.schres.2010.05.003
27. Ramirez, J., Garnica, R., Boll, M. C., Montes, S., & Rios, C. (2004). Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: a pilot study. *Schizophrenia research*, **68**(2-3), 357–361. [https://doi.org/10.1016/S09209964\(03\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S09209964(03)00070-7)
28. Kirchner, L., Weitzdoerfer, R., Hoeger, H., Url, A., Schmidt, P., Engelmann, M., et al. (2004). Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. *Nitric Oxide* **11**, 316–330. doi: 10.1016/j.niox.2004.10.005
29. Nakano, Y., Yoshimura, R., Nakano, H., Ikenouchi-Sugita, A., Hori, H., Umene-Nakano, W., ... & Nakamura, J. (2010). Association between plasma nitric oxide metabolites levels and negative symptoms of schizophrenia: a pilot study. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, **25**(2), 139-144.
30. Miller, M.R., Megson, I.L., 2007. Recent development in nitric oxide donor drugs. *Br.J. Pharmacol.* **151**, 305–321.
31. Godínez-Rubí, M., Rojas-Mayorquín, A. E., & Ortuño-Sahagún, D. (2013). Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
32. Deshpande, S. R., Satyanarayana, K., Rao, M. N. A., & Pai, K. V. (2012). Nitric oxide modulators: An emerging class of medicinal agents. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **74**(6), 487–497. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.110572>
33. Pitsikas, N., Zisopoulou, S., & Sakellaris, N. (2006). Nitric oxide donor molsidomine attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801. *Journal of neuroscience research*, **84**(2), 299-305.

34. Gourgiotis, I., Kampouri, N. G., Koulouri, V., Lempesis, I. G., Prasinou, M. D., Georgiadou, G., & Pitsikas, N. (2012). Nitric oxide modulates apomorphine-induced recognition memory deficits in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(4), 507-514.
35. Perla Moreno-Castilla, Kioko Guzman-Ramos, Federico Bermudez-Rattoni, Chapter 28 - Object Recognition and Object Location Recognition Memory – The Role of Dopamine and Noradrenaline, *Handbook of Behavioral Neuroscience*, Elsevier, Volume 27, 2018, Pages 403-413, ISSN 1569-7339, ISBN 9780128120125, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00028-8>.
36. Montoya, A., Lal, S., Menear, M., Duplessis, E., Thavundayil, J., Schmitz, N., & Lepage, M. (2008). Apomorphine effects on episodic memory in young healthy volunteers. *Neuropsychologia*, 46(1), 292-300.
37. LaBar, K. S., & Cabeza, R. (2006). Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 54-64.
38. Picada, J.N.; Schroder, N.; Izquierdo, I.; Henriques, J.A.P.; Roesler, R. Differential neurobehavioral deficits induced by apomorphine and its oxidation product 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2002, 443, 105–111.
39. Pitsikas, N.; Zoupa, E.; Gravanis, A. The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts cognitive deficits induced by the D1/D2 dopaminergic receptor agonist apomorphine in rats. *Psychopharmacology* 2021, 238, 227–237.
40. Ogren, S.E. Evidence for a role of brain serotonergic neurotransmission in avoidance learning. *Acta Physiol. Scand.* 1985, 125 (Suppl. S544), 1–71.
41. Richard A. King, Richard L. Glasser, Duration of electroconvulsive shock-induced retrograde amnesia in rats, *Physiology & Behavior*, Volume 5, Issue 3, 1970, Pages 335-339, ISSN 0031-9384, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(70\)90107-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(70)90107-1).
42. Horiguchi, M.; Huang, M.; Meltzer, H.Y. Interaction of mGlu2/3 agonism with clozapine and lurasidone to restore novel object recognition in subchronic phencyclidine-treated rats. *Psychopharmacology* 2011, 217, 13–24.
43. Potasiewicz, A.; Holuj, M.; Kos, T.; Popik, P.; Arias, H.R.; Nikiforuk, A. 3-Furan-2-yl-N-p-tolyl-acrylamide, a positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ nicotinic receptor, reverses schizophrenia-like cognitive and social deficits in rats. *Neuropharmacology* 2017, 113, 188–197.
44. Georg A. Böhme, Christelle Bon, Jean-Marie Stutzmann, Adam Doble, Jean-Charles Blanchard, Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation, *European Journal of Pharmacology*, Volume 199, Issue 3, 1991, Pages 379-381, ISSN 0014-2999, [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90505-K](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90505-K).
45. Ana Carolina Issy, Maurício dos-Santos-Pereira, João Francisco Cordeiro Pedrazzi, Regina Celia Cussa Kubrusly, Elaine Del-Bel, The role of striatum and prefrontal cortex in the

prevention of amphetamine-induced schizophrenia-like effects mediated by nitric oxide compounds, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Volume 86, 2018, Pages 353-362, ISSN 0278-5846, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.03.015>.

46. Meltzer, H.Y.; McGurk, S.R. The effects of clozapine, risperidone and olanzapine on cognitive functions in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 1999, 25, 235–255.

47. Prast, H.; Philippu, A. Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain. *Eur. J. Pharmacol.* 1992, 216, 139–140.

48. Chung, Y.C.; Li, Z.; Dai, J.; Meltzer, H.Y.; Ichikawa, J. Clozapine increases both acetylcholine and dopamine release in rat ventral hippocampus. Role of the 5-HT_{1A} receptor agonism. *Brain Res.* 2004, 1023, 54–63

i