



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ρόλος των κανναβινοειδών σε πειραματικά πρότυπα ψύχωσης.
Εστιάζοντας στην κανναβιδιόλη.**

**ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΜΠΡΑΚΑΤΣΕΛΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ρόλος των κανναβινοειδών σε πειραματικά πρότυπα ψύχωσης.
Εστιάζοντας στην κανναβιδιόλη.**

**ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΜΠΡΑΚΑΤΣΕΛΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπρακατσέλου Χαράλαμπου: 14-05-2018

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 859/21-06-2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Αντωνίου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Μέλη:

Κωνσταντή Μαρία, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Δάλλα Χριστίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας-Ψυχοφαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-07-2018

«Ο ρόλος των κανναβινοειδών σε πειραματικά πρότυπα ψύχωσης. Εστιάζοντας στην κανναβιδιόλη»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1036^α/21-12-2022

1. Αντωνίου Αικατερίνη, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Κωνσταντή Μαρία, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Δάλλα Χριστίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
4. Παππάς Περικλής, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Παπαθεοδωρόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Φυσιολογίας-Νευροφυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών
6. Σωτηρόπουλος Ιωάννης, Ερευνητής Γ' στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
7. Λεονταρίτης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-12-2022

Ιωάννινα 06-06-2023

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ξεκίνησε το καλοκαίρι του 2018 υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας τότε Καθηγήτριας Φαρμακολογίας, κας Κατερίνας Αντωνίου, στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η ερευνητική της ομάδα διαθέτει μακρά εμπειρία στη μοντελοποίηση ψυχιατρικών ασθενειών και τη μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των κανναβινοειδών. Κλείνοντας ένα κύκλο μελετών των ανεπιθύμητων επιδράσεων της THC, αυτή τη φορά εστίασε στην αξιολόγηση των ευεργετικών φαρμακολογικών ιδιοτήτων των κανναβινοειδών και συγκεκριμένα στις αντιψυχωσικές ιδιότητες της CBD σε προκλινικές προσεγγίσεις των ψυχώσεων.

Η πορεία μέχρι την υποστήριξη το Δεκέμβρη του 2022 ήταν γεμάτη, δημιουργική, απαιτητική σε προσήλωση και αντοχές. Η παρούσα εργασία έχει αποδώσει προς το παρόν 2 δημοσιεύσεις (10.1016/j.neuroscience.2020.09.029 και 10.3389/fphar.2021.746935), με τον κύριο όγκο δουλειάς να βρίσκεται αυτή τη στιγμή υπό συγγραφή προς δημοσίευση. Έχει επίσης παρουσιαστεί μέσω 8 αναρτημένων και 5 προφορικών ανακοινώσεων σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια, λαμβάνοντας ικανοποιητική ανταπόκριση (2 διεθνή travel grants και 1 βραβείο προφορικής ανακοίνωσης). Παράλληλα, όλα αυτά τα χρόνια η παρουσία μου στην ερευνητική ομάδα της κας Αντωνίου μου έδωσε τη δυνατότητα να συμμετάσχω σε πολλά διαφορετικά και ενδιαφέροντα ερευνητικά πρότζεκτ, τα οποία μου προσέφεραν πολλές σημαντικές γνώσεις και εμπειρίες που εν μέρει αντανακλώνται από τη συμμετοχή μου ως συν-συγγραφέας σε 2 δημοσιεύσεις και 16 παρουσιάσεις σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια.

Ιδιαίτερα σημαντική υπήρξε η υποστήριξη από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) μέσω της χορήγησης υποτροφίας διάρκειας 36 μηνών στο πλαίσιο της 2^{ης} δράσης ενίσχυσης των υποψήφιων διδακτόρων. Επίσης, καθοριστική ήταν και η συμβολή του διεθνούς οργανισμού για την έρευνα στον εγκέφαλο (IBRO) που μου χορήγησε υποτροφία για την επίσκεψη στο ίδρυμα ICVS, του Πανεπιστημίου του Μίνιο στην Μπράγκα της Πορτογαλίας η οποία διήρκεσε 5 μήνες και συνέβαλε ουσιαστικά στην απάντηση θεμελιωδών ερευνητικών ερωτημάτων που προέκυψαν στην πορεία της παρούσας εργασίας.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η δουλειά που ακολουθεί δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς τη συμβολή των καθηγητών και των συναδέλφων μου, για τους οποίους είμαι πολύ βαθιά ευγνώμων. Η έκταση των ευχαριστιών που ακολουθεί πιθανώς να φανεί αναντίστοιχη ως προς το μέγεθος και το αποτύπωμα της εργασίας. Δε θα μπορούσα όμως να καταθέσω την τελική μορφή της διατριβής ελλείψει κάποιας εκ των παρακάτω αναφορών:

Αρχικά, θεωρώ τον εαυτό μου εξαιρετικά τυχερό που είχε τη δυνατότητα να είναι μαθητής και συνεργάτης της Καθηγήτριας Φαρμακολογίας κας Κατερίνας Αντωνίου, στην οποία χρωστάω πολύ περισσότερα απ' ότι μπορώ να συνοψίσω εδώ. Με δέχθηκε στην ερευνητική της ομάδα αρχικά ως προπτυχιακό φοιτητή το 2015 και έκτοτε συνέβαλε όσο κανένας άλλος στην εξέλιξη μου σαν επιστήμονα, επενδύοντας την προσοχή και το χρόνο της, αλλά και αποτελώντας υπόδειγμα επιστήμονα, ερευνητή, δασκάλου και ανθρώπου. Η άγρυπνη οξυδέρκεια της, η διαπρεπής της κατάρτιση και δραστηριότητα ως επιστήμονας, η αφοσίωση στο έργο της, η αξεπέραστη εργατικότητα της, η έμπειρη της ματιά και το ακλόνητο αξιακό φορτίο που φέρει την καθιστούν μια εξαιρετικά σπάνια περίπτωση ανθρώπου. Το παράδειγμα που δίνει αγωνιζόμενη σκληρά, πρωτίστως για την επιτυχία των μαθητών, των φίλων και των συνεργατών της, αγγίζει όλους όσους έχουν δουλέψει μαζί της και διαμορφώνει μια μεγάλη οικογένεια επιστημόνων. Θέλω να την ευχαριστήσω θερμά που πάντα είναι εκεί για μένα και για το παράδειγμα που αποτελεί.

Επίσης νιώθω πολύ τυχερός που τα περισσότερα από τα χρόνια μου στο εργαστήριο Φαρμακολογίας δούλεψα πλάι στη Φωτεινή Δελή, βιολόγο, πολύπειρη ερευνητριά και υποδειγματική νευροεπιστήμονα. Η Φωτεινή με δίδαξε πάρα πολλά από τον πρώτο κιόλας καιρό που βρέθηκα στο εργαστήριο και ποτέ δε σταματά να με εκπλήσσει το πόσο πολύ-επίπεδες είναι οι γνώσεις της και το πόσο οξυδερκής και έμπειρη επιστήμονας είναι. Με έχει υποστηρίξει καθοριστικά αμέτρητες φορές είτε σε μικρά καθημερινά ή σύνθετα

και δύσκολα πειραματικά και επιστημονικά ζητήματα, μεταδίδοντάς μου εξαιρετικές πειραματικές δεξιότητες και γνώσεις. Πάντα εξετάζει ενδελεχώς τους προβληματισμούς μου και μου απαντά με πολύτιμες συμβουλές, παρακινώντας με να κάνω σωστές επιλογές. Αποτελεί ιδιαίτερα σπάνια περίπτωση επιστήμονα, καθώς και ανθρώπου με αδιαπραγμάτευτες αξίες και στάση και την ευχαριστώ που με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια και για τη φιλία της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Αλεξία Πολυσίδη, ερευνήτρια συνεργάτη του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και επικεφαλής ερευνητικής ομάδας. Η Αλεξία έχει συμβάλει κεντρικά στην παρούσα εργασία καθώς με έχει φιλοξενήσει στο εργαστήριό της για σύντομο διάστημα προκειμένου να πραγματοποιήσω πειράματα με την καθοδήγηση της, έχει προσφέρει κομβικά πειραματικά δεδομένα στο πλαίσιο αυτής της μελέτης και έχει συνεισφέρει σε όλα τα επίπεδα της παρούσας εργασίας με την έμπειρη ματιά της, την αντίληψη της για το πως εξελίσσεται το πεδίο που μελετάμε, τη μεθοδολογική της αρτιότητα, την εργατικότητα, την πολύ μεγάλη διάθεση για προσφορά και την ευδιάθετη στάση της.

Ένα ακόμη πρόσωπο με πολύ σημαντική συνεισφορά στην παρούσα εργασία αποτελεί η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας στο ΕΚΠΑ, κα Χριστίνα Δάλλα. Ως στενή συνεργάτης με την κα Αντωνίου αφενός, αλλά και ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για της παρούσα διατριβή, έχει υπάρξει πάντα πολύ βοηθητική και υποστηρικτική, ευδιάθετη και αισιόδοξη και διαθέσιμη να βοηθήσει κάθε φορά που υπάρχει ανάγκη.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας κα Μαρία Κωνσταντή, η οποία είναι επίσης μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τη διδακτορική μου διατριβή και όλα αυτά τα χρόνια που βρίσκομαι στο εργαστήριο είναι πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει, να με συμβουλέψει και να μου μεταδώσει τις γνώσεις της.

Πολύ καθοριστική έχει υπάρξει η συνεισφορά του Δρ. Ιωάννη Σωτηρόπουλου, Ερευνητή Γ' στο ΕΚΕΘΕ Δημόκριτος και επικεφαλής ερευνητικής ομάδας στο ICVS Institute, University of Minho, στη Μπράγκα της Πορτογαλίας στην παρούσα εργασία. Ο Γιάννης με φιλοξένησε στην Πορτογαλία και με έφερε σε επαφή με την εξαιρετική και δυναμική ερευνητική κοινότητα του ICVS της οποίας είναι αναπόσπαστο κομμάτι, συμμετείχε καθοριστικά στο παρών ερευνητικό έργο ως συνεργάτης και αποτέλεσε μέλος της επταμελούς επιτροπής αξιολόγησης της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ πολύ που με πρόσεξε σα μέλος της ερευνητικής του ομάδας όσο ήμουν στο ICVS, τις συμβουλές του, την πολύ ευχάριστη παρέα του σε περιόδους που δουλεύαμε παράλληλα σε εξοντωτικά ωράρια, τη συμβολή του στην ανάπτυξη των οριζόντιων δεξιοτήτων μου και γενικότερα για την πολύ σημαντική βοήθεια που μου παρείχε σε πάρα πολλά επίπεδα.

Αντίστοιχα καθοριστική ήταν και η συνεισφορά του Δρ. Joao Oliveira, φαρμακοποιού και επικεφαλής ερευνητικής ομάδας στο ICVS Institute. Αποτελεί έναν κοντινό συνεργάτη που είχε το ρόλο του επιβλέποντά μου κατά το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριό του στο ICVS. Ο Joao με εισήγαγε στην *in vivo* ηλεκτροφυσιολογία αφιερώνοντας πολύ χρόνο για να με διδάξει, επιβλέψει, αλλά και να καθοδηγήσει τις σύνθετες αναλύσεις των ηλεκτοφυσιολογικών δεδομένων μου. Ήταν πάντα εκεί όταν αντιμετώπιζα δυσκολίες στην ηλεκτροφυσιολογία με τον πολύ εφησυχαστικό, φιλικό και άνετο τρόπο του. Τον ευχαριστώ πολύ για το ενδιαφέρον που έχει δείξει για τη συνεργασία μας αλλά και τη πολύ σημαντική και πολύ-επίπεδη υποστήριξή που μου παρείχε σε προσωπικό επίπεδο. Αποτελεί ξεχωριστό παράδειγμα επιστήμονα, ερευνητή και ανθρώπου και θα χαιρόμουν πολύ να συνεργαστώ ξανά μαζί του στο μέλλον.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας, κο Γιώργο Λεονταρίτη, στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων που αποτέλεσε μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής και που όλα αυτά τα χρόνια που συνυπάρχουμε στο εργαστήριο είναι πάντα διαθέσιμος να με βοηθήσει σε ο,τι χρειαστώ και για τις πολύ ενδιαφέρουσες συζητήσεις και τη μετάδοση πολύτιμων εμπειριών.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Φαρμακολογίας κο Περικλή Παππά, που αποτέλεσε μέρος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και επίσης για όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο Φαρμακολογίας που είναι πάντα πρόσχαρος και ανοικτός για να με βοηθήσει σε ο,τι χρειαστώ.

Ένα πρόσωπο που θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω είναι ο Καθηγητής Φυσιολογίας-Νευροφυσιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, κος Κωνσταντίνος Παπαθεωδορόπουλος, καθώς αποτέλεσε μέλος της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής, ενώ επιπρόσθετα αποτελεί και εξαιρετικός συνεργάτης της ερευνητικής μας ομάδας στο πλαίσιο άλλων ερευνητικών έργων.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τους συναδέλφους μου στην ερευνητική μας ομάδα:

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου απέναντι στον Μιχάλη Ασπρογέρακα, Βιολόγο συνεργάτη της ερευνητικής μας ομάδας και συμμετέχων στο μεγαλύτερο κομμάτι του προτζεκτ. Ο Μιχάλης βρέθηκε για δεύτερη φορά στην ερευνητική ομάδα της κας Αντωνίου στις αρχές του 2019 και εκ τότε η πολύ ευχάριστη παρουσία του πλαισίωσε τη λειτουργία μας. Ο Μιχάλης έχει δουλέψει σκληρά για τη συγκεκριμένη εργασία σε πάρα πολλά διαφορετικά επίπεδα, ενώ η διαυγής ειλικρίνεια του, η ακούραστη προθυμία του να βοηθήσει και η ηρεμία που τον διακατέχει τον καθιστούν εξαιρετικό συνεργάτη.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Γιώργο Ντούλα, Χημικό και ΥΔ στην ερευνητική μας ομάδα για τη πολύ μεγάλη συνεισφορά του στην παρούσα εργασία. Ο Γιώργος εντάχθηκε στην ομάδα μας το Φθινόπωρο του 2020 και έκτοτε ενίσχυσε πολύ έντονα τη δυναμική της ομάδας με το οξύ πνεύμα του, την ακούραστη παρατηρητικότητα του, την εργατικότητα του, τις εξαιρετικές του ικανότητες σε μεθοδολογίες όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και τη διαρκή διάθεσή του να συνεισφέρει ενισχύοντας σημαντικά τις πειραματικές δυνατότητες της ερευνητικής μας ομάδας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Όλγα Τσαρνά, Φαρμακοποιό και ΥΔ στην ερευνητική μας ομάδα με σημαντική συνεισφορά στην παρούσα μελέτη. Η Όλγα εντάχθηκε στην ομάδα μας το 2021 και εκ τότε έχει προσφέρει πολλά με τις γνώσεις της στη μικροσκοπία, την ανάπτυξη σχετικών πρωτοκόλλων, τη σπανία και εκπληκτική εργατικότητα της όταν έχει κληθεί και τη διάθεση της να βοηθήσει όπου αυτό είναι αναγκαίο.

Είναι αδύνατο να παραλείψω τη Ναυσικά Πούλια, Βιολόγο και διδάκτορα Ψυχοφαρμακολογίας που παρόλο που ολοκλήρωσε τον κύκλο της στο εργαστήριο πριν εγώ ξεκινήσω το διδακτορικό, είχε ήδη προλάβει να με μάθει πολλά από τα πράγματα που ξέρω καθώς κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου ήταν εκείνη που με εισήγαγε στη χρήση πειραματοζώων, στα συμπεριφορικά πειράματα και τη βιοχημική φαρμακολογία.

Από την ερευνητική ομάδα της κας Αντωνίου έχουν περάσει πολλοί ακόμα άνθρωποι που είχαν σημαντική συνεισφορά στη συγκεκριμένη εργασία, αλλά και στη διαμόρφωση ενός πολύ όμορφου, φιλικού και παραγωγικού περιβάλλοντος εργασίας, συνθέτοντας ένα αρμονικό μωσαϊκό ετερογενών χαρακτήρων. Σε αυτό το πλαίσιο ευχαριστώ πολύ την Εύα-Μαρία Νάτση, το Γιάννη Ζυγαντίδη, τη Μαρία Γιαννούλη το Μάκη Νάκα, το δρ. Βασίλη Καφετζόπουλο και τη Στεργία Κουρούνη.

Ξεχωριστή θέση στις ευχαριστίες μου και πολύ περισσότερο νοητικά διαθέτω για την Αλεξάνδρα Πολύζου, Βιολόγο και ΥΔ στο εργαστήριο Φαρμακολογίας. Με την Αλεξάνδρα συνυπάρχουμε στο εργαστήριο από το 2018 και από πολύ νωρίς με έκανε να καταλάβω ότι είναι μια πολύ καλή ικανή συνεργάτης, ήρεμη δύναμη σαν επιστήμονας και χαρακτήρας και ένα από τα πιο θετικά και ευχάριστα άτομα που έχω γνωρίσει. Η παρουσία της έκανε πιο όμορφο όλο τον καιρό εκπόνησης της διατριβής μου, ενώ σε όλες τις απαιτητικές για τα ψυχικά μου αποθέματα περιόδους, η παρουσία της με γέμιζε με αισιοδοξία.

Δε μπορώ να παραλείψω και τους υπόλοιπους συναδέλφους του εργαστηρίου Φαρμακολογίας που επίσης συνέβαλαν πολυεπίπεδα με την παρουσία και τη φιλία τους. Τη Χριστίνα Ανδριοπούλου, τον Αριστείδη Κοφινά, την Κυριακή Πρεμέτη και τη δρ. Μάνθα Σωτηροπούλου καθώς και τα πολλά παιδιά που έχουν συνυπάρξει για πιο σύντομα διαστήματα στο εργαστήριο.

Ένα ακόμη άτομο στο οποίο χρωστάω πολλά είναι η Αναστασία Βαμβακά-Ιακώβου, Βιολόγο και ΥΔ στο Δημόκριτο και το ICVS, με βοήθησε καθοριστικά με την παρουσία και τη φιλία της τους 5 μήνες που ήμουν στην Πορτογαλία και συνεχίζει ακόμη και σήμερα. Πρόκειται για ένα σπάνιο άτομο, με εξαιρετική εργατικότητα, εξαιρετική επιστημονική κατάρτιση και τεράστια διάθεση να βοηθήσει και την ευχαριστώ πολύ γι' αυτό.

Επίσης θα ήθελα να συμπεριλάβω και τη δρ. Joana Silva, Βιολόγο, νέα επικεφαλής ερευνητικής ομάδας στο ICVS αλλά και κεντρική συνεργάτη του δρ. Γιάννη Σωτηρόπουλου, που λειτούργησε καταλυτικά στο να ενταχθώ, και να κινηθώ με ελευθερία στο ICVS, καθώς και στο να αναπτύξω ταχύτατα τα πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας και συνεστιακής μικροσκοπίας που χρειάστηκαν στο πλαίσιο των πειραματικών μου εργασιών.

Αντίστοιχα θέλω να συμπεριλάβω στις ευχαριστίες μου μερικούς από τους συναδέλφους που συνυπήρξαμε στο ICVS και είχαν μεγάλη συνεισφορά στην παρούσα μελέτη. Το ICVS αποτελεί ένα εξαιρετικά σπάνιο ινστιτούτο από πλευράς ανθρώπινου δυναμικού. Πολύ ζεστό και φιλικό και παράλληλα εστιασμένο στην αιχμή της επιστήμης και εξαιρετικά παραγωγικό. Συγκεκριμένα ευχαριστώ το Jonas Campos, διατροφολόγο και ΥΔ στο ICVS, ο οποίος με εισήγαγε στην αυτοματοποιημένη ανάλυση εικόνων και αποτελεί πρότυπο εργατικότητας, στάσης ως επιστήμονας και παράδειγμα άντλησης κινήτρου. Είμαι σίγουρος ότι ο Jonas θα έχει μια λαμπρή πορεία ως ερευνητής. Ευχαριστώ επίσης τη Patricia Gomes, τον Carlos Marques, την Αναστασία Μεγαλοκονόμου, τον Joao Machado, τη δρ. Sara Silva, τη Daniela Garcia, τη Daniela Monteiro και τη Nela Mota.

Ευχαριστώ πολύ και τη δρ. Σοφία Μπέλλου, Ειδική Επιστημονική Συνεργάτη στο ΙΤΕ και υπεύθυνη του οριζόντιου δικτύου μικροσκοπίας για τη μεγάλη βοήθεια της στις διαδικασίες συνεστιακής απεικόνισης, τη μεγάλη της διάθεση της να συνεργαστεί και να προσφέρει τις εξαιρετικές γνώσεις που κατέχει στο πεδίο της μικροσκοπίας.

Ευχαριστώ επίσης τον εξαιρετικό επιστήμονα, δρ. Τάσο Δελή, ειδικό συνεργάτη στη μονάδα μικροσκοπίας του ΙΙΒΕΑΑ, για την καθοριστική βοήθειά του σε ζητήματα που άπτονται στην ανάπτυξη αλγορίθμων αυτοματοποιημένης ανάλυσης εικόνων μικροσκοπίας και των μετέπειτα αναλύσεων.

Θέλω ακόμα να ευχαριστήσω τα μέλη της ερευνητικής ομάδα του κου Λέανδρου Σκαλτσούνη, Καθηγητή Φαρμακογνωσίας στο Φαρμακευτικό τμήμα του ΕΚΠΑ για την άριστη συνεργασία στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος T1-ΕΔΚ που έθεσε το εφελτήριο για την παρούσα μελέτη και παρείχε τη CBD.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Ευαγγελία και Γιάννη και τον αδελφό μου, Γιώργο για την ατέλειωτη υποστήριξη και την ενθάρρυνση να προσεγγίσω τους στόχους μου.



Μέρος των πειραματικών διαδικασιών της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο ICVS (Life and Health Sciences Research Institute) της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου του Minho στη Μπράγκα της Πορτογαλίας, στο πλαίσιο μιας υποτροφίας (IBRO-PERC short stay grant) από τον παγκόσμιο οργανισμό για την έρευνα στον εγκέφαλο (IBRO).



Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδασκτόρων» (Αριθμός Υποτροφίας: 1203).

Πίνακας περιεχομένων:

1.	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1.	Σχιζοφρένεια	1
1.2.	Νευροβιολογικό υπόστρωμα σχιζοφρένειας	3
1.2.1.	Θεωρία δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια	3
1.2.2.	Θεωρία δυσλειτουργίας του γλουταματεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια	9
1.3.	Πειραματικά μοντέλα – προκλινικές προσεγγίσεις	14
	d-αμφεταμίνη	16
	Κεταμίνη	20
1.4.	Ενδοκανναβινοειδές σύστημα – Κανναβινοειδή	28
	Κανναβινοειδή και έλεγχος ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου	31
	Κανναβιδιόλη	34
2.	ΣΚΟΠΟΣ	38
3.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	39
3.1.	Πειραματόζωα	39
3.2.	Φάρμακα	39
3.3.	Πειραματικό σχεδιασμός	40
3.3.1.	Οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης	40
3.3.2.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης	41
3.3.3.	Οξεία χορήγηση κεταμίνης	42
3.3.4.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης	44
3.4.	Μέθοδοι εκτίμησης παραμέτρων συμπεριφοράς	46
3.4.1.	Δοκιμασία ανοικτού πεδίου (OF)	46
3.4.2.	Δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς/συνδιαλλαγής (SI)	47
3.4.3.	Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (Novel object recognition, NOR)	49
3.4.4.	Δοκιμασία Προ-Παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού Αιφνιδιασμού (Pre-Pulse Inhibition test, PPI)	51
3.5.	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	53
3.5.2.	Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας	55
3.6.	Εκτίμηση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western	59
3.7.	Καταγραφές δυναμικών πεδίου	60
3.7.1.	Στερεοταξικό χειρουργείο τοποθέτησης των ηλεκτροδίων	60
3.7.2.	Καταγραφή και ανάλυση εξωκυττάρων δυναμικών πεδίου (LFPs)	61
3.7.3.	Εκτίμηση των σημείων καταγραφής	63
3.8.	Ανοσοσήμανση έναντι παρβαλβουμίνης – καταμέτρηση αριθμού κυττάρων	65
3.9.	Εκτίμηση μεταβολών στην έκφραση των CB1 υποδοχέων στις ανασταλτικές απολήξεις των CCK ανοσοθετικών κυττάρων.	67
3.10.	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	69
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
4.1.	Οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης	70
4.1.1.	Επίδραση της CBD στο κινητικό πρότυπο της οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης	70
4.1.2.	Επίδραση της CBD ως προς την εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού	71
4.2.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης	73
4.2.1.	Εκτίμηση κινητικού προτύπου μετά από οξεία χορήγηση αμφεταμίνης (challenge) σε επίμυες υπερευαίσθητοποιημένους σε αμφεταμίνη και ο αντισταθμιστικός ρόλος της CBD	73
4.2.2.	Εκτίμηση ντοπαμινεργικής δραστηριότητας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επίμυων ευαίσθητοποιημένων στην επαναλαμβανόμενη χορήγηση αμφεταμίνης	74
4.3.	Οξεία χορήγηση κεταμίνης	77

4.3.1.	Διερεύνηση της δράσης της CBD στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε μη εξοικειωμένους επίμυες	77
4.3.2.	Διερεύνηση της δράσης της κεταμίνης στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε εξοικειωμένους επίμυες	78
4.3.3.	Διερεύνηση της δράσης της CBD στην οξεία χορήγηση κεταμίνης στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε εξοικειωμένους επίμυες.	79
4.3.4.	Εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού	80
4.3.5.	Εκτίμηση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων	81
4.3.6.	Εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western	83
4.4.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης	87
4.4.1.	Συμπεριφορικές προσεγγίσεις	87
4.4.1.1.	Επίδραση της επαναλαμβανόμενης ΚΕΤ στην κινητικότητα και ο αντισταθμιστικός ρόλος της CBD	87
4.4.1.2.	Δοκιμασία με d-αμφεταμίνη στο ανοικτό πεδίο (amphetamine challenge) κατά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης	89
4.4.1.3.	Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου κατά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης	90
4.4.1.4.	Δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς κατά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης	90
4.4.1.5.	Εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού κατά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης	91
4.4.2.	Εκτίμηση ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων κατόπιν της επαναλαμβανόμενης χορήγησης κεταμίνης	93
4.4.3.	Εκτίμηση γλουταματεργικής δραστηριότητας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων κατόπιν της επαναλαμβανόμενης χορήγησης κεταμίνης	96
4.4.4.	Εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των υποδοχέων του γλουταματεργικού συστήματος μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western	102
4.4.4.2.	Πρωτεϊνική έκφραση AMPA υποδοχέων	105
4.4.5.	Εκτίμηση της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές	108
4.4.6.	Καταγραφή ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου σε αναισθητοποιημένα πειραματόζωα	110
4.4.6.1.	Φασματική πυκνότητα ισχύος	110
4.4.6.2.	Συνοχή	113
4.4.7.	Ποσοτικοποίηση αριθμού ανοσοϊστοχημικά σημασμένων κυττάρων έναντι της πρωτεΐνης παρβαλβουμίνης	115
4.4.8.	Ανοσοϊστοχημική προσέγγιση CB1 υποδοχέων	119
4.4.8.1.	Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού της ανοσοϊστοχημικής χρώσης CB1 υποδοχέων	119
4.4.8.2.	Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού της ανοσοϊστοχημικής χρώσης CB1 υποδοχέων στα σημεία που συνεντοπίζονται με τις χρώσεις για το πεπτίδιο CCK8 και τον κυστιδιακό μεταφορέα vGAT	119
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	122
5.1.	Συνοπτική ανασκόπηση αποτελεσμάτων	122
5.2.1.	Προκλινικό πρότυπο ψύχωσης μέσω χορήγησης οξείας d-αμφεταμίνης	122
5.2.2.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης	124
5.3.	Προκλινική προσέγγιση ψυχωτικής συμπτωματολογίας μέσω της χορήγησης κεταμίνης	126
5.3.1.	Διερεύνηση της δράσης της CBD στην οξεία χορήγηση κεταμίνης	127
5.3.2.	Εκτίμηση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων	129

5.3.3.	Εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western.	130
5.4.1.	Επαναλαμβανόμενη χορήγηση ΚΕΤ και ο αντισταθμιστικός ρόλος της CBD	132
5.4.2.	Εκτίμηση ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων κατόπιν της επαναλαμβανόμενης χορήγησης κεταμίνης	134
5.4.3.	Εκτίμηση γλουταματεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων κατόπιν της επαναλαμβανόμενης χορήγησης κεταμίνης.	136
5.4.4.	Εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφραση των υποδοχέων του γλουταματεργικού συστήματος	137
5.4.5.	Εκτίμηση της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές.	139
5.4.6.	Καταγραφή ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου	140
5.4.7.	Προσδιορισμός ανοσοϊστοχημικά σημασμένων κυττάρων έναντι της πρωτεΐνης παρβαλβουμίνης	143
5.4.8.	Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού της ανοσοϊστοχημικής χρώσης CB1 υποδοχέων στα σημεία συνεντοπισμού με τις χρώσεις για το πεπτίδιο CCK8 και τον κυστιδιακό μεταφορέα vGAT	145
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	147
7.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	149
8.	SUMMARY	151
9.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	153

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σχιζοφρένεια

i. Γενικά στοιχεία

Η Σχιζοφρένεια αποτελεί μια σοβαρή ψυχιατρική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από σημαντικές μεταβολές στη σφαίρα της αντίληψης, των σκέψεων, της διάθεσης και της συμπεριφοράς. Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν ανακάμπτει πλήρως από τη νόσο, ενώ ο επιπολασμός της εκτιμάται κοντά στο 1% του γενικού πληθυσμού. Η συμπτωματολογία της σχιζοφρένειας μπορεί να καταταχθεί σε τρεις κύριες κατηγορίες:

- i. Τα θετικά συμπτώματα τα οποία χαρακτηρίζουν τα ψυχωτικά επεισόδια και εκδηλώνονται με ψευδαισθήσεις, παραληρηματικές ιδέες, αποδιοργανωμένο ρου σκέψεων, συγκεχυμένο λόγο, ψυχοκινητική διέγερση και επαναλαμβανόμενες κινήσεις.
- ii. Οι πιο συνήθεις εκφάνσεις των αρνητικών συμπτωμάτων είναι η έλλειψη κινήτρου, η τάση για κοινωνική απόσυρση, η ανηδονία και η αμβλυμμένη δυνατότητα έκφρασης συναισθημάτων (blunted affect). Γενικά υπάρχει μια εκτεταμένη δυσλειτουργία του συστήματος ανταμοιβής (impaired reward processing) η οποία διαμεσολαβείται από τη ντοπαμινεργική λειτουργία, ενώ οι διαταραχές που συγκαταλέγονται στο φάσμα της απάθειας σχετίζονται με αποδιοργανωμένες γνωστικές διεργασίες που αφορούν το σχεδιασμό (planning), περιλαμβάνοντας και την εκτέλεση ενεργειών για την επίτευξη κάποιου στόχου (goal-directed behavior).
- iii. Τις γνωστικές δυσλειτουργίες, οι οποίες είναι εμφανείς ήδη από το πρόδρομο στάδιο της νόσου, πριν την εμφάνιση των θετικών και αρνητικών συμπτωμάτων. Αφορούν ελλείματα στην αντίληψη, τη μνήμη και τη μάθηση, τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες και τη διατήρηση της προσοχής. Συνήθως απαιτείται περισσότερος χρόνος για την επεξεργασία ερεθισμάτων, ενώ συχνά παρατηρούνται διαταραχές που αφορούν την ικανότητα επεξεργασίας οπτικών ερεθισμάτων, όπως πχ η αντίληψη οπτικών ψευδαισθήσεων.

Η νόσος συνήθως εμφανίζεται μεταξύ εφηβείας και της αρχής της τέταρτης δεκαετίας ζωής, με τις περισσότερες περιπτώσεις να αφορούν τα μέσα της τρίτης. Η εμφάνιση μπορεί να συμβεί είτε ξαφνικά, είτε με σταδιακή εμφάνιση συμπτωμάτων, τα οποία σε αυτή την περίπτωση είναι κυρίως γνωστικά, δευτερευόντως αρνητικά και χαρακτηρίζουν το πρόδρομο στάδιο (prodromal stage) της νόσου. Η διάγνωση πραγματοποιείται βάσει ειδικών αλγορίθμων με διαγνωστικά κριτήρια που απαιτούν τη μόνιμη παρουσία συμπτωμάτων και ελλιπούς λειτουργικότητας του ατόμου για τουλάχιστον ένα (ICD-11) ή έξι (DSM-5) μήνες (Robert A McCutcheon *et al.*, 2020).

Η ολική αποδρομή της νόσου είναι σπάνια, ενώ συχνή είναι η συνοσηρότητα με άλλες ψυχιατρικές διαταραχές, ιδιαίτερα τη διαταραχή χρήσης ουσιών (substance use disorder), αλλά και τη κατάθλιψη, αγχώδεις διαταραχές και την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή. Ταυτόχρονα, κοινωνικά προβλήματα όπως η ανεργία, έλλειψη στέγης και φτώχεια έχουν ισχυρή θετική συσχέτιση με τη σχιζοφρένεια, ενώ συχνά συνυπάρχουν και προβλήματα φυσικής υγείας, που σε συνδυασμό με τα αυξημένα ποσοστά αυτοκτονίας σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, έχουν ισχυρό αποτύπωμα στο προσδόκιμο ζωής των ασθενών (Whiteford *et al.*, 2013). Είναι συνεπώς ευκόλως κατανοητό ότι πρόκειται για μια ασθένεια με δριμείς επιπτώσεις για το άτομο και μεγάλο οικονομικό αντίκτυπο στην κοινωνία.

Υπάρχουσες φαρμακευτικές θεραπευτικές επιλογές

Η θεραπευτική προσέγγιση της σχιζοφρένειας στηρίζεται κυρίως στη φαρμακευτική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων. Τα πρώτα αντιψυχωσικά φάρμακα ήρθαν τη δεκαετία του 1950 με τη χλωροπρομαζίνη, η οποία προέκυψε από την προσπάθεια σύνθεσης χημικού ανάλογου της προμεθαζίνης, μιας αντισταμινεργικής φαινοθειαζίνης, η οποία επέφερε μια κατάσταση νωθρότητας και ευφορίας σε υγιείς ανθρώπους και μια κατάσταση ηρεμίας, νυσταγμού και χαλάρωσης σε προ-χειρουργικούς ασθενείς (Delay *et al.*, 1952). Τις επόμενες δύο δεκαετίες μια σειρά ενώσεων υπέστησαν σύνθεση και χαρακτηρισμό και αποτέλεσαν την πρώτη γενιά αντιψυχωσικών φαρμάκων. Πρόκειται για ισχυρούς ανταγωνιστές των D2 υποδοχέων της ντοπαμίνης που αποτελέσαν την κατηγορία των «τυπικών» αντιψυχωσικών (ή αλλιώς «νευροληπτικά»), τα οποία συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Οι κύριες υποκατηγορίες αυτών είναι πέρα από τις φαινοθειαζίνες, όπως η χλωροπρομαζίνη, οι βουτυροφαινόνες με χαρακτηριστικό παράδειγμα την αλοπεριδόλη η οποία έχει υψηλή ισχύ ως προς τον ανταγωνισμό των D2 υποδοχέων, αλλά και τις θειοξανθίνες, όπως η θειοθιξένη. Τα τυπικά αντιψυχωσικά αντιμετωπίζουν επιτυχώς τη θετική συμπτωματολογία γι' αυτό κι η ανακάλυψη τους αποτέλεσε τομή. Η αποτελεσματικότητά τους βέβαια περιορίζεται εκεί, δεδομένου ότι αδυνατούν να ανακουφίσουν ικανοποιητικά την αρνητική και τη γνωστική συμπτωματολογία (Mark A. Geyer *et al.*, 2012). Παράλληλα, πολύ συχνά εμφανίζουν εκτεταμένες και σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως τα εξωπυραμιδικά συμπτώματα, η όψιμη δυσκινησία, η υπερπρολακτιναμία, η έντονη καταστολή και το κακοήθες σύνδρομο των νευροληπτικών. Αξίζει να αναφερθεί ότι η χρήση των συγκεκριμένων αντιψυχωσικών μπορεί να επιδεινώσει παρά να αναχαιτίσει την εμφάνιση των αρνητικών συμπτωμάτων και γνωστικών ελλειμμάτων.

Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 εισάγεται η κλοζαπίνη η οποία ανοίγει νέους ορίζοντες, καθώς φαίνεται να έχει ένα καλύτερο προφίλ από πλευράς ανεπιθύμητων ιδιοτήτων σε σχέση με τα τυπικά, ιδιαίτερα σε επίπεδο εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων. Παράλληλα, εμφανίζει μια πρωτοφανή μεν, αλλά όχι επαρκώς αποτελεσματική δυνατότητα να αντιμετωπίζει αρνητική και γνωστική συμπτωματολογία, τουλάχιστον σε βραχυχρόνιο επίπεδο (Aleman *et al.*, 2017). Σύντομα αποσύρεται μετά την παρατήρηση ότι συνδέεται με μεγάλα ποσοστά ακοκκιοκυτταραιμίας σε ασθενείς κατά τις πρώτες 18 εβδομάδες της θεραπείας (Idänpää-Heikkilä *et al.*, 1975) και επαναεισαγάγεται ως επιλογή τρίτης γραμμής λόγω της μοναδικής αποτελεσματικότητάς της σε ανθεκτικές μορφές της νόσου, αφού διευθετηθεί ότι εν τέλει η παρενέργεια αυτή αφορά περίπου το 1% των ασθενών και μπορεί να αποφευχθεί όταν υπάρχει στενή παρακολούθηση αιματολογικών δεικτών. Η κλοζαπίνη άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη της επόμενης γενιάς αντιψυχωσικών φαρμάκων, των άτυπων αντιψυχωσικών (Mark A. Geyer *et al.*, 2012), τα οποία χαρακτηρίζονται από διαφορετικό και πιθανώς πιο ανεκτό προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών, καθώς εμφανίζουν εξωπυραμιδικά και υπερπρολακτιναμία αισθητά πιο σπάνια σε σχέση με τα τυπικά, είναι όμως πιο στενά συνδεδεμένα με άλλες ανεπιθύμητες όπως η έντονη αύξηση σωματικού βάρους, το μεταβολικό σύνδρομο και τα καρδιαγγειακά προβλήματα (Leucht *et al.*, 2009; Khasawneh and Shankar, 2014).

Τα 2^{ης} γενιάς αντιψυχωσικά διατηρούν ανταγωνιστική δράση για τους D2 υποδοχείς της ντοπαμίνης και εμφανίζουν επιπρόσθετα ανταγωνιστική δράση για συγκεκριμένους υποδοχείς της σεροτονίνης, συνήθως τους 5-HT_{2A}, δευτερευόντως τους 5-HT_{2C}, αλλά και προς υποδοχείς άλλων συστημάτων όπως το νοραδρενεργικό. Σε αντίθεση με τα 1^{ης} γενιάς, τα άτυπα έχουν ποικίλες αναλογίες τάξης συγγένειας με τους επιμέρους υποδοχείς στόχους ή διαφορετικούς συνδυασμούς αποκλεισμού ντοπαμινεργικών και σεροτονεργικών υποδοχέων, παρέχοντας ένα ευρύτερο φάσμα εξειδικευμένων ιδιοτήτων της φαρμακολογικής τους δράσης αλλά και των ανεπιθύμητων ενεργειών. Πέρα από την κλοζαπίνη χαρακτηριστικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα άτυπα αποτελούν η ολανζαπίνη, η ρισπεριδόνη, η αμισουλπρίδη, η κουετιαπίνη και η αριπιπραζόλη.

Ως προς την αποτελεσματικότητά έναντι των συμπτωμάτων, τα 2^{ης} γενιάς αντιψυχωσικά αναμένονταν να αντιμετωπίζουν πιο αποτελεσματικά τα αρνητικά και γνωστικά συμπτώματα (Mark A. Geyer *et al.*, 2012), ωστόσο το κατά πόσο η προσδοκία αυτή έχει εκπληρωθεί είναι εν τέλει αμφίβολο (Davidson *et al.*, 2009; Tyrer and Kendall, 2009; Hartling *et al.*, 2012; Fusar-Poli *et al.*, 2015). Υπάρχουν δε ερευνητές που

αμφισβητούν τη προτίμηση των άτυπων έναντι των τυπικών ως πρώτης γραμμής (Hartling *et al.*, 2012), ενώ κάποιοι υποστηρίζουν ότι η διάκριση σε δυο τάξεις χρήζει επαναξιολόγησης προκειμένου να προκύψουν αποτελεσματικότερες κλινικές πρακτικές με σκοπό τη βέλτιστη επιλογή θεραπείας σε εξατομικευμένο επίπεδο (Fischer-Barnicol *et al.*, 2008; Owens, 2008; Tyrer and Kendall, 2009). Εν πάση περιπτώσει, ο αυξημένος κίνδυνος για εξωπυραμδικά, τουλάχιστον από τα τυπικά που δρουν ως ισχυροί ανταγωνιστές των D2, είναι ένα πάγιο κριτήριο για πολλούς θεραπευτικούς αλγόριθμους (θεραπευτικά πρωτόκολλα), ώστε να ευνοούν ελαφρώς την προτίμηση των άτυπων (Βλέπε NICE, UK).

Συγκεντρωτικά, φαίνεται ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί μεγάλη πρόοδος από την ανακάλυψη της χλωροπρομαζίνης πριν 70 χρόνια, παρά την αλματώδη πρόοδο στις νευροεπιστήμες, στη λειτουργική απεικόνιση, τη γενετική και την ανάπτυξη όλων των εξαιρετικών εργαλείων στη βασική και κλινική έρευνα. Ταυτόχρονα, το αποτύπωμα της νόσου στους ασθενείς αλλά και την υπόλοιπη κοινωνία είναι εξαιρετικά δριμύ και επιτάσσει την ανάγκη για νέες πιο αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Υπάρχει πλήθος φαρμακολογικών προσεγγίσεων που μελετάται, ενώ πραγματοποιούνται και εκτεταμένες προσπάθειες για την καλύτερη κατανόηση του πολύ σύνθετου νευροβιολογικού υποστρώματος της σχιζοφρένειας. Αυτό άλλωστε αποτελεί και την προϋπόθεση ώστε να γίνουν πιο στοχευμένες και πιο επιτυχημένες οι προσπάθειες. Ένας από τους λόγους που η ανάπτυξη αντιψυχωσικών τις προηγούμενες δεκαετίες δεν είχε την επιθυμητή πρόοδο είναι το γεγονός ότι δεν οδηγήθηκε μόνο από προσπάθειες επέμβασης σε κομβικά σημεία της αιτιοπαθολογίας, αλλά κυρίως από την πρακτική ευκολία ως προς την ανάπτυξη συγκεκριμένων ομάδων ενώσεων.

Υπάρχει πληθώρα μορίων που μελετώνται ως υποψήφια αντιψυχωσικά και στοχεύουν σε διαφορετικά νευροδιαβιβαστικά συστήματα από εκείνα της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης. Δεδομένης της εμπλοκής του γλουταματεργικού συστήματος στο νευροβιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας, πλήθος μορίων που δρουν στο σύστημα αυτό έχουν επίσης μελετηθεί. Ανταγωνιστές της γλυκίνης (που είναι συνδιαβιβαστής του γλουταμικού), όπως η D-σερίνη, παρόλο που έδωσαν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε προκλινικό επίπεδο, απέτυχαν σε επόμενες κλινικές δοκιμασίες. Επιπλέον, μελετώνται ουσίες που δρουν αγωνιστικά στους μεταβοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού παρέχοντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Taly, 2013; Hudson *et al.*, 2016; Yang and Tsai, 2017). Αντίστοιχα δοκιμάζονται ουσίες με αγωνιστική δράση, ή δράση αλλοστερικού τροποποιητή στους M1 μουσκαρινικούς υποδοχείς, και τους α7 νικοτινικούς υποδοχείς (Sotiropoulos *et al.*, 2021).

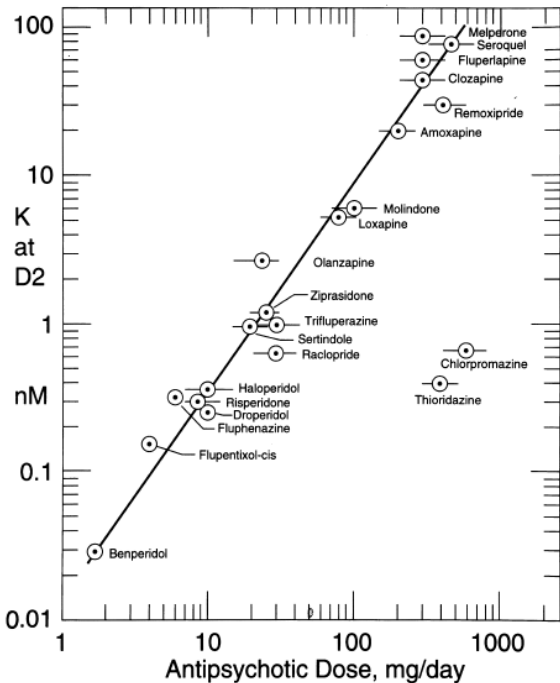
1.2. Νευροβιολογικό υπόστρωμα σχιζοφρένειας

1.2.1. Θεωρία δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος

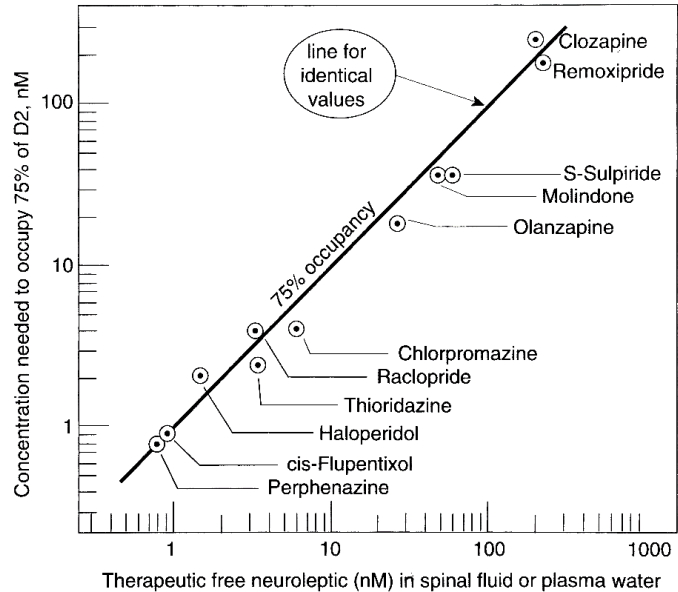
Όπως προαναφέρθηκε, όλα τα αντιψυχωσικά φάρμακα δρουν ανταγωνιστικά στους D2 υποδοχείς. Είναι μάλιστα γνωστό ότι η αποτελεσματική δόση του κάθε φαρμάκου είναι εκείνη η οποία προκαλεί κατάληψη κατά 70-80% των D2 υποδοχέων, όπως αυτό εκτιμάται από μελέτες με ραδιενεργούς προσδέτες σε ασθενείς, ενώ η χημική κινητική των προσδετών για τους D2 υποδοχείς μπορεί να προβλέψει τη θεραπευτική δόση (βλ. εικόνες 1 και 2) (Seeman and Tallerico, 1998). Είναι άξιο αναφοράς το γεγονός ότι αντίστοιχος συσχετισμός δεν παρατηρείται με άλλους υποδοχείς από άλλα συστήματα όπως της σεροτονίνης (Karur and Seeman, 2001; McCutcheon *et al.*, 2019). Αυτή η στενή σύνδεση της αντιψυχωσικής δράσης με το ντοπαμινεργικό σύστημα αποτέλεσε ένα από τα μεγάλα επιχειρήματα υπέρ της διαμόρφωσης της θεωρίας της δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια. Η άλλη παρατήρηση η οποία μάλιστα είχε προηγηθεί χρονικά, είναι το γεγονός ότι οι ντοπαμινεργικοί αγωνιστές, όπως η αμφεταμίνη, έχουν ψυχομιμητική δράση σε υγιείς ανθρώπους και επιδεινώνουν τη σχετική κατάσταση των ασθενών (Sotiropoulos *et al.*, 2021). Τις προηγούμενες δεκαετίες εκτεταμένες μελέτες χαρακτήρισαν το ντοπαμινεργικό σύστημα και συνέδεσαν συγκεκριμένα σημεία της παθολογίας του με τη νευροβιολογική βάση της σχιζοφρένειας. Στην πορεία η αδυναμία του να παρέχει μηχανιστικές απαντήσεις για τους

υποκείμενους μηχανισμούς ευνόησε τη δημοφιλία και άλλων υποθέσεων, οι οποίες θα συζητηθούν επίσης, πρόσφατα όμως ευρήματα από καινές απεικονιστικές μεθοδολογίες επαναφέρουν το ενδιαφέρον στους D2 υποδοχείς.

1.1



1.2



Εικόνες 1.1 και 1.2:

Ο συσχετισμός μεταξύ της χημικής κινητικής αντιψυχωσικών φαρμάκων με το θεραπευτικό αποτέλεσμα (1.1), και τα επίπεδα του φαρμάκου στα βιολογικά υγρά αθενών (1.2). Seeman and Talleric, 1998

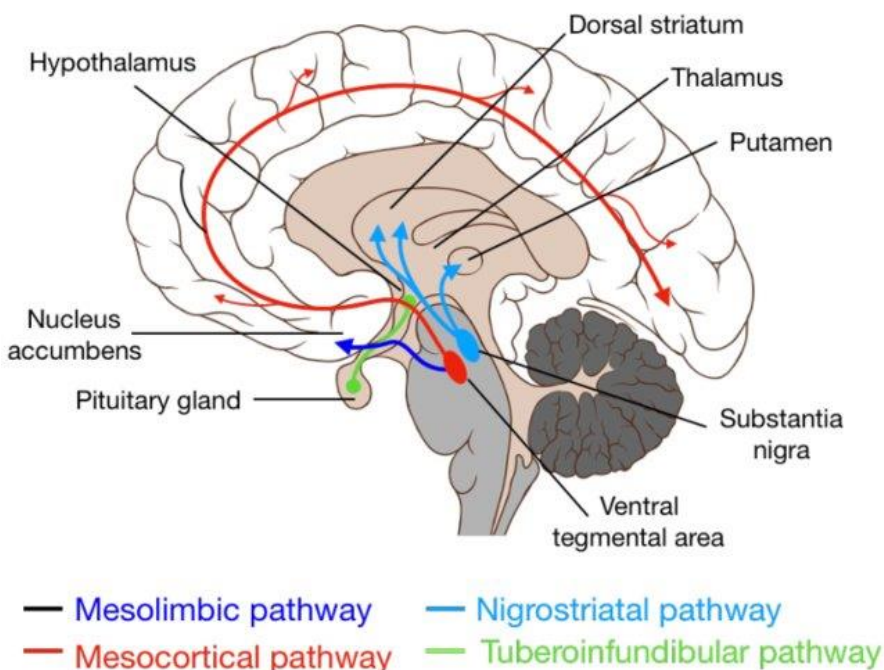
Ντοπαμινεργικό σύστημα

Το ντοπαμινεργικό σύστημα είναι εκείνο που διαμορφώνεται τελευταίο κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου (Lauder and Bloom, 1974), γεγονός που υποδηλώνει τη μεγάλη του επιρροή στη σταθεροποίηση και ενσωμάτωση των νευρωνικών κυκλωμάτων, και συνεπάγεται την απορρύθμιση κεντρικών λειτουργιών όταν αυτό δε λειτουργεί ομαλά. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες προβολής (projection neurons) εδράζουν κυρίως σε συγκεκριμένους μεσεγκεφαλικούς πυρήνες και εκφύουν δεμάτια αξόνων που καταλήγουν σε πολλές διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, ελέγχοντας πλήθος λειτουργιών συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας, της γνωστικής λειτουργίας, της ανταμοιβής, της κινητοποίησης, των ανώτερων γνωστικών λειτουργιών και του νευροενδοκρινικού ελέγχου. Ως επί τω πλείστον εντοπίζονται συγκεκριμένα στην κοιλιακή καλυπτική περιοχή (ventral tegmental area, VTA) ή στη μέλανα ουσία (substantia nigra, SN) και με αφετηρία κυρίως αυτούς τους πυρήνες ξεκινούν οι ντοπαμινεργικές οδοί που καταλήγουν στις εξής περιοχές του εγκεφάλου:

- i. Μεσομεταιχμιακή οδός (mesolimbic pathway): Αφορά τους νευρώνες με σώματα που εντοπίζονται στη VTA και προβάλλουν στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα (ventral striatum), συμπεριλαμβάνοντας τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος (nucleus accumbens, NAc), στον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή. Είναι εναλλακτικά γνωστή ως η οδός ανταμοιβής του εγκεφάλου (reward pathway) λόγω της ενορχήστρωσης λειτουργιών που εμπλέκονται σε γνωστικές

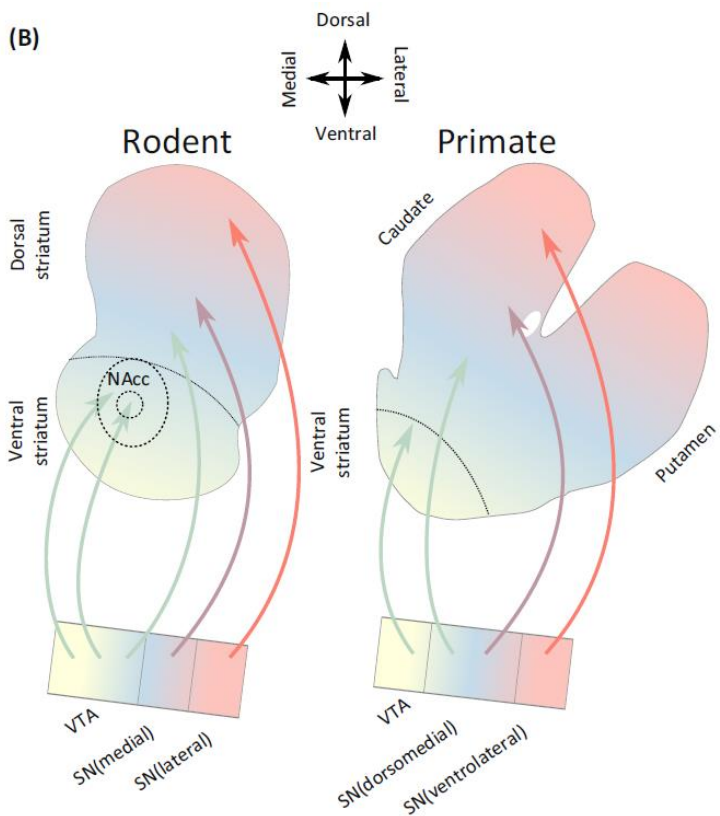
εκφάνσεις της ανταμοιβής (emotional cognition) όπως η ανάδειξη και ο βαθμός υπεροχής των ερεθισμάτων που προκαλούν ανταμοιβή αλλά και η απόδοση «του τόνου της ανταμοιβής» (incentive salience/salience attribution), η ενίσχυση (reinforcement) και η εμφάνιση ηδονής σε συγκεκριμένα ερεθίσματα (pleasure response from certain stimuli).

- ii. Μεσοφλοιική οδός (mesocortical pathway): Αφορά τους νευρώνες από την VTA που προβάλλουν στο προμετωπιαίο φλοιό και εμπλέκεται στη ρύθμιση κυρίως γνωστικών λειτουργιών, αλλά και στη ρύθμιση του κινήτρου και του συναισθήματος. Η συγκεκριμένη οδός εμφανίζεται διαταραγμένη στις ψυχώσεις και στη σχιζοφρένεια και είναι συσχετισμένη κυρίως με το νευροανατομικό υπόστρωμα της αρνητικής συμπτωματολογίας. Σε συνδυασμό με τη μεσομεταιχμιακή οδό, συχνά αναφέρονται μαζί ως μεσοφλοιομεταιχμιακή οδός.
- iii. Μελαινοραβδωτή οδός (nigrostriatal pathway): Είναι η οδός των προβολών νευρώνων που εδράζουν στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars compacta, SNc) και προβάλλουν στο ραχιαίο τμήμα του ραβδωτού σώματος, στον κερκοφόρο πυρήνα και το κέλυφος (caudate nucleus και putamen αντίστοιχα). Πρόκειται για διμερή (bilateral) οδό που σχετίζεται με τον έλεγχο της κινητικότητας (motor function), αλλά και τον έλεγχο γνωστικών λειτουργιών. Ο εκφυλισμός των κυττάρων της SNc είναι ένα από τα κύρια ευρήματα σε ασθενείς με νόσο του Parkinson, ενώ ο ανταγωνισμός των D2 υποδοχέων στο ραχιαίο ραβδωτό από τα αντιψυχωσικά είναι κεντρικό σημείο του βιολογικού υποστρώματος των εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων. Τα άτυπα αντιψυχωσικά εμφανίζουν σπανιότερα εξωπυραμιδικά καθώς ο ανταγωνισμός των προσυναπτικών 5-HT_{2A} υποδοχέων αίρει τον ανασταλτικό έλεγχο των προσαγωγών σεροτονεργικών ινών στην απελευθέρωση ντοπαμίνης.
- iv. Φυματοχοανική οδός (Tuberoinfundibular pathway): Η συγκεκριμένη οδός αφορά σε κύτταρα που εδράζουν στον τζορειδή πυρήνα του υποθαλάμου και προβάλλουν στη διάμεση υπεροχή, απελευθερώνοντας ντοπαμίνη στην υπόφυση. Ελέγχει την έκκριση ορμονών, συμπεριλαμβανομένης της προλακτίνης και η λειτουργία της οδού είναι διαταραγμένη σε καταστάσεις υπερπρολακτιναιμίας, όπως συμβαίνει ως ανεπιθύμητη ενέργεια από τα αντιψυχωσικά.



Εικόνα 1.3:

Γραφική αναπαράσταση των οδών προβολής του ντοπαμινεργικού συστήματος στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Από τους (Nummenmaa et al., n.d.)



Εικόνα 1.4:

Η συνδεσμολογία των ντοπαμινεργικών μεσεγκεφαλικών πυρήνων με το ραβδωτό. Από (McCutcheon et al., 2019)

Trends in Neurosciences

Ντοπαμινεργικό σύστημα και Μεταβολές στη σχιζοφρένεια

Για πολλά χρόνια κεντρικό δόγμα στην εξήγηση της συμπτωματολογίας της σχιζοφρένειας ήταν η προβληματική λειτουργία της μεσοφλοιομεταιχμιακής οδού που είχε ως αποτέλεσμα εκτεταμένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα υποφλοιικά σε αντίθεση με τη μειωμένη δραστηριότητα στο φλοιό (Weinberger and Berman, 1988; Davis *et al.*, 1991). Από τις πρώτες κλινικές παρατηρήσεις που ευνόησαν τη διαμόρφωση του μοντέλου αυτού ήταν ότι επιληπτικές κρίσεις από εστίες στην περιοχή προκαλούσαν συμπτώματα παρόμοια με σχιζοφρένεια (GIBBS, 1951), ενώ τα πρώτα πειραματικά μοντέλα με χρήση αμφεταμίνης εμφάνιζαν αυξήσεις στην ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος (G and Imperato, 1988). Παράλληλα, αναδείχθηκε ότι τα αντιψυχωσικά αναστρέφουν το συμπεριφορικό φαινότυπο της αμφεταμίνης όταν χορηγούνται στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος και όχι στο ραχιαίο ραβδωτό (Pijnenburg *et al.*, 1975). Ωστόσο, οι νευροβιολογικοί μηχανισμοί δράσης των ντοπαμινεργικών ψυχοδιεγερτικών δεν είναι ασφαλές να ταυτίζονται πλήρως με τους υποκείμενους μηχανισμούς της νόσου, καθώς οι ουσίες αυτές πέρα από ψυχοκινητική διέγερση προκαλούν ευφορία, αύξηση της εγρήγορσης και τόνωση της αυτοπεποίθησης, συμπτώματα που δε συναντώνται στη σχιζοφρένεια. Παράλληλα υπήρξαν μελέτες σε μεταθανάτιο υλικό, οι οποίες συνέδεαν τη νόσο με αυξημένα επίπεδα ντοπαμίνης και μεταβολιτών στο ραβδωτό των ασθενών. Η διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων κι

από αυτές τις μελέτες είναι αρκετά αμφίβολη γιατί πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την τελική εικόνα, όπως η ύπαρξη και ο τύπος της αγωγής ή το στάδιο της νόσου.

Η υπολειτουργία της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας στον προμετωπιαίο φλοιό στη σχιζοφρένεια στηρίζεται από δεδομένα που προκύπτουν εδώ και αρκετές δεκαετίες, κυρίως από απεικονιστικές μελέτες της αιματικής ροής μέσω ραδιενεργού ξένον, ή από μελέτες με τομογράφο εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography, PET) (Weinberger and Berman, 1988). Πιο πρόσφατες μελέτες εντοπίζουν μειωμένη δυνατότητα απελευθέρωσης ντοπαμίνης στον ραχιαίο έξω προμετωπιαίο φλοιό (dorsolateral prefrontal cortex, DLPFC) και υποστηρίζουν πως ένα επαναλαμβανόμενο εύρημα είναι η αδυναμία του πρόσθιου φλοιού του προσαγωγίου (anterior cingulate cortex, ACC) και του ραχιαίου-πλάγιου τμήματος του προμετωπιαίου φλοιού (DLPFC) να «επιστρατεύσει» τοπικά τη ντοπαμίνη κατά τη διάρκεια μιας γνωστικής δοκιμασίας (cognitive task).

Αντίστοιχα νέες απεικονιστικές προσεγγίσεις έχουν ανανεώσει όσα γνωρίζουμε για τη ντοπαμινεργική λειτουργία του ραβδωτού σώματος στη σχιζοφρένεια. Συγκεκριμένα οι εξελίξεις στη τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων επιτρέπουν την απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο με μεγαλύτερη ευκρίνεια με τελικό αποτέλεσμα να είναι δυνατός ο διαχωρισμός των επιμέρους υποπεριοχών του ραβδωτού. Νέα απεικονιστικά δεδομένα λοιπόν, καθώς και μετα-αναλύσεις προηγούμενων πειραματικών δεδομένων, συγκλίνουν με συνέπεια στο ότι η αύξηση της βιοσύνθεσης και της νευροδιαβίβασης της ντοπαμίνης στο ραβδωτό, είναι εστιασμένη στη συνειρμική και όχι στη μεταιχμιακή του μοίρα. Μελέτες ασθενών με υψηλό δείκτη επικινδυνότητας (clinical high risk, CHR) για εμφάνιση ψύχωσης, παρουσιάζουν μεταβολές κυρίως στο συνειρμικό ραβδωτό, ενώ η πορεία προς την εμφάνιση ψύχωσης συνοδεύεται από σταδιακές μεταβολές στη δυνατότητα βιοσύνθεσης ντοπαμίνης στο ραχιαίο ραβδωτό (συμπεριλαμβάνοντας και το αισθητικοκινητικό) έναντι του κοιλιακού. Παράλληλα, η ενεργοποίηση εμπρόσθιων περιοχών κατά τη διάρκεια μιας μνημονικής δοκιμασίας παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τη δυναμική βιοσύνθεσης στο συνειρμικό ραβδωτό σε άτομα που εμφανίζουν πρόδρομα συμπτώματα ψύχωσης (Fusar-Poli *et al.*, 2010), συμβάλλοντας έτσι στη σύνδεση των επιμέρους διαφορών της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας ανάλογα με την νευρανατομική τους εντόπιση κατά την προσπάθεια αποτύπωσης του παθοφυσιολογικού υποστρώματος της σχιζοφρένειας. Προς επίρρωση των προαναφερθέντων, απεικονιστικές μελέτες λειτουργικής απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού έχουν δείξει ότι το ραχιαίο ραβδωτό εμφανίζει μειωμένη ικανότητα σύνδεσης με φλοιικές περιοχές σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση, γνωρίσματα πρόδρομης ψύχωσης και σχιζοφρένεια, ενώ η απόκριση στη θεραπεία συσχετίζεται με αύξηση της λειτουργικής ικανότητας σύνδεσης του συνειρμικού ραβδωτού με τον προμετωπιαίο φλοιό.

Κοιλιακός υπόκαμπος και ντοπαμινεργικό σύστημα

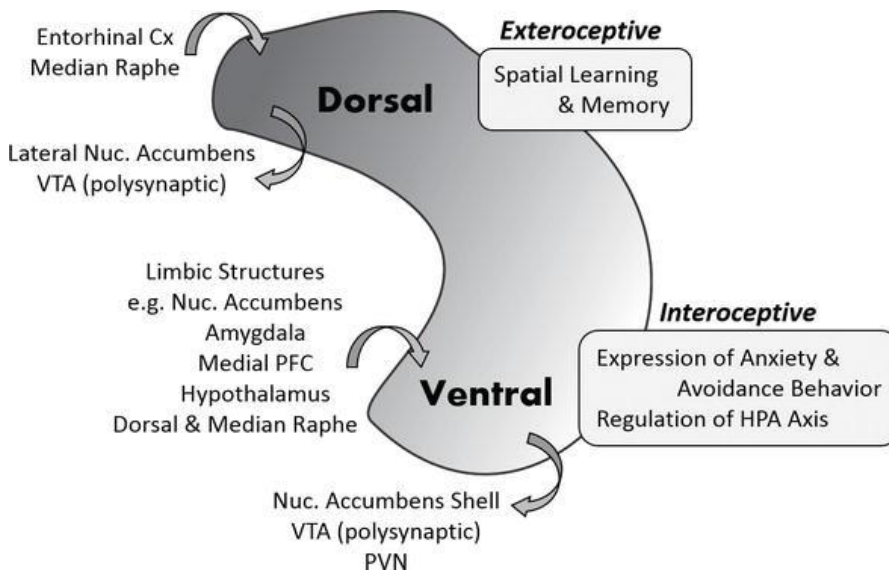
Ο υπόκαμπος είναι μια ακόμη κύρια εγκεφαλική δομή που συνδέεται έντονα με το νευροβιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας. Στους ανθρώπους μπορεί να διαχωριστεί σε εμπρόσθιο και οπίσθιο υπόκαμπο, ενώ στα τρωκτικά σε κοιλιακό και ραχιαίο, με το κοιλιακό τμήμα να είναι το ισοδύναμο-ανάλογο του ανθρώπινου εμπρόσθιου. Κάθε υποδιαίρεση συμμετέχει σε διαφορετικές λειτουργίες, με το ραχιαίο/οπίσθιο τμήμα να ρυθμίζει κυρίως γνωστικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένης της χωρικής μνήμης, ενώ το κοιλιακό/εμπρόσθιο τμήμα περιπλέκεται περισσότερο με το μεταιχμιακό σύστημα και συμμετέχει στην έκφραση του άγχους, τη ρύθμιση του συναισθήματος και του άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Οι υπόκαμποι ασθενών με σχιζοφρένεια εμφανίζουν συστηματικά μειωμένο όγκο, μεταβολές στην οργάνωση, την κυτταρο-αρχιτεκτονική και την έκφραση συναπτικών πρωτεϊνών (Suddath *et al.*, 1990; Harrison and Eastwood, 2001; Heckers and Konradi, 2010; Matosin *et al.*, 2016). Απεικονιστικές μελέτες μάλιστα υποστηρίζουν ότι η εμπρόσθια μοίρα του υπόκαμπου ασθενών με σχιζοφρένεια, η οποία είναι η ανάλογη του κοιλιακού υπόκαμπου στα τρωκτικά, εμφανίζει υπερδραστηριότητα (Grace, 2016; Wolff *et al.*, 2018), η οποία συσχετίζεται με την παρουσία θετικής ψυχοσυμπτωματολογίας (Silbersweig *et al.*, 1995). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι στο πρόδρομο στάδιο της σχιζοφρένειας η

υπερδραστηριότητα εμφανίζεται στην CA1 υποπεριοχή, ενώ κατά τη μετάβαση στην ψύχωση η υπερδραστηριότητα μεταφέρεται και στο κοιλιακό υπόθεμα του ιππόκαμπου (ventral subiculum, vSUB) (Schobel *et al.*, 2013).

Το vSUB είναι γνωστό ότι ελέγχει τη δραστηριότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων της VTA (Grace, 2016) και δύναται να προκαλέσει αύξηση της απελευθέρωσης ντοπαμίνης στο NAc (Wolff *et al.*, 2018). Η αύξηση της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας στη VTA σε πειραματικά μοντέλα προκαλεί υπερκινητικότητα (Heusner *et al.*, 2003; Boekhoudt *et al.*, 2016), η οποία όπως θα συζητηθεί και παρακάτω πιο αναλυτικά, αποτελεί μια εδραιωμένη πειραματική προσέγγιση της θετικής συμπτωματολογίας (Wilson and Terry, 2010; Roulia *et al.*, 2021). Συμπερασματικά, ο εμπρόσθιος ιππόκαμπος του ανθρώπου ή κοιλιακός στα τρωκτικά κατ'αντιστοιχία, φαίνεται να αναπτύσσει σταδιακά ένα καθεστώς υπερδραστηριότητας με την πρόοδο της νόσου, το οποίο απορυθμίζει τη λειτουργία στη VTA η οποία είναι συσχετισμένη με θετική συμπτωματολογία σε κλινικές και πειραματικές μελέτες. Όμως δυσλειτουργία του vSUB φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει και τις γνωστικές διεργασίες αλλά και την διαμόρφωση των συναισθηματικών αποκρίσεων (emotional responses) η οποία συνδέεται με την αρνητική συμπτωματολογία.

Παράλληλα, η CA1 περιοχή του ιπποκάμπου επικοινωνεί μονοσυναπτικά με τον προμετωπιαίο φλοιό (Phillips *et al.*, 2019) και τον κογχομετωπιαίο φλοιό (orbitofrontal cortex, OFC) (Bian *et al.*, 2021). Το τμήμα του ιππόκαμπου που είναι συνδεδεμένο με τον προμετωπιαίο φλοιό μονοσυναπτικά εμφανίζει υπερδραστηριότητα κατά τα πρόδρομα στάδια της νόσου, όταν τα γνωστικά ελλείματα είναι παρόντα.

Ο ιππόκαμπος δεν αποτελεί βέβαια μια δομή με έντονη ντοπαμινεργική λειτουργία, αντιθέτως το κύριο νευροδιαβιβαστικό σύστημα που συναντάται είναι το γλουταματεργικό, ενώ αποτελεί από το πιο καλά μελετημένα σημεία του εγκεφάλου ως προς τη νευρωνική πλαστικότητα και το ρόλο των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού σε αυτή. Γι αυτό το λόγο, η γλουταματεργική του φύση από τη μια, αλλά και ο έλεγχος που ασκεί στη ντοπαμινεργική λειτουργία του εγκεφάλου τον καθιστούν ένα σημείο όπου συναντώνται οι διαφορετικές θεωρίες για το βιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας.



Εικόνα 1.5:

Απλουστευμένη γραφική σύνοψη των διαφορετικών συνδέσεων και λειτουργιών του ραχιαίου με τον κοιλιακό ιππόκαμπο στα τρωκτικά. Από (Barr *et al.*, 2017).

1.2.2. Θεωρία δυσλειτουργίας του γλουταματεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια

Η θεωρία της δυσλειτουργίας του γλουταματεργικού συστήματος ως βιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας ήρθε πιο αργά χρονικά υποστηρίζοντας ότι οι δυσλειτουργίες που παρατηρούνται στο ντοπαμινεργικό σύστημα σχετίζονται λόγω καθοδικής αιτιότητας με μεταβολές στο γλουταματεργικό σύστημα και ειδικά τους NMDA υποδοχείς του γλουταμικού. Οι πρώτες σχετικές παρατηρήσεις ήρθαν από τη δράση μη συναγωνιστικών αναστολέων των NMDA υποδοχέων, όπως η φαινυλκυκλιδίνη (PCP) και αργότερα η κεταμίνη να προκαλούν μια κατάσταση που να προσομοιάζει τη σχιζοφρένεια σε υγιείς ανθρώπους. Κλινικές αλλά και πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι σε αντίθεση με τους αγωνιστές της ντοπαμίνης, οι μη συναγωνιστικοί αναστολείς των NMDA R αντανακλούν καλύτερα την αρνητική και γνωστική συμπτωματολογία. Οι πρώτες διατυπώσεις του μοντέλου ήρθαν 30 χρόνια πριν (Cohen *et al.*, 2015), ενώ στην πορεία η γλουταματεργική υπόθεση κατάφερε να ενσωματώσει και να εξηγήσει και άλλα σημαντικά ευρήματα που εντοπίζονται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια και έχουν να κάνουν με αλλαγές σε επίπεδο σηματοδότησης, νευρωνικής πλαστικότητας, αρχιτεκτονικής κυττάρων, ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου και το ρόλο συγκεκριμένων τύπων GABAεργικών ενδονευρώνων (Gonzalez-Burgos *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2015; Bygrave *et al.*, 2019; Uno and Coyle, 2019; Robert A McCutcheon *et al.*, 2020).

Σε αντίθεση με το ντοπαμινεργικό σύστημα που αποτελείται από εντοπισμένους πυρήνες οι οποίοι προβάλλουν σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου, το γλουταματεργικό σύστημα εντοπίζεται πολύ πιο εκτεταμένα και αποτελεί μακράν τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή. Υπάρχουν τρεις τύποι ιονοτροπικών υποδοχέων του γλουταμικού, οι υποδοχείς AMPA, NMDA και οι υποδοχείς του καϊνικού. Υπάρχουν επίσης και μεταβοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού οι οποίοι χωρίζονται σε 3 κατηγορίες (group I, II, III) και σε 8 διαφορετικούς υπότυπους. Η λειτουργία των NMDA υποδοχέων χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες ιδιαιτερότητες οι οποίες καθορίζουν και το ρόλο που έχουν σε θεμελιώδεις διεργασίες του εγκεφάλου, όπως η νευρωνική πλαστικότητα. Σε αντίθεση με τους AMPA που μεσολαβούν τη ροή ιόντων προς το εσωτερικό της μεμβράνης απαντώντας στην απελευθέρωση γλουταμικού, οι υποδοχείς του NMDA λειτουργούν ως ανιχνευτές σύμπτωσης (coincidence detectors). Τουτέστιν, το διάνοιγμα τους προϋποθέτει η μεμβράνη να έχει ήδη εκπολωθεί προκειμένου να απομακρυνθεί το διασθενές κατιόν Mg^{++} που φράζει το εσωτερικό τους και επιπρόσθετα, πέραν του γλουταμικού απαιτείται και η παρουσία συν-διαβιβαστή που προσδέεται στη θέση πρόσδεσης της γλυκίνης. Το κανάλι είναι διαπερατό κυρίως από ιόντα Ca^{++} με αποτέλεσμα την παραγωγή μακρών διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών (EPSCs) τα οποία είναι μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με εκείνων από τους AMPA, και απαραίτητα για την εκτέλεση φασικών εκφορτίσεων στη VTA και στον κοιλιακό υπόκαμπο. Επιπρόσθετα, το Ca^{++} αφού εισέλθει στο κύτταρο λειτουργεί ως δευτερογενής αγγελιοφόρος με κεντρικό ρόλο στα συμβάντα συναπτικής πλαστικότητας, ενώ δευτερευόντως επηρεάζει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που αφορούν τη δομή της σύναψης, παίζοντας κεντρικό ρόλο στη διαμεσολάβηση της μακροχρόνιας συναπτικής ευόδωσης (Long term potentiation, LTP) και της μακροχρόνιας συναπτικής καταστολής (Long term depression, LTD) (Frohlich and Van Horn, 2014; Cohen *et al.*, 2015).

Οι NMDA υποδοχείς είναι τετραμερή σύμπλοκα που αποτελούνται από 2 υποχρεωτικές GluN1 υπομονάδες, ενώ τα μεταβλητά της μέρη μπορεί να είναι είτε από την οικογένεια GluN2 των οποίων κάθε υπότυπος έχει συγκεκριμένες ιδιότητες ως προς τη λειτουργία και τον εντοπισμό, είτε GluN3 όπου είναι μελετημένες σε μικρότερη έκταση συγκριτικά με τις προηγούμενες. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι GluN2A υπομονάδες εντοπίζονται κυρίως σε συναπτικές θέσεις και η λειτουργία τους σχετίζεται με συναπτική ευόδωση και νευροπροστασία, ενώ οι GluN2B εντοπίζονται κυρίως σε εξωσυναπτικές θέσεις και η ενεργοποίησή τους είναι συνδεδεμένη με συναπτική καταστολή και κυτταρικό θάνατο (Frohlich and Van Horn, 2014).

Ο ρόλος των NMDA υποδοχέων στη γονιδιακή έκφραση και τη νευρωνική πλαστικότητα

Μια κεντρική ιδιότητα που απαντάται στο νευρικό σύστημα και καθορίζει την ανάπτυξη και τη λειτουργία του είναι η συσχέτιση της νευρωνικής ηλεκτρικής δραστηριότητας με το βαθμό έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Ονομάζεται εξαρτώμενη από τη δραστηριότητα έκφραση γονιδίων (activity-dependent gene expression) και οι NMDA υποδοχείς, ρυθμίζοντας τα επίπεδα διέγερσης έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε αυτές τις διεργασίες (Cohen *et al.*, 2015). Έχει διαπιστωθεί ότι η από ερεθίσματα εξωτερικού περιβάλλοντος - επαγόμενη νευρωνική δραστηριότητα ρυθμίζει την ανάπτυξη των νευρωνικών κυκλωμάτων, καθορίζοντας συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως η νευρωνική διέγερση κι επιβίωση (Zhang *et al.*, 2002), η ανάπτυξη δενδριτικών και αξονικών διακλαδώσεων, η δημιουργία και η διαμόρφωση της μορφολογίας των συνάψεων (Chattopadhyaya *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011; Spiegel *et al.*, 2014). Οι NMDA υποδοχείς επηρεάζουν ποικιλοτρόπως τα συγκεκριμένα φαινόμενα, είτε μέσω του ρόλου τους σε επίπεδο ηλεκτρικής διεγερσιμότητας, είτε σε επίπεδο σηματοδότησης. Συγκεκριμένα, η εισροή Ca^{++} , συνδέει τη λειτουργία των καναλιών με αλλαγές σε επίπεδο σηματοδότησης, όπως είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών, που οδηγεί στη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB και οδηγεί στη γονιδιακή έκφραση. Επιπρόσθετα, το σύμπλοκο Ca^{++}/CaM μεταναστεύει στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει επίσης τον CREB, ενώ αντίστοιχους ρόλους στη ρύθμιση της μεταγραφής παίζουν νευροτροφικοί παράγοντες όπως ο BDNF που είναι επίσης στενά συνδεδεμένος με τη γλουταματεργική λειτουργία και τους υποδοχείς AMPA και NMDA (Cohen *et al.*, 2015).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι το MAPK/ERK μονοπάτι έχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφραση της παρβαλβουμίνης (parvalbumin, PV), μιας πρωτεΐνης που δεσμεύει το ασβέστιο και εκφράζεται σε έναν πολύ συγκεκριμένο τύπο ανασταλτικών ενδονευρώνων, που όπως θα αναλυθεί παρακάτω παίζει κεντρικό ρόλο στη παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας. Τα επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στους PV+ ενδονευρώνες (interneurons) καθορίζει την εύρυθμη λειτουργία τους, ενώ ο BDNF δρώντας στο παραπάνω μονοπάτι καθορίζει την ωρίμανση των νευροφυσιολογικών τους ιδιοτήτων, οι οποίες κατ'επέκταση καθορίζουν την ανάπτυξη και λειτουργία των φλοιικών ανασταλτικών δικτύων. Δεν είναι σύμπτωση μάλιστα ότι έχει υποστηριχθεί αρκετά η θεώρηση, που θέλει το βιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας να εντοπίζεται στους NMDA υποδοχείς που εδράζουν στους PV+ ενδονευρώνες (Bygrave *et al.*, 2019). Φαίνεται συνεπώς ότι με τους ανωτέρω μηχανισμούς η λειτουργία των NMDA υποδοχέων καθορίζει τις διεργασίες που εκπίπτουν στη σχιζοφρένεια υποστηρίζοντας τη γλουταματεργική θεωρία της σχιζοφρένειας.

Ισορροπία διέγερσης/αναστολής και ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου/νευρωνικές ταλαντώσεις

Προς υποστήριξη της υπόθεσης ότι η δυσλειτουργία των NMDA υποδοχέων στη σχιζοφρένεια εντοπίζεται κυρίως σε συγκεκριμένους τύπους GABAεργικών ενδονευρώνων, έχει προταθεί ότι οι μη συναγωνιστικοί αναστολείς των NMDA (PCP, MK-801, κεταμίνη) δρουν κατά προτίμηση σε ανασταλτικούς ενδονευρώνες, λόγω της υψηλότερης τονικής δραστηριότητας σε σχέση με τους πυραμιδικούς νευρώνες (Homayoun and Moghaddam, 2007). Η αναστολή των NMDA που εδράζουν σε ανασταλτικούς ενδονευρώνες αυξάνει τη διεγερσιμότητα των πυραμιδικών, ιδιαίτερα στον προμετωπιαίο φλοιό. Η άρση της αναστολής των πυραμιδικών νευρώνων που προκαλείται από μη συναγωνιστικούς NMDA αναστολείς με ψυχομημητική δράση, έχει συσχετιστεί με την άρση αναστολών (μεταφορικά εδώ) που χαρακτηρίζει τις ψυχώσεις (Homayoun and Moghaddam, 2007; Frohlich and Van Horn, 2014; Bygrave *et al.*, 2019).

Η ισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής καθορίζει μεταξύ άλλων το συγχρονισμό των δυναμικών ενέργειας (spiking synchrony) που διαμορφώνει τη ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου σε διαφορετικές συχνότητες, ένα φαινόμενο που ονομάζεται νευρωνικές ταλαντώσεις (neural oscillations). Τα νευρωνικά δίκτυα στους εγκεφάλους των θηλαστικών εμφανίζουν συντονισμένη και επαναλήψιμη νευρωνική δραστηριότητα σε διαφορετικές συχνότητες (frequency bands) από 0,05 μέχρι περίπου 500 Hz. Οι σύνθετες

λειτουργίες όπως η αντίληψη και η γνωστική λειτουργία απαιτούν την παράλληλη συντονισμένη λειτουργία φλοιωδών και υποφλοιωδών περιοχών οι οποίες εμπλέκονται συντονισμένα σε παρωδικά διαστήματα σύγχρονης ρυθμικής δραστηριότητας (oscillatory activity) σε συγκεκριμένες συχνότητες καθώς επεξεργάζονται πληροφορίες (processing information) (Uhlhaas and Singer, 2010; Skosnik *et al.*, 2016). Έτσι δίνεται η δυνατότητα για μια εγκεφαλική περιοχή να εμπλέκεται σε πολλές διεργασίες ταυτόχρονα, όντας συντονισμένη σε διαφορετικά δίκτυα με διαφορετικές συχνότητες. Οι διαφορετικές συχνότητες ταλαντώσεων έχουν συγκεκριμένα ανατομικά υποστρώματα και εμπλέκονται σε καθορισμένες λειτουργίες, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.6. Χαρακτηριστικοί είναι οι γάμα ρυθμοί (30-200 Hz) που είναι συνδεδεμένοι με τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες και την αντίληψη, ενώ οι θήτα ρυθμοί (4-7/8 Hz) έχουν συσχετισθεί με διάφορους τύπους μνημονικών λειτουργιών.

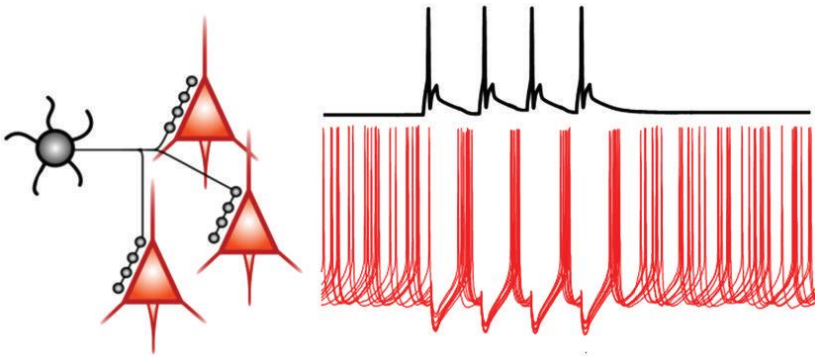
Table 1 | **Neural oscillations in cortical networks**

Frequency band	Anatomy	Function
Theta (4–7 Hz)	Hippocampus ¹³⁴ , sensory cortex ¹⁴⁰ and prefrontal cortex ¹⁴¹	Memory ^{142,143} , synaptic plasticity ¹⁸ , top-down control ⁹ and long-range synchronization ⁹
Alpha (8–12 Hz)	Thalamus ¹⁴⁴ , hippocampus ¹⁴⁵ , reticular formation ¹⁴⁵ , sensory cortex ¹⁴⁶ and motor cortex ¹⁴⁷	Inhibition ¹⁴⁸ , attention ¹⁴⁹ , consciousness ¹⁵⁰ , top-down control ⁹ and long-range synchronization ¹⁵¹
Beta (13–30 Hz)	All cortical structures, subthalamic nucleus ¹⁵² , basal ganglia ¹⁵² and olfactory bulb ¹⁵³	Sensory gating ¹⁵⁴ , attention ¹⁵⁵ , motor control ¹⁵⁶ and long-range synchronization ¹⁵⁷
Gamma (30–200 Hz)	All brain structures, retina ¹⁵⁸ and olfactory bulb ¹⁵⁹	Perception ⁷ , attention ¹⁶⁰ , memory ¹⁶¹ , consciousness ¹⁶² and synaptic plasticity ¹⁶

Εικόνα 1.6: Πίνακας που συνοψίζει τα ανατομικά υποστρώματα και τις βιολογικές λειτουργίες των διαφόρων φασμάτων συχνότητας της εγκεφαλικής ρυθμικής λειτουργίας. Από (Uhlhaas and Singer, 2010)

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος εκτίμησης της ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου σε ανθρώπους είναι το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ). Οι ασθενείς με σχιζοφρένεια παρουσιάζουν μια πολύ χαρακτηριστική αύξηση των γάμα ρυθμών σε κατάσταση ηρεμίας και αδυναμία «στρατολόγησης» των γάμα ρυθμών κατά την επιτέλεση γνωστικών διεργασιών, γεγονός που συνδέει πολύ στενά τη διαταραγμένη λειτουργία των γάμα ρυθμών με τα γνωστικά συμπτώματα. Η χορήγηση κεταμίνης σε υγιείς εθελοντές και πειραματόζωα έχει παρόμοιο αποτέλεσμα στους γάμα ρυθμούς και τις γνωστικές λειτουργίες, ενώ έχει βρεθεί ότι η χορήγηση κεταμίνης σε πειραματόζωα επηρεάζει τη λειτουργία και τον αριθμό των PV+ (παρβαλβουμίνης) ενδονευρώνων, η οποία είναι καθοριστική για τη γένεση των γάμα ρυθμών.

Η νευροδιαβίβαση GABA από τους PV+ ενδονευρώνες προς τα πυραμιδικά κύτταρα έχει προεξέχουσα ισχύ ξεχωρίζοντας από τα υπόλοιπα προσαγωγά σήματα. Η ανατομική ιδιαιτερότητα των συνάψεων που σχηματίζονται μεταξύ PV+ και πυραμιδικών κυττάρων είναι αυτή που καθορίζει το φαινόμενο αυτό και οι συνάψεις αυτές εντοπίζονται στο σώμα των πυραμιδικών, όπου σε ορισμένες περιπτώσεις το 70-80% της επιφάνειας των σωμάτων είναι καλυμμένα με κομβία στις απολήξεις των ανασταλτικών ενδονευρώνων. Τέτοιου είδους συνάψεις διαμορφώνονται μόνο ανάμεσα σε πυραμιδικά και σε ενδονευρώνες με καλανθοειδή μορφολογία (basket cells) που εκφράζουν PV ή χολεκυστοκινίνη (CCK) και ονομάζονται περισωματικές καθώς και το συγκεκριμένο φαινόμενο ονομάζεται περισωματική αναστολή (perisomatic inhibition) (Freund and Katona, 2007). Δεδομένης της ανατομικής εγγύτητας με τον άξονα αλλά και της μεγάλης πυκνότητας τους, οι συνάψεις αυτές ασκούν στενό έλεγχο στο χρονισμό των δυναμικών ενέργειας, καταφέρνοντας έτσι το συγχρονισμό των πληθυσμών των PNs.



Εικόνα 1.7: Γραφική και απλουστευμένη απεικόνιση του φαινομένου όπου οι ανασταλτικοί ενδονευρώνες (μαύρος νευρώνας) ελέγχουν το ρυθμό πυροδότησης πυραμιδικών νευρώνων (κόκκινοι νευρώνες). Από (Gonzalez-Burgos *et al.*, 2011)

απαιτούμενες συχνότητες με αποτέλεσμα την απορρύθμιση και των καθοδικών κόμβων στα νευρωνικά κυκλώματα που ενορχηστρώνουν την εκτέλεση των αναγκαίων λειτουργιών. Κατά αυτό τον τρόπο το έλλειμμα PV+ ενδονευρώνων και οι διαταραγμένοι γάμα ρυθμοί, που μεσολαβούν τις κεντρικές λειτουργίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, είτε σε επίπεδο φλοιικού είτε ιπποκάμπειου σχηματισμού, συνδέονται με την παθοφυσιολογία και συμπτωματολογία της σχιζοφρένειας (Uhlhaas and Singer, 2010; Gonzalez-Burgos *et al.*, 2011; Skosnik *et al.*, 2016).

Δεδομένα που υποστηρίζουν τη γλουταματεργική θεωρία της σχιζοφρένειας:

i. Κλινικές παρατηρήσεις

Οι βάσεις της θεωρίας της υπολειτουργίας του γλουταματεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια προέρχονται από τη φαρμακολογία των NMDA υποδοχέων και συγκεκριμένα από τα αποτελέσματα του ανταγωνισμού τους. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η χορήγηση μη συναγωνιστικών αναστολέων των NMDA υποδοχέων σε υγιείς εθελοντές προκαλεί θετική, αρνητική και γνωστική συμπτωματολογία (Cohen *et al.*, 2015; Uno and Coyle, 2019; Robert A. McCutcheon *et al.*, 2020), ενώ ο αποκλεισμός των NMDA υποδοχέων αποτελεί μια αναγκαία και ικανή συνθήκη για την εμφάνιση αυτού του φαινοτύπου (Moghaddam and Javitt, 2012). Η φαρμακολογική δράση της PCP δε, έχει τόσο εντυπωσιακή ομοιότητα με τη νόσο σε σημείο που η ψύχωση που επάγεται από χρήση PCP αντανάκλα τόσο εντυπωσιακά τη νόσο ώστε να υπάρχουν συμβάντα όπου έμπειροι ψυχίατροι έχουν διαγνώσει σχιζοφρένεια σε χρήστες PCP πριν λάβουν το ιστορικό της χρήσης ουσιών (Luisada, 1978). Ειδοποιός διαφορά σε σχέση με τα ντοπαμινεργικά ψυχομιμητικά αποτελεί η δυνατότητα των NMDA-δρώντων να επάγει ευρύ φάσμα της συμπτωματολογίας, πέραν των θετικών συμπτωμάτων, ενώ εμφανίζουν ισχυρότερη αντανάκλαση συγκριτικά και με δυνητικά ψυχομιμητικές ουσίες που δρουν σε τελείως διαφορετικά συστήματα, όπως το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (γνωστό και ως LSD). Το LSD συγκεκριμένα, προκαλεί αλλαγές στην οπτική αντίληψη που συσχετίζονται με ψυχωτικό επεισόδιο ωστόσο διαρκούν για λίγες ώρες, ενώ η χορήγηση LSD σε ασθενείς με σχιζοφρένεια δεν προκαλεί πιο έντονα επεισόδια συγκριτικά με υγιείς. Η επίδραση της PCP και της κεταμίνης σε όλο το φάσμα της συμπτωματολογίας μπορεί να κρατήσει και 2 εβδομάδες, ενώ η χορήγηση τους σε ασθενείς προκαλεί πιο εκτεταμένη απόκριση σε σχέση με υγιείς και επιδεινώνει την κατάστασή τους (Snyder, 1980; Lahti *et al.*, 1995).

Μια ακόμη κλινική παρατήρηση που συνδέει τους NMDA υποδοχείς (R) με το βιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας προέρχεται από ασθενείς με Anti-NMDA R εγκεφαλίτιδα. Πρόκειται για μια αυτοάνοση νόσο

Οι PV+ ενδονευρώνες όπως προαναφέρθηκε διαμορφώνουν έναν έλεγχο στη διέγερση των πυραμιδικών κυττάρων επιβάλλοντας έτσι τη ρυθμική τους δραστηριότητα, ιδιαίτερα ως προς τη συχνότητα των γάμα ρυθμών. Όταν οι NMDA υποδοχείς στους PV+ ενδονευρώνες υπολειτουργούν ή γενικότερα η λειτουργία των PV+ ενδονευρώνων είναι διαταραγμένη, αδυνατούν να συγχρονίσουν με ακρίβεια τα πυραμιδικά κύτταρα στις

κατά την οποία εαυτά αντιγόνα στρέφονται κατά της εξωκυττάριας επιφάνειας των NMDA Rs, η οποία πιστεύεται ότι έχει ως αποτέλεσμα την κατιούσα ρύθμιση (downregulation) των υποδοχέων. Στο φάσμα των συμπτωμάτων της περιλαμβάνονται θετικά και γνωστικά συμπτώματα, ενώ μελέτη έχει δείξει ότι το 6,5% των ασθενών με πρώτο ψυχωσικό επεισόδιο που πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια για σχιζοφρένεια, είναι θετικοί σε έλεγχο για anti-NMDA R αντισώματα (Uno and Coyle, 2019).

ii. Μεταθανάτια ευρήματα

Σε επίπεδο νευρωνικών μορφολογικών αλλαγών, μεταθανάτιες μελέτες έχουν δείξει μειώσεις δενδριτικών διακλαδώσεων, πυκνότητας ακανθών και έκφρασης συναπτοφυσίνης σε δείγματα εμπρόσθιων ή κροταφικών φλοιικών περιοχών ασθενών με σχιζοφρένεια (Hu *et al.*, 2015). Τα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων για τις επιμέρους υπομονάδες των NMDA υποδοχέων, GRIN1, GRIN2A, GRIN2C έχουν βρεθεί μειωμένα σποραδικά σε διάφορες μελέτες, ωστόσο μετα-αναλύσεις δείχνουν ότι τα ευρήματα αυτά είναι σχετικά μη επαναλαμβανόμενα, με εξαίρεση τη μείωση του GRIN1 γονιδίου που κωδικεύει τη δομική NMDA R υπομονάδα και έχει βρεθεί μειωμένο σε δείγματα υποκάμπτου ασθενών στην πλειοψηφία των μελετών (Hu *et al.*, 2015). Παράλληλα, έχουν εντοπιστεί αυξημένα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης που εντοπίζεται στη μετασυναπτική πυκνότητα με μοριακό βάρος 95 kDa (post synaptic density -95, PSD-95), ενώ τα επίπεδα πρωτεϊνικής της έκφρασης έχουν βρεθεί μειωμένα (Uno and Coyle, 2019). Το εύρημα αυτό επίσης σχετίζεται με τη λειτουργία των NMDA R καθώς αφορά μια πρωτεΐνη συναρμογής η οποία πολυμερίζεται στα σημεία που εκφράζονται οι NMDA και οι AMPA υποδοχείς, συμμετέχει στα συμβάντα συναπτικής πλαστικότητας και τη σταθεροποίηση των συναπτικών μεταβολών προς τη παγίωση του LTP, ενώ μεταβολές στην έκφραση της είναι συνυφασμένες με αλλαγές σε επίπεδο λειτουργίας των υποδοχέων και της νευρωνικής πλαστικότητας (Meyer *et al.*, 2014).

Παρά το πλήθος των περιορισμών ως προς τη διεξαγωγή συμπερασμάτων χρησιμοποιώντας ευρήματα από μεταθανάτιες μελέτες ιστού ασθενών, είναι εμφανές ότι στη σχιζοφρένεια υπάρχουν αλλαγές που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία του γλουταματεργικού συστήματος και ιδιαίτερα σε σχέση με τους NMDA υποδοχείς και τη νευρωνική πλαστικότητα.

iii. Μελέτες γύρω από γενετικούς παράγοντες

Εκτεταμένης κλίμακας μελέτες που πραγματοποιούν συσχετισμούς σε εύρος γονιδιώματος, όπως οι μελέτες σάρωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος (large scale genome-wide association studies, GWAS), έχουν συνδέσει πάνω από 100 γενετικούς τόπους με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου (Ripke *et al.*, 2014). Παρά τη συζητηθείσα εμπλοκή του ντοπαμινεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια, μόνο ένας γενετικός τόπος εκ των ανωτέρω βρέθηκε να αφορά στο ντοπαμινεργικό σύστημα και συγκεκριμένα τους D2 υποδοχείς. Το γεγονός αυτό δε συνάδει με παλαιότερες γενετικές μελέτες που συνέδεαν το ντοπαμινεργικό με γενετικές αλλαγές, στηριζόμενες στην τότε κεντρική θέση της θεωρίας της ντοπαμινεργικής δυσλειτουργίας στη σχιζοφρένεια. Ο ερχομός νέων μεθοδολογιών και η καλύτερη κατανόηση του πεδίου απέδειξαν ότι επρόκειτο για ψευδώς θετικά ευρήματα (Uno and Coyle, 2019), όπως έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει γενικότερα λόγω έλλειψης της απαιτούμενης στατιστικής ισχύος, η οποία περιπλέκεται περαιτέρω και από την υφιστάμενη πίεση για την αποφυγή δημοσίευσης αρνητικών δεδομένων (publication bias).

Πλήθος γενετικών τόπων που αφορούν τη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση και καθοδικούς τελεστές (downstream effectors) βρέθηκαν να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, συμπεριλαμβάνοντας τα GRIN2A, GRIA1 και GRM3 (που κωδικεύουν τις υπομονάδες GluN2A, GluA1 και τον μεταβοτροπικό υποδοχέα mGluR3 αντίστοιχα) (Ripke *et al.*, 2014; Horwitz *et al.*, 2019). Επιπρόσθετα, μελέτες που αξιοποιούν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs) από

ασθενείς αποσκοπώντας στη μελέτη της υποκείμενης γενετικής αρχιτεκτονικής, ανεπηρέαστης από περιβαλλοντικούς παράγοντες, μπορούν να προσδώσουν πολύτιμα δεδομένα σε ασθένειες με πολύπλοκο γενετικό υπόβαθρο το οποίο αλληλοεπιδρά έντονα με το περιβάλλον. Μελέτες με iPSCs από ασθενείς με σχιζοφρένεια έχουν δείξει ότι παρουσιάζουν μεταβολές σε επίπεδο σηματοδότησης κάτωθεν των υποδοχών του γλουταμικού, ενώ οι νευρώνες που προκύπτουν παρουσιάζουν μειωμένη απελευθέρωση γλουταμικού και επιβραδυμένη ωρίμανση των ντοπαμινεργικών και γλουταματεργικών νευρώνων, αλλά και μειωμένη ικανότητα σχηματισμού συνάψεων (Robert A. McCutcheon *et al.*, 2020).

iv. Απεικονιστικά δεδομένα

Πλέον έχουν αναπτυχθεί διάφορες μεθοδολογίες που εκτιμούν τη γλουταματεργική δραστηριότητα σε ασθενείς με σχιζοφρένεια και εθελοντές. Η φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων (proton magnetic resonance spectroscopy, $^1\text{H-MRS}$) έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο για τη μελέτη του γλουταματεργικού *in vivo*, καθώς δεν απαιτεί την εκπομπή ιριδίζουσας ακτινοβολίας και είναι σημαντικά πιο οικονομική από την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography, PET). Όταν εφαρμόζονται ισχυρά πεδία το γλουταμικό μπορεί να διαχωριστεί από το μεταβολίτη του, τη γλουταμίνη (Gln), ενώ σε χαμηλότερης ισχύος πεδία υπολογίζονται αθροιστικά οι συγκεντρώσεις και των δυο και παρουσιάζονται ως Glx (Uno and Coyle, 2019; Robert A. McCutcheon *et al.*, 2020). Παρόλο που υπάρχουν πολλές μελέτες του γλουταματεργικού στη σχιζοφρένεια μέσω $^1\text{H-MRS}$, οι μεθοδολογικές διαφορές διαμορφώνουν μια δύσκολη συνθήκη για τη διατύπωση ενός consensus για το πως εμφανίζεται το γλουταματεργικό στους εγκεφάλους ασθενών. Μετα-αναλύσεις προτείνουν ότι γλουταμικό και Glx εντοπίζονται αυξημένα σε βασικά γάγγλια, το γλουταμικό ευρίσκεται αυξημένο στο θάλαμο και το Glx φαίνεται να αυξάνεται στον έσω κροταφικό λοβό (Robert A. McCutcheon *et al.*, 2020).

Επιπρόσθετα, πιο πρόσφατες μελέτες με εφαρμογή ισχυρών μαγνητικών πεδίων σε ασθενείς με πρώτο ψυχωτικό επεισόδιο εμφανίζουν μειωμένη τη συγκέντρωση γλουταμικού στον εμπρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου (anterior cingulate cortex, ACC) (Reid *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019), ενώ μελέτες με λειτουργικό $^1\text{H-MRS}$ υποστηρίζουν ανεπαρκή «στρατολόγηση» του γλουταμικού στον ACC κατά τη διάρκεια γνωστικών δοκιμασιών (Taylor *et al.*, 2015). Συμπληρωματικά, μια ακόμα μελέτη με $^{13}\text{C-MRS}$, μια τεχνική μεθοδολογικής εγγύτητας με την προηγούμενη, αλλά με διαφορετικές αδυναμίες και πλεονεκτήματα, έχει δείξει ότι η κεταμίνη αυξάνει την ανακύκλιση γλουταμίνης-γλουταμικού (Sibson *et al.*, 1998; Abdallah *et al.*, 2018).

1.3. Πειραματικά μοντέλα – προκλινικές προσεγγίσεις

Τα πειραματικά πρότυπα είναι κατασκευές εξαιρετικής σημασίας για τη διερεύνηση του νευροβιολογικού υποστρώματος των σύνθετων και ετερογενών νευροψυχιατρικών ασθενειών και τον έλεγχο νέων υποψήφιας θεραπείων. Δεδομένου του μεγάλου τέλματος που υπάρχει στην αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας, η ορθή χρήση τους και η ανάπτυξη νέων πειραματικών μοντέλων είναι απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να σημειωθεί πρόοδος. Υπάρχει μεγάλο πλήθος πειραματικών προσεγγίσεων της σχιζοφρένειας σε πειραματόζωα, τα οποία μπορούν να κατανεμηθούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες βάσει των στρατηγικών ανάπτυξης τους: Τα φαρμακολογικά μοντέλα, τα νευροαναπτυξιακά, τα γενετικά και εκείνα που προέρχονται από πρόκληση εστιασμένων ανατομικά βλαβών στον εγκέφαλο πειραματόζωων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα μοντέλα αναπτύσσονται σε επίμυες, συχνά χρησιμοποιούνται μύς, ενώ πιο σπάνια χρησιμοποιούνται πρωτεύοντα (Nestler and Hyman, 2010; Mark A Geyer *et al.*, 2012; Winship *et al.*, 2019; Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Τα πειραματικά πρότυπα αποτελούν προσπάθειες προσέγγισης των διαταραχών σε προκλινικό επίπεδο και απέχουν πολύ από το να αντανakλούν πλήρως τις ασθένειες όπως εκείνες εμφανίζονται στους ανθρώπους. Όταν δε πρόκειται για πολύπλοκες νευροψυχιατρικές διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια, ο βιο-φαινότυπος που αναπτύσσεται στα πειραματόζωα συχνά αντανakλά συγκεκριμένο υποσύνολο της συμπτωματολογίας ή τείνει να προσομοιώσει υποσύνολο των υποκείμενων μηχανισμών της νόσου. Είναι συγκεκριμένα τα κριτήρια που αξιολογούν το κατά πόσο ένα μοντέλο πληροί τις επιθυμητές προϋποθέσεις εγκυρότητας και είναι τα εξής:

1. Η φαινομενολογική ομοιότητα (face validity): Αφορά την εκτίμηση της ομοιότητας/αντιστοιχίας του πειραματικού μοντέλου με τη συμπτωματολογία της διαταραχής. Στην περίπτωση της σχιζοφρένειας βέβαια, όπου απαιτείται η προσομοίωση της συμπτωματολογίας στη συμπεριφορά των πειραματόζωων υπάρχει μια διχογνωμία περί της σημαντικότητας του κριτηρίου αυτού. Ερευνητές υποστηρίζουν ότι δεδομένης της αδυναμίας απόδοσης πολλών διαφορετικών κύριων συμπτωμάτων όπως οι ψευδαισθήσεις, η αλογία, ή η αποδιοργανωμένη σκέψη, είναι αμφίβολη η εγκυρότητα του παρόντος κριτηρίου [15]. Υπάρχουν ωστόσο συμπεριφορικοί δείκτες σε επίμυς οι οποίοι προσομοιάζουν παραμέτρους από όλες τις κατηγορίες συμπτωμάτων. Πολλοί μάλιστα έχουν μεγάλη αποδοχή στην προκλινική έρευνα αν και έχουν υποστεί κριτική, όπως η υπερκινητικότητα που αποτελεί τον πιο διαδεδομένο δείκτη θετικής συμπτωματολογίας σε πειραματόζωα (Winship *et al.*, 2019).

Από πλευράς αρνητικής συμπτωματολογίας, υπάρχουν αξιολογες δυνατότητες προσομοίωσης της σε πειραματόζωα. Η δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης ανηδονίας. Επίσης συνηθίζεται με την διαταραγμένη επίδοση στη δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς να προσομοιάζεται η κοινωνική απόσυρση. Επίσης, η έλλειψη κινήτρου μπορεί να μελετηθεί σε προκλινικό επίπεδο με τη χρήση ειδικών πειραματικών κλωβών όπου το πειραματόζωο καλείται να ολοκληρώσει κάποια δοκιμασία προκειμένου να λάβει μια επιβράβευση.

Πληθώρα πειραματικών δοκιμασιών εξετάζουν τις γνωστικές δεξιότητες των πειραματόζωων σε επίπεδο διαφόρων ειδών μνήμης αλλά και ανώτερων γνωστικών λειτουργιών. Έχει διατυπωθεί ότι αυτές οι προκλινικές προσεγγίσεις δεν αντανakλούν πάντα με ακρίβεια τις γνωστικές δυσλειτουργίες που απαντώνται στη σχιζοφρένεια σε όλες τις περιπτώσεις, είναι ωστόσο τα καλύτερα διαθέσιμα εργαλεία για την προσέγγισή τους. Και σε αυτή την κατηγορία υπάρχουν συμπτώματα που η προσομοίωση τους σε τρωκτικά είναι δύσκολη υπόθεση, όπως τα ελλείμματα σε λεκτική μάθηση και μνήμη (verbal learning and memory), ή ελλείμματα κοινωνικής αντίληψης (social cognition). Ωστόσο, η πρωτοβουλία Cognitive Neuroscience Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia (CNTRICS) που στοχεύει στη βελτίωση ως προς την εφαρμογή της προκλινικής έρευνας για την προσομοίωση της γνωστικής συμπτωματολογίας, έχει κατηγοριοποιήσει τα γνωστικά συμπτώματα σε 7 πεδία (domains), όπου για το καθένα αντιστοιχούν κάποιες θεμελιωμένες πειραματικές διαδικασίες (Millan and Bales, 2013).

Συγκεντρωτικά, η επίτευξη φαινομενολογικής ομοιότητας στις πειραματικές προσεγγίσεις της σχιζοφρένειας ενέχει μεγάλους περιορισμούς, είναι όμως εφικτό να αποτυπωθούν όλες οι κατηγορίες της συμπτωματολογίας αν αξιοποιηθεί το πλήθος των πειραματικών προσεγγίσεων που έχει αναπτυχθεί. Αυτό αποτελεί και την προϋπόθεση προκειμένου μια πειραματική κατασκευή να χαρακτηρίζεται από φαινομενολογική ομοιότητα.

2. Η θεωρητική λογική (construct validity): Αναφέρεται στη σχέση του πειραματικού προτύπου με τους μηχανισμούς πρόκλησης της νόσου ή με το εγγενές υπόστρωμα της νόσου. Στην περίπτωση μελέτης της σχιζοφρένειας η θεωρητική λογική είναι δύσκολο να εκτιμηθεί καθώς οι μηχανισμοί πρόκλησης της νόσου είναι μερικώς μόνο κατανοητοί. Προκειμένου να υπάρχει κάποια σύνδεση των πειραματικών προτύπων με το βιολογικό υπόστρωμα της νόσου, τα πειραματικά μοντέλα που αναπτύσσονται στηρίζονται συνήθως σε κάποια από τις υπάρχουσες θεωρίες για το βιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας. Είναι ζητούμενο να διαλευκανθεί το σημείο σύγκλισης των διαφορετικών θεωριών, ώστε να αποτελέσει τη βάση για τη διαμόρφωση προσεγγίσεων με ισχυρή θεωρητική λογική.

3. Η προβλεπτική ισχύς (predictive validity): Εξαρτάται από την ικανότητα του μοντέλου να ανιχνεύει ουσίες με αντιψυχωτικές ιδιότητες. Η δυνατότητα διάκρισης των ουσιών που πραγματικά θα μπορέσουν να εμφανίσουν κλινική αντιψυχωτική δράση έχει εξέχουσα σημασία και πολλά πειραματικά μοντέλα είναι προσανατολισμένα σε αυτή την κατεύθυνση. Δεδομένης της συμπτωματολογίας και παθοφυσιολογίας της σχιζοφρένειας, οι ενώσεις με πιθανές αντιψυχωτικές ιδιότητες θα ήταν δόκιμο να εξετάζονται χρησιμοποιώντας διάφορα πειραματικά πρότυπα (multi-model approach), προκειμένου να χαρτογραφηθεί αξιόπιστα η δράση τους και η αντιψυχωσική δυναμική τους. Η απουσία αποτελεσματικών θεραπευτικών φαρμακευτικών προσεγγίσεων, ειδικά όταν μιλάμε για αρνητική και γνωστική συμπτωματολογία, στερεί ένα εργαλείο “gold standard” που θα συνείσφερε στην ανάπτυξη των μοντέλων, ιδιαίτερα ως προς τη προβλεπτική ισχύ, αλλά και ως προς τα υπόλοιπα κριτήρια (Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Φαρμακολογικά πειραματικά πρότυπα:

Οι φαρμακολογικές προσεγγίσεις βασίζονται συνήθως στη ντοπαμινεργική και τη γλουταματεργική θεωρία της σχιζοφρένειας από πλευράς θεωρητικής λογικής και διαμορφώνονται είτε με οξείες χορηγήσεις φαρμάκων όπου η δράση του φαρμάκου προσομοιάζει τη συμπτωματολογία που σχετίζεται με την οξεία ψύχωση, είτε με επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις φαρμάκων που οδηγούν στη διαμόρφωση ενός βιοφαινότυπου που ενσωματώνει ευρύτερη συμπτωματολογία της νόσου.

Οξείες χορηγήσεις

A. Ντοπαμινεργικοί αγωνιστές: d-αμφεταμίνη

Η πιο κλασική ψυχομιμητική ουσία που δρα στο ντοπαμινεργικό σύστημα και χορηγείται ώστε να προσομοιάσει τις ψυχώσεις σε πειραματόζωα είναι η d-αμφεταμίνη. Δρα ως μη-ειδικός ντοπαμινεργικός αγωνιστής και η διαφορά της με το αριστερόστροφο ισομερές (l-αμφεταμίνη) συνοψίζεται στο ότι έχει πιο ισχυρή διεγερτική δράση κεντρικά και λιγότερο ισχυρή περιφερικά. Έχει χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά για την αντιμετώπιση του βρογχικού άσθματος, της ναρκοληψίας και ως αντιορεξιγόνο. Στη δεκαετία του 1950 χαρακτηρίστηκε η οξεία ψυχομιμητική της δράση, γεγονός που σταδιακά την απομάκρυνε από την κλινική πράξη. Τις τελευταίες δεκαετίες χρησιμοποιείται κυρίως για την αντιμετώπιση του συνδρόμου ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας (attention deficit hyperactivity disorder) σε αναλογία 3:1 προς το αριστερόστροφο ισομερές και παράνομα για ψυχαγωγικούς σκοπούς, ή ως ενισχυτής αθλητικών και ακαδημαϊκών επιδόσεων.

Φαρμακοδυναμική d-αμφεταμίνης

Ο μηχανισμός δράσης της d-αμφεταμίνης σχετίζεται με το ρυθμιστικό της ρόλο στη νευροδιαβίβαση της ντοπαμίνης, της σεροτονίνης και της νορεπινεφρίνης. Το ψυχοδιεγερτικό αποτέλεσμα ωστόσο της χορήγησης της, μεσολαβείται κυρίως από την αύξηση της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης στη συναπτική σχισμή (Swendsen and Le Moal, 2011, Sulzer *et al.*, 2013).

Ο κύριος άξονας του μηχανισμού δράσης της αμφεταμίνης είναι η δράση της στους μεταφορείς κατεχολαμινών. Αφενός ανταγωνίζεται τις κατεχολαμίνες (ντοπαμίνη, σεροτονίνη, νορεπινεφρίνη) στην πρόσδεσή τους στους αντίστοιχους μεταφορείς επαναπρόσληψης των: Dopamine transporter (DAT), Norepinephrine transporter (NET) και Serotonin transporter (SERT) οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσης των μονοαμινών στη σύναψη (Heal D. *et al.*, 2013). Επιπρόσθετα, δρώντας σαν υπόστρωμα του κυστιδιακού μεταφορέα μονοαμινών 2 (vesicular monoamine transporter 2, VMAT2), τις εκτοπίζει στο κυτοσόλιο, όπου η

μεγάλη συγκέντρωση τους εκεί, σε συνδυασμό με τη σχετικά πολική τους φύση έχουν σαν αποτέλεσμα τη μεταβίβασή τους στη σύναψη ανεξάρτητα του προσυναπτικού ρυθμού πυροδότησης (Fei et al., 2008; Fleckenstein et al., 2009; Ramamoorthy et al., 2011; Teng et al., 1998; Eiden και Weihe, 2011). Επιπλέον, η d-αμφεταμίνη φαίνεται να μειώνει τον ρυθμό μεταβολισμού των κατεχολαμινών, μέσω της αναστολής της λειτουργίας της μονοαμινοξειδάσης (ΜΑΟ), λειτουργώντας προσθετικά στις προαναφερθείσες δράσεις που έχουν σαν αποτέλεσμα την ανάστροφη μεταφορά των κατεχολαμινών προς τη σύναψη (Mantle et al., 1976; Miller et al., 1980; Robinson, 1985).

Χρήση στη ψυχοφαρμακολογία -πειραματικό πρότυπο οξείας ψύχωσης:

Η χορήγηση της d-αμφεταμίνης προκαλεί αύξηση της οριζόντιας κινητικότητας στο ανοιχτό πεδίο, ανάλογη με τη δόση (Fray et al., 1980; Kuczenski et al., 1991; Antoniou et al., 1998) ενώ σε υψηλές δόσεις προκαλεί εμφάνιση στερεοτυπίας (Carr and White, 1987; Kelly, 1977). Επιπλέον προκαλεί συμπεριφορά προτίμησης θέσης (Nomikos και Spyraiki, 1988; Klebaur et al., 2001), συμπεριφορά αυτοχορήγησης (Hoffmeister and Goldberg, 1973, Krasnova et al., 2010, Krasnova et al., 2013) και ενίσχυση της συμπεριφοράς ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού (Panagis et al., 2000, Vlachou et al., 2008).

Χρησιμοποιείται ως κλασικό πρότυπο οξείας ψύχωσης για να δοκιμαστούν υποψήφιοι παράγοντες με αντιψυχωσική δράση (Pedrazzi et al., 2015), καθώς τα αντιψυχωσικά φάρμακα μπορούν να αναστρέψουν τη δράση της. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η d-αμφεταμίνη στις περισσότερες μελέτες δεν έχει αρνητική επίδραση σε δείκτες αντανάκλασης αρνητικής ή γνωστικής συμπτωματολογίας, έχει αντιθέτως προταθεί η χορήγηση της σε ασθενείς με σχιζοφρένεια προς την αντιμετώπιση της συμπτωματολογίας αυτού του φάσματος (Lindenmayer et al., 2013). Η ψυχοκινητική διέγερση που παρατηρείται στα πειραματόζωα μετά από χορήγηση d-αμφεταμίνης συνοδεύεται από αύξηση της ντοπαμινεργικής και γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης στο ραχιαίο ραβδωτό (Polissidis et al., 2014) και τον σύμφωνα με μελέτες in vivo μικροδιάλυσης σε επίμεις και αυξήσεις στη ντοπαμινεργική λειτουργία στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, το ραβδωτό σώμα και τον προμετωπιαίο φλοιό σύμφωνα με δεδομένα από ex-vivo μελέτες σε επίμεις. Παράλληλα, η οξεία d-αμφεταμίνη προκαλεί την ενεργοποίηση συγκεκριμένων βιοχημικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με έκφραση MAPK/ERK, DARPP-32 και CREB) ενώ παρατηρούνται αλλαγές και σε επίπεδο ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας

Αναστολή προ-παλμού:

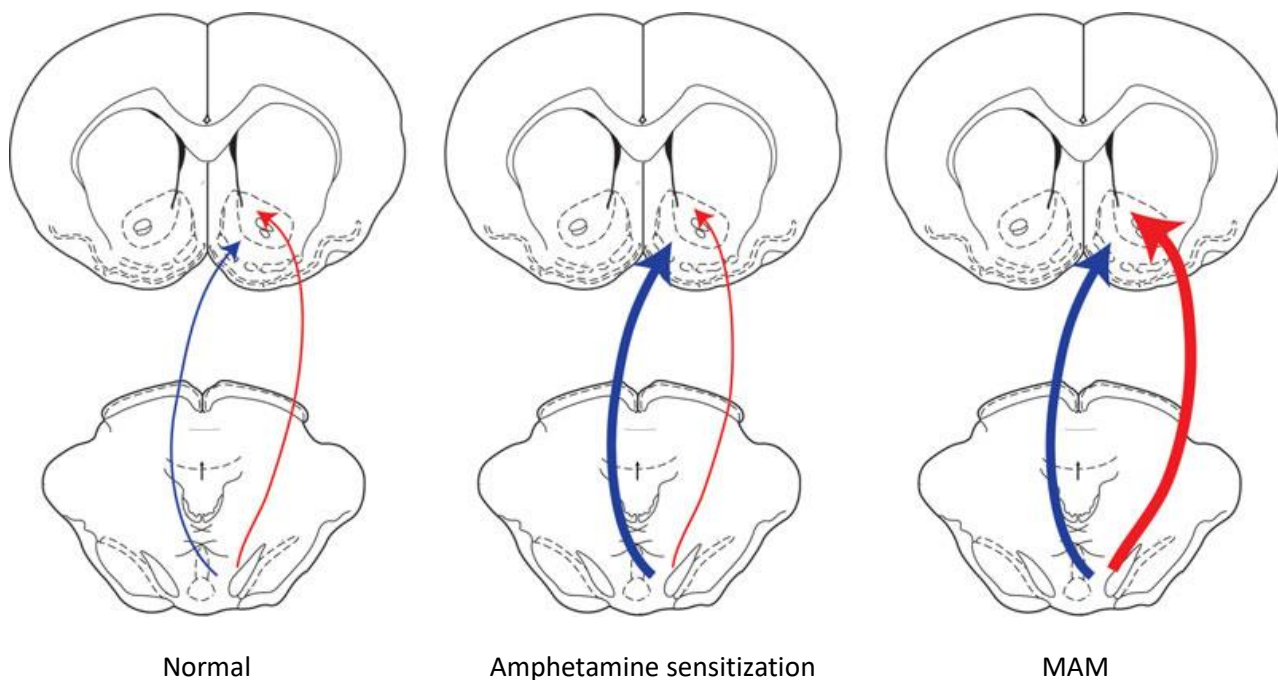
Επιπρόσθετα η d-αμφεταμίνη μειώνει την αναστολή του ξαφνιάσματος που παρατηρείται φυσιολογικά όταν ένας ήπιος προ-παλμός προηγηθεί ενός έντονου ακουστικού ερεθίσματος (Geyer et al., 2001; Swerdlow et al., 2003; Pedrazzi et al., 2015). Η μείωση της έντασης του ξαφνιάσματος από τον προπαλμό αντανάκλα τη δυνατότητα του εγκεφάλου να προσαρμόζεται προσωρινά σε ισχυρά ερεθίσματα όταν έχει προηγηθεί προειδοποίηση από ένα πιο ήπιο ερέθισμα (Graham, 1975). Το νευρολογικό αυτό φαινόμενο ονομάζεται αναστολή προπαλμού (prepulse inhibition, PPI) και η αναστολή του αποτελεί έναν ενδοφαινότυπο που εμφανίζεται σε ανθρώπους με σχιζοφρένεια, σε προκλινικά πρότυπα οξείας ψύχωσης και σε πειραματικές προσεγγίσεις της σχιζοφρένειας (Gururajan et al., 2011; Mena et al., 2016). Η μείωση του PPI θεωρείται ότι αποτελεί έναν δείκτη διαταραγμένου αισθητικοκινητικού ηθμού, δηλαδή της δυνατότητας του εγκεφάλου να αποσιωπά τα περιττά ερεθίσματα και εμφανίζεται διαταραγμένος και σε άλλες παθήσεις του κεντρικού νευρικού, πλην της σχιζοφρένειας. Έχει συσχετισθεί με τη θετική αλλά και τη γνωστική συμπτωματολογία, η ορθή εκτίμηση του ωστόσο πιθανότατα δεν τον κατατάσσει σε κάποια από τις 3 κύριες κατηγορίες συμπτωμάτων, αλλά πιθανώς αντανάκλα έναν ειδικό ενδοφαινότυπο που εξαρτάται από πλήθος παραγόντων όπως η κληρονομικότητα και παρόλο που απαντά και σε άλλες διαταραχές πλην της

σχιζοφρένειας (Swerdlow *et al.*, 2008; Giakoumaki, 2012), αποτελεί έναν εύρωστο δείκτη υψηλής μεταφραστικής αξίας.

Επαναλαμβανόμενη χορήγηση αμφεταμίνης

Συνεχόμενες δόσεις d-αμφεταμίνης χρησιμοποιούνται για να προκαλέσουν την υπερευαισθητοποίηση (sensitization) του ντοπαμινεργικού συστήματος, η οποία συνήθως εκδηλώνεται με επόμενη έκθεση του πειραματόζωου σε σχετικά μικρή δόση d-αμφεταμίνης, μια διαδικασία που ονομάζεται δοκιμασία αμφεταμίνης (amphetamine challenge) και η ακόλουθη έξαρση συμπεριφοράς αποτελεί αντανάκλαση της θετικής συμπτωματολογίας (Renard *et al.*, 2016). Και σε αυτή την περίπτωση δεν εμφανίζονται μεταβολές στη συμπεριφορά των πειραματόζωων που παραπέμπουν σε αρνητική συμπτωματολογία, όπως ελλείματα κοινωνικής συμπεριφοράς (Sams-Dodd, 1995), παρατηρούνται ωστόσο συγκεκριμένου τύπου γνωστικά ελλείματα που αφορούν ανώτερες γνωστικές λειτουργίες, όπως η γνωστική ευελιξία και η προσοχή (Featherstone *et al.*, 2008). Τα συγκεκριμένα γνωστικά ελλείματα αφορούν διεργασίες που μεσολαβούνται κυρίως από τον PFC και πιο εστιασμένα την εμπρόσθια μοίρα του φλοιού του προσαγωγίου, ενώ οι εξαρτώμενες από τον υπόκαμπο γνωστικές διεργασίες οι οποίες βρίσκονται διαταραγμένες στη σχιζοφρένεια, όπως η ενεργός μνήμη δεν επηρεάζονται από την υπερευαισθητοποίηση σε d-αμφεταμίνη (Featherstone *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2011; Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Η υπερευαισθητοποίηση στην αμφεταμίνη έχει πραγματοποιηθεί με διαφορετικά δοσολογικά σχήματα στη βιβλιογραφία. Η ερευνητική ομάδα του AA Grace δείχνει ότι 1.5 mg/kg d-αμφεταμίνης ανά ημέρα για 5 ημέρες προκαλεί αλλαγές στο ρυθμό πυροδότησης ντοπαμινεργικών νευρώνων στη VTA, όταν η δραστηριότητα τους καταγράφεται από αναισθητοποιημένα ζώα και 5 μέρες μετά την τελευταία δόση (Lodge and Grace, 2008). Ακόμα δείχνουν ότι ακόλουθη δοκιμασία αμφεταμίνης με 1.5 mg/kg είναι αρκετή για να αναδείξει την πιο έντονη απόκριση των ευαισθητοποιημένων επίμυων, σε επίπεδο κινητικότητας. Άλλες παραλλαγές του πρωτοκόλλου επιλέγουν είτε μεγαλύτερες δόσεις κατά την υπερευαισθητοποίηση (Renard *et al.*, 2016), είτε μεγαλύτερα διαστήματα εγκαθίδρυσης της ευαισθητοποίησης, τα οποία μπορούν να είναι και 5 εβδομάδες (Peleg-Raibstein *et al.*, 2009), είτε έντονη έκθεση σε αυξανόμενες δόσεις για 6 ημέρες (Peleg-Raibstein *et al.*, 2008). Οι πειραματικές αυτές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί πολύ για τη προσέγγιση της θετικής συμπτωματολογίας, έχοντας κεντρικό σημείο της θεωρητικής τους λογικής την εγκαθιδρυμένη υπερευαισθησία του ντοπαμινεργικού συστήματος σε μεταιχμιακό επίπεδο και τη δυσλειτουργία του PFC όπως αποτυπώνεται στα ανεξάρτητα από τον υπόκαμπο γνωστικά ελλείματα και ειδικά σε ανώτερες γνωστικές λειτουργίες. Πάντα η έκθεση σε αμφεταμίνη μετά από μια περίοδο αποχής, έχει σαν αποτέλεσμα την υπέρμετρη υπερδραστηριότητα στο κινητικό προφίλ των πειραματόζωων που αντανάκλα τη θετική συμπτωματολογία και στοχεύει να προσομοιάσει την υπέρμετρη απόκριση ασθενών με σχιζοφρένεια σε ντοπαμινεργικά ψυχοδιεγερτικά.



Εικόνα 1.8: Από Lodge and Grace, (2012).

Διαφοροποίηση ως προς τη δραστηριότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων προβολής που καταλήγουν στο ραβδωτό. Στη μέση βρίσκεται η μινιμαλιστική αποτύπωση του μοντέλου των επαναλαμβανόμενης αμφεταμίνης, όπου εμφανίζει μια επιλεκτική διέγερση στο εσωτερικό-κουλιακό σημείο εντοπισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Στα δεξιά η αντίστοιχη απλουστευμένη γραφική απεικόνιση της αντίστοιχης κατάστασης μετά από προγεννητική χορήγηση μεθυλαζομεθανόλης (MAM) που διαμορφώνει στο ζώο αφού γεννηθεί και αναπτυχθεί έναν βιο-φαινότυπο που προσεγγίζει τη σχιζοφρένεια. Στην περίπτωση του MAM υπάρχει καθολική αύξηση της δραστηριότητας των νευρώνων προβολής. Συνολικά αποτυπώνεται μια ειδοποιός διαφορά σε επίπεδο υποκείμενων μηχανισμών και θεωρητικής λογικής ανάμεσα σε 2 από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα σχιζοφρένειας.

B. Μη συναγωνιστικοί αναστολείς NMDA:

Οι κύριοι μη συναγωνιστικοί αναστολείς των NMDA είναι η φαινυλκυκλιδίνη (PCP) ή αλλιώς αγγελόσκονη, η κεταμίνη και η διζοσιλπίνη (dizocilpine, ή αλλιώς MK-801). Η PCP είναι η πρώτη που συντέθηκε και ακολούθησε η κεταμίνη 5 χρόνια πιο μετά, το 1962, ενώ το 1982 συντέθηκε και το MK-801. Η κεταμίνη είναι εκείνη η ένωση με την πιο χαμηλή συγγένεια για τους NMDA υποδοχείς αλλά και την πιο σύνθετη φαρμακοδυναμική. Ας σημειωθεί ότι η κεταμίνη προκάλεσε επανεμφάνιση της συμπτωματολογίας σε ασθενείς που ανταποκρίνονται καλά σε θεραπεία με αντιψυχωσικά (Cohen et al., 2015). Παλαιότερα η PCP ήταν εκείνη από τις τρεις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκε περισσότερο ως πειραματικό πρότυπο που να προσομοιάζει τη σχιζοφρένεια, ενώ από ένα σημείο και μετά και το MK-801 χρησιμοποιήθηκε ευρέως. Μετά την ανακάλυψη της αντικαταθλιπτικής της δράσης της κεταμίνης βέβαια, ανέκυψε η ανάγκη να διαλευκανθεί το κατά πόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν αντικαταθλιπτικό χωρίς το φόβο της πρόκλησης ψυχομιμητικών παρενεργειών κατά την οξεία ή χρόνια χορήγηση (Kokkinou et al., 2020). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς τις δράσεις σε επίπεδο συμπεριφοράς και εξαρτησιογόνων ιδιοτήτων, ενδοκυττάριας σηματοδότησης, και δράσης σε επίπεδο συναπτικής πλαστικότητας. Επιπλέον, ακολούθησε και λεπτομερής χαρακτηρισμός της φαρμακολογίας των μεταβολιτών της και των ανεξάρτητων από NMDA R φαρμακολογικών δράσεων της (Zanos et al., 2016, 2018; Gould et al., 2017).

Κεταμίνη

Η κεταμίνη [(+/-) 2-(2-χλωροφαινυλ)-2-(μεθυλάμινο)-κυκλοεξανόνη] αποτελείται από δύο οπτικά ισομερή, την S- και τη R-κεταμίνη, τα οποία έχουν παρόμοιες χημικές και φυσικές ιδιότητες. Πρόκειται για ένα μόριο με ποικίλες δράσεις και μεγάλη σημασία για πολλά πεδία της κλινικής πρακτικής και της επιστημονικής έρευνας. Χαρακτηρίζεται ως διαχωριστικό/διασχιστικό (dissociative) αναισθητικό (Corssen and Domino, 1966), καθώς ο ασθενής φαίνεται να είναι σε εγρήγορση, ενώ στην πραγματικότητα εμφανίζει αμνησία και έντονη αναλγησία, μη μπορώντας να αντιδράσει ή να επεξεργαστεί αισθητικά ερεθίσματα. Σε υποαναισθητικές δόσεις η κεταμίνη εμφανίζει αμνησιακές και αναλγητικές ιδιότητες, ενώ την τελευταία δεκαετία έχει τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας η διερεύνηση των ταχέως εμφανιζόμενων αντικαταθλιπτικών της ιδιοτήτων (Berman *et al.*, 2000; Rowland, 2005; Aroni *et al.*, 2009; Niesters and Dahan, 2012). Σήμερα χρησιμοποιείται παγκοσμίως ως αναισθητικό στην κτηνιατρική και λιγότερο ως αναισθητικό και αναλγητικό στην ιατρική (Rowland, 2005), ενώ από το 2019 η εσκεταμίνη εγκρίθηκε για τη θεραπεία της κατάθλιψης, ως αντικαταθλιπτικό ταχείας δράσης (σκεύασμα χαμηλής δοσολογίας) υπό τη μορφή του ρινικού σπρέι (Spravato®) ([σύνδεσμος για ανακοίνωση έγκρισης](#)).

Αξίζει να αναφερθεί ότι η κεταμίνη χρησιμοποιείται και ως εξαρτησιογόνος ουσία, για ψυχαγωγικούς σκοπούς, από τη δεκαετία του 1970 (Siegel, 1978)). Προτιμάται η χρήση δια της ρινικής οδού και αποτελεί ένα εκ των συνηθισμένων Club drugs. Μεταξύ των χρηστών η κεταμίνη είναι γνωστή με διάφορες ονομασίες όπως Special K, Vitamin K, Purple και Super Acid. Οι περισσότεροι χρήστες περιγράφουν ότι η χρήση της προκαλεί συναισθηματικές μεταβολές συζευγμένες με ονειρικές εμπειρίες ή/και με ψευδαισθήσεις (Domino, 2010). Πολλοί έχουν αναφερθεί σε μια κατάσταση κατά την οποία αισθάνονται πως γίνονται ένα με το περιβάλλον (“*melting into the surrounding*”) και σε μια εμπειρία που περιγράφουν πως αντιλαμβάνονται ότι βρίσκονται έξω από το σώμα τους, την οποία ανεπίσημα ονομάζουν “K-hole” και είναι χαρακτηριστική για την κεταμίνη (Muetzelfeldt *et al.*, 2008).

Φαρμακοδυναμική κεταμίνης

Οι κύριες φαρμακολογικές επιδράσεις της κεταμίνης οφείλονται στην ανταγωνιστική της δράση στον NMDA υποδοχέα. Προσδένεται στην θέση δέσμησης της PCP, η οποία είναι διαφορετική από τη θέση δέσμησης του γλουταμικού, (Εικόνα 11), αναστέλλοντας τη λειτουργία του και μειώνοντας το ρυθμό διάνοιξής του με αλλοστερικούς μηχανισμούς. Το S(+) ισομερές έχει 5 με 8 φορές μεγαλύτερη συνάφεια για τη θέση πρόσδεσης σε σχέση με το R(+) ισομερές (Ebert *et al.*, 1997; Karur and Seeman, 2001).

Η κεταμίνη εμφανίζει συγγένεια πρόσδεσης και σε άλλους υποδοχείς του ΚΝΣ. Ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι ασκεί επίδραση σε όλους τους τύπους οπιοειδών υποδοχέων με διαφορετική ισχύ τον καθένα ($\mu > \kappa > \delta$), ενώ και εδώ το S(+) ισομερές εμφανίζει 3 με 4 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα, στους υποδοχείς τύπου μ και κ (Smith *et al.*, 1987). Επιπλέον, η κεταμίνη έχει βρεθεί ότι δρα ανασταλτικά στη χολινεργική νευροδιαβίβαση, μέσω της δράσης της στους μουσκαρινικούς και νικοτινικούς χολινεργικούς υποδοχείς. Ενδέχεται οι δράσεις αυτές να δικαιολογούν εν μέρει την αντιχολινεργική δράση της κεταμίνης (επιδράσεις σε μνήμη και επίπεδο συνείδησης, αυξημένος μυϊκός τόνος, μυδρίαση, βρογχοδιαστολή) (Kohrs and Durieux, 1998). Ακόμα, υποδοχείς σεροτονίνης 5-HT_{2A} παρουσιάζουν μια σχετικά ασθενή συγγένεια πρόσδεσης με την κεταμίνη ($K_i=15 \pm 5 \mu\text{M}$), η οποία ίσως σχετίζεται με τις οπτικές παραισθήσεις που προκαλεί η χορήγηση κεταμίνης, λαμβάνοντας υπόψη τη συσχέτιση μεταξύ εμφάνισης οπτικών παραισθήσεων και σεροτονεργικών αγωνιστών. Τέλος έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την λειτουργία διαύλων Na⁺ στο ΚΝΣ όταν χορηγείται σε αναισθητικές δόσεις (Tyler *et al.*, 2017).

Αξίζει να αναφερθεί ότι προϊόντα του μεταβολισμού της κεταμίνης ασκούν φαρμακολογική δράση, στοχεύοντας επίσης στη γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση,. Συγκεκριμένα η νορκεταμίνη, ένας μεταβολίτης της κεταμίνης φαίνεται να αυξάνει την λειτουργία των AMPA υποδοχέων, ενώ δεν έχει συγγένεια πρόσδεσης

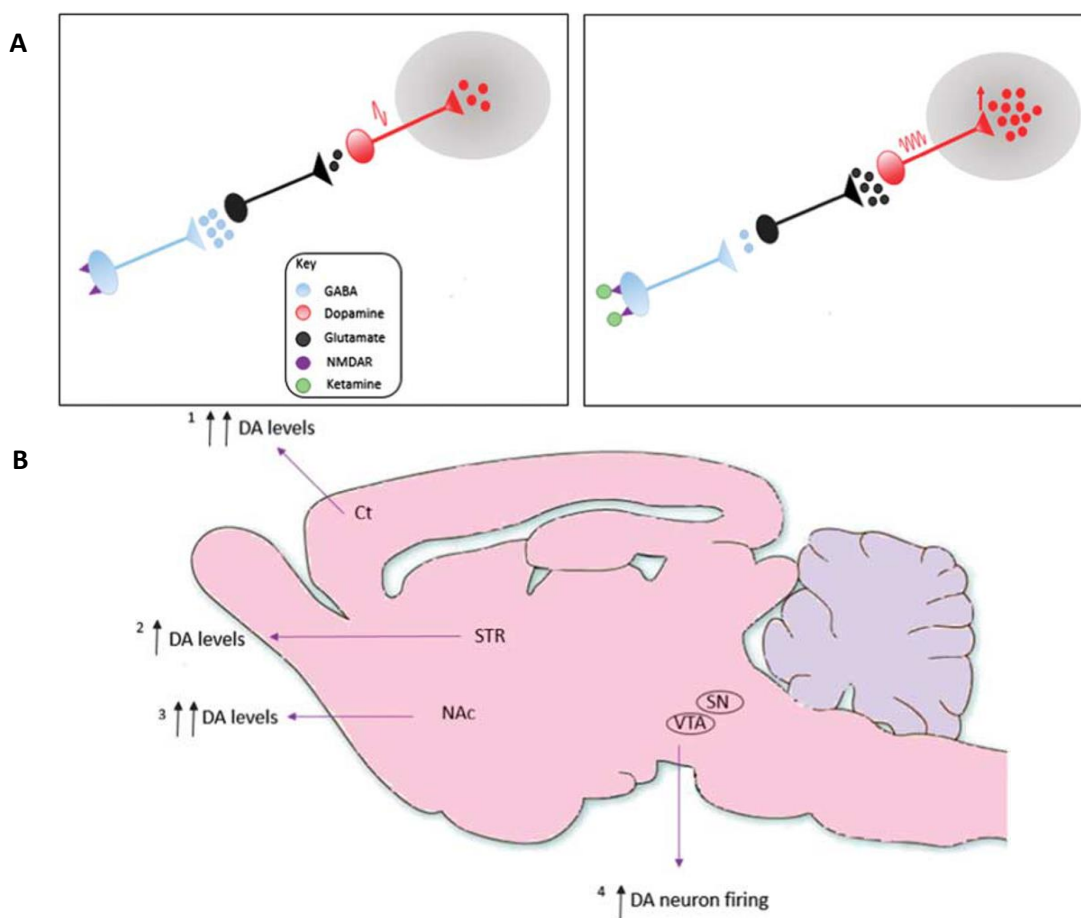
με τους NMDA. Η αύξηση της λειτουργίας των AMPA υποδοχέων από την κεταμίνη είναι συνδεδεμένη με τις αντικαταθλιπτικές ιδιότητες του φαρμάκου (Zanos *et al.*, 2016).

Πειραματικές μελέτες δράσεων κεταμίνης στο ΚΝΣ

Σε συμπεριφορικές μελέτες σε μύες και επίμυες, η χορήγηση κεταμίνης σε δόσεις από 8 mg/kg έως και 80 mg/kg προκαλεί δοσοεξαρτώμενη αύξηση της κινητικότητας, ενώ σταδιακά με την αύξηση της δόσης, εμφανίζονται συμπεριφορές στερεοτυπίας, αταξίας και έλλειψη «εστιασμένου προσανατολισμού» (Yamamoto *et al.*, 1997; Imre *et al.*, 2006; Frohlich and Van Horn, 2014). Οι αντικαταθλιπτικές ιδιότητες του φαρμάκου επίσης εμφανίζονται σε μικρές δόσεις (8-12mg/kg). Σε δόσεις μεγαλύτερες των 80 mg/kg, η κεταμίνη προκαλεί αναισθησία στα πειραματόζωα, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η αναισθησία συμβαίνει για λίγα λεπτά, ανάλογα το μέγεθος της δόσης ενώ τα πειραματόζωα σταδιακά μετά την αναισθησία ανακτούν αρχικά τις αισθήσεις τους και στην συνέχεια την ικανότητα τους να κινούνται (Veilleux-Lemieux *et al.*, 2013; Venancio *et al.* 2015).

Έχει εκτενώς παρατηρηθεί ότι η κεταμίνη όπως και η φαινυλκυκλιδίνη και το MK801 επάγουν υπερκινητικότητα, ελλείμματα κοινωνικής συμπεριφοράς και γνωστικές δυσλειτουργίες σε πειραματόζωα. Επίσης οι συγκεκριμένες ουσίες διαταράσσουν τη λειτουργία του αισθητικοκινητικού ηθμού με την κεταμίνη να προκαλεί ασθενέστερη επίδραση συγκριτικά με τις υπόλοιπες δύο ουσίες (Keith *et al.*, 1991; Cilia *et al.*, 2007; van den Buuse *et al.*, 2015; Ma and Leung, 2018; Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Ειδικότερα η ερευνητική ομάδα του Yamamoto *et al.*, (1997) παρατήρησε ότι ντοπαμινεργικοί ανταγωνιστές (αλοπεριδόλη και νεμοναπρίδη) αναστέλλουν συμπεριφορικές και ηλεκτροφυσιολογικές, σε επίπεδο ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος, αλλαγές που προκαλεί η κεταμίνη, δίνοντας περισσότερα στοιχεία στην θεωρία που θέλει την κεταμίνη να έχει δράση έμμεσου ντοπαμινεργικού αγωνιστή (Irifune *et al.*, 1991). Ως προς τις επιδράσεις στη ντοπαμινεργική λειτουργία, μετα-αναλύσεις δείχνουν ότι η κεταμίνη οξέως αυξάνει τα επίπεδα ντοπαμίνης σε φλοικές δομές, ραβδωτό σώμα και επικλινή πυρήνα. Επίσης αυξάνει το ρυθμό πυροδότησης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη VTA, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω αλλαγές είναι επαναλήψιμες σε μελέτες που χρησιμοποιούν υποαναισθητικές δόσεις και δεν εμφανίζονται μετά τη χορήγηση αναισθητικών δόσεων (≥ 100 mg/kg) (Kokkinou *et al.*, 2018). Μια πολύ πρόσφατη και πρότυπη μελέτη ψυχοφαρμακολογίας έδειξε ότι η κεταμίνη αυξάνει έντονα την απελευθέρωση ντοπαμίνης στο NAc, αντίστοιχα όπως τα ντοπαμινεργικά ψυχοδιεγερτικά, αλλά για πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα, δεν επιφέρει ωστόσο τη μετέπειτα συναπτική πλαστικότητα που μεσολαβεί τις εθιστικές ιδιότητες των δεύτερων (Simmler *et al.*, 2022).



Εικόνα 1.9:

- A. Απλουστευμένη γραφική απεικόνιση του μηχανισμού με τον οποίο η κεταμίνη προκαλεί αύξηση της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης. Η κεταμίνη (δεξιά εικόνα) προκαλώντας αποκλεισμό στους NMDA υποδοχείς των ανασταλτικών ενδονευρώνων, αυξάνει τη λειτουργία των γλουταματεργικών νευρώνων, οι οποίοι έχουν καθοδικά ντοπαμινεργικούς νευρώνες προβολής.
- B. Σύνοψη των μετα-αναλυτικών αποτελεσμάτων σχετικά με τη δράση της οξείας υπο-αναισθητικής κεταμίνης στα επίπεδα ντοπαμίνης διαφόρων περιοχών στον εγκέφαλο. Η οξεία κεταμίνη αυξάνει την πυροδότηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη VTA και κατέπεκτα τα επίπεδα ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης σε προμετωπιαίο φλοιό, επικλινή πυρήνα και σε μικρότερη κλίμακα στο ραχιαίο ραβδωτό.

Από τους (Kokkinou et al., 2018)

Πειραματικές μελέτες – Μοντελοποίηση σχιζοφρένειας και κεταμίνη

Παρότι υπήρχε ήδη σε χρήση το μοντέλο επαναλαμβανόμενων χορηγήσεων PCP για την πειραματική προσέγγιση της σχιζοφρένειας, συγκεκριμένες παρατηρήσεις οδήγησαν την πειραματική ομάδα του Becker A. να αναπτύξει ένα αντίστοιχο μοντέλο με επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις κεταμίνης (Becker *et al.*, 2003). Ήταν ήδη γνωστό ότι η κεταμίνη έχει ένα πιο ήπιο ψυχομιμητικό προφίλ σε ανθρώπους και πειραματόζωα και πιο μικρή συγγένεια για τους NMDA υποδοχείς (Becker *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2015). Παράλληλα, συγκριτικά με την PCP φαινόταν ότι εμφάνιζε μικρότερη συγγένεια προς του 5-HT_{2A}, αλλά υψηλότερη για του D2 υποδοχείς της ντοπαμίνης. Η πιθανότητα της επαναλαμβανόμενης κεταμίνης να εγκαθιστά ένα διαφορετικό βιο-φαινότυπο σε σχέση με την PCP και η συνεχής αναζήτηση πειραματικών προσεγγίσεων της σχιζοφρένειας με πιο ικανοποιητική φαινομενολογική ομοιότητα και προβλεπτική ισχύ, οδήγησε στο να ξεκινήσει μια προσπάθεια διαμόρφωσης του πειραματικού μοντέλου, μέσω της κατανόησης της επίδρασης του στη συμπεριφορά των πειραματοζώων στην οποία μελετήθηκαν διάφορα σχήματα χορήγησης.

Οι πρώτες μελέτες που εξετάζουν το σχήμα των 5 ημερήσιων δόσεων των 30 mg/kg σε Sprague-Dawley επίμυες εμφανίζουν έναν ήπιο βιο-φαινότυπο χωρίς σημαντικές βλάβες στον αισθητικοκινητικό ηθμό και σε παραμέτρους σχετιζόμενες με αρνητική και γνωστική συμπτωματολογία. Ωστόσο η διαταραχή της λανθάνουσας αναστολής (latent inhibition, LI), ενός συμπεριφορικού δείκτη που έχει συνδεθεί μεταξύ άλλων και με τη ψυχοπαθολογία, η αύξηση της πρόσδεσης των D2 υποδοχέων στον ιππόκαμπο και η μείωση των υποδοχέων γλουταμικού στον εμπρόσθιο φλοιό (Becker *et al.*, 2003) διατήρησαν το ενδιαφέρον ως προς αυτή την προσέγγιση. Ακόλουθες μελέτες συνέδεσαν το πειραματικό πρότυπο με αλλαγές σε δεσμευτικές του Ca⁺⁺ πρωτεΐνες, οι οποίες είναι ανάλογες με ευρήματα από μεταθανάτιο υλικό σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Bernstein *et al.*, 2003), με μείωση της ανοσοδραστικότητας (immunoreactivity) των PV+ ενδονευρώνων στον ιππόκαμπο (G Keilhoff *et al.*, 2004), και αυξημένους δείκτες νευρωνικής πλαστικότητας στον ιππόκαμπο (Gerburg Keilhoff *et al.*, 2004). Ακολούθησε και μια μελέτη που έδειξε ότι το συγκεκριμένο δοσολογικό σχήμα της κεταμίνης διαταράσσει ανώτερες γνωστικές λειτουργίες που ελέγχονται κυρίως από φλοιικές δομές (Rushforth *et al.*, 2011).

Προκειμένου να αποτυπωθεί καλύτερα ο συμπεριφορικός φαινότυπος προτιμώνται στη συνέχεια σχήματα με την ίδια δόση κεταμίνης αλλά για περισσότερες ημέρες. Συγκεκριμένα, οι 10 ημερήσιες δόσεις των 30 mg/kg αρκούν για να επιφέρουν ελλείματα σε ανώτερες γνωστικές λειτουργίες (Nikiforuk and Popik, 2012, 2014), ή γνωστικές δοκιμασίες που αντανakλούν την αναγνωριστική μνήμη (Schumacher *et al.*, 2016; Kozela *et al.*, 2020). Παράλληλα δείκτες αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας εμφανίζονται επίσης διαταραγμένοι σε σχήμα δεκατεσσάρων ημερήσιων χορηγήσεων σε επίμυες του γένους Long Evans (Schumacher *et al.*, 2016). Επιπρόσθετα μελέτη με 10 δόσεις των 10 mg/kg σε Wistar επίμυες παρουσίασε διαταραγμένους δείκτες θετικής, αρνητικής, γνωστικής συμπτωματολογίας και μειωμένη λειτουργία αισθητικοκινητικού ηθμού (PPI) (Sampaio *et al.*, 2018), γεγονός που ενδεχομένως να υποδεικνύει ότι το διάστημα έκθεσης στην κεταμίνη ίσως να παίζει πιο μεγάλο ρόλο για την ανάπτυξη του φαινοτύπου συγκριτικά με την ποσότητα της έκθεσης. Τα δεδομένα σχήματα χορήγησης επιτυγχάνουν να προκαλέσουν αλλαγές στον αριθμό των PV+ ενδονευρώνων και το εξωκυττάριο πλέγμα πρωτεογλυκανών που τους περιβάλλει και παίζει ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία τους (Matuszko *et al.*, 2017a; Fujikawa *et al.*, 2021; Kaushik *et al.*, 2021), στην έκφραση του mGluR5 (Zurawek *et al.*, 2018), και τη λειτουργία της μικρογλοίας (Kozela *et al.*, 2020).



Εικόνα 1.10: Αντιπροσωπευτικό δείγμα από την κουλτούρα των memes που δείχνει το πόσο επιθυμητή είναι η κεταμίνη για ηδονιστική χρήση και ταυτόχρονα το πόσο γνωστές είναι οι συνέπειες της στους χρήστες. Γεγονός ιδιαίτερα ενδιαφέρον δεδομένης της έλλειψης εθιστικών ιδιοτήτων του μορίου.

Επιπρόσθετα, επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης, PCP ή MK-801 έχει βρεθεί ότι μειώνει τον αριθμό των PV+ ανασταλτικών ενδονευρώνων είτε στον PFC είτε στον ιππόκαμπο (G Keilhoff *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2015; Matuszko *et al.*, 2017b; Fujikawa *et al.*, 2021; Kaushik *et al.*, 2021; Kokkinou *et al.*, 2021) και προκαλεί δυσλειτουργίες στη ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου και συγκεκριμένα στους γάμα ρυθμούς, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Kocsis *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2015).

Οι πειραματικές προσεγγίσεις που προαναφέρθηκαν έχουν δοκιμαστεί και σε μύες με σκοπό την αξιοποίηση της μεγαλύτερης ευκολίας για παρεμβάσεις σε επίπεδο γενετικής μηχανικής, όπως η υπερέκφραση γονιδίων ή η έκφραση τεχνητών υποδοχέων για συνθετικούς προσδέτες (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs, DREADDs) σε εγκεφαλικές περιοχές ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα, μια μεγάλη μελέτη δείχνει ότι ο βιο-φαινότυπος μετά από 28 δόσεις κεταμίνης συνοδεύεται από αλλαγές σε επίπεδο συναπτικής και νευρωνικής πλαστικότητας οι οποίες μεσολαβούνται από την CAMKIIβ και ελέγχουν τη χωρική μνήμη (Luo *et al.*, 2020). Η εξαιρετική μελέτη ωστόσο των Kokkinou *et al.*, 2021 στο ίδιο περιοδικό, μελετώντας το αποτύπωμα των 5 υπο-αναισθητικών δόσεων, έδειξε μέσω PET ότι αυξάνεται η βιοσύνθεση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό, ενώ η χημειο-γενετική ([chemogenetics](#), αλλιώς τα DREADDs) ενεργοποίηση των PV ενδονευρώνων σε mPFC ή στο κοιλιακό επίθεμα του ιπποκάμπου (vSUB) μπορούν να αναστρέψουν το φαινόμενο αυτό, καθώς και το συμπεριφορικό φαινότυπο (Mukherjee *et al.*, 2019; Kokkinou *et al.*, 2021).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι σε μύες οι 5 δόσεις κεταμίνης 30 mg/kg είναι αρκετές ώστε να προκαλέσουν υπερκινητικότητα μετά από 2 ημέρες wash-out, κάτι που όπως είδαμε παραπάνω σε επίμυες δεν παρατηρείται, παρόλο που η δόση κατά αντιστοιχία είναι μεγαλύτερη, ενώ δημοσιευμένη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας δείχνει ότι ούτε οι 7 ημέρες είναι αρκετές για να αποτυπωθεί ο φαινότυπος αυτός σε επίμυες, ενώ οι 10 ημερήσιες χορηγήσεις είναι (Poulia *et al.*, 2021). Το γεγονός αυτό υπενθυμίζει τη σημασία του διαχωρισμού των δεδομένων από μυς και επίμυς στις μεταφραστικές μελέτες καθώς φαίνεται ότι δεν επηρεάζονται απαραίτητα κατά τρόπο κοινό από τις διάφορες φαρμακολογικές παρεμβάσεις.

Ένα από τα προεξέχοντα ευρήματα λοιπόν στις πειραματικές προσεγγίσεις της σχιζοφρένειας μέσω επαναλαμβανόμενων χορηγήσεων κεταμίνης είναι η μείωση του αριθμού των PV+ ενδονευρώνων ή η μείωση της έντασης φθορισμού της πρωτεΐνης PV σε αυτά. Αυτό το εύρημα συμπλέει απόλυτα με τα ευρήματα ανθρώπων με σχιζοφρένεια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Παραπάνω αναφέρθηκε επίσης ότι τα κύτταρα αυτά είναι που διαμορφώνουν τους γάμα ρυθμούς (gamma band oscillations, GBO), όπου η διαταραγμένη λειτουργία τους αποτελεί επίσης ένα από τα πιο κλασικά ευρήματα σε ασθενείς με σχιζοφρένεια. Αντίστοιχα η οξεία υπο-αναισθητική κεταμίνη επηρεάζει τους GBO κατά αντίστοιχο τρόπο όπως έχει δειχθεί (Kocsis *et al.*, 2013), ενώ οι επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις μειώνουν τους GBO σε Sprague-Dawley επίμυες σε κατάσταση εγρήγορσης, γεγονός που συνδέεται με τη δριμύτητα των αρνητικών συμπτωμάτων (Αηναου *et al.*, 2017), ενώ σε καταγραφές δυναμικών πεδίου από τομές νεοφλοιού έχει βρεθεί ότι μειώνουν την κορυφή των GBO (McNally *et al.*, 2013).

Παράλληλα, απεικονιστικές μελέτες σε ανθρώπους δείχνουν ότι η κεταμίνη προκαλεί αύξηση του γλουταμικού σε φλοϊκές δομές (Cohen *et al.*, 2015) και αλλαγές στη λειτουργική συνδεσιμότητα του PFC που συμπλέουν με τα κλασικά ευρήματα της υπερ-συνδεσιμότητας σε κατάσταση ηρεμίας στους ασθενείς με σχιζοφρένεια (Cohen *et al.*, 2015; Robert A. McCutcheon *et al.*, 2020). Μια ακόμη πολύ πρόσφατη μελέτη εστιάζει στην θαλαμο-φλοϊκή υπερ-συνδεσιμότητα, μετά από χορήγηση υπο-αναισθητικής κεταμίνης σε υγιείς εθελοντές παράλληλα με εκείνη που παρατηρείται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια η υψηλό ρίσκο εμφάνισης πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου (Abram *et al.*, 2022).

Γενετικές πειραματικές προσεγγίσεις:

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει μεγάλη συσχέτιση διάφορων γενετικών τόπων με τη σχιζοφρένεια με αποτέλεσμα τη μελέτη αρκετών γονιδίων σε διαγονιδιακά πειραματόζωα, κυρίως μυς. Το γονίδιο DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) είναι μια από τις πιο καλά μελετημένες περιπτώσεις. Οι μυς που έχουν υποστεί μείωση της έκφρασης της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης, η οποία σχετίζεται με τη ρύθμιση της ανάπτυξης των

νευρώνων σε προγεννητικά κυρίως στάδια, εμφανίζουν μεταβολές σε συμπεριφορικούς δείκτες που προσομοιάζουν αρνητική, θετική και γνωστική συμπτωματολογία. Παράλληλα, χαρακτηρίζονται από ανατομικές αλλοιώσεις όπως μεγαλύτερο όγκο στις κοιλίες, ενώ παρουσιάζουν μειωμένη ανοσοδραστικότητα της παρβαλβουμίνης και διαταραχές ως προς την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη νευρωνική πλαστικότητα (Winship *et al.*, 2019; Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Ένα ακόμη προεξέχων γονίδιο υψηλού ρίσκου είναι η νευρεγουλίνη 1 (neuregulin 1, NRG1) που κωδικεύει μια σειρά διαφορετικών πρωτεϊνών με συνολικά 31 ισομορφές. Δρουν ως παράγοντες ανάπτυξης, ενώ και το γονίδιο που κωδικεύει τον υποδοχέα τους, τον ErbB4 σχετίζεται επίσης με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν ρόλο μεταξύ άλλων στη συναπτογένεση, τη μετανάστευση νευρώνων κατά την ανάπτυξη, τη μυελίνωση και την αλληλεπίδραση νευρώνων με γλοία. Η ολική απαλοιφή του γονιδίου σε πειραματόζωα (ομόζυγα ΚΟ) είναι θανατηφόρα. Από την ετερόζυγη η ελεγχόμενη απαλοιφή (conditioned KO) διαμορφώνονται διάφορα διακριτά πρότυπα που προσομοιάζουν συμπτώματα που καταγράφονται στη σχιζοφρένεια, ανάλογα με ποιος ακριβώς είναι ο χειρισμός του γονιδίου, όπως η ετερόζυγη απαλοιφή της διαμεμβρανικής δομής της πρωτεΐνης [Nrg1(Δ TM)^{+/-}], ή της EGF-ομοιάζουσας δομής της [Nrg1(Δ EGF)^{+/-}]. Κάθε περίπτωση έχει συγκεκριμένες ιδιαιτερότητες. Λόγου χάρη, οι Nrg1(Δ TM)^{+/-} μυς εμφανίζουν δείκτες θετικής, γνωστικής συμπτωματολογίας και μειωμένο PPI ενώ είναι ανθεκτικοί στην άμβλυση των δεικτών αυτών μετά από τη χορήγηση ντοπαμινεργικών ψυχοδιεγερτικών/ψυχομιμητικών (van den Buuse *et al.*, 2009). Οι Nrg1(Δ EGF)^{+/-} από την άλλη, εμφανίζουν διαταραχές που συνδέονται με τη λειτουργία του συναισθήματος και αρνητική συμπτωματολογία, χωρίς να συνοδεύονται από αλλαγές σε γνωστικούς δείκτες. Άλλες σχετικές παρεμβάσεις στη λειτουργία του γονιδίου έχουν σαν αποτέλεσμα αυξημένα PV+ κύτταρα στον PFC και μειωμένα επίπεδα υδροξυλάσης της τυροσίνης (tyrosine hydroxylase, TH), σε PFC και ιππόκαμπο. Συνολικά οι παρεμβάσεις στη λειτουργία του γονιδίου NRG1 που είναι από τα πιο στενά συνδεδεμένα με τη σχιζοφρένεια, εμφανίζουν φαινοτυπικές ομοιότητες αλλά και μεταβολές που δε σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια, ενώ υπάρχει κενό και ως προς τη φαρμακολογική διερεύνηση των διάφορων σχετικών προτύπων (Jones *et al.*, 2011; Winship *et al.*, 2019).

Μυς με μεταλλάξεις στο γονίδιο της dysbindin, μιας συναπτικής πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην εξωκυττάρωση, τη σύνθεση συναπτικών κυστιδίων και την κινητικότητα των υποδοχέων (receptor trafficking), έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως πειραματικό πρότυπο σχιζοφρένειας. Ανάλογα με τις στρατηγικές παρέμβασης στην έκφραση του γονιδίου, προκύπτουν διάφορα παθοφυσιολογικά γνωρίσματα της σχιζοφρένειας που έχουν να κάνουν με μορφολογικά στοιχεία συναπτικής πλαστικότητας όπως ασύμμετρες συνάψεις στο ιππόκαμπο, πιο στενές συναπτικές σχισμές σε διεγερτικές συνάψεις και αλλαγές στη μορφολογία των συναπτικών κυστιδίων (Jones *et al.*, 2011). Από πλευράς συμπεριφοράς, αυξημένη παρορμητικότητα συχνά συνοδεύει την υπερδραστηριότητα των μεταλλαγμένων πειραματοζώων και τα γνωστικά ελλείματα που εμφανίζουν (Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Έχουν επιπροσθέτως αναπτυχθεί διαγονιδιακά πειραματικά πρότυπα βασισμένα στη ντοπαμινεργική και άλλα στη γλουταματεργική θεωρία της σχιζοφρένειας από πλευράς θεωρητικής λογικής, όπως οι μυς που δεν εκφράζουν το μεταφορέα της ντοπαμίνης (dopamine transporter, DAT) ή υπερεκφράζουν τους υποδοχείς D2 της ντοπαμίνης (Sotiropoulos *et al.*, 2021). Αντίστοιχες γενετικές παρεμβάσεις έχουν πραγματοποιηθεί και στο γλουταματεργικό σύστημα, στοχεύοντας είτε συγκεκριμένες υπομονάδες των NMDA υποδοχέων, είτε τη δομική υπομονάδα σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, όπως οι μύες που έχουν υποστεί απαλοιφή των NMDA από τους PV+ ενδονευρώνες (Bygrave *et al.*, 2016). Και σε αυτές τις περιπτώσεις υπάρχουν θεμελιώδη ζητήματα από πλευράς φαινομενολογικής ισχύος, τα γενετικά πειραματικά πρότυπα έχουν ωστόσο συντελέσει στην κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου των γονιδίων που υφίστανται απαλοιφή, δίνοντας πολύ σημαντικές γνώσεις σχετικά με το βιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας.

Πιο πρόσφατες μελέτες εστιασμένες σε GWAS δεδομένα είτε από μεγάλα διεθνή consortia, είτε μικρότερης κλίμακας που εστιάζουν σε οικογένειες (family-based designs) έχουν προσφέρει νέες προοπτικές στην κατανόηση της πολύπλοκης γενετικής βάσης της νόσου, χαρακτηρίζοντας μοναδιαίες ή συνδυασμούς σπάνιων (και συχνά ιδιαίτερα δριμύων) μεταλλάξεων (συχνά SNPs εντοπισμένες σε εσώνια που είναι είτε

κληρονομούμενες είτε εμφανίζονται *de novo*). Σε αυτό το πλαίσιο έχει διατυπωθεί ότι η πολυγενετική βάση της νόσου αντικατοπτρίζεται από την πλειάδα κοινών SNPs που εμφανίζουν πολύ μικρά effect size στις μελέτες GWAS και υποδεικνύει ότι το γενετικό υπόβαθρο επηρεάζει την διεισδυτικότητα προς της νόσο (penetrance), καθώς και το ότι η συσσώρευση αυτών των σπάνιων μεταλλάξεων διαμορφώνει ένα πολυγενετικό συστατικό το οποίο επηρεάζει δυναμικά την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων στον εγκέφαλο. Ο χαρακτηρισμός τέτοιων μεταλλάξεων έχει συμβάλει στη διαμόρφωση πειραματικών μοντέλων σε μύς που προσπαθούν να συνδέσουν τη μετάλλαξη με τις ευρύτερες μακροσκοπικές παθολογίες που παρατηρούνται στη σχιζοφρένεια ότας παράλληλα πιο έγκυρα σε επίπεδο φαινομενολογικής ομοιότητας και θεωρητικής λογικής (Gogos *et al.*, 2020).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μοντέλων αποτελούν εκείνα που προσομοιάζουν τις *de novo* μικροδιαγραφές (microdeletions) 22q11.2 που βασίζονται στη συσσώρευση διαγραφών στο σχετικό γενετικό τόπο του χρωμοσώματος 22 με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την έκφραση 30-60 γονιδίων που εκφράζονται κυρίως στο εγκέφαλο. Συνήθως η αιτία των μεταλλαγών είναι η παραλλαγή αριθμού αντιγράφων (Code number variant, CNV) που εδράζει στο χρωμόσωμα 22 η οποία συχνά οδηγεί σε γνωστικές δυσλειτουργίες, ενώ περίπου το 30% των φορέων των μικροδιαγραφών εμφανίζουν σχιζοφρένεια (Karayiorgou *et al.*, 2010). Στο πλαίσιο αυτό, έχουν αναπτυχθεί γενετικά τροποποιημένοι μύς που προσομοιάζουν το σύνδρομο των μικροδιαγραφών στο 22q11 με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα τους Df(16)A^{+/-} από την ομάδα του J. Gogos στο Zuckerman Institute και τους LgDel^{+/-} που εμφανίζονται σε εργασίες και άλλων εξέχοντων πειραματικών ομάδων (Hamm *et al.*, 2017; Marissal *et al.*, 2018; Mukherjee *et al.*, 2019). Μεταξύ άλλων έχει δειχθεί ότι τα πειραματικά μοντέλα αυτά αντανακλούν τις γνωστικές δυσλειτουργίες στη σχιζοφρένεια συνδεδεμένες με τη λειτουργία των PV+ ενδονευρώνων και ενδοφαινοτύπων ηλεκτρικής δραστηριότητας του εγκεφάλου (γαμμα-ρυθμική δραστηριότητα). Ενδιαφέρον είναι ότι το πειραματικό πρότυπο των Df(16)A^{+/-} μυών παρουσιάζει πυρηνικά ελλείμματα στην υποστήριξη της εγκεφαλικής λειτουργίας από τοπικές συναθροίσεις φλοιικών νευρώνων (ensembles) που περιπλέκονται σε ειδικά μοτίβα συν-ενεργοποίησης, ανάλογες δυσλειτουργίες με εκείνες που παρουσιάζονται κατόπιν χρόνιας χορήγησης υποαναισθητικής κεταμίνης (Hamm *et al.*, 2017). Τέτοιες μεθοδολογικές προσεγγίσεις σε τέτοια μεταφραστικά μοντέλα επιχειρούν να κατανοήσουν το πως διαταράσσεται η αντίληψη και οι μηχανισμοί που την υποστηρίζουν στη σχιζοφρένεια, δίνοντας πολύτιμα δεδομένα για την παθοφυσιολογία της νόσου, αλλά και την κατανόηση των σχετικών φυσιολογικών διεργασιών.

Νευροαναπτυξιακές πειραματικές προσεγγίσεις:

Αρκετά δημοφιλής είναι και η νευροαναπτυξιακή θεωρία της σχιζοφρένειας που υποστηρίζει ότι παθολογικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της κύησης επηρεάζουν την ανάπτυξη των νευρωνικών κυκλωμάτων με αποτέλεσμα να προκύπτουν ψυχοπαθολογικές καταστάσεις που «αποκαλύπτονται» κατά το τέλος της εφηβείας ή την αρχή της ενηλικίωσης (Sotiropoulos *et al.*, 2021). Οι πειραματικές προσεγγίσεις που στηρίζουν τη θεωρητική τους λογική στην παραπάνω θεώρηση περιλαμβάνουν παρεμβάσεις σε προγεννητικό ή πολύ πρώιμο μεταγεννητικό στάδιο.

Το πιο καθιερωμένο ίσως πειραματικό πρότυπο είναι η προγεννητική χορήγηση μιας μιτοτοξίνης (ή αντι-μιτωτικός παράγοντας), της μεθυλαζομεθανόλης (MAM) σε εγκύους θηλυκούς επίμους, σε συγκεκριμένη ημέρα της κύησης. Η MAM είναι εκλεκτική για τις υπό κυτταρικό πολλαπλασιασμό νευροβλάστες, χωρίς να επιδρά σε γλοιακά κύτταρα ή στα περιφερικά όργανα. Η ημέρα της χορήγησης καθορίζεται από την ανατομική περιοχή που υφίσταται έντονη νευρογένεση. Για παράδειγμα, κατά την 15^η ημέρα της κύησης (gestational day, GD), είναι οι νευρώνες που σχηματίζουν το φλοιό εκείνοι που γεννώνται και επηρεάζονται, με αποτέλεσμα τη διαμόρφωση ενός ανάλογου φαινοτύπου όταν οι επίμεις είναι πλέον ενήλικες. Διαφορετικές ημέρες χορήγησης δίνουν ετερογενείς φαινοτύπους, βάσει του πληγείσαντος ανατομικού υποστρώματος. Η πιο συνήθης ημέρα χορήγησης είναι η GD17, όπου οι κυτταρικές διαιρέσεις στο φλοιό είναι κατά πολύ μειωμένες, ενώ επηρεάζονται πιο έντονα ο mPFC (Jones *et al.*, 2011) και ο κοιλιακός υπόκαμπος

(Lodge and Grace, 2007). Ο βιο-φαινότυπος που προκύπτει χαρακτηρίζεται από φαινομενολογική ισχύ εμφανίζοντας διαταραγμένους δείκτες θετικής, αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας, νευροανατομικά ευρήματα που προσομοιάζουν τα μεταθανάτια ευρήματα σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, με εξαίρεση τοις έσω κοιλίες του εγκεφάλου που δεν εμφανίζονται διαταραγμένες (Matricon *et al.*, 2010). Επίσης παρατηρούνται μειώσεις στον αριθμό των PV+ κυττάρων σε PFC και ιππόκαμπο και η ντοπαμινεργική δραστηριότητα στο κοιλιακό ραβδωτό εμφανίζεται αυξημένη. Το GD17 MAM αποτελεί ένα από τα πιο αποδεκτά ως προς τη μεταφραστική ισχύ πειραματικό πρότυπο σχιζοφρένειας και έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά για την αξιολόγηση ενώσεων με πιθανή αντιψυχωσική δράση.

Άλλες νευροαναπτυξιακές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη προσβολή του κυοφορούντος επίμου με πολυινωσινικό-πολυκυτιδικό οξύ (polyinosinic-polycytidilic acid, poly I:C). Πρόκειται για ένα συνθετικό RNA μόριο, το οποίο μέσω της πρόσδεσης του στο Toll-like receptor 3, μιμείται την ανάλογη δράση συγκεκριμένων ιών και εκκινεί μια ανοσολογική αντίδραση στη μητέρα. Αυτό το γεγονός έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση φλεγμονής στους εγκεφάλους των εμβρύων που συνεπάγεται τη νευρωνική απόπτωση και απώλεια λευκής ουσίας σε συγκεκριμένο στάδιο της εμβρυικής τους ανάπτυξης. Όταν τα έμβρυα είναι πλέον ενήλικα πειραματόζωα εμφανίζουν κοινωνική απόσυρση, γνωστικά ελλείματα, μειωμένο PPI, νευροχημικές και νευροανατομικές αλωιώσεις που προσομοιάζουν τη σχιζοφρένεια. Το χρονικό σημείο ανάπτυξης του φαινοτύπου και η συμπτωματολογία που προκύπτει το καθιστούν μια από τις προσεγγίσεις με μεταφραστική αξία. Πλην του Poly I:C προτύπου, εφαρμόζονται προσεγγίσεις και με άλλου τύπου μολύνσεις, όπως βακτηριακές με ανάλογα αποτελέσματα στα έμβρυα.

Επίσης υπάρχουν κι άλλου τύπου παρεμβάσεις σε νεογνά που στηρίζονται στη νευροαναπτυξιακή θεωρία και σε επιδημιολογικές παρατηρήσεις, όπως η μητρική αποστέρηση ή η κοινωνική απομόνωση των νεογνών που διαμορφώνουν «ήπιους» φαινότυπους στα ενήλικα πλέον άτομα. Συνολικά, η νευροαναπτυξιακή είναι από τις κυρίαρχες θεωρίες της σχιζοφρένειας με διάφορες στρατηγικές για τη μελέτη της και τη χρήσης της για τη μελέτη πιθανών αντιψυχωτικών ιδιοτήτων νέων ουσιών (Jones *et al.*, 2011; Winship *et al.*, 2019; Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών – THC κατά την ανάπτυξη:

Ένα ακόμα νευροδιαβιβαστικό σύστημα που έχει συνδεθεί με τη σχιζοφρένεια είναι το ενδογενές σύστημα των κανναβινοειδών (endocannabinoid system, ECS). Η δομή, η λειτουργία και ο ρόλος του θα αναπτυχθούν εκτενώς στο επόμενο χωρίο, ωστόσο για τις ανάγκες του παρόντος κεφαλαίου αξίζει να αναφερθεί ότι η Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη (THC), το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης, έχει συνδεθεί με την πιθανότητα πρόκλησης συμπτωμάτων ψυχωσικού τύπου (Roulia *et al.*, 2019, 2020), ενώ η κανναβιδιόλη (CBD), το προεξέχων μη εθιστικό συστατικό, εμφανίζει αντιψυχωσικές ιδιότητες (Leweke *et al.*, 2016; Brakatselos *et al.*, 2021; Roulia *et al.*, 2021). Το σύστημα των ενδογενών κανναβινοειδών ελέγχει την ανάπτυξη της μεσομεταιχμιακής και μεσοφλοιικής οδού -η οποία παρεπιπτόντως ολοκληρώνεται στα ηλικιακά στάδια στα οποία εμφανίζεται η σχιζοφρένεια- μέσω του ελέγχου που ασκεί στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα αυτών (Burke and Miczek, 2014; Sgheddu *et al.*, 2015). Πέρα από τα δεδομένα που σχετικά με την οξεία ψύχωση που κάποιες φορές προκαλείται από την χορήγηση κανναβινοειδών που δρουν αγωνιστικά στους υποδοχείς κανναβινοειδών τύπου 1 (cannabinoid receptor 1, CB1), έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια ανάπτυξης πειραματικού προτύπου ψυχωτικής συμπτωματολογίας σε ενήλικους επίμους που έχουν υποστεί έκθεση σε κανναβινοειδή κατά την ανάπτυξη, κυρίως την εφηβεία. Υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν ένα συμπεριφορικό φαινότυπο θετικής, αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας συνοδευόμενο από μεγάλες αλλαγές στο ντοπαμινεργικό και γλουταματεργικό σύστημα (Lopez-Rodriguez *et*

al., 2014; Rubino and Parolaro, 2016; Renard *et al.*, 2017; Poulia *et al.*, 2020). Όταν οι δόσεις των κανναβινοειδών ωστόσο είναι χαμηλές προκειμένου να προσομοιάζουν επιδημιολογικά δεδομένα που συνδέουν τη χρήση κάνναβης κατά την εφηβεία με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ψυχοπαθολογίας στην ενηλικίωση, καταλήγουν σε έναν πιο ήπιο βιο-φαινότυπο που θα μπορούσε να συσχετισθεί με μια προνοσηρότητα σε σχέση με την εμφάνιση της νόσου (Poulia *et al.*, 2020; Poulia *et al.*, 2021).

Άλλες νέες προσεγγίσεις

Στο παρελθόν η πρόκληση βλαβών σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές αποτελούσε μια κλασική μέθοδος επέμβασης στο ΚΝΣ για τη μελέτη του νευροβιολογικού υποστρώματος της νόσου (Jones *et al.*, 2011; Winship *et al.*, 2019; Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Καινοτόμες πειραματικές προσεγγίσεις αξιοποιούν την πρόοδο στη γενετική μηχανική προκειμένου να κατανοήσουν τις αλλαγές σε επίπεδο νευρωνικών κυκλωμάτων που χαρακτηρίζουν τη σχιζοφρένεια. Οι προσεγγίσεις αυτές έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στην μοντελοποίηση της νόσου Parkinson (Gittis and Yttri, 2018; Srix *et al.*, 2021) ενώ προσπαθούν να εφαρμοστούν και σε διαταραχές με πιο πολύπλοκη υποκείμενη νευροβιολογία, ή τουλάχιστον λιγότερο κατανοητή προς το παρόν, όπως η σχιζοφρένεια (Tourinho *et al.*, 2013; Lüscher *et al.*, 2015; Lüscher and Pollak, 2016). Η ερευνητική ομάδα του Prof. Dennis Kaetzel έχει προτείνει ένα πρωτόκολλο ηλεκτρικής διέγερσης του κοιλιακού υποθέματος του ιπποκάμπου μέσω οπτογενετικής, το οποίο αποτελεί κλασικό ενδοφαινότυπο της υπερλειτουργίας του vSUB που συνεπάγεται και την αυξημένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα της VTA στη σχιζοφρένεια, όπως εκτενώς αναλύθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, επάγοντας θετική και γνωστική συμπτωματολογία (Wolff *et al.*, 2018). Αντίστοιχα έχουν γίνει προσπάθειες μέσω χημειο-γενετικής να αναστραφεί ο βιο-φαινότυπος που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη υπο-αναισθητική κεταμίνη σε μυς. Συγκεκριμένα, οι Kokkinou *et al.*, (2020) όπως προαναφέρθηκε, ελέγχοντας είτε PV+ κύτταρα στον mPFC ή στο vSUB, είτε ελέγχοντας απευθείας τα ντοπαμινεργικά κύτταρα της VTA, εκφράζοντας εκλεκτικά σε αυτά έναν συνθετικό ανασταλτικό μεταβοτροπικό υποδοχέα, τον οποίον ήλεγχαν μέσω ειδικού αγωνιστή, κατάφεραν να αναστρέψουν το συμπεριφορικό και νευροχημικό ως προς τη ντοπαμίνη βιο-φαινότυπο της επαναλαμβανόμενης χορήγησης υπο-αναισθητικής δόσης κεταμίνης.

Η ερευνητική κοινότητα βρίσκεται μακριά από το να καθορίσει με σαφήνεια το λειτουργικό νευροανατομικό υπόστρωμα τη σχιζοφρένειας ή να προσφέρει θεραπευτικές λύσεις. Οι νέες μεθοδολογίες που προσφέρει η γενετική μηχανική είναι σε θέση να προσφέρουν, όπως επιχειρείται σε άλλες νόσους του ΚΝΣ, νέα δεδομένα τα οποία επιταχύνουν την κατανόηση και δημιουργούν νέες δυναμικές πειραματικές προσεγγίσεις που συνεισφέρουν τελικά στη μεταφραστική έρευνα.

1.4. Ενδοκανναβινοειδές σύστημα – Κανναβινοειδή

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (ECS) είναι ένα εκτεταμένο νευρορρυθμιστικό σύστημα, με θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη του ΚΝΣ (Harkany *et al.*, 2007, 2008), ενώ και στο ώριμο ΚΝΣ ρυθμίζει τη συναπτική λειτουργία και τη λειτουργία των νευρωνικών δικτύων. Αποτελείται από τους ενδογενείς προσδέτες του -ή αλλιώς ενδοκανναβινοειδή- όπως η N-αραχιδονοϋλαιθανολαμίνη (AEA), γνωστή και ως ανανδαμίδα και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG), τις πρωτεΐνες μεταφορείς, τους υποδοχείς των κανναβινοειδών (CB1 και CB2), και τα ένζυμα που ελέγχουν τη βιοσύνθεση και την αποικοδόμηση των προσδετών, ρυθμίζοντας έτσι τα επίπεδά τους (Lutz, 2007; Lu and MacKie, 2016; Lu and Mackie, 2020).

Το ECS συμμετέχει σε πλήθος φυσιολογικών διεργασιών όπως στη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας, στο μεταβολισμό λιπιδίων και γλυκόζης, στην ανταμοιβή, στη ρύθμιση της κίνησης, σε γνωστικού τύπου διαδικασίες, όπως η μνήμη και η μάθηση, στην αντίληψη του πόνου, στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού μηχανισμού και στην αναπαραγωγή. Επιπλέον, η εκτεταμένη παρουσία του στα διάφορα όργανα και ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο του στη ρύθμιση και ομοιοστασία διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών (Piomelli, 2003; De Petrocellis *et al.*, 2004; Pagotto *et al.*, 2006; Lu and Mackie, 2020)ρ.

Μια ιδιαιτερότητα του ECS και της νευροδιαβίβασης μέσω CB1 υποδοχέων που αξίζει να αναφερθεί αποτελεί το γεγονός ότι το σήμα μεταφέρεται παλίνδρομα από το μετασυναπτικό προς το προσυναπτικό κύτταρο (Alger, 2002), ενώ τα ενδογενή κανναβινοειδή συντίθενται και απελευθερώνονται κατά παραγγελία (on demand) μετά από εκπόλωση ή διέγερση των μετασυναπτικών υποδοχέων και της επακόλουθης εισόδου ιόντων ασβεστίου (Marsicano *et al.*, 2003; Piomelli, 2003).

Οι CB2 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως περιφερικά και σε ιστούς που αποτελούν μέρος του ανοσοποιητικού, όπως η μικρογλοία. Παρατηρείται και εντοπισμός τους σε νευρώνες, αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, έχουν ωστόσο επιβεβαιωμένο ρόλο σε κεντρικές διεργασίες (Delis *et al.*, 2017).

Οι CB1 υποδοχείς του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος αποτελούν τους πιο πολυπληθείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες υποδοχείς στον εγκέφαλο (Marsicano and Lutz, 1999). Ανήκουν στη υπεροικογένεια των πρωτεϊνών με επτά διαμεμβρανικές περιοχές, οι οποίες δεσμεύονται με G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors: GPCRs) του τύπου Gi/o, που συνεπάγεται ότι ο η διέγερσή τους έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα (Elphick και Egertova 2001). Εντοπίζονται προσυναπτικά στις απολήξεις κυρίως κεντρικών αλλά και περιφερικών νευρώνων, όπου ελέγχουν την αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή μέσω της διαμεσολάβησης της αναστολής της αδενυλικής κυκλάσης (Howlett AC *et al.* 2002). Εμφανίζουν πολύ έντονη έκφραση στις προσυναπτικές απολήξεις των ανασταλτικών ενδονευρώνων που εκφράζουν το πεπτιδίο χολεκυστοκινίνη (cholecystokinin, CCK -CCK+ ενδονευρώνες), ενώ εντοπίζονται και σε άξονες, σώματα και σπανιότερα στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. Εκτός των φλοιικών δομών και του ιπποκάμπου, οι CB1 εκφράζονται αρκετά στο ραχιαίο και κοιλιακό ραβδωτό, αλλά και σε καλαθοειδή κύτταρα (basket cells) στην παρεγκεφαλίδα (Marsicano and Lutz, 1999). Η διφασική δράση των κανναβινοειδών έχει συσχετισθεί με το πρότυπο κατανομής των CB1 υποδοχέων καθώς μικρές συγκεντρώσεις επαρκούν μόνο για να λειτουργήσουν ανασταλτικά στα προσυναπτικά άκρα των ενδονευρώνων, ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις αναστέλλουν άμεσα και τους πυραμιδικούς νευρώνες και η ανασταλτική δράση τους σε αυτούς επικρατεί έναντι της άρσης της ανασταλτικής τους δράσης μέσω ενδονευρώνων, καθώς οι πυραμιδικοί αποτελούν συντριπτικά μεγαλύτερο πληθυσμό. Έχει περιγραφεί και η δράση των CB1 στα αστροκύτταρα, η οποία παραδόξως προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{++} και έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση γλουταμικού (Navarrete and Araque, 2008).

Ένα ιδιαίτερο γνώρισμα ακόμα των CB1 υποδοχέων είναι η λειτουργική εκλεκτικότητα (functional selectivity), που αναφέρεται στο γεγονός ότι ανάλογα με τον προσδέτη, ο υποδοχέας επιστρατεύει διαφορετικά μόρια τελεστές σε επίπεδο σηματοδότησης κάτωθι του. Η ιδιότητα αυτή είναι που εξηγεί και τη διαφορετική απόκριση του υποδοχέα στην AEA ή την 2-AG, με τη δεύτερη να προσδένεται πιο ισχυρά και να ενεργοποιεί διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς. Αντίστοιχα το ίδιο συμβαίνει και με τους εξωγενείς αγωνιστές όπου ο μερικός αγωνιστής THC, επιφέρει διαφορετικά βιολογικά αποτελέσματα από τους συνθετικούς αγωνιστές των CB1 υποδοχέων, οι οποίοι έχουν πολύ υψηλότερη αποτελεσματικότητα (efficacy) και δραστηριότητα (potency). Γι αυτό και τα τελευταία χρόνια έχει συζητηθεί το κατά πόσο είναι ορθό να χορηγούνται συνθετικοί αγωνιστές κανναβινοειδών σε μελέτες που αποσκοπούν να κατανοήσουν τις επιπτώσεις της THC (Mackie, 2006; Lu and Mackie, 2020).

Ένα ακόμη ιδιαίτερο γνώρισμα των CB1 που καθορίζει την πολυπλοκότητα της λειτουργίας τους ECS είναι ο διμερισμός/πολυμερισμός του με άλλους υποδοχείς τύπου GPCR. Προεξέχουσες περιπτώσεις αποτελούν οι D2, οι NMDA, οι υποδοχείς της αδενοσίνης τύπου 2A και οι οπιοειδείς υποδοχείς τύπου δέλτα. Ο διμερισμός

υποδοχέων έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη σηματοδότηση από βήτα αρρεσίνη και τη φωσφορυλίωση της ERK1/2, ενώ ο διμερισμός με άλλες πρωτεΐνες συμμετέχει στις διαδικασίες κατιούσας ρύθμισης των υποδοχέων μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε εξωγενείς προσδέτες (Rios *et al.*, 2006; Ferré *et al.*, 2010; Bushlin *et al.*, 2012).

Τα ενδοκανναβινοειδή εμφανίζουν επίσης υψηλή συγγένεια και για τους βανιλοειδικούς υποδοχείς (transient receptor potential vanilloid receptor type 1, TRPV1), οι οποίοι εδράζονται μετασυναπτικά. Αποτελούν κανάλια ιόντων, απαντώνται πολύ συχνά σε αισθητικούς νευρώνες στην περιφέρεια και η συναπτική τους λειτουργία σχετίζεται με την αντίληψη του πόνου (Castillo *et al.*, 2012).

Ως προς τις λειτουργικές ιδιαιτερότητες των κύριων ενδογενών προσδετών/κανναβινοειδών, η AEA και η 2-AG, παρά την ομοιότητα στη δομή τους, έχουν διαφορετική ισχύ και αποτελεσματικότητα για τους υποδοχείς των κανναβινοειδών, ενώ συντίθενται και διασπώνται από διαφορετικά ένζυμα. Συγκεκριμένα η αποδόμηση της AEA πραγματοποιείται από το ένζυμο fatty acid amino hydrolase (FAAH), ενώ για τον καταβολισμό της 2-AG ευθύνονται 3 ένζυμα με προεξέχων τη λιπάση του μονοακυλογλυκερικού (monoacylglycerol lipase, MAGL). Οι συγκεκριμένες ιδιαιτερότητες των ενδοκανναβινοειδών, σε συνδυασμό με την λειτουργική εκλεκτικότητα των CB1 υποδοχέων, υποδεικνύουν ότι τα δυο μόρια έχουν διαφορετικό ρόλο στις λειτουργίες του ECS ενώ υπάρχουν οι προϋποθέσεις ώστε να διατηρεί ανεξάρτητο έλεγχο η μια έναντι της άλλης κατά την εκτέλεση βιολογικών λειτουργιών, ή σε περιπτώσεις εξωγενούς παρέμβασης στο ECS (Murataeva *et al.*, 2014; Lu and Mackie, 2020).

Η κατά γενικό κανόνα «παλίνδρομη» και «κατά παραγγελία» μεταγωγή σήματος του ECS έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε συμβάντα συναπτικής πλαστικότητας μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών. Ο πρώτος που χαρακτηρίστηκε (Vincent *et al.*, 1992; Alger 1992; Alger 2002) και προεξέχων είναι η καταστολή της αναστολής που επάγεται από υπερπόλωση (Depolarization induced suppression of inhibition, DSI). Πρόκειται για την βραχυπρόθεσμη καταστολή του ανασταλτικού σήματος που καταλήγει στο μετασυναπτικό άκρο, όταν αυτό έχει προηγουμένως λάβει ισχυρή ενεργοποίηση (repeated action potential or a step depolarization) για ένα παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Η καταστολή οφείλεται στην απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών από το μετασυναπτικό κύτταρο, τα οποία προσδέονται στους προσυναπτικούς CB1 υποδοχείς. Όταν οι τελευταίοι εδράζουν σε διεγερτικό και όχι ανασταλτικό προσυναπτικό άκρο, τότε πρόκειται αντίστοιχα για την καταστολή της διέγερσης που επάγεται από υπερπόλωση (Depolarization induced suppression of excitation, DSE). Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι ανασταλτικές συνάψεις είναι αυτές που είναι πιο επιδεκτικές στη μορφή αυτή πλαστικότητας, ενώ η ενεργοποίηση των CB1 προσυναπτικά δεν καταστέλει μόνο την απελευθέρωση του κύριου νευροδιαβιβαστή αλλά και των πεπτιδίων που συνδιαβιβάζονται, όπως τη CCK. Τα συμβάντα αυτά συναπτικής πλαστικότητας λαμβάνουν χώρα σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου καταδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο που έχει το ECS στη νευρωνική πλαστικότητα (Alger, 2002; Marsicano *et al.*, 2003; Lu and Mackie, 2020).

Το ECS μπορεί να επάγει μακροχρόνια συναπτική καταστολή (Long-term depression, LTD), μια κλασική μορφή αποδυνάμωσης της συναπτικής ισχύος, η οποία μπορεί να προκληθεί με διάφορους μηχανισμούς. Ενδέχεται να προκαλείται συνεχή διέγερση μιας σύναψης σε κάποια σταθερά χαμηλή συχνότητα και τα ενδοκανναβινοειδή μπορεί να την μεσολαβήσουν είτε στην ίδια τη σύναψη που υφίσταται διέγερση (ομοσυναπτικό LTD) είτε σε γειτονική (ετεροσυναπτικό LTD). Οι ανωτέρω δεν είναι οι μόνοι μηχανισμοί με τους οποίους το ECS μπορεί να προκαλέσει συμβάντα συναπτικής πλαστικότητας (Lu and Mackie, 2016).

Κανναβινοειδή και έλεγχος ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου:

Ανωτέρω αναφέρθηκε ότι η ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου αντανάκλα την ισορροπία διέγερσης και αναστολής (E/I), δηλαδή τη λειτουργία των πυραμιδικών νευρώνων και των ανασταλτικών ενδονευρώνων.

Οι CB1 υποδοχείς εδράζουν κυρίως όπως αναφέρθηκε στους 2 αυτούς τύπους κυττάρων, ενώ η ενεργοποίησή τους από εξωγενώς χορηγούμενα κανναβινοειδή επάγει συμπτώματα ψυχωτικού τύπου. Στη σχιζοφρένεια δε, ένα από τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά αποτελεί η διαταραχή της ισορροπίας E/I και ιδιαίτερα της ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου στις γάμμα συχνότητες οι οποίες δημιουργούνται από τη ρυθμική αναστολή των πυραμιδικών νευρώνων από τους PV+ ενδονευρώνες. Οι δεύτεροι ασκούν ακριβή έλεγχο μέσω του πυκνού πλέγματος των προβολών τους οι οποίες περιβάλλουν τα πυραμιδικά σώματα (perisomatic innervation/perisomatic inhibition). Η νευροανατομία του ECS υποδεικνύει ότι εμπλέκεται κομβικά στις ανωτέρω διεργασίες μέσω της πολύ πυκνής έκφρασής του στους CCK+ ενδονευρώνες (Marsicano and Lutz, 1999) που είναι ο 2^{ος} τύπος κυττάρων που ασκεί περισματικό έλεγχο στα πυραμιδικά (Freund and Katona, 2007), ενώ έχει επίσης δειχθεί ότι επηρεάζει άμεσα και τη λειτουργία των PV+ ενδονευρώνων (Dudok *et al.*, 2021).

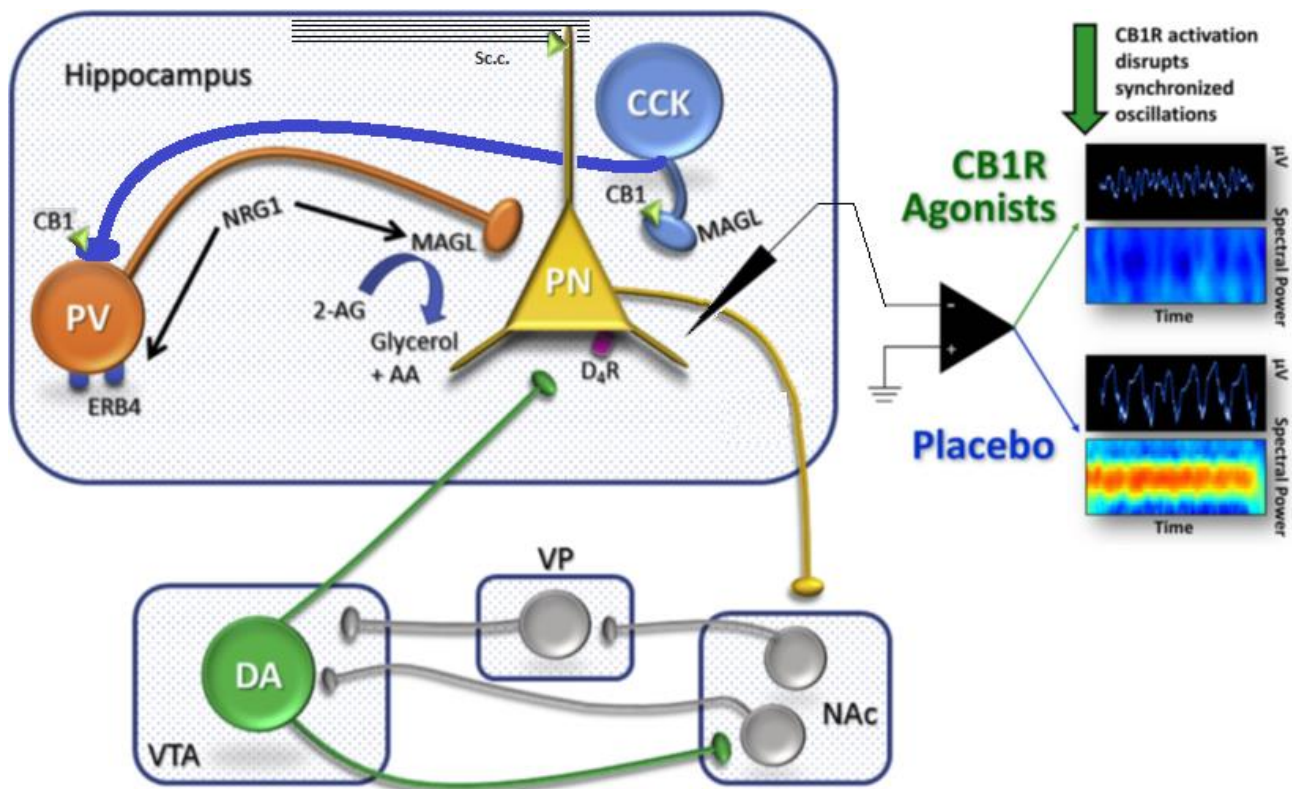
Πράγματι, η οξεία ή χρόνια έκθεση ανθρώπων σε THC επηρεάζει κυρίως τη ρυθμική δραστηριότητα στις θήτα και γάμμα συχνότητες (Skosnik *et al.*, 2016). Προκλινικές μελέτες υποστηρίζουν ότι ο αγωνισμός των CB1 υποδοχέων κατά τη διάρκεια μιας δοκιμασίας του αισθητικοκινητικού ηθμού διαταράσσει τη ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου, ενώ ο ανταγωνισμός των CB1 αναστρέφει αυτό το φαινόμενο (Hajós *et al.*, 2008). Έχει βρεθεί επιπροσθέτως ότι η διέγερση των CB1 διαταράσσει το συγχρονισμό των πυραμιδικών νευρώνων στον υπόκαμπο (Robbe *et al.*, 2006; Robbe and Buzsáki, 2009) και μειώνει το εύρος των θήτα και γάμμα ρυθμών (Hajós *et al.*, 2008; Goonawardena *et al.*, 2011; Kucewicz *et al.*, 2011). Πειραματικές μελέτες των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων της έκθεσης σε κανναβινοειδή (THC ή WIN55-212,2) κατά την ανάπτυξη αμβλύνουν την επιδεκτικότητα του ώριμου εγκεφάλου να υποστεί φαρμακολογικά-επαγόμενες μεταβολές της ρυθμικής δραστηριότητας. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζονται και από *in vitro* μελέτες, ενώ μια ενδιαφέρουσα μελέτη σε μύς συνδέει τη μη-ομαλή επικοινωνία προμετωπιαίου φλοιού και ραχιαίου υποκάμπου με τη διαταραγμένη ανάπτυξη της GABAεργικής λειτουργίας στον PFC (Cass *et al.*, 2014). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το χρόνιο σχήμα χορήγησης του WIN55-212,2 επιτυγχάνει μακροπρόθεσμες αλλαγές στη ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου μόνο όταν πραγματοποιείται κατά την ανάπτυξη (Skosnik *et al.*, 2016).

Αντίστοιχα, μελέτες σε ανθρώπους που έχουν εκτεθεί χρονίως σε κανναβινοειδή συμπληρώνουν τα αντίστοιχα προκλινικά ευρήματα περί διαταραχής της ρυθμικής δραστηριότητας. Οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούν την αδυναμία επιστράτευσης ρυθμικής δραστηριότητας σε συχνότητες εντός του φάσματος των χαμηλών γάμμα ρυθμών, προκειμένου να επιτελεστεί μια αισθητικοκινητική ή γνωστική λειτουργία (Skosnik *et al.*, 2016), ενώ μελέτες με οξεία χορήγηση THC υποδεικνύουν ότι η οξεία χορήγηση THC διαταράσσει τους θήτα ρυθμούς και το εύρημα αυτό συνδέεται με τη βραχυπρόθεσμη/ενεργό μνήμη (Skosnik *et al.*, 2015).

Είναι πολλά τα πειραματικά δεδομένα και οι κλινικές παρατηρήσεις που υποστηρίζουν ότι το ECS επηρεάζει τη ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου και η δυσλειτουργία του συνδέεται με τη σχιζοφρένεια. Οι υπάρχουσες γνώσεις σχετικά με τη φυσιολογία του ECS συστήματος συγκλίνουν καθώς φαίνεται ότι οι υποδοχείς του συστήματος εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή έκφραση σε πολύ κομβικά σημεία για τη ρύθμιση της ισορροπίας διέγερσης/αναστολής και κατ' επέκταση της ρυθμικής δραστηριότητας. Όπως συζητήθηκε ο πυκνός εντοπισμός των υποδοχέων στα CCK+ που ασκούν στενό έλεγχο στη πυραμιδική λειτουργία αλλά και τη λειτουργία των PV+, αλλά και ο εντοπισμός τους στα πυραμιδικά αποτελούν τις κύριες ενδείξεις για το ρόλο του συγκεκριμένου συστήματος στη ρυθμική δραστηριότητα.

Συγκεκριμένα οι CCK+ ενδονευρώνες φαίνεται να ελέγχουν το κατώφλι ενεργοποίησης των πυραμιδικών, ενώ επίσης έχουν προεξέχουσες απολήξεις στα PV+ κύτταρα, τα οποία ελέγχουν είτε μέσω ανασταλτικής νευροδιαβίβασης, είτε μέσω της απελευθέρωσης CCK (Karson *et al.*, 2009). Επισημαίνεται ότι τα PV+ διαθέτουν CCK_B υποδοχείς των οποίων η ενεργοποίηση σχετίζεται με την εμφάνιση παθολογιών όπως οι αγχώδεις διαταραχές (Ballaz and Bourgin, 2021). Η σύνθεση 2-AG μπορεί να προκαλέσει την έντονη περισματική αναστολή των PV+ στα πυραμιδικά, μέσω της επαγωγής DSI στις CCK+ απολήξεις σε PV και πυραμιδικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι οι CCK+ ενδονευρώνες πυροδοτούν δυναμικά ενέργειας

κατά τη γένεση των θήτα (Csicsvari *et al.*, 2003) και γάμμα (Klausberger *et al.*, 2005) ρυθμών, ενώ σε ύστερη φάση της ρυθμικής δραστηριότητας εκφορτίζονται κυρίως τα PV+. Η συνθεση της 2-AG και η αποικοδόμηση της είναι ένα σύντομο παρωδικό φαινόμενο, ενώ η παρουσία εξωγενών κανναβινοειδών δεν εμφανίζει τέτοια χρονική ακρίβεια/παροδικότητα. Αυτό θα μπορούσε να εξηγεί τα παραπάνω ευρήματα σχετικά με τη διαταραχή της ρυθμικής λειτουργίας από εξωγενή κανναβινοειδή στον υπόκαμπο, καθώς εκείνα δε λειτουργούν με τη χρονική ακρίβεια των ενδοκανναβινοειδων και διαταράσσουν έτσι τις διαδικασίες ρυθμικής δραστηριότητας με αποτέλεσμα την εμφάνιση αισθητηριακών, γνωστικών αλλά και λοιπών σχετικών με τη σχιζοφρένεια ελλειμμάτων.



Εικόνα 1.11: Μια μινιμαλιστική γραφική απεικόνιση του μικροδικτύου που καθορίζει τη ρυθμική δραστηριότητα των πυραμιδικών κυττάρων στον ιππόκαμπο με εμφανή τα σημεία στα οποία συμμετέχει το ενδοκανναβινοειδές σύστημα. Στο σχήμα φαίνεται συγκεκριμένα η ρυθμιστική επίδραση των CCK+ ενδονευρώνων στα πυραμιδικά κύτταρα αλλά και στα CCK+. Επίσης είναι διακριτό ότι τα PV+ οποία εκφράζουν έντονα την NRG1 η οποία είναι στενά συσχετισμένη με το νευροβιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας και η λειτουργία της σχετίζεται με τη σύνθεση ενδοκανναβινοειδών στα προσυναπτικά άκρα των PV+ που ασκούν περιωματική αναστολή στα πυραμιδικά κύτταρα και γειτνιάζουν με CCK+ απολήξεις. Ακολούθως φαίνεται ότι η αγωνιστική δράση στους CB1 λειτουργεί απορρυθμιστικά για το δίκτυο, του οποίου η μη-ομαλή λειτουργία μπορεί να επηρεάσει το NAc και τη VTA, δείχνοντας ένα σημείο στο οποίο αλληλοσυμπληρώνονται οι διαφορετικές υποθέσεις για το νευροβιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας, όπως αυτές συζητήθηκαν παραπάνω.

Προσαρμοσμένο από (Skosnik et al., 2016; Lupica et al., 2017)

Κανναβιδιόλη

Το δεύτερο κυριότερο συστατικό της κάνναβης, η κανναβιδιόλη (CBD) δεν παρουσιάζει εθιστικές ιδιότητες ούτε ψυχομμητική δράση. Η δομή του μορίου χαρακτηρίστηκε από την ερευνητική ομάδα του Mechoulam το 1963, ενώ το μόριο είχε ήδη υποστεί απομόνωση από τη δεκαετία του 1930 (Mechoulam *et al.*, 2002). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της CBD αποτελεί το γεγονός ότι έχει μια πληθώρα φαρμακολογικών στόχων στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με αποτέλεσμα να έχει διερευνηθεί η θεραπευτική της δυναμική για πολλές διαφορετικές νευροψυχιατρικές διαταραχές. Συνοπτικά η κανναβιδιόλη έχει μελετηθεί σαν μόριο για την αντιμετώπιση της επιληψίας (ήδη εγκεκριμένο σκεύασμα: Epidyolex®), της Alzheimer's disease, της νόσου του Πάρκινσον, της χορείας του Huntington, του άγχους και της κατάθλιψης, της σχιζοφρένειας, του εθισμού και νευροαναπτυξιακών διαταραχών συμπεριλαμβανομένου του φάσματος του αυτισμού (Elsaid *et al.*, 2019).

Στοιχεία φαρμακοδυναμικής

Η κανναβιδιόλη, φυτοκανναβινοειδές άλλωστε, ασκεί φαρμακολογική δράση στο ενδοκανναβινοειδές σύστημα, χωρίς ωστόσο να περιορίζεται εκεί. Το μεγάλο ρεπερτόριο φαρμακολογικών στόχων της κανναβιδιόλης, σε συνδυασμό με τη δράση της στο ECS το οποίο εν γένει αποτελεί ένα ομοιοστατικό/ρυθμιστικό νευροδιαβιβαστικό σύστημα που μεσολαβεί πολλές φυσιολογικές λειτουργίες και ρυθμίζει την ανάπτυξη και ομαλή λειτουργία άλλων συστημάτων νευροδιαβίβασης.

Το πλήθος των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της CBD και η ελλιπής προς το παρόν κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών καθιστούν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τη μελέτη των φαρμακοδυναμικών της ιδιοτήτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το συγκεκριμένο φυτοκανναβινοειδές έχει πολύ χαμηλή συγγένεια για τους υποδοχείς CB1 και CB2 των κανναβινοειδών, (K_i :4359 nM και 2860 nM αντιστοίχως, υπολογισμένες σε εγκεφαλικό ιστό και μεμβράνες από σπλήνα επίμου) (R.G., 2008). Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίφαση με την πληθώρα πειραματικών και κλινικών παρατηρήσεων που θέλουν τη CBD να ανταγωνίζεται τις δράσεις της THC, οι οποίες μεσολαβούνται από τη δράση της ως μερικός αγωνιστής των υποδοχέων CB1. Ωστόσο, το 2015 οι (Laprairie *et al.*) έδειξαν ότι η άμεση φαρμακολογική δράση που ασκεί η κανναβιδιόλη στους CB1 είναι αυτή του αρνητικού αλλοστερικού τροποποιητή (negative allosteric modulator, NAM). Η δράση αυτή από μόνη της συμπνέει με τις παρατηρήσεις σχετικά με τις φαρμακολογικές επιδράσεις της CBD στις δράσεις της THC. Η άλλη μελέτη ωστόσο, αυτή των (De Petrocellis *et al.*, 2011) υποστηρίζει ότι η CBD αναστέλλει τη δράση του ενζύμου fatty acid amide hydroxylase (FAAH), εμποδίζοντας τον καταβολισμό της ανανδαμίδης (ενδοκανναβινοειδές). Παράλληλα εμποδίζοντας και την επαναπρόσληψη του ίδιου ενδοκανναβινοειδούς, έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκανναβινοειδούς τόνου. Τα τελευταία ευρήματα είναι σε συμφωνία και με τους (Leweke *et al.*, 2016) όπου αναφέρουν αυξημένα επίπεδα ανανδαμίδης στον ορό ασθενών με σχιζοφρένεια μετά από χορήγηση CBD, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα ανανδαμίδης συσχετίστηκαν με βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών.

Η κανναβιδιόλη επίσης εμφανίζει ιδιότητες αγωνιστή για τους υποδοχείς βανιλοειδικών τύπου 1 και 2 (TRPV1,2) (Bisogno *et al.*, 2001; Campos and Guimaraes, 2009), και κάποιοι ερευνητές αποδίδουν σε αυτή την ιδιότητα την αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση του μορίου (Elsaid *et al.*, 2019). Είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι οι ιονοτροπικοί αυτοί υποδοχείς έχουν στενή σχέση με το ECS, καθώς η ανανδαμίδη είναι ισχυρός διεγέρτης τους. Μια ακόμα οικογένεια υποδοχέων που σχετίζονται με το ECS είναι οι ορφανοί υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες, καθώς υπάρχουν μελέτες που τους χαρακτηρίζουν ως υποδοχείς κανναβινοειδών (Overton *et al.*, 2006; Sharir and Abood, 2010), εστιάζοντας κυρίως στο GPR55 υποδοχέα, του οποίου η CBD αποτελεί ανταγωνιστής, σε αντίθεση με την THC και τα ενδοκανναβινοειδή (Ryberg *et al.*, 2007).

Η δράση της CBD δεν περιορίζεται στο ECS και στα «δορυφορικά» του συστήματα. Σειρές μελετών στη βιβλιογραφία υποστηρίζουν την δράση της CBD ως αγωνιστής στους υποδοχείς τύπου 1A της σεροτονίνης (5HT_{1A}), οι οποίοι είναι συζευγμένοι με Gi/o πρωτεΐνες (Russo *et al.*, 2005; Katsidoni *et al.*, 2013; Norris *et al.*, 2016; Renard *et al.*, 2017). Η αγωνιστική δράση στους 5HT_{1A} έχει συσχετισθεί στενά με τις αγχολυτικές, αντικαταθλιπτικές, και αντιψυχωτικές ιδιότητες της CBD, καθιστώντας τον υποδοχέα έναν από τους κύριους μεσολαβητές των φαρμακολογικών δράσεων του μορίου.

Συνεχίζοντας και σε άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα, σίγουρα θα πρέπει να αναφέρουμε και μια κλασική μελέτη κινητικής σε παρασκευάσμα φλοιού από επίμου, η οποία έχει δείξει τη δράση της CBD ως αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής των υποδοχέων των οπιοειδών τύπου μ και δ , οι οποίοι είναι συζευγμένοι με Gi/o πρωτεΐνες (Kathmann *et al.*, 2006). Από τη μελέτη αυτή είχε ως αποτέλεσμα η CBD να μελετηθεί ως θεραπευτικός παράγων για τον εθισμό στα οπιοειδή (Elsaid *et al.*, 2019). Μια ακόμα σημαντική κεντρική δράση της CBD είναι αυτή του μερικού αγωνιστή των D₂^{HIGH} υποδοχέων της ντοπαμίνης. Ειδικότερα, ο (Seeman) το 2016 έδειξε ότι η CBD παρουσιάζει ένα διφασικό μοτίβο εκτοπισμού της [3H]domperidone, αντίστοιχο με εκείνο της αριπιπραζόλης (άτυπο αντιψυχωσικό), δίνοντας έναν ακόμη πιθανό μηχανισμό (μερικός αγωνιστής) για την κατανόηση των αντιψυχωσικών ιδιοτήτων του μορίου.

Ένα ποσοστό της τάξης του 20% των φαρμακολογικών στόχων της κανναβιδιόλης αποτελούν μόρια μεταφορείς (Ibeas Bih *et al.*, 2015). Εκτός του μεταφορέα της ανανδαμίδης που αναφέρθηκε παραπάνω, στη λίστα συγκαταλέγονται και άλλοι οι οποίοι έχουν σίγουρα αντίκτυπο στις κεντρικές δράσεις του μορίου. Συνοπτικά, έχει δειχθεί πειραματικά η δράση της CBD ως αναστολέας του μεταφορέα επαναπρόσληψης της νοραδρεναλίνης, της ντοπαμίνης, της σεροτονίνης και του GABA (Zhornitsky and Potvin, 2012), ωστόσο το γεγονός ότι η δράση της αυτή δεν είναι σημαντική όταν εφαρμόζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις *in vitro*, δημιουργεί αμφιβολίες για τη συνεισφορά αυτών των ιδιοτήτων στις κεντρικές φαρμακολογικές δράσεις της κανναβιδιόλης (Ibeas Bih *et al.*, 2015).

Προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών

Η κανναβιδιόλη φαίνεται ότι παρουσιάζει ένα ασφαλές προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών. Έχουν αναφερθεί αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως: εμβρυοτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα, αναπαραγωγική δυσλειτουργία, αύξηση βάρους, υπόταση, διάρροια, κούραση, αυπνία και γαστρεντερικές διαταραχές. Στις περισσότερες περιπτώσεις χαρακτηρίζεται ασφαλής η χρήση CBD και συνήθως είναι σημαντικά πιο ασφαλής έναντι άλλων ουσιών με τις αντίστοιχες φαρμακολογικές ιδιότητες. Γι αυτό το λόγο η κανναβιδιόλη πιθανώς αποτελεί μια ουσία που μπορεί να χρησιμοποιείται αποτελεσματικά ως κύρια ή συνοδός θεραπεία, προκειμένου να οδηγήσει στο επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα ή να συμβάλλει σε υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές μειορυθμίζοντας την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών (Machado Bergamaschi *et al.*, 2011; Iffland and Grotenhermen, 2017; Huestis *et al.*, 2019).

Κανναβιδιόλη και προκλινικά πρότυπα ψύχωσης/σχιζοφρένειας:

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η THC, το κύριο ψυχοδραστικό της κάνναβης, μπορεί να επιφέρει συμπτωματολογία ψυχωτικού τύπου και γνωστικά ελλείμματα σε ανθρώπους και πειραματόζωα. Η παρουσία της CBD προφυλάσσει από την εμφάνιση αυτών των συμπτωμάτων (Bhattacharyya *et al.*, 2009, Hudson *et al.*, 2019), μειώνοντας παράλληλα και την ευφοριογόνο δράση της THC. Έχει μάλιστα δειχθεί ότι η πιθανότητα ανάπτυξης ψυχωσικής συμπτωματολογίας από τη χρήση κάνναβης είναι αρνητικά συσχετισμένη με το

περιεχόμενο σε CBD (Englund 2017). Αυτές οι παρατηρήσεις σχετικά με τη δράση της CBD πυροδότησαν τη διερεύνηση της αντιψυχωσικής της δράσης.

Από πλευράς προκλινικής διερεύνησης σε πειραματικά πρότυπα οξείας χορήγησης ντοπαμινεργικών αγωνιστών ή μη συναγωνιστικών αναστολέων των NMDA υποδοχέων, εμφανίζονται ασυνεπή δεδομένα. Συγκεκριμένα υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η χορήγηση CBD μπορεί να αμβλύνει την υπερκινητικότητα έπειτα από χορήγηση οξείας αμφεταμίνης (Moreira and Guimaraes 2005; Renard 2016; Pedrazzi 2015) ή από κεταμίνη και MK-801 (Moreira and Guimaraes 2005; Gururajan 2014; Gomes 2014). Πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η κανναβιδιόλη δεν έχει επίδραση στους ίδιους δείκτες (Valvassori, Long 2012, Brakatselos 2020).

Σε περιπτώσεις απορρύθμισης της εμφάνισης κοινωνικής συμπεριφοράς (προσέγγιση αρνητικής συμπτωματολογίας) λόγω οξείας χορήγησης MK-801, η CBD έχει φανεί να λειτουργεί ευεργετικά όταν χορηγηθεί σε χαμηλή δόση σε επίμυες (Gururajan *et al.*, 2011, 2012). Ωστόσο, μια πιο πρόσφατη μελέτη δεν κατάφερε να αναπαραγάγει αυτό το αποτέλεσμα (σε επίμυς διαφορετικού γένους), παρόλο που εξέτασε δοσολογικά σχήματα χαμηλών και μεσαίων δόσεων της CBD (Deiana *et al.*, 2015).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι υψηλή δόση συγχορήγησης CBD με THC σε επίμυς, αναστέλλουν τη γνωστική δυσλειτουργία λόγω THC ωστόσο χαμηλότερες δόσεις της CBD δεν επιτυγχάνουν το ίδιο αποτέλεσμα που προκαλεί η χορήγηση χαμηλής δόσης MK-801 (Fadda *et al.*, 2006).

Ωστόσο, όταν οι αντιψυχωσικές ιδιότητες της CBD αξιολογούνται σε προκλινικούς βιο-φαινοτύπους που προσομοιάζουν τη σχιζοφρένεια, τα αποτελέσματα είναι πιο συνεπή. Το εν λόγω φυτοκανναβινοειδές ανταγωνίζεται την επίδραση της χρόνιας αμφεταμίνης σε υπερκινητικότητα και στερεοτυπία σε επίμυς (Renard *et al.*, 2016). βελτιώνει την αρνητική επίδραση του MK-801 κατά τη δοκιμασία PPI (Gomes *et al.*, 2014; Gomes, Issy, *et al.*, 2015). Οι Kozela *et al.*, 2020 εξέτασαν τη δράση της CBD σε πειραματικό πρότυπο επαναλαμβανόμενων χορηγήσεων κεταμίνης, δείχνοντας ότι η χορήγηση CBD οξέως και χρονίως μπορεί να αναστρέψει τα γνωστικά ελλείματα που χαρακτηρίζουν το συγκεκριμένο προκλινικό πρότυπο σχιζοφρένειας, χρησιμοποιώντας δείκτες αναγνωριστικής μνήμης. Η χρόνια χορήγηση CBD επίσης επαναφέρει τη διαταραγμένη απόδοση PPI λόγω χρόνιας χορήγησης MK-801, στις φυσιολογικές τιμές, ενώ ο συγκεκριμένος ενδοφαινότυπος συνοδεύεται από μείωση στην έκφραση του GNR1 mRNA στον ιππόκαμπο και μείωση των PV+ κυττάρων στον mPFC, αλλαγές οι οποίες δεν παρατηρούνται μετά από χρόνια συγχορήγηση CBD στους μυς του C57BL/6J γένους (Gomes *et al.*, 2014). Σε μια ακόμη μελέτη η χορήγηση CBD αναστρέφει το έλλειμα που προκαλεί η χρόνια χορήγηση MK-801 σε μυς στην δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (Novel Object Recognition) ενώ η υψηλή δόση CBD ασκεί θετική επίδραση στις υπο μελέτη παραμέτρους έπειτα από τη χρόνια χορήγηση MK-801 (Gomes, Issy, *et al.*, 2015; Gomes, Llorente, *et al.*, 2015).

Η CBD έχει επίσης μελετηθεί και σε νευροαναπτυξιακά πειραματικά πρότυπα σχιζοφρένειας, προσφέροντας ενθαρρυντικά δεδομένα ως προς την αντιμετώπιση της συμπτωματολογίας που προσομοιάζει τη σχιζοφρένεια. Συγκεκριμένα, οι λίγες διαθέσιμες μελέτες σε πειραματόζωα που έχουν δεχθεί προγεννητική χορήγηση δείχνουν ότι η CBD λειτουργεί ευεργετικά στους διαταραγμένους δείκτες θετικής αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας, ενώ συγκεκριμένη εργασία συνδέει τις επιδράσεις αυτές της CBD με ανταγωνισμό των CB1 υποδοχέων (Stark *et al.*, 2019, 2020). Επιπρόσθετα, συγκεκριμένες ερευνητικές ομάδες κύκλοι έχουν δημοσιεύσει ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες εργασίες σχετικά με την ευεργετική δράση της CBD σε όλο το εύρος δεικτών που αντανakλούν τη συμπτωματολογία της σχιζοφρένειας, όταν αυτή προσεγγίζεται κατόπιν έκθεσης κυοφορουσών μητέρων σε PolyI:C (Osborne *et al.*, 2017, 2019, 2019; Jimenez Naranjo *et al.*, 2019). Ακόμα, μια μελέτη έχει πραγματοποιηθεί σε μυς που στερούνται το διαμεμβρανικό τμήμα της NRG1 [transmembrane domain neuregulin 1 mutant, όπου η CBD αναχαιτίζει τις μεταβολές στην κινητικότητα, τη μειωμένη αναστολή προπαλμικού αιφνιδιασμού (PPI) και τους δείκτες αγχώδους συμπεριφοράς (Long *et al.*, 2012).

Συνοψίζοντας, οι πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η CBD έχει τη δυνατότητα να αντιμετωπίζει τουλάχιστον κάποιες πτυχές της θετικής, αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας αν και οι δημοσιευμένες προκλινικές μελέτες είναι περιορισμένες και ελλιπείς ιδιαίτερα κατά την προσέγγιση της αρνητικής συμπτωματολογίας και των γνωστικών ελλειμμάτων. Εν κατακλείδι η CBD έχει μελετηθεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, παρέχοντας ασυνεπή μεν, αλλά κατά κύριο λόγο ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Τα συγκεκριμένα πειραματικά μοντέλα βασίζονται σε διαφορετικές προσεγγίσεις θεωρητικής λογικής ως προς τους υποκείμενους μηχανισμούς της νόσου, διαμορφώνονται άλλοτε σε μυς και άλλοτε σε επίμυς και μελετούν κυρίως συμπεριφορικούς δείκτες ενώ σπανιότερα δίνουν έμφαση στις υποκείμενες νευροβιολογικές μεταβολές. Ως τώρα οι αντιψυχωσικές ιδιότητες της CBD όπως έχει ήδη προαναφερθεί έχουν συνδεθεί με δράση σε διαφορετικά συστήματα: Μελέτες υποστηρίζουν ότι η δράση της στους 5-HT_{1A} σχετίζεται με τις αντιψυχωσικές ιδιότητες, σε αντίθεση με πιο πρόσφατες μελέτες που υποδεικνύουν CB₁ ανταγωνισμό, ενώ άλλες μελέτες συνδέουν τη δράση της με τη λειτουργία της γλοίας (Kozela 2020, Gomes 2015b).

Προκειμένου να διευθετηθεί η έλλειψη συνέπειας στα συμπεριφορικά δεδομένα, η αβεβαιότητα ως προς τους υποκείμενους μηχανισμούς και να διαπιστωθεί η σκοπιμότητα χρήσης της CBD στην κλινική πράξη, είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες σε επίπεδο βασικών προκλινικών προτύπων οξείας ψύχωσης, όπως και εγκαθιδρυμένων βιο-φαινοτύπων που προσομοιάζουν τη σχιζοφρένεια σε επίμυες, βασισμένα στα πρόσφατα στοιχεία για τους μηχανισμούς της νόσου. Δεδομένης της έλλειψης πειραματικών μοντέλων με τις απαραίτητες προδιαγραφές, είναι αναγκαίο να πραγματοποιούνται προσεγγίσεις μέσα από λεπτομερή μελέτη διαφορετικών μοντέλων που προσεγγίζουν διαφορετικές πτυχές της νόσου και των υποκείμενων μηχανισμών και τα αποτελέσματα αυτών να μελετούνται συνδυαστικά.

Κλινικές μελέτες αντιψυχωσικής δυναμικής:

Κλινικές μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι η CBD αντιμετωπίζει την θετική και αρνητική συμπτωματολογία σε ασθενείας με την ίδια αποτελεσματικότητα με την αμισουλπρίδη, παρουσιάζοντας όμως ένα πολύ πιο ήπιο προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών (Leucht 2002). Άλλη μελέτη έχει δείξει ότι η αποτελεσματικότητα της CBD στην αντιμετώπιση της θετικής συμπτωματολογίας είναι συσχετισμένη με τα επίπεδα ανανδαμίδης στον ορό των ασθενών (Leweke 2012). Επίσης, η CBD έχει δοκιμαστεί με επιτυχία ως συνοδός θεραπεία σε συνδυασμό με αντιψυχωσικά 2^{ης} γενιάς, βελτιώνοντας την απόκριση των ασθενών στην υπάρχουσα θεραπεία τους σε επίπεδο θετικής και γνωστικής συμπτωματολογίας (McGuire). Ένας σχετικά μικρός αριθμός από case studies εμφανίζει ασυνέπεια ως προς το αν η CBD αναστρέφει τη συμπτωματολογία σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Zuardi 2006, Bhattakarrya 2012). Από πλευράς μελετών σε υγιείς εθελοντές, μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα μελέτη παρουσιάζει ότι η CBD δεν αντιμετωπίζει τους επαγόμενους από την κεταμίνη δείκτες θετικής συμπτωματολογίας, ενώ μάλιστα επιδεινώνει περαιτέρω έναν δείκτη που συνδέεται με αρνητική συμπτωματολογία (Hallak *et al.*, 2011). Μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα πρόσφατη εργασία από την άλλη υποστηρίζει ότι η CBD (CBD-varing) ενισχύει τις γνωστικές λειτουργίες υγιών εθελοντών (Hotz *et al.*, 2021).

Συγκεντρωτικά και η κλινική διερεύνηση των αντιψυχωσικών ιδιοτήτων της CBD εμφανίζει κυρίως θετικά αποτελέσματα, χωρίς ωστόσο να υπάρχει απόλυτη σύγκλιση των επιμέρους μελετών, κατά τρόπο που δεν υπόκεινται σε κάποια συγκεκριμένη ερμηνεία, γεγονός που δείχνει τη μεγάλη ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της αντιψυχωσικής δυναμικής της CBD και σε αυτό το επίπεδο και σε συνδυασμό με την προκλινική έρευνα.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Προκλινικά ευρήματα και κλινικές παρατηρήσεις συσχετίζουν την κανναβιδιόλη (CBD), ένα μη ψυχομιμητικό συστατικό της κάνναβης χωρίς εξαρτησιογόνο δράση, με την αντιμετώπιση συμπτωμάτων ψυχωτικού τύπου.

Η κλινική διερεύνηση των αντιψυχωσικών ιδιοτήτων της CBD εμφανίζει θετικά αποτελέσματα, χωρίς ωστόσο να υπάρχει απόλυτη σύγκλιση των επιμέρους μελετών, γεγονός που δείχνει τη μεγάλη ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της αντιψυχωσικής δυναμικής της CBD σε συνδυασμό και με την προκλινική έρευνα. Απεναντίας, η έλλειψη συνέπειας ως προς τα συμπεριφορικά δεδομένα που προσομοιάζουν τη συμπτωματολογία των ψυχώσεων και ιδιαίτερα της σχιζοφρένειας και η αβεβαιότητα ως προς τους υποκείμενους μηχανισμούς της διαταραχής καθιστά, αναγκαία την πραγματοποίηση περισσότερων μελετών σε επίπεδο προκλινικών προτύπων οξείας ψύχωσης, όπως και εγκατεστημένων βιο-φαινοτύπων που προσομοιάζουν τη σχιζοφρένεια σε επίμυες, λαμβάνοντας υπόψη πρόσφατα δεδομένα για τους μηχανισμούς της νόσου. Δεδομένης της έλλειψης αξιόπιστων πειραματικών μοντέλων, είναι αναγκαίο να πραγματοποιούνται προσεγγίσεις με τη χρήση διαφορετικών μοντέλων που προσεγγίζουν διαφορετικές πτυχές της νόσου και των υποκείμενων μηχανισμών και τα αποτελέσματα αυτών να μελετώνται συνδυαστικά.

Σε αυτό το πλαίσιο ο κύριος σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η προκλινική διερεύνηση της επίδρασης της CBD σε συγκεκριμένους συμπεριφορικούς, νευροχημικούς, νευροβιολογικούς και ηλεκτροφυσιολογικούς δείκτες που προσομοιάζουν την εμφάνιση ψυχωσικής συμπτωματολογίας και η περαιτέρω κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών. Αναλυτικότερα οι επιμέρους στόχοι της διατριβής είναι:

- α) Η μελέτη φαρμακολογικών προτύπων ψύχωσης με την οξεία χορήγηση ψυχομιμητικών ουσιών που στοχεύουν στο ντοπαμινεργικό και το γλουταματεργικό σύστημα, όπως η d-αμφεταμίνη και η κεταμίνη.
- β) Η στόχευση σε σχήματα επαναλαμβανόμενης έκθεσης σε ψυχομιμητικά με σκοπό την προσομοίωση εγκατεστημένων βιο-φαινοτύπων που προσομοιάζουν τη σχιζοφρένεια σε επίπεδο συμπτωματολογίας και νευροβιολογικού υποστρώματος.
- γ) Ο χαρακτηρισμός της επίδρασης της CBD σε κάθε έναν από τους διαφορετικούς βιοφαινότυπους που αναπτύχθηκαν, με σκοπό την αποτύπωση των αντιψυχωσικών της ιδιοτήτων χρησιμοποιώντας πολύπαραγοντικές προσεγγίσεις, που βασίζονται σε διαφορετικά πλαίσια φαινομενολογικής ομοιότητας και θεωρητικής λογικής.

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί ενήλικες επίμυες του στελέχους Sprague-Dawley, οι οποίοι εισάγονταν στα πειραματικά πρωτόκολλα όταν έφθαναν την ηλικία των τριών μηνών. Τα πειραματόζωα αναπαράχθηκαν και διατηρήθηκαν στη μονάδα πειραματοζώων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων license №“EL33-BIObr01”). Έπειτα από τον απογαλακτισμό τους τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς κλωβούς διαστάσεων 47,5 x 20,5 x 27 cm, ανά δύο, με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 21°C ±2°C και υγρασίας και με ημερήσιο κύκλο ημέρας/νύχτας 12 ωρών (έναρξη της φωτεινής περιόδου στις 07.00 πμ.). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κατά τη φωτεινή περίοδο του κύκλου.

Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα που αφορούσαν τον χειρισμό των πειραματόζωων είναι εγκεκριμένα από τις ελεγκτικές αρχές, ενώ οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματόζωων (EEC Council 2010/63/EU; 22/09/2010) και οι πειραματικές διαδικασίες σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν η ταλαιπωρία και ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων πειραματόζωων, βάσει των κατευθυντηρίων γραμμών της FELASA (Guillen, 2012). Οι επίμυες υποβάλλονταν σε διαδικασία εξοικείωσης με τον πειραματιστή, ενώ πριν από κάθε πειραματικό χειρισμό υποβάλλονταν σε διαδικασία εξοικείωσης με το χώρο διεξαγωγής των πειραμάτων.

3.2 Φάρμακα

Κανναβιδιόλη: Η CBD (>99%) απομονώθηκε από *C. sativa* inflorescences της εγκεκριμένης στην ΕΕ ποικιλίας “Futura 75” από την ερευνητική ομάδα του κ. Λεάνδρου Σκαλτσούνη, Καθηγητή Φαρμακογνωσίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, μέσω μεθοδολογιών που έχουν ήδη περιγραφεί (Brakatselos *et al.*, 2021; Tzimas *et al.*, 2021). Το τελικό προϊόν (>99%) διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα εκδόχου (vehicle, VEH) που περιείχε 5% διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO, Sigma) 5% Cremophor EL (Sigma) και 90% στείρο φυσιολογικό ορό σε συγκέντρωση 10 mg/mL.

Κεταμίνη: Υδροχλωρική κεταμίνη προερχόμενη από σκεύασμα που προορίζεται για κτηνιατρική χρήση (Ketamidor®) αραιώθηκε σε διάλυμα στείρου φυσιολογικού ορού (saline, SAL) σε συγκέντρωση 30 mg/mL.

D-αμφεταμίνη: Υδροχλωρική d-αμφεταμίνη (>98%, προμηθευόμενη από την «Cayman») αραιώθηκε σε διάλυμα στείρου φυσιολογικού ορού (SAL) σε συγκέντρωση 1 mg/mL.

Πριν την έναρξη των πειραμάτων παρασκευάστηκαν stocks με τα φάρμακα διαλυμένα στο βασικό τους διαλύτη και διατηρήθηκαν στους -20, ενώ τα τελικά διαλύματα παρασκευάστηκαν την ίδια μέρα που χορηγήθηκαν. Όλες οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις (i.p.).

3.3 Πειραματικό σχεδιασμός

3.3.1. Οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης

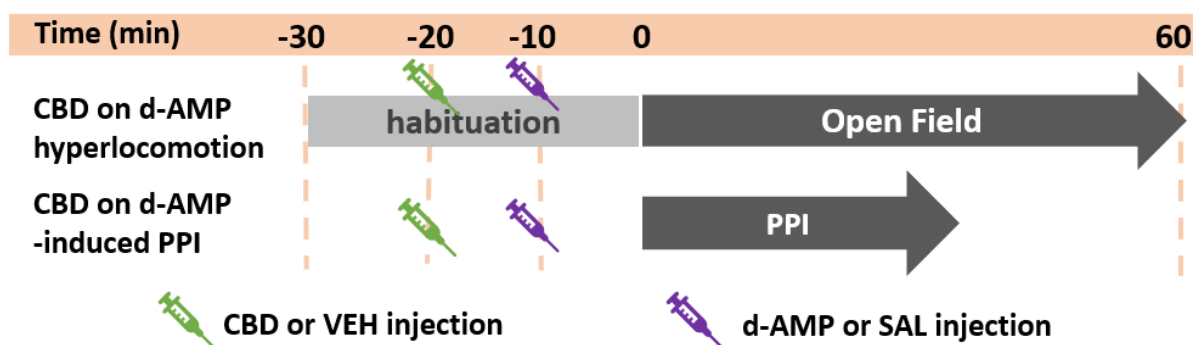
Για το πειραματικό αυτό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές κοορτές πειραματοζώων, μια για το κάθε πειραματικό πρότυπο που μελετήθηκε:

i. Επίδραση της CBD στο κινητικό πρότυπο της οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης

Η μια κοορτή (n=78) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της CBD στις δόσεις των 10 και 30 mg/kg στην υπερκινητικότητα που προκαλεί η d-αμφεταμίνη στις δόσεις των 1 και 3 mg/kg μέσω της δοκιμασίας καταγραφής κινητικότητας στο ανοικτό πεδίο (OF) σε εξοικειωμένους με την αρένα κινητικότητας επίμυες (βλ. παρακάτω: 3.4.A). Οι χορηγήσεις της CBD πραγματοποιήθηκαν 20 λεπτά πριν την έναρξη της καταγραφής, ενώ οι χορηγήσεις της d-αμφεταμίνης 10 λεπτά πριν την έναρξη της καταγραφής, όπως αποτυπώνεται και στην παρακάτω σχηματική απεικόνιση (Εικόνα 3.1). Δεδομένου ότι ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε δύο παράγοντες (χορήγηση CBD και χορήγηση d-αμφεταμίνης) όπου ο καθένας έχει 3 επίπεδα (έκδοχο, χαμηλή δόση, υψηλή δόση), διαμορφώθηκαν συνολικά 9 πειραματικές ομάδες βάσει της χορήγησης των φαρμάκων με n=7-11 πειραματοζώα έκαστη. Η ομάδα ελέγχου για την CBD έλαβε vehicle (VEH) ως έκδοχο, ενώ η ομάδα ελέγχου για την αμφεταμίνη έλαβε στείρο φυσιολογικό ορό (saline, SAL).

ii. Επίδραση της CBD ως προς την εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού

Η δεύτερη κοορτή (n=24) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της δράσης της CBD και της αλληλεπίδρασής της με την d-αμφεταμίνη στην προ-παλμική αναστολή του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού (βλ. παρακάτω: 3.4.Δ). Η CBD χορηγήθηκε στη δόση των 10 mg/kg, ενώ η d-αμφεταμίνη στη δόση 0.5 mg/kg, η οποία προέκυψε ως η χαμηλότερη δόση που επιτυγχάνει εύρωστο αποτέλεσμα σε προκαταρκτικά πειράματα. Συνολικά διαμορφώθηκαν 4 πειραματικές ομάδες, έκαστη αποτελούμενη από n=5-9 πειραματοζώα.



Εικόνα 3.1: Πειραματικός σχεδιασμός και χρονικά σημεία φαρμακολογικών χορηγήσεων των πειραματικών πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης της χορήγησης CBD στο πειραματικό πρότυπο οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης

3.3.2. Επαναλαμβανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης

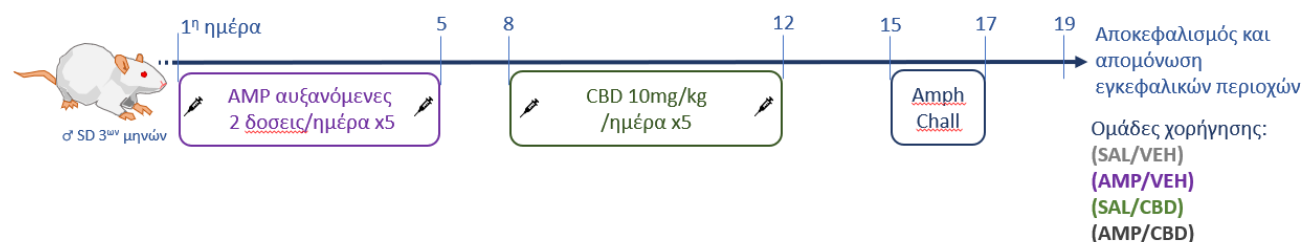
Για την ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου που θα προσομοιάζει τη δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια, χρησιμοποιήθηκε ο εξής πειραματικός σχεδιασμός: Επίμυες δέχθηκαν 2 δόσεις d-αμφεταμίνης ή φυσιολογικού ορού την ημέρα, για 5 συνεχόμενες μέρες οι οποίες αυξάνονταν σταδιακά ως εξής:

- 1^η ημέρα: 1 mg/kg x2
- 2^η ημέρα: 2 mg/kg x2
- 3^η ημέρα: 4 mg/kg x2
- 4^η ημέρα: 8 mg/kg x2
- 5^η ημέρα: 8 mg/kg x2

Ακολούθησαν 2 ημέρες χωρίς φαρμακολογικό χειρισμό και έπειτα για 5 ημέρες πραγματοποιήθηκαν οι χορηγήσεις της CBD. Συγκεκριμένα η CBD (ή VEH) χορηγήθηκαν μια φορά κάθε μέρα, στη δόση των 10 mg/kg, κάθε μέρα. Τρεις ή τέσσερις ημέρες μετά την τελευταία χορήγηση ακολούθησε η δοκιμασία αμφεταμίνης (Amphetamine challenge, AC) στο ανοικτό πεδίο όπου οι επίμυες δέχθηκαν οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης και ακολούθως μελετήθηκε η κινητικότητα τους. Διαμορφώθηκαν 4 πειραματικές ομάδες βάσει των χορηγήσεων (βλ. εικόνα 3.2) με n=8-9 σε κάθε ομάδα.

Δυο ή τρεις ημέρες μετά τη δοκιμασία d-αμφεταμίνης οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο, υπέστησαν αποκεφαλισμό με τη χρήση λαιμητόμου, άμεση απομάκρυνση του εγκεφάλου τους και τοποθέτηση σε πάγο, και έπειτα απομονώθηκαν οι παρακάτω εγκεφαλικές περιοχές με τη χρήση κρουτόμου, ώστε να μελετηθούν ως προς τη ντοπαμινεργική τους λειτουργία μέσω HPLC-ED (βλ. 3.5):

- Ραχιαίος ιππόκαμπος – VHIP
- Κοιλιακός ιππόκαμπος – DHIP
- Προμετωπιαίος φλοιός – PFC
- Έσω ραβδωτό σώμα – DMS
- Έξω ραβδωτό σώμα – DLS
- Επικλινής πυρήνας του διαφράγματος – NAc



Εικόνα 3.2: Χρονικά παράθυρα χορηγήσεων και πειραματικών διαδικασιών για τη μελέτη της επίδρασης της χρόνιας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) σε υπερεθασθητοποιημένους επίμυες στη d-αμφεταμίνη (AMP).

3.3.3. Οξεία χορήγηση κεταμίνης

Για το πειραματικό αυτό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές κοορτές πειραματοζώων, μια για το κάθε πειραματικό πρότυπο που μελετήθηκε:

- i. Διερεύνηση της δράσης της CBD στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε μη εξοικειωμένους επίμους.

Μια κοορτή επίμωων (n=37) δέχθηκε τη χορήγηση VEH ή CBD στις δόσεις 3,10, 30 mg/kg διαμορφώνοντας 4 πειραματικές ομάδες των 8-10 επίμωων, οι οποίοι 20' μετά τις χορηγήσεις υπέστησαν καταγραφή της κινητικής τους δραστηριότητας στο ανοικτό πεδίο χωρίς να έχουν υποστεί εγκλιματισμό.

- ii. Διερεύνηση της δράσης της κεταμίνης στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε εξοικειωμένους επίμους.

Μια ακόμη κοορτή επίμωων (n=37, 8-10 ανά πειραματική ομάδα) δέχθηκε τη χορήγηση SAL ή κεταμίνης (KET) στις δόσεις 10, 30, 60 mg/kg άμεσα πριν από την έναρξη της καταγραφής της κινητικότητάς στο ανοικτό πεδίο για 60 λεπτά και κατόπιν εγκλιματισμού διάρκειας 30 λεπτών.

- iii. Διερεύνηση της επίδρασης της CBD στην οξεία χορήγηση κεταμίνης στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε εξοικειωμένους επίμους.

Για τη διερεύνηση της επίδρασης της CBD στο κινητικό πρότυπο που επάγει η κεταμίνη στο ανοικτό πεδίο, επιλέχθηκε η χορήγηση της χαμηλότερης αποτελεσματικής δόσης κεταμίνης (30 mg/kg), ενώ για τη CBD επιλέχθηκαν οι δόσεις των 10 και 30 mg/kg. Ένα σύνολο 55 επίμωων (8-10/ πειραματική ομάδα, για καθεμία από τις 6 πειραματικές ομάδες που διαμορφώθηκαν) υπέστη χορηγήσεις CBD (ή VEH) και κεταμίνης (ή SAL) και υπέστη καταγραφή της κινητικής του δραστηριότητας, έπειτα από εγκλιματισμό στο ανοικτό πεδίο.

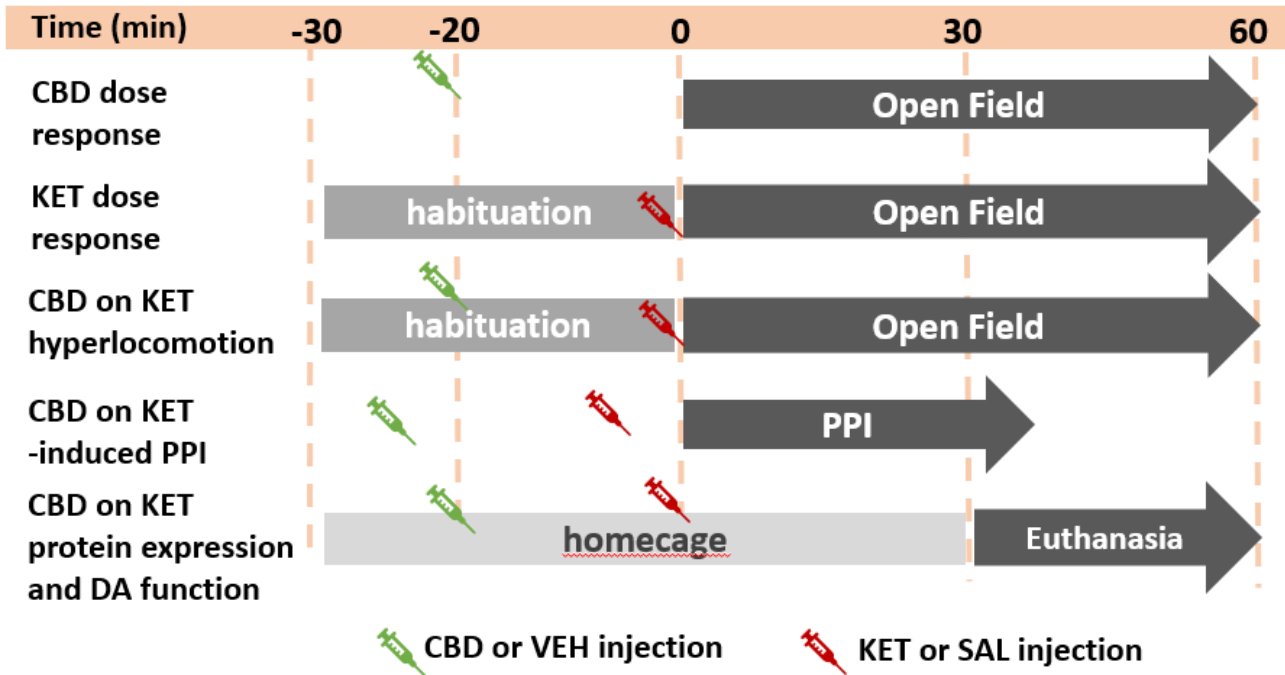
- iv. Εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού.

Η μελέτη της δράσης της CBD και της αλληλεπίδρασής της με την d-αμφεταμίνη στην προ-παλμική αναστολή του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού πραγματοποιήθηκε σε σύνολο n=27 επίμωων. Η CBD χορηγήθηκε στη δόση των 10 mg/kg 35 λεπτά πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας του PPI, ενώ για την κεταμίνη επιλέχθηκε η δόση των 10 mg/kg κατόπιν μελέτης της σχετικής βιβλιογραφίας (Cilia et al., 2007; van der Buuse et al., 1015; Manshbach and Geyer et al., 1991) και χορηγήθηκε 5' πριν την εκκίνηση του πειράματος. Συνολικά διαμορφώθηκαν 4 πειραματικές ομάδες, έκαστη αποτελούμενη από n=5-9 πειραματόζωα.

- v. Εκτίμηση μεταβολών της ντοπαμινεργική δραστηριότητας μέσω HPLC-ED και της πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω αποτύπωσης κατά western σε δείγματα ιστού.

Για τις μελέτες των νευροχημικών αναλύσεων και των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε μια κοορτή αποτελούμενη από 30 επίμους. Οι επίμους δέχθηκαν τη χορήγηση VEH ή CBD (10 ή 30 mg/kg) 50 λεπτά πριν τον αποκεφαλισμό παρουσία ισοφλουρανίου προς απομόνωση των εγκεφαλικών δομών ενδιαφέροντος. Οι

δομές που απομονώθηκαν και αναλύθηκαν είναι οι ίδιες με εκείνες στο πεδίο 3.3.2. (VHIP, DHIP, PFC, DMS, DLS, NAc). Από κάθε πειραματόζωο απομονώθηκαν οι παραπάνω δομές και από τα 2 εγκεφαλικά ημισφαίρια με τις περιοχές από το ένα ημισφαίριο να προορίζονται για τις αναλύσεις των επιπέδων ντοπαμίνης και μεταβολιτών μέσω HPLC-ED (βλ. 3.5) και το άλλο ημισφαίριο να προορίζονται προς την ανάλυση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western (βλ. 3.6).



Εικόνα 3.3: Πειραματικός σχεδιασμός και χρονικά παράθυρα σημεία φαρμακολογικών χορηγήσεων των πειραματικών πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης της χορήγησης CBD στο πειραματικό πρότυπο οξείας χορήγησης κεταμίνης. Προσαρμοσμένο από Brakatselos et al., 2020.

3.3.4. Επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης

Για την ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου που θα προσομοιάζει τη δυσλειτουργία του γλουταματεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια, χρησιμοποιήθηκε ο εξής πειραματικός σχεδιασμός: Αρσενικοί επίμυες ηλικίας 3 μηνών δέχθηκαν 1 δόση κεταμίνης (30 mg/kg) ή φυσιολογικού ορού την ημέρα, για 10 συνεχόμενες μέρες. Ακολούθησαν 2 ημέρες χωρίς χορηγήσεις και έπειτα χορηγήθηκε μια δόση CBD την ημέρα (10 mg/kg), για 5 συνεχόμενες ημέρες. Το σχήμα χορήγησης με CBD ακολούθησαν 2 ημέρες χωρίς φαρμακολογικές χορηγήσεις, την οποία ακολουθούσε η μελέτη του βιο-φαινοτύπου που αναπτύχθηκε σε επίπεδο συμπεριφοράς, νευροχημικών, νευροβιολογικών και ηλεκτροφυσιολογικών μεταβολών.

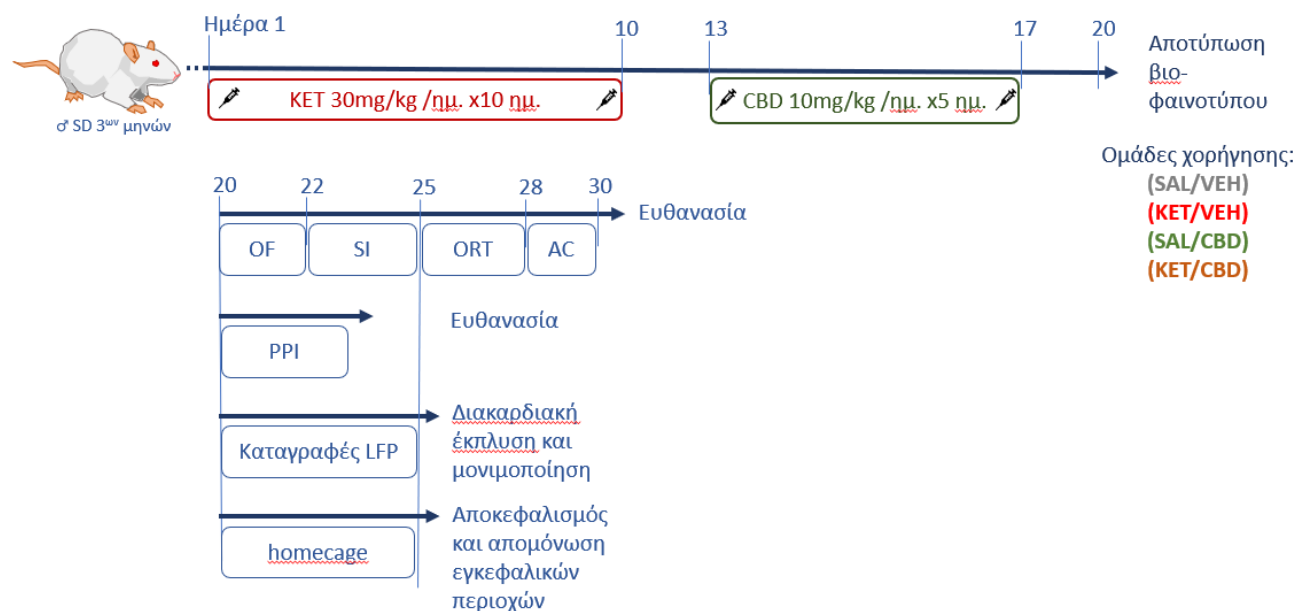
Για τη μελέτη των συμπεριφορών αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας στο ανοικτό πεδίο (OF), απόκρισης στη χορήγηση κεταμίνης στο ανοικτό πεδίο (AC), κοινωνικής συμπεριφοράς/συνδιαλλαγής (SI) και δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου (ORT/NOR), χρησιμοποιήθηκε μια κοορτή επίμυων (n=45, 8-10/πειραματική ομάδα). Η σειρά της διεξαγωγής πειραμάτων είχε ως εξής: την 20^η και 21^η ημέρα από την έναρξη των χορηγήσεων κεταμίνης πραγματοποιήθηκε η μελέτη της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας των επίμυων στο ανοικτό πεδίο. Την 22^η και την 23^η οι επίμυες υποβλήθηκαν σε διαδικασία εξοικείωσης με τους κλωβούς που πραγματοποιείται η δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς ενώ την 25^η πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία. Ακολούθησε η εξοικείωση με την αρένα που πραγματοποιείται η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου την 25^η και την 26^η ημέρα, ενώ την 27 πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία. Την 28^η και την 29^η ημέρα από την πρώτη χορήγηση κεταμίνης μελετήθηκε η απόκριση των επίμυων στη χορήγηση d-αμφεταμίνης στο ανοικτό πεδίο. Την 30^η ημέρα οι επίμυες υπέστησαν ευθανασία.

Μια δεύτερη κοορτή επίμυων (n=37, 7-10/ πειραματική ομάδα) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της συμπεριφοράς προ-παλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού. Οι επίμυες υποβλήθηκαν στη δοκιμασία την 20^η, 21^η ή 23^η ημέρα μετά την έναρξη των χορηγήσεων της κεταμίνης και με το πέρας των πειραματικών διαδικασιών υπέστησαν ευθανασία.

Μια τρίτη κοορτή επίμυων (n=26, 6-8/ πειραματική ομάδα) χρησιμοποιήθηκε για την in vivo καταγραφή δυναμικών πεδίου (LFP) και την ακόλουθη παρασκευή και χρώση εγκεφαλικών τομών με σκοπό τη διενέργεια ιστολογικών και ανοσοϊστοχημικών μελετών. Οι επίμυες υπέστησαν το στερεοταξικό χειρουργείο και τις καταγραφές την 21^η, 22^η, 23^η ή 24^η ημέρα από την έναρξη των χορηγήσεων κεταμίνης. Το χειρουργείο ακολούθησε η χορήγηση θανατηφόρας δόσης πεντοβαρβιτάλης, διακαρδιακή έκπλυση και μονιμοποίηση των πειραματόζων και τέλος απομόνωση του εγκεφάλου προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στις περαιτέρω αναλύσεις.

Μια τέταρτη κοορτή πειραματόζων (n=32, 8/ πειραματική ομάδα) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ιστού από εγκεφαλικές δομές για περαιτέρω νευροχημικές αναλύσεις μέσω HPLC και εκτιμήσεις επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα, κατά την 24^η ημέρα από την έναρξη των χορηγήσεων οι επίμυες υπέστησαν αποκεφαλισμό παρουσία ισοφλουρανίου προς απομόνωση των εγκεφαλικών δομών ενδιαφέροντος. Οι δομές που απομονώθηκαν και αναλύθηκαν είναι οι ίδιες με εκείνες στο πεδίο 3.3.2. (VHIP, DHIP, PFC, DMS, DLS, NAc). Από κάθε πειραματόζω απομονώθηκαν οι παραπάνω δομές και από τα 2 εγκεφαλικά ημισφαίρια με τις περιοχές από το ένα ημισφαίριο να προορίζονται για τις αναλύσεις των επιπέδων ντοπαμίνης και μεταβολιτών μέσω HPLC-ED (βλ. 3.5) και το άλλο ημισφαίριο να

προορίζονται προς την ανάλυση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western (βλ. 3.6).



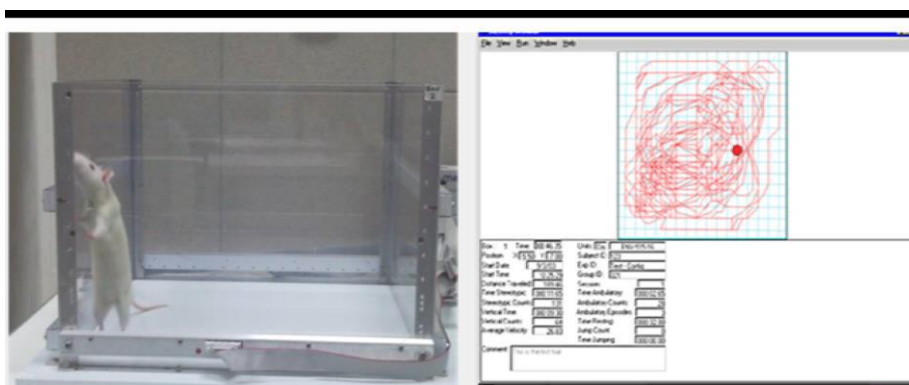
Εικόνα 3.4: Χρονικά παράθυρα χορηγήσεων και πειραματικών διαδικασιών για τη μελέτη της επίδρασης της χρόνιας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) σε επίμυες που έχουν υποστεί αρχικά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) για την ανάπτυξη ενός πειραματικού προτύπου που προσομοιάζει τη δυσλειτουργία του γλουταματεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια. SD: επίμυες του στελέχους Sprague-Dawley, OF: Δοκιμασία ανοικτού πεδίου, SI: δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς/συνδιαλλαγής, ORT: δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, AC: δοκιμασία απόκρισης στη οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης στο ανοικτό πεδίο, LFP: δυναμικά πεδίου, homecage: παραμονή στον κλωβό.

3.4 Μέθοδοι εκτίμησης παραμέτρων συμπεριφοράς

3.4.1. Δοκιμασία ανοικτού πεδίου (OF)

Ο προσδιορισμός και η καταγραφή παραμέτρων της κινητικής συμπεριφοράς των πειραματόζωνων είναι ένας δείκτης ο οποίος παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αμιγή κινητικότητα του ζώου, την εξερευνητικότητα και την εσωτερική διεγερσιμότητα-κινητοποίηση (emotionality) (Polissidis et al., 2014; Brakatselos et al., 2021; Roulia et al., 2021). Όταν οι παράμετροι αυτοί επηρεάζονται λόγω κάποιου πειραματικού χειρισμού, όπως η χορήγηση ψυχοδραστικών ουσιών, οι υφιστάμενες αλλαγές αποτυπώνονται και στη μεταβολή της κινητικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της υπερδραστηριότητας που προκαλείται στα πειραματόζωα μέσω της χορήγησης ψυχοδιεγερτικών και ο χαρακτηρισμός του ως πειραματική προσέγγιση ψύχωσης, αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της σημασίας της μελέτης της κινητικής συμπεριφοράς. Γενικότερα έχει βρεθεί ότι ευφοριογόνες ουσίες προκαλούν κινητική διέγερση σε πειραματόζωα (Antonίου et al., 2004; Polissidis et al., 2014), ενώ όπως προαναφέρθηκε η χορήγηση υψηλών δόσεων κανναβινοειδών επιδρά κατ' αντίθετο τρόπο στην κινητικότητα των πειραματόζωνων (Galanopoulos et al., 2014).

Μια εκ των ευρύτερα χρησιμοποιημένων μεθόδων μέτρησης της κινητικότητας είναι η δοκιμασία ανοικτού πεδίου (open field test, OF). Η πειραματική συσκευή (Εικόνα 10) περιλαμβάνει έναν κλωβό με διαφανή τοιχώματα κατασκευασμένα από Plexiglas, διαστάσεων 40x40x40cm, ανοιχτό από επάνω και εξοπλισμένο με οριζόντιες και κάθετες συστοιχίες 16 φωτοκυττάρων, καθώς επίσης και μια ηλεκτρική μονάδα καταγραφής (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates) η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η κίνηση των πειραματόζωνων καταγράφεται αυτόματα στο σύστημα λόγω διακοπής των δεσμίδων φωτός των φωτοκυττάρων και οι τιμές των υπό μελέτη παραμέτρων κινητικότητας αποθηκεύονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.



Εικόνα 3.5: Η αρένα πειραματισμού του ανοικτού πεδίου και εικονοποιημένο στιγμιότυπο του λογισμικού κατά τη διάρκεια της καταγραφής

Καταγραφή κινητικής δραστηριότητας εξοικειωμένων επίμυων

Η καταγραφή της κινητικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε βάσει πρωτοκόλλων που έχουν περιγραφεί (Brakatselos et al., 2021). Η μελέτη δεικτών κινητικότητας των επίμυων που δέχθηκαν τη χορήγηση κάποιας ουσίας με διεγερτική δράση (κεταμίνη, d-αμφεταμίνη) πραγματοποιήθηκε σε εξοικειωμένους επίμυες. Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν στην αρένα 30 λεπτά πριν την έναρξη της καταγραφής ώστε να εγκλιματιστούν με αυτόν. Η εξοικείωση με τον κλωβό κινητικότητας (habituation) έχει μεγάλη σημασία για την αξιολόγηση κεντρικών διεγερτικών δράσεων στις παραμέτρους της κινητικότητας, καθώς η συμπεριφορά των μη-εξοικειωμένων πειραματόζωων κατά την έκθεση τους σε ένα άγνωστο περιβάλλον μπορεί να συγκαλύψει την αύξηση της κινητικής (Brakatselos et al., 2021; Roulia et al., 2021). Οι χορηγήσεις των φαρμάκων πραγματοποιήθηκαν βάσει των παραπάνω περιγεγραμμένων πρωτοκόλλων (βλ. 3.3).

Η καταγραφή έχει διάρκεια μια ώρα και οι παράμετροι που καταγράφονται στην OF είναι η οριζόντια κινητικότητα εκφρασμένη ως διανυθείσα απόσταση, ως διάρκεια και ως συχνότητα εμφάνισης (ambulatory distance, ambulatory time και ambulatory counts, αντίστοιχα) και η κάθετη κινητικότητα, εκφρασμένη βάσει της διάρκειάς και της συχνότητας εμφάνισης (vertical time και vertical counts, αντίστοιχα). Με το πέρας της διαδικασίας της καταγραφής, η οποία διαρκούσε μια ώρα, τα ζώα τοποθετούνταν πίσω στο κλωβό τους και η αρένα καθαριζόταν επιμελώς με νερό και 70% αιθανόλη με σκοπό την απαλοιφή οσμών από την παρουσία των επίμυων.

Καταγραφή κινητικότητας σε μη εξοικειωμένους επίμυες

Η καταγραφή της κινητικότητας από μη εξοικειωμένους επίμυες πραγματοποιήθηκε όπως η καταγραφή στους εξοικειωμένους με τη διαφορά της απουσίας περιόδου εγκλιματισμού με την αρένα κινητικότητας. Οι επίμυες στην παρούσα περίπτωση δεν είχαν υποστεί στο παρελθόν εισαγωγή στο ανοικτό πεδίο. Η καταγραφή ξεκινούσε από τη στιγμή της εισαγωγής και είχε διάρκεια μια ώρα. Οι παράμετροι που καταγράφηκαν ήταν οι ίδιοι με που καταγράφηκαν και στην περίπτωση των εξοικειωμένων επίμυων.

Δοκιμασία απόκρισης στη χορήγηση d-αμφεταμίνης στο ανοικτό πεδίο (AC)

Πρόκειται για μια τυπική δοκιμασία εκτίμησης της κινητικής δραστηριότητας εξοικειωμένων επίμυων στο ανοικτό πεδίο, με τη διαφορά του ότι 10 λεπτά πριν την έναρξη της καταγραφής πραγματοποιήθηκε η χορήγηση d-αμφεταμίνης (1 mg/kg) για το σύνολο των επίμυων όλων των πειραματικών ομάδων που συμμετείχαν σε αυτή τη δοκιμασία.

3.4.2. Δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς/συνδιαλλαγής (SI)

Η δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση δεικτών κοινωνικής συμπεριφοράς, καθώς η διαταραχή τους αποτελεί δείκτη αρνητικής συμπτωματολογίας (Georgiadou et al.,

2014). Η διενέργεια των πειραμάτων βασίστηκε σε πειραματικά πρωτόκολλα που περιγράφονται στη βιβλιογραφία, εφαρμόζοντας μικρές τροποποιήσεις (Georgiadou et al., 2014).

Συνοπτικά, της δοκιμασίας κοινωνικής συμπεριφοράς προηγήθηκε η διαδικασία εγκλιματισμού των επίμυων με την αρένα καταγραφής της κοινωνικής συμπεριφοράς. Ο εγκλιματισμός πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή των πειραματοζώων στην αρένα που επρόκειτο να μελετηθούν για 10 λεπτά, 2 φορές τη μέρα, τις 2 ημέρες που προηγήθηκαν της δοκιμασίας.

Μετά το πέρας του εγκλιματισμού, οι επίμεις αντιστοιχίστηκαν ανά ζεύγη προκειμένου να διαμορφωθούν τα ζευγάρια τα οποία θα εισαγάγονταν μαζί στην αρένα για να μελετηθεί η κοινωνική τους αλληλεπίδραση. Η αντιστοίχιση πραγματοποιήθηκε βάσει των παρακάτω κριτηρίων:

- Οι δυο επίμεις που εισάγονται μαζί στην αρένα μελέτης της κοινωνικής συμπεριφοράς θα πρέπει να ανήκουν στην ίδια πειραματική ομάδα.
- Να μην έχουν διαφορά στο σωματικό βάρος μεγαλύτερη της τάξης του 10%.
- Να μην έχουν έρθει σε επαφή στον παρελθόν.

Κατά αυτή την αρχή οι επίμεις εισήχθησαν μαζί στην αρένα μελέτης της κοινωνικής τους συμπεριφοράς και η συμπεριφορά τους βιντεοσκοπήθηκε για 10 λεπτά. Ακολούθησε ανάλυση επίδοσης του ζευγαριού με τη χρήση του λογισμικού Kinoscope που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο φαρμακολογίας του ΕΚΠΑ ως λογισμικό ποσοτικοποίησης δεικτών συμπεριφοράς ζωντανά ή από καταγεγραμμένο οπτικοακουστικό υλικό (Kokras et al., 2017). Οι επιμέρους συμπεριφορές των πειραματοζώων καταγράφηκαν για κάθε ζεύγος ως προς τη συνολική διάρκεια και τη συχνότητα εμφάνισης και ήταν οι εξής:

- i. Sniffing (εξερεύνηση του άλλου επίμου μέσω της οσμής) -κοινωνική συμπεριφορά
- ii. Grooming (περιποίηση του άλλου επίμου) -κοινωνική συμπεριφορά
- iii. Following (ακολουθήση του άλλου επίμου) -κοινωνική συμπεριφορά
- iv. Touching (άγγιγμα) -κοινωνική συμπεριφορά
- v. Crawling (σύρσιμο κάτω από το σώμα του άλλου επίμου) -κοινωνική συμπεριφορά
- vi. Avoiding (αποφυγή) -μη κοινωνική συμπεριφορά
- vii. Wrestling (πάλη μεταξύ των επίμυων) -επιθετική συμπεριφορά
- viii. Biting (δάγκωμα του άλλου επίμου) -επιθετική συμπεριφορά

Προκειμένου να καταγραφεί μια συμπεριφορά θα έπρεπε η απόσταση ανάμεσα από τα σώματα των επίμυων να μη ξεπερνά το 1 cm. Ο πειραματιστής που καταγράφει τη συμπεριφορά δε γνωρίζει την πειραματική ομάδα στην οποία ανήκει ο κάθε επίμυς (blinded).

Οι συμπεριφορές που καταγράφηκαν κατανεμήθηκαν σε κοινωνικές, μη κοινωνικές και επιθετικές συμπεριφορές και ο συνολικός χρόνος για κάθε μια από τις επιμέρους συμπεριφορές αθροίστηκε. Αξίζει να σημειωθεί ότι επιθετικές συμπεριφορές εμφανίστηκαν σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις (2 επεισόδια επιθετικής συμπεριφοράς συνολικά σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή), αν και στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η επαναλαμβανόμενη χορήγηση KET έχει αρνητικό αντίκτυπο στις επιθετικές συμπεριφορές, πράγμα που υποδηλώνει ότι εμφανίζονται τουλάχιστον στις ομάδες ελέγχου (Becker et al., 2003). Στα δεδομένα της παρούσας εργασίας παρουσιάζεται μόνο το άθροισμα του χρόνου διάρκειας των μελετημένων κοινωνικών συμπεριφορών.



Εικόνα 3.6: Αναπαράσταση 2 επίμυων στην αρένα εκτίμησης κοινωνικής συμπεριφοράς/συνδιαλλαγής

3.4.3. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (Novel object recognition, NOR)

Η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου αποτελεί ένα πρότυπο αξιολόγησης της αναγνωριστικής μνήμης, το οποίο περιεγράφηκε αρχικά από τους (Ennaceur and Delacour, 1988) και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μια προσέγγιση γνωστικών δυσλειτουργιών που απαντώνται και στη σχιζοφρένεια (Georgiadou *et al.*, 2014; Kozela *et al.*, 2020). Η πειραματική αυτή διαδικασία βασίζεται στην έμφυτη τάση των τρωκτικών να εξερευνούν μέσω φυσικής επαφής περισσότερα τα αντικείμενα τα οποία δε γνωρίζουν, σε σχέση με εκείνα που έχουν αναγνωρίζουν από προηγούμενη έκθεση.

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σε αδιαφανή λευκή ξύλινη αρένα διαστάσεων 50x50x50 cm.

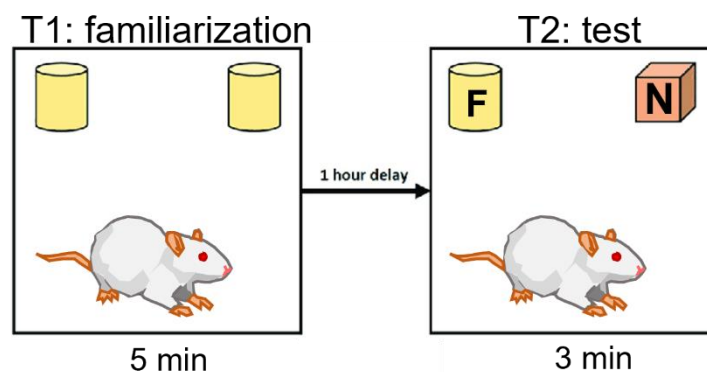
Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σε ειδικό θάλαμο αφιερωμένο στη διενέργεια του συγκεκριμένου πειράματος με χαμηλωμένα επίπεδα φωτισμού. Αρχικά πραγματοποιείται εξοικείωση των πειραματόζων με το χώρο και την αρένα, ώστε στη φάση της δοκιμασίας να είναι πλήρως εξοικειωμένα και πιο κινητοποιημένα να εξερευνήσουν τα αντικείμενα. Η φάση εξοικείωσης πραγματοποιείται σε 3 ημέρες όπου ο επίμυς μεταφέρεται για συνολικό διάστημα τριών ωρών στο θάλαμο που πραγματοποιείται το πείραμα και στο διάστημα αυτό τοποθετείται 2 φορές, για 5' κάθε φορά στην αρένα ώστε να την εξερευνήσει και να επέλθει εξοικείωση.

Η επόμενη της τρίτης μέρας της εξοικείωσης είναι η μέρα του πειραματισμού η οποία πραγματοποιείται σε 2 φάσεις. Αρχικά είναι η φάση της εκμάθησης των «οικείων» αντικειμένων η οποία ονομάζεται T1. Στη φάση αυτή έχουν τοποθετηθεί 2 πανομοιότυπα αντικείμενα στην αρένα, απέναντι από το σημείο στο οποίο τοποθετείται ο επίμυς κατά την εισαγωγή του στην αρένα, απέχοντας 15 cm από τους ακρινούς τοίχους. Στη φάση αυτή ο επίμυς αφήνεται για 5 λεπτά στο χώρο να εξερευνήσει τα πανομοιότυπα αντικείμενα, ενώ καταγράφεται ο χρόνος καταγραφής για το καθένα. Τα διαθέσιμα αντικείμενα για πειραματισμό υπάρχουν ανά ζεύγη, αποτελούνται από διαφορετικά υλικά (γυαλί, πλαστικό, μέταλλο), έχουν διαφορετικά σχήματα αλλά όχι πολύ διαφορετικά μεγέθη.

Κατά τα 5 λεπτά της διάρκειας της φάσης T1, αν ο επίμυς δεν εξερευνήσει κάποιο αντικείμενο ή ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης αντικειμένων δε ξεπεράσει τα 10 δευτερόλεπτα, τότε ο επίμυς αποσύρεται από το πειραματικό πρωτόκολλο. Μετά την ολοκλήρωση των 5 λεπτών καταγράφεται πιθανή προτίμηση του επίμυ σε θέση τοποθέτησης αντικειμένου.

Μία ώρα μετά την εισαγωγή την έναρξη της φάσης T1 για κάθε επίμυ πραγματοποιείται η φάση δοκιμασίας (T2). Πριν την εισαγωγή του επίμυ έχει τοποθετηθεί το ένα αντικείμενο από το ζεύγος που ήταν στη φάση T1 στην αρένα, στο ίδιο σημείο (γνώριμο αντικείμενο -familiar, F), ενώ το άλλο γνωστό αντικείμενο αντικαθίσταται από ένα διαφορετικό σε υλικο και σχήμα με το οποίο ο επίμυς δεν είναι εξοικειωμένος (καινούριο αντικείμενο -novel, N). Η θέση που επιλέγεται να τοποθετηθεί το νέο αντικείμενο είναι εκείνη για την οποία έδειξε τη χαμηλότερη προτίμηση ο επίμυς στη φάση T1. Έπειτα εισάγεται ο επίμυς για τη πραγματοποίηση της T2 για συνολικό χρόνο 3 λεπτών, όπου καταγράφεται η συμπεριφορά του από ειδική κάμερα.

Οι βιντεοσκοπημένες δοκιμασίες (φάσεις T2) για κάθε επίμυ αναλύονται από τον πειραματιστή (blinded) μέσω του λογισμικού Kinoscope και καταγράφεται ο συνολικός χρόνος που ο επίμυς εξερεύνησε το κάθε αντικείμενο. Αν κάποιος επίμυς δεν προσεγγίσει κάποιο εκ των δυο αντικειμένων δε συνυπολογίζεται στα τελικά αποτελέσματα. Η παράμετρος που καθορίζει την επίδοση του πειραματόζωο είναι ο δεικτης ικανότητας διάκρισης αντικειμένου (Discrimination Index), ο οποίος υπολογίζεται από το πηλίκο της διαφοράς του χρόνου εξερεύνησης του γνώριμου αντικειμένου μείον τον χρόνο εξερεύνησης νέου αντικειμένου προς το άθροισμα των δύο αυτών χρόνων, δηλαδή προς τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των δύο αντικειμένων [$DI=(N-F)/(N+F)$] (Canoy and Delacour, 1993). Μειωμένος συντελεστής DI σε σχέση με την ομάδα ελέγχου υποδηλώνει μειωμένη διακριτική ικανότητα μεταξύ γνώριμου και παλαιού αντικειμένου.



Εικόνα 3.7: Γραφική επεξήγηση της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου

3.4.4. Δοκιμασία Προ-Παλμικής Αναστολής του Αντανακλαστικού Αιφνιδιασμού (Pre-Pulse Inhibition test, PPI)

Η συγκεκριμένη δοκιμασία αφορά στον έλεγχο της αισθητικοκινητικού ηθμού μέσω της απάντησης σε συγκεκριμένη ροή ηχητικής πληροφορίας. Η διαδικασία αυτή εμφανίζεται διαταραγμένη σε συγκεκριμένες ψυχιατρικές και νευρολογικές νόσους συμπεριλαμβανομένης και της σχιζοφρένειας. Στην παρούσα μελέτη η μελέτη πραγματοποιήθηκε βάσει προηγούμενων πρωτοκόλλων (Rouliia et al., 2021) με ορισμένες τροποποιήσεις.

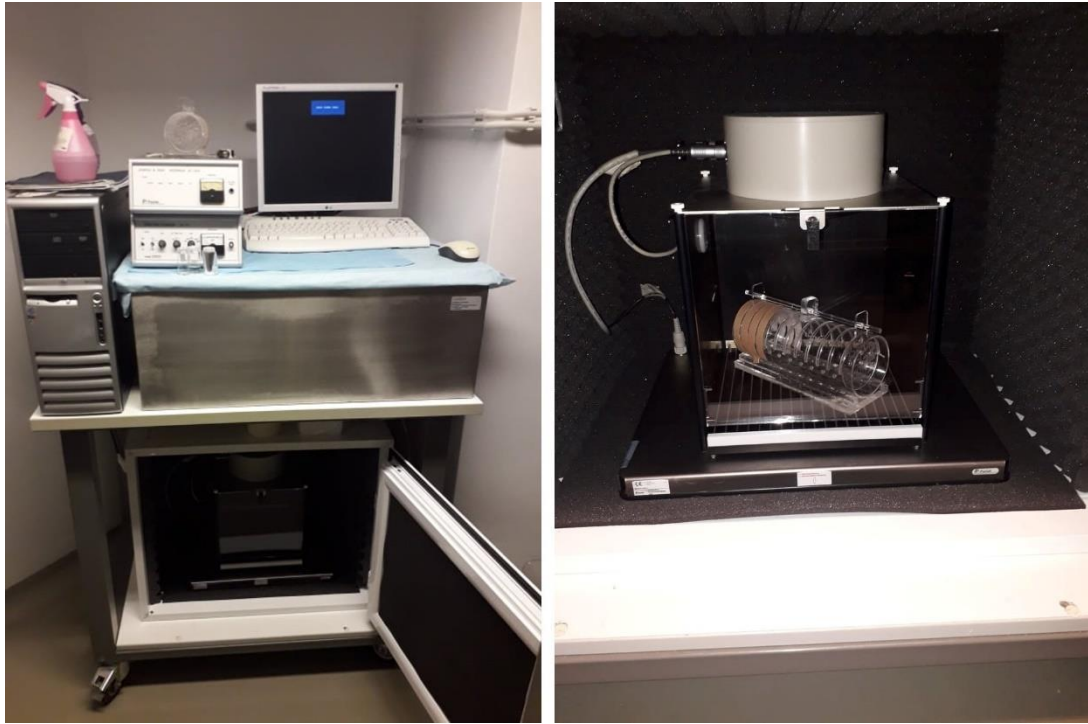
Την πρώτη ημέρα της δοκιμασίας οι επίμυες εισάγονται σε περιοριστή κίνησης από plexiglass (restrainer) και αμέσως μετά μέσα σε έναν ειδικό αυτόματο κλωβό, με ανιχνευτές μέτρησης της ολικής αντίδρασης του σώματος του πειραματοζώου, και αφήνονται να εξοικειωθούν με το χώρο για διάστημα 5 λεπτών. Στη συνέχεια, δέχονται με τυχαία σειρά ακουστικά ερεθίσματα αιφνιδιασμού 70, 80, 90, 100, 110 και 120 dB για 40 ms το καθένα, με 20 sec ως ενδιάμεσο χρονικό διάστημα μεταξύ των ακουστικών ερεθισμάτων (intertrial interval). Το κάθε ερέθισμα επαναλαμβάνεται με τυχαία σειρά για πέντε φορές.

Ως ακουστικό ερέθισμα αιφνιδιασμού χρησιμοποιείται ένας λευκός θόρυβος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καταγράφεται μέσω υπολογιστικού προγράμματος (Startle V1.2) η απόκριση στο ερέθισμα αιφνιδιασμού και η αντανακλαστική συμπεριφορά αποστροφής σε αυτό (αντανακλαστικό αιφνιδιασμού, startle reflex). Ειδικότερα υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών του εύρους (amplitude) κάθε αντανακλαστικής απόκρισης για καθένα από τα έξι ακουστικά ερεθίσματα αιφνιδιασμού (70, 80, 90, 100, 110 και 120 dB).

Τη δεύτερη ημέρα ο επίμυς εισάγεται εκ νέου στον ίδιο κλωβό, πάλι όντας κλεισμένος σε περιοριστή κίνησης. Προηγείται ένα διάστημα εξοικείωσης με το χώρο για 5 λεπτά και στη συνέχεια, δέχεται κατά τυχαία σειρά συνδυασμούς ηχητικών ερεθισμάτων (προ-παλμός και παλμός). Η χρονική απόσταση ανάμεσα σε 2 διαφορετικούς συνδυασμούς ερεθισμάτων έχει διάρκεια 20 δευτερά, ενώ μεταξύ προ-παλμου και παλμού έχει 20 ms. Ο παλμός που αποτελεί το κύριο ηχητικό ερέθισμα έχει ένταση 115 db, ενώ οι προ-παλμοί έχουν εντάσεις 75, 80, 85, 90 db. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής ο επίμυς εκτίθεται στους εξής συνδυασμούς: 30 εκθέσεις του παλμού (115 db, διάρκεια 40 ms) και από δέκα εκθέσεις της κάθε έντασης προ-παλμού με τον παλμό, τα οποία απέχουν 20 ms μεταξύ τους.

Μετά την αναπαράσταση κάθε ζεύγους ηχητικών ερεθισμάτων ακολουθεί η καταγραφή του εύρους της απόκρισης του πειραματοζώου που αντιστοιχεί στην ένταση τους ξαφνιάσματος. Ακολούθως, οι μετρήσεις από τις τυχαιοποιημένες αναπαραστάσεις των ερεθισμάτων κατηγοριοποιούνται και υπολογίζεται το εύρος της αντίστασης σε κάθε ζεύγος προ-παλμού - παλμού. Έπειτα υπολογίζεται το ποσοστό της απόκρισης στο αντανακλαστικό του αιφνιδιασμού και οι μεταβολές στην απόκριση του βάσει της έντασης του προ-παλμικού ερεθίσματος. Η αναστολή που προκαλεί κάθε προ-παλμικό ερέθισμα στο αντανακλαστικό αιφνιδιασμού υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

% αναστολής = [(εύρος αντανακλαστικού απόκρισης στα 115 dB - εύρος αντανακλαστικού απόκρισης στον εκάστοτε προ-παλμό) / εύρος αντανακλαστικού απόκρισης στον εκάστοτε προ-παλμό] * 100 Σε φυσιολογικά πειραματόζωα εάν ένας ηχητικός προ-παλμός προηγηθεί του δυνατού ερεθίσματος αιφνιδιασμού, μειώνει το αντανακλαστικό του αιφνιδιασμού.



Εικόνα 3.8: Η πειραματική διάταξη για τη μελέτη της αναστολής προ-παλμικού ερεθίσματος. (ΙΙΒΕΑΑ)

3.5 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

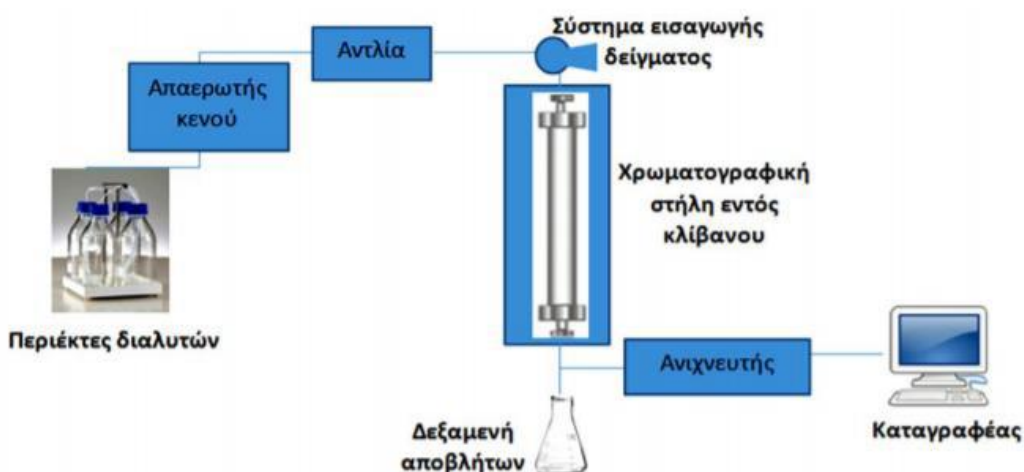
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια εξελιγμένη μορφή της κλασικής υγρής χρωματογραφίας και ορίζεται ως εκείνη η τεχνική ανάλυσης κατά την οποία ένα μείγμα ενώσεων διαχωρίζεται περνώντας μέσα από ένα πορώδες υλικό, την στατική φάση. Για να μπορέσει να περάσει το μείγμα μέσα από τη στατική φάση είναι απαραίτητη η χρήση ενός διαλύματος (κινητή φάση) το οποίο θα παρασύρει το μείγμα διαμέσου αυτής. Η διαβίβαση της κινητής φάσης μέσα από τη στατική επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της βαρύτητας (υγρή χρωματογραφία) ή με την χρήση αντλιών χαμηλής πίεσεως. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση την ικανότητα που έχει κάθε ένωση του μείγματος να παραμένει τόσο στην στατική όσο και στην κινητή φάση. Οι ενώσεις που έχουν χημικά περισσότερο συγγένεια με την στατική φάση όταν περνούν διαμέσου αυτής, έχουν την τάση να προσδένονται σε αυτή πιο εύκολα με αποτέλεσμα να παραμένουν μεγαλύτερο χρόνο εντός της στήλης (Durai et al., 2020).

Η HPLC είναι μία από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβούς ποσοτικούς και ποιοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητά της για τον διαχωρισμό ποικίλων ενώσεων και ειδικότερα μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων ουσιών, είναι μόνο μερικοί από τους λόγους για τους οποίους αυτή η τεχνική είναι τόσο διαδεδομένη.

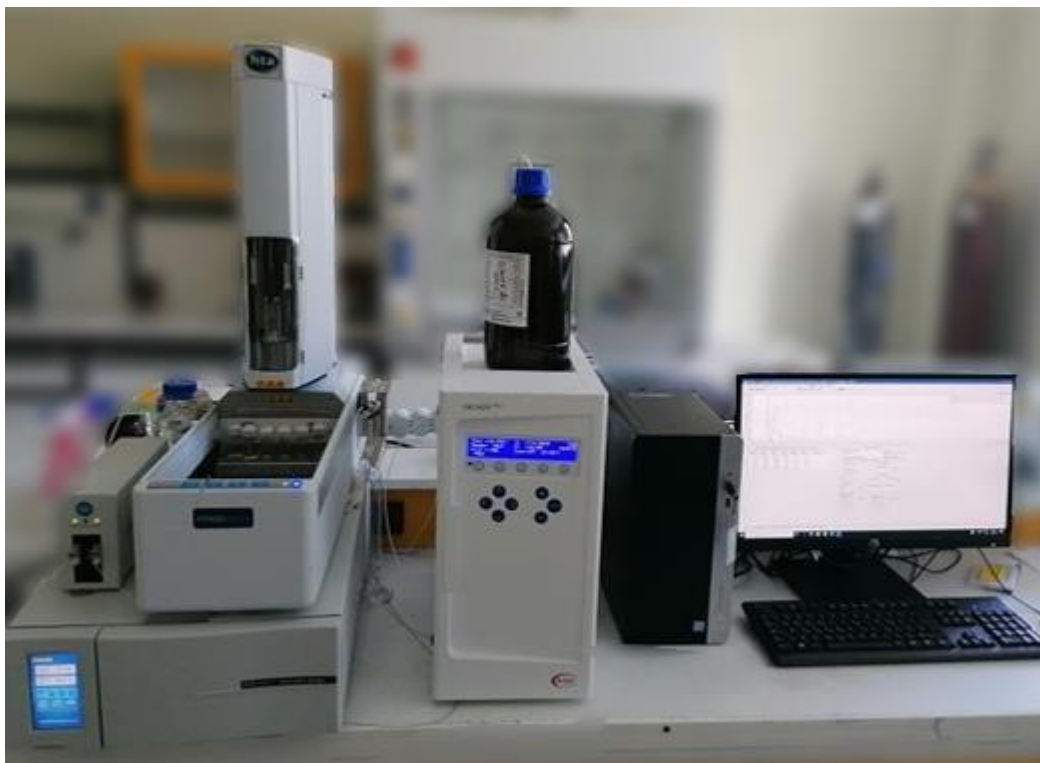
Σκοπός της αξιοποίησης της HPLC στην παρούσα μελέτη ήταν να προσδιοριστούν τα ιστικά επίπεδα της ντοπαμίνης (DA), του DOPAC, του HVA, του γλουταμικού (glu), του GABA αλλά και της γλουταμίνης (glu) σε δείγματα εγκεφαλικών περιοχών που αναφέρθηκαν στο πεδίο 3.3 (DHIP, VHIP, PFC, DMS, DLS, NAc), ώστε να αξιολογηθούν τυχόν αλλαγές στη λειτουργία του ντοπαμινεργικού και του γλουταματεργικού συστήματος.

3.5.1 Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Η βασική διάταξη του συστήματος της HPLC (Εικόνες 28, 29) αποτελείται από το σύστημα άντλησης της κινητής φάσης, τον απαερωτή κενού, το σύστημα έγχυσης του δείγματος, τη χρωματογραφική στήλη εντός κλίβανου, τον ανιχνευτή και το πρόγραμμα καταγραφής (Karkalousos P, 2015).



Εικόνα 3.8. Η βασική διάταξη ενός συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). (Karkalousos P, 2015).



Εικόνα 3.9. Απεικόνιση του συστήματος της HPLC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Σύστημα αποθήκευσης και άντλησης κινητής φάσης

Η αντλία του συστήματος HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν η αντλία δύο πιστονιών YL9112 Plus Isocratic Pump (YOUNG in Chromass) και ο ρόλος της είναι στην παροχή συνεχούς άντλησης και προώθησης της κινητής φάσης διαμέσου του συστήματος υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή. Η ροή της κινητής φάσης μέσα από το σύστημα της HPLC ρυθμίστηκε ισοκρατικά στα 0,2 mL/min για την ανίχνευση των επιπέδων κατεχολαμινών και 0,9 mL/min των αμινοξέων αντίστοιχα.

Απαερωτής κενού

Ο απαερωτής κενού είναι απαραίτητος για τη διάσπαση φυσαλίδων αέρα που μπορεί να σχηματιστούν εντός του συστήματος, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση του και την πίεση εντός της στήλης.

Χρωματογραφική στήλη

Οι στήλες χρωματογραφίας είναι το σημαντικότερο κομμάτι ενός μηχανήματος HPLC. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed-phase chromatography) όπου η στατική φάση είναι μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας, και η κινητή φάση είναι σχετικά πολικός διαλύτης όπως ύδωρ, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή κάποιο μείγμα τέτοιου τύπου ενώσεων. Κατά την έκλουση, το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο αφού κατακρατείται λιγότερο από την μη πολική στατική φάση. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Aquasil ODS για τις κατεχολαμίνες και η Hypersil™ ODS C18 για τα αμινοξέα αντίστοιχα (Columns from Thermo Scientific™), το πληρωτικό υλικό της οποίας αποτελείται από μακρινές αλυσίδες υδρογονανθράκων (C18), διαστάσεων 250mm μήκους * 4,6 mm εσωτερικής διαμέτρου και διάμετρο σωματιδίων 5μm.

Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής στην HPLC είναι ένα από τα πιο κρίσιμα στοιχεία του συστήματος, γιατί καθιστά ορατό το διαχωρισμό που επιτυγχάνεται μέσω της στήλης. Οι ανιχνευτές στην HPLC είναι συχνά παραδοσιακά αναλυτικά όργανα προσαρμοσμένα σε κυψελίδες ροής για να μετρούν χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών. (Skoog et al., 2020). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροχημικός ανιχνευτής DECADE Elite - Antec Scientific, κυψελίδα SenCell™ με γέφυρα άλατος (Ag/AgCl) βασιζόμενος στην αμπερομετρία. Οι ανιχνευτές αυτού του τύπου παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ευαισθησία, απλότητα και ευρεία χρήση, ενώ η λειτουργία τους βασίζεται στην οξειδωση ή αναγωγή δραστικών ομάδων των ουσιών στο δείγμα προς ανάλυση με αποτέλεσμα αυτές να ανιχνεύονται. Σημειώνεται ότι, τα αμινοξέα που εξετάστηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη (glu, GABA, gln) καθίστανται ανιχνεύσιμα μετά από κατάλληλη αντίδραση παραγωγοποίησης. Το δυναμικό του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή ρυθμίστηκε στα 800 Volt και το εύρος (range) στα 50 nA. Όσο πιο χαμηλά ρυθμίζεται η τιμή του range, τόσο πιο ευαίσθητο γίνεται το ηλεκτρόδιο να αντιδρά και να παράγει ηλεκτρικό ρεύμα, με αποτέλεσμα ο ανιχνευτής να έχει τη δυνατότητα να καταγράψει και τις πιο μικρές κορυφές.

Πρόγραμμα καταγραφής

Το σύστημα της HPLC ήταν συνδεδεμένο με υπολογιστή που είχε πρόγραμμα ανάλυσης (Clarity™) μέσω των οποίου γινόταν η συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των σημάτων των ανιχνευτών. Μέσω του προγράμματος έγινε σύνδεση των τμημάτων της HPLC ώστε να λειτουργεί κατά αυτοματοποιημένο τρόπο.

3.5.2 Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας

Παρασκευή διαλυμάτων:

A.Κινητή φάση

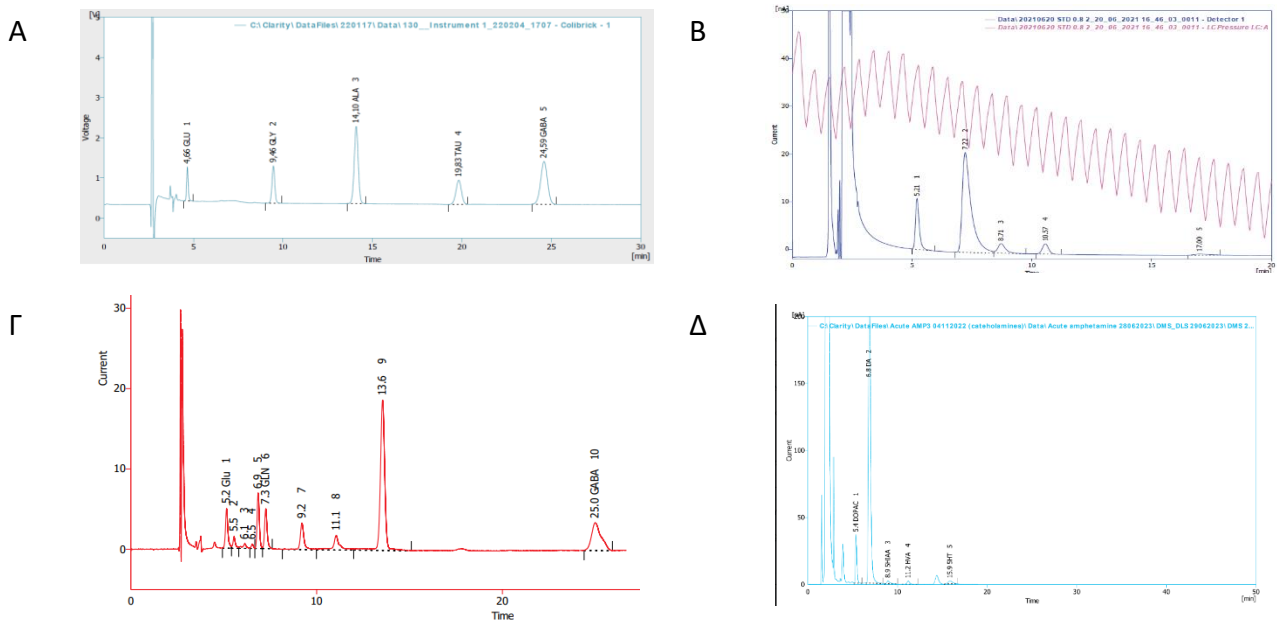
i.Παρασκευή κινητής φάσης για την εκτίμηση επιπέδων κατεχολαμινών

Η κινητή φάση, προκύπτει από ανάμειξη ρυθμιστικού διαλύματος (σε 1L δις απεσταγμένου νερού διαλύονται: 8,9 gr όξινου φωσφορικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 300 mg οκτυλοσουλφιδίου του νατρίου ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{SO}_4\text{Na}$) και 20 mg EDTA, pH = 3 ρυθμισμένο με ορθοφωσφορικό. 4°C) και ακετονιτριλίου (ACN) σε αναλογία 90:10, ενώ πριν εισέλθει στο σύστημα της HPLC πραγματοποιείται διήθηση/φιλτράρισμα του μίγματος της κινητής φάσης μέσω εξειδικευμένων μεμβρανικών φίλτρων Millipore μεγέθους πόρων 0,45μm.

ii.Παρασκευή κινητής φάσης για την εκτίμηση επιπέδων αμινοξέων (glu, gln, GABA)

Για την παρασκευή 500mL ρυθμιστικού διαλύματος κινητής φάσης ζυγίζονται 4,4g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Citric acid monohydrate), 10,3g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sodium dihydrogen phosphate dihydrate) και 190mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ακολουθεί ανάδευση σε 400mL ddH₂O, ρύθμιση pH=5,26 με χρήση διαλύματος HCl 4N και συμπληρώνεται ο υπόλοιπος όγκος μέχρι τα 500mL με ddH₂O. Έπειτα, γίνεται προσθήκη ακετονιτριλίου (ACN 70%) ώστε η τελική συγκέντρωση του στην κινητή φάση να είναι 5%. Αφού διηθηθεί υπό κενό η κινητή φάση τοποθετείται στο δοχείο αποθήκευσης της HPLC.

Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος έχει την ικανότητα να διατηρήσει σταθερό το pH του και κατά συνέπεια το baseline, μετά την εισαγωγή του δείγματος. Η τιμή του pH είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς μπορεί να καθορίσει την συνολική πολικότητα των ενώσεων, ενώ αλλαγή της πολικότητας όχι μόνο αλλάζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες αλλά επηρεάζει και τον τρόπο πρόσδεσής και συνεπώς και τον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με τη στατική φάση της στήλης. Σαν αποτέλεσμα αλλάζει ο χρόνος κατακράτησης της κάθε ένωσης εντός της στήλης το οποίο με την σειρά του επηρεάζει τον χρόνο που χρειάζεται η ένωση για να φτάσει στον ανιχνευτή. Με την τιμή του pH που επιλέχθηκε στην παρούσα εργασία τα αμινοξέα δεν είχαν μεταξύ τους τον ίδιο χρόνο έκλουσης και επομένως οι χρωματογραφικές κορυφές τους δεν αλληλοεπικαλύπτονταν (Εικόνα 31). Όσον αφορά τη χρήση του EDTA, λόγω της φύσης των αμινομάδων και των καρβοξυλομάδων που υπάρχουν στο μόριο του μπορεί και δρα σαν χηλικός υποκαταστάτης, σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα με ελεύθερα κατιόντα μετάλλων. που υπάρχουν εντός της στήλης και να τα αδρανοποιεί. Τα ιόντα αυτά υπό κανονικές συνθήκες μπορούν και οξινίζουν ελαφρώς την στήλη, διαταράσσοντας ελαφρώς την συνοχή του pH εντός της, κάτι που με την σειρά του δυσχεραίνει τον χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επίσης, μπορούν και σχηματίζουν ασθενείς δεσμούς με οργανικές ενώσεις, δηλαδή δημιουργούν σύμπλοκα με αυτές, το οποίο οδηγεί στην περαιτέρω κατακράτηση των ουσιών αυτών εντός της στήλης.



Εικόνα 3.11. Χαρακτηριστική εικόνα χρωματογραφήματος που απεικονίζει: Α. Τα πρότυπα για τα αμινοξέα, Β. Τα πρότυπα για τις κατεχολαμίνες, Γ. Πειραματικό δείγμα με αμινοξέα, Δ. Πειραματικό δείγμα με κατεχολαμίνες

Β. Διαλύματα παρακαταθήκης αμινοξέων (stock solutions)

Για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης των διαφορετικών αμινοξέων (Glu, Ala, Tau, Gln, GABA), ζυγίζονται ξεχωριστά 2mg των πρότυπων ουσιών. Μετά την ζύγισή τους, μεταφέρονται σε falcon όπου διαλύονται μέσω vortex με 10mL διαλύματος HClO₄ 0,2N. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτουν διαλύματα

παρακαταθήκης διαφορετικών αμινοξέων συγκέντρωσης 0,2mg/mL. Έπειτα, κάθε πρότυπο διάλυμα χωρίζεται σε κλάσματα που διατηρούνται στους -80°C.

Γ. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων εργασίας (standard solution)

Η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας γινόταν καθημερινά πριν τον έλεγχο των αγνώστων δειγμάτων, με σκοπό τον καθορισμό της καμπύλης γραμμικότητας της εκάστοτε ημέρας. Συγκεκριμένα συλλέγονται 100 μL από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (Glu, Ala, Tau, GLN, GABA), τα οποία και τοποθετούνται σε erpendorf, με τελικό όγκο $5 \cdot 100 \mu\text{L} = 500 \mu\text{L}$. Έπειτα στα ήδη υπάρχοντα 500μL γίνεται προσθήκη 500μL διαλύματος HClO₄ 0,2 N με αποτέλεσμα ο νέος όγκος του διαλύματος να διαμορφωθεί στο 1 mL. Το συγκεκριμένο διάλυμα ορίζεται αυθαίρετα ως Διάλυμα No 1 και αποτελεί το εναρκτήριο διάλυμα με βάση το οποίο παρασκευάζονται περαιτέρω αραιωμένα διαλύματα. Πιο συγκεκριμένα, από το Διάλυμα No 1 κατασκευάστηκε το Διάλυμα No 2 με τον εξής τρόπο. Από το διάλυμα No 1 λαμβάνονται 500 μL τα οποία και μεταφέρονται σε erpendorf. Έπειτα γίνεται προσθήκη άλλων 500μL καθαρού διαλύματος HClO₄ 0,2 N σε αυτά με τον τελικό όγκο να διαμορφώνεται εκ νέου στο 1mL. Το καινούριο διάλυμα No 2 περιέχει τα ίδια ακριβώς αμινοξέα με το διάλυμα No 1 στις ίδιες ακριβώς συνθήκες μόνο που συγκέντρωσή τους θα είναι το ½ σε σχέση με το No 1. Αντιστοίχως, παρασκευάζεται το διάλυμα No 3 από το No 2, στο οποίο οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων θα είναι στο ¼ του No 1. Ανάμεσα στις διάφορες αραιώσεις πραγματοποιείται ανάδευση του νεοσχηματισμένου διαλύματος με vortex.

Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων εργασίας για διαλύματα παρακαταθήκης που περιέχουν κατεχολαμίνες και μεταβολίτες (DA, DOPAC, HVA) πραγματοποιείται το ίδιο πρωτόκολλο με τη διαφορά του ότι συλλέγονται 50 μl από το διάλυμα στα οποία γίνεται προσθήκη 950 μL διαλύματος HClO₄ 0,2 N για την παρασκευή τελικού διαλύματος όγκου 1 mL.

Δ. Ομογενοποίηση ιστών και προετοιμασία δειγμάτων

Η ομογενοποίηση των εγκεφαλικών ιστών (DHIP, VHIP, PFC, DMS, DLS, NAc) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια συσκευής υπερήχων (Virasonic – UP 100H Ultraschallprozessor, dr. Hielscher GmbH). Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 250μL διαλύματος HClO₄ 0,2N και τοποθετήθηκαν για 2x20 sec στους υπερήχους, με ενδιάμεσο διάλειμμα 10 s για να μην καταστραφεί το δείγμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλη τη διαδικασία της ομογενοποίησης, τα erpendorf πρέπει να παραμένουν σε πάγο, καθώς μπορεί να αναπτύξουν υψηλή θερμοκρασία λόγω των υπερήχων. Στη συνέχεια, τα ομογενοποιημένα, φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο Erpendorf® (5415C), στις 14000 στροφές/λεπτό (r.p.m.) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία των 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, διαχωρίστηκαν και απομονώθηκαν με προσοχή τα υπερκείμενα διαλύματα από τα αντίστοιχα ιζήματα, τοποθετήθηκαν σε νέα Erpendorf (3 κλάσματα ανά δείγμα) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους. Σημειώνεται ότι, πριν την ανάλυσή τους, για κάθε δείγμα έγινε μια αραιώση 1:5 μόνο για την ανάλυση των αμινοξέων (οι κατεχολαμίνες δεν υπέστησαν περαιτέρω αραιώση), δηλαδή 5μL δείγματος προστέθηκαν σε 20μL ddH₂O και από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν τα 10μL για την αντίδραση με το OPA.

Ε. Καμπύλη βαθμονόμησης

Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον ποιοτικό προσδιορισμό μιας ένωσης όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ο ποιοτικός προσδιορισμός είναι απαραίτητη η εφαρμογή μιας κατάλληλης μεθόδου μέσω της οποίας η ένωση θα μπορέσει να ανιχνευτεί. Από την άλλη πλευρά, όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης, δεν αρκεί μόνο η σωστή μέθοδος αλλά επίσης η υπό εξέταση ένωση θα πρέπει να βρίσκεται εντός συγκεκριμένου εύρους συγκέντρωσης. Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει σε αυτό το εύρος η σχέση μεταξύ της έντασης του σήματος, που ανιχνεύεται από το ηλεκτρόδιο, να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των αμινοξέων των πρότυπων διαλυμάτων (standards solutions). Διαφορετικά αν η συγκέντρωση της υπό ανίχνευση ουσίας είναι πολύ μεγάλη, η ένταση του σήματος που θα καταγράψει ο ανιχνευτής δεν θα αντικατοπτρίζει την πραγματική ποσότητα της ένωσης που βρίσκεται εντός του διαλύματος. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι επειδή το ηλεκτρόδιο έχει ένα όριο ανίχνευσης, πάνω από το οποίο είναι αδύνατον να δώσει σωστά αποτελέσματα. Ουσιαστικά, το ηλεκτρόδιο δεν προλαβαίνει να οξειδώσει όλη την ποσότητα της ένωσης που ανιχνεύεται, με αποτέλεσμα το σήμα που αποστέλλει να είναι ελλιπές και κατά συνέπεια ψευδές. Για την κατασκευή της καμπύλης, χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα εργασίας No2 και No3 και ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα και η κανονικότητα. Η επαναληψιμότητα έγκειται στο να προκύπτει το ίδιο χρωματογράφημα κάθε φορά που αναλύονται τα πρότυπα διαλύματα μέσα στη μέρα. Όσον αφορά την κανονικότητα, θα πρέπει το εμβαδόν κάθε κορυφής να μειώνεται σχεδόν ανάλογα καθώς μειώνεται η συγκέντρωση των αμινοξέων στα πρότυπα διαλύματα. Σημειώνεται ότι η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευαζόταν καθημερινά πριν την ανάλυση των υπό εξέταση δειγμάτων και για κάθε αμινοξύ προέκυπτε μια βέλτιστη ευθεία. Όσο πιο κοντά στο 1 ήταν η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (correlation factor) τόσο πιο έγκυρη ήταν η γραμμικότητα.

ΣΤ. Εκτίμηση ντοπαμινεργικής λειτουργίας

Οι μετρήσεις των επιπέδων των νευροδιαβιβαστών και των μεταβολιτών τους χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της αντίστοιχης νευροδιαβιβαστικής λειτουργίας μέσω του υπολογισμού του ρυθμού ανακύκλισης (turnover ratio). Συγκεκριμένα, ο ρυθμός ανακύκλισης για τη ντοπαμίνη (DA) ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης του μεταβολίτη της ντοπαμίνης, DOPAC, προς την συγκέντρωση της ντοπαμίνης ή ο λόγος του μεταβολίτη HVA προς την DA. Αυτοί οι ρυθμοί ανακύκλισης είναι ενδεικτικοί για το ρυθμό απελευθέρωσης, επαναπρόσληψης και μεταβολισμού της ντοπαμίνης.

Εκτός από τους ρυθμούς ανακύκλισης, υπολογίστηκαν ακόμα οι αντίστροφοι τους λόγοι: DA/DOPAC ή DA/HVA, το άθροισμα της DA και του DOPAC ή του HVA: DA+DOPAC ή DA+HVA ως δείκτες ρυθμού βιοσύνθεσης της DA

Εκτίμηση γλουταματεργικής λειτουργίας

Αντίστοιχα για την εκτίμηση της γλουταματεργικής λειτουργίας πλην της εκτίμησης των ιστικών επιπέδων του glu, του GABA και του gln, υπολογίζονται και ο συντελεστής κύκλισης της γλουταμίνης (gln/glu) και η αναλογία GABA/glu, ως δείκτες που προσεγγίζουν τη λειτουργία του γλουταματεργικού ή δείκτες που σχετίζονται με την αναλογία διέγερσης/αναστολής.

3.6. Εκτίμηση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western

Οι αναλύσεις επίπεδων πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού από τις εγκεφαλικές περιοχές που απομονώθηκαν σε κάθε πειραματικό πρότυπο, όπως περιγράφεται στο 3.3. Η διαδικασία εκχύλισης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε και όλων των επόμενων βημάτων έχει ήδη περιγραφεί (Brakatselos et al., 2021; Roulia et al., 2021).

Συνοπτικά, οι ιστοί υπέστησαν ομογενοποίηση με τη χρήση υπερήχων και τη χρήση διαλύματος λύσης RIPA (Tris; NaCl; EDTA; SDS; NaDOC; Triton; Glycerol) , το οποίο εμπλουτίστηκε με αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών (RIPA+). Τα διαφορετικά δείγματα εκχυλισμάτων από κάθε περιοχή του εγκεφάλου αραιώθηκαν ώστε να έχουν όλα την ίδια συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών με τη βοήθεια της μεθόδου BCA (Bicinchoninic Acid) χρησιμοποιώντας το πακέτο BCA Protein Assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) και τη χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop. Έπειτα, τα εκχύλισμα πρωτεϊνών διαλύθηκαν σε διάλυμα Laemli και υπέστησαν θερμική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά. Ακολούθως φορτώθηκαν σε ηλεκτροφόρηση τύπου SDS-PAGE και μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης μεταφέρθηκαν μέσω διαδικασίας υγρής μεταφοράς (Criterion™ Blotter) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε διάλυμα αποκλεισμού των μη-ειδικών θέσεων (5% άπαχο γάλα σε TBS-Tween 0.1% για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου). Ακολούθησε η επώαση με πρωτογενές αντίσωμα (βλ. αναλυτική λίστα στον πίνακα 3.1.) για 16 ώρες σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C) και η επώαση με δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με επώαση στο σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) της εταιρείας Biorad, Clarity™ Western ECL Blotting Substrates, και τη χρήση του λογισμικού Quantity One, Chemidoc XRS software (Biorad), σε υπολογιστή συζευγμένο με ειδική κάμερα (Bio-Rad Laboratories). Η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης πρωτεΐνης μετρήθηκε με ημιποσοτικό τρόπο με χρήση του λογισμικού ImageJ. Η εκτίμηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της ERK1/2 πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογισμού της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης δια την ολική πρωτεΐνη ERK1/2.

Αντίσωμα	Εταιρεία - κωδικός	Είδος που αναπτύχθηκε	Αραίωση	Χρήση
Anti-NMDA R1 (GluN1)	Cell Signaling -5704	Rabbit mAb	1:1000	WB
Anti-NMDA R2A (GluN2A)	Cell Signaling -4205	Rabbit mAb	1:1000	WB
Anti-NMDA R2B (GluN2B)	Cell Signaling -14544	Rabbit mAb	1:1000	WB
Anti-AMPA A1 (GluA1)	Cell signaling-13185	Rabbit mAb	1:2000	WB
Anti-AMPA A2 (GluA2)	Cell signaling-13607	Rabbit mAb	1:2000	WB
Anti- p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell signaling- 4695	Rabbit mAb	1:5000	WB
Anti- phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell signaling- 9101	Rabbit mAb	1:5000	WB

Anti- β-actin	Cell signaling- 8457	Rabbit mAb	1:5000	WB
Anti- α-tubulin	Cell signaling- 8144	Rabbit mAb	1:5000	WB
Anti-vGAT	Synaptic systems- 131 003	Guinea pig mAb	1:1000	IHC
Anti- Cannabinoid Receptor I	Abcam -ab23703	Rabbit pAb	1:150	IHC
Anti- cholecystokinin 8	Abcam -ab37274	Mouse mAb	1:1000	IHC
Anti-Parvalbumin	Swant, UK - PV 235	Mouse mAb	1:5000	IHC
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Merck Millipore- #12-348	Goat	1:5000	WB
Chicken anti-rabbit Alexa 488	Invitrogen- A-21441	Chicken	1:1000	IHC
Donkey anti-mouse Alexa 594	Invitrogen- R37115	Donkey	1:1000	IHC
Goat anti-Guinea Pig Alexa 647	Invitrogen- A-21450	Goat	1:1000	IHC

Πίνακας 1: Λίστα αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

3.7. Καταγραφές δυναμικών πεδίου

3.7.1. Στερεοταξικό χειρουργείο τοποθέτησης των ηλεκτροδίων

Οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν σε ειδικό θάλαμο από plexiglass με την παροχή σεβοφλουρανίου (SevoFlo, Abbott, USA 8%) και μετά την επίτευξη όλες βαθειάς αναισθησίας, άμεσα μεταφέρθηκαν στη στερεοταξική συσκευή (KOPF, USA). Εκεί διατηρήθηκαν αναισθητοποιημένοι μέσω όλες χρήσης ειδικού αναπνευστήρα παροχής σεβοφλουρανίου (4%), ενώ η σωματική θερμοκρασία όλες διατηρήθηκε όλες 37°C μέσω ειδικού θερμαινόμενου υποστρώματος, συζευγμένου με θερμόμετρο (Stoelting, Ireland) και όλες κάλυψης μεγάλου μέρους του σώματος όλες με χρήση κουβέρτας κατά τη διάρκεια του χειρουργείου. Όλες αποφυγή του πόνου χορηγήθηκε λιδοκαΐνη (2%, B. Braun, Germany) υποδόρια στο σημείο όλες τομής ενώ στα μάτια των επίμυων τοποθετήθηκε ειδική οφθαλμική κρέμα ενυδάτωσης (Duratears Z, Alcon, USA).

Η διαδικασία τοποθέτησης των ηλεκτροδίων πραγματοποιήθηκε με βάση ήδη περιεγραμμένα πρωτόκολλα με ορισμένες τροποποιήσεις (Oliveira *et al.*, 2013). Συνοπτικά, ομοκεντρικά ηλεκτρόδια καταγραφής λευκόχρυσου/ιριδίου (400 μ m shaft diameter; 50-100 K Ω impedance; Science Products, Germany) τοποθετήθηκαν στερεοτακτικά στην περιοχή του όλες CA1 περιοχής του κοιλιακού ιππόκαμπου (vCA1) και στην προμεταιχμιακή περιοχή (prelimbic cortex, PL) του έσω προμετωπιαίου φλοιού. Παράλληλα, τοποθετήθηκε ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς σε απομακρυσμένες φλοιϊκές περιοχές του αντίθετου ημισφαιρίου για κάθε πειραματικό ηλεκτρόδιο. Χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς για κάθε ηλεκτρόδιο καταγραφής και όχι κοινό, ώστε να αποφευχθεί η διασταυρούμενη ανάγνωση σήματος μεταξύ PL και DMS. Με το πέρας όλες καταγραφής του ζεύγους των δομών PL και vCA1, πραγματοποιήθηκε ηλεκτρολυτική βλάβη

του ακριβούς σημείου καταγραφής στο vCA1 μέσω όλες εφαρμογής διφασικού ρεύματος 1 mA για 5 δευτερόλεπτα. Μετά την εφαρμογή του ρεύματος το ηλεκτρόδιο μετακινούνταν στο έσω ραχιαίο ραβδωτό (DMS) για την ταυτόχρονη καταγραφή με τον PL. Με την ολοκλήρωση των καταγραφών και από το δεύτερο ζεύγος περιοχών, εφαρμόστηκε κατά αντιστοιχία με το vCA1 όλες τάσης ρεύμα για τη σήμανση και των PL και DMS και χορηγήθηκε θανατηφόρος δόση πεντοβαρβιτάλης (140 mg/kg, i.p.). Όλες οι καταγραφές πραγματοποιήθηκαν στο αριστερό εγκεφαλικό ημισφαίριο και οι ακριβείς συντεταγμένες-στόχοι για κάθε ανατομική περιοχή αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα, βάσει του στερεοτακτικού άτλαντα του εγκεφάλου του επίμου Paxinos and Watson (2005).

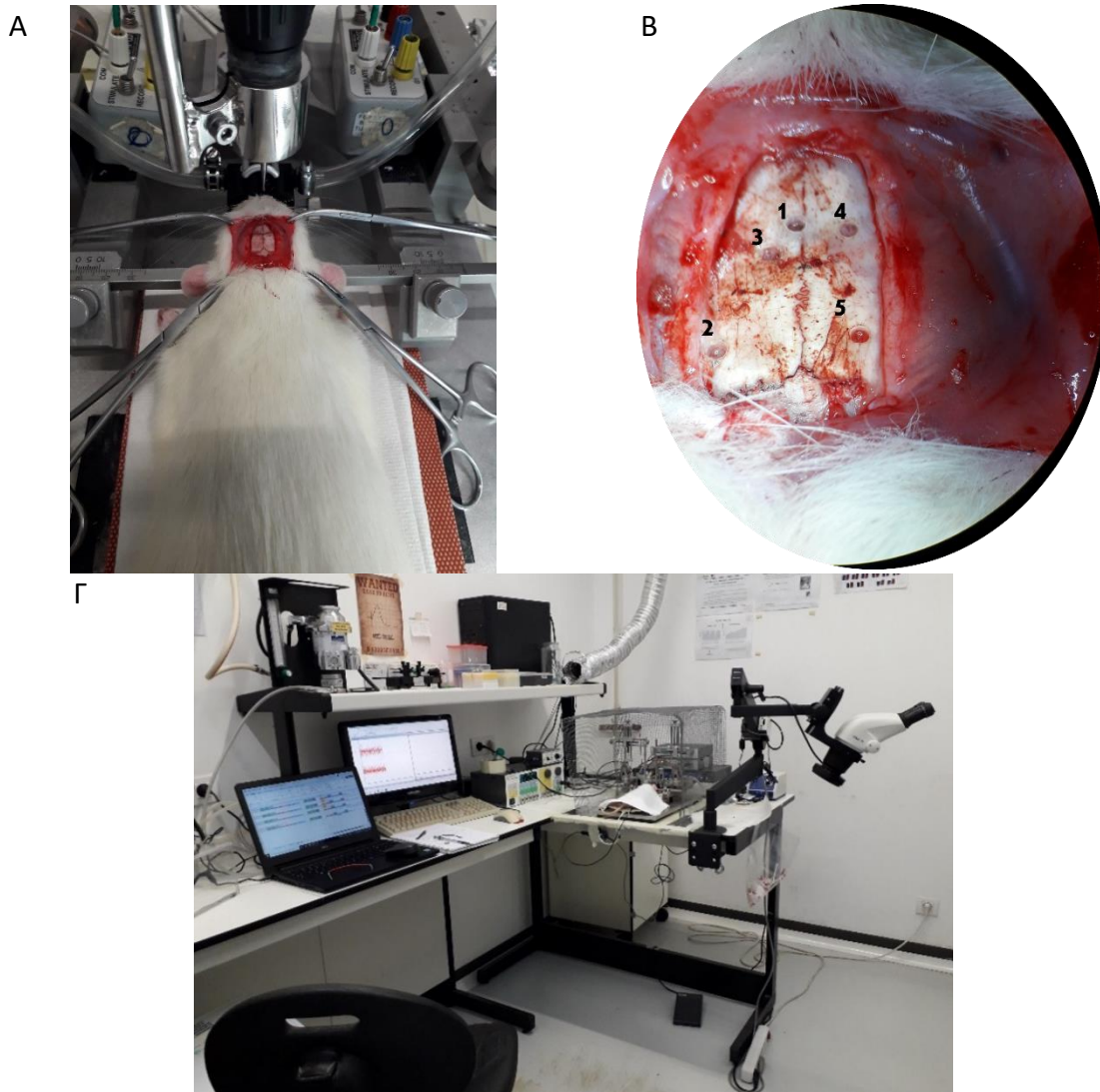
Στερεοτακτικοί άξονες	mPFC (PL)	VHIP (vCA1)	DMS
Ρυγχοουριαίος	3.6 mm	1.0 mm	-6.0 mm
Πλάγιος	0.6 mm	2.0 mm	5.5 mm
Ραχαιοκοιλιακός (καθοδικά από την επιφάνεια του εγκεφάλου)	2.8 mm	4.3 mm	4.9 mm

Πίνακας 2: Στερεοτακτικές συντεταγμένες στόχοι για κάθε εγκεφαλική περιοχή ενδιαφέροντος, βάσει Paxinos and Watson (2005)

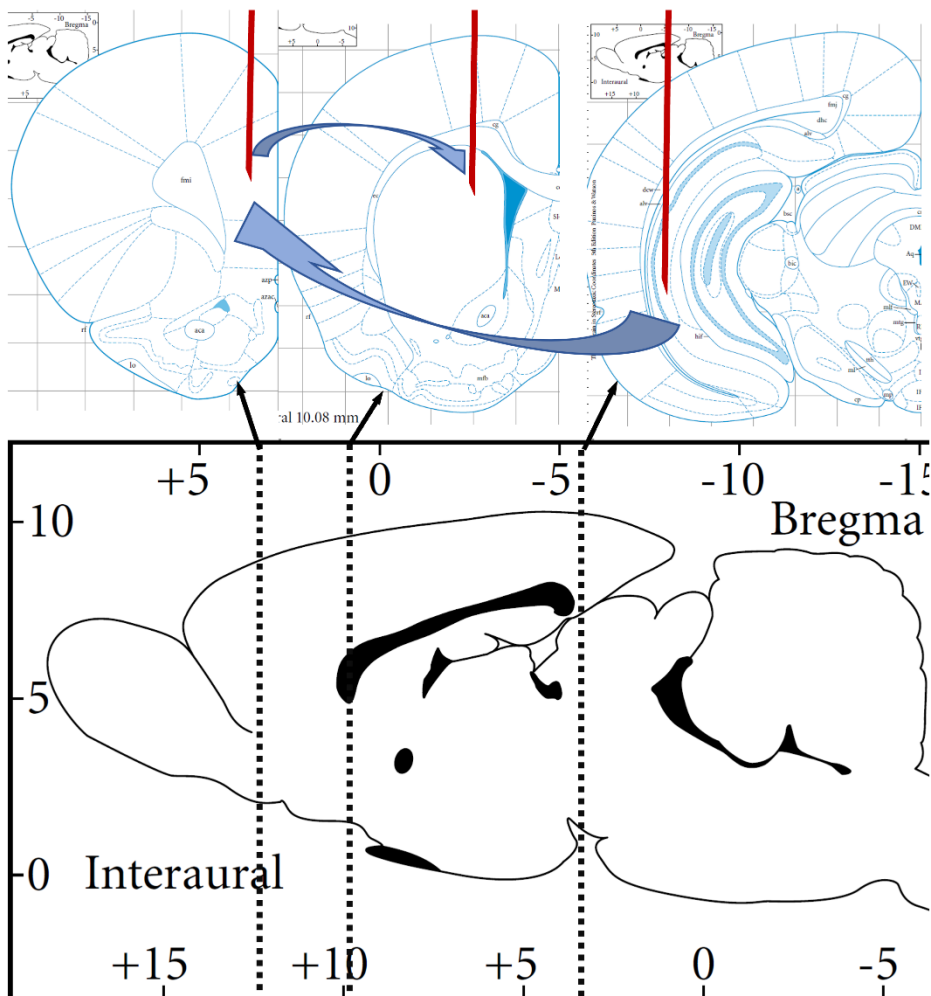
3.7.2. Καταγραφή και ανάλυση εξωκυττάρων δυναμικών πεδίου (LFPs)

Οι καταγραφές πραγματοποιήθηκαν άμεσα μετά τις τοποθετήσεις των ηλεκτροδίων βάσει πρωτοκόλλων που έχουν περιγράψει προηγουμένως με ορισμένες τροποποιήσεις (Oliveira *et al.*, 2013; Kafetzopoulos *et al.*, 2018). Συνοπτικά, τα σήματα ενισχύθηκαν, φιλτραρίστηκαν (5000x; 0.1–300 Hz; LP511 Grass Amplifier, Natus, USA) ανακτήθηκαν (Micro 1401mkII, CED, UK) και καταγράφηκαν με ρυθμό δειγματοληψίας 1000 Hz σε έναν προσωπικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού Signal Software (CED, UK).

Για τις αναλύσεις ισχύος και συνοχής καταγράφηκαν δυναμικά πεδίου από κάθε ζεύγος περιοχών για διάστημα 100 s. Η ανάλυση ισχύος από κάθε σημείο καταγραφής (PL, vCA1, DMS), όπως και η εκτίμηση της συνοχής μεταξύ των ζευγών που υπέστησαν ταυτόχρονη καταγραφή (PL -VHIP, PL-DMS) πραγματοποιήθηκε για κάθε επίμου. Η ισχύς και η συνοχή υπολογίστηκαν μέσω προσαρμοσμένου κώδικα γραμμένο στο μαθηματικό πακέτο MATLAB (MathWorks, USA) και των εργαλείων Chronux (<http://www.chronux.org>) (Mitra and Pesaran, 1999) για τις συχνότητες 1-40 Hz. Για την ανάλυση ισχύος και της συνοχής αξιολογήθηκαν τα δεδομένα που προήλθαν από το τετραγωνισμένο μέγεθος της ανάλυσης Fourier, τα οποία υπολογίστηκαν για κάθε διάστημα 1 s από τα 100 s της κάθε καταγραφής. Οι φασματικές πυκνότητες που αναλύθηκαν ήταν οι εξής: θ (4–12 Hz), β (12–20 Hz) και χαμηλές γ (20–40 Hz) (Oliveira *et al.* 2013).



Εικόνα 3.10: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τη διάταξη των στερεοτακτικών χειρουργείων και των ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών. Α. Τοποθέτηση του επίμου στο στερεοτακτικό, αποκάλυψη της επιφάνειας του κρανίου και ευθυγράμμιση του τρυπανιού με το βρέγμα. Β. Οι τρύπες που ανοίγουν με το τρυπάνι στο κρανίο προκειμένου να εισαχθούν τα ηλεκτρόδια. 1:PFC-PL, 2:VHIP-CA1, 3:DMS, 4:ηλεκτρόδιο αναφοράς, 5: ηλεκτρόδιο αναφοράς. Γ: Διάταξη του στερεοτακτικού και μονάδων καταγραφής. Είναι εμφανές το κουτί faraday, το στερεοτακτικό με τον επίμου, το στερεοσκόπιο, η αντλία σεβοφλουρανίου, το hardware που χρησιμοποιήθηκε για τις καταγραφές.



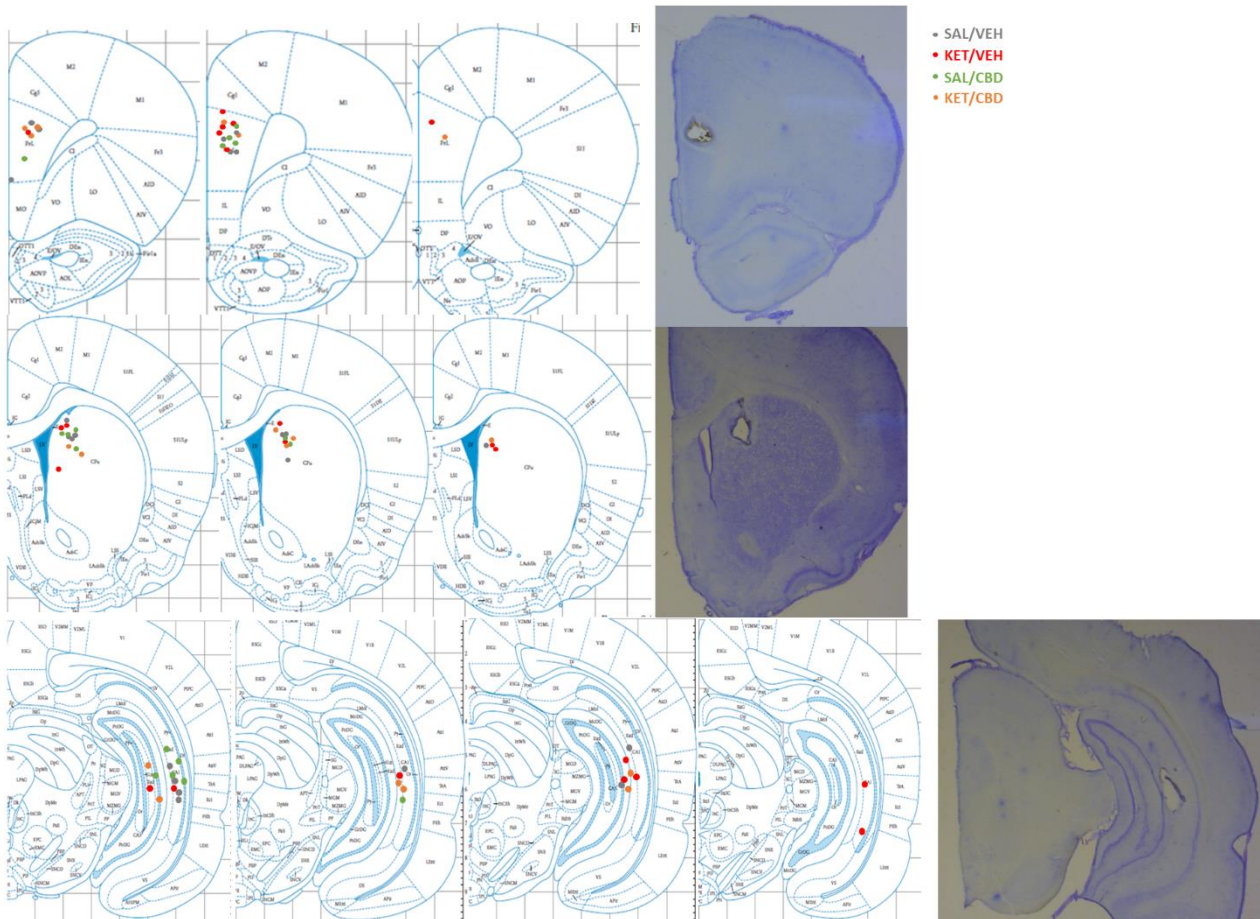
Εικόνα 3.11 . Ενδεικτική γραφική απεικόνιση των σημείων καταγραφής στον εγκέφαλο (κόκκινα βέλη) των αναισθητοποιημένων πειραματόζωων και η διάταξη των ζευγών που υπέστησαν ταυτόχρονη καταγραφή με σκοπό την μέτρηση των επιπέδων συγχρονισμού των νευρωνικών ταλαντώσεων. Σημάνσεις με βέλη πάνω σε απεικονίσεις από τον Άτλαντα του εγκεφάλου του επίμου από τον Α. Παζινό (6^η έκδοση).

3.7.3 Εκτίμηση των σημείων καταγραφής

Μετά τη χορήγηση της πεντοβαρβιτάλης ακολούθησε διακαρδιακή έκπλυση, μονιμοποίηση και απομόνωση του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε ύπτια θέση και μετά τη διάνοιξη του θώρακα, ένας καθετήρας διαπερνώντας την αριστερή κοιλία εισήλθε στο εσωτερικό της καρδιάς, ενώ σταδιακά προωθήθηκε μέχρι το αορτικό τόξο. Με τη χρήση ψαλιδιού προκλήθηκε διάτρηση στο δεξιό κόλπο και ~150 mL παγωμένου φυσιολογικού ορού διοχετεύτηκαν από τον καθετήρα με ρυθμό ~0.8 mL/δευτερόλεπτο, για επίμου βάρους 500 g. Ακολούθησε η διοχέτευση ~200 mL διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4% σε PBS.

Ακολούθησε η συλλογή του εγκεφάλου. Το αριστερό ημισφαίριο όπου υπέστη τις ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές τοποθετήθηκε σε 4% PFA για 24 ώρες και έπειτα κόπηκε σε τομές

πάχους 50 μm με τη χρήση vibratome (Leica Biosystems, Germany). Ακολούθησε χρώση με Cresyl Violet και λήψη εικονών από στερεοσκόπιο για τη διαπίστωση των σημείων των βλαβών. Σε περίπτωση τοποθέτησης του ηλεκτροδίου εκτός της περιοχής-στόχου, η αντίστοιχη καταγραφή αποσύρονταν από τα δεδομένα. Παρακάτω παρατίθεται χάρτης με όλα τα σημεία που πραγματοποιήθηκαν καταγραφές.



Εικόνα 3.12: Χάρτες με τα ακριβή σημεία των ηλεκτρολυτικών βλαβών που συνεπάγονται τα σημεία καταγραφών για κάθε πειραματόζωο που συμμετείχε στο πείραμα. Αριστερά βρίσκονται οι χάρτες σε πρότυπο από τον άτλαντα του εγκεφάλου του επίμου των Paxinos and Watson (2005). Στα δεξιά βρίσκεται από μια αντιπροσωπευτική εικόνα στερεοσκοπίου από τομές σημασμένες με χρώση nissl στις οποίες φαίνεται η βλάβη από την καύση της περιοχής. Από πάνω προς τα κάτω: PFC-PL, DMS, VH1P-CA1. Η αντίστοιχη πειραματικού γκρουπ που ανήκει το πειραματόζωο που αντιπροσωπεύει κάθε σημείο καταγραφής βάσει χρώματος πάνω δεξιά

3.8. Ανοσοσθήμανση έναντι παρβαλβουμίνης – καταμέτρηση αριθμού κυττάρων

Η ανοσοϊστοχημική σθήμανση της παρβαλβουμίνης (PV) πραγματοποιήθηκε στα δεξιά ημισφαίρια των εγκεφάλων των επίμυων που υπέστησαν ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές και οι εγκέφαλοί τους απομονώθηκαν κατόπιν διακαρδιακής έκπλυσης και μονιμοποίησης όπως αναγράφεται παραπάνω (βλ. 3.7).

Κατόπιν απομόνωσης τα δεξιά ημισφαίρια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 4% PFA και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Έπειτα μεταφέρθηκαν σε διάλυμα σουκρόζης 30% σε PBS +0.02% νατραζιδίου (sodium azide). Ακολούθησε η κοπή τους σε εγκάρσιες (coronal) τομές σε vibratome (Leica Biosystems, Germany) πάχους 50 μm, όπου για το παρόν πρωτόκολλο συλλέχθηκε κάθε 6^η τομή (300 μm απόσταση διαδοχικών τομών στο ρυγχοουριαίο άξονα).

Οι περιοχές ενδιαφέροντος προς χρώση συμπεριλήφθηκαν ο έσω προμετωπιαίος φλοιός, ο ραχιαίος και ο κοιλιακός ιππόκαμπος. Συλλέχθηκαν 5 τομές από κάθε περιοχή ενδιαφέροντος κάθε πειραματοζώου και υπέστησαν επώαση με τα απαραίτητα αντισώματα προκειμένης της σθήμανσης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος βάσει του παρακάτω πρωτοκόλλου:

Ανοσοϊστοχημική σθήμανση τομών εγκεφαλικού ιστού έναντι της πρωτεΐνης παρβαλβουμίνης: Πρωτόκολλο σθήμανσης τομών				
	Επαναλήψεις	Διάρκεια	Θερμοκρασία	
Πρωτογενές αντίσωμα	3x	10min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	Πλύση με PBS
	1x	1h	Θ.Δ./υπό ανάδευση	διάλυμα αποκλεισμού: 10% αμνιακός ορός βοοειδούς (FBS) σε PBS - Triton 0.5% Triton.
		16h	4°C/ υπό ανάδευση	Mouse mAb a-Parvalbumin (SWANT, UK) (1:5000) σε 2% FBS 0.3% σε PBS-Triton X 0.3%
		16h	4°C/ υπό ανάδευση	Αρνητικός μάρτυρας 2% FBS 0.3% σε PBS-Triton X 0.3%
Δευτερογενές αντίσωμα	3x	10min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	Πλύσεις με PBS-Triton X 0.3%
		2h	4°C / υπό ανάδευση	donkey anti-mouse Alexa 594 (1:1000) in 0.3% in PBS-Triton X 0.3%
	2x	5 min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	πλύσεις με PBS-Triton X 0.3%
		10 min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	Επώαση DAPI 1:1000
	3x	10min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	Πλύσεις με PBS- Triton X 0.3%
		16 h		Ενσωμάτωση σε αντικειμενοφόρο με DPX

Η λήψη εικόνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού (Olympus IX81 Widefield Inverted microscope). Συγκεκριμένα 4 συνεχόμενες τομές από κάθε περιοχή ενδιαφέροντος για κάθε επίμυ απεικονίστηκαν. Οι εικόνες που ελήφθησαν ήταν σύνθεση επιμέρους μεμονομένων εικόνων (tiles) που

πάρθηκαν με φακό 20x και ενοποιήθηκαν από το ειδικό λογισμικό της Olympus ώστε να αποδοθεί αναλυτική αναπαράσταση κάθε περιοχής ενδιαφέροντος που να δίνει τη δυνατότητα καταμέτρησης της πυκνότητας των PV+ ανοσοθετικών κυττάρων στα διαφορετικά ανατομικά διαμερίσματά της.

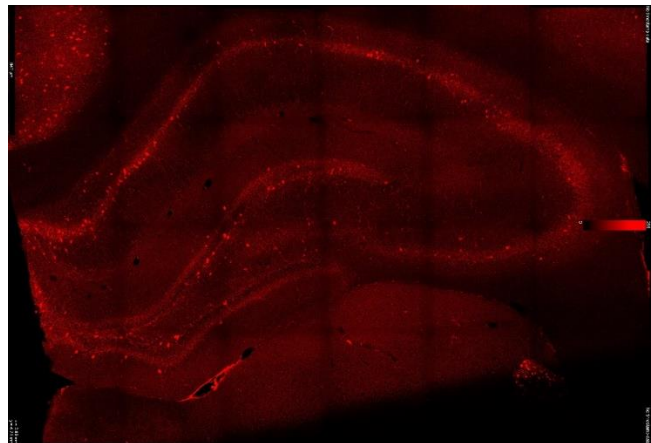
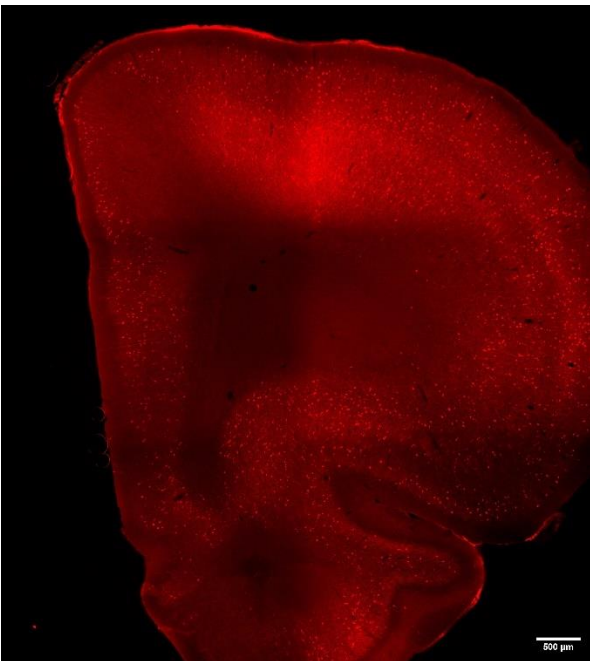
Ρυθμίσεις μικροσκοπίου για τη λήψη εικόνων:

- Ανάλυση: 1376x1078
- Ρυθμίσεις ανάλυσης κάμερας -> Histogram: 12-bit
- DAPI: Χρόνος έκθεσης=30 ms, ψηφιακή μεγέθυνση σήματος=0
- TRICH: Χρόνος έκθεσης=100 ms, ψηφιακή μεγέθυνση σήματος

Καταμέτρηση ανοσοθετικών PV+ κυττάρων:

Η καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Fiji/ImageJ κατόπιν ανάπτυξης ειδικών μακροεντολών σε γλώσσα java.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων αξιοποιήθηκαν 3 τομές ανά εγκεφαλική περιοχή, βάσει της εγκυρότητας των ανατομικών τους διαμερισμάτων σε σχέση με τις ανάγκες της ανάλυσης. Υπολογίστηκε η μέση πυκνότητα ανοσοθετικών PV+ κυττάρων για κάθε ανατομικό διαμέρισμα ενδιαφέροντος κάθε πειραματόζωου, βάσει του αριθμού των κυττάρων και του εμβαδού της περιοχής ενδιαφέροντος σε mm². Οι περιοχές ενδιαφέροντος σχεδιάστηκαν βάσει του άτλαντα του εγκεφάλου του επίμου.



Εικόνα 3.13: Αντιπροσωπευτικές εικόνες τομής που περιέχει τον mPFC (αριστερά) και το ραχιαίο υπόκαμπο (δεξιά) με σημειωμένη την πρωτεΐνη PV, όπου μπορούν να διακριθούν τα κύτταρα που την εκφράζουν.

3.9. Εκτίμηση μεταβολών στην έκφραση των CB1 υποδοχέων στις ανασταλτικές απολήξεις των CCK ανοσοθετικών κυττάρων.

Κατά αντιστοιχία του 3.8, ένα διαφορετικό σετ τομών κοιλιακού υποκάμπτου που προέκυψε από κάθε πειραματόζωο που υπέστη ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές, διακαρδιακή έκπλυση και μονιμοποίηση, απομόνωση και κόψιμο του εγκεφάλου σε εγκάρσιες τομές. Σκοπός του δεδομένου πειράματος η εκτίμηση μεταβολών στην έκφραση των υποδοχέων CB1 πάνω στα σημεία συν-εντοπισμού CCK-8 και vGAT.

Για κάθε πειραματόζωο επιλέχθηκαν 5 διαδοχικές τομές που περιέχουν τον κοιλιακό υποκάμφο με σημείο αναφοράς τη θέση των -5,6 mm στο ρυγχοουριαίο άξονα, βάσει του άτλαντα του εγκεφάλου του ανήλικου επίμου (Paxinos and Watson, 2004). Οι τομές αυτές υπέστησαν χρώση βάσει του πρωτόκολλου επώασεων που περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα.

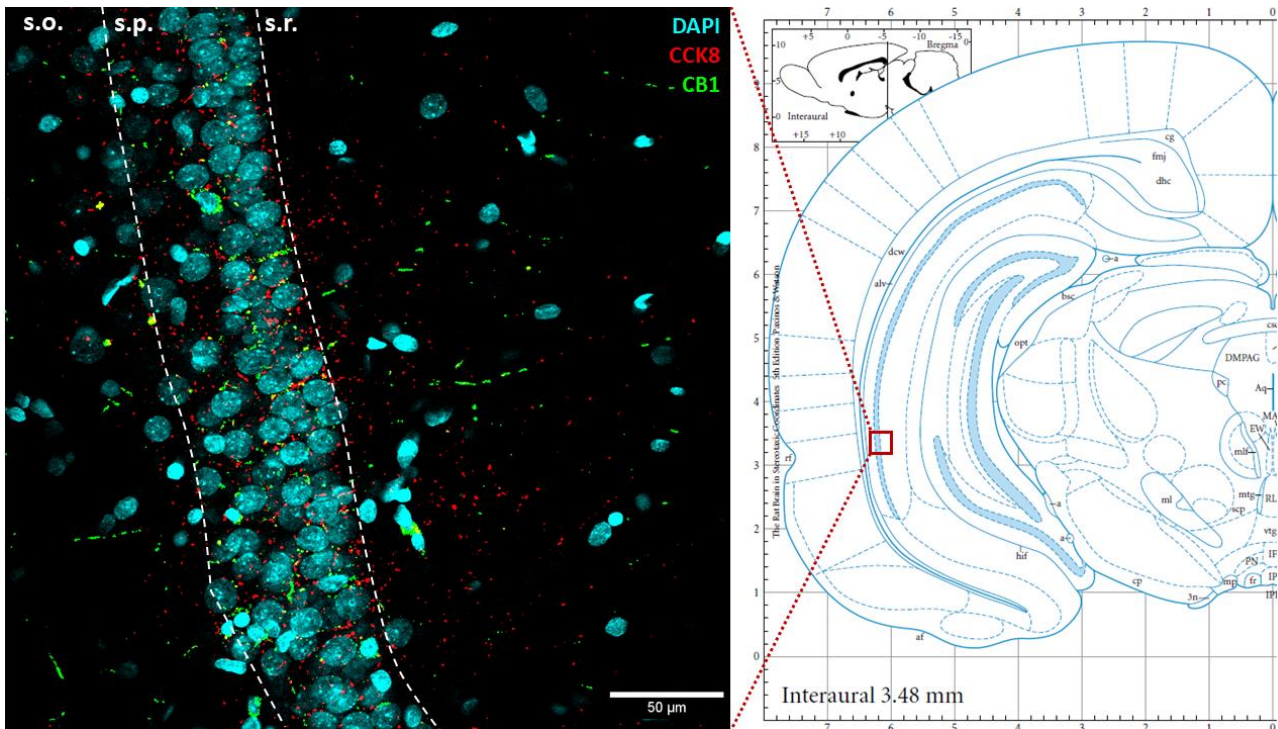
Εντοπισμός υποδοχέων CB1 στις ανασταλτικές απολήξεις των νευρώνων που εκφράζουν CCK: Πρωτόκολλο σήμανσης τομών				
	Επανάληψεις	Διάρκεια	Θερμοκρασία	
Πρωτογενές αντίσωμα	3x	10min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	Πλύση με PBS
	1x	1h	Θ.Δ./υπό ανάδευση	Επώαση με διάλυμα αποκλεισμού: 10% αμνιακός ορός βωοειδούς (FBS) σε PBS -Triton 0.5% Triton.
		16h	4°C/ υπό ανάδευση	Συνεπώαση: Mouse mAb a-CCK8 (1:1000) Rabbit pAb a-CB1R (1:150) Guinea pig mAb a-vGAT (1:1000) σε 2% FBS 0.3% in PBS-Triton X 0.3%
		16h	4°C/ υπό ανάδευση	Negative control 2% FBS 0.3% in PBS-Triton X 0.3%

Δευτερογενές αντίσωμα	3x	10min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	Πλύση με PBS
		2h	4°C / υπό ανάδευση	Συνεπώαση: donkey anti-mouse Alexa 594 (1:1000) chicken anti-rabbit Alexa 488 (1:1000) goat anti-GP Alexa 647 (1:1000) σε 0.3% σε PBS-Triton X 0.3%
	2x	5 min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	πλύσεις με PBS-Triton X 0.3%
		10 min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	Επώαση DAPI 1:1000
	3x	10min	Θ.Δ./υπό ανάδευση	πλύσεις με PBS-Triton X 0.3%
		overnight		Πλύσεις με PBS- Triton X 0.3%

Μετά την επώαση ακολούθησε έλεγχος της επιτυχούς σήμανσης των τομών σε μικροσκόπιο φθορισμό, ενώ η λήψη εικόνων πραγματοποιήθηκε μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου (Olympus confocal FL1000V).

Για τη λήψη εικόνων επιλέχθηκαν 3 συνεχόμενες τομές από κάθε πειραματόζωο από τις οποίες ελήφθησαν 2 εικόνες από την κάθε μια. Οι εικόνες λαμβάνονταν από την περιοχή CA1 του κοιλιακού υποκάμπτου και περιείχαν πάντα τμήματα των επιμέρους δομών: stratum oriens, stratum pyramidae, stratum radiatum (βλέπε εικόνα).

Οι εικόνες αποτελούνταν από 20 επίπεδα στον κάθετο άξονα (z) που απέιχαν μεταξύ τους 1 μm (step size=1.0) και αποτελούνταν από 4 διαφορετικά κανάλια εκπομπής-απορρόφησης, βάσει των επιλεγμένων φθοριωχρωμάτων. Ο φακός που χρησιμοποιήθηκε ήταν 40x (UPLSAPO 40X NA:0.90) και η ανάλυση τέθηκε στο 1024x1024.



Εικόνα 3.14: Αντιπροσωπευτική εικόνα από τις τομές σημασμένες με CCK8, CB1 και VGAT. Η εικόνα έχει ληφθεί μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου (Olympus FL1000V, 40x, 1 focal plane) στην οποία αναγράφονται τα ανατομικά διαμερίσματα που απεικονίζονται (πάνω με λευκά), ενώ στα δεξιά εμφανίζεται το ανατομικό σημείο λήψης της εικόνας, το οποίο αντιπροσωπεύει γενικά τις εικόνες που ελήφθησαν στο συγκεκριμένο πείραμα (ραχοκοιλιακά και πλαγίως ακριβής αντιπροσώπευση, στον εμπροσθοποσθιο άξονα το σημείο λήψη εικόνων διαφοροποιείται μετακινείται +/- 500 μm).

Η ανάλυση του ληφθέντος σήματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Fiji/ImageJ κατόπιν ανάπτυξης ειδικών μακροεντολών σε γλώσσα java.

3.10. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού στατιστικών αναλύσεων SPSS (Version 26.0, Windows OS).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων όπου οι διαφορετικές πειραματικές ομάδες διαφοροποιούνται αποκλειστικά από έναν παράγοντα (πχ διαφορετικές δόσεις ενός φαρμάκου) χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση (one way ANOVA). Ακολούθησαν των αναλύσεων μεταβλητότητας οι απαραίτητες συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών ομάδων πειραματοζώων (Post Hoc τύπου Bonferroni).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων όπου οι διαφορετικές πειραματικές ομάδες διαφοροποιούνται από δυο παράγοντες (πχ ύπαρξη η μη για 2 διαφορετικά φάρμακα) χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (two way ANOVA). Ακολούθησαν αντίστοιχα οι απαραίτητες συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών ομάδων πειραματοζώων (Post Hoc τύπου Bonferroni).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων όπου οι διαφορετικές πειραματικές ομάδες διαφοροποιούνται από δυο παράγοντες (πχ ύπαρξη η μη για 2 διαφορετικά φάρμακα), ενώ αποδίδουν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του ίδιου αντικειμένου για δεδομένη μεταβλητή, χρησιμοποιείται η ανάλυση μεταβλητότητας κατά τρεις διευθύνσεις (three way repeated measures ANOVA), με τον παράγοντα που καθορίζει τους βαθμούς των επαναλήψεων ως παράγοντα εσωτερικά των αντικειμένων (within subject factor). Παρομοίως ακολουθούν οι απαραίτητες συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών ομάδων πειραματοζώων (Post Hoc τύπου Bonferroni).

Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε αυτό του 0.05 ($p \leq 0.05$), ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος (mean) \pm SEM (Standard Error of the Mean), με εξαίρεση τα γραφήματα που υιοθετήθηκαν από τη μελέτη Brakatselos et al., 2020, και αφορούν την επίδραση της κανναβιδιόλης στο πειραματικό πρότυπο οξείας κεταμίνης. Τα δεδομένα εκείνα παρουσιάζονται υπό τη μορφή θηκογράμματος αντιπροσωπεύοντας τη διάμεση τιμή (ενδιάμεση γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

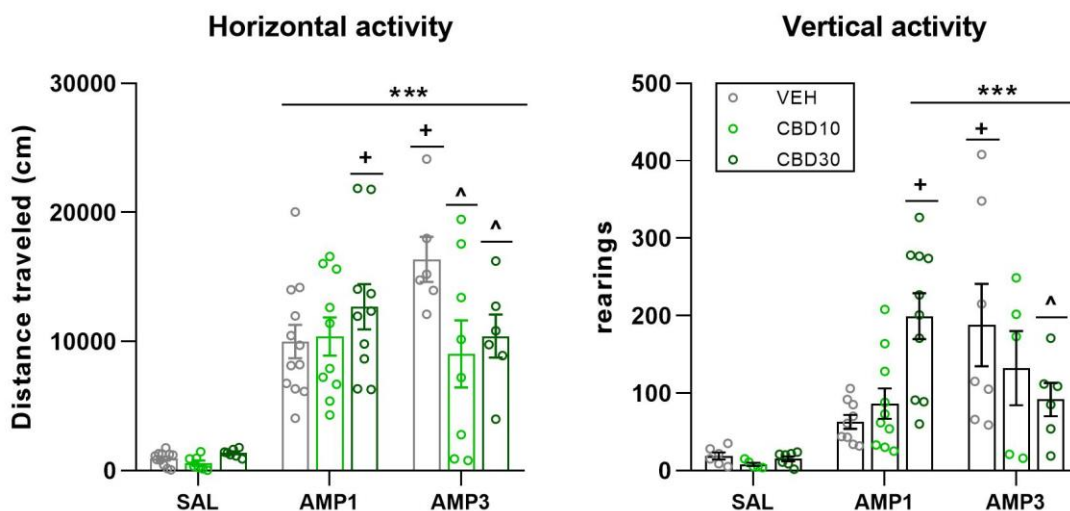
4.1 Οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης

4.1.1 Επίδραση της CBD στο κινητικό πρότυπο της οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης

Η μελέτη της επίδρασης της οξείας χορήγησης CBD στο κινητικό πρότυπο της d-αμφεταμίνης εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις έχοντας ως παράγοντες τη χορήγηση CBD (δόσεις 0, 10, 30 mg/kg) και τη χορήγηση d-αμφεταμίνης (AMP σε δόσεις 0, 1, 3 mg/kg).

Η συγκεκριμένη ανάλυση έδειξε ότι η αλληλεπίδραση της χορήγησης CBD με τη χορήγηση AMP επηρεάζουν την οριζόντια κινητικότητα των επίμυων όπως αυτή εκφράζεται ως απόσταση που διένυσαν στο ανοικτό πεδίο [$F_{(4,66)}=2.542$, $p=0.048$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις των επιμέρους ομάδων με διορθώσεις κατά Bonferroni υποστήριξαν τη στατιστικά σημαντική αύξηση της οριζόντιας κινητικότητας για τις ομάδες VEH/AMP1, VEH/AMP3, CBD10/AMP1, CBD30/AMP1, CBD30/AMP3, CBD30/AMP3 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p<0.001$). Επιπρόσθετα, η ομάδα AMP3/VEH εμφάνισε αυξημένη οριζόντια κινητικότητα συγκριτικά με την ομάδα (AMP1/VEH $p=0.003$), ενώ οι ομάδες AMP3/CBD10 και AMP3/CBD30 εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα AMP3/VEH ($p=0.005$, $p=0.047$ αντίστοιχα) (Γράφημα 4.1).

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για την κάθετη κινητικότητα έδειξε ότι επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά λόγω της αλληλεπίδρασης CBDxAMP [$F_{(4,68)}=4.623$, $p=0.002$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων υποστήριξαν τη στατιστικά σημαντική αύξηση της κάθετης κινητικότητας για τις ομάδες, VEH/AMP3, CBD30/AMP1, CBD30/AMP1, CBD30/AMP3 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p<0.001$). Επιπρόσθετα, η ομάδα AMP3/VEH εμφάνισε αυξημένη κάθετη κινητικότητα συγκριτικά με την ομάδα AMP1/VEH ($p=0.004$), ενώ η ομάδα AMP3/CBD10 εμφάνισε στατιστικά σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα AMP3/VEH ($p=0.027$). Εστιασμένες αναλύσεις ανέδειξαν την αυξημένη κάθετη κινητικότητα λόγω οξείας χορήγησης αμφεταμίνης συγκριτικά με την ομάδα εκδόχων ($p=0.031$) (Γράφημα 4.1).



Γράφημα 4.1: Επίδραση της CBD στην υπερκινητικότητα που προκαλείται από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης (αριστερά η κάθετη και δεξιά η οριζόντια κινητικότητα). ***: vs SAL/VEH, $p<0.001$; +: vs VEH/AMP1, $p<0.05$; ^: vs VEH/AMP3, $p<0.05$.

4.1.2. Επίδραση της CBD ως προς την εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού

Η επίδραση της οξείας χορήγησης CBD και της οξείας χορήγησης AMP στη συμπεριφορά προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού εκτιμήθηκε πραγματοποιώντας στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις κατά τρεις διευθύνσεις (three-way repeated-measures ANOVA), με τη χορήγηση CBD και τη χορήγηση AMP ως παράγοντες μεταξύ των μετρήσεων (between-subjects factors) και την ένταση του προπαλμικού ερεθίσματος ως παράγοντα συνδεδεμένο με τις ίδιες μετρήσεις (within-subject factor).

Το μέγεθος της προ-παλμικής αναστολής στο αντανακλαστικό αιφνιδιασμού δε βρέθηκε να επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά από την ένταση του προ-παλμικού ερεθίσματος [$F_{(2,28)}=2.812$, $p=0.077$], όπως και από την αλληλεπίδραση, CBDxAMP [$F_{(1,27)}=1.051$, $p<0.327$].

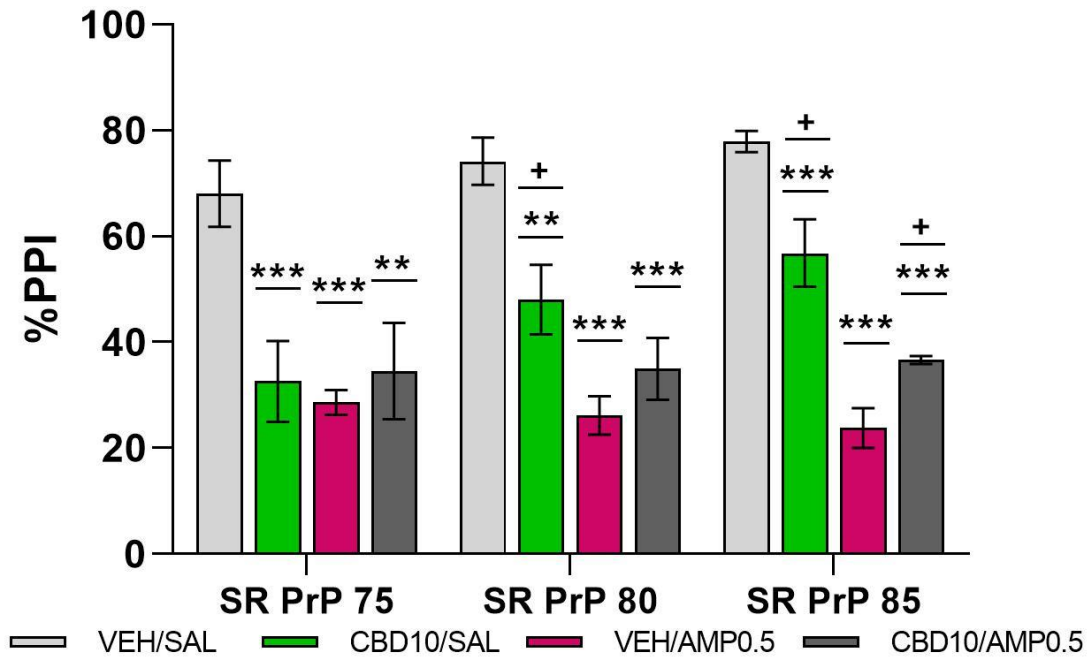
Εστιάζοντας σε κάθε μέγεθος προ-παλμικού ερεθίσματος ξεχωριστά, αξίζει να σημειωθεί ότι προκύπτουν στατιστικά σημαντικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, για το προ-παλμικό ερέθισμα των 75 kDa, η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (AMP, CBD) αναδεικνύει την αλληλεπίδραση AMPxCBD να επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά την αναστολή του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού [$F_{(1,18)}=11,00$, $p=0.004$]. Στις ακόλουθες συγκρίσεις των επιμέρους ομάδων εμφανίζεται μείωση για τις πειραματικές ομάδες CBD/SAL και VEH/AMP σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.001$, $p<0.001$) (Γράφημα 4.2).

Αντίστοιχα για το προ-παλμικό ερέθισμα των 80 kDa, η αλληλεπίδραση CBDxAMP επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την αναστολή του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού [$F_{(1,18)}=11.700$, $p=0.003$]. Στις ακόλουθες συγκρίσεις των επιμέρους ομάδων εμφανίζεται μείωση για τις πειραματικές ομάδες CBD/SAL και VEH/AMP σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.002$, $p<0.001$ αντίστοιχα) (Γράφημα 4.2).

Για το προ-παλμικό ερέθισμα των 85 kDa, η αλληλεπίδραση CBDxAMP επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την αναστολή του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού [$F_{(1,19)}=20.935$, $p<0.001$]. Στις ακόλουθες συγκρίσεις των επιμέρους ομάδων εμφανίζεται μείωση για τις πειραματικές ομάδες CBD/SAL και VEH/AMP σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.001$, $p<0.001$) (Γράφημα 4.2).

Ας σημειωθεί ότι για το προπαλμικό ερέθισμα των 80 kDa παρατηρήθηκε αυξημένη αναστολή για την ομάδα CBD/SAL συγκριτικά με την οξεία χορήγηση αμφεταμίνης ενώ για το προπαλμικό ερέθισμα των 85 kDa παρατηρήθηκε αυξημένη αναστολή στις ομάδες CBD/SAL και CBD/AMP συγκριτικά με την οξεία χορήγηση αμφεταμίνης ($p=0.041$, $p=0.018$, $p=0.042$) (Γράφημα 4.2).

Προ-παλμική αναστολή αντανακλαστικού αιφνιδιασμού



Γράφημα 4.2: Η επίδραση της CBD στη διαταραχή της προ-παλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού (PPI) που προκαλείται από την οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης. ***: vs SAL/VEH, $p < 0.001$; **: vs SAL/VEH, $p < 0.01$; +: vs VEH/AMP0.5, $p < 0.05$.

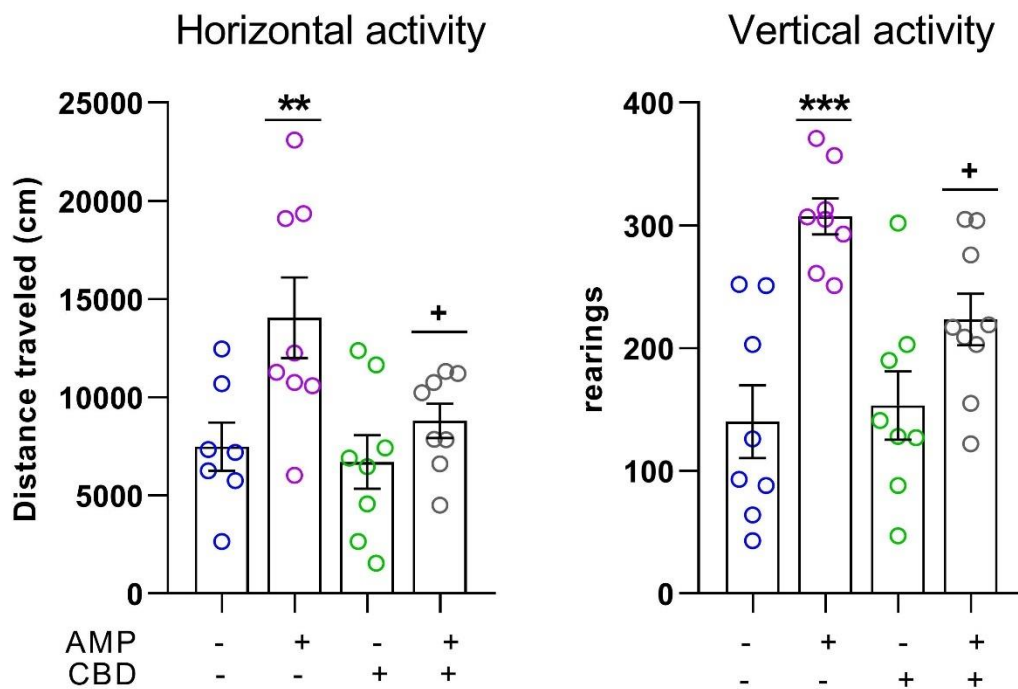
4.2 Επαναλαμβανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης

4.2.1. Εκτίμηση κινητικού προτύπου μετά από οξεία χορήγηση αμφεταμίνης (challenge) σε επίμυες υπερευαισθητοποιημένους σε αμφεταμίνη και ο αντισταθμιστικός ρόλος της CBD

Για τη μελέτη της επίδρασης της επαναλαμβανόμενης χορήγησης d-αμφεταμίνης στο κινητικό πρότυπο μετά από οξεία d-αμφεταμίνη πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις με παράγοντες την επαναλαμβανόμενη χορήγηση αμφεταμίνης (AMP) και την επαναλαμβανόμενη χορήγηση CBD (CBD), ενώ ακολούθησαν posthoc συγκρίσεις των επιμέρους πειραματικών ομάδων με διορθώσεις κατά Bonferroni.

Η οριζόντια κινητικότητα μετά από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης, όπως αυτή εκφράζεται ως διανυθείσα απόσταση στο ανοικτό πεδίο, βρέθηκε ότι επηρεάζεται από τη χορήγηση AMP [$F_{(1,28)} = 10.073$, $p = 0.004$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις έδειξαν ότι τα πειραματόζωα της ομάδας AMP/VEH εμφάνισαν αυξημένη οριζόντια κινητικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.006$) (Γραφήμα 4.3).

Η κάθετη κινητικότητα, όπως αυτή εκφράζεται από τον αριθμό των κάθετων ανορθώσεων, βρέθηκε ότι επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση AMP×CBD [$F_{(1,29)} = 4,149$, $p = 0.051$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις έδειξαν ότι η ομάδα AMP/VEH εμφάνισε αυξημένη κάθετη κινητικότητα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$), ενώ η ομάδα AMP/CBD εμφάνισε μειωμένη κάθετη κινητικότητα σε σχέση με την ομάδα AMP/VEH ($p = 0.044$), αλλά και τάση για αύξηση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.055$) (Γράφημα 4.3).



Γράφημα 4.3: Δοκιμασία d-αμφεταμίνης στο ανοικτό πεδίο μετά από το πρωτόκολλο χρόνιας αυξανόμενης d-αμφεταμίνης ή/και χρόνιας CBD. Αριστερά η οριζόντια και δεξιά η κάθετη κινητικότητα μετά από τη χορήγηση 1 mg/kg d-αμφεταμίνης. ***: vs SAL/VEH, $p < 0.001$; **: vs SAL/VEH, $p < 0.01$; +: vs SAL/VEH

4.2.2 Εκτίμηση ντοπαμινεργικής δραστηριότητας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επίμωων ευαισθητοποιημένων στην επαναλαμβανόμενη χορήγηση αμφεταμίνης

Προμετωπιαίος φλοιός (PFC)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά 2 διευθύνσεις με τους παράγοντες χορήγηση AMP και χορήγηση CBD, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις υπό μελέτη παραμέτρους. Παρατηρήθηκαν μόνο τάσεις που δεν άγγιξαν το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας, με κυριότερη την τάση για αύξηση της προμετωπιαίας συγκέντρωσης DA για την ομάδα AMP/VEH συγκριτικά με την ομάδα SAL/VEH.

PFC	SAL/VEH	AMP/VEH	SAL/CBD	AMP/CBD
DOPAC (μg/g)	0.048 ± 0.004	0.054 ± 0.004	0.054 ± 0.004	0.046 ± 0.003
DA (μg/g)	0.106 ± 0.005	0.140 ± 0.012	0.122 ± 0.015	0.127 ± 0.011
DOPAC/DA	0.458 ± 0.044	0.408 ± 0.053	0.483 ± 0.074	0.359 ± 0.029
DOPAC+DA	0.154 ± 0.007	0.195 ± 0.013	0.176 ± 0.017	0.172 ± 0.012

Ραχιαίος ιππόκαμπος (DHIP)

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για το DHIP ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική επίδραση της αλληλεπίδρασης AMPxCBD ως προς τα επίπεδα DA [$F_{(1,26)} = 5,411$, $p=0.030$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους πειραματικών ομάδων υποστήριξαν την αύξηση στα επίπεδα DA που εμφανίζει η ομάδα AMP/VEH συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.029$).

Επίσης παρατηρήθηκε ότι η αλληλεπίδραση των δυο φαρμάκων είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στο ρυθμό ανακύκλωσης DOPAC/DA [$F_{(1,26)} = 8,195$, $p=0.009$]. Οι posthoc συγκρίσεις ωστόσο δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή σε κάποια πειραματική ομάδα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

DHIP	SAL/VEH	AMP/VEH	SAL/CBD	AMP/CBD
DOPAC (μg/g)	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001
DA (μg/g)	0.019 ± 0.001	0.027 ± 0.002	0.026 ± 0.001	0.024 ± 0.003
DOPAC/DA	0.515 ± 0.039	0.385 ± 0,030	0.387 ± 0,059	0.533 ± 0.081
DOPAC+DA	0.029 ± 0,001	0.037 ± 0.003	0.032 ± 0,004	0,037 ± 0,003

Κοιλιακός ιππόκαμπος (VHIP)

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για το VHIP δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

vHIP	SAL/VEH	AMP/VEH	SAL/CBD	AMP/CBD
DOPAC (μg/g)	0.042 ± 0.003	0.051 ± 0.003	0.044 ± 0.005	0.051 ± 0.006
DA (μg/g)	0,056 ± 0.007	0,055 ± 0.008	0,046 ± 0.003	0,046 ± 0.005
DOPAC/DA	0,778 ± 0.064	0,886 ± 0.062	0,859 ± 0.033	1,024 ± 0.066
DOPAC+DA	0.097 ± 0.009	0.102 ± 0.013	0.085 ± 0.005	0.092 ± 0.009

Έσω ραβδωτό σώμα (DMS)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις έδειξε ότι η αλληλεπίδραση χορήγησης AMP x χορήγησης CBD επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα ντοπαμίνης στην έσω μοίρα του ραχιαίου ραβδωτού σώματος [$F_{(1,26)} = 5,075$, $p=0.036$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις με διορθώσεις τύπου Bonferroni έδειξαν ότι η παρατηρούμενη μείωση της ντοπαμίνης στην ομάδα AMP/VEH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα ($p=0.089$), ενώ αντιθέτως, η ίδια ομάδα παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα AMP/CBD ($p<0.001$).

Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση AMPxCBD βρέθηκε ότι επηρεάζει τα επίπεδα HVA [$F_{(1,26)} = 5,149$, $p=0.035$] και το συντελεστή ανακύκλωσης HVA/DA [$F_{(1,26)} = 7.153$, $p=0.015$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επιμέρους πειραματικών ομάδων.

DMS	SAL/VEH	AMP/VEH	SAL/CBD	AMP/CBD
DA (μg/g)	6,254 ±0.498	4,614 ±0.392	6,847 ±0.492	7,072 ±0.802
DOPAC (μg/g)	3,551 ±0.422	3,972 ±0.771	3,654 ±0.221	4,167 ±0.428
HVA (μg/g)	0,549 ± 0,178	1,928 ±0.527	2,480 ±628	1,286 ±0.118
DOPAC/DA	0,566 ±0.031	0,855 ±0.164	0,556 ±0.056	0,510 ±0.052
HVA/DA	0,117 ±0.016	0,399 ±0.123	0,359 ±0.081	0,207 ±0.061
DOPAC+DA	9,808 ±0.971	9,301 ±0.959	10,501 ±0.512	11,822 ±0.796
HVA+DA	6,771 ±0.476	6,300 ±0.790	9,327 ±0.955	8,255 ±0.759

Έξω ραβδωτό σώμα (DLS)

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των χορηγήσεων AMPxCBD επηρέασε τα επίπεδα HVA [$F_{(1,26)} = 15,178$, $p<0.001$] και το σχετικό συντελεστή ανακύκλωσης HVA/DA [$F_{(1,26)} = 16.137$, $p<0.001$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις των επιμέρους ομάδων έδειξαν ότι η ομάδα AMP/VEH εμφάνισε αυξημένα επίπεδα HVA σε σχέση με τις πειραματικές ομάδες SAL/VEH και AMP/CBD ($p=0.003$ και $p=0.002$ αντίστοιχα), όπως και για το συντελεστή ανακύκλωσης (HVA/DA) σε σχέση τις ίδιες πειραματικές ομάδες ($p=0.010$ vs SAL/VEH, $p=0.011$ vs AMP/CBD).

DLS	SAL/VEH	AMP/VEH	SAL/CBD	AMP/CBD
DA (μg/g)	8,056 ±0.666	8,670 ±1.234	8,811 ±0.572	8,452 ±0.661
DOPAC (μg/g)	3,234 ±0.253	3,169 ±0.372	3,621 ±0.198	3,839 ±0.321
HVA (μg/g)	0,813 ±0.082	3,120 ±0.529	1,822 ±0.487	1,041 ±0.078
DOPAC/DA	0,415 ±0.035	0,447 ±0.137	0,433 ±0.053	0,484 ±0.069
HVA/DA	0,103 ±0.006	0,335 ±0.030	0,231 ±0.068	0,128 ±0.013
DOPAC+DA	11,291 ±0.832	11,013 ±1.136	12,432 ±0.465	12,291 ±0.612
HVA+DA	11,857 ±2.266	14,131 ±4.002	11,166 ±0.933	9,493 ±0.683

Επικλινής πυρήνας (NAc)

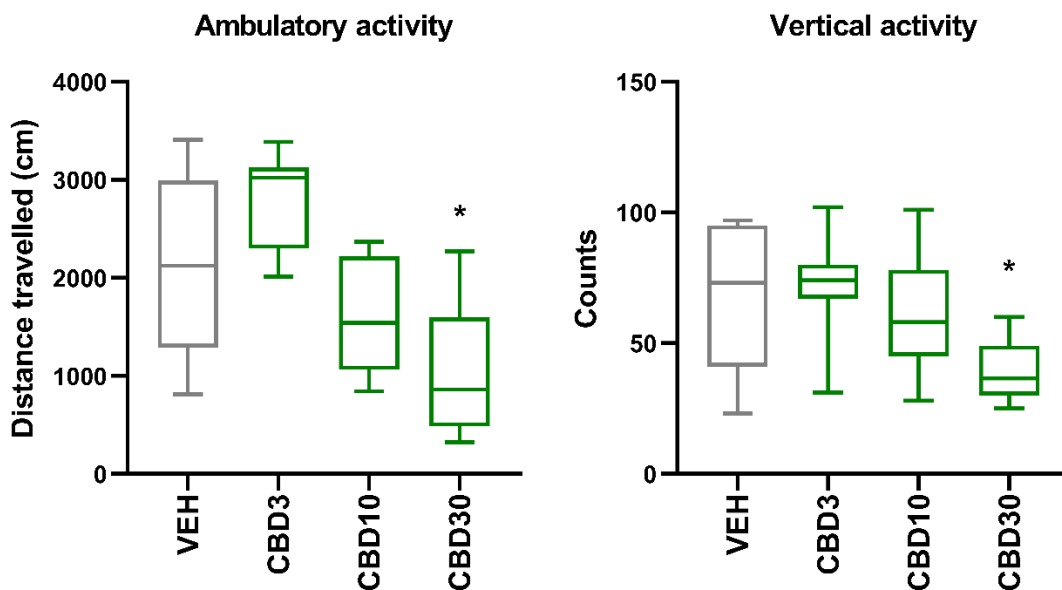
Οι αντίστοιχες στατιστικές αναλύσεις μεταβλητότητας για τα δείγματα από τον επικλινή πυρήνα δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

NAc	SAL/VEH	AMP/VEH	SAL/CBD	AMP/CBD
DA (μg/g)	5,217 ±0.297	3,786 ±0.450	4,488 ±0.588	4,246 ±0.496
DOPAC (μg/g)	3,702 ±0.466	2,797 ±0.453	2,525 ±0.273	2,652 ±0.331
HVA (μg/g)	0,682 ±0.066	1,837 ±0.499	1,136 ±0.303	1,155 ±0.298
DOPAC/DA	0,682 ±0.081	0,646 ±0.111	0,601 ±0.080	0,649 ±0.081
HVA/DA	0,135 ±0.009	0,489 ±0.151	0,311 ±0.097	0,322 ±0.093
DOPAC+DA	9,145 ±0.563	7,146 ±0.797	7,013 ±0.788	6,898 ±0.736
HVA+DA	9,095 ±0.970	5,720 ±0.045	6,124 ±0.943	5,865 ±0.915

4.3 Οξεία χορήγηση κεταμίνης

4.3.1 Διερεύνηση της δράσης της CBD στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε μη εξοικειωμένους επίμυες.

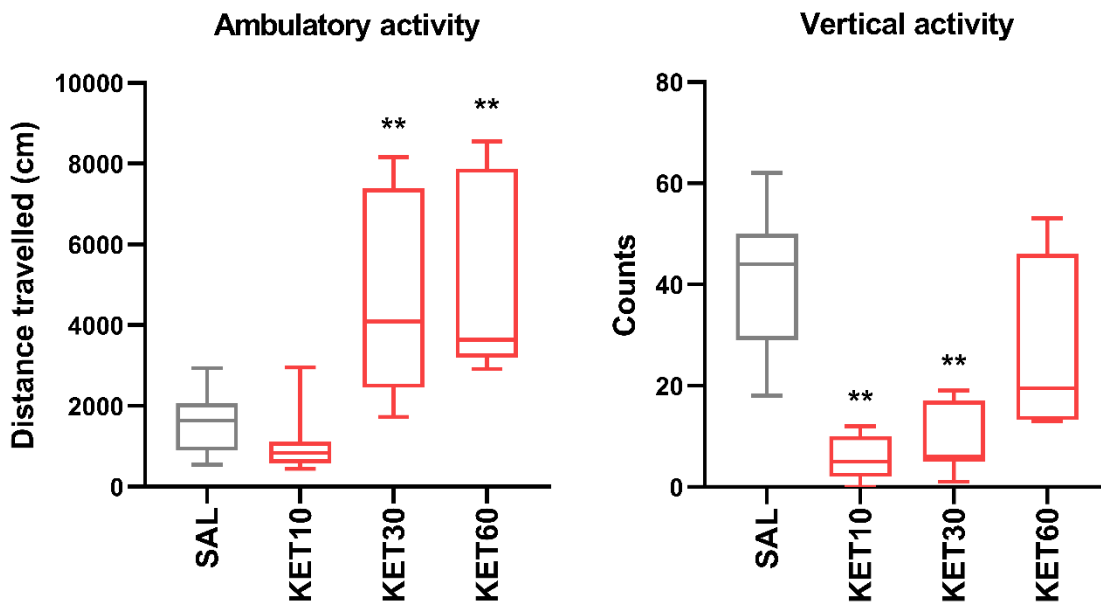
Σύμφωνα με την ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση (one-way ANOVA), η οξεία χορήγηση CBD επηρεάζει την αυθόρμητη οριζόντια και κάθετη κινητικότητα των πειραματόζων στα 60 λεπτά καταγραφής της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας των πειραματόζων στο ανοικτό πεδίο. Συγκεκριμένα, οι παράμετροι που αναλύθηκαν είναι η διανυθείσα απόσταση και το σύνολο των κάθετων ανορθώσεων [$F_{(3,31)}=8.411$, $p<0.001$; $F_{(3,31)}= 3.508$, $p=0.027$ αντίστοιχα]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις των επιμέρους πειραματικών ομάδων (Post Hoc tests τύπου Bonferroni) έδειξαν ότι η δόση των 30 mg/kg CBD μειώνει την οριζόντια ($p=0.023$) και κάθετη ($p=0.050$) κινητικότητα (γράφημα 4.4).



Γράφημα 4.4: Επίδραση της κανναβιδιόλης (CBD) στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα στο ανοικτό πεδίο, κατά τη μια ώρα καταγραφής, όπως αποτυπώνεται από την οριζόντια (αριστερά) και κάθετη κινητικότητα (δεξιά) *:vs VEH, $p<0.05$. Από Brakatselos et al., 2020.

4.3.2 Διερεύνηση της δράσης της κεταμίνης στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε εξοικειωμένους επίμυες.

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση έδειξε ότι η οξεία χορήγηση κεταμίνης επηρεάζει την απόσταση που επίμυες διανύουν στο ανοικτό πεδίο [$F_{(3,28)}=10.319$, $p<0.001$] και τον αριθμό των κάθετων ανορθώσεων [$F_{(3,28)}=9.111$, $p<0.001$] κατά τη μια ώρα που καταγράφεται η κινητικότητα τους. Οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους πειραματικών ομάδων (Post Hoc) έδειξαν ότι οι δόσεις των 30 και 60 mg/kg αυξάνουν τη διανυθείσα απόσταση ($p=0.011$ και $p=0.004$ αντίστοιχα). Αντιθέτως, οι δόσεις των 10 και 30 mg/kg προκάλεσαν μείωση στον αριθμό των κατακόρυφων ανυψώσεων ($p=0.001$ και $p=0.002$ αντίστοιχα) (Γράφημα 4.5).

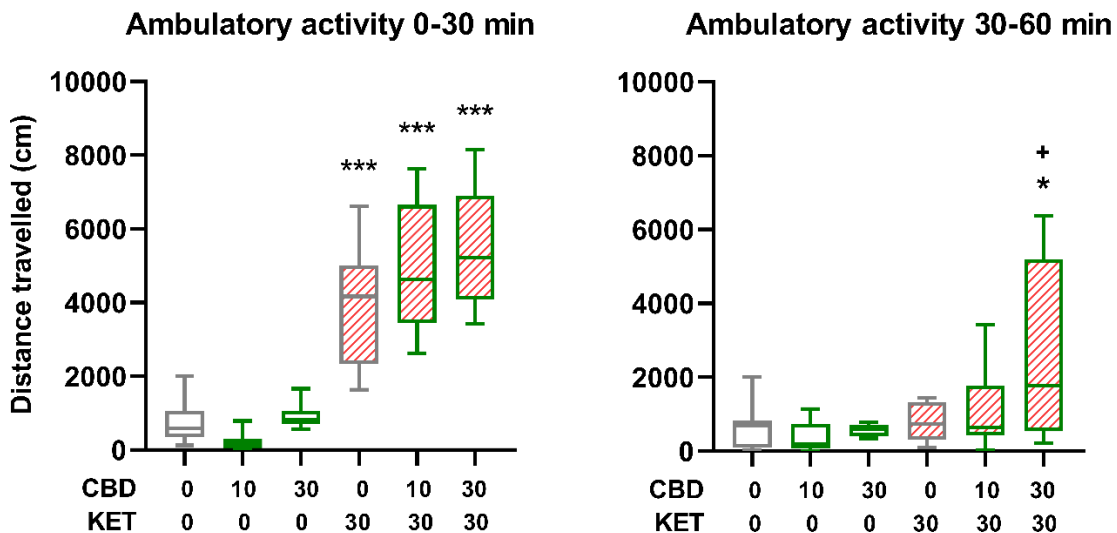


Γράφημα 4.5: Η δόσο-εξάρτηση της δράσης της κεταμίνης κεταμίνης στην οριζόντια (αριστερά) και κάθετη κινητικότητα) εξοικειωμένων επίμυων. *:KET vs saline (SAL), $p \leq 0.05$. Από το Brakatselos et al., 2020.

4.3.3 Διερεύνηση της δράσης της CBD στην οξεία χορήγηση κεταμίνης στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου σε εξοικειωμένους επίμους.

Η επίδραση της χορήγησης CBD στο κινητικό προφίλ της κεταμίνης εκτιμήθηκαν με στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας για συνεχείς μετρήσεις και κατά τρεις διευθύνσεις (three-way repeated-measures ANOVA), με την CBD και την KET ως παράγοντες μεταξύ των μετρήσεων (between-subjects factors) και το χρόνο ως παράγοντα συνδεδεμένο με τις μετρήσεις (within-subject factor). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση CBD επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την οριζόντια κινητικότητα των επίμυων [$F_{(2,42)}=3.624$, $p=0.035$], όπως και η KET [$F_{(1,42)}=70.795$, $p<0.001$] και ο χρόνος [$F_{(1,42)}=79.17$, $p<0.001$], ενώ η αλληλεπίδραση της CBD με την KET βρέθηκε επίσης στατιστικά σημαντική [$F_{(2,42)}=2.797$, $p=0.050$].

Οι μετέπειτα συγκρίσεις των επιμέρους πειραματικών ομάδων έδειξαν ότι η χορήγηση KET προκαλεί αύξηση στα πρώτα 30 λεπτά της καταγραφής ($p<0.001$), ενώ καμία δόση της CBD δεν επηρέασε την κινητικότητα όταν συγχρηγήθηκε με φυσιολογικό ορό. Ας σημειωθεί ότι τα πειραματόζωα που έλαβαν 30 mg/kg CBD και KET έδειξαν αυξημένη οριζόντια κινητική δραστηριότητα κατά το δεύτερο διάστημα καταγραφής (30-60 min) ($p=0.016$) (Γράφημα 4.6).



Γράφημα 4.6: Η επίδραση της κανναβιδιόλης στην υπερκινητικότητα που προκαλεί η κεταμίνη στο ανοικτό πεδίο (οριζόντια μόνο) στο χρονικά διάστημα 0-30 (αριστερά) και 30-60 λεπτά (δεξιά). $p<0.05$; ***VEH/KET, CBD10/KET, CBD30/KET rats vs VEH/SAL, $p<0.001$, *: CBD30/KET vs VEH/KET, $p<0.05$; +CBD30/KET rats vs VEH/KET rats, $p<0.05$. Από Brakatselos et al., 2020.

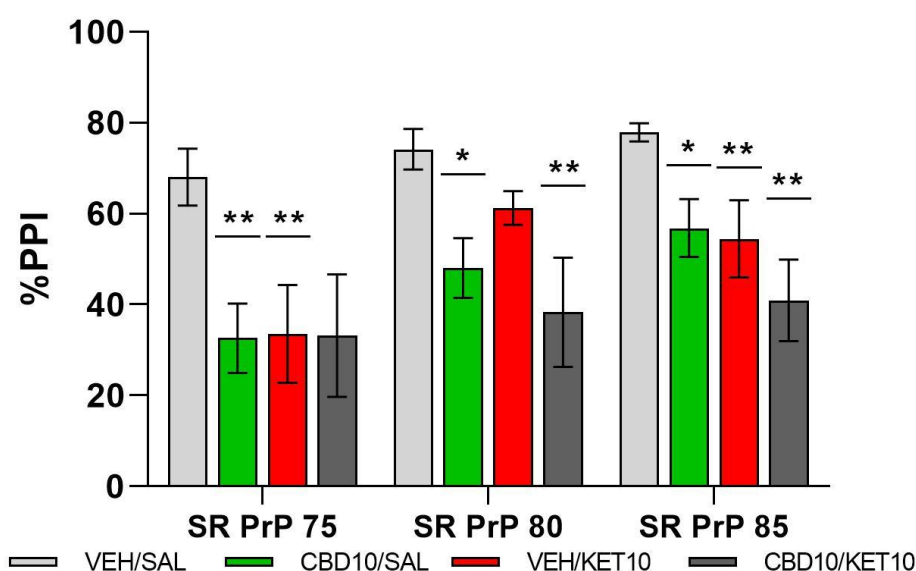
4.3.4 Εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού

Για την εκτίμηση της επίδρασης της οξείας χορήγησης CBD και της οξείας χορήγησης KET στη συμπεριφορά προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας για συνεχείς μετρήσεις και κατά τρεις διευθύνσεις (three-way repeated-measures ANOVA), με τη χορήγηση KET και τη χορήγηση CBD ως παράγοντες μεταξύ των μετρήσεων (between-subjects factors) και την ένταση του προπαλμικού ερεθίσματος ως παράγοντα συνδεδεμένο με τις μετρήσεις (within-subject factor).

Το μέγεθος της προ-παλμικής αναστολής στο αντανακλαστικό αιφνιδιασμού βρέθηκε να επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά από την ένταση του προ-παλμικού ερεθίσματος [$F_{(2,27)}=11.845$, $p<0.001$] και την αλληλεπίδραση της έντασης του προ-παλμικού ερεθίσματος με τη χορήγηση KET και τη χορήγηση CBD [$F_{(2,23)}=3,850$, $p=0.018$]. Ωστόσο, η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις για την εκτίμηση της επίδρασης των παραγόντων μεταξύ των αντικειμένων, έδειξε ότι η αλληλεπίδραση KETxCBD δεν επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά το μέγεθος της προ-παλμικής αναστολής [$F_{(1,27)}=1,051$, $p<0.327$].

Για κάθε προ-παλμικό ερέθισμα (έντασης 75, 80 και 85 kDa), η αλληλεπίδραση KETxCBD δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγεθος του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού [$F_{(1,15)}=3.495$, $p=0.081$, $F_{(1,17)}=0.057$, $p=0.814$ και $F_{(1,16)}=0.488$, $p=0.495$, κατά αντιστοιχία του μεγέθους του ηχητικού ερεθίσματος. Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι το μέγεθος του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού ελαττώνεται συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου για τα ηχητικά ερεθίσματα των 75 kDa (για την ομάδα CBD10/SAL, $p=0.012$, και την ομάδα VEH/KET10, $p=0.014$), 80 kDa (για την ομάδα CBD10/SAL $p=0.009$, και την ομάδα CBD10/KET10 $p=0.140$) και 85 kDa (για την ομάδα CBD10/SAL $p=0.020$, την ομάδα VEH/KET10 $p=0.008$, και την ομάδα CBD10/KET10 $p=0.012$) (Γράφημα 4.7).

Προ-παλμική αναστολή αντανακλαστικού αιφνιδιασμού



Γράφημα 4.7: Επίδραση της CBD στη διαταραχή της προ-παλμικής αναστολής αντανακλαστικού αιφνιδιασμού μετά από χορήγηση οξείας κεταμίνης. **: vs VEH/SAL, $p<0.01$; *:VEH/SAL, $p<0.05$.

4.3.5 Εκτίμηση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων

Προμετωπιαίος φλοιός (PFC)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις (two way ANOVA) έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των παραγόντων χορήγησης CBD και χορήγησης KET προκαλεί στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ως προς τα επίπεδα DOPAC [$F_{(2,22)}=6.229$, $p=0.007$] αλλά και το λόγο ανακύκλωσης της ντοπαμίνης όπως αποτυπώνεται από την αναλογία DOPAC/DA [$F_{(2,22)}=6.983$, $p=0.004$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους ομάδων και της ομάδας ελέγχου (VEH/SAL) δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή. Αξιοσημείωτη είναι ωστόσο η στατιστικά σημαντική αύξηση που παρουσιάζουν τα πειραματόζωα που έχουν λάβει τη μεγάλη δόση CBD όταν αυτή ακολουθείται και από οξεία χορήγηση κεταμίνης και για τις 2 παραπάνω παραμέτρους ($p=0.009$, $p=0.035$ για επίπεδα DOPAC και λόγο DOPAC/DA αντίστοιχα).

Οι παράμετροι των επιπέδων ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό επιμύων καθώς και το άθροισμα DA+DOPAC δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

PFC	VEH/SAL	CBD10/SAL	CBD30/SAL	VEH/KET	CBD10/KET	CBD30/KET
DOPAC (μg/g)	0.114 ±0.006	0.132 ±0.012	0.080 ±0.013	0,106 ±0.003	0,131 ±0.009	0,132 ±0.011
DA (μg/g)	0,145 ±0.013	0,167 ±0.012	0,154 ±0.005	0,156 ±0.014	0,196 ±0.011	0,154 ±0.005
DOPAC/DA	0,816 ±0.083	0,806 ±0.063	0,514 ±0.073	0,704 ±0.076	0,669 ±0.027	0,868 ±0.090
DOPAC+DA	0,258 ±0.016	0,298 ±0.025	0,234 ±0.017	0,262 ±0.015	0,327 ±0.019	0,286 ±0.011

Ραχιαίος ιππόκαμπος (DHIP)

Οι αντίστοιχες στατιστικές αναλύσεις μεταβλητότητας για το ραχιαίο ιππόκαμπο έδειξαν ότι η χορήγηση CBD και η χορήγηση KET προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μόνο ως προς το λόγο DOPAC/DA [$F_{(2,22)}=4.112$, $p=0.031$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές παρά μια μικρή αυξητική τάση ως προς το λόγο ανακύκλωσης της ντοπαμίνης από τις ομάδες CBD10/SAL και VEH/KET, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

DHIP	VEH/SAL	CBD10/SAL	CBD30/SAL	VEH/KET	CBD10/KET	CBD30/KET
DOPAC	0,008 ±0.001	0,020 ±0.007	0,013 ±0.001	0,013 ±0.001	0,016 ±0.001	0,014 ±0.001
DA (μg/g)	0,028 ±0.003	0,027 ±0.004	0,031 ±0.002	0,029 ±0.003	0,036 ±0.002	0,031 ±0.002
DOPAC/DA	0,319 ±0.033	0,563 ±0.080	0,415 ±0.035	0,459 ±0.036	0,444 ±0.033	0,364 ±0.010
DOPAC+DA	0,041 ±0.005	0,054 ±0.007	0,043 ±0.003	0,043 ±0.003	0,052 ±0.003	0,045 ±0.001

Κοιλιακός ιππόκαμπος (VHIP)

Στον κοιλιακό ιππόκαμπο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

VHIP	VEH/SAL	CBD10/SAL	CBD30/SAL	VEH/KET	CBD10/KET	CBD30/KET
DOPAC	0,061 ±0.007	0,065 ±0.006	0,050 ±0.050	0,064 ±0.010		0,070 ±0.007
DA (μg/g)	0,037 ±0.003	0,029 ±0.004	0,034 ±0.003	0,029 ±0.003	0,039 ±0.004	0,034 ±0.003
DOPAC/DA	2,011 ±0.374	2,364 ±0.205	1,447 ±0.269	1,998 ±0.279		2,073 ±0.134
DOPAC+DA	0,094 ±0.007	0,094 ±0.010	0,083 ±0.012	0,080 ±0.017	1,901 ±0.097	0,103 ±0.009

Έσω ραβδωτό σώμα (DMS)

Στο έσω ραχιαίο ραβδωτό σώμα σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση των χορηγήσεων CBDxKET ως προς τη παράμετρο HVA/DA [$F_{(2,22)}=3.515$, $p=0.047$], η οποία δε συνοδεύεται από στατιστικά σημαντικές μεταβολές των επιμέρους πειραματικών ομάδων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, παρά μόνο μια τάση για μείωση στην ομάδα VEH/KET.

DMS	VEH/SAL	CBD10/SAL	CBD30/SAL	VEH/KET	CBD10/KET	CBD30/KET
DA (μg/g)	5,926 ±0.263	6,232 ±0.570	5,504 ±0.298	6,674 ±0.280	7,334 ±0.207	5,504 ±0.268
DOPAC	3,260 ±0.152	3,485 ±0.238	3,062 ±0.176	3,181 ±0.124	3,578 ±0.276	3,280 ±0.280
HVA (μg/g)	0,451 ±0.023	0,524 ±0.060	0,475 ±0.034	0,408 ±0.023	0,434 ±0.031	0,621 ±0.163
DOPAC/DA	0,550 ±0.009	0,577 ±0.059	0,536 ±0.031	0,478 ±0.019	0,488 ±0.034	0,596 ±0.041
HVA/DA	0,076 ±0.002	0,087 ±0.011	0,081 ±0.005	0,061 ±0.003	0,059 ±0.005	0,084 ±0.007

Έξω ραβδωτό σώμα (DLS)

Στο έξω ραβδωτό σώμα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

DLS	VEH/SAL	CBD10/SAL	CBD30/SAL	VEH/KET	CBD10/KET	CBD30/KET
DA (μg/g)	5,377 ±0.176	5,389 ±0.191	6,085 ±0.421	5,742 ±0.088	6,384 ±0.362	6,085 ±0.421
DOPAC	2,471 ±0.111	2,763 ±0.123	2,310 ±0.070	2,758 ±0.064	2,714 ±0.122	2,570 ±0.179
HVA (μg/g)	1,029 ±0.044	1,193 ±0.112	1,057 ±0.075	1,237 ±0.056	1,106 ±0.043	1,154 ±0.071
DOPAC/DA	0,465 ±0.016	0,513 ±0.017	0,384 ±0.018	0,477 ±0.020	0,428 ±0.019	0,453 ±0.039
HVA/DA	0,192 ±0.008	0,221 ±0.018	0,174 ±0.007	0,213 ±0.013	0,175 ±0.009	0,204 ±0.017

Επικλινής πυρήνας (NAc)

Η στατιστική ανάλυση για τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος έδειξε ότι η χορήγηση και CBD και KET αλληλοεπιδρούν στατιστικώς σημαντικά μόνο ως προς τη παράμετρο HVA/DA [$F_{(2,22)}=4.343$, $p=0.026$]. Οι συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων ανέδειξαν την τάση της ομάδας CBD30/KET προς αύξηση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.062$).

NAc	VEH/SAL	CBD10/SAL	CBD30/SAL	VEH/KET	CBD10/KET	CBD30/KET
DA (μg/g)	5,736 ±0.402	6,159 ±0.199	5,347 ±0.677	6,553 ±0.186	5,902 ±0.492	5,347 ±0.677
DOPAC	2,525 ±0.113	2,408 ±0.146	2,539 ±0.405	2,777 ±0.213	3,090 ±0.209	3,386 ±0.229
HVA (μg/g)	0,682 ±0.045	0,625 ±0.063	0,828 ±0.129	0,747 ±0.089	0,982 ±0.189	1,039 ±0.059
DOPAC/DA	0,453 ±0.048	0,393 ±0.030	0,464 ±0.029	0,424 ±0.030	0,561 ±0.026	0,547 ±0.017
HVA/DA	0,120 ±0.009	0,101 ±0.008	0,151 ±0.007	0,113 ±0.012	0,163 ±0.020	0,182 ±0.006

4.3.6 Εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western.

Πρωτεϊνική έκφραση GluN1 υπομονάδας NMDA R

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις (Two way ANOVA) δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή της πρωτεϊνικής έκφρασης της GluN1 υπομονάδας στον PFC, αν και παρατηρήθηκε μια τάση για αύξηση μετά από τη χορήγηση κεταμίνης.

Αντίστοιχη στατιστική μελέτη των δεδομένων που ελήφθησαν από το NAc εμφανίζει επίδραση της χορήγησης CBD [$F_{(2,21)}=5.753$, $p=0.010$] και αλληλεπίδραση των χορηγήσεων CBD x KET [$F_{(2,21)}=3.693$, $p=0.042$]. Οι ακόλουθες αναλύσεις των επιμέρους πειραματικών ομάδων προβάλλουν μια στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης GluN1 μετά από χορήγηση KET ($p=0.025$) συγκριτικά την ομάδα ελέγχου (VEH/SAL), ενώ η προχορήγηση CBD30 αναιρεί τη δράση αυτή της KET ($p=0.002$).

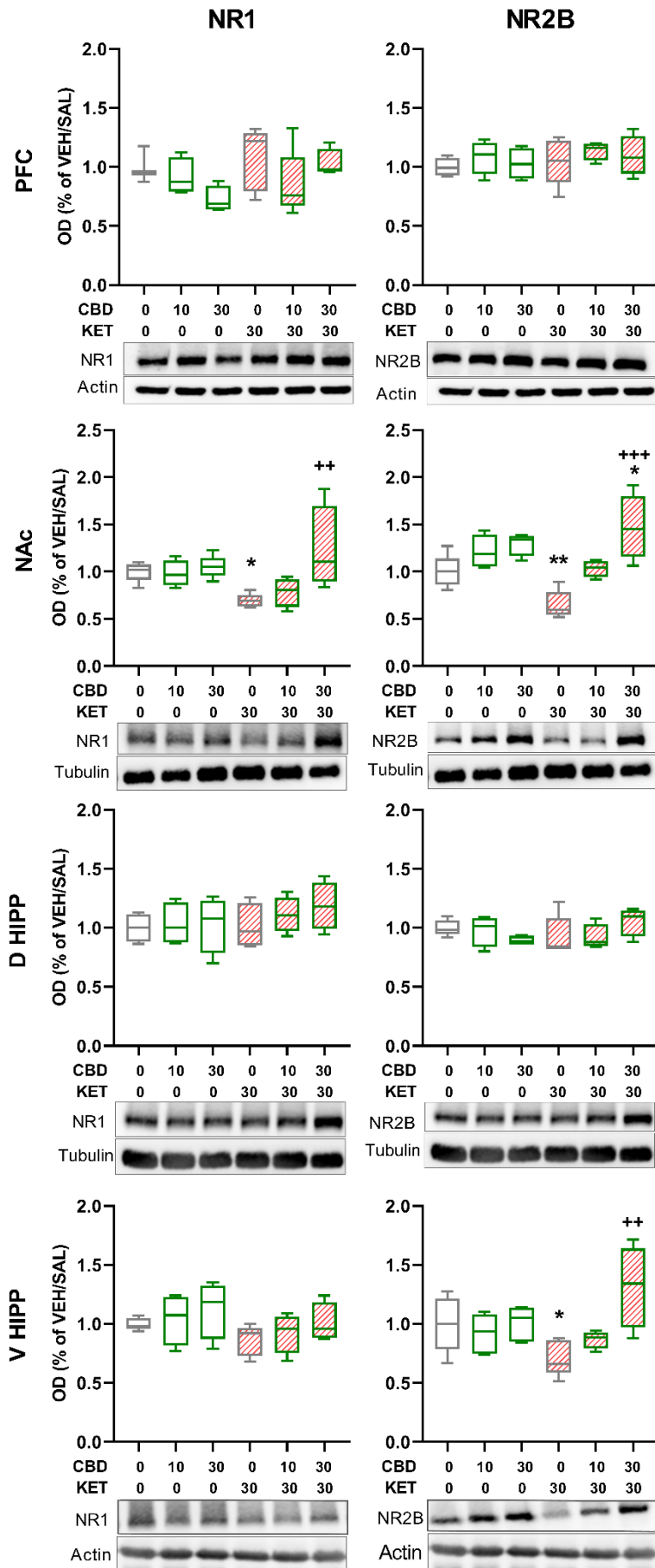
Καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν εντοπίστηκε στον ραχιαίο ή κοιλιακό υπόκαμπο, αν και στο δεύτερο (κοιλιακό) ανατομικό διαμέρισμα παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της GluN1 υπομονάδας (Γράφημα 4.8).

Πρωτεϊνική έκφραση GluN2B υπομονάδας NMDA R

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις δεν εμφάνισε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της GluN2B υπομονάδας των NMDA υποδοχέων στον PFC.

Σχετικά με το NAc ωστόσο, εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική επίδραση λόγω της χορήγησης CBD [$F_{(2,20)}=19.268$, $p<0.001$], όπως και λόγω της αλληλεπίδρασης των δύο χορηγήσεων (CBD x KET) [$F_{(2,20)}=4.305$, ($p=0.028$)]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις των επιμέρους πειραματικών ομάδων παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση της GluN2B στα πειραματόζωα της ομάδας VEH/KET ($p=0.009$) συγκριτικά με τη χορήγηση VEH/SAL, ενώ η χορήγηση CBD30 (πειραματική ομάδα (CBD30/KET) ανέστρεψε τη μείωση αυτή ($p<0.001$). Είναι σημαντικό να σημειωθεί το γεγονός ότι η έκφραση της GluN2B στους CBD30/KET επίμυς ήταν αυξημένη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, VEH/SAL ($p=0.032$) (Γράφημα 4.8).

Στο ραχιαίο υπόκαμπο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές, στον κοιλιακό ωστόσο, η στατιστική ανάλυση πρόβαλε τη στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης CBD [$F_{(2,22)}=6.283$, ($p=0.007$)] και της αλληλεπίδρασης των δύο χορηγήσεων, CBD x KET [$F_{(2,22)}=5.308$, ($p=0.013$)]. Οι post hoc συγκρίσεις με διορθώσεις τύπου Bonferroni έδειξαν μείωση της έκφρασης της GluN2B μετά από οξεία χορήγηση κεταμίνης (KET/VEH vs VEH/SAL επίμυς, $p=0.034$), αποτέλεσμα που αναιρείται πλήρως κατόπιν της συγχορήγησης CBD30/KET (KET/CBD30 vs KET/SAL, $p=0.001$) (Γράφημα 4.8).



Γράφημα 4.8: Η επίδραση της κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η κεταμίνη (KET) στην έκφραση των *GluN1* και *GluN2B* υπομονάδων των NMDA υποδοχέων. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα στην αναλογία (ratio) ώστε η ομάδα ελέγχου (VEH/SAL) να εμφανίζει αναλογία 1.0 και αφορούν την οπτική πυκνότητα των ζωνών των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, όπως υπολογίστηκε από το λογισμικό ImageJ σε αυθαίρετες μονάδες. Κάτω από κάθε επιμέρους γράφημα βρίσκονται blots με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και την αντίστοιχη πρωτεΐνη αναφοράς που λειτουργεί ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. *VEH/KET, CBD30/KET rats vs VEH/SAL, $p \leq 0.05$; **VEH/KET, CBD30/KET vs VEH/SAL, $p < 0.01$. ++CBD30/KET vs VEH/KET, $p \leq 0.01$; +++ CBD30/KET vs VEH/KET, $p \leq 0.001$.

Φωσφορυλίωση της ERK1/2

Για την αξιολόγηση της κατάστασης φωσφορυλίωσης των ισομορφών 1 και 2 της πρωτεΐνης ERK, υπολογίσθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης (t-ERK), των φωσφορυλιωμένων μορφών αυτής στα κατάλοιπα ενδιαφέροντος (Thr202/Tyr204, p-ERK-ERK1/2) και έπειτα υπολογίσθηκε ο λόγος ολικής/φωσφορυλιωμένης μορφής (p-ERK/t-ERK) για την κάθε ισομορφή.

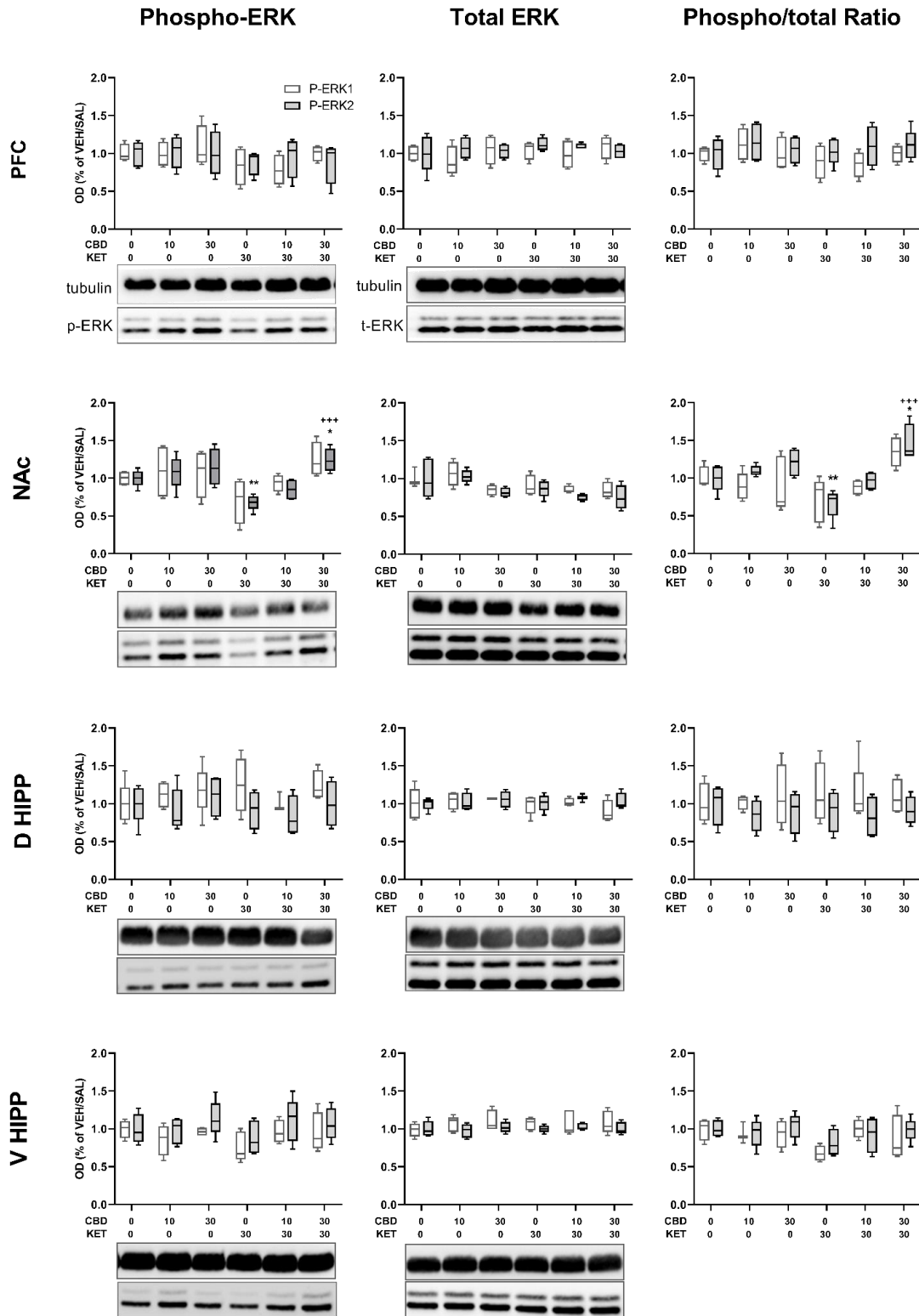
Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις για τον PFC δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα t-ERK, p-ERK και p-ERK/t-ERK για κάθε ισομορφή.

Στο NAc, η στατιστική ανάλυση παρουσίασε στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης CBD [$F_{(2,21)}=9.867$, $p=0.001$], της χορήγησης KET [$F_{(1,21)}=5.491$, $p=0.029$] και της αλληλεπίδρασης CBDxKET [$F_{(2,26)}=3.538$, $p=0.047$], μόνο για τη φωσφορυλιωμένη μορφή της ισομορφής ERK2 (p-ERK2). Οι μετέπειτα post hoc συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους πειραματικών ομάδων έδειξαν ότι οι επίμυες της ομάδας VEH/KET εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα p-ERK2 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.007$). Η συγχορήγηση CBD στη δόση των 30 mg/kg αναίρεσε αυτή τη δράση της κεταμίνης ($p<0.001$), οδηγώντας μάλιστα και σε επίπεδα υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.032$) (Γράφημα 4.9).

Τα επίπεδα του ολικού ERK και για τις 2 ισομορφές (t-ERK1/2) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Ο λόγος p-ERK2/t-ERK2 βρέθηκε στατιστικά σημαντικώς επηρεασμένος από χορήγηση CBD [$F_{(2,21)}=18.791$, $p<0.001$] και επίσης παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση CBDxKET [$F_{(2,21)}=6.438$, $p=0.007$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις των επιμέρους πειραματικών ομάδων ανέδειξαν τη μείωση στο λόγο p-ERK2/t-ERK2 που εμφανίζουν οι VEH/KET επίμυες και την άρση της επίδρασης αυτής της KET από τη συγχορήγηση CBD30/KET (VEH/KET vs CBD30/KET, $p<0.001$), η οποία μάλιστα οδήγησε στη διαμόρφωση του λόγου p-ERK2/t-ERK2 σε επίπεδα υψηλότερα από την ομάδα ελέγχου ($p=0.032$) (Γράφημα 4.9).

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση (two-way ANOVA) για το ραχιαίο και το κοιλιακό ιππόκαμπο έδειξαν ότι οι φαρμακολογικοί χειρισμοί δεν οδήγησαν σε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των p-ERK1-2, t-ERK1/2 και της μεταξύ τους αναλογίας. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση στα επίπεδα της p-ERK1 και του λόγου p-ERK1/t-ERK1 για την ομάδα VEH/KET συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου η οποία δεν άγγιξε το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας (Γράφημα 4.9).



Γράφημα 4.9: Η επίδραση της κανναβιδιόλης (CBD) στις αλλαγές που προκαλεί η κεταμίνη (KET) στη φωσφορυλίωση της ERK1/2 στον προμετωπιαίο φλοιό, στον επικλινή πυρήνα, στο ραχιαίο και κοιλιακό υποπόγκιο (PFC, NAC, DHIP, VHIPP αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως φωσφορυλιωμένη-ERK1/2, ολική-ERK1/2 και αναλογία (αριστερή, μεσαία και δεξιά στήλη αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως αναλογία ως προς την ομάδα ελέγχου που την ορίζει στο 1,0. Κάθε επιμέρους γράφημα που αφορά ποσοτικοποιήσεις πρωτεϊνικής έκφρασης στην ανοσοαποτύπωση συνοδεύεται και από αντίστοιχη σειρά με χαρακτηριστικές πρωτεϊνικές ζώνες από κάτω. *CBD30/KET rats vs VEH/SAL, $p \leq 0.05$; **VEH/KET vs VEH/SAL, $p < 0.01$. *** CBD30/KET vs VEH/KET, $p \leq 0.001$.

4.4 Επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης

4.4.1 Συμπεριφορικές προσεγγίσεις

4.4.1.1 Επίδραση της επαναλαμβανόμενης KET στην κινητικότητα και ο αντισταθμιστικός ρόλος της CBD

Οριζόντια κινητικότητα:

Για την εκτίμηση της επίδρασης της χορήγησης KET και της χορήγησης CBD στη δοκιμασία αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας στο ανοικτό πεδίο πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας για συνεχείς μετρήσεις και κατά τρεις διευθύνσεις (three-way repeated-measures ANOVA), με τη χορήγηση KET και τη χορήγηση CBD ως παράγοντες μεταξύ των μετρήσεων (between-subjects factors) και το χρόνο, ο οποίος έχει 4 επίπεδα (0-15 min, 0-30 min, 0-45 min, 0-60 min) ως παράγοντα συνδεδεμένο με τις μετρήσεις (within-subject factor).

Η σωρευτική οριζόντια κινητική δραστηριότητα, η οποία εκφράζεται μέσω της διανυθείσας απόστασης στο ανοικτό πεδίο, βρέθηκε να επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά από το χρόνο [$F_{(3,39)}=118.180$, $p<0.001$] και από την αλληλεπίδραση του χρόνου με τη χορήγηση κεταμίνης και με τη χορήγηση CBD (χρόνος*χορήγηση_KET*χορήγηση_CBD) [$F_{(3,39)}=2.764$, $p=0.049$].

Ως προς τα επιμέρους χρονικά σημεία, για το χρονικό διάστημα 0-15 λεπτά, η αλληλεπίδραση KETxCBD δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την οριζόντια κινητικότητα [$F_{(1,39)}=2.582$, $p=0.066$]. Για το διάστημα 0-30 λεπτά, η αλληλεπίδραση KETxCBD επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την οριζόντια κινητικότητα [$F_{(1,39)}=4.691$, $p=0.036$], ενώ οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων επιβεβαίωσαν τη στατιστικά σημαντική αύξηση της οριζόντιας κινητικότητας της ομάδας KET/VEH σε σχέση με την ομάδα SAL/VEH ($p=0.003$) και την έντονη τάση για αυξημένη κινητικότητα συγκριτικά με την ομάδα KET/CBD ($p=0.057$).

Η στατιστική ανάλυση ειδικά για το χρονικό διάστημα 0-45 λεπτά, έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των χορηγήσεων KETxCBD επηρέασε την οριζόντια κινητικότητα [$F_{(1,39)}=4.886$, $p=0.033$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις έδειξαν τη στατιστικά σημαντική αύξηση της οριζόντιας κινητικότητας της ομάδας KET/VEH σε σχέση με τις ομάδες SAL/VEH και KET/CBD ($p=0.002$, $p=0.026$ αντίστοιχα).

Για το συνολικό διάστημα των 60 λεπτών, η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση υποστήριξε τη στατιστικά σημαντική μεταβολή από την αλληλεπίδραση KETxCBD [$F_{(1,39)}=4.109$, $p=0.050$], ενώ οι μεταβολές στις επιμέρους ομάδες ακολούθησαν το ίδιο μοτίβο με την ομάδα KET/VEH να εμφανίζει αυξημένη οριζόντια κινητικότητα σε σχέση με τις ομάδες SAL/VEH και KET/CBD ($p=0.002$, $p=0.021$ αντίστοιχα) (Γράφημα 4.10).

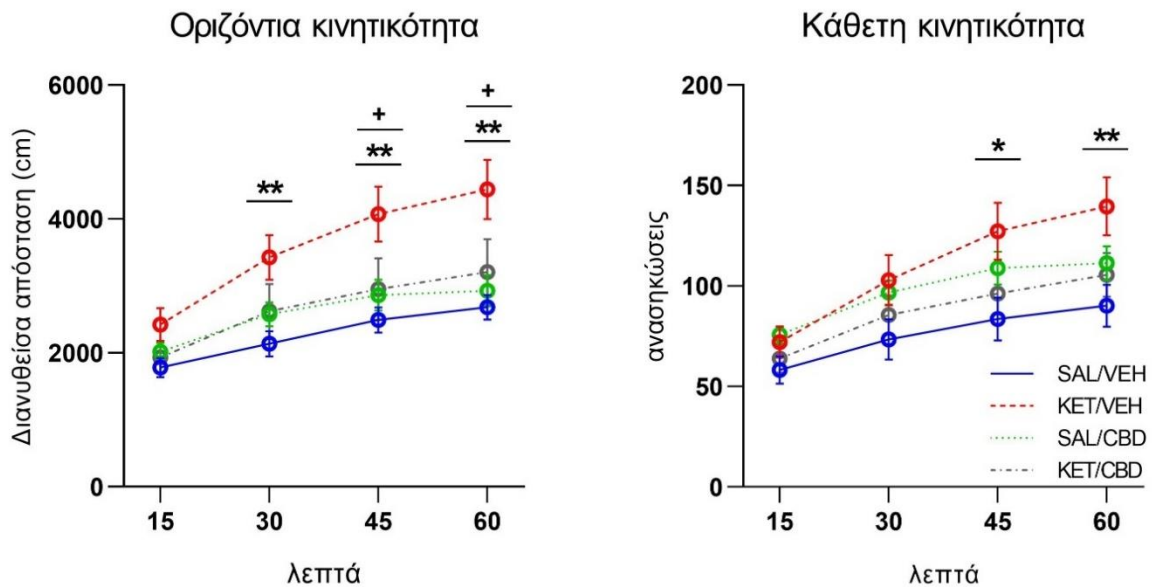
Κάθετη κινητικότητα:

Η σωρευτική κάθετη κινητική δραστηριότητα, η οποία εκφράζεται μέσω του αριθμού των κάθετων ανορθώσεων των επίμυων στο ανοικτό πεδίο, βρέθηκε να επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά από το χρόνο [$F_{(3,39)}=153.038$, $p<0.001$] και από την αλληλεπίδραση του χρόνου με τη χορήγηση κεταμίνης και με τη χορήγηση CBD (χρόνος*χορήγηση_KET*χορήγηση_CBD) [$F_{(3,39)}=4.165$, $p=0.008$].

Ειδικότερα, η στατιστική ανάλυση κατά δύο διευθύνσεις για το χρονικό διάστημα 0-45 λεπτά έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των χορηγήσεων KETxCBD επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την κάθετη κινητικότητα [$F_{(1,39)}=5.421$, $p=0.025$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις έδειξαν τη στατιστικά σημαντική αύξηση της κάθετης κινητικότητας της ομάδας KET/VEH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.009$).

Αντίστοιχα για το χρονικό διάστημα 0-60 λεπτά, βρέθηκε ότι επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά από την αλληλεπίδραση των χορηγήσεων KETxCBD [$F_{(1,39)}=5.107$, $p=0.029$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις έδειξαν τη

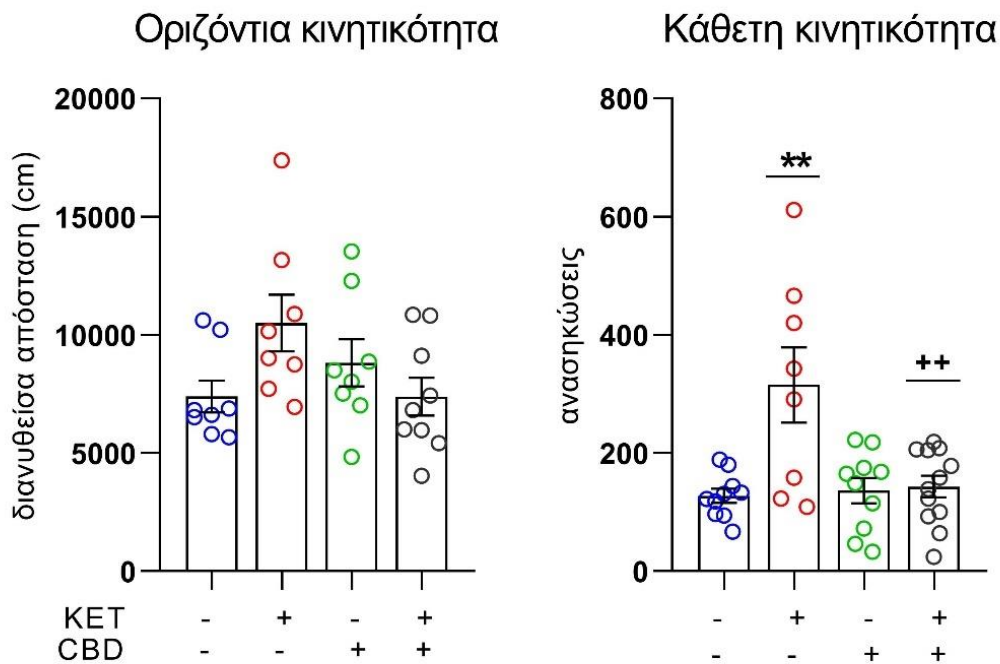
στατιστικά σημαντική αύξηση της κάθετης κινητικότητας της ομάδας KET/VEH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.004$) και τάση για μείωση στην ομάδα KET/CBD συγκριτικά με την ομάδα KET/VEH ($p=0.073$). Ειδικότερα οι μετέπειτα συγκρίσεις με διορθώσεις κατά Bonferroni, έδειξαν ότι η ομάδα KET/VEH εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των ανορθώσεων στα 45 λεπτά καταγραφής συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.010$), ενώ συγκριτικά με την ομάδα KET/CBD η αύξηση προσέγγισε το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας ($p=0.063$). Στα 60 λεπτά καταγραφής η ομάδα KET/VEH εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση έναντι και των 2 ομάδων ($p=0.004$ vs SAL/VEH και $p=0.040$ vs KET/CBD) (Γράφημα 4.10).



Γράφημα 4.10: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στο κινητικό πρότυπο που διαμορφώνουν οι επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις κεταμίνης (KET) στην αθροιστική κινητικότητα ανά 15 λεπτά στο ανοικτό πεδίο. **:vs SAL/VEH, $p<0.01$; *:vs SAL/VEH, $p<0.05$; +: vs KET/VEH

4.4.1.2 Δοκιμασία με d-αμφεταμίνη στο ανοικτό πεδίο (amphetamine challenge) κατά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης

Η στατιστική μεταβλητότητα κατά δύο διευθύνσεις έδειξε πως η αλληλεπίδραση της χορήγησης KET με τη χορήγηση CBD επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά την οριζόντια [$F_{(1,30)}=5.934$, $p=0.021$] και την κάθετη [$F_{(1,36)}=8.877$, $p=0.005$] κινητικότητα των επίμυων. Οι συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων με τις προβλεπόμενες διορθώσεις κατά Bonferroni δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή για της οριζόντιας κινητικότητας η οποία προσεγγίστηκε μέσω της διανειθείσας απόστασης στο ανοικτό πεδίο. Αντίστοιχες συγκρίσεις ωστόσο παρουσίασαν ότι οι επίμυες που δέχθηκαν τη χορήγηση KET/VEH εμφάνισαν αυξημένο αριθμό κάθετων ανορθώσεων κατόπιν χορήγησης d-αμφεταμίνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.001$) αλλά και την ομάδα που έλαβε KET/CBD ($p=0.002$) (Γράφημα 4.11).



Γράφημα 4.11: Δοκιμασία χορήγησης d-αμφεταμίνης (1 mg/kg) στο ανοικτό πεδίο σε επίμυες μετά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) ή/και κανναβιδιόλη (CBD). Οι επίμυες μετά την υποβολή στα χρόνια σχήματα χορήγησης δέχθηκαν τη χορήγηση d-αμφεταμίνης 1 mg/kg και μελετήθηκε η κινητικότητά τους στο ανοικτό πεδίο κατόπιν εξοικείωσης. Η d-αμφεταμίνη χορηγήθηκε σε όλες τις πειραματικές ομάδες. **: vs SAL/VEH, $p<0.01$; ++: vs KET/VEH, $p<0.01$.

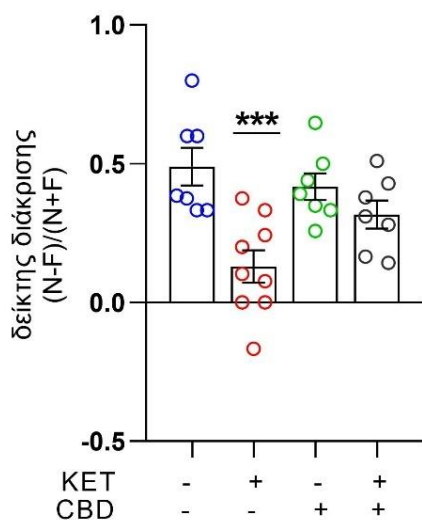
4.4.1.3 Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου κατά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση έδειξε πως η αλληλεπίδραση της χορήγησης KET με τη χορήγηση CBD επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά το δείκτη απόδοσης/αναγνώρισης στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου [$F_{(1,26)}=5.047$, $p=0.033$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων υποστήριξαν τη στατιστική σημαντικότητα της μείωσης του δείκτη που παρατηρείται στα πειραματόζωα της ομάδας KET/VEH συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p<0.001$). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε επίπεδο posthoc συγκρίσεων ο μειωμένος δείκτης απόδοσης που παρατηρείται στα πειραματόζωα της KET/VEH ομάδας αν και δεν διαφέρει συγκριτικά με την ομάδα SAL/VEH, δεν διαφέρει όμως στατιστικώς σημαντικά και σε σχέση με την ομάδα KET/CBD ($p=0.157$) (Γράφημα 4.12).

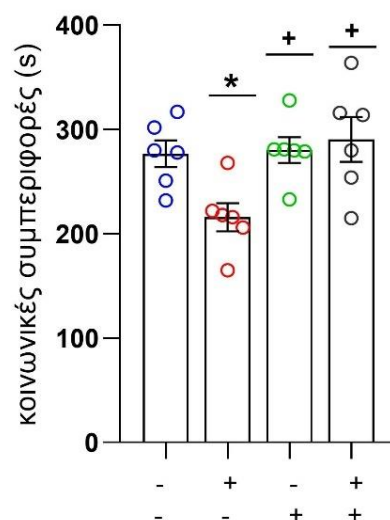
4.4.1.4 Δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς κατά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης

Η στατιστική ανάλυση κατά δυο διευθύνσεις έδειξε πως η αλληλεπίδραση της χορήγησης KET με τη χορήγηση CBD επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά το άθροισμα της διάρκειας των κοινωνικών συμπεριφορών που οι επίμυες εμφανίζουν στη δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς [$F_{(1,20)}=5.280$, $p=0.032$]. Ειδικότερα και σύμφωνα με τις ακόλουθες συγκρίσεις με τις προβλεπόμενες διορθώσεις, οι επίμυες που έλαβαν μόνο KET εμφάνισαν μείωση του δείκτη κοινωνικής συμπεριφοράς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.052$ vs SAL/VEH), ενώ η μείωση αυτή δεν παρατηρήθηκε για τις ομάδες SAL/CBD και KET/CBD ($p=0.047$ KET/VEH vs SAL/CBD, $p=0.010$ KET/VEH vs KET/CBD) (Γράφημα 4.12).

Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου



Δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς



Γράφημα 4.12: Επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (αριστερά) και στη δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς/συνδιαλλαγής (δεξιά). ***:vs SAL/VEH, $p<0.001$; *:vs SAL/VEH, $p<0.05$; +:vs KET/SAL, $p<0.05$.

4.4.1.5 Εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού κατά την επαναλβανόμενη χορήγηση κεταμίνης

Για την εκτίμηση της επίδρασης της χορήγησης KET και της χορήγησης CBD στη συμπεριφορά προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας για συνεχείς μετρήσεις και κατά τρεις διευθύνσεις (three-way repeated-measures ANOVA), με τη χορήγηση KET και τη χορήγηση CBD ως παράγοντες μεταξύ των μετρήσεων (between-subjects factors) και την ένταση του προπαλμικού ερεθίσματος ως παράγοντα συνδεδεμένο με τις μετρήσεις (within-subject factor).

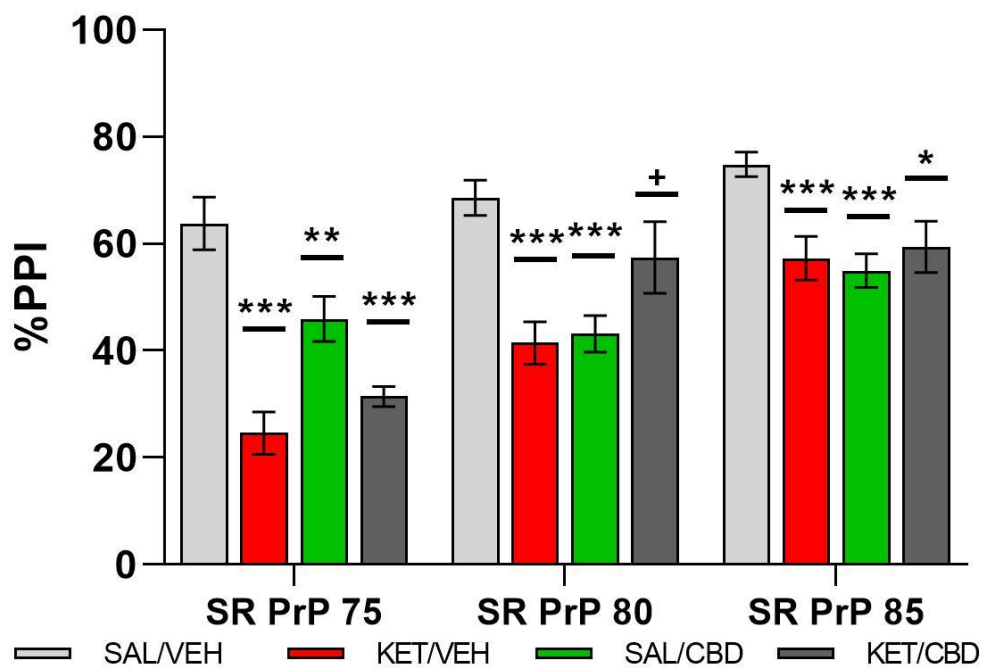
Το μέγεθος της προ-παλμικής αναστολής στο αντανακλαστικό αιφνιδιασμού βρέθηκε να επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά από την ένταση του προ-παλμικού ερεθίσματος [$F_{(2,23)}=39.763$, $p<0.001$] και την αλληλεπίδραση της έντασης του προ-παλμικού ερεθίσματος με τη χορήγηση KET και τη χορήγηση CBD [$F_{(2,23)}=3,630$, $p=0.034$]. Επιπρόσθετα η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις για την εκτίμηση της επίδρασης των παραγόντων μεταξύ των μετρήσεων, έδειξε ότι η αλληλεπίδραση KETxCBD επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά το μέγεθος της προ-παλμικής αναστολής [$F_{(1,23)}=15.773$, $p<0.001$].

Ειδικότερα, για προ-παλμικό ερέθισμα έντασης 75 kDa, όπου η αλληλεπίδραση KETxCBD εμφάνισε στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγεθος του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού [$F_{(1,25)}=8.364$, $p=0.008$], βρέθηκε ότι οι ομάδες KET/VEH, SAL/CBD και KET/CBD εμφάνισαν μειωμένη προ-παλμική αναστολή στο αντανακλαστικό αιφνιδιασμού ($p<0.001$, $p=0.009$ και $p<0.001$ αντίστοιχα) (Γράφημα 4.13).

Η ανάλογη ανάλυση για το προ-παλμικό ερέθισμα των 80 kDa έδειξε ότι η αλληλεπίδραση KETxCBD εμφάνισε στατιστικά σημαντική επίδραση στο εύρος της μείωσης του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού [$F_{(1,27)}=24.089$, $p<0.001$], βρέθηκε ότι οι ομάδες KET/VEH και SAL/CBD εμφάνισαν μειωμένη προ-παλμική αναστολή στο αντανακλαστικό αιφνιδιασμού ($p<0.001$, $p<0.001$ αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, η ομάδα KET/CBD εμφάνισε αύξηση συγκριτικά με την ομάδα KET/VEH ($p=0.016$).

Για το προ-παλμικό ερέθισμα των 85 kDa, η αλληλεπίδραση KETxCBD εμφάνισε στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέγεθος του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού [$F_{(1,29)}=8.132$, $p=0.008$]. Ειδικότερα παρατηρήθηκε ότι οι ομάδες KET/VEH, SAL/CBD και KET/CBD εμφάνισαν μειωμένη προ-παλμική αναστολή στο αντανακλαστικό αιφνιδιασμού ($p=0.001$, $p<0.001$, $p=0.038$ αντίστοιχα) (Γράφημα 4.13).

Προ-παλμική αναστολή αντανακλαστικού αιφνιδιασμού



Γράφημα 4.13: Επίδραση της χρόνιας χορήγησης κανναβιδιόλης (CBD) στη διαταραχή της προ-παλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET). ***:vs SAL/VEH, $p<0.001$; **:vs SAL/VEH, $p<0.01$; *:vs SAL/VEH, $p<0.05$; +:vs KET/SAL, $p<0.05$.

4.4.2 Εκτίμηση ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων κατόπιν της επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης

Προμετωπιαίος φλοιός (PFC):

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις (two way ANOVA) έδειξε ότι η αλληλεπίδραση της χορήγησης CBD και της χορήγησης KET επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά το λόγο ανακύκλησης της ντοπαμίνης όπως εκείνος αποτυπώνεται από την αναλογία DOPAC/DA [$F_{(2,25)}=10.068$, $p=0.004$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων με διορθώσεις κατά Bonferroni υποστηρίζουν ότι η πειραματική ομάδα KET/VEH εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση του λόγου DOPAC/DA συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.041$, vs. SAL/VEH), ενώ η ομάδα SAL/CBD παρουσιάζει αντίστοιχη τάση η οποία όμως δεν αγγίζει το κατώφλι της σημαντικότητας ($p=0.082$).

PFC	SAL/VEH	KET/VEH	SAL/CBD	KET/CBD
DOPAC (μg/g)	0,099 ±0.006	0,087 ±0.010	0,092 ±0.004	0,121 ±0.006
DA (μg/g)	0,134 ±0.015	0,192 ±0.018	0,188 ±0.015	0,196 ±0.016
DOPAC/DA	0,799 ±0.133	0,463 ±0.050	0,506 ±0.038	0,655 ±0.077
DOPAC+DA	0,251 ±0.022	0,256 ±0.031	0,280 ±0.016	0,317 ±0.016

Ραχιαίος ιππόκαμπος (DHIP):

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις υπό μελέτη παραμέτρους για το ραχιαίο ιππόκαμπο.

DHIP	SAL/VEH	KET/VEH	SAL/CBD	KET/CBD
DOPAC (μg/g)	0,044 ±0.005	0,037 ±0.001	0,035 ±0.004	0,037 ±0.003
DA (μg/g)	0,043 ±0.005	0,044 ±0.003	0,043 ±0.002	0,043 ±0.003
DOPAC/DA	1,074 ±0.109	0,870 ±0.079	0,818 ±0.086	0,878 ±0.061
DOPAC+DA	0,087 ±0.009	0,081 ±0.004	0,079 ±0.005	0,079 ±0.004

Κοιλιακός ιππόκαμπος (VHIP):

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις υπό μελέτη παραμέτρους για το ραχιαίο ιππόκαμπο.

VHIP	SAL/VEH	KET/VEH	SAL/CBD	KET/CBD
DOPAC (μg/g)	0,030 ±0.003	0,026 ±0.006	0,037 ±0.008	0,054 ±0.006
DA (μg/g)	0,040 ±0.002	0,043 ±0.006	0,046 ±0.003	0,048 ±0.003
DOPAC/DA	0,768 ±0.13	0,591 ±0.188	0,857 ±0.217	1,138 ±0.108
DOPAC+DA	0,070 ±0.004	0,069 ±0.005	0,082 ±0.007	0,102 ±0.008

Έσω ραβδωτό σώμα (DMS):

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις έδειξε ότι η αλληλεπίδραση της χορήγησης CBD με τη χορήγησης KET επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα ντοπαμίνης στην έσω μοίρα του ραχιαίου ραβδωτού σώματος των επίμυων [$F_{(2,25)}=9.311$, $p=0.007$]. Ειδικότερα, οι μετέπειτα συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων ανέδειξαν την αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης που παρατηρείται στα πειραματόζωα που έλαβαν μόνο κεταμίνη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (SAL/VEH vs. KET/VEH, $p=0.018$).

Επίσης η αλληλεπίδραση CBDxKET βρέθηκε ότι επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά και το λόγο HVA/DA [$F_{(2,25)}=7.148$, $p=0.016$]. Συγκεκριμένα οι πειραματικές ομάδες KET/VEH και KET/CBD εμφάνισαν μειωμένη την αναλογία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.034$, $p=0.043$ κατά αντιστοιχία) βάσει των συγκρίσεων με διορθώσεις Bonferroni, ενώ τάση για μείωση παρουσίασε και η ομάδα SAL/CBD ($p=0.060$).

Επιπρόσθετα, η στατιστική ανάλυση εμφάνισε την αλληλεπίδραση CBDxKET να επηρεάζει σημαντικά το άθροισμα DOPAC+DA [$F_{(2,25)}=10.820$, $p=0.004$] και το άθροισμα HVA+DA [$F_{(2,25)}=6.237$, $p=0.023$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων έδειξαν την αύξηση του αθροίσματος DOPAC+DA για την πειραματική ομάδα KET/VEH συγκριτικά με τη SAL/VEH ($p=0.013$).

DMS	SAL/VEH	KET/VEH	SAL/CBD	KET/CBD
DA (μg/g)	3,707 ±0.501	5,508 ±0.420	4,928 ±0.346	4,367 ±0.199
DOPAC (μg/g)	1,616 ±0.360	2,480 ±0.379	2,341 ±0.275	2,544 ±0.252
HVA (μg/g)	1,273 ±0.161	1,143 ±0.144	1,181 ±0.17	1,043 ±0.095
DOPAC/DA	0,556 ±0.166	0,475 ±0.090	0,499 ±0.085	0,587 ±0.056
HVA/DA	0,426 ±0.082	0,230 ±0.032	0,246 ±0.040	0,242 ±0.024
DOPAC+DA	5,469 ±0.705	8,223 ±0.568	6,909 ±0.428	6,879 ±0.313
HVA+DA	5,156 ±0.471	6,320 ±0.533	5,391 ±0.572	5,410 ±0.233

Έξω ραβδωτό σώμα (DLS):

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η αλληλεπίδραση της χορήγησης CBD με τη χορήγησης KET επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα ντοπαμίνης στην έξω μοίρα του ραχιαίου ραβδωτού σώματος των επίμυων [$F_{(2,25)}=4.169$, $p=0.051$]. Ειδικότερα, οι μετέπειτα συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων ανέδειξαν την αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης που παρατηρείται στα πειραματόζωα που έλαβαν μόνο κεταμίνη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (SAL/VEH vs. KET/VEH, $p=0.033$).

Παράλληλα, η αλληλεπίδραση CBDxKET βρέθηκε ότι επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά και το λόγο HVA/DA [$F_{(2,25)}=11,584$, $p=0.003$]. Συγκεκριμένα οι πειραματικές ομάδες KET/VEH και SAL/CBD εμφάνισαν μειωμένο ρυθμό ανακύκλωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.002$, $p=0.005$ κατά αντιστοιχία) βάσει των συγκρίσεων με διορθώσεις Bonferroni, ενώ τάση για μείωση παρουσίασε και η ομάδα KET/CBD ($p=0.074$).

DLS	SAL/VEH	KET/VEH	SAL/CBD	KET/CBD
DA (μg/g)	5,363 ±0.460	8,071 ±0.580	7,226 ±0.650	7,430 ±0.684
DOPAC (μg/g)	3,062 ±0.402	3,831 ±0.507	3,043 ±0.404	3,585 ±0.289
HVA (μg/g)	1,743 ±0.162	1,335 ±0.102	1,294 ±0.200	1,713 ±0.248
DOPAC/DA	0,502 ±0.105	0,516 ±0.099	0,443 ±0.073	0,595 ±0.099
HVA/DA	0,348 ±0.046	0,162 ±0.018	0,183 ±0.017	0,234 ±0.029
DOPAC+DA	8,291 ±0.607	11,974 ±0.603	10,268 ±0.789	10,847 ±0.763
HVA+DA	7,457 ±0.395	9,479 ±0.623	8,158 ±0.798	9,143 ±0.836

Επικλινής πυρήνας (NAc):

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις έδειξε ότι η αλληλεπίδραση της χορήγησης KET με τη χορήγηση CBD επηρέασε μόνο το λόγο HVA/DA [$F_{(2,25)}=12.383$ $p=0.002$]. Οι συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων, έδειξαν ότι ο λόγος εμφανίζεται μειωμένος στις ομάδες KET/VEH, SAL/CBD και KET/CBD συγκριτικά με την ομάδα SAL/VEH ($p=0.002$, $p=0.003$, $p=0.018$).

NAc	SAL/VEH	KET/VEH	SAL/CBD	KET/CBD
DA (μg/g)	6,235 ±1.064	7,788 ±0.682	6,203 ±0.608	7,995 ±0.533
DOPAC (μg/g)	4,842 ±0.387	3,903 ±0.486	4,155 ±0.502	5,042 ±0.457
HVA (μg/g)	2,717 ±0.611	1,643 ±0.317	1,515 ±0.228	2,069 ±0.360
DOPAC/DA	0,762 ±0.174	0,493 ±0.0214	0,592 ±0.066	0,631 ±0.091
HVA/DA	0,424 ±0.053	0,179 ±0.023	0,209 ±0.031	0,241 ±0.040
DOPAC+DA	11,082 ±0.972	11,754 ±1.264	10,907 ±0.635	12,951 ±0.316
HVA+DA	8,995 ±1.725	9,431 ±0.770	8,266 ±0.449	9,948 ±0.810

4.4.3 Εκτίμηση γλουταματεργικής δραστηριότητας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων κατόπιν της επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης

Προμετωπιαίος φλοιός (PFC)

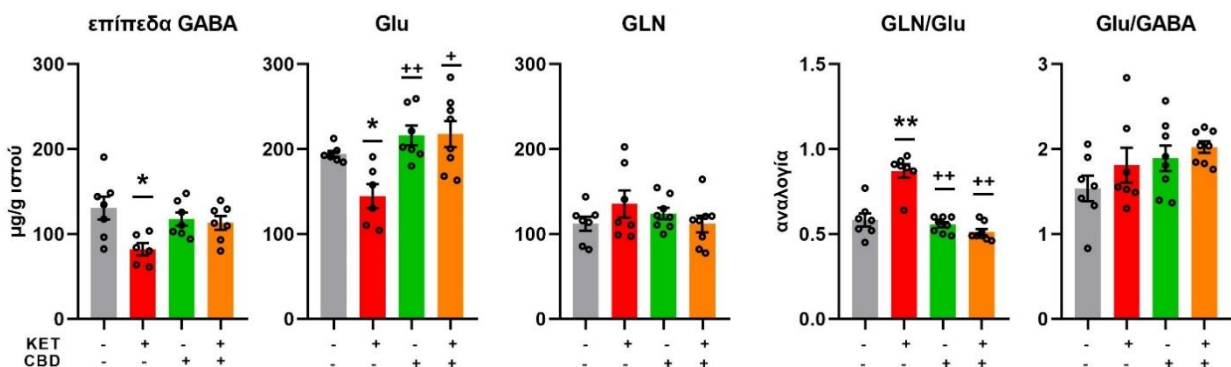
Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά 2 διευθύνσεις ως προς την ανιχνευθείσα συγκέντρωση GABA στα δείγματα από PFC μέσω HPLC-ED έδειξε στατιστικά σημαντική την επίδραση της χορήγησης KET [$F_{(1,23)} = 7,414, p=0.012$], όπως και την αλληλεπίδραση CBDxKET [$F_{(1,23)} = 5,271, p=0.031$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων, κατόπιν των προβλεπόμενων διορθώσεων κατά Bonferroni υποστηρίζουν τη μείωση της συγκέντρωσης GABA στα δείγματα KET/VEH συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (SAL/VEH, $p=0.0121$).

Ως προς τα επίπεδα Glu, η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η χορήγηση KET επηρεάζει την υπό μελέτη παράμετρο [$F_{(1,24)} = 14.527, p<0.001$] και εμφάνισε σημαντική την αλληλεπίδραση CBDxKET [$F_{(1,24)} = 14.527, p=0.050$]. Οι συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων έδειξαν ότι τα επίπεδα της πειραματικής ομάδας που έλαβε μόνο KET τείνουν να εμφανίσουν μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.0530$), ενώ εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα SAL/CBD ($p=0.003$) και KET/CBD ($p=0.002$) (Γράφημα 4.14).

Τα επίπεδα GLN δεν επηρεάστηκαν από τα σχήματα χορήγησης.

Η κύκλιση του Glu, όπως αντανακλάται από το λόγο GLN/Glu, εμφανίστηκε στατιστικά σημαντικώς επηρεασμένη από τη χορήγηση CBD [$F_{(1,26)} = 18.324, p<0.001$] και KET [$F_{(1,26)} = 45.000, p<0.001$], ενώ στατιστικά σημαντική υπολογίστηκε και η αλληλεπίδραση CBDxKET [$F_{(1,26)} = 33.071, p<0.001$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση του λόγου για την πειραματική ομάδα KET/VEH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά και τις πειραματικές ομάδες CBD/SAL και CBD/KET ($p=0.005, p=0.003, p=0.001$ κατά αντιστοιχία) (Γράφημα 4.14).

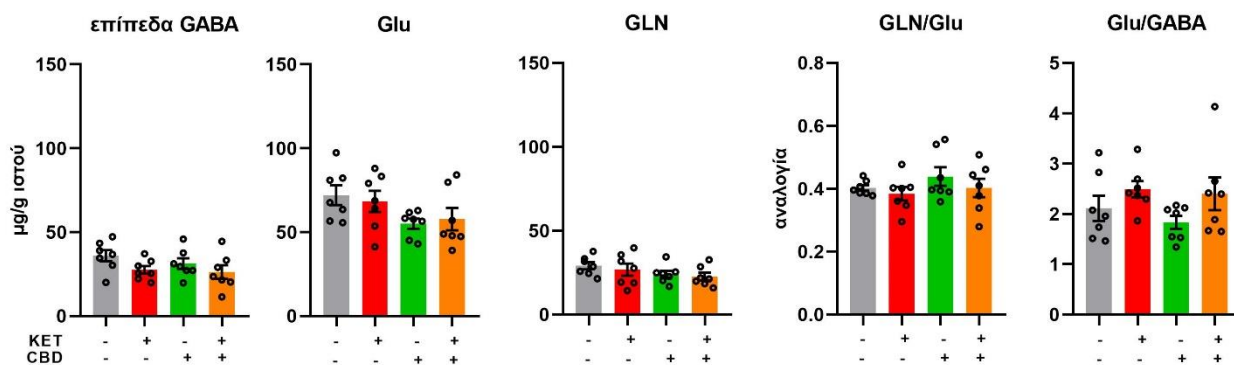
Η αναλογία Glu/GABA δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές μεταβολές.



Γράφημα 4.14: Επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC) όπως αυτή μπορεί να θεωρηθεί μέσω εκτίμησης ιστικών επιπέδων GABA, γλουταμικού (Glu) και γλουταμίνης (Gln). **: vs SAL/VEH, $p<0.01$; *: vs SAL/VEH, $p<0.05$; ++: vs KET/VEH, $p<0.01$; +: vs KET/VEH, $p<0.05$.

Ραχιαίος υπόκαμπος (dHIP)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις δεν έμφάνισε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή για οποιαδήποτε από τις υπό μελέτη νευροχημικές παραμέτρους στο ραχιαίο υπόκαμπο (Γράφημα 4.15).



Γράφημα 4.15: Επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση στο ραχιαίο υπόκαμπο (dHIP) όπως αυτή μπορεί να θεωρηθεί μέσω εκτίμησης ιστικών επιπέδων GABA, γλουταμικού (Glu) και γλουταμίνης (Gln).

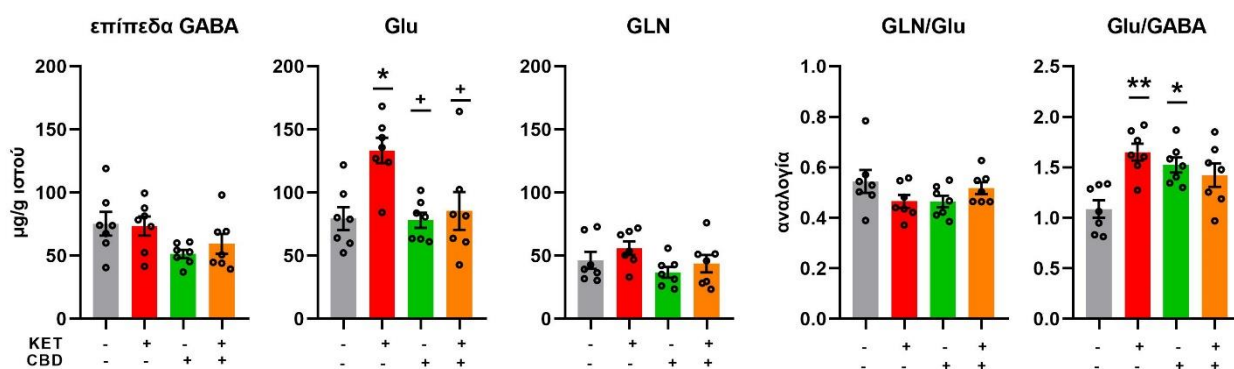
Κοιλιακός υπόκαμπος (vHIP)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά 2 διευθύνσεις έδειξε ότι μόνο η χορήγηση CBD επηρεάζει τη συγκέντρωση GABA [$F_{(1,24)}=6.682$, $p=0.016$], ενώ δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των χορηγήσεων.

Αντίστοιχη ανάλυση τύπου 2 way ANOVA έδειξε ότι η χορήγηση CBD όπως και η χορήγηση KET επηρεάζουν τη συγκέντρωση glu [$F_{(1,24)}=5,497$, $p=0.028$, $F_{(1,24)}=8,500$, $p=0.008$ αντιστοίχως]. Επιπρόσθετα, στατιστικά σημαντική αναδείχθηκε και η αλληλεπίδραση μεταξύ των 2 παραγόντων [$F_{(1,24)}=4.888$, $p=0.037$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων υποστήριξαν τη στατιστικά σημαντική αύξηση που προκαλεί η κεταμίνη στα επίπεδα του glu συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (KET/VEH vs SAL/VEH, $p=0.046$), την ομάδα SAL/CBD ($p=0.025$) και KET/CBD ($p=0.049$).

Τα επίπεδα της GLN όπως και η αναλογία GLN/Glu δεν εμφάνισαν κάποια στατιστική μεταβολή στον κοιλιακό υπόκαμπο.

Ο λόγος Glu/GABA βρέθηκε να επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση KETxCBD [$F_{(1,24)}=13,321$, $p=0.001$]. Οι μετέπειτα αναλύσεις έδειξαν ότι ο λόγος εμφανίζει αύξηση στην ομάδα KET/VEH και SAL/CBD συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.009$ και $p=0.033$ αντιστοίχα) (Γράφημα 4.16).

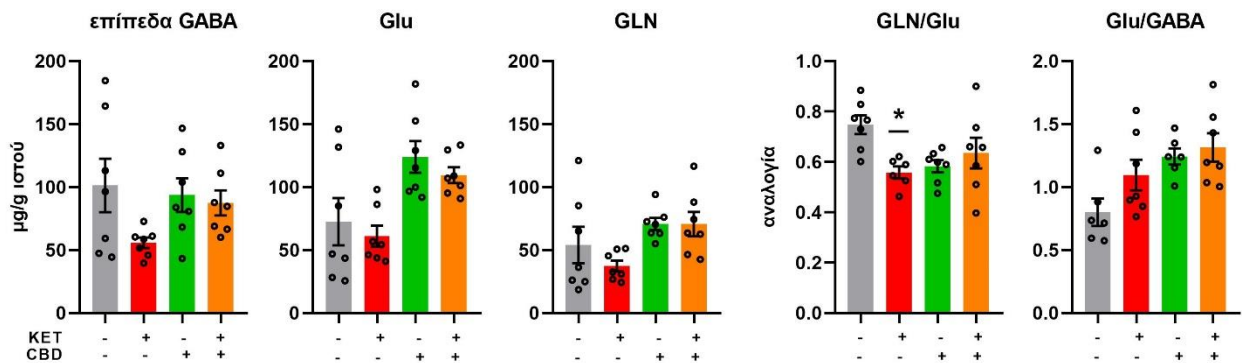


Γράφημα 4.16: Επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση στον κοιλιακό υπόκαμπο (vHIP) όπως αυτή μπορεί να θεωρηθεί μέσω εκτίμησης ιστικών επιπέδων GABA, γλουταμικού (Glu) και γλουταμίνης (Gln). **: vs SAL/VEH, $p<0.01$; *: vs SAL/VEH, $p<0.05$;

Έσω ραβδωτό σώμα (DMS)

Η στατιστική ανάλυση κατά δυο διευθύνσεις έδειξε ότι τα επίπεδα GABA δεν εμφανίζουν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή μετά την επίδραση των υπό μελέτη χορηγήσεων αν και εμφανίζεται μια ισχυρή τάση λόγω χορήγησης KET [$F_{(1,24)} = 3.598$, $p = 0.070$].

Η στατιστική ανάλυση για το λόγο Glu/GABA έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση CBDxKET [$F_{(1,23)} = 8.339$, $p = 0.008$]. Επιπρόσθετα, οι μετέπειτα συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων ανέδειξαν τη στατιστικά σημαντική μείωση του λόγου GLN/Glu που υφίσταται η ομάδα KET/VEH συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.049$) (Γράφημα 4.17).



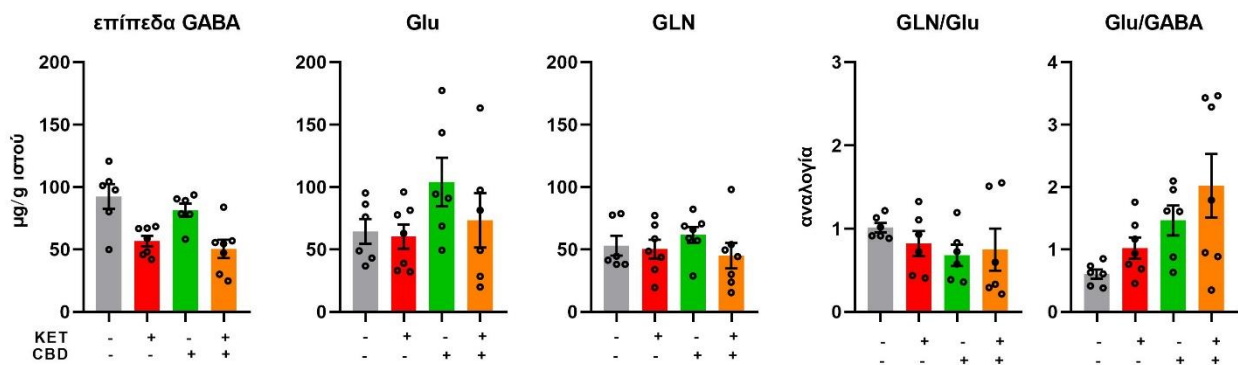
Γράφημα 4.17: Επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση στον εσωτερικό ραχιαίο ραβδωτό (DMS) όπως αυτή μπορεί να θεωρηθεί μέσω εκτίμησης ιστικών επιπέδων GABA, γλουταμικού (Glu) και γλουταμίνης (Gln). *:vs SAL/VEH, $p < 0.05$;

Έξω ραβδωτό σώμα (DLS)

Η στατιστική ανάλυση κατά δυο διευθύνσεις έδειξε ότι τα επίπεδα GABA στο LS επηρεάζονται μόνο από τη χορήγηση KET [$F_{(1,22)}=22.936$, $p<0.001$].

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για τα επίπεδα glu, GLN και το λόγο κύκλισης του γλουταμικού (GLN/glu) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Ο λόγος glu/GABA βρέθηκε ότι επηρεάζεται αποκλειστικά από τη χορήγηση CBD [$F_{(1,23)}=9.943$, $p=0.004$] (Γράφημα 4.19).



Γράφημα 4.18: Επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση στον εξωτερικό ραχιαίο ραβδωτό (DLS) όπως αυτή μπορεί να θεωρηθεί μέσω εκτίμησης ιστικών επιπέδων GABA, γλουταμικού (Glu) και γλουταμίνης (Gln).

Επικλινής πυρήνας (NAc)

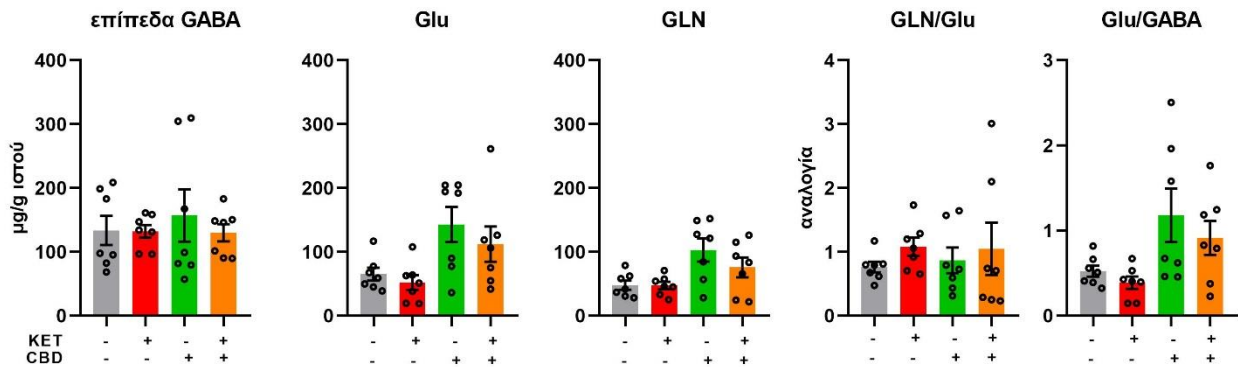
Η στατιστική ανάλυση κατά δύο διευθύνσεις έδειξε ότι τα επίπεδα GABA στο NAc δεν επηρεάστηκαν από τα σχήματα χορηγήσεων.

Τα επίπεδα Glu βρέθηκε ότι επηρεάζονται από τη χορήγηση CBD [$F_{(1,24)}=10.0941$, $p=0.003$], ενώ η χορήγηση KET δεν είχε επίπτωση στην υπό μελέτη παράμετρο, ούτε παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο χορηγήσεων.

Αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για τα επίπεδα GLN έδειξε ότι μόνο η χορήγηση CBD επηρεάζει τα συγκεκριμένα επίπεδα [$F_{(1,24)}=10.702$, $p=0.003$].

Η στατιστική ανάλυση για τα δεδομένα σχετικά με την κύκλιση του γλουταμικού (λόγος GLN/Glu), δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Γράφημα 4.19).

Αντίστοιχα, η ανάλυση για το λόγο Glu/GABA ανάδειξε τη στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης CBD [$F_{(1,24)}= 9.464$, $p=0.005$] (Γράφημα 4.19).



Γράφημα 4.19: Επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκαλεί η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στη γλουταματεργική νευροδιαθίβαση στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος (NAc) όπως αυτή μπορεί να θεωρηθεί μέσω εκτίμησης ιστικών επιπέδων GABA, γλουταμικού (Glu) και γλουταμίνης (Gln).

4.4.4 Εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφραση των υποδοχέων του γλουταματεργικού συστήματος μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western.

Προμετωπιαίος φλοιός (PFC)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά 2 διευθύνσεις για τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της GluN1 υπομονάδας έδειξαν σημαντική επίδραση της χορήγησης KET [$F_{(1,12)}=4.89$, $p=0.047$] και της χορήγησης CBD [$F_{(1,12)}=5.85$, $p=0.032$], χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των 2 χορηγήσεων (Γράφημα 4.20).

Σχετικά με την υπομονάδα GluN2A, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Εικόνα Β.2.3.Β). Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για την έκφραση της GluN2B υπομονάδας στον PFC ανέδειξε την αλληλεπίδραση CBDXKET [$F_{(1,12)}=14.71$, $p=0.002$]. Ειδικότερα, οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων υποστηρίζουν την αύξηση της έκφρασης της GluN2B στις ομάδες KET/VEH ($p=0.002$) και SAL/CBD ($p=0.019$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 4.20).

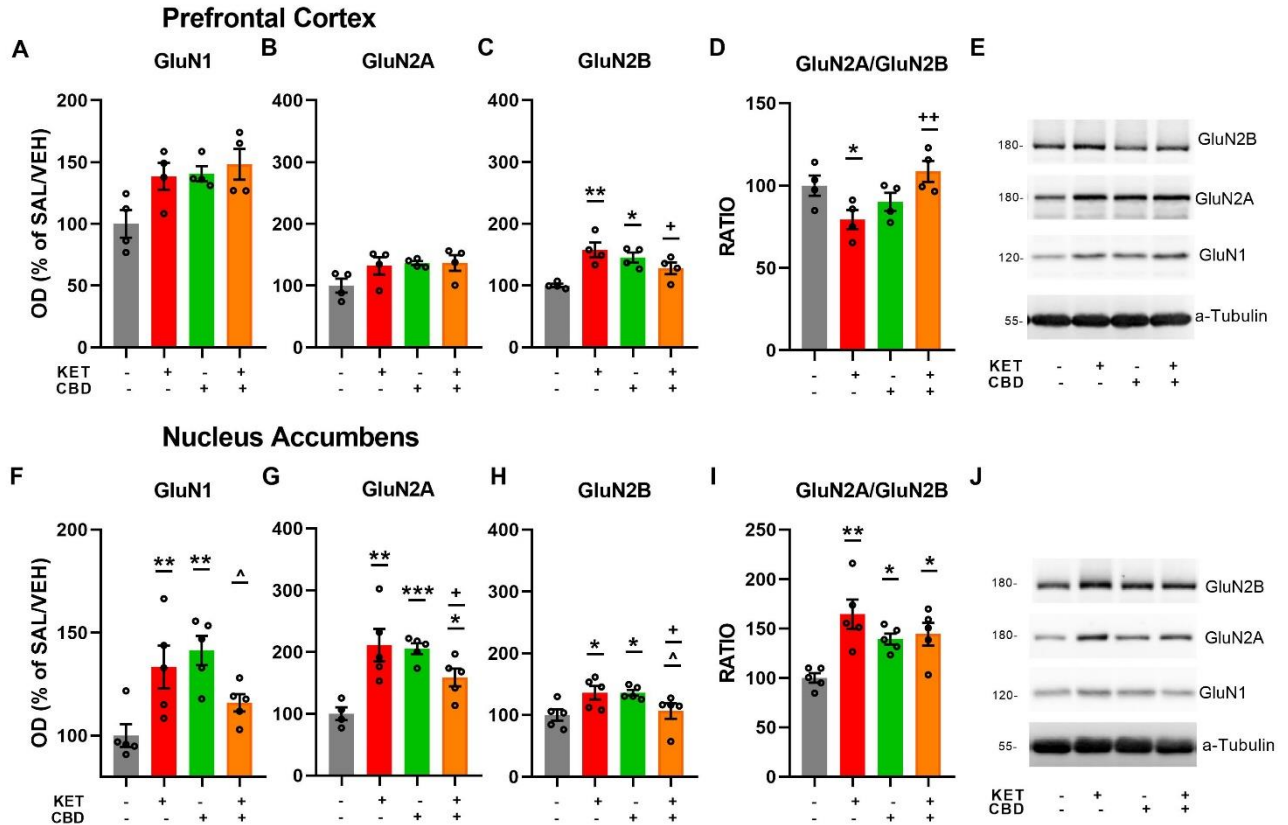
Επιπρόσθετα υπολογίστηκε ο λόγος της υπολογισθείσας πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων GluN2A/GluN2B. Η στατιστική ανάλυση κατά δύο διευθύνσεις παρουσίασε την αλληλεπίδραση CBDXKET [$F_{(1,12)}=10.90$, $p=0.006$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις έδειξαν πως ο λόγος των υπομονάδων εμφανίστηκε μειωμένος για την ομάδα KET/VEH συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.031$) αλλά και την ομάδα KET/CBD ($p=0.005$) (Γράφημα 4.20).

Επικλινής πυρήνας (NAc)

Η στατιστική ανάλυση κατά 2 διευθύνσεις για με την έκφραση της υπομονάδας GluN1 στο NAc εμφάνισε αλληλεπίδραση KETXCBD [$F_{(1,15)}=14.30$, $p=0.002$]. Ειδικότερα, οι πειραματικές ομάδες KET/VEH και SAL/CBD εμφάνισαν αυξημένη έκφραση της υπομονάδας σε σχέση με την ομάδα SAL/VEH ($p=0.005$, $p=0.001$), ενώ δε παρατηρήθηκε αντίστοιχη μεταβολή της έκφρασης της GluN1 υπομονάδας για την ομάδα KET/CBD (Γράφημα 4.20).

Αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για τη GluN2A υπομονάδα έδειξε αλληλεπίδραση CBDXKET [$F_{(1,15)}=21.16$, $p<0.001$]. Η έκφραση της υπομονάδας υπολογίστηκε στατιστικά σημαντικώς αυξημένη στην ομάδα KET/VEH ($p=0.001$), στην ομάδα SAL/CBD ($p<0.001$), αλλά και την ομάδα KET/CBD ($p=0.032$). Ας σημειωθεί όμως ότι η ομάδα KET/CBD εμφάνισε χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με την ομάδα KET/VEH ($p=0.042$) (Γράφημα 4.20). Η στατιστική ανάλυση για τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της GluN2B υπομονάδας εμφάνισε αλληλεπίδραση CBDXKET [$F_{(1,15)}=14.37$, $p=0.002$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις ανέδειξαν τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας για την ομάδα KET/VEH ($p=0.019$) και την ομάδα SAL/CBD ($p=0.019$), συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Οι επίμυες της ομάδας KET/CBD εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα συγκριτικά με τις ομάδες SAL/CBD και KET/VEH ($p=0.047$, $p=0.048$ κατά αντιστοιχία) (Γράφημα 4.20).

Όπως αντίστοιχα και για τον PFC υπολογίστηκε ο λόγος της πρωτεϊνικής έκφρασης GluN2A/GluN2B, όπου η στατιστική ανάλυση ανέδειξε την αλληλεπίδραση CBDXKET [$F_{(1,15)}=7.74$, $p=0.014$]. Ειδικότερα, οι post hoc συγκρίσεις έδειξαν την αύξηση του λόγου στην ομάδα KET/VEH ($p=0.001$), την ομάδα SAL/CBD ($p=0.023$) και την KET/CBD ($p=0.012$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 4.20).

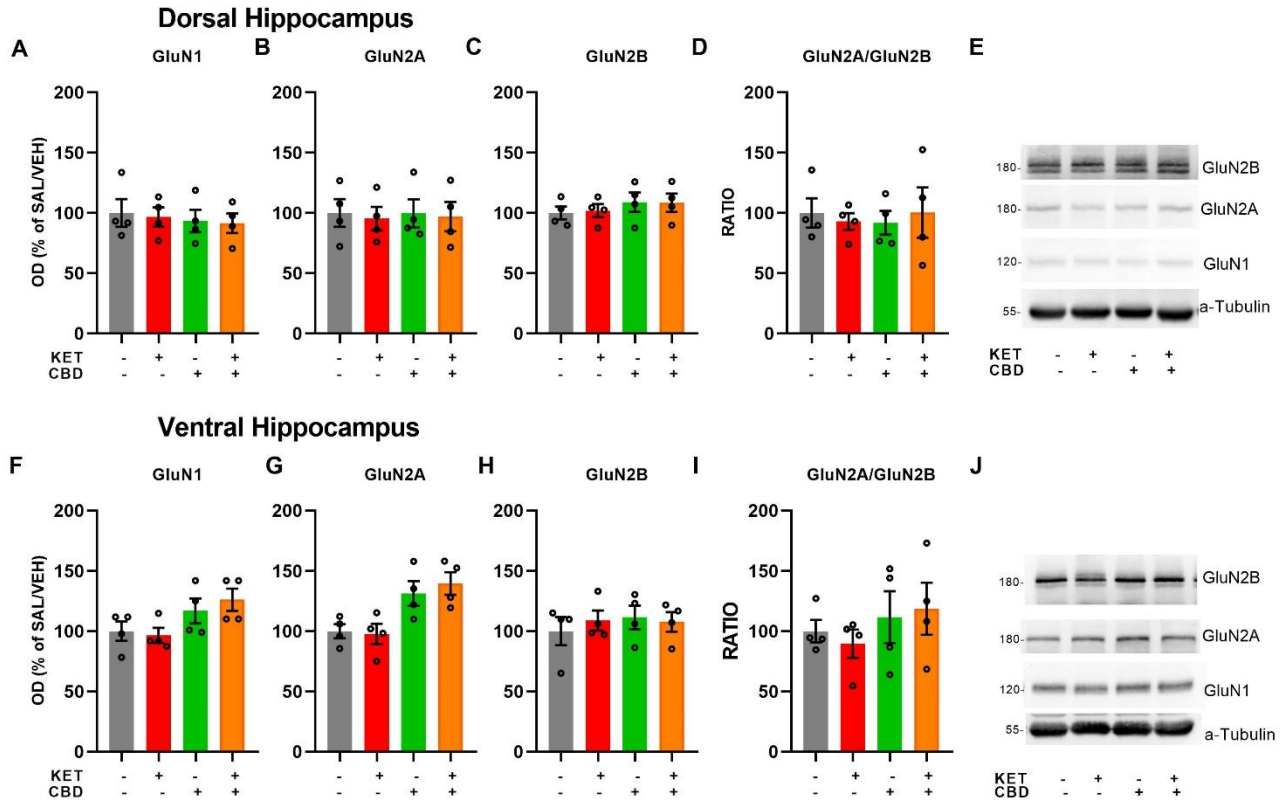


Γράφημα 4.20: Οι επιδράσεις της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στο πρότυπο έκφρασης των υπομονάδων των NMDA υποδοχέων στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC- επάνω σειρά) και τον επικλινή πυρήνα (NAc – κάτω σειρά). Οι υπομονάδες έχουν ως εξής: A, F: GluN1; B, G: GluN2A; C, H: GluN2B; D, I: GluN2A/ GluN2B ratio; E, J: αντιπροσωπευτικό blot.

Τα δεδομένα εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου (SAL/VEH) Η οπτική πυκνότητα κάθε μπάντας διαιρέθηκε με τον αντίστοιχο μάρτυρα ισοφόρτωσης. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs SAL/VEH; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs KET/VEH; ^ $p < 0.05$ vs SAL/CBD ($n=4$ ανά πειραματική ομάδα).

Ραχιαίος και κοιλιακός ιππόκαμπος (DHIP, VHIP)

Οι στατιστικές αναλύσεις των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων ενδιαφέροντος των NMDA υποδοχέων, καθώς και της αναλογίας GluN2A/GluN2B, δεν εμφάνισαν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στο ραχιαίο και τον κοιλιακό ιππόκαμπο (Γράφημα 4.21).



Γράφημα 4.21: Οι επιδράσεις της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στο πρότυπο έκφρασης των υπομονάδων των NMDA υποδοχέων στο ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο (DHIP- επάνω σειρά, VHIP-κάτω σειρά κατά αντιστοιχία). Οι υπομονάδες έχουν ως εξής: A, F: GluN1; B, G: GluN2A; C, H: GluN2B; D, I: GluN2A/ GluN2B ratio; E, J: αντιπροσωπευτικό blot.

Τα δεδομένα εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου (SAL/VEH) Η οπτική πυκνότητα κάθε μπάντας διαιρέθηκε με τον αντίστοιχο μάρτυρα ισοφόρτωσης. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs SAL/VEH; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs KET/VEH; ^ $p < 0.05$ vs SAL/CBD ($n=4$ ανά πειραματική ομάδα).

4.4.4.2 Πρωτεϊνική έκφραση AMPA υποδοχέων

Προμετωπιαίος φλοιός (PFC)

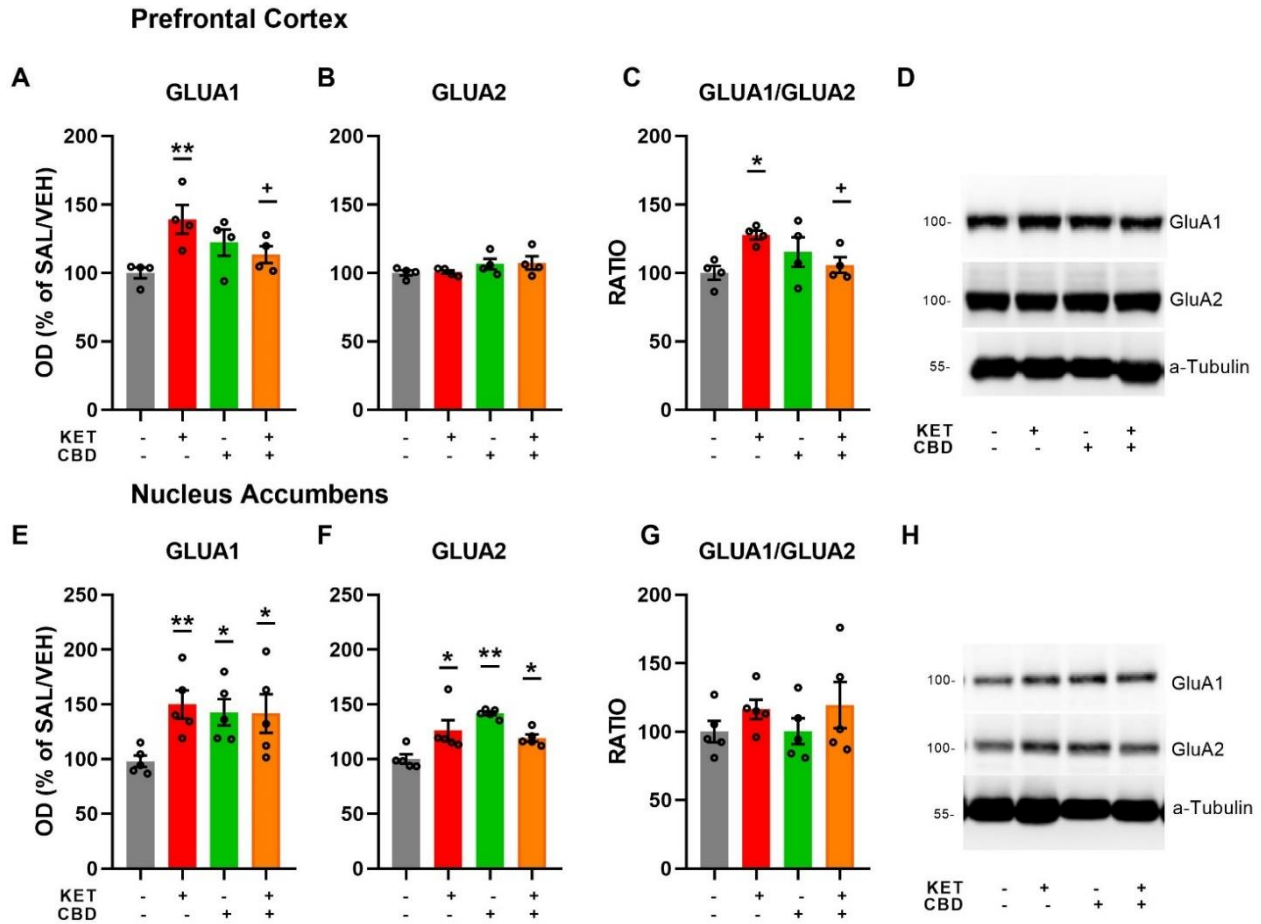
Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις για τα επίπεδα έκφρασης της GluA1 υπομονάδας των AMPA υποδοχέων στον PFC έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση KET/CBD [$F_{(1,11)}=7.40$, $p=0.020$]. Οι μετέπειτα *post hoc* συγκρίσεις ανέδειξαν την αύξηση της έκφρασης της υπομονάδας στην ομάδα KET/VEH συγκριτικά με την ομάδα SAL/VEH ($p=0.005$) και την ομάδα CBD/KET ($p=0.042$) (Γράφημα 4.22).

Ως προς την αναλογία GluA1/GluA2 εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση KET/CBD [$F_{(1,11)}=5.89$, $p=0.034$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις έδειξαν αύξηση της αναλογίας για την KET/VEH ομάδα συγκριτικά με την SAL/VEH και την KET/CBD ($p=0.034$, $p=0.036$ κατά αντιστοιχία) (Γράφημα 4.22).

Επικλινής πυρήνας (NAc)

Η στατιστική ανάλυση για τον επικλινή πυρήνα έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση KET/CBD για τα επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας GluA1 [$F_{(1,11)}=4.43$, $p=0.049$] και της υπομονάδας GluA2 [$F_{(1,16)}=19.16$, $p<0.001$]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις τύπου Bonferroni παρουσίασαν την αύξηση των GluA1 επιπέδων για την ομάδα KET/VEH ($p=0.011$), SAL/CBD ($p=0.025$) και CBD/KET ($p=0.028$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 4.22).

Επίσης, σχετικά με την έκφραση της GluA2 υπομονάδας, αυξήσεις παρατηρήθηκαν για τις ομάδες KET/VEH ($p=0.004$), SAL/CBD ($p=0.001$) και CBD/KET ($p=0.026$), σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα Β.2.5.ΣΤ). Οι αντίστοιχες στατιστικές αναλύσεις για το λόγο GluA1/GluA2 στον επικλινή πυρήνα δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (Γράφημα 4.22).



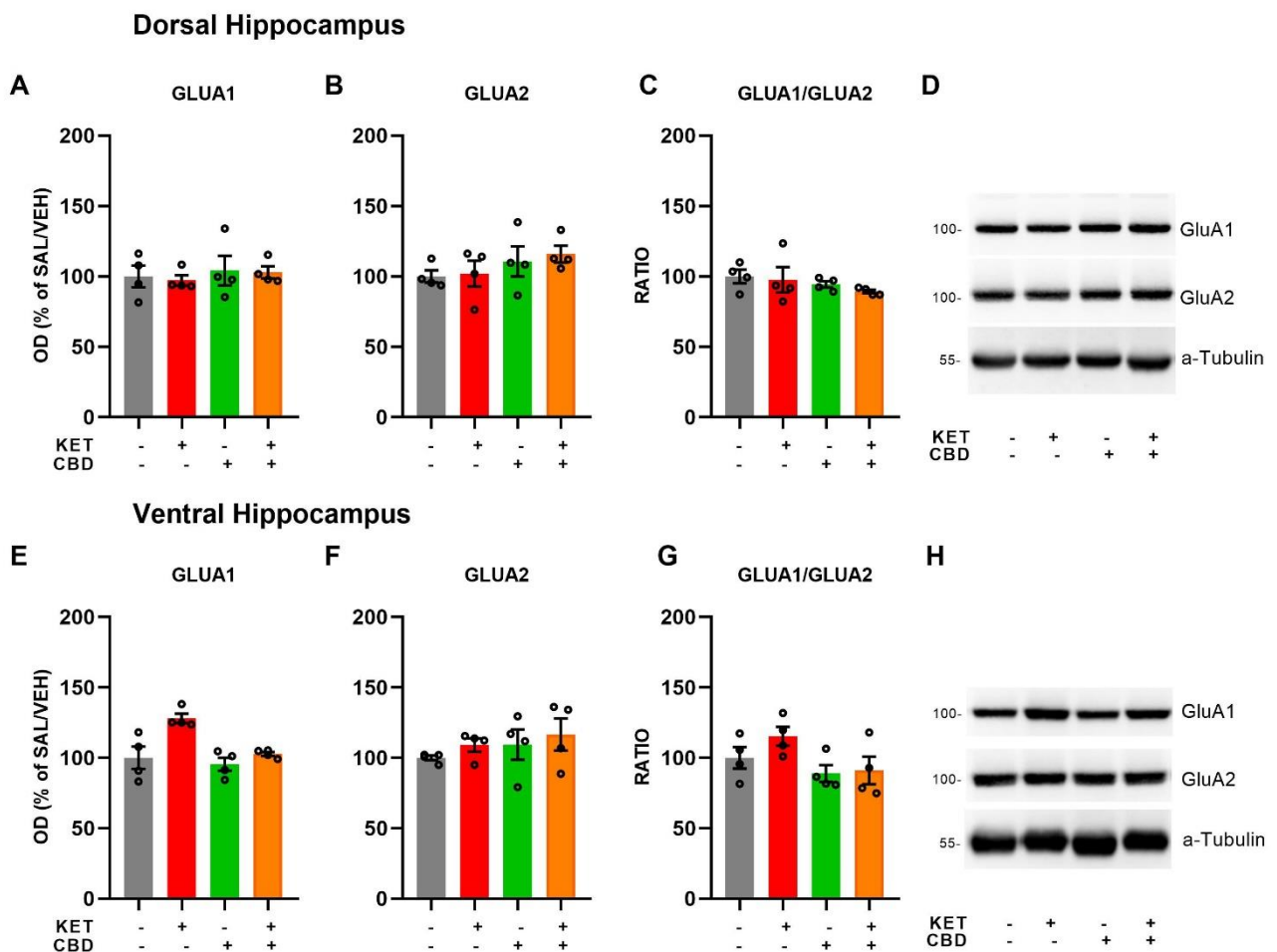
Γράφημα 4.22: Οι επιδράσεις της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στο πρότυπο έκφρασης των υπομονάδων των AMPA υποδοχέων στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC- επάνω σειρά) και τον επικλινή πυρήνα (NAc – κάτω σειρά). Οι υπομονάδες έχουν ως εξής). A, E: GLUA1; B, F: GLUA2; C, G: GLUA1/GLUA2 ratio; D, H: αντιπροσωπευτικό blot.

Τα δεδομένα εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου (SAL/VEH) Η οπτική πυκνότητα κάθε μπάντας διαιρέθηκε με τον αντίστοιχο μάρτυρα ισοφόρτωσης. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs SAL/VEH; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs KET/VEH; ^ $p < 0.05$ vs SAL/CBD (n=4 ανά πειραματική ομάδα).

Ραχιαίος και κοιλιακός ιππόκαμπος (DHIP και VHIP)

Οι στατιστικές αναλύσεις μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις δεν παρουσίασαν κάποια στατιστική μεταβολή στην έκφραση των GluA1 και GluA2 υπομονάδων ή της μεταξύ τους αναλογίας στον ραχιαίο ιππόκαμπο (Γράφημα 4.23).

Στον κοιλιακό ιππόκαμπο η αντίστοιχη ανάλυση ανέδειξε κύρια επίδραση της χορήγησης KET [$F_{(1,12)}=12.73$, $p=0.004$] και της χορήγησης CBD [$F_{(1,12)}=9.04$, $p=0.01$] ως προς την έκφραση GluA1, με την απουσία ωστόσο στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης CBDXKET. (Εικόνα Β.2.6.Α-Γ). Σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης της GluA2 υπομονάδας, παρατηρήθηκε μόνο στατιστικά σημαντική επίδραση λόγω χορήγησης CBD [$F_{(1,12)}=6.35$, $p=0.027$] (Γράφημα 4.23).



Γράφημα 4.23: Οι επιδράσεις της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη (KET) στο πρότυπο έκφρασης των υπομονάδων των AMPA υποδοχέων υποδοχέων στο ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο (DHIP- επάνω σειρά, VHIP-κάτω σειρά κατά αντιστοιχία). Οι υπομονάδες έχουν ως εξής). A, E: GLUA1; B, F: GLUA2; C, G: GLUA1/GLUA2 ratio; D, H: αντιπροσωπευτικό blot.

Τα δεδομένα εκφράζονται ως % της ομάδας ελέγχου (SAL/VEH) Η οπτική πυκνότητα κάθε μπάντας διαιρέθηκε με τον αντίστοιχο μάρτυρα ισοφόρτωσης.

4.4.5 Εκτίμηση της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές

Προμετωπιαίος φλοιός

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις εμφάνισε αλληλεπίδραση KETx CBD ως προς το λόγο p-ERK2/t-ERK2 [$F_{(1,12)}=19.29$, $p=0.001$]. Συγκεκριμένα, οι ομάδες KET/VEH, SAL/CBD και KET/CBD εμφάνισαν αυξημένο το λόγο p-ERK2/t-ERK2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$ αντίστοιχα). Η τάση για παρόμοιες αλλαγές παρατηρήθηκε επίσης για το λόγο p-ERK1/t-ERK1 χωρίς όμως να αγγίξει τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας (Γράφημα 4.24).

Επικλινής πυρήνας

Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε την αλληλεπίδραση KETx CBD για τους λόγους p-ERK1/t-ERK1 και p-ERK2/t-ERK2 [$F_{(1,16)}=13.63$, $p=0.002$; $F_{(1,16)}=9.30$, $p=0.008$, αντίστοιχα]. Οι μετέπειτα συγκρίσεις έδειξαν ότι ο λόγος p-ERK1/t-ERK1 ήταν αυξημένος στην πειραματική ομάδα KET/VEH συγκριτικά με τις ομάδες SAL/VEH ($p<0.001$) και KET/CBD ($p=0.003$). Αντίστοιχα, η KET αύξησε το λόγο και για την άλλη ισομορφή (p-ERK2/t-ERK2 ratio) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p<0.001$) και την ομάδα KET/CBD ($p=0.003$) (Γράφημα 4.24).

Έσω ραχιαίο ραβδωτό σώμα (DMS)

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για το DMS έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των χορηγήσεων KETx CBD δεν επηρέασε σημαντικά το λόγο p-ERK1/t-ERK1, αν και πλησίασε το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας [$F_{(1,16)}=3.595$, $p=0.082$]. Ο λόγος p-ERK2/t-ERK2 ωστόσο βρέθηκε να επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση KETx CBD [$F_{(1,16)}=5.142$, $p=0.043$], ενώ οι μετέπειτα post hoc συγκρίσεις υποστήριξαν ότι η ομάδα KET/VEH εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τις ομάδες SAL/VEH και KET/CBD ($p=0.003$, $p=0.021$ αντίστοιχα).

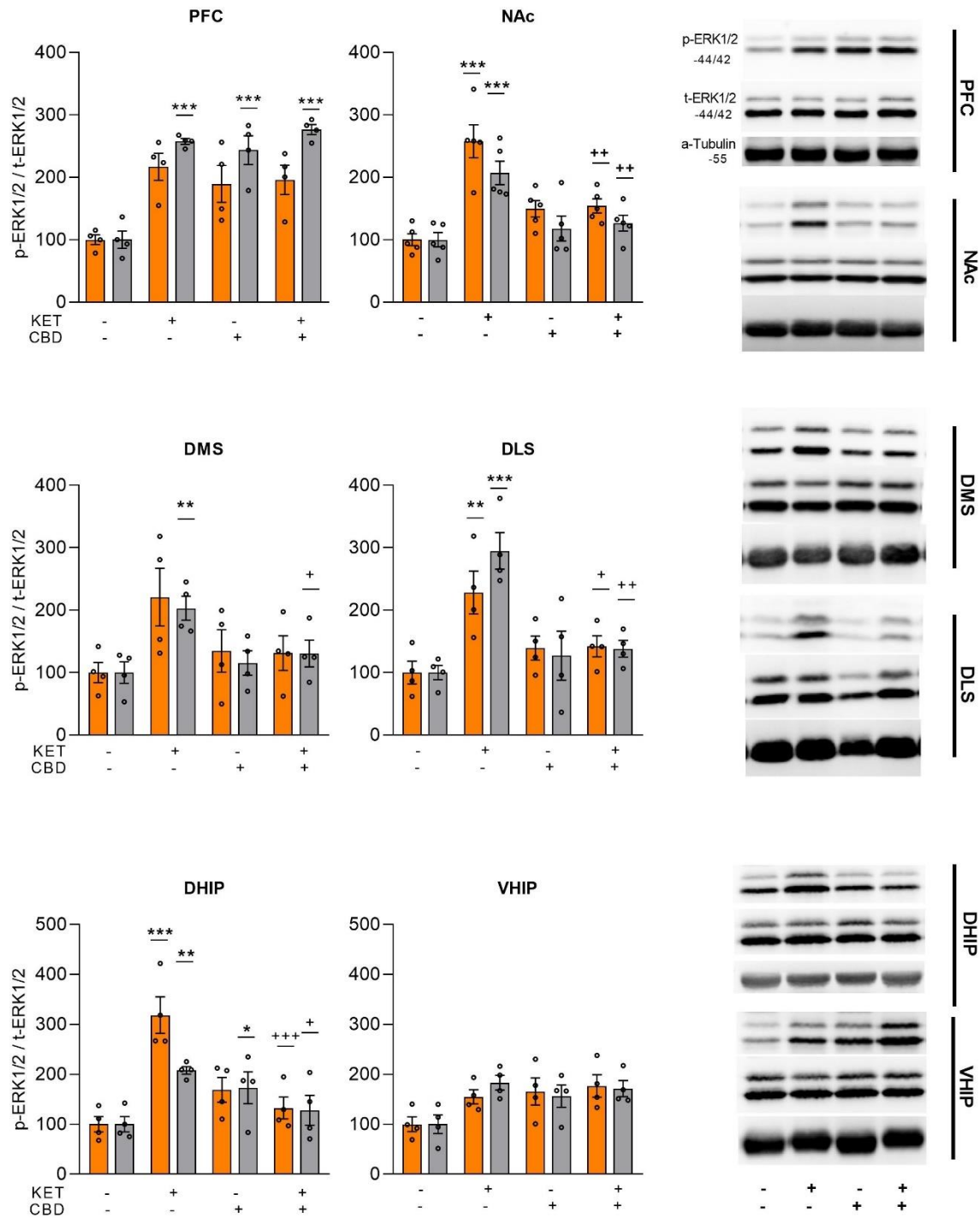
Έξω ραχιαίο ραβδωτό σώμα (DLS)

Η στατιστική ανάλυση που αφορούσε το DLS έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των χορηγήσεων KETx CBD επηρέασε στατιστικώς σημαντικά τους λόγους p-ERK1/t-ERK1 και p-ERK2/t-ERK2 [$F_{(1,16)}=7.275$, $p=0.019$; $F_{(1,16)}=12.445$, $p=0.004$, αντίστοιχα]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις έδειξαν ότι η KET/CBD εμφάνισε αυξήσεις στο λόγο p-ERK1/t-ERK1 συγκριτικά τις ομάδες SAL/VEH και KET/CBD ($p=0.002$, $p=0.023$ αντίστοιχα). Παρομοίως ο λόγος p-ERK2/t-ERK2 για την KET/CBD πειραματική ομάδα εκτιμήθηκε αυξημένος συγκριτικά με τις SAL/VEH και KET/CBD ($p<0.001$, $p=0.001$ αντίστοιχα).

Ραχιαίος και κοιλιακός ιππόκαμπος

Στο ραχιαίο ιππόκαμπο παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση KETx CBD για την αναλογία έκφρασης p-ERK1/t-ERK1 [$F_{(1,12)}=24.31$, $p<0.001$], όπως και για το λόγο p-ERK2/t-ERK2 [$F_{(1,12)}=10.68$, $p=0.007$]. Οι ακόλουθες post hoc συγκρίσεις υποστήριξαν ότι ο λόγος p-ERK1/t-ERK1 εμφανίστηκε αυξημένος στην πειραματική ομάδα KET/VEH, όταν αυτή συγκρίνεται με την SAL/VEH ($p<0.001$) και την KET/CBD ($p<0.001$). Επιπροσθέτως, ο λόγος p-ERK2/t-ERK2 παρατηρήθηκε αυξημένος στην ομάδα KET/VEH συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.007$) αλλά και την ομάδα που έλαβε τη χορήγηση CBD μετά την επαναλαμβανόμενη έκθεση σε KET ($p=0.032$). Ο συγκεκριμένος λόγος βρέθηκε επίσης αυξημένος και στην ομάδα SAL/CBD συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.048$) (Εικόνα 4.24).

Στον κοιλιακό ιππόκαμπο δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Γράφημα 4.24).



Γράφημα 4.24: Effects of cannabidiol (CBD) treatment on ketamine (KET)-induced alterations in the pERK1/2 / total ERK1/2 ratio in (A) the prefrontal cortex, PFC; (B) the nucleus accumbens, NAc; (C) the dorsomedial striatum, DMS; (D) the dorsolateral striatum, DLS; (E) the dorsal hippocampus (DHIP); (F) the ventral hippocampus, VHIP. White bars: p-ERK1, tERK1 isoforms; gray bars: p-ERK2, tERK2 isoforms. Data are presented as percentage of the SAL/VEH group. The optical density (OD) of each band was divided by the corresponding loading marker. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA (Bonferroni's post hoc test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs SAL/VEH; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs KET/VEH ($n = 4$ per group).

4.4.6 Καταγραφή ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου σε αναισθητοποιημένα πειραματόζωα

4.4.6.1 A. Φασματική πυκνότητα ισχύος

Προμετωπιαίος φλοιός (PFC)

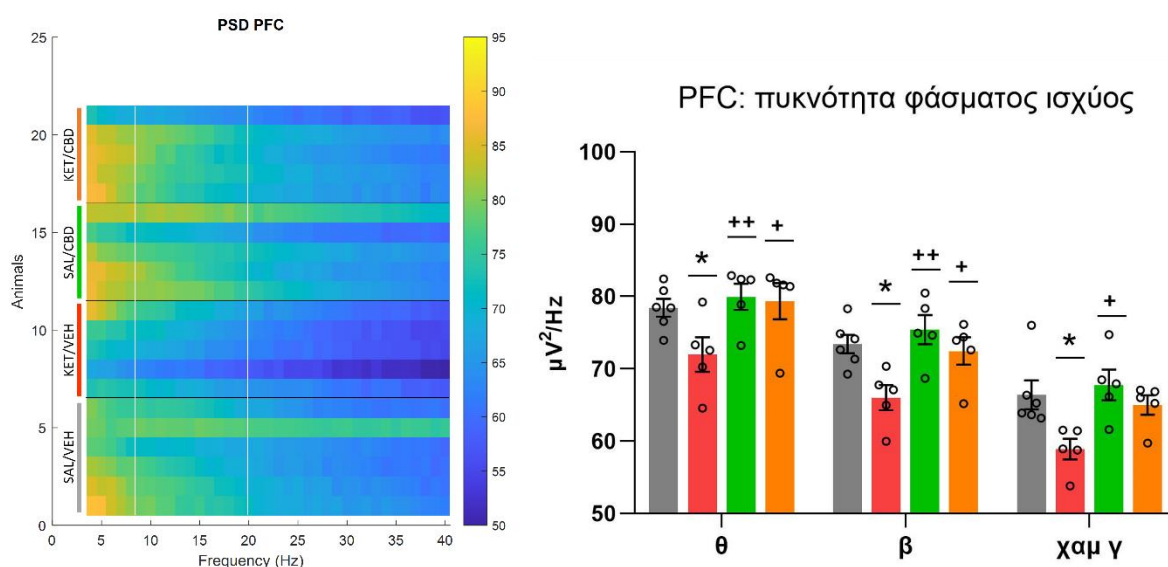
Για την εκτίμηση της επίδρασης της χορήγησης KET και της χορήγησης CBD στις φασματικές πυκνότητες ισχύος στις εγκεφαλικές περιοχές που υπέστησαν καταγραφές δυναμικών πεδίου πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας για συνεχείς μετρήσεις και κατά τρεις διευθύνσεις (three-way repeated-measures ANOVA), με τη χορήγηση KET και τη χορήγηση CBD ως παράγοντες μεταξύ των μετρήσεων (between-subjects factors) και το εύρος συχνότητας (frequency band), το οποίο έχει 3 επίπεδα (θήτα, βήτα και χαμηλούς γάμμα ρυθμούς νευρωνικών ταλαντώσεων) ως παράγοντα συνδεδεμένο με τις μετρήσεις (within-subject factor).

Η ρυθμική δραστηριότητα στον PFC βρέθηκε να επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά από το εύρος συχνότητας [$F_{(2,34)}=223.721$, $p<0.001$] αλλά όχι από την αλληλεπίδραση του εύρους με τη χορήγηση κεταμίνης και με τη χορήγηση CBD (εύρος_συχνότητας*χορήγηση_KET*χορήγηση_CBD) [$F_{(2,34)}=1.267$, $p=0.276$].

Ός προς τα επιμέρους φάσματα νευρωνικών ταλαντώσεων, η αλληλεπίδραση KETxCBD δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά τους θ ρυθμούς, [$F_{(1,17)}=2.193$, $p=0.157$], ωστόσο παρατηρήθηκε επίδραση (main effect) της χορήγησης KET [$F_{(1,17)}=9.101$, $p=0.008$], όπως και της χορήγησης CBD [$F_{(1,17)}=5.997$, $p=0.026$]. Συγκεκριμένα, οι ακόλουθες συγκρίσεις με διορθώσεις κατά Bonferroni μεταξύ των πειραματικών ομάδων, υποστήριξαν στατιστικά σημαντική μείωση της σχετικής ισχύος των θ ρυθμών για την ομάδα KET/VEH συγκριτικά με τις ομάδες SAL/VEH και KET/CBD ($p=0.032$, $p=0.019$ κατά αντιστοιχία) (Γράφημα 4.25).

Η αλληλεπίδραση KETxCBD, δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά το φάσμα των β ρυθμών [$F_{(1,17)}=1.662$, $p=0.195$], ωστόσο παρατηρήθηκε επίδραση (main effect) της χορήγησης KET [$F_{(1,17)}=5.000$, $p=0.039$], όπως και της χορήγησης CBD [$F_{(1,17)}=4.253$, $p=0.048$]. Συγκεκριμένα, οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων, υποστήριξαν στατιστικά σημαντική μείωση της σχετικής ισχύος των β ρυθμών για την ομάδα KET/VEH συγκριτικά με τις ομάδες SAL/VEH και KET/CBD ($p=0.019$, $p=0.006$ κατά αντιστοιχία).

Οι χαμηλοί γ ρυθμοί δεν επηρεάστηκαν από την αλληλεπίδραση KETxCBD [$F_{(1,17)}=1.170$, $p=0.185$], ωστόσο παρατηρήθηκε επίδραση (main effect) της χορήγησης KET [$F_{(1,17)}=8.823$, $p=0.010$], όπως και της χορήγησης CBD [$F_{(1,17)}=4.379$, $p=0.049$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις μεταξύ των πειραματικών ομάδων, υποστήριξαν στατιστικά σημαντική μείωση της σχετικής ισχύος των γ ρυθμών για την ομάδα KET/VEH συγκριτικά με τις ομάδες SAL/VEH και KET/CBD ($p=0.030$, $p=0.007$ κατά αντιστοιχία) (Γράφημα 4.25).

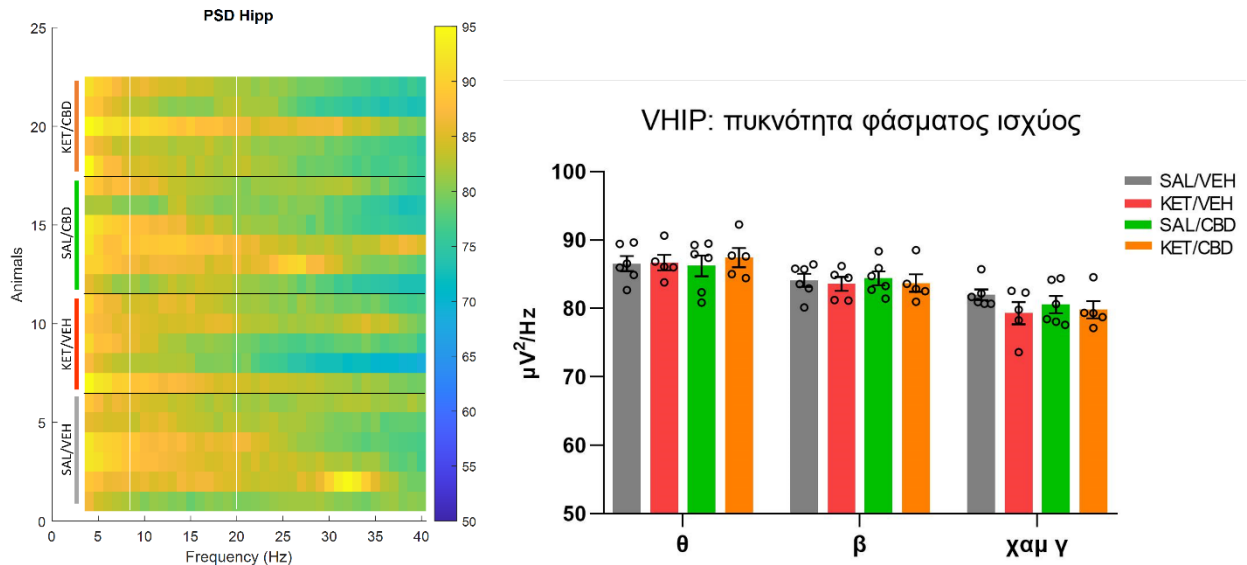


Γράφημα 4.25: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) στη φασματική πυκνότητα ισχύος στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC) όταν καταγράφεται για 100 sec σε αναισθητοποιημένους με σεβοφλουράνιο επίμυες, για τα φάσματα συχνοτήτων θ (4-12 Hz), β (12-20 Hz) και χαμηλά γ (20-40 Hz). Στα αριστερά βρίσκεται θερμικός χάρτης (heatmap) για τη φασματική πυκνότητα ισχύος κάθε πειραματόζωου (οριζόντιες γραμμές), για κάθε 1 Hz συχνότητας από τα 4 έως τα 40 Hz.

* $p < 0.05$, vs SAL/VEH; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs KET/VEH; ^ $p < 0.05$ vs SAL/CBD (n=5-6 ανά πειραματική ομάδα).

Κουλιακός ιππόκαμπος (VHIP):

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για τον κουλιακό ιππόκαμπο δεν εμφάνισε καμία στατιστική σημαντική επίδραση ή αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων (Γράφημα 4.26).



Γράφημα 4.26: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) στη φασματική πυκνότητα ισχύος στο κουλιακό ιππόκαμπο (DHIP) όταν καταγράφεται για 100 sec σε αναισθητοποιημένους με σεβοφλουράνιο επίμυες, για τα φάσματα συχνοτήτων θ (4-12 Hz), β (12-20 Hz) και χαμηλά γ (20-40 Hz). Στα αριστερά βρίσκεται θερμικός χάρτης (heatmap) για τη φασματική πυκνότητα ισχύος κάθε πειραματόζωου (οριζόντιες γραμμές), για κάθε 1 Hz συχνότητας από τα 4 έως τα 40 Hz.

* $p < 0.05$, vs SAL/VEH; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs KET/VEH; ^ $p < 0.05$ vs SAL/CBD (n=5-6 ανά πειραματική ομάδα).

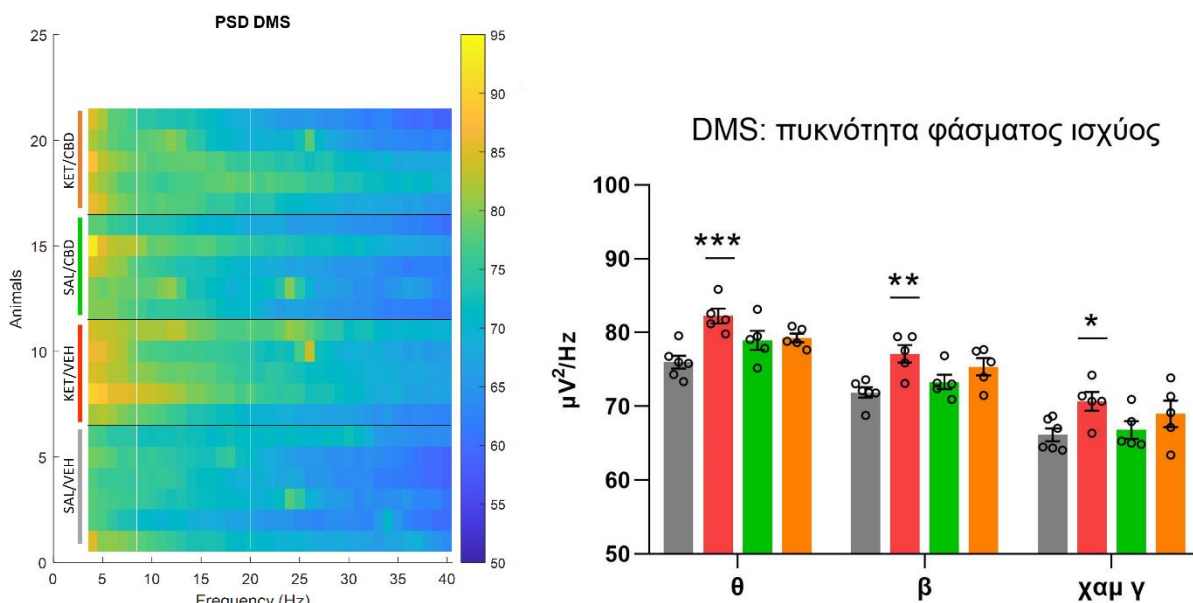
Έσω ραχιαίο ραβδωτό σώμα (DMS)

Η αντίστοιχη ανάλυση για το DMS υποστήριξε τη στατιστικά σημαντική επίδραση του εύρους συχνότητας [$F_{(2,34)}=328.141$, $p<0.001$] αλλά όχι και της αλληλεπίδραση του εύρους με τη χορήγηση κεταμίνης και με τη χορήγηση CBD (εύρος_συχνότητας*χορήγηση_KET*χορήγηση_CBD) [$F_{(2,34)}=2.399$, $p=0.106$].

Ως προς τα επιμέρους φάσματα νευρωνικών ταλαντώσεων, η αλληλεπίδραση KETxCBD επηρέασε στατιστικώς σημαντικά τους θ ρυθμούς, [$F_{(1,17)}=9.326$, $p=0.007$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις με διορθώσεις κατά Bonferroni μεταξύ των πειραματικών ομάδων, υποστήριξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της σχετικής ισχύος των θ ρυθμών για την ομάδα KET/VEH συγκριτικά με τις ομάδες SAL/VEH και KET/CBD ($p<0.001$, $p=0.050$ κατά αντιστοιχία). Επιπρόσθετα, στατιστικά σημαντική εμφανίζεται η αύξηση των θ ρυθμών στην ομάδα SAL/CBD συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.041$) (Γράφημα 4.27).

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση σχετικά με τους β ρυθμούς υποστήριξε τη στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης KET [$F_{(1,17)}=13.234$, $p=0.002$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις με διορθώσεις κατά Bonferroni μεταξύ των πειραματικών ομάδων, υποστήριξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της σχετικής ισχύος των θ ρυθμών για την ομάδα KET/VEH συγκριτικά με την ομάδα SAL/VEH ($p=0.002$) (Γράφημα 4.27).

Η ανάλυση ως προς τους χαμηλούς γ ρυθμούς έδειξε τη στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης KET [$F_{(1,17)}=6.812$, $p=0.018$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις με διορθώσεις κατά Bonferroni μεταξύ των πειραματικών ομάδων, υποστήριξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της σχετικής ισχύος των θ ρυθμών για την ομάδα KET/VEH συγκριτικά με την ομάδα SAL/VEH ($p=0.021$) (Γράφημα 4.27).



Γράφημα 4.27: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) στη φασματική πυκνότητα ισχύος στο εσωτερικό ραχιαίο ραβδωτό (DMS) όταν καταγράφεται για 100 sec σε αναισθητοποιημένους με σεβοφλουράνιο επίμυες, για τα φάσματα συχνοτήτων θ (4-12 Hz), β (12-20 Hz) και χαμηλά γ (20-40 Hz). Στα αριστερά βρίσκεται θερμικός χάρτης (heatmap) για τη φασματική πυκνότητα ισχύος κάθε πειραματόζωου (οριζόντιες γραμμές), για κάθε 1 Hz συχνότητας από τα 4 έως τα 40 Hz.

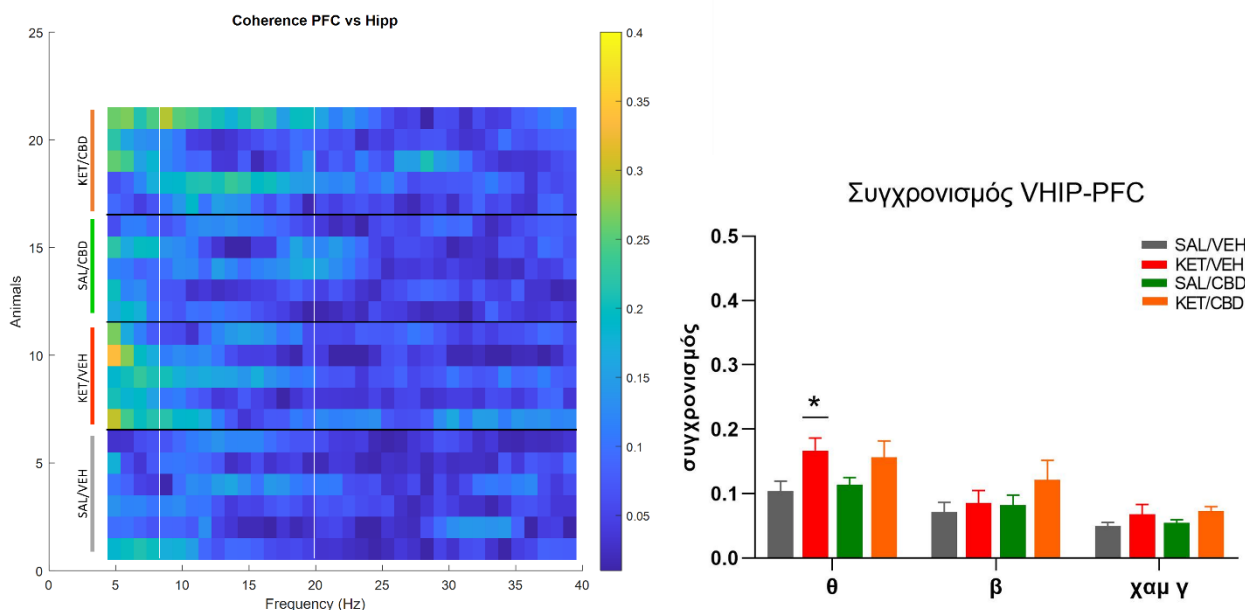
**** $p<0.001$; * $p<0.01$; * $p<0.05$, vs SAL/VEH; (n=5-6 ανά πειραματική ομάδα).

4.4.6.2 Συνοχή

Μεταξύ κοιλιακού υποκάμπτου και προμετωπιαίου φλοιού (VHIP-PFC):

Η στατιστική ανάλυση για τη συνοχή μεταξύ προμετωπιαίου φλοιού και κοιλιακού υποκάμπτου βρέθηκε να επηρεάζεται σημαντικά από το εύρος των συχνοτήτων που αναλύθηκαν [$F_{(2,34)}=25.899$, $p<0.001$], αλλά όχι και της αλληλεπίδραση του εύρους με τη χορήγηση κεταμίνης και με τη χορήγηση CBD (εύρος_συχνότητας*χορήγηση_KET*χορήγηση_CBD) [$F_{(2,34)}=0.586$, $p=0.562$].

Ως προς τα επιμέρους φάσματα νευρωνικών ταλαντώσεων, αναδείχθηκε ότι η συνοχή των θ ρυθμών επηρεάζεται στατιστικώς σημαντικά από τη χορήγηση κεταμίνης [$F_{(1,17)}=8.311$, $p=0.010$], ενώ συγκεκριμένα, βάσει των ακόλουθων συγκρίσεων με διορθώσεις Bonferroni, η ομάδα KET/VEH εμφάνισε αυξημένα επίπεδα συγχρονισμού συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.010$) (Γράφημα 4.28).

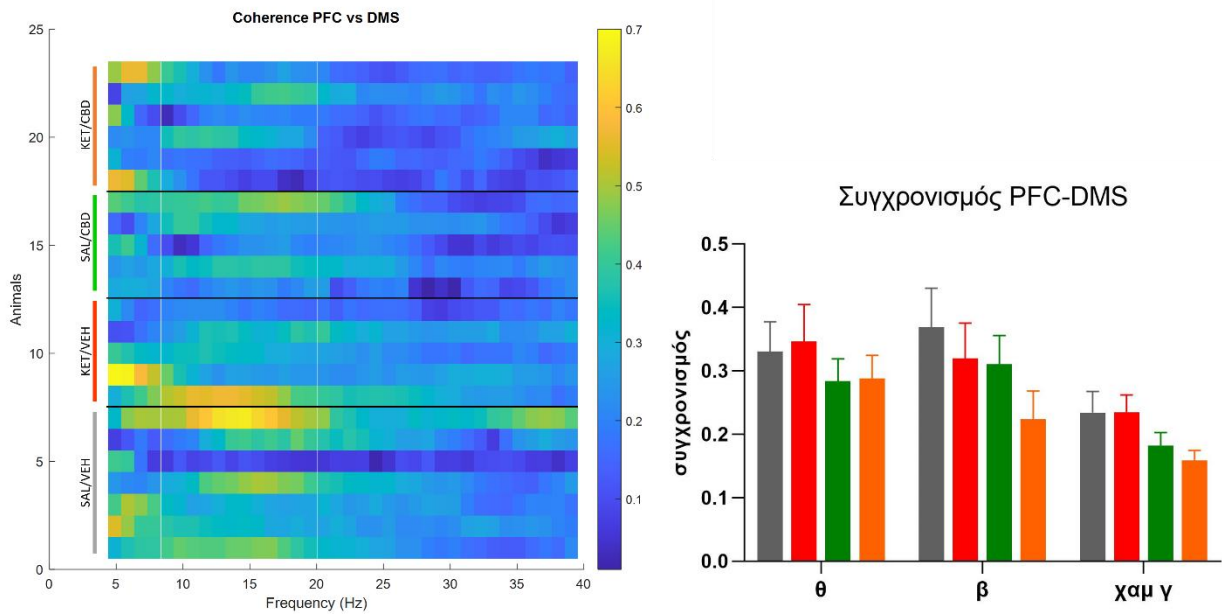


Γράφημα 4.28: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) στη συνοχή μεταξύ κοιλιακού υποκάμπτου και προμετωπιαίου φλοιού (VHIP-PFC coherence) όταν καταγράφεται για 100 sec σε αναισθητοποιημένους με σεβοφλουράνιο επίμυες, για τα φάσματα συχνοτήτων θ (4-12 Hz), β (12-20 Hz) και χαμηλά γ (20-40 Hz). Στα αριστερά βρίσκεται θερμικός χάρτης (heatmap) για τη φασματική πυκνότητα ισχύος κάθε πειραμαυόζωου (οριζόντιες γραμμές), για κάθε 1 Hz συχνότητας από τα 4 έως τα 40 Hz.

* $p<0.05$, vs SAL/VEH; (n=5-6 ανά πειραματική ομάδα).

Μεταξύ προμετωπιαίου φλοιού και έσω ραχιαίου ραβδωτού σώματος (PFC-DMS):

Η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση για τη συνοχή μεταξύ των δυο περιοχών δεν ανέδειξε κάποια σημαντική επίδραση από τους παράγοντες χορήγησης ή από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών (Γράφημα 4.29).



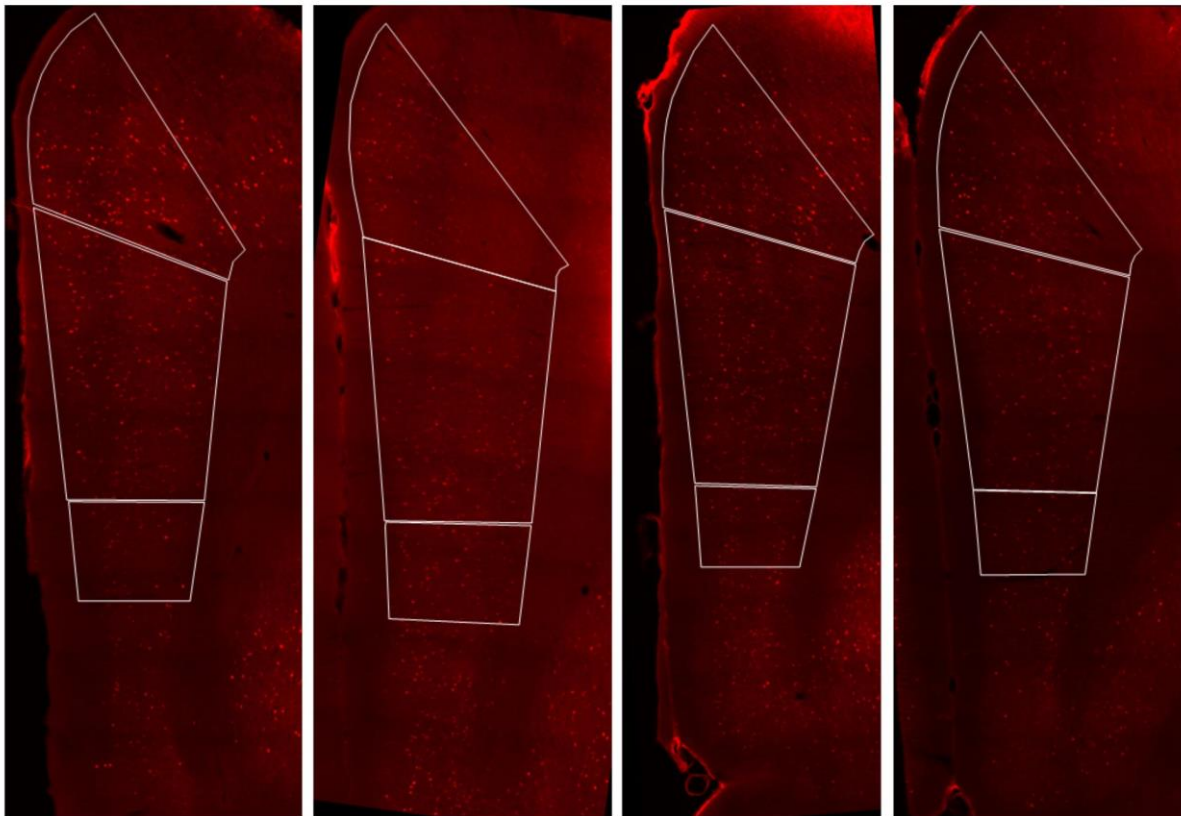
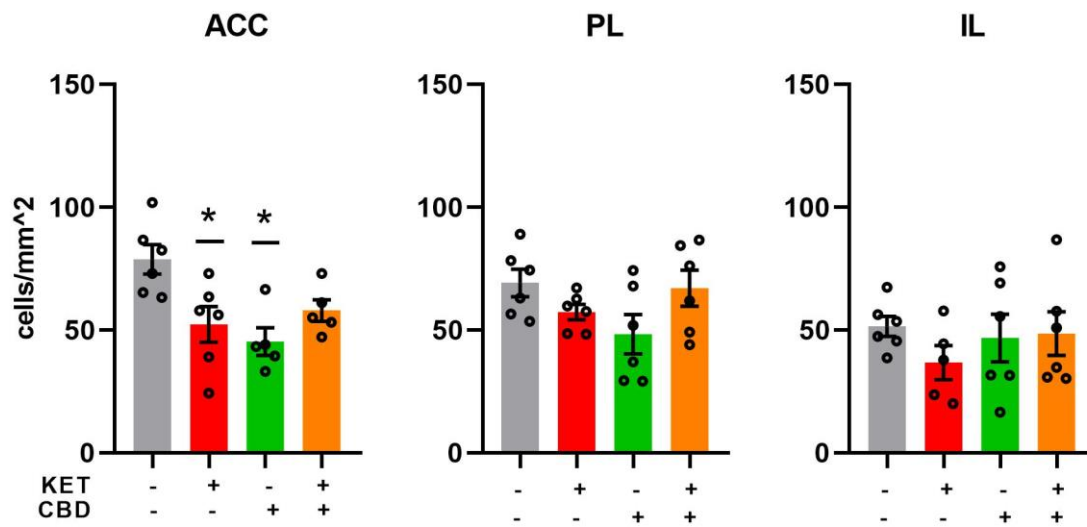
Γράφημα 4.29: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) στη συνοχή μεταξύ προμετωπιαίου φλοιού και εσωτερικού ραχιαίου ραβδωτού σώματος (PFC-DMS coherence) όταν καταγράφεται για 100 sec σε αναισθητοποιημένους με σεβοφλουράνιο επίμυες, για τα φάσματα συχνοτήτων θ (4-12 Hz), β (12-20 Hz) και χαμηλά γ (20-40 Hz). Στα αριστερά βρίσκεται θερμικός χάρτης (heatmap) για τη φασματική πυκνότητα ισχύος κάθε πειραμαυόζωου (οριζόντιες γραμμές), για κάθε 1 Hz συχνότητας από τα 4 έως τα 40 Hz.

4.4.7 Ποσοτικοποίηση αριθμού ανοσοϊστοχημικά σημασμένων κυττάρων έναντι της πρωτεΐνης παρβαλβουμίνης

Έσω προμετωπιαίος φλοιός (mPFC)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις έδειξε ότι η πυκνότητα των κυττάρων σημασμένων με παρβαλβουμίνη στον εμπρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου (ACC) επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση της χορήγησης KET με τη χορήγηση CBD [$F_{(1,23)} = 14.575$, $p=0.002$]. Οι ακόλουθες συγκρίσεις με διορθώσεις κατά Bonferroni ανέδειξαν τη στατιστικά σημαντική μείωση στην ομάδα KET/VEH και την ομάδα SAL/CBD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.025$, $p=0.012$ αντίστοιχα).

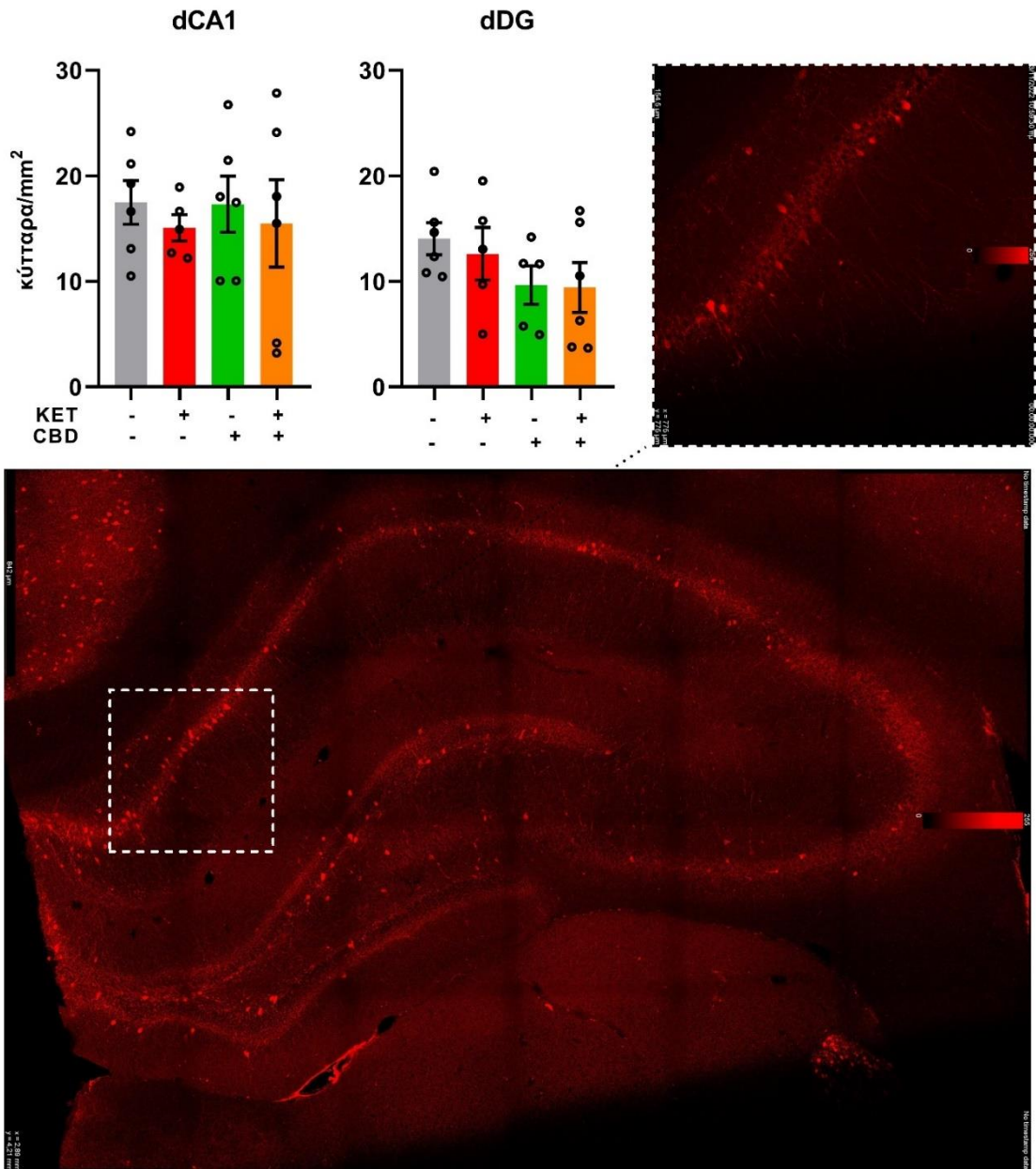
Οι αντίστοιχες στατιστικές αναλύσεις για το προμεταιχμιακό φλοιό (PL) έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση KETxCBD προσέγγισε αλλά δεν ξεπέρασε το κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας [$F_{(1,23)} = 3.802$, $p=0.072$], ενώ και στην περίπτωση του υπομεταιχμιακού φλοιού (IL) δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Γράφημα 4.30).



Γράφημα 4.30: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) στον αριθμό ανοσοθετικών στην παρβαλουμίνη (PV) κυττάρων στις υποπεριοχές του εσωτερικού προμετωπιαίου φλοιού (mPFC), οι οποίες είναι ο εμπρόσθιος φλοιός του προσαγωγίου (ACC), ο προμεταιχμακός φλοιός (PL) και ο ύπομεταιχμακός φλοιός (IL). Τα όρια των αντίστοιχων υποπεριοχών απεικονίζονται στο κάτω μέρος του γραφήματος, από πάνω προς τα κάτω κατά αντιστοιχία της σειράς που αναφέρθηκαν. Πρόκειται για μια αντιπροσωπευτική τομή για κάθε ομάδα πειραματόζων (SAL/VEH, KET/VEH, SAL/CBD, KET/CBD, κατά αντιστοιχία). Οι εικόνες αποτελούν συμπληρωμένα μωσαϊκά εικόνων παρμένων με μεγέθυνση 20x από μικροσκόπιο φθορισμού. Στα γραφήματα ανωτέρω εκφράζονται τα αποτελέσματα για κάθε περιοχή σε σχετική πυκνότητα κυττάρων (κύτταρα ανά τετραγωνικό χιλιοστό). *: vs SAL/VEH, $p < 0.05$.

Ραχιαίος ιππόκαμπος (DHIP)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις δεν υποστήριξε κάποια στατιστική σημαντικά μεταβολή στην πυκνότητα των ανοσοθετικών κυττάρων παρβαλουμίνης στις μελετηθείσες υποπεριοχές του ραχιαίου ιπποκάμπου (Γράφημα 4.31).

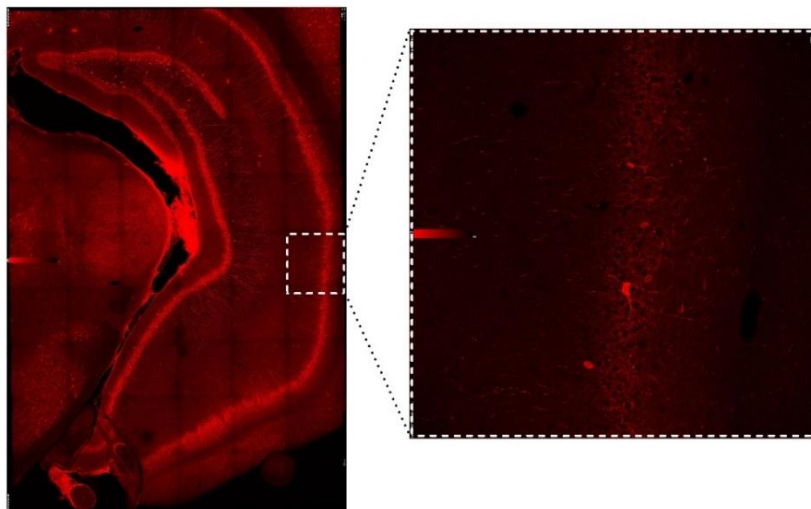
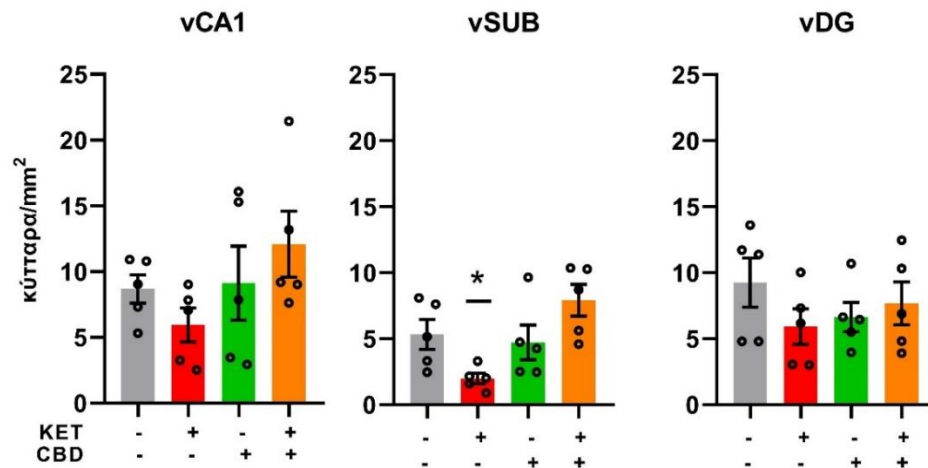


Γράφημα 4.31. Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) και της επαναλαμβανόμενης κεταμίνης (KET) στον αριθμό των ανοσοθετικών σε παρβαλουμίνη (PV+) κυττάρων του ραχιαίου ιπποκάμπου. Τα δυο επιμέρους γραφήματα αφορούν τις υποπεριοχές της CA1 και της οδοντωτής έλικας (DG) του DHIP. Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές από δείγμα της ομάδας ελέγχου με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (Leica, φακός 20x).

Κοιλιακός ιππόκαμπος (VHIP)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις ανέδειξε την στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της χορήγησης KET και της χορήγησης CBD ως προς την πυκνότητα των ανοσοθετικών κυττάρων παρβαλβουμίνης στο υπόθεμα του κοιλιακού ιπποκάμπου των επίμυων [$F_{(1,23)} = 7.020$ $p = 0.017$]. Οι περαιτέρω συγκρίσεις των πειραματικών ομάδων με διορθώσεις Bonferroni έδειξαν ότι η πειραματική ομάδα KET/SAL εμφάνισε μειωμένη πυκνότητα ανοσοθετικών σε παρβαλβουμίνη κυττάρων, σε σχέση με τα πειραματόζωα της ομάδας KET/CBD ($p = 0.032$) (Γράφημα 4.32).

Οι αντίστοιχες στατιστικές αναλύσεις μεταβλητότητας για την περιοχή CA1 του ιπποκάμπου δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Γράφημα 4.32).



Γράφημα 4.32: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) στον αριθμό ανοσοθετικών στην παρβαλβουμίνη (PV) κυττάρων στις υποπεριοχές του κοιλιακού ιπποκάμπου (VHIP). Οι περιοχές που αναλύθηκαν είναι η CA1 του κοιλιακού ιπποκάμπου (vCA1), το υπόθεμα του κοιλιακού ιπποκάμπου (vSUB) και η οδοντωτή έλικα του κοιλιακού ιπποκάμπου (vDG).

Οι εικόνες στο 2^ο μισό του γραφήματος είναι αντιπροσωπευτικές από δείγμα της ομάδας ελέγχου με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (Leica, φακός 20x).

*: vs SAL/VEH, $p < 0.05$.

4.4.8 Ανοσοιστοχημική προσέγγιση CB1 υποδοχέων

4.4.8.1 Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού της ανοσοϊστοχημικής χρώσης CB1 υποδοχέων

Κοιλιακός ιππόκαμπος (VHIP)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές μεταβολές προερχόμενες από τη χορήγηση φαρμάκων ή την αλληλεπίδραση μεταξύ των χορηγήσεων (Γράφημα 4.33).

4.4.8.2 Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού της ανοσοϊστοχημικής χρώσης CB1 υποδοχέων στα σημεία που συνεντοπισμού με τις χρώσεις για το πεπτίδιο CCK8 και τον κυστιδιακό μεταφορέα vGAT:

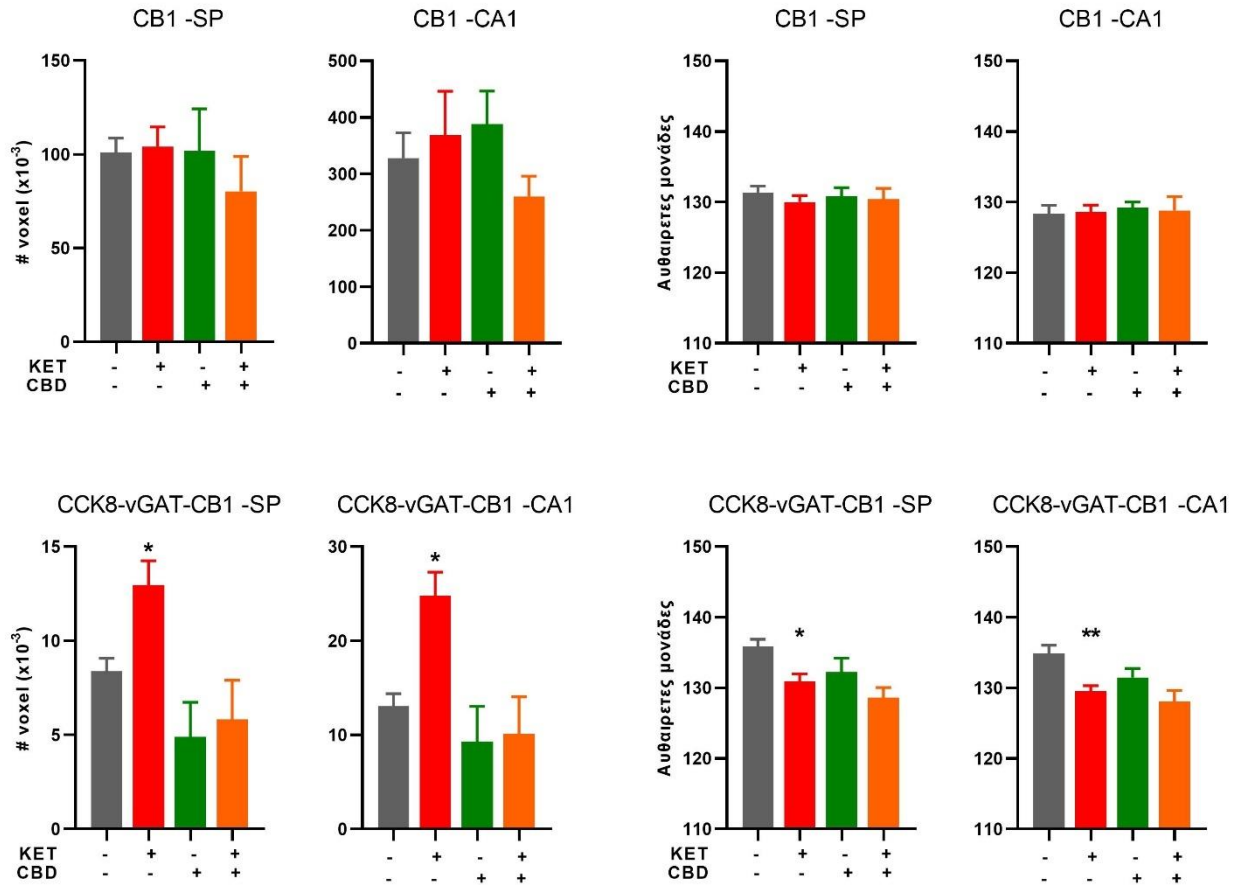
Κοιλιακός ιππόκαμπος (VHIP)

Η στατιστική ανάλυση μεταβλητότητας κατά δυο διευθύνσεις έδειξε ότι η χορήγηση KET επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τη μέση ένταση φθορισμού ανά voxel όταν συνεντοπίζεται με τις άλλες 2 πρωτεΐνες στόχους ειδικά στην πυραμιδική στιβάδα του ιπποκάμπου [$F_{(1,16)} = 7.051$, $p = 0.017$] και στο σύνολο της εικόνας όπως αντικατοπτρίζει τις κύριες στιβάδες της περιοχής CA1 [$F_{(1,16)} = 16.052$, $p < 0.001$].

Οι ακόλουθες συγκρίσεις των επιμέρους πειραματικών ομάδων με διορθώσεις τύπου Bonferroni υποστήριξαν τη στατιστικά σημαντική μείωση της μέσης έντασης φθορισμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όταν η ανάλυση αφορούσε ειδικά την πυραμιδική στιβάδα ($p = 0.010$) αλλά και το σύνολο των τριών στιβάδων της CA1 ($p = 0.001$).

Ως προς την αθροιστική έκταση των σημείων όπου συνεντοπίζονται και οι 3 πρωτεΐνες στην πυραμιδική στιβάδα, η στατιστική ανάλυση έδειξε πως επηρεάζονται στατιστικώς σημαντικά από τη χορήγηση KET [$F_{(1,16)} = 3.980$, $p = 0.051$] και τη χορήγηση CBD [$F_{(1,16)} = 13.620$, $p = 0.002$]. Οι ακόλουθες posthoc συγκρίσεις έδειξαν ότι η ομάδα KET/SAL εμφάνισε αυξημένη έκταση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.034$) (Γράφημα 4.33).

Η αντίστοιχη ανάλυση για το σύνολο των 3 στιβάδων της CA1 περιοχής έδειξε επίσης πως η χορήγηση KET [$F_{(1,16)} = 3.982$, $p = 0.052$] και η χορήγηση CBD [$F_{(1,16)} = 11.856$, $p = 0.004$] επηρέασαν την έκταση που κατέλαβαν τα σημεία συνεντοπισμού των τριών πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Οι ακόλουθες posthoc συγκρίσεις έδειξαν ότι η ομάδα KET/SAL εμφάνισε αυξημένη έκταση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.015$) (Γράφημα 4.33).



Γράφημα 4.33: Η επίδραση της χρόνιας κανναβιδιόλης (CBD) στις μεταβολές που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης (KET) στην κατανομή (αριστερά, υπολογισμένη σε αριθμό voxel) και τη μέση τιμή έντασης φθορισμού (δεξιά αυθαιρέτες μονάδες 0-255) του CB1 υποδοχέα:

-Στο *stratum pyramidae* (SP) ειδικά του κοιλιακού υπόκαμπου -περιοχή CA1 (vCA1) -πάνω

-Στη vCA1 ευρύτερα (περιλαμβάνοντας τμήματα από *stratum oriens*, *stratum pyramidae*, *stratum radiatum*) -πάνω.

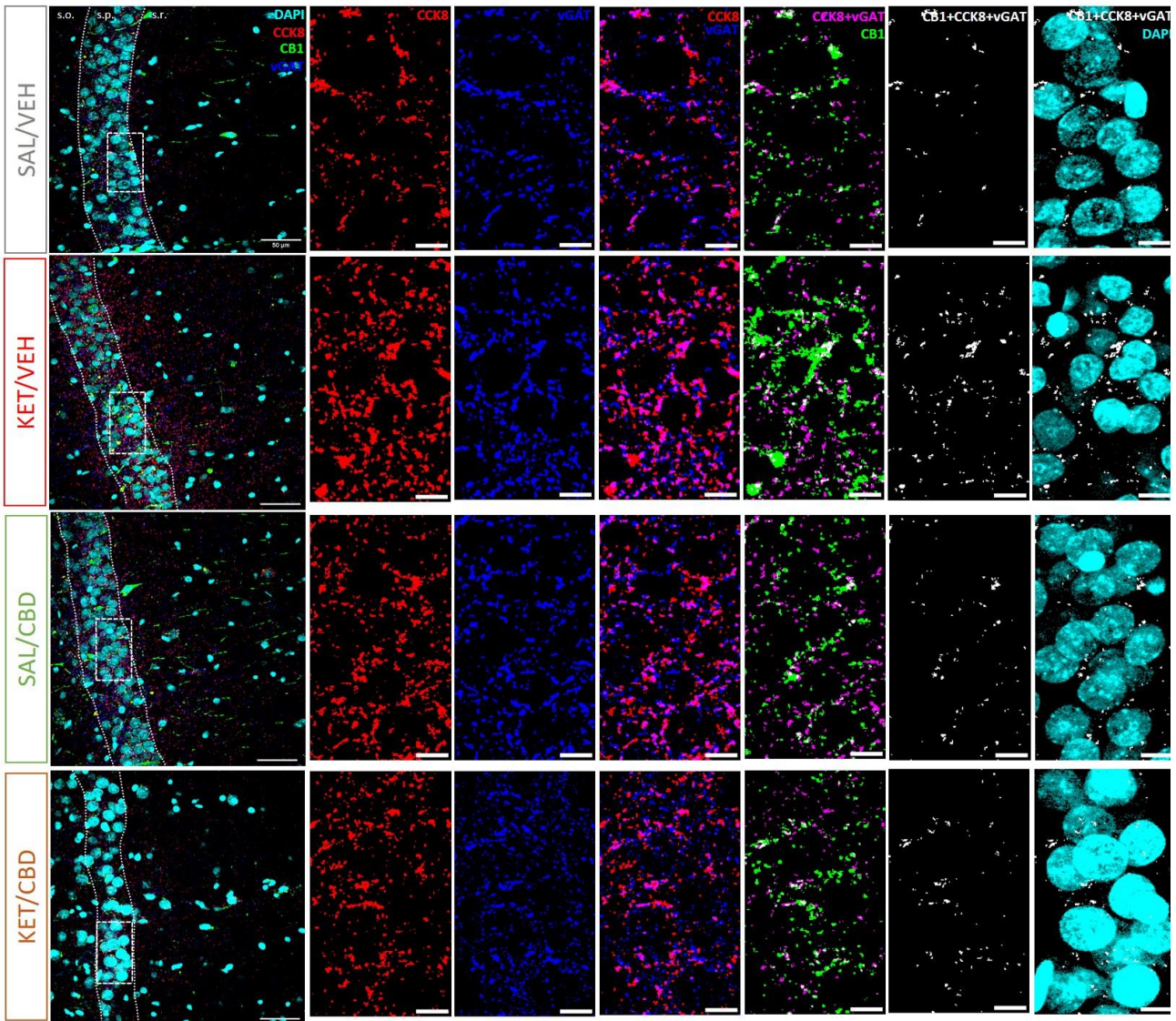
Αντίστοιχα τον όγκο του συνεντοπισμού των CB1 υποδοχέων με την πρωτεΐνη CCK-8 και το μεταφορέα vGAT σε:

-Στο *stratum pyramidae* (SP) ειδικά του κοιλιακού υπόκαμπου -περιοχή CA1 (vCA1) -κάτω αριστερά

-Στη vCA1 ευρύτερα (περιλαμβάνοντας τμήματα από *stratum oriens*, *stratum pyramidae*, *stratum radiatum*) -κάτω αριστερά

-Τη μέση τιμή έντασης φθορισμού και στις ανατομικές υποδιαίρεσεις.

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, vs SAL/VEH;



Γράφημα 4.34: Αντιπροσωπευτική απεικόνιση προς απόδοση σε εικόνα των υπολογισμών συνεντοπισμού των σημασμένων πρωτεϊνών.

Εστιασμένο σημείο του *stratum pyramidalis* από κάθε εικόνα που προκύπτει από το συνεστιακό μικροσκόπιο, αναπτύσσεται στο πλάι (δεξιά) και απεικονίζονται οι διαφορετικές χρώσεις ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκαν, αλλά και συνδυασμοί αυτών που οδηγούν σε συνεντοπισμό για το δεδομένο σημείο (ROI).

Όλες οι εικόνες έχουν υποστεί επεξεργασία ώστε να είναι δυνατό να απεικονιστεί ο συνεντοπισμός μέσω του συνδυασμού των αρχικών χρωμάτων σε τρίτο.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Συνοπτική ανασκόπηση αποτελεσμάτων

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η αξιολόγηση της αντιψυχωτικής δράσης της κανναβιδιόλης (CBD) πάνω σε ένα φάσμα φαρμακολογικών προκλινικών προσεγγίσεων της σχιζοφρένειας, που προκύπτει από την εναλλαγή 2 μεταβλητών:

1. Την προσομοίωση της οξείας ψύχωσης σε επίμυες, όπως αυτή μπορεί να αποτυπωθεί μέσω της μελέτης της οξείας δράσης ψυχομιμητικών ενώσεων έναντι της χρόνιας χορήγησης ψυχομιμητικών ακολουθούμενη από περίοδο χωρίς χορηγήσεις με σκοπό την εγκαθίδρυση ενός πιο γενικευμένου βιο-φαινότυπου, που προσομοιάζει τη σχιζοφρένεια και είναι διαφοροποιημένος από την οξεία δράση των ψυχομιμητικών.
2. Τη διαμόρφωση των μοντέλων από πλευράς θεωρητική λογικής σε δυο διαφορετικά συστήματα που συνδέονται με τη παθοφυσιολογία της νόσου: το ντοπαμινεργικό σύστημα και το γλουταματεργικό.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει ότι στα μοντέλα οξείας ψύχωσης η CBD εμφανίζει περιορισμένες δυνατότητες ανάσχεσης της ψυχωτικής συμπτωματολογίας σε επίπεδο συμπεριφοράς, ενώ εμφανίζει ανασχετική δράση στις υποκείμενες νευροβιολογικές διαφοροποιήσεις, όπως οι αλλαγές στην έκφραση υπομονάδων των NMDA υποδοχέων, ή το ρυθμό ανακύκλωσης της ντοπαμίνης σε μεταιχμιακές δομές του εγκεφάλου. Στις προσεγγίσεις των εγκαθιδρυμένων από χρόνια έκθεση σε ψυχομιμητικά βιο-φαινότυπων ωστόσο, η CBD ήταν αποτελεσματική στο να περιστέλλει τις μεταβολές σε παραμέτρους θετικής, αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας. Παράλληλα εμφάνισε ένα ειδικό ως προς τις ανατομικές περιοχές προφίλ ανασχετικών επιδράσεων στους υποκείμενους δείκτες που αναλύθηκαν, παρέχοντας νέα δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς που μεσολαβούν τις αντιψυχωσικές της ιδιότητες.

5.2.1. Προκλινικό πρότυπο ψύχωσης μέσω χορήγησης οξείας d-αμφεταμίνης

Στην παρούσα μελέτη η οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης προκάλεσε την δόσο-εξαρτώμενη αύξηση της οριζόντιας και της κάθετης κινητικότητας των επίμυων, ενώ η CBD στη δόση των 10 mg/kg δεν είχε κάποια επίδραση στη δράση της d-αμφεταμίνης. Η χορήγηση της CBD στη δόση των 30 mg/kg εμφάνισε αποτελέσματα διπλής κατεύθυνσης καθώς είχε προσθετική δράση στη διέγερση της κινητικότητας από τη χαμηλότερη δόση της d-αμφεταμίνης, ενώ αντιθέτως ανέστειλε μερικώς την υπερκινητικότητα της υψηλής δόσης της d-αμφεταμίνης στην οριζόντια και κάθετη κινητικότητα, σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που προκαλεί η χορήγηση d-αμφεταμίνης στη χαμηλή δόση.

Η χορήγηση αμφεταμίνης σε μυς και επίμυες προκαλεί αύξηση της κινητικότητας -οριζόντιας και κάθετης- στο ανοικτό πεδίο (Antonίου *et al.*, 1998; Einat *et al.*, 2003; Wolff *et al.*, 2018), ενώ η χορήγηση αντιψυχωσικών φαρμάκων έχει ανασταλτική δράση σε αυτό το φαινόμενο. Λαμβάνοντας υπόψη τη προαναφερόμενο ερευνητικό πλαίσιο, η υπερκινητικότητα που προκαλείται από την d-αμφεταμίνη στο ανοικτό πεδίο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία ως πειραματική προσέγγιση (proxy) της θετικής συμπτωματολογίας (Wolff *et al.*, 2018; Polissidis *et al.*, 2021; Sotiropoulos *et al.*, 2021). Προηγούμενες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι η οξεία χορήγηση κανναβιδιόλης αμβλύνει την υπερκινητικότητα λόγω χορήγησης αμφεταμίνης (Moreira and Guimarães, 2005; Pedrazzi *et al.*, 2015), ενώ κάποιες άλλες μελέτες δεν υποστηρίζουν τέτοια επίδραση ((Goulart *et al.*, 2010; Valvassori *et al.*, 2011)). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε μυς, χρησιμοποιώντας διαφορετικές δοσολογικές κλίμακες αλλά και διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης των δεδομένων (καταγραφή και ανάλυση κινητικότητας σε

διαφορετικά χρονικά σημεία συγκριτικά με αθροιστική προσέγγιση κινητικής δραστηριότητας στο συνολικό χρόνο καταγραφής) οι οποίες ενδεχομένως να δικαιολογούν τις μεγάλες παρεκκλίσεις στα ευρήματα αυτών των μελετών.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η προσθετική επίδραση της CBD (30mg/kg) στην κινητικότητα από οξεία αμφεταμίνη. Το αποτέλεσμα αυτό αν εξεταστεί ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα σίγουρα δεν υποστηρίζει τις αντιψυχωσικές ιδιότητες της CBD. Πρέπει όμως να ληφθεί υπόψη βέβαια ότι το εύρημα αυτό αφορά συγκεκριμένα την κάθετη κινητικότητα, η οποία σε αντίθεση με την οριζόντια που αποτελεί ένα καθαρό δείκτη κινητικής δραστηριότητας, αποτελεί έναν πιο σύνθετο δείκτη που αντανακλά κινητικότητα αλλά και εσωτερική διεγερσιμότητα καθώς και εξερευνητική δραστηριότητα (Thiel *et al.*, 1999; Antoniou *et al.*, 2004). Η επίδραση της ίδιας δόσης CBD (30 mg/kg) κατά τη χορήγηση της υψηλότερης δόσης d-αμφεταμίνης (3 mg/kg) είχε ωστόσο ανασχετική επίδραση στην οριζόντια και κάθετη υπερκινητικότητα, περιορίζοντας την στα επίπεδα της πιο μικρής δόσης d-αμφεταμίνης. Φαίνεται λοιπόν πως η οξεία χορήγηση της CBD εμφανίζει ανασχετική επίδραση στην υπερκινητικότητα που προκαλείται από την d-αμφεταμίνη, υποστηρίζοντας προηγούμενες μελέτες (Moreira and Guimaraes 2005). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις, πιθανότατα όταν η λειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος, ιδιαίτερα στη μεσομεταιχμιακή διαδρομή, ή οποία και διαμεσολαβεί την εμφάνιση της υπερκινητικότητας μετά από χορήγηση ντοπαμινεργικών διεγερτικών (Lodge and Grace, 2008, 2012; Polissidis *et al.*, 2009; Slifstein *et al.*, 2015), είναι ιδιαίτερα αυξημένη. Απεναντίας, σε χαμηλότερα επίπεδα διέγερσης, ενδεχομένως να ευοδώνει περαιτέρω τη διέγερση της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας που υποστηρίζει και έκφραση συμπεριφορικών αποκρίσεων πέραν της απλής υπερκινητικότητας. Η διττή αυτή κατεύθυνση της δράσης της κανναβιδιόλης υπενθυμίζει τις ιδιαίτερα σύνθετες και συχνά αντιφατικές φαρμακολογικές της ιδιότητες. Ενδεχομένως σε καταστάσεις ιδιαίτερα αυξημένης ντοπαμινεργικής διαβίβασης η CBD καταλαμβάνει και αναστέλλει τους D₂HIGH υποδοχείς της ντοπαμίνης (Seeman, 2016), οι οποίοι είναι οι εν λειτουργία υποδοχείς (McDonald *et al.*, 1984; George *et al.*, 1985) άρα είναι και μακράν περισσότεροι διαθέσιμοι ιδιαίτερα σε καταστάσεις πολύ έντονης ντοπαμινεργικής λειτουργίας. Επιπλέον, μία παράλληλη δράση της κανναβιδιόλης είναι η ήπια ενίσχυση του ενδοκανναβινοειδικού τόνου μέσω της αναστολής του καταβολισμού της ανανδαμίδης, η οποία θα μπορούσε να έχει μια προσθετική ισχύ στη δράση της αμφεταμίνης σε χαμηλές δόσεις (French *et al.*, 1997; Narushima *et al.*, 2007; Norris *et al.*, 2016), ενώ σε καταστάσεις περαιτέρω ενίσχυσης ντοπαμινεργικής λειτουργίας (π.χ. υψηλότερη δόση αμφεταμίνης) επικρατεί πιθανώς η δράση της κανναβιδιόλης που προαναφέρθηκε στους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς. Η συγκεκριμένη συλλογιστική με αναφορά σε δύο δράσεις της κανναβιδιόλης, πιθανώς εξηγεί το αυτό το διττό πρότυπο δράσης. Ας σημειωθεί επίσης ότι το διφασικό μοντέλο στη συμπεριφορά που έχει παρατηρηθεί κατά τη χορήγηση κανναβινοειδών (Polissidis *et al.*, 2014) και δεν θα μπορούσε έτσι να αποκλειστεί και η συσχέτιση του διφασικού συμπεριφορικού μοντέλου της κανναβιδιόλης με τον πιθανά διττό της ρόλο, ανάλογα με τη δόση, στο ντοπαμινεργικό σύστημα.

Επιπρόσθετα στο πρότυπο οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης μελετήθηκε και η συμπεριφορά προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού όπου παρατηρήθηκε μείωση της αναστολής του αντανακλαστικού (PPI) και στις τρεις διαφορετικές εντάσεις του προπαλμικού ερεθίσματος που μελετήθηκαν, σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες (Geyer *et al.*, 2001; Swerdlow *et al.*, 2003; Pedrazzi *et al.*, 2015). Η χορήγηση CBD από μόνη της προκάλεσε επίσης μείωση του PPI, αλλά σε μικρότερη κλίμακα από την d-αμφεταμίνη για τις δυο εκ των τριών εντάσεων του ερεθίσματος, ενώ είχε ανασχετική επίδραση στο προπαλμικό ερέθισμα των 85 db. Με βάση τον κύριο όγκο της σχετικής βιβλιογραφίας η δράση της CBD στο PPI δεν ήταν αναμενόμενη (Peres *et al.*, 2016; Saletti and Tomaz, 2019), ωστόσο υπάρχουν και μελέτες που δείχνουν ότι η CBD μειώνει το PPI, όπως οι (Gururajan *et al.*, 2012; Hložek *et al.*, 2017) που διενεργούν τη μελέτη χρησιμοποιώντας αντίστοιχες δόσεις επίσης σε Sprague-Dawley επίμυς.

Η κανναβιδιόλη, εμφάνισε ανασχετική επίδραση στη μεγαλύτερης κλίμακας δράση της d-αμφεταμίνης όταν το προπαλμικό ερέθισμα ήταν 85 db. Το εύρημα αυτό μπορεί να συσχετισθεί με εκείνο των 5 (Pedrazzi *et al.*, 2015), όπου η CBD είχε ανασταλτική δράση στη διαταραχή του δείκτη από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης σε μους, χωρίς να επιτύχει να τον επαναφέρει στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Η ίδια μελέτη μάλιστα συγκρίνει την επίδραση της CBD με εκείνη του UR597, έναν συνθετικό αναστολέα της FAAH (αναστολέα αποικοδόμησης ενδοκανναβινοειδών), εικάζοντας ότι η δράση της CBD στο PPI μεσολαβείται από την αύξηση των επιπέδων της ανανδαμίδης που επιτυγχάνονται από την αναστολή του ενζύμου αποικοδόμησης της. Παρόλο που η ανασχετική αυτή επίδραση της CBD στη διαταραχή του PPI λόγω αμφεταμίνης είναι παρούσα στα ευρήματά μας και μπορεί να συνδεθεί με αντιψυχωσικές ιδιότητες, πρέπει να ληφθεί υπόψη η δράση της CBD *per se*, η οποία μπορεί να σχετίζεται και με την αύξηση ενδοκανναβινοειδικού τόνου υπο φυσιολογικές συνθήκες, γεγονός όμως που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μελέτες ως προς τη δράση της CBD μέχρι ώρας είναι λίγες και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια σε πλήθος παραγόντων όπως το είδος (μους, επίμυς και πρωτεύοντα), η πειραματική συμπεριφορική προσέγγιση και το μεγάλο εύρος δόσεων (0.5-10 mg/kg για την αμφεταμίνη και 2,5 με 60 mg/kg για τη CBD).

Συνολικά, η επίδραση της οξείας χορήγησης CBD στο πρότυπο της οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης δεν επέφερε καθολική αναστροφή των συμπεριφορικών προσεγγίσεων οι οποίες αντανακλούν ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογία. Η οξεία χορήγηση CBD στοιχία αντιψυχωσικής δυναμικής τα οποία αντιπαραβάλλονται με επιδράσεις οι οποίες δεν είναι απολύτως ενθαρρυντικές, εγείροντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση χρησιμοποιώντας τόσο το συγκεκριμένο πειραματικό πρότυπο, αλλά και διαφορετικά φαρμακολογικά πρότυπα προσέγγισης των ψυχώσεων.

5.2.2. Επαναλαμβανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης

Οι επίμυες που υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενη και σταδιακά αυξανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης εμφάνισαν πιο έντονη διέγερση της οριζόντιας και κάθετης κινητικής τους δραστηριότητας όταν δέχθηκαν οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης στη δόση του 1 mg/kg, σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες (Lodge and Grace, 2012; Renard *et al.*, 2016; Gatica *et al.*, 2020). Η χρόνια χορήγηση CBD κατόπιν της χρόνιας d-αμφεταμίνης επέφερε αναστροφή του φαινοτύπου της υπερδιέγερσης, αποτέλεσμα που δεν παρατηρήθηκε όταν χορηγήθηκε μόνο CBD χρονίως. Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης ακολουθούμενη από ένα μικρό διάστημα απόσυρσης και εκ νέου χορήγηση μία δόσης (challenge dose), αποτελεί μια προσέγγιση για τη μελέτη της υπερευαισθητοποίησης του ντοπαμινεργικού συστήματος που προσομοιάζει την αντίστοιχη υπερευαισθητοποίηση και υπεραποκρισιμότητα κατόπιν ντοπαμινεργικής διέγερσης, που παρατηρείται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Grace *et al.*, 2016). Η απόκριση στη μοναδική χορήγηση d-αμφεταμίνης των υπερευαισθητοποιημένων επίμυων θεωρείται πειραματική προσέγγιση της θετικής συμπτωματολογίας στη σχιζοφρένεια (Pierce and Kalivas, 1997; PelegRaibstein *et al.*, 2008) και το γεγονός ότι η CBD προκαλεί αναστροφή αυτού του φαινοτύπου υποδηλώνει ότι είναι αποτελεσματική απέναντι σε δείκτες θετικής συμπτωματολογίας σε έναν εγκαθιδρυμένο βιο-φαινότυπο που προσομοιάζει τη δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος.

Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τη μοναδική μελέτη που προσεγγίζει τη δράση της CBD σε αντίστοιχο πειραματικό πρότυπο με αμφεταμίνη, όπου Sprague-Dawley επίμυες υποβλήθηκαν στη χορήγηση ενός σχετικά διαφορετικού σχήματος χρόνιας αμφεταμίνης, αλλά η CBD στην συγκεκριμένη μελέτη χορηγήθηκε ενδοεγκεφαλικά και συγκεκριμένα στο κέλυφος του NAc και το αποτέλεσμα της δράσης της CBD συσχετίστηκε με τον περιορισμό του αυξημένου ρυθμού πυροδότησης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην πλάγια καλυπτρική περιοχή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η συγκεκριμένη μελέτη υποστηρίζει ότι η έγχυση της CBD στον NAc επαναφέρει το φυσιολογικό ρυθμό πυροδότησης ενώ μεταβάλλει και το

συμπεριφορικό φαινότυπο, μέσω της εκλεκτικής καταστολής της περισσής φωσφορυλίωσης του καθοδικού μονοπατιού σηματοδότησης mTOR/p70S6 στον επικλινή πυρήνα που προκαλεί η d-αμφεταμίνη. Επισημαίνεται ότι το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι συνδέεται με απορρυθμισμένους μηχανισμούς συναπτικής πλαστικότητας, μνημονικής λειτουργίας και διαμόρφωσης νευρωνικής μορφολογίας (Antion et al., 2008; Hoeffler and Klann, 2010; Jernigan et al., 2011). Δεδομένης της πολυπλοκότητας της φαρμακοδυναμικής της CBD, η οποία όταν χορηγείται στερεοταξικά διαμορφώνει διαφορετικούς φαινοτύπους βάσει της περιοχής έγχυσης (Szkudlarek et al., 2019) αλλά λαμβάνοντας υπόψη και το νευροανατομικό υποστρώμα της νόσου (Grace et al., 2016; McCutcheon et al., 2018) μπορεί να υποστηριχθεί ότι η κατανόηση της δράσης της συστηματικής χορήγησης συνεισφέρει δυναμικά στην καλύτερη κατανόηση των αντιψυχωσικών ιδιοτήτων της CBD και ενέχει υψηλότερη μεταφραστική αξία.

Σε συνέπεια με αυτή τη συλλογιστική πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές εμπλεκόμενες με στο νευροανατομικό και βιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι οι υπερευαισθητοποιημένοι στην d-αμφεταμίνη επίμυες εμφάνισαν μηδαμινές έως μικρής κλίμακας αλλαγές στον PFC, το ραχιαίο και κοιλιακό υποκάμπο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρόνια d-αμφεταμίνη έδρασε αντιθετικά στο ραχιαίο-κοιλιακό άξονα του υποκάμπου, καθώς αύξησε τα επίπεδα DA στο ραχιαίο τμήμα, έτεινε να αυξήσει τα επίπεδα του DOPAC (μεταβολίτη της DA) στο κοιλιακό υποκάμπο, ενώ η εικόνα του PFC ήταν παρόμοια με του κοιλιακού υποκάμπου, χωρίς οριακά να αγγίζει το όριο της σημαντικότητας.

Οι επιμέρους ανατομικές υποδιαίρεσεις του ραβδωτού σώματος εμφάνισαν πιο εύρωστες μεταβολές. Συγκεκριμένα, η έσω ραχιαία μοίρα (DMS) των υπερευαισθητοποιημένων στην d-αμφεταμίνη επίμυων εμφάνισε αυξημένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα δεδομένης της της αύξησης ως προς το ρυθμό ανακύκλωσης DOPAC/DA και HVA/DA. Η χορήγηση CBD επανάφερε τις μεταβολές στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα στα φυσιολογικά επίπεδα. Αντίστοιχα στην έξω μοίρα (DLS), οι υπερευαισθητοποιημένοι στην d-αμφεταμίνη επίμυες εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα HVA και ακόλουθου ρυθμού ανακύκλωσης (HVA/DA), ενώ η CBD επανάφερε τα επίπεδα τους στα φυσιολογικά. Η d-αμφεταμίνη στον επικλινή πυρήνα (NAc) εμφάνισε τάσεις για παρόμοιες αλλαγές με εκείνες που παρατηρήθηκαν στο DLS, ενώ η δράση της CBD επέφερε μικρότερης κλίμακας μεταβολές.

Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη ντοπαμινεργική λειτουργία είναι αναμενόμενες σε μεγάλο βαθμό καθώς η ψυχοκινητική υπερδιέγερση που εμφάνισαν νωρίτερα τα πειραματόζωα διαμεσολαβείται από την αύξηση της ντοπαμίνης στο ραχιαίο ραβδωτό (Ikemoto, 2007). Επίσης, τα πρωτόκολλα υπερευαισθητοποίησης σε αμφεταμίνη συνδέουν την όξυνση της απάντησης σε ακόλουθη οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης (challenge) με την αύξηση του ρυθμού πυροδότησης των DA-εργικών νευρώνων στη VTA και τη SN (Iodje and Grace 2012, Renard 2016) οι οποίοι προβάλλουν σε όλη την έκταση και με τοποειδικό τρόπο στο ραβδωτό σώμα. Επιπρόσθετα, τα ευρήματα που αφορούν στη ντοπαμινεργική λειτουργία ειδικά στο DLS βρίσκονται σε απόλυτη συνάφεια με άλλες μελέτες που έχουν παρατηρήσει την αύξηση της DA στο DLS μέσω in vivo μικροδιαπίδυσης, σε επίμυες που έχουν υποστεί υπερευαισθητοποίηση στη d-αμφεταμίνη και εξετάζονται σε ανάλογο χρονικό παράθυρο (Gatica et al., 2020). Η αυξημένη DA στην in vivo μικροδιαπίδυση είναι το ανάλογο του αυξημένου ρυθμού ανακύκλωσης της DA σε ex vivo μελέτες καθώς στην πρώτη περίπτωση εξετάζεται το εξωκυττάριο υγρό, ενώ στη δεύτερη εκχύλισμα από τη λύση του εγκεφαλικού ιστού (Polissidis et al., 2014). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι το χρονικό παράθυρο αξιολόγησης της ντοπαμινεργικής λειτουργίας μετά το πέρας των χορηγήσεων της d-αμφεταμίνης έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς όταν μεσολαβούν διαστήματα της τάξης των 5 εβδομάδων δεν εντοπίζονται αντίστοιχες μεταβολές στον επικλινή πυρήνα (Raibstein et al., 2006).

Η υπερευαισθητοποιημένη αυτή κατάσταση λειτουργίας του μεσομεταιχμιακού και μελαινοραβδωτού συστήματος που εμφανίζεται μετά από τις επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις αμφεταμίνης εμφανίζει

αναλογικά στοιχεία με την αυξημένη ευαισθησία σε έμμεσους ντοπαμινεργικούς αγωνιστές που παρατηρείται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Janowsky *et al.*, 1973; Laruelle and Abi-Dargham, 1999) καθώς και της αυξημένης ντοπαμινεργικής λειτουργίας στο ραβδωτό, κυρίως στη συνειρμική αλλά και τη κινητική μοίρα, που έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με σχιζοφρένεια μέσω της χρήσης απεικονιστικών μεθόδων (Laruelle and Abi-Dargham, 1999; Slifstein *et al.*, 2015; Grace, 2016). Συνεπώς θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μια αξιόλογη προσέγγιση της δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος στη σχιζοφρένεια η οποία πιθανότατα συνδέεται κυρίως με τη θετική συμπτωματολογία, καθώς τα σχετικά πειραματικά μοντέλα, αποτυγχάνουν να προσομοιάσουν με αξιοπιστία συγκεκριμένες παραμέτρους γνωστικής και αρνητικής συμπτωματολογίας (Winship *et al.*, 2019; Sotiropoulos *et al.*, 2021).

Η CBD εμφανίζει ανασχετική δράση στο συγκεκριμένο φαινότυπο υπερευαισθητοποίησης (locomotor sensitization) αλλά και στις υποκείμενες μεταβολές του ντοπαμινεργικού συστήματος. Σε αντιπαράβολη με την αδυναμία της κατά την οξεία χορήγηση να προκαλέσει πλήρη ύφεση της υπερκινητικότητας και μείωσης του PPI μετά από οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης, φαίνεται ότι είναι πιο αποτελεσματική όταν χορηγείται χρονίως και σε καταστάσεις εγκατεστημένης δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος που προσομοιάζουν τη σχιζοφρένεια, έναντι της οξείας ψυχοκινητικής δράσης ντοπαμινεργικών ψυχοδιεγερτικών. Είναι γεγονός ότι όταν η CBD χορηγείται χρονίως, εμφανίζει ανασχετικές ιδιότητες συγκριτικά με μια οξεία χορήγηση που δεν αναχαίτισε το ιδιαίτερα εύρωστο συμπεριφορικό προφίλ της αμφεταμίνης. Δεδομένου ότι η CBD εξετάζεται ως προς τις αντιψυχωσικές ιδιότητες κι αν αναλογιστούμε το προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών της συγκριτικά με τα εν χρήση αντιψυχωσικά φάρμακα δε θα ήταν παράλογο να υποστηριχθεί ότι η χρόνια χορήγηση της συνδυάζεται με την εμφάνιση του επιθυμητού θεραπευτικού αποτελέσματος. Επιπρόσθετα, ας σημειωθεί ότι στην περίπτωση των επαναλαμβανόμενων χορηγήσεων, η CBD αρχίζει να χορηγείται αφού παρέλθουν 48 ώρες από τη τελευταία χορήγηση της d-αμφεταμίνης, ενώ στα πρότυπα των οξείων χορηγήσεων, τα δυο φάρμακα συν-χορηγούνται. Στη δεύτερη περίπτωση η παρουσία άμεσων φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών αλληλεπιδράσεων δεν μπορεί να αποκλεισθεί καθώς οι οποίες μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση πιθανών αντιψυχωσικών ιδιοτήτων της CBD. Στα πειραματικά πρότυπα των χρόνιων χορηγήσεων οι αντιψυχωσικές ιδιότητες της CBD και η πιθανή χρήση της στη σχιζοφρένεια παραμένουν καιρίες, καθώς η νόσος δεν αποτελεί αποτέλεσμα μιας οξείας δράσης ενός ψυχοκινητικού φαρμάκου, αλλά έχει συγκεκριμένα και εγκατεστημένα νευροβιολογικά υποστρώματα.

5.3. Προκλινή προσέγγιση ψυχωτικής συμπτωματολογίας μέσω της χορήγησης κεταμίνης

Η εκτίμηση του ρόλου της CBD στην κινητική δραστηριότητα μελετήθηκε εκτενώς προκειμένου να επιλεχθούν οι κατάλληλες δόσεις που θα εφαρμοζόταν στα πειράματα συγχορήγησης η αναχαίτισης των δράσεων των ψυχοκινητικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ειδικότερα, η χορήγηση της CBD προκάλεσε καταστολή της οριζόντιας και της κάθετης κινητικότητας στην υψηλότερη δόση (30 mg/kg). Η μελέτη της επίδρασης της επίδρασης της κανναβιδιόλης στην κινητικότητα πραγματοποιήθηκε σε μη εξοικειωμένους για την αρένα κινητικότητας επίμυες, ώστε να είναι εφικτή η ανίχνευση μικρών κατασταλτικών επιδράσεων, μέσω της μείωσης της απόκρισης στο νέο περιβάλλον. Μελέτες σε μύς επιβεβαιώνουν την απουσία επίδρασης της CBD στην κινητικότητα όταν χορηγείται σε χαμηλές δόσεις (Hartmann *et al.*, 2019; Long 2010), ενώ έπειτα από χορήγηση υψηλών δόσεων CBD έχει καταγραφεί είτε υπερκινητικότητα (Socafá *et al.*, 2019), είτε απουσία επίδρασης σε μύς (Moreira Guimaraes 2005). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε συνδυασμό με την υπάρχουσα βιβλιογραφία δείχνουν ότι οι μη υψηλές δόσεις της κανναβιδιόλης

δεν επηρεάζουν την κινητικότητα, ενώ οι υψηλότερες δόσεις φαίνεται να προκαλούν καταστολή ειδικά σε μη εξοικειωμένους επίμυες.

Ακολούθησε η εκτίμηση της δράσης της κεταμίνης κατόπιν οξείας χορήγησης προκειμένου να χαρακτηριστεί το συμπεριφορικό προφίλ και να επιλεγούν οι δόσεις για τις επόμενες πειραματικές προσεγγίσεις όπου διερευνήθηκε ο ρόλος της CBD στη δράση της κεταμίνης. Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας υποστηρίζουν ότι η οξεία υποαναισθητική χορήγηση κεταμίνης στις δόσεις των 30 και 60 mg/kg αυξάνουν την κινητική δραστηριότητα των εξοικειωμένων με το κλωβό κινητικότητας επίμυων, όντας σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ο εγκλιματισμός των πειραματόζων με τον κλωβό της κινητικότητας παρέχει μια πιο καθαρή εικόνα πιθανών διεγερτικών δράσεων καθώς σε αυτή την περίπτωση δε συγχέονται με τη αυξημένη κινητικότητα που εκφράζουν οι επίμυες κατά την συμπεριφορά απόκρισης σε νέο περιβάλλον (Antoniou et al., 2004; Polissidis et al., 2009). Η δόση των 30 mg/kg συγκεκριμένα εμφάνισε άμεσα έντονες αλλαγές στη συμπεριφορά που περιλαμβάνουν συμπεριφορές στερεοτυπίας, αταξίας και υπερκινητικότητας και περιορίστηκαν στο πρώτο χρονικό παράθυρο της καταγραφής (0-30 λεπτά), όντας σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Lorrain et al., 2003; Georgiadou et al., 2014). Η υπερκινητικότητα αποτυπώθηκε μόνο σε επίπεδο οριζόντιας κινητικότητας, ενώ η κάθετη κινητικότητα εμφανίστηκε μειωμένη σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες (Kotermanski et al., 2013; Radford et al., 2017). Τα πρώτα λεπτά της καταγραφής η εμφάνιση της αταξικής συμπεριφοράς και απώλειας του συντονισμού της κινητικότητας καθιστά εξαιρετικά δύσκολη την εκτέλεση κατακόρυφων ανορθώσεων των επίμυων. Όμως κατά τη δόση των 10 mg/kg όπου εμφανίζεται η μείωση της κάθετης κινητικότητας δε συμπεριλαμβάνει συμπεριφορά αταξίας, ενώ δεδομένα που δεν παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη δείχνουν ότι η αταξική συμπεριφορά δεν απαντάται μετά τα πρώτα 15 λεπτά της καταγραφής για τη δόση των 30 mg/kg. Συμπερασματικά φαίνεται ότι η κεταμίνη προκαλεί καταστολή της κάθετης κινητικότητας, η οποία αποτελεί ένα σύνθετο δείκτη που συγκαταλέγει στοιχεία αποτύπωσης της κινητικής δραστηριότητας σε συνδυασμό με στοιχεία εξερευνητικότητας και εσωτερικής διεγερσιμότητας (Thiel et al., 1999; Antoniou et al., 2004). Η υψηλότερη δόση κεταμίνης εμφάνισε αύξηση της οριζόντιας κινητικότητας, ενώ δεν επηρέασε την κάθετη κινητικότητα.

5.3.1. Διερεύνηση της δράσης της CBD στην οξεία χορήγηση κεταμίνης

➤ Εκτίμηση της αυθόρμητης κινητικότητας στο ανοικτό πεδίο

Η χορήγηση CBD στις δόσεις των 10 και των 30 mg/kg δεν επηρέασαν την οξείας διάρκειας (0-30 λεπτά καταγραφής) υπερκινητικότητα που προκαλεί η κεταμίνη. Η υψηλότερη δόση CBD ωστόσο επιμήκυνε χρονικά τη δράση της κεταμίνης και στο επόμενο διάστημα της καταγραφής (30-60 λεπτά), όπου η κεταμίνη από μόνη της δεν εμφάνισε επίδραση στην οριζόντια κινητική δραστηριότητα. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με την κλασική μελέτη των Moreira και Guimaraes (2005) η οποία υποστήριξε πως η CBD έχει ανασχετική επίδραση στην υπερκινητικότητα που προκαλείται από την κεταμίνη εμφανίζοντας καμπύλη σχήματος U. Αυτή η διαφοροποίηση πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιεί μύες και αξιοποιεί διαφορετικές μεθοδολογίες για την εκτίμηση της κινητικής δραστηριότητας, συμπεριλαμβανομένων διαφορών ως προς την ύπαρξη εξοικείωσης των πειραματόζων αλλά και το χρονικό παράθυρο που πραγματοποιείται η καταγραφή.

Ωστόσο, προς υποστήριξη των ευρημάτων της παρούσας εργασίας, οι Gururajan και συνεργάτες (2011) σε ένα αντίστοιχο πειραματικό πρότυπο σε SD επίμυες, δεν παρατήρησαν κατασταλτικές ιδιότητες από τη CBD στην υπερκινητικότητα που προκαλεί το MK-801. Σε ακόλουθη μελέτη τους έδειξαν ωστόσο ότι η CBD αναχαιτίζει την υπερκινητικότητα που προκαλεί ο ίδιος μη συναγωνιστικός αναστολέας των NMDA όταν αυτή καταγράφεται κατά τη διάρκεια μιας δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς (Gururajan *et al.*, 2012). Τα συγκρουόμενα αποτελέσματα στην αξιολόγηση της CBD στο προκλινικό πρότυπο οξείας ψύχωσης από χορήγηση μη συναγωνιστικών αναστολέων των NMDA υποδοχέων παρουσιάζουν μια ανάλογη εικόνα με εκείνα της οξείας χορήγησης έμμεσων ντοπαμινεργικών αγωνιστών που συζητήθηκαν παραπάνω. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την κεντρική σημασία των πειραματικών παραμέτρων όταν αξιολογούνται τέτοιου τύπου φαρμακολογικές επιδράσεις, αλλά και τη μελέτη των υποψήφιων αντιψυχωσικών ενώσεων σε διαφορετικά πειραματικά πρότυπα με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των αντιψυχωσικών ιδιοτήτων των ουσιών (multi-model approach).

Το φαρμακοδυναμικό υπόστρωμα της αλληλεπίδρασης της KET με την CBD είναι δύσκολο να διασαφηνιστεί και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Από το πλήθος των φαρμακολογικών στόχων της CBD, έχει προταθεί ότι οι αντιψυχωτικές της ιδιότητες διαμεσολαβούνται από αγωνιστική δράση στους 5HT_{1A} υποδοχείς της σεροτονίνης (Rodrigues da Silva *et al.*, 2020), ή ανταγωνιστική στους CB₁ (Stark *et al.*, 2019,2020), καθώς η CBD έχει χαρακτηριστεί αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής των υποδοχέων αυτών (Laprairie *et al.*, 2015). Από την άλλη η πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη των (Xu *et al.*, 2020) υποστηρίζει ότι η ψυχομμητική δράση της κεταμίνης διαμεσολαβείται από την αύξηση των επιπέδων της 2-AG η οποία προέρχεται από την ανασταλτική δράση της στη MAGL, το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τον καταβολισμό του συγκεκριμένου ενδοκανναβινοειδούς. Παρόλο που έχει δειχθεί ότι η CBD δε διαθέτει ανασταλτικές ιδιότητες απέναντι στα κύρια ένζυμα καταβολισμού της 2-AG (MAGL, DAGL_a), καταστέλλει τη FAAH (De Petrocellis *et al.*, 2011). Η FAAH είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση της ανανδαμίδης, ενώ δεν καταβολίζει σε επαρκή βαθμό την 2-AG ώστε η δράση αυτή να μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αυξήσεις στα επίπεδα της (Murataeva *et al.*, 2014), αν και η δράση αυτή έχει διαπιστωθεί εδώ και δεκαετίες σε *in vitro* πειράματα (Goparaju *et al.*, 1998). Παρόλα αυτά, έχει υποστηριχθεί ότι απουσία δράσης των άλλων ενζύμων όπου τα επίπεδα της 2-AG βρίσκονται ιδιαίτερα αυξημένα, η FAAH ενδέχεται να συμμετέχει πιο αποτελεσματικά στον καταβολισμό της (Murataeva *et al.*, Br J Pharm 2014). Στην περίπτωση της συγχορήγησης της κεταμίνης με τη CBD η δράσης της κεταμίνης, επιμηκύνεται πιθανώς λόγω της απουσίας της λειτουργίας της MAGL (λόγω κεταμίνης) και της παράλληλης καταστολής της FAAH (λόγω CBD). Συνεπώς η παρατηρηθείσα αλληλεπίδραση μπορεί να υποστηριχθεί λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις της κεταμίνης και της CBD σε διαφορετικά ένζυμα καταβολισμού των ενδοκανναβινοειδών..

Παράλληλα, ο ρόλος πιθανών φαρμακοκινητικών αλληλεπιδράσεων στο φαινόμενο αυτό δε θα μπορούσε να αγνοηθεί, καθώς η παρουσία CBD έχει παρατηρηθεί να αυξάνει τα επίπεδα κοκαΐνης, αμφεταμίνης και PCP στον εγκέφαλο (Reid and Bornheim, 2001), ενώ επίσης έχουν παρατηρηθεί και αυξημένα επίπεδα αντιεπιληπτικών σε ορό ασθενών όταν συγχορηγούνται με CBD (Gaston *et al.*, 2017). Στην εν λόγω περίπτωση, λαμβάνοντας υπόψη την ανασταλτική δράση της CBD στην ενεργότητα των P450 CYP, συμπεριλαμβανομένων των CYP3A(4,5) και CYP2B6 (Yamaori *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2019)(Yamaori *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2019), και το γεγονός ότι η κεταμίνη μεταβολίζεται από τα CYP3A4 και CYP2B6 (Hijazi and Boulieu, 2002; Petroliniemi *et al.*, 2016), δε θα μπορούσε να αποκλειστεί μια αύξηση στα επίπεδα της κεταμίνης οφειλόμενη στη προ-χορήγηση CBD.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η παρατηρηθείσα δράση της CBD στην υπερκινητικότητα που προκαλεί η κεταμίνη δεν υποδεικνύουν πιθανές ψυχομμητικές δράσεις του κανναβινοειδούς, αλλά σχετίζονται με συγκεκριμένες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές

αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο ενώσεων. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να εξηγηθεί και η μη αναμενόμενη όξυνση δεικτών αρνητικής συμπτωματολογίας που παρατηρήθηκε στη μελέτη των (Hallak *et al.*, 2011) η που προκαλεί η CBD σε υγιείς εθελοντές που έλαβαν οξεία κεταμίνη, δεδομένων και των υπόλοιπων διαθέσιμων κλινικών δεδομένων σχετικά με την αντιψυχωσική δράση της CBD (Rohleder *et al.*, 2016). Περαιτέρω πειραματική διερεύνηση είναι αναγκαία για να διαλευκάνει το μηχανισμό πίσω από τη δεδομένη αλληλεπίδραση προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα πιθανών ψυχομιμητικών επιδράσεων της CBD. Η συγκεκριμένη διερεύνηση έχει άμεση αξία δεδομένης της συχνά απαντώμενης πλέον χρήσης της κεταμίνης ως αντικαταθλιπτική θεραπεία και της ταυτόχρονης μεγάλης εμπορικής διαθεσιμότητας σκευασμάτων εμπλουτισμένων σε CBD, αλλά και σκευασμάτων που προέρχονται από τη βιομηχανική κάνναβη (π.χ. ανθοί, εκχυλίσματα).

➤ Εκτίμηση συμπεριφοράς προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού

Η οξεία χορήγηση 10 mg/kg κεταμίνης προκάλεσε μείωση στην αναστολή που προκαλούν τα προπαλμικά ερεθίσματα έντασης 75 και 85 db, ενώ στα 80 db προσέγγισε τη στατιστική σημαντικότητα. Η δράση της οξείας κεταμίνης σε αυτή τη δόση είναι διαπιστωμένη στη βιβλιογραφία (Cilia *et al.*, 2007; van der Buuse *et al.*, 2015; Mansbach and Geyer *et al.*, 1991). Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε χαμηλότερη δόση κεταμίνης σε σχέση με την μελέτη της κινητικής δραστηριότητας καθώς η βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι είναι επαρκής για να επιφέρει το επιθυμητό φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Η δόση των 30 mg/kg προκαλεί αταξία και οι αλλεπάλληλες ακανόνιστες κινήσεις για ένα διάστημα που μπορεί να διαρκέσει περίπου 15 λεπτά, δεν θα ήταν επιθυμητό καθώς αφενός θα έκανε τη διαμονή στον κλωβό περισσότερο στρεσογόνο για τα πειραματόζωα, ενώ και οι αταξικές κινήσεις θα συγχέονταν με τις αποκρίσεις στα ηχητικά ερεθίσματα από τον πιεζο-ηλεκτρικό ανιχνευτή κίνησης στο θάλαμο πειραματισμού.

Η κανναβιδιόλη εμφανίζει παρόμοιο αποτέλεσμα με εκείνο που παρατηρήθηκε στο πρότυπο οξείας d-αμφεταμίνης, ενώ δεν επιτυγχάνει να αναστρέψει τη διαταραχή του PPI που προκαλείται από την οξεία κεταμίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξεία CBD αντιμετωπίζει επιτυχώς τη διαταραχή του PPI που προκαλείται από τη χορήγηση μη συναγωνιστικών αναστολέων NMDA υποδοχέων (Gomes *et al.*, 2014; Gomes, Issy, *et al.*, 2015), ενώ δεν υπάρχουν προηγούμενες αναφορές για επίδραση συγκεκριμένα στη διαταραχή του δείκτη από την κεταμίνη.

Παρότι η βιβλιογραφία έχει πλήθος δημοσιεύσεων που υποστηρίζουν τη δράση της CBD σε πειραματικές συμπεριφορικές προσεγγίσεις των ψυχώσεων σε φαρμακολογικά πρότυπα οξέων χορηγήσεων, η παρούσα μελέτη δεν εμφανίζει εύρωστα αποτελέσματα για κανένα από τα δυο πειραματικά πρότυπα στα οποία εξετάστηκε η CBD. Πέρα από την εμπάθυνση και κατανόηση των υποκείμενων νευροβιολογικών μηχανισμών που διαμεσολαβούν αυτές τις διαφοροποιήσεις, είναι εξίσου σημαντικό να μελετηθεί η δράση της CBD σε διαφορετικά πειραματικά πρότυπα ψύχωσης/σχιζοφρένειας που βασίζονται σε διαφορετικά πλαίσια θεωρητικής λογικής, ώστε να χαρτογραφηθούν οι αντιψυχωσικές της ιδιότητες σε προκλινικό επίπεδο.

5.3.2. Εκτίμηση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμών

Στην παρούσα μελέτη δεν εμφανίστηκαν έντονες μεταβολές στη λειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος στις εγκεφαλικές περιοχές που μελετήθηκαν κατόπιν οξείας χορήγησης κεταμίνης (30 mg/kg). Συγκεκριμένα, η κεταμίνη δεν επηρέασε ιδιαίτερα τα επίπεδα DOPAC, DA και του συντελεστή ανακύκλωσης DOPAC/DA στον PFC. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι όταν είχε προηγηθεί η χορήγηση της υψηλής δόσης της CBD (30 mg/kg), τα επίπεδα DOPAC και ο συντελεστής ανακύκλωσης βρέθηκαν αυξημένα

συγκριτικά με τους επίμεις που δέχθηκαν μόνο τη χορήγηση της κεταμίνης. Στο ραχιαίο ιππόκαμπο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές, παρά μια τάση για αύξηση του λόγου DOPAC/DA από τις ομάδες CBD10 και KET, ενώ στον κοιλιακό ιππόκαμπο δεν αναδείχθηκαν σημαντικές μεταβολές. τις υποδιαίρεσεις του ραβδωτού η εικόνα της ντοπαμινεργικής λειτουργίας μετά τις χορηγήσεις των φαρμάκων ήταν κοντινή σε αυτή του PFC, με εξαίρεση το DLS που δεν εμφάνισε μεταβολές. Στο DMS και τον NAc παρατηρήθηκε τάση για αύξηση των συντελεστών ανακύκλωσης DOPAC/DA και HVA/DA όταν η μεγάλη δόση CBD προηγήθηκε της κεταμίνης, συγκριτικά με την κεταμίνη.

Συνολικά φαίνεται πως η κεταμίνη δεν προκαλεί στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη ντοπαμινεργική λειτουργία, όπως αυτή αντανακλάται από την εκτίμηση των επιπέδων ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της σε δείγματα ιστού που προέρχονται από πειραματόζωα τα οποία θυσιάσθηκαν 30 λεπτά μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου. Η εκτενής ανασκόπηση όλων των διαθέσιμων πειραματικών μελετών από τη μετα-αναλυτική μελέτη των (Kokkinou *et al.*, 2018) αναφέρει ότι συνολικά η οξεία χορήγηση υποαναισθητικής κεταμίνης αυξάνει την έντονα τη ντοπαμινεργική λειτουργία στον PFC και το NAc και λιγότερο εύρωςτα στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα, ενώ συνοδεύεται από αύξηση του ρυθμού πυροδότησης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη VTA. Ειδικότερα αναφέρει ότι οι αλλαγές αυτές είναι ανιχνεύσιμες με εύρωςτο τρόπο μέσω *in vivo* μικροδιαπίδυσης, ενώ οι *ex vivo* μελέτες που πραγματοποιούνται σε δείγματα ιστού σπάνια αναπαράγουν το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, αν και εμφανίζουν παρόμοια εικόνα.

Στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο η θυσία όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε 30 λεπτά μετά τη χορήγηση της κεταμίνης, κατά αντιστοιχία με το μεσοδιάστημα της καταγραφής της κινητικής δραστηριότητας που περιγράφηκε παραπάνω, με αποτέλεσμα τα αποτελέσματα να συνδέονται με τη δεύτερη χρονική υποδιαίρεση της καταγραφής (30-60 λεπτά). Στο χρονικό σημείο αυτό η υπερκινητικότητα της κεταμίνης δεν υφίσταται πλέον, αλλά η προ-χορήγηση CBD (κατά 20 λεπτά λόγω των φαρμακοκινητικών παραμέτρων) παρατείνει τη δράση της και σε αυτό το χρονικό παράθυρο. Αντίστοιχα, η ντοπαμινεργική λειτουργία κατόπιν προχορήγησης CBD βρέθηκε αυξημένη κυρίως για τον PFC το NAc και το DMS αλλά όχι το DLS, σε ένα αντίστοιχο πρότυπο με αυτό που παρουσιάζεται στη μετα-αναλυτική μελέτη των Kokkinou και συνεργατών (2018).

Φαίνεται συνεπώς ότι η ντοπαμινεργική λειτουργία από την κεταμίνη πιθανώς να παρατείνεται από τη CBD με αποτέλεσμα να μπορεί να είναι εφικτή η ανίχνευσή της στο συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο που ορίζει το πειραματικό πρωτόκολλο. Τα δεδομένα αυτά συνεπάγονται ότι η αύξηση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας από την κεταμίνη είναι ιδιαίτερα παρωδικά, κάτι που επιβεβαιώνεται από πρόσφατες μελέτες. Συγκεκριμένα, η μελέτη των (Simmler *et al.*, 2022) δείχνει ότι οξεία χορήγηση υποαναισθητικής κεταμίνης σε μύς αυξάνει για μόλις 5 λεπτά τη δραστηριότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη VTA, μέσω της *in vivo* απεικόνισης γενετικά τροποποιημένων ανιχνευτών Ca⁺⁺ τοπικά, καθώς και της απελευθέρωσης ντοπαμίνης στο NAc, όπως αποτυπώνεται από το γενετικά τροποποιημένο ανιχνευτή ντοπαμίνης «dLight1.1».

Η δράση της CBD φαίνεται να εξυπηρετεί τη διεύρυνση του χρονικού παραθύρου δράσης, όπως αντίστοιχα συμβαίνει και στην κινητική δραστηριότητα, η οποία πιθανώς να συνδέεται με τους υποκείμενες φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις που συζητήθηκαν παραπάνω.

5.3.3. Εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western.

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης εμφανίζουν την πρωτεϊνική έκφραση των GluN1 και GluN2B υπομονάδων του NMDA υποδοχέα μειωμένη στο NAc μετά από χορήγηση κεταμίνης, ενώ η προ-χορήγηση CBD ανέστρεψε αυτές τις μεταβολές. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ η χορήγηση CBD δεν επέφερε αλλαγές από

μόνη της, όταν προ-χορηγήθηκε της κεταμίνης επέφερε το αντίστροφο αποτέλεσμα από την κεταμίνη (η ομάδα CBD/KET επέδειξε στατιστικά σημαντικά αύξηση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου). Αντίστοιχης κατεύθυνσης ήταν οι μεταβολές στη φωσφορυλίωση του ERK1/2, καθώς η κεταμίνη μείωσε το λόγο φωσφορυλιωμένης/ολικής ERK1/2, ενώ η προχορήγηση CBD 30 mg/kg σε συνδυασμό με τη κεταμίνη οδήγησε στην αύξηση του συγκεκριμένου συντελεστή, χωρίς ωστόσο να εμφανίζει μεταβολές από μόνη της. Παράλληλα, η μικρότερη δόση CBD προκάλεσε ανάσχεση των μειώσεων από την κεταμίνη στο συντελεστή αλλά και στα επίπεδα GluN1 και GluN2B.

Ο NAc αποτελεί το κύριο τμήμα του κοιλιακού ραβδωτού και θεωρείται προεξέχων κόμβος διεπαφής μεταξύ του κινητικού και μεταιχμιακού συστήματος. Συμμετέχει στον έλεγχο του κινήτρου και συγκεκριμένων συναισθηματικών λειτουργιών και αποτελεί ένα από τα κύρια νευροβιολογικά υποστρώματα της δράσης των ψυχοδιεγερτικών (Salgado and Karlitt, 2015). Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα των λειτουργιών της εγκεφαλικής αυτής δομής, των αλλαγών στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης που ανιχνεύτηκαν, την αύξηση της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας από τη συγχορήγηση CBD-KET που περιγράφηκε παραπάνω, καθώς και το γεγονός ότι η ίδια πειραματική ομάδα επέδειξε διεγερμένη κινητικότητα και στο επόμενο χρονικό παράθυρο της καταγραφής (30-60min), θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι η CBD ασκεί δράση σε δυο διαφορετικές κατευθύνσεις, καθώς παρατείνει την αύξηση της κινητικής δραστηριότητας και της ντοπαμινεργικής λειτουργίας που προκαλεί η κεταμίνη αλλά αναστρέφει τις αλλαγές που προκαλεί η κεταμίνη στα επίπεδα έκφρασης των NMDA υπομονάδων και της φωσφορυλίωσης της ERK1/2.

Η παροδική αύξηση της ντοπαμίνης στη VTA είναι συνδεδεμένη με αύξηση της φωσφορυλίωσης του ERK1/2 στον επικλινή πυρήνα, κυρίως μέσω της ενεργοποίησης των D1 υποδοχέων της ντοπαμίνης ((Baik, 2013) Day et al., 2008 J Neurosci). Από την άλλη, η εισροή Ca^{++} από τους GluN2B NMDA υποδοχείς επίσης συντελεί στην αύξηση της φωσφορυλίωσης. Η κεταμίνη φαίνεται να λειτουργεί διττά, αυξάνοντας το ρυθμό πυροδότησης στη VTA αλλά ταυτόχρονα μπλοκάροντας τους NMDA υποδοχείς, ενώ σύμφωνα με τα ευρήματά μας, καταστέλλει και την έκφρασή τους στο NAc. Ο έλεγχος που ασκούν οι NMDA υποδοχείς στη φωσφορυλίωση είναι πιο άμεσος και πιο καθολικός καθώς πέραν της αμεσότητας του καθοδικού μονοπατιού έναντι του αντίστοιχου από D1, οι D1 εντοπίζονται περίπου στους μισούς νευρώνες του NAc. Αυτό έχει πιθανώς σαν αποτέλεσμα το να προεξέχει η NMDA-εξαρτώμενη δράση στη φωσφορυλίωση κατόπιν χορήγησης κεταμίνης. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι διττές δράσεις τόσο της κεταμίνης αλλά και της CBD πιθανώς υποστηρίζουν την παράταση της δράσης της κεταμίνης στην κινητικότητα, την αύξηση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας στο NAc την αύξηση των επιπέδων των GluN1 και GluN2B, αλλά και την παράλληλη αναστροφή των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της ERK1/2, λόγω προ-χορήγησης CBD και ακόλουθης χορήγησης KET.

Στον κοιλιακό υπόκαμπο, η δόση των 30 mg/kg της CBD δεν επηρέασε από μόνη της τα επίπεδα της GluN2B υπομονάδας που, ενώ ανέτρεψε τη μείωση που τους προκάλεσε η κεταμίνη. Μια αντίστοιχη δράση παρατηρήθηκε και στην φωσφορυλιωμένη μορφή της της ERK1/2, η οποία όμως δεν έφτασε το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας. Σειρά μελετών έχουν συνδέσει τη χορήγηση υπο-αναισθητικής κεταμίνης με μεταβολές σε δείκτες συναπτικής πλαστικότητας ειδικά στον υπόκαμπο (Goulart et al., 2010; Kamiyama et al., 2011; Izumi and Zorumski, 2014; Rame et al., 2017), μέσω της δράσης στη γλουταματεργική σηματοδότηση, συμπεριλαμβανομένων της GluN2B και του p-ERK1/2 (Gu et al., 2009; Fu et al., 2011; Rame et al., 2017; Meng et al., 2020), οι οποίοι αποτελούν πρωτεϊνικούς δείκτες που ενορχηστρώνουν τις διεργασίες συναπτικής πλαστικότητας (Sweatt, 2004; Thomas and Huganir, 2004; El-Gaamouch et al., 2012) (El Gaamouch et al., 2012; Sweatt, 2004; Thomas and Huganir, 2004). Παράλληλα, η κεταμίνη επιδρά αρνητικά σε δείκτες γνωστικής λειτουργίας που συνδέονται με τη λειτουργία του υποκάμπου (Georgiadou et al., 2014; Goulart et al., 2010; Hudson et al., 2019; Kamiyama et al., 2011; Keilhoff et al., 2004). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ευρήματα που αφορούν τον κοιλιακό υπόκαμπο, συνδυαστικά με τη γνώση από τη βιβλιογραφία αντιψυχωσική δράση της CBD σε συμπεριφορικά πειραματικά πρότυπα ψυχωτικής

συμπτωματολογίας μέσω της χορήγησης άλλων μη-συναγωνιστικών αναστολέων των NMDA υποδοχέων (Gomes et al., 2015; Gururajan et al., 2011; 2012; Kozela et al., 2020), θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η CBD εμφανίζει προστατευτική δράση στις δυσλειτουργίες που προκαλεί η κεταμίνη σε επίπεδο συναπτικής πλαστικότητας.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη υποστηρίζει ότι η CBD δε μπορεί να αντιμετωπίσει την υπερκινητικότητα που προκαλείται από οξεία χορήγηση κεταμίνης, μια προσέγγιση της θετικής συμπτωματολογίας στις ψυχώσεις, αλλά αντίθετα διευρύνει το χρονικό παράθυρο της δράσης της. Επίσης, δεν εμφανίζει ανασχετική δράση στην προπαλμική αναστολή του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού που προκαλεί η κεταμίνη και επιπρόσθετα όταν χορηγείται από μόνη της διαταράσσει τη συγκεκριμένη συμπεριφορά η οποία αποτελεί έναν κλασικό φαινότυπο που απαντάται στη σχιζοφρένεια. Από πλευράς λειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος, φαίνεται επίσης να παρατείνει χρονικά τη δράση της κεταμίνης, ενώ από μόνη της δεν προκαλεί αλλαγές στη λειτουργία του. Πιθανότατα οι υποκείμενοι μηχανισμοί της αλληλεπίδρασης να έχουν φαρμακολογικό και φαρμακοδυναμικό χαρακτήρα ο οποίος δεν αναιρεί τις αντιψυχωσικές ιδιότητες της CBD που παρατηρούνται στα άλλα πειραματικά πρότυπα της παρούσας μελέτης αλλά και στη βιβλιογραφία, ωστόσο χρήζουν περαιτέρω πειραματικής επιβεβαίωσης. Σημαντικώς η CBD βρέθηκε να αναιρεί ή και να οδηγεί σε αναστροφή των δεικτών όταν αφορούν μοριακούς στόχους της γλουταματεργικής σηματοδότησης στον κοιλιακό υπόκαμπο και τον επικλινή πυρήνα. Οι δράσεις αυτές πιθανότατα σχετίζονται με την ευεργετική της δράση στους διαταραγμένους από την κεταμίνη μηχανισμούς νευρωνικής πλαστικότητας.

5.4.1. Επαναλαμβανόμενη χορήγηση KET και ο αντισταθμιστικός ρόλος της CBD

Συμπεριφορικές μελέτες

Κινητική δραστηριότητα

Η μελέτη της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων πραγματοποιήθηκε 3 ημέρες μετά το πέρας των φαρμακολογικών χειρισμών, σε μη εξοικειωμένους επίμεις. Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης αύξησε την οριζόντια κινητική δραστηριότητα των επίμυων ενώ παρέμεινε η χρόνια χορήγηση CBD μετά την επαναλαμβανόμενη κεταμίνη μείωσε την αυξημένη δραστηριότητα. Επιπρόσθετα, η κεταμίνη αύξησε την κάθετη κινητικότητα των επίμυων ενώ η ομάδα KET/CBD δεν εμφάνισε διαφορές από την ομάδα ελέγχου, υποδεικνύοντας τον τροποποιητικό ρόλο της CBD στη δράση της κεταμίνης. Δεδομένου ότι η αυξημένη αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα έχει προταθεί ως πειραματική προσέγγιση της θετικής συμπτωματολογίας (Powell and Miyakawa, 2006), τα συγκεκριμένα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης διαταράσσει δείκτες που σχετίζονται με τη θετική συμπτωματολογία ενώ η CBD εμφανίζει προστατευτικό ρόλο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κεταμίνη αυξάνει την κινητικότητα στα ύστερα διαστήματα της καταγραφής όπου οι επίμεις είναι πλέον αρκετά εξοικειωμένοι με το χώρο και φυσιολογικά κινούνται πολύ λιγότερο. Το γεγονός αυτό μπορεί να συνδεθεί με το ότι η διεγερτική επίδραση της κεταμίνης είναι πιο ευκρινής να διαπιστωθεί απουσίας της τάσης του πειραματόζωου να εξερευνήσει το νέο περιβάλλον στο οποίο εκτέθηκε. Αφετέρου θα μπορούσε να συνδεθεί και με τις γνωστικές

δεξιότητες των πειραματοζώων καθώς η έκπτωσή τους θα μπορούσε να συνεπάγεται την ανάγκη μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος για να εξοικειωθούν με το νέο περιβάλλον.

Προηγούμενες μελέτες με επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις κεταμίνης σε επίμυες αδυνατούν να εντοπίσουν αύξηση κινητικής δραστηριότητας (Becker 2003; Becker 2009; Schumacher 2016). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε μύς οι 5 ημερήσιες δόσεις κεταμίνης εμφανίζουν το φαινόμενο της υπερκινητικότητας όταν εξετάζεται 2 ημέρες μετά την τελευταία δόση (Kokkinou et al., 2021). Το γεγονός της αδυναμίας καταγραφής υπερκινητικότητας σε επίμυες πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιούνται δοσολογικά σχήματα που περιλαμβάνουν λιγότερες δόσεις κεταμίνης (πχ 5 αντί 10 ημερήσιων καθημερινών δόσεων KET 30 mg/kg). Προς περαιτέρω υποστήριξη της συγκεκριμένης ερμηνείας, δημοσιευμένα δεδομένα από την παρούσα μελέτη υποστηρίζουν ότι 7 ημερήσιες δόσεις δεν είναι αρκετές για να εμφανίσουν το φαινόμενο της υπερκινητικότητας, συγκριτικά με τη χορήγηση 10 ημερήσιων δόσεων (Poulia, Delis, Brakatselos, Ntoulas, et al., 2021).

➤ Δοκιμασία οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης

Στη δοκιμασία απόκρισης σε οξεία χορήγηση 1 mg/kg d-αμφεταμίνης στο ανοικτό πεδίο, οι επίμυες που είχαν προηγουμένως δεχθεί το σχήμα χορήγησης της επαναλαμβανόμενης κεταμίνης εμφάνισαν τάση για οριζόντια υπερκινητικότητα και σημαντική αύξηση της κάθετης κινητικότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η χορήγηση CBD μετά την κεταμίνη μείωσε την κινητικότητα λόγω χορήγησης d-αμφεταμίνης σε συμφωνία με δεδομένα προηγούμενων μελετών (Becker 2003; Schumacher et al., 2016). Αξίζει να επισημανθεί ότι όπως προαναφέρθηκε η CBD εμφάνισε επίσης ανασχετική δράση ως προς το κινητικό προφίλ και στην προσέγγιση της δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος μέσω της υπερευαισθητοποίησης στην d-αμφεταμίνη (επαναλαμβανόμενη χορήγηση αμφεταμίνης) καταδεικνύοντας την ανασχετική δράση της σε πειραματικές προσεγγίσεις θετικής συμπτωματολογίας.

➤ Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου

Στην παρούσα μελέτη οι επίμυες που δέχθηκαν τις επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις κεταμίνης εμφάνισαν διαταραγμένο δείκτη διάκρισης στη δοκιμασία νέου αντικειμένου, ο οποίος αντανάκλα διαταραγμένη αναγνωριστική μνήμη που μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης άμβλυνσης των γνωστικών λειτουργιών. Οι επίμυες που κατόπιν επαναλαμβανόμενης κεταμίνης δέχθηκαν τη χορήγηση CBD δεν εμφάνισαν μεταβολή ως προς το δείκτη διάκρισης, γεγονός που συνεπάγεται την ανασχετική δράση της CBD. Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με τη μοναδική μελέτη που αξιολογεί τη δράση της χρόνιας CBD μετά από επαναλαμβανόμενη κεταμίνη στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (Kozela et al., 2020), ενώ παράλληλα αξίζει να σημειωθεί ότι η CBD εμφανίζει ανασχετική δράση σε αντίστοιχους δείκτες γνωστικής συμπτωματολογίας σε διαφορετικά πειραματικά πρότυπα σχιζοφρένειας, φαρμακολογικά (Gomes et al., 2015), νευροαναπτυξιακά (Osborne et al., 2017, Stark et al., 2020;2021), ή κατόπιν έκθεσης σε κανναβινοειδή που δρουν αγωνιστικά στους CB1 υποδοχείς (Szkudlarek et al., 2018).

➤ Δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς

Οι επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις κεταμίνης είχαν αρνητική επίδραση στο συνολικό χρόνο που τα πειραματόζωα εμφανίζουν συμπεριφορές συνδιαλλαγής κατά τη δοκιμασία κοινωνικής συμπεριφοράς, υποδεικνύοντας ότι η πειραματική προσέγγιση της δυσλειτουργίας του γλουταματεργικού συστήματος από τη χορήγηση κεταμίνης χαρακτηρίζεται και από δείκτες αρνητικής συμπτωματολογίας. Προηγούμενη μελέτη με επαναλαμβανόμενα σχήματα χορήγησης κεταμίνης έχει παρουσιάσει την κοινωνική συμπεριφορά των πειραματόζωων άθικτη (Becker et al., 2003), ωστόσο αυτή η ασυμφωνία πιθανότατα να εξηγείται από τη πιο σύντομη έκθεση στην κεταμίνη που ενδεχομένως δεν είναι αρκετή για να διαταράξει το συγκεκριμένο δείκτη

αρνητικής συμπτωματολογίας, Η CBD εμφάνισε ανασχετική δράση στη μειωμένη κοινωνική συμπεριφορά που εμφάνισαν τα πειραματόζωα, σε συμφωνία ευρήματα άλλων μελετών (Gururajan et al., 2012, Gomes et al., 2015; Rodrigues da Silva et al., 2020).

➤ Προ-παλμική αναστολή αντανακλαστικού αιφνιδιασμού

Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης είχε σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή της προπαλμικής αναστολής του αντανακλαστικού αιφνιδιασμού (PPI) και για τις 3 διαφορετικές εντάσεις του προπαλμικού ερεθίσματος. Προηγούμενη μελέτη με σχήμα 10 δόσεων των 10 mg/kg κεταμίνης εμφανίζει παρόμοια δεδομένα για τη συγκεκριμένη παράμετρο (Samraio et al., 2018), ωστόσο οι Becker et al., (2003) που χρησιμοποίησαν 5 δόσεις των 30 mg/kg δεν παρατήρησαν διαταραχές κατά την πραγματοποίηση του PPI. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μελετών, θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι το διάστημα έκθεσης στην κεταμίνη είναι η πιο κρίσιμη παράμετρος για την ανάπτυξη της διαταραχής συγκριτικά με το μέγεθος της δόσης. Η CBD, στο προπαλμικό ερέθισμα έντασης 80 db εμφάνισε ανασχετική επίδραση στη διαταραχή που προκάλεσε η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν για πρώτη φορά ότι η χρόνια χορήγηση CBD προκαλεί διαταραχή του PPI, ενός ενδοφαινοτύπου παρατηρείται διαταραγμένος στη σχιζοφρένεια.

Μελέτες δεικτών νευροδιαβιβαστικών συστημάτων

5.4.2. Εκτίμηση ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων κατόπιν της επαναλαμβανόμενης χορήγησης κεταμίνης.

Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης προκάλεσε μείωση στο συντελεστή ανακύκλησης DOPAC/DA στον PFC, υποδεικνύοντας μειωμένη ντοπαμινεργική λειτουργία, ένα φαινόμενο που είναι αναμενόμενο σε ένα πειραματικό πρότυπο σχιζοφρένειας (Weinberger and Berman, 1988; Grace, 2016). Η επίδραση της CBD ως προς τη συγκεκριμένη παράμετρο συμβάλλει επιπλέον στο χαρακτηρισμό των αντιψυχωσικών της ιδιοτήτων.

Στο ραχιαίο και τον κοιλιακό υπόκαμπο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές από τη χορήγηση κεταμίνης, παρόλο που το κοιλιακό τμήμα θεωρείται κεντρικός κόμβος του νευροανατομικού υποστρώματος που εμφανίζεται σε δυσλειτουργία στη σχιζοφρένεια. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο ότι δεν πρόκειται για την πρώτη φορά που ο κοιλιακός υπόκαμπος βρίσκεται άθικτος, σε αντίθεση με άλλες μεταιχμιακές δομές, όπως για παράδειγμα στη μελέτη των (Stark et al., 2019, 2020) όπου μελετάται το MAM πρότυπο σχιζοφρένειας.

Στο DMS, η χορήγηση κεταμίνης είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης, την αύξηση του άθροισματος DOPAC+DA και τη μειωμένη αναλογία HVA/DA. Η παρατηρηθείσα μείωση του συντελεστή ανακύκλησης HVA/DA θα μπορούσε να συνδεθεί με μειωμένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα τοπικά και αποτελεί μια εικόνα εκ πρώτης όψης διαφορετική από την αναμενόμενη δεδομένου ότι πρόκειται για μια πειραματική προσέγγιση σχιζοφρένειας. Απεναντίας, το αυξημένο άθροισμα DOPAC+DA υποδηλώνει αυξημένη βιοσύνθεση ντοπαμίνης, κάτι που είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Kokkinou et al., (2020) αλλά και με ευρήματα μελετών ζωντανής απεικόνισης ασθενών με σχιζοφρένεια (McCutcheon et al., 2019). Η χορήγηση CBD λειτουργεί ανασταλτικά στις μεταβολές που προκαλεί η κεταμίνη ως προς τα επίπεδα της DA και το δείκτη βιοσύνθεσης, ενώ δεν προκαλεί αλλαγές στο συντελεστή ανακύκλησης HVA/DA.

Αντίστοιχη εικόνα παρατηρείται και στο DLS, με τη διαφορά του ότι η αύξηση από την κεταμίνη στα επίπεδα DA και το άθροισμα DOPAC+DA οριακά δεν αγγίζει το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας, ενώ η DOPAC βρέθηκε επίσης αυξημένη στα πειραματόζωα που τους χορηγήθηκε κεταμίνη, αλλά όχι και σε εκείνα που δέχθηκαν και τη χορήγηση CBD. Αντίστοιχα στο NAc, η κεταμίνη μείωσε το ρυθμό ανακύκλησης HVA/DA ενώ παρόμοια μεταβολή παρατηρήθηκε και από τη χορήγηση CBD.

Συνολικά φαίνεται ότι στο ραχιαίο ραβδωτό εμφανίζεται αυξημένος ο δείκτης βιοσύνθεσης της ντοπαμίνης μετά από την παρατεταμένη έκθεση σε κεταμίνη, ενώ η CBD εμφανίζει ανασχετική δράση σε αυτό το φαινόμενο. Αντίστοιχα, στο κοιλιακό ραβδωτό δεν παρατηρούνται μεταβολές στο συγκεκριμένο δείκτη. Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με τους Kokkinou *et al.*, (2020) που δείχνουν μέσω PET ότι ένα αντίστοιχο πρότυπο κεταμίνης σε μυς αυξάνει τη βιο-σύνθεση ντοπαμίνης στο ραχιαίο ραβδωτό. Επιπλέον τα παρόντα δεδομένα φαίνεται να κατέχουν μεταφραστική αξία δεδομένου ότι τα πιο πρόσφατα απεικονιστικά ευρήματα του ντοπαμινεργικού συστήματος ασθενών με σχιζοφρένεια που υποστηρίζουν ότι η ντοπαμίνη βρίσκεται αυξημένη στο ραχιαίο ραβδωτό, με έμφαση στη γνωστική μοίρα (McCutcheon, Howes, Moggadham). Επισημαίνεται ότι στα δεδομένα μας οι αλλαγές είναι πιο έντονες στο DMS συγκριτικά με το DLS, όπου το DMS έχει συσχετισθεί ως η υποδιαίρεση του εγκεφάλου των τρωκτικών που αντιστοιχεί στη συνειρμική/γνωστική μοίρα του κερκοφόρου πυρήνα των πρωτευόντων, μέσα από καθαρά ανατομικές (Joel and Weiner, 2000; Reep *et al.*, 2003) και λειτουργικές μελέτες (Burton *et al.*, 2015; Fino *et al.*, 2018; Shipman *et al.*, 2019).

Επιπρόσθετα, στο πλαίσιο της αυξημένης ντοπαμινεργικής λειτουργίας στο ραχιαίο ραβδωτό, οι McCutcheon *et al.*, 2020 αναφέρουν ότι η αύξηση αφορά τη προσυναπτική λειτουργία της ντοπαμίνης, ενώ παραθέτουν μελέτες που υποστηρίζουν την άμεση συσχέτιση της βιο-συνθετικής ικανότητας/δυναμικής (capacity) για ντοπαμίνη με την ένταση των θετικών συμπτωμάτων. Επιστρέφοντας στα δεδομένα της εργασίας μας και δεδομένων των προαναφερθέντων ευρήματα στη βιβλιογραφία, θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι η επίδραση της κεταμίνης στη βιο-συνθετική ισχύ της ντοπαμίνης στο ραχιαίο ραβδωτό συνδέεται με την αύξηση της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας αλλά και την υπερβάλλουσα απόκριση στη χορήγηση d-αμφεταμίνης που αποτελούν πειραματικούς δείκτες θετικής συμπτωματολογίας. Σημαντικώς, η CBD επαναφέρει τα επίπεδα την ντοπαμινεργικής βιο-σύνθεσης σε τιμές κοντά στις φυσιολογικές, ενώ παράλληλα αναχαιτίζει τις μεταβολές ως προς τους δείκτες θετικής συμπτωματολογίας.

Σχετικά με τον προμετωπιαίο φλοιό, η μείωση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας είναι ένα εύρημα που ευρίσκεται σε συνέπεια με την φλοιώδη υπολειτουργία (hypofrontality) που παρατηρείται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, και είναι συνδεδεμένη με τη δριμύτητα των αρνητικών συμπτωμάτων τα οποία περιλαμβάνουν την κοινωνική απόσυρση αλλά και τα γνωστικά ελλείμματα. Η CBD εμφάνισε ανασχετική επίδραση ως προς την ντοπαμινεργική λειτουργία αλλά και τους συμπεριφορικούς δείκτες κοινωνικής συνδιαλλαγής και γνωστικής λειτουργίας.

Από πλευράς αλλαγών στον κοιλιακό υπόκαμπο, θα ήταν αναμενόμενο να εντοπιστεί μια κατάσταση υπερδραστηριότητας, σύμφωνα με τα δεδομένα της διαθέσιμης βιβλιογραφίας (Grace AA *et al.*, 2016, Knight *et al.*, 2022), καθώς και προκλινικών ευρημάτων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της παρούσας εργασίας από το πρότυπο οξείας χορήγησης κεταμίνης. Ωστόσο, δεν εντοπίστηκαν μεταβολές ως προς τη ντοπαμινεργική λειτουργία στη συγκεκριμένη εγκεφαλική δομή. Στο πλαίσιο αυτό αξίζει να σημειωθεί το χρονοδιάγραμμα του πειράματος, καθώς στο δεδομένο πειραματικό σχεδιασμό οι επίμυες θυσιάζονται 14 με 15 ημέρες μετά την τελευταία χορήγηση κεταμίνης, και το διάστημα αυτό είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τα αντίστοιχα στη βιβλιογραφία και ενδεχομένως αφήνει το περιθώριο για την αποδρομή κάποιων από τις αλλαγές, καθώς και τη μεταβολή της ανιχνευθείσας παθολογίας κατά το στάδιο της άμεσης απάντησης λόγω οξείας χορήγησης κεταμίνης προς την ύστερη αποδρομή της δυσλειτουργίας.

5.4.3. Εκτίμηση γλουταματεργικής λειτουργίας σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού επιμύων κατόπιν της επαναλαμβανόμενης χορήγησης κεταμίνης.

Στον PFC ανιχνεύτηκαν μειωμένα επίπεδα glu και GABA μετά από χορήγηση κεταμίνης, καθώς και αυξημένο συντελεστή κύκλωσης gln/glu που αντιπροσωπεύει τον ομαλό κύκλο γλουταμικού-γλουταμίνης-γλουταμικού που διαμεσολαβείται από τη λειτουργία των αστροκυττάρων (Rothman *et al.*, 2003). Η CBD επανάφερε όλες τις μεταβολές των δεικτών της γλουταματεργικής και GABAεργικής λειτουργίας στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, χωρίς να προκαλεί μεταβολές όταν χορηγείται *per se*.

Στο ραχιαίο υπόκαμπο δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές, ενώ στον κοιλιακό η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη αύξησε τα επίπεδα glu, ενώ αυξημένη βρέθηκε η αναλογία glu/GABA. Η CBD ανέστειλε πλήρως τη δράση της κεταμίνης στο glu και μερικώς στην αναλογία glu/GABA. Αντίστοιχα στο DLS και στο NAc δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές, ενώ στο DMS βρέθηκε μειωμένος ο λόγος gln/glu μόνο μετά τη χορήγηση κεταμίνης.

Συγκεντρωτικά οι μεταβολές από την κεταμίνη εντοπίζονται κυρίως στον PFC αλλά και τον κοιλιακό υπόκαμπο και το DMS και η χορήγηση CBD μετά την κεταμίνη επιδρά αντισταθμιστικά στις αλλαγές της γλουταματεργικής και GABAεργικής δραστηριότητας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι PFC με VHIP καθώς και PFC με DMS αποκλίνουν προς αντίθετες κατευθύνσεις ως προς τους δείκτες της γλουταματεργικής δραστηριότητας που εξετάστηκαν.

Μια συγκεντρωτική αποτίμηση της βιβλιογραφίας πάνω σε κλινικά ευρήματα ασθενών με σχιζοφρένεια καταλήγει στο ότι οι μελέτες εκτίμησης των επιπέδων αυτών των νευροδιαβιβαστών με νέες μεθοδολογίες υποστηρίζει μειώσεις στα επίπεδα γλουταμικού στον ACC, ενώ παλαιότερες εμφανίζουν ασυνεπή δεδομένα. Στο πλαίσιο αυτό, μετα-αναλυτικές μελέτες καταλήγουν στο ότι οι παλαιότερες μελέτες συγκλίνουν σε αυξήσεις του Glx (άθροισμα επιπέδων gln+glu). Αποτελεί την αντιπροσωπευτική παράμετρο καθώς μέχρι να γίνουν ευρέως διαθέσιμοι οι φασματογράφοι υψηλής τάσης για H-MRS, ήταν αδύνατος ο σχετικός διαχωρισμός στις υπο μελέτη εγκεφαλικές δομές.

Η φύση της βιο-σύνθεσης και αποικοδόμησης του glu είναι τέτοια που δεν επιτρέπει τη διαμόρφωση ασφαλών συμπερασμάτων πάρα μόνο από την εκτίμηση των επιπέδων των νευροδιαβιβαστών, των μεταβολιτών (και παράλληλα πρόδρομων ουσιών) και τις επιμέρους αναλογίες. Σε αντίθεση με τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των κατεχολαμινών, το γλουταμικό αφου προσληφθεί από τα αστροκύτταρα μετατρέπεται σε γλουταμίνη μέσω της συνθετάσης της γλουταμίνης, ακολούθως μεταφέρεται πίσω στην προσυναπτική απόληξη του νευρώνα όπου εκεί μετατρέπεται εκ νέου σε γλουταμικό με τη μεσολάβηση της αφυδρογονάσης του γλουταμικού. Έχει υποστηριχθεί ότι η αναλογία gln/glu αυξάνεται όταν είναι αυξημένη η γλουταματεργική νευροδιαβίβαση (Hall *et al.*, 2015), ενώ άλλες μελέτες συνδέουν την αύξηση της αναλογίας gln/glu με τα γνωστικά ελλείματα που απαντώνται στη σχιζοφρένεια και με δυσλειτουργία των αστροκυττάρων (Shriyama *et al.*, 2010, Neuroimage).

Η διαταραχή δεικτών γλουταματεργικής λειτουργίας σε PFC έναντι VHIP και DMS κατά αντίστροφο τρόπο μπορεί να συνδυαστεί με το έλλειμα στην αναγνωριστική μνήμη που εμφανίζεται στους επίμεις που δέχθηκαν κεταμίνη, καθώς η CBD συντονισμένα αναστρέφει τις γλουταματεργικές και συμπεριφορικές μεταβολές. Η εικόνα της γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης θα ήταν πιο συμπληρωμένη με τη μελέτη πιθανών μεταβολών της συνθετάσης της γλουταμίνης ή της αφυδρογονάσης του γλουταμικού, καθώς θα καταδείκνυαν τον εντοπισμό του σημείου συσσώρευσης που προκαλεί τη δυσαναλογία στο συντελεστή ανακύκλωσης (αστροκύτταρα-μετασυναπτικά έναντι προσυναπτικού άκρου γλουταματεργικού κυττάρου). Η σημασία των νευροχημικών ευρημάτων θα αποτιμηθεί συνδυαστικά με την ταυτόχρονη εκτίμηση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης των υπομονάδων NMDA και AMPA, της ρυθμική δραστηριότητα των συγκεκριμένων εγκεφαλικών δομών αλλά και της κατάστασης συγκεκριμένων τύπων ενδονευρώνων που ελέγχουν τη γλουταματεργική λειτουργία.

5.4.4. Εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφραση των υποδοχέων του γλουταματεργικού συστήματος

Πρωτεϊνική έκφραση NMDA υποδοχέων

Στον PFC η κεταμίνη προκάλεσε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της GluN2B υπομονάδας των NMDA υποδοχέων και μείωση στην αναλογία GluN2A/GluN2B. Η χορήγηση CBD όταν ακολούθησε την κεταμίνη εμφάνισε ανασταλτική επίδραση στις μεταβολές της. Στο NAc από την άλλη παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση όλων των υπομονάδων που μελετήθηκαν (GluN1, GluN2A, GluN2B), καθώς και του λόγου GluN2A/GluN2B μετά από χορήγηση κεταμίνης, ενώ είναι ενδιαφέρον ότι αντίστοιχη εικόνα είχαν και τα δείγματα από πειραματόζωα που έλαβαν CBD. Φαίνεται συνεπώς ότι η κεταμίνη προκαλεί μεταβολές σε αντίθετη κατεύθυνση για τις 2 περιοχές σχετικά με την έκφραση της GluN2A/GluN2B υπομονάδας, καθώς στον PFC παρατηρήθηκε αύξηση του GluN2B, ενώ στο NAc η αύξηση της GluN2A ήταν προεξέχουσα. Η CBD ανέστειλε τη μεταβολή της αναλογίας στον PFC, ενώ δεν πέτυχε το ίδιο στο NAc.

Στον υπόκαμπο η κεταμίνη δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές, γεγονός που υποδεικνύει το ότι η κεταμίνη εμφανίζει ένα προφίλ μεταβολών όχι καθολικό, αλλά ειδικό ως προς την περιοχή ενδιαφέροντος. Η έλλειψη μεταβολών στον υπόκαμπο δε συμβαδίζει με τη μελέτη των Luo *et al.*, 2020 που υποστήριξε τη μείωση όλων των μη δομικών υπομονάδων του NMDA στον υπόκαμπο μετά από 10, 14 και 28 καθημερινές χορηγήσεις κεταμίνης σε υποαναισθητικές δόσεις σε μυσ. Αυτή η ασυμφωνία θα μπορούσε να εξηγηθεί από τις μεθοδολογικές διαφορές μεταξύ των 2 εργασιών, όπως το γεγονός ότι πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά είδη, καθώς και των διαφορών στην διαμερισματοποίηση του υποκάμπου (διαχωρισμός ραχιαίου με κοιλιακό έναντι μελέτη ολόκληρου του υποκάμπου σαν ενιαία δομή).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαταραχή του δείκτη της προ-παλμικής αναστολής μπορεί να μεσολαβηθεί από τη δράση των ντοπαμινεργικών αγωνιστών και των μη συναγωνιστικών αναστολέων των NMDA υποδοχέων στον επικλινή πυρήνα (Wan *et al.*, 1995; Wan and Swerdlow, 1996), με τη συμμετοχή των NMDA υποδοχέων. Δεδομένων των επιδράσεων της κεταμίνης αλλά και της CBD στη σύσταση των NMDA υποδοχέων στην περιοχή, αλλά και παράλληλης δράσης τους στο δείκτη του PPI, όπου η CBD προκαλεί από μόνη της ίδιας κατεύθυνσης μεταβολές ενώ δεν αναχαιτίζει τις αντίστοιχες της κεταμίνης, θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ των επιδράσεων στο PPI και των επιπέδων των NMDA υπομονάδων και ειδικά της έκφρασης των GluN2A υποδοχέων.

Ως προς την αναλογία GluN2A/GluN2B, αξίζει να σημειωθεί ότι αποτελεί έναν δείκτη που μεταβάλλεται ανάλογα με τα επίπεδα της δραστηριότητας των νευρώνων που αντιπροσωπεύει (Chen and Bear, 2007; Yashiro and Philpot, 2008; Xu *et al.*, 2009). Βάσει αυτής της αρχής και των μεταβολών που υπέστησαν από την κεταμίνη, θα μπορούσε να προταθεί ότι υποδεικνύουν μειωμένη νευρωνική δραστηριότητα στον PFC και αυξημένη δραστηριότητα στο NAc, τουλάχιστον όσο αφορά τις προσαγωγές γλουταματεργικές ίνες.

Η δυνατότητα της CBD να αντιμετωπίζει στον PFC τις μεταβολές στο δείκτη GluN2A/GluN2B, σε συνδυασμό με την αδυναμία της να τις αντιμετωπίσει στο NAc, θα μπορούσε να συνδεθεί με την προφίλ της που εμφανίζεται να έχει ευεργετική δράση σε δείκτες αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας (Gururajan *et al.*, 2011, 2012; Osborne *et al.*, 2017; Kozela *et al.*, 2020; Rodrigues da Silva *et al.*, 2020), έναντι της μη αξιόλογης δυναμικής της να αντιμετωπίζει τη θετική συμπτωματολογία τουλάχιστον σε προκλινικό επίπεδο (Long *et al.*, 2010; Valvassori *et al.*, 2011; Brakatselos *et al.*, 2021). Είναι δε ενδιαφέρον το ότι η CBD μέχρι ώρας έχει δείξει ανεπάρκεια να ανταπεξέλθει στη θετική συμπτωματολογία που συνοδεύει τη δράση των ψυχομιμητικών που μελετήθηκαν σε οξείες χορηγήσεις, όπου σε αυτή την περίπτωση η δράση τους ελέγχεται κυρίως από το NAc, σε αντίθεση με την ανασχετική της δράση που εμφάνισε σε συγκεκριμένους δείκτες στις προσεγγίσεις που προϋποθέτουν την εγκατάσταση των βιο-φαινότυπων, όπου η θετική συμπτωματολογία σχετίζεται με αλλαγές της ντοπαμινεργικής διαβίβασης στο DLS (υπερευαισθητοποίηση σε d-αμφεταμίνη), ή το DMS (επαναλαμβανόμενη έκθεση σε κεταμίνη).

Πρωτεϊνική έκφραση AMPA υποδοχέων

Η κεταμίνη στο PFC προκάλεσε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της GluA1 υπομονάδας των AMPA υποδοχέων υπομονάδας και της αναλογίας GluA1/GluA2, ενώ η CBD προκάλεσε επαναφορά των επιπέδων τους σε αντίστοιχα επίπεδα με της ομάδας ελέγχου. Στο NAc παρατηρήθηκαν αυξήσεις στα επίπεδα της GluA1 και της GluA2 υπομονάδας, ενώ η CBD *per se* αλλά και το σχήμα χορήγησης στο οποίο ακολούθησε την κεταμίνη εμφάνισαν την ίδια εικόνα. Παράλληλα, στον κοιλιακό ιππόκαμπο δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των 2 υπομονάδων των AMPA υποδοχέων που μελετήθηκαν.

Συγκεντρωτικά, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην πρωτεϊνική έκφραση των NMDA και AMPA υπομονάδων κινήθηκαν σε παράλληλες κατευθύνσεις με την κεταμίνη να προκαλεί αυξήσεις στην έκφρασή τους στο PFC και το NAc και με τη CBD να προκαλεί από μόνης της αυξήσεις στο NAc. Η χρόνια χορήγηση CBD ανείρεσε τις μεταβολές (αυξήσεις) που παρατηρήθηκαν στον PFC ενώ δεν επηρέασε τη δράση της κεταμίνης στον NAc.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση της έκφρασης των AMPA υποδοχέων που δεν περιέχουν τη GluA2 υπομονάδα, η οποία μπορεί να υποδηλωθεί από την αύξηση της αναλογίας GluA1/GluA2 που παρατηρήθηκε στον PFC, συνεπάγεται την αύξηση της διαπερατότητας Ca^{++} από τους υποδοχείς και αποτελεί μορφή συναπτικής πλαστικότητας που υποκινείται μεταξύ άλλων από την παρουσία ψυχοδιεγερτικών (Bowers et al., 2010; Luscher and Malenka, 2011). Παράλληλα, η αναλογία GluN2A/GluN2B παίζει σημαντικό ρόλο στη συναπτική πλαστικότητα καθώς φαίνεται να συμμετέχει στον έλεγχο του αν μια σύναψη θα υποστεί LTP ή LTD (Yashiro and Philpot, 2008; Xu et al., 2009). Ενδέχεται λοιπόν οι παρατηρηθείσες μεταβολές σε PFC και NAc να σχετίζονται με long lasting μεταβολές σε επίπεδο συναπτικής πλαστικότητας, κάτι που είναι αναμενόμενο δεδομένης της δράσης της κεταμίνης αλλά και της CBD σε αυτό το επίπεδο (Brakatselos et al., 2020, Roulia, Delis, Brakatselos, Ntoulas et al., 2020, Sartim 2020).

Τα παραπάνω δεδομένα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που συνδέουν την κεταμίνη ή άλλους μη συναγωνιστικούς αναστολείς των NMDA με μεταβολές στην πρωτεϊνική έκφραση των υπομονάδων NMDA και AMPA. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι χρόνια χορήγηση κεταμίνης αυξάνει τις αναλογίες GluN1/PSD95 και GluN2A/PSD95, οι οποίες ακολούθως επηρεάζουν τη σηματοδότηση που προκαλεί η εισροή Ca^{++} (Lisek et al., 2017). Επιπρόσθετα, οι υπομονάδες των NMDA έχει βρεθεί ότι αυξάνονται μετά από χρόνια χορήγηση MK-801 (Rammes et al., 2001, Zhou et al., 2020) και PCP (Anastasio and Johnson, 2004, Yu et al., 2002), ενώ οι μεταβολές αυτές έχουν συσχετισθεί με υπερλειτουργικούς NMDA υποδοχείς (Yu et al., 2002). Από την άλλη, μελέτες υποστηρίζουν αντίστοιχα ανασταλτικά αποτελέσματα (Ding et al., 2016, Liu et al., 2018, Sun et al., 2021) ή απουσία μεταβολών (Uttl et al., 2018) στην έκφραση των NMDA και AMPA υπομονάδων, με την ασυμφωνία να αποδίδεται με διαφορές στα δοσολογικά σχήματα και στα χρονικά σημεία που επιλέχθηκαν να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις.

Ταυτόχρονα, υπάρχουν μελέτες σε μεταθανάτιο υλικό ασθενών με σχιζοφρένεια, όπου υποστηρίζουν ότι η νόσος χωρίς ή με παρουσία φαρμακευτικής αγωγής επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων από NMDA και AMPA, καθώς και σχετικούς νευροβιολογικούς δείκτες που σχετίζονται με νευρωνική πλαστικότητα (Zavitsanou et al., 2008; Kristiansen et al., 2006). Είναι ωστόσο σημαντικό να διατυπωθεί ότι η σύνδεση αυτών των δεδομένων με τα προκλινικά ευρήματα αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία καθώς στην περίπτωση των μεταθανάτιων ευρημάτων από ασθενείς το τελικό αποτέλεσμα επηρεάζεται από πλήθος αστάθμητων και μη παραγόντων όπως το στάδιο της νόσου, το κατά πόσο κάθε ασθενής είναι σε συμμόρφωση μες στη θεραπεία, οι συνοσηρότητες και η αιτία θανάτου.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, υπάρχει διαπιστωμένη δράση της CBD σε επίπεδο αύξησης δεικτών νευρωνικής πλαστικότητας που περιλαμβάνουν τον BDNF (Sales et al., 2019; Sartim et al., 2021), πιθανότατα μέσω μηχανισμών που μεσολαβούνται από τη λειτουργία των NMDA και AMPA υποδοχέων (Silote et al., 2019). Σε αυτό το πλαίσιο μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει μάλιστα πως η αντικαταθλιπτική δράση της CBD

εξαρτάται από την ενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων (Sartim et al., 2021). Δεδομένου μάλιστα ότι οι AMPA υποδοχείς μεσολαβούν συμβάντα νευρωνικής πλαστικότητας με την αύξηση των υποδοχέων που δεν περιέχουν GluA2, ώστε να αυξηθεί η εισροή Ca^{++} έναντι του Na^+ , για την προώθηση της σηματοδότησης καθοδικά του Ca^{++} , αξίζει να σημειωθεί ότι η CBD εμφανίζει δράση αρνητικού αλλοστερικού τροποποιητή ειδικά για τους AMPA που περιέχουν την GluA2 υπομονάδα (Yu et al., 2020).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα δεδομένα μας η CBD κατέστειλε τις επιδράσεις της κεταμίνης στους NMDA και AMPA υποδοχείς στον PFC οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με το βιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας. Θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η δράση της CBD εμφανίζει ένα διφασικό μοτίβο: Υπό φυσιολογικές συνθήκες υποκινεί τη νευρωνική πλαστικότητα με την αύξηση των επιπέδων δεικτών όπως ο BDNF, ενώ τροποποιεί τη δράση των δεικτών όταν βρίσκονται σε μια διαταραγμένη κατάσταση, μετά από την εμφάνιση ενός παθολογικού φαινοτύπου, όπως αυτός που προκαλείται από τη χορήγηση μη συναγωνιστικών αναστολέων των NMDA.

5.4.5 Εκτίμηση της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές.

Το καθεστώς φωσφορυλίωσης της ERK1/2 βρέθηκε αυξημένο σε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές πλην του κοιλιακού ιπποκάμπου μετά από χορήγηση κεταμίνης, ενώ η CBD ανέστειλε αυτές τις μεταβολές με εξαίρεση τον PFC όπου και η *per se* δράση της προκάλεσε αύξηση στο λόγο φωσφορυλιωμένης/ολικής ERK1/2. Η γενική εικόνα των μεταβολών στο καθεστώς φωσφορυλίωσης ERK1/2 δεν ήταν αντίστοιχη με εκείνη της έκφρασης των NMDA και AMPA υπομονάδων που μελετήθηκαν στις υπο μελέτη εγκεφαλικές περιοχές. Αντίστοιχα και στο πρότυπο οξείας χορήγησης κεταμίνης, τα επίπεδα GluN2B βρέθηκαν μειωμένα σε NAc και VHIP, αλλά το καθεστώς φωσφορυλίωσης ERK1/2 απαντάται μόνο στο NAc. Παρόλα αυτά οι μεταβολές που παρατηρούνται και στις 2 περιπτώσεις βρίσκονται σε κοινές κατευθύνσεις υποστηρίζοντας ότι οι μεταβολές στα επίπεδα των NMDA υποδοχέων επηρεάζουν το καθεστώς φωσφορυλίωσης της ERK1/2, ενώ η CBD τροποποιεί τις μεταβολές με ένα ειδικό ανά την εγκεφαλική περιοχή πρότυπο.

Η μελέτη των (Luo et al., 2020) υποστηρίζει ότι οι επαναλαμβανόμενες υπο-αναισθητικές δόσεις κεταμίνης προκαλούν μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης ERK1/2 μετά από 28 ημέρες καθημερινών χορηγήσεων. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη μελέτη η αναλογία φωσφορυλιωμένης προς ολικής ERK1/2 δεν έχει εμφανίσει πραγματικές μεταβολές στον ιππόκαμπο, καθώς η ολική και η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης βρίσκονται μειωμένες στον ίδιο βαθμό μετά από κεταμίνη. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν στον ιππόκαμπο, αναλύοντας τον ως ενιαία δομή, θα μπορούσε να προταθεί ότι τα δεδομένα μας είναι σε συμφωνία, όσο αφορά τον VHIP. Επιπρόσθετα, οι (Hudson et al., 2019) έδειξαν ότι η CBD *per se* δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της ERK1/2 στον ιππόκαμπο, ενώ ανέστειλε την αύξηση που προκάλεσε η THC, η οποία συσχετίστηκε με την απόδοση του τόνου ανταμοιβής (salience attribution), ένας συμπεριφορικός δείκτης που αντανάκλα την αρνητική συμπτωματολογία.

Συμπερασματικά θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι οι αντιρροπιστικές επιδράσεις της CBD ως προς τη μεταβολή της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 μπορεί να συσχετισθεί με την ύπαρξη αντιψυχωσικής δράσης, δεδομένου ότι υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία όπου η CBD αναστέλλει τις μεταβολές στην ERK1/2, ενώ ταυτόχρονα έχει ανασχετική δράση σε συμπεριφορικές παραμέτρους που συνδέονται με τη συμπτωματολογία της σχιζοφρένειας. Προς περαιτέρω υποστήριξη των παραπάνω, έχει δειχθεί ότι τα αντιψυχωσικά φάρμακα *per se*, προκαλούν μεταβολές στο καθεστώς φωσφορυλίωσης της ERK1/2 σε αντίθετη κατεύθυνση από τις αντίστοιχες μεταβολές που παρατηρούνται σε πειραματικά πρότυπα των ψυχώσεων ή της σχιζοφρένειας (Ruso-Julve et al., 2019).

5.4.6. Καταγραφή ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου

Φασματική πυκνότητα ισχύος

Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης προκάλεσε μείωση της φασματικής πυκνότητας ισχύος για τα εύρη συχνοτήτων θ , β και χαμηλών γ στον PFC. Η CBD *per se* δεν προκάλεσε μεταβολές, ενώ είχε ανασχετική δράση στις μεταβολές που προκάλεσε η κεταμίνη. Στον υπόκαμπο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές, ενώ στο DMS προκάλεσε αύξηση των αντίστοιχων της πυκνότητας ισχύος για θ , β και χαμηλές γ , μεταβολές που δεν εμφανίστηκαν όταν την επαναλαμβανόμενη κεταμίνη ακολούθησε η χρόνια CBD.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν ότι υπάρχει σαφής δυσλειτουργία στην ισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής (E/I) στον PFC και το DMS κατόπιν κεταμίνης, ενώ ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι αυτό δε συναντάται στους επίμυες που δέχθηκαν τη χορήγηση CBD. Παράλληλα, ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η κεταμίνη μεταβάλλει την ισορροπία E/I σε διαφορετικές κατευθύνσεις στον PFC και το DMS, κατά αντιστοιχία και των διαφορετικών παραμέτρων που μελετήθηκαν, συμπεριλαμβανομένης της γλουταματεργικής λειτουργίας, της ντοπαμινεργικής λειτουργίας αλλά και των μεταβολών στην αναλογία GluN2A/GluN2B θεωρώντας ότι ο NAc παρέχει μια εικόνα η οποία μπορεί αντιπροσωπεύσει ένα τμήμα της δομής του ραβδωτού σώματος.

Έχει ήδη αναφερθεί η διαταραγμένη λειτουργία του εγκεφάλου που απαντάται στη σχιζοφρένεια και ειδικότερα στο χαρακτηριστικό ενδοφαινότυπο που εμφανίζουν οι ασθενείς σχετικά με τους γ ρυθμούς. Συγκεκριμένα εμφανίζουν μια αύξηση στη λειτουργία των γ ρυθμών σε κατάσταση ηρεμίας και την ελλειμματική επιστράτευσή τους, όταν είναι αναγκαίοι για την υποστήριξη συγκεκριμένων γνωστικών λειτουργιών (Uhlhaas and Singer 2010; Gonzalos-Burgos et al., 2011; Williams and Boska et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη η καταγραφή της ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου πραγματοποιήθηκε σε αναισθητοποιημένους με σεβοφλουράνιο επίμυες προκειμένου να καταστεί δυνατή η καταγραφή των 3 εγκεφαλικών περιοχών ανά δυο ζεύγη, βάσει των διαθέσιμων μεθοδολογικών δυνατοτήτων. Υπό τη συνθήκη της παρουσίας του σεβοφλουρανίου η εκτίμηση της ρυθμικής δραστηριότητας ενδεχομένως να εμφανίζει διαφορές με την αντίστοιχη σε επίμυες σε εγρήγορση, ωστόσο δόθηκε προτεραιότητα στην παράλληλη μελέτη των βασικών δομών που εμπλέκονται στο νευροβιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας καθώς τα αποτελέσματα των υπόλοιπων πειραματικών μας προσεγγίσεων υποδείκνυαν την ύπαρξη διαφορετικής κατεύθυνσης μεταβολών ανά εγκεφαλική περιοχή.

Οι περισσότερες προκλινικές προσεγγίσεις σχιζοφρένειας που εστιάζουν στη ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου δίνουν έμφαση συγκεκριμένα στο φάσμα συχνότητας των γ ρυθμών, καθώς η δυσλειτουργία τους έχει χαρακτηριστεί ως ενδοφαινότυπος χαρακτηριστικός για τη νόσο που σχετίζεται στενά με τα γνωστικά ελλείματα (Kocsis et al., 2013). Στο πλαίσιο αυτό έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες της επίδρασης οξείας κεταμίνης και MK-801 στη λειτουργία των γ ρυθμών, η οποία συνήθως καταγράφεται μέσω ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος (HEΓ). Οι διάφορες μεταβλητές μιας διαδικασίας καταγραφής, όπως τα μέσα (HEΓ, LFPs), η χορηγούμενη δόση, η κατάσταση του πειραματόζωου την ώρα της καταγραφής (σε ηρεμία, κατά τη διάρκεια μιας συμπεριφορικής δοκιμασίας, υπό αναισθησία, *ex vivo*), η περιοχή καταγραφής, η μετέπειτα επεξεργασία του σήματος, μέχρι και η δοσολογία, έχουν σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη ασυμφωνιών στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ωστόσο, κατά γενικό κανόνα φαίνεται ότι η οξεία κεταμίνη προκαλεί μεταβολές όπως μια παροδική αύξηση των γ ρυθμών σε κατάσταση ηρεμίας και μείωση αυτών μετά από προκλητή διέγερσή τους, οι οποίες συνδέονται με συμπεριφορικούς δείκτες που αντανακλούν συμπτωματολογία των ψυχώσεων (Kittelberger et al., 2012; Kocsis et al., 2013; Hudson et al., 2016; Cadinu et

al., 2018; Michaels *et al.*, 2018). Οι μεταβολές αυτές ωστόσο έχουν παρωδικό χαρακτήρα και αντανακλούν περισσότερο την κατάσταση της οξείας ψύχωσης, παρά τον εγκαθιδρυμένο ενδοφαινότυπο που υπάρχει στη σχιζοφρένεια.

Σε μελέτες όπου συναντώνται χρόνια σχήματα χορηγήσεων επίσης αποτυπώνονται μεταβολές στη ρυθμική δραστηριότητα και ειδικά στους γ ρυθμούς. Σε μια μελέτη των επιδράσεων της κεταμίνης στη ρυθμική δραστηριότητα του εγκεφάλου, οι (McNally *et al.*, 2013) αφού χορήγησαν 30mg/kg για 5 ημέρες, κατέγραψαν LFPs από τον προμεταιχμιακό φλοιό τομών εγκεφάλου και παρατήρησαν μείωση στην φασματική πυκνότητα ισχύος των γ ρυθμών. Το εύρημα των *ex vivo* μελετών αυτό είναι ίδιας κατεύθυνσης με τη μείωση των γ ρυθμών που ανιχνεύουμε στην ίδια εγκεφαλική περιοχή στα αναισθητοποιημένα πειραματόζωα, της παρούσας μελέτης, παρότι οι προαναφερθέντες καταγραφές πραγματοποιήθηκαν *ex vivo*. Οι Kittelberg *et al.*, (2012) χρησιμοποιώντας EEG αλλά και καταγραφές LFPs από CA1 σε επίμυες μελέτησαν την οξεία και τη χρόνια χορήγηση κεταμίνης (5 ημερήσιες δόσεις των 30 mg/kg) σε επίμυες που ήταν σε εγρήγορση αλλά και σε κατάσταση αναισθησίας από ουρεθάνη, καταλήγοντας στο ότι η χρόνια χορήγηση δεν οδηγεί σε αντίστοιχα εύρωστες μεταβολές της ρυθμικής δραστηριότητας σε σχέση με την οξεία. Επίσης έδειξαν ότι η οξεία κεταμίνη προκαλεί αύξηση της ισχύος των γ , σε αντίθεση με τη χρόνια χορήγηση που προκαλεί μείωση των γ στον ιππόκαμπο, η οποία σταδιακά αμβλύνεται κατόπιν της τελευταίας χορήγησης. Συγκεκριμένα, η μείωση που παρατηρείται τις μέρες 1 και 5 μετά το τέλος του χρόνιου σχήματος χορήγησης έχουν ήδη αποδράμει τις ημέρες 10 και 13. Θα μπορούσε λοιπόν να υποστηριχθεί ότι και στη δική μας περίπτωση όπου μελετάμε τη ρυθμική δραστηριότητα στο κοιλιακό CA1, 11 με 14 ημέρες από την τελευταία χορήγηση κεταμίνης δεν παρατηρούμε μεταβολές στους χαμηλούς γ , τις οποίες ενδεχομένως να μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε σε ένα πιο πρώιμο χρονικό παράθυρο.

Μια ακόμη ενδιαφέρουσα μελέτη που συγκρίνει τις επιδράσεις οξείας και χρόνιας υπο-αναισθητικής κεταμίνης και μελετάει τη μεταβολή της ρυθμικής δραστηριότητας μετά τη χρόνια κεταμίνη στο χρόνο, μέσω EEG καταγραφών σε επίμυες που βρίσκονται σε εγρήγορση είναι αυτή των (Ahnou *et al.*, 2017). Και στην παρούσα μελέτη η οξεία χορήγηση επέφερε αύξηση στην ισχύ των γ ρυθμών ενώ η χρόνια προκαλεί μείωση η οποία φθίνει σταδιακά, μέχρι την 4^η εβδομάδα από την έναρξη των χορηγήσεων όπου η ισχύς των γ ρυθμών έχει πλέον επιστρέψει στα φυσιολογικά επίπεδα. Η παρούσα εργασία συνδέει την αυξημένη ισχύ των γ που παρατηρείται από την οξεία χορήγηση με θετική συμπτωματολογία και τη μείωση της ισχύος ανάλογη με τη δριμύτητα των αρνητικών συμπτωμάτων και η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να συνδυαστεί και με τα δικά μας ευρήματα. Συγκεκριμένα η μείωση της γ ισχύος στον PFC θα μπορούσε να συσχετιστεί με την διαταραχή των δεικτών αρνητικής συμπτωματολογίας (μειωμένη κοινωνική συμπεριφορά), ενώ η αύξηση της γ ισχύος στο DMS θα μπορούσε να συνδεθεί με τη διαταραχή δεικτών θετικής συμπτωματολογίας (υπερκινητικότητα και υπερευαισθητοποιημένη απόκριση στην οξεία χορήγηση d-αμφεταμίνης) αλλά και με την αύξηση των επιπέδων βιο-σύνθεσης της ντοπαμίνης που παρατηρήθηκαν σε παράλληλες συμπεριφορικές και νευροχημικές προσεγγίσεις. Αξίζει ωστόσο να επισημανθεί πως τέτοιοι συσχετισμοί, αν και αποτελούν σημείο σύγκλισης των προκλινικών ευρημάτων και των κλινικών παρατηρήσεων, χρήζουν περαιτέρω επιβεβαίωσης προκειμένου να γίνουν καλύτερα κατανοητοί οι υποκείμενοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της νόσου.

Αξίζει να επισημανθεί ότι η σχετική βιβλιογραφία απαρτίζεται κυρίως από μελέτες με ΗΕΓ, ηλεκτροφλοιογράφημα (τοποθέτηση ηλεκτροδίων στην επιφάνεια του φλοιού) και καταγραφή δυναμικών πεδίου κυρίως σε φλοιικές, θαλαμικές δομές καθώς και τον ιππόκαμπο ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα από καταγραφές στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα.

Μεταβολές της ισχύος σε διαφορετικές φασματικές πυκνότητες, όπως οι θ και οι β ρυθμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν πάλι συσχετισθεί με διαταραχές στην ισορροπία διέγερσης και αναστολής σε προκλινικά πρότυπα σχιζοφρένειας (Kocsis *et al.*, 2013; Ahnou *et al.*, 2017; De Felice *et al.*, 2022). Τέτοιες

μεταβολές θα μπορούσαν να αποδοθούν σε δυσλειτουργίες ειδικών υποστρωμάτων όπως οι ανασταλτικοί ενδονευρώνες με καλανθοειδή μορφολογία (basket cells) που είναι θετικοί στην παρβαλβουμίνη, εδράζουν στο stratum oriens του υποκάμπου και ονομάζονται OLM (λόγω του ότι προβάλλουν στην ανατομική περιοχή που ονομάζεται lacunosum-moleculare) και έχουν συσχετισθεί με τις μεταβολές των θ ρυθμών μετά τη χορήγηση κεταμίνης, καθώς έχουν μεγάλη ευαισθησία στον ανταγωνισμό των NMDA υποδοχέων (Kocsis *et al.*, 2013). Δεν αποκλείεται επίσης η διαταραγμένη ισορροπία διέγερσης/αναστολής που παρατηρείται στο προκλινικό πρότυπο σχιζοφρένειας μέσω της χορήγησης κεταμίνης να περιλαμβάνει επιφανόμενα δεικτών των οποίων η ακεραιότητα εξαρτάται από τα μοριακά υποστρώματα στα οποία λειτουργεί η κεταμίνη, όπως οι NMDA υποδοχείς.

Μια τελευταία παρατήρηση για τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν είναι ότι και στις δυο περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν μεταβολές στις φασματικές πυκνότητες ισχύος από την κεταμίνη, οι μεταβολές ήταν ομοιόμορφες δηλαδή προς μια κατεύθυνση για τα διαφορετικά φάσματα πυκνότητας. Έχει διατυπωθεί στη βιβλιογραφία ότι οι ομοιόμορφες μεταβολές της ισχύος κατά το ευρύ πλάτος του φάσματος συχνοτήτων καταγραφής (broadband spectral change) μπορούν να προβλέψουν επιτυχώς το καθεστώς πυροδότησης (firing rate) του τοπικού πληθυσμού νευρώνων που υφίσταται καταγραφή (Manning *et al.*, 2009; Whittingstall and Logothetis, 2009; Gao, 2016). Βάσει αυτής της αρχής θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι η συντονισμένη μείωση από την κεταμίνη όλων των φασματικών πυκνοτήτων ισχύος που μελετήθηκαν στον PFC, θα μπορούσε να υποδεικνύει μια μείωση του ρυθμού πυροδότησης του συνόλου των νευρώνων που υπέστησαν καταγραφή. Αντίστοιχα για το DMS η ίδια αρχή υποδεικνύει αύξηση του ρυθμού πυροδότησης. Είναι ενδιαφέρον ότι η μετέπειτα χρόνια χορήγηση CBD εμφανίζει ανασχετική δράση στις διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται και στα 2 σημεία καταγραφής. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι η διεξαγωγή των παραπάνω συμπερασμάτων ενέχει σχετική αμφισβήτηση γιατί οι αλλαγές στο ευρύ φάσμα των συχνοτήτων καταγραφής θα έπρεπε να μελετηθούν ως μια ενιαία φασματική πυκνότητα και όχι ως τρεις διακριτές (θ, β, χαμηλές γ) παρόλο που οι μεταβολές παρατηρούνται παράλληλα και είναι στατιστικά σημαντικές και για τις τρεις επιμέρους φασματικές πυκνότητες.

Ένα τελευταίο σημείο που αξίζει να συζητηθεί αφορά στην παρατήρηση ότι οι 3 περιοχές καταγραφής έχουν ένα αντίστροφο πρότυπο απόκρισης ως προς τη φασματική πυκνότητα ισχύος και το ρυθμό κύκλωσης gln/glu , μετά τη χορήγηση κεταμίνης. Συγκεκριμένα, στο φλοιό μειώνεται η φασματική πυκνότητα ισχύος και για τα 3 φάσματα συχνοτήτων ενώ αυξάνεται ο ρυθμός ανακύκλωσης gln/glu , και η μετέπειτα χορήγηση CBD ασκεί ολική αναχαίτιση των μεταβολών και στις 2 περιπτώσεις. Αντίστοιχα, στο DMS που η ισχύς των θ, β και χαμηλών γ ρυθμών είναι αυξημένη, ο ρυθμός gln/glu παρουσιάζει μείωση, ενώ η μετέπειτα χορήγηση CBD έχει ίδιας κλίμακας ανασχετική δράση και στις 2 παραμέτρους. Λαμβάνοντας υπόψη την παραπάνω θεώρηση περί μειωμένης συχνότητας πυροδότησης των τοπικών φλοιικών πληθυσμών που καταγράφηκαν ταυτόχρονα με αυξημένο ρυθμό gln/glu θα μπορούσε να προταθεί ότι στον PFC που το κύριο σώμα νευρώνων είναι πυραμιδικό (~75% των νευρώνων) (DeFelipe and Fariñas, 1992), ο αυξημένος ρυθμός προέρχεται από μειωμένη σύνθεση και νευροδιαβίβασης γλουταμικού είτε λόγω δυσλειτουργίας των αστροκυττάρων, είτε λόγω μειωμένου ρυθμού βιοσύνθεσης.

Συνοχή

Η κεταμίνη αύξησε τη συνοχή της φασματικής πυκνότητας των θ ρυθμών μεταξύ VHIP και PFC. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση CBD *per se*, ενώ η χορήγηση CBD μετά την επαναλαμβανόμενη κεταμίνη εμφάνισε ανασχετική δράση. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη συνοχή μεταξύ PFC και DMS.

Η μη ύπαρξη πολλών μεταβολών σε επίπεδο συνοχής μεταξύ των δύο ζευγών εγκεφαλικών περιοχών που μελετήθηκαν υποδεικνύουν ότι δεν εμφανίζονται μεταβολές στην επικοινωνία μεταξύ VHIP και PFC όπως και PFC και DMS στο πειραματικό πρότυπο της κεταμίνης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι διάφορες

μεταβολές που πραγματοποιούνται, στο χρονικό παράθυρο τουλάχιστον που εξετάζονται δεν εμφανίζουν λειτουργικές μεταβολές στη συνδεσιμότητά τους όσον τουλάχιστον αφορά τη ρυθμική δραστηριότητά τους, παρόλο που οι επιμέρους πόλοι εμφανίζουν παρεκκλίσεις από την ομαλή λειτουργία τους.

5.4.7. Προσδιορισμός ανοσοϊστοχημικά σημασμένων κυττάρων έναντι της πρωτεΐνης παρβαλβουμίνης

Προμετωπιαίος φλοιός (PFC)

Η πυκνότητα των ανοσοθετικών νευρώνων σε παρβαλβουμίνη (PV) βρέθηκε μειωμένη στο πρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου (ACC) μετά από τις επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις κεταμίνης και CBD, ενώ η χορήγηση CBD αντέστρεψε τη συγκεκριμένη μεταβολή. Στον προμεταιχμιακό φλοιό (PL) και στον υπομεταιχμιακό φλοιό (IL) δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές.

Ραχιαίος ιππόκαμπος (DHIP)

Στο DHIP δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές ως προς την πυκνότητα των ανοσοθετικών σε PV κυττάρων που καταμετρήθηκαν.

Κοιλιακός ιππόκαμπος (VHIP)

Στο υπόθεμα του VHIP (vSUB) η κεταμίνη προκάλεσε μείωση ως προς τον αριθμό των ανοσοθετικών στην PV νευρώνων, ενώ η μετέπειτα χορήγηση CBD προκάλεσε την περιστολή αυτού του φαινομένου. Στις CA1 και την DG δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές αν και η κεταμίνη εμφάνισε μια τάση για μείωση στη CA1. Συνολικά φαίνεται πως η κεταμίνη εμφανίζει ένα πρότυπο αυστηρά καθορισμένων σε ανατομικό επίπεδο μεταβολών που δε γενικεύονται σε όλο το εύρος των δομών αλλά εντοπίζονται σε συγκεκριμένα διαμερίσματα. Στην περίπτωση του έσω PFC (mPFC), οι μεταβολές εντοπίζονται στον εμπρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου (ACC), μια δομή που εμπλέκεται σε ανώτερες γνωστικές λειτουργίες, όπως στη συγκέντρωση/εστίαση προσοχής, στη λήψη αποφάσεων και τη γνωστική ευελιξία. Οι συμπεριφορές αυτές εκπίπτουν μετά από οξεία ή χρόνια κεταμίνη (Nikiforuk and Porik 2016) και εμφανίζονται διαταραγμένες σε ασθενείς με σχιζοφρένεια. Παράλληλα, πρόσφατες απεικονιστικές μελέτες σε ασθενείς με σχιζοφρένεια έχουν υποστηρίξει την αδυναμία επιστράτευσης ντοπαμίνης και γλουταμικού στον ACC σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (McCutcheon *et al.*, 2019; Robert A. McCutcheon *et al.*, 2020).

Από την άλλη το vSUB αποτελεί μια δομή του υποκάμπου που αποτελεί σταθμό/κόμβο ενσωμάτωσης των μεταιχμιακών και υποκάμπιων κυκλωμάτων και λειτουργιών και αποτελεί το βασικό σημείο εξόδου του υποκάμπου προς τον επικλινή πυρήνα, τον PFC, αλλά και τη VTA (πολυσυναπτικά) παίζοντας ρόλο στο συντονισμό των δικτύων που αφορούν -μεταξύ άλλων- την αντίληψη του περιβάλλοντος (context), τη ρύθμιση του συναισθήματος και της κοινωνικής συμπεριφοράς. Πλήθος παρατηρήσεων θέλουν το vSUB σε καθεστώς υπερδιέγερσης σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, το οποίο μεταδίδεται στη VTA (Grace 2016, Bygrave 2018) με επικρατούσες υποθέσεις να υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο της παρατηρηθείσας υπερδραστηριότητας στο vSUB στο νευροβιολογικό υπόστρωμα της σχιζοφρένειας.

Έλλειμμα στην έκφραση της PV από τα κύτταρα που φυσιολογικά την εκφράζουν ή μείωση του αριθμού αυτών αποτελεί κλασικό και επαναλαμβανόμενο εύρημα σε μεταθανάτιο υλικό φλοιικών δομών ή του υποκάμπου ασθενών με σχιζοφρένεια (Zhang and Reynolds, 2002; Wang *et al.*, 2011), ενώ αντίστοιχες μειώσεις παρατηρούνται στα πειραματικά μοντέλα της νόσου, φαρμακολογικά (Kokkinou *et al.*, 2020), αναπτυξιακά (Chalkiadaki *et al.*, 2019) και γενετικά (Mukherjee *et al.*, 2019). Το έλλειμμα αυτό είναι επιλεκτικό για το συγκεκριμένο τύπο ενδονευρώνων, καθώς πολύ σπάνια παρατηρείται παράλληλη μείωση του αριθμού άλλου τύπου ανασταλτικών ενδονευρώνων. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης της PV είναι συνδεδεμένη με

προβληματική λειτουργία αυτών των ενδονευρώνων (Zhou *et al.*, 2015), η οποία συνεπάγεται την αύξηση της δραστηριότητας των πυραμιδικών νευρώνων λόγω της μειωμένης αναστολής που πλέον υφίστανται, αλλά και τη διαταραχή του συγχρονισμού σε γ ρυθμική δραστηριότητα, εκτροχιάζοντας έτσι τη λειτουργία φλοιού, του υποκάμπτου καθώς και των νευρωνικών δικτύων που περιλαμβάνουν τις προαναφερθείσες (Gonzalez-Burgos *et al.*, 2015; Kokkinou *et al.*, 2020; Donato *et al.*, 2012; Knight *et al.*, 2022).

Μελέτες σε τρωκτικά (κυρίως επίμεις) που χρησιμοποιούν επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις κεταμίνης σε υπο-αναισθητικές δόσεις για την ανάπτυξη ενός πειραματικού πρότυπου σχιζοφρένειας κατά γενικό κανόνα εντοπίζουν μειώσεις της ανοσοθετικότητας των PV κυττάρων. Η ύπαρξη ωστόσο μελετών που δεν εντοπίζει αλλαγές σε φλοιικές δομές (Sabbagh *et al.*, 2003; Matuszko *et al.*, 2017; Occhiero *et al.*, 2022) ή τον υποκάμπτου (Occhiero *et al.*, 2022; Sabbagh *et al.*, 2003), υποδεικνύει ότι οι μεταβολές αυτές δε λαμβάνουν χώρα σε όλες τις περιπτώσεις. Στο πλαίσιο αυτό οι (Honeycutt and Chrobak, 2018) έδειξαν ότι η επαναλαμβανόμενη κεταμίνη μειώνει την ανοσοθετικότητα των PV κυττάρων σε πρώιμα ηλικιακά στάδια, ενώ επίμεις ηλικίας 6 μηνών δεν εμφανίζουν παρόμοια ευρήματα σε φλοιικές δομές και τα βασικά διαμερίσματα του υποκάμπτου (CA1, CA3, DG). Παράλληλα έδειξαν ότι το εύρος του διαστήματος μεταξύ της ολοκλήρωσης των χορηγήσεων κεταμίνης και της ευθανασίας του πειραματόζωου δεν επηρεάζει το πρότυπο της μείωσης των PV κυττάρων από την κεταμίνη. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγεί τις μικρές κλίμακας μειώσεις των PV κυττάρων κατόπιν κεταμίνης που παρατηρήσαμε στον PL και τη CA1 του κοιλιακού υποκάμπτου, όπου δεν είχαν αρκετή ισχύ για να εμφανίσουν στατιστική σημαντικότητα. Ειδικότερα, οι επίμεις στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο θανατώθηκαν σε ηλικία 3,5 με 4 μηνών, ενώ η πλειοψηφία των μελετών που εντοπίζουν σημαντικές αλλαγές σε όλες τις δομές αντίστοιχα χρησιμοποιούν επίμεις σε ηλικία πείπου 2,5 με 3 μηνών (Keilhoff *et al.*, 2004).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια πολύ ενδιαφέρουσα πρόσφατη μελέτη όπου εφαρμόστηκε ένα γενετικό μοντέλο σχιζοφρένειας δε μειώνεται η πυκνότητα των PV ενδονευρώνων στον παθολογικό γονότυπο (με εξαίρεση τη μείωση στο vSUB) αλλά μειώνεται δραματικά η ένταση του σήματος από συγκεκριμένο υποσύνολο του πληθυσμού τους, που είναι οι πρόσφατα γεννημένοι (BrdU+) PV ανοσοθετικοί ενδονευρώνες (Mukherjee *et al.*, 2021). Το συγκεκριμένο εύρημα σε συνδυασμό με τους υφιστάμενους περιορισμούς της μεθόδου καταμέτρησης των ανοσοϊστοχημικά σημασμένων PV+ ενδονευρώνων σε τομές ιστού, θα μπορούσε να εξηγεί την απουσία της δυνατότητας να ανιχνευτούν σημαντικές μεταβολές σε PL και vCA1 στην περίπτωση μας, καθώς είναι μικρότερης κλίμακας οι αναμενόμενες μεταβολές και πιο δύσκολο να ανιχνευθούν μιας και αντιπροσωπεύουν ένα υποσύνολο του πληθυσμού που έχει σημανθεί στην παρούσα μελέτη.

Δεδομένης ωστόσο της ορθότητας της εκτίμησης του πληθυσμού των PV+ ανοσοθετικά σημασμένων νευρώνων στη CA1 υποπεριοχή του VHIP η οποία δεν εμφάνισε σημαντικές μεταβολές, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι το συγκεκριμένο εύρημα είναι παράλληλης κατεύθυνσης με την απουσία δυσλειτουργιών στην ισορροπία E/I βάσει των LFP καταγραφών. Σε αντίθεση το vSUB εμφάνισε μειωμένο αριθμό κυττάρων ανοσοθετικών σε PV, όπως προαναφέρθηκε. Το παρόν πειραματικό εύρημα πιθανώς να υποδεικνύει ανισορροπία E/I εστιασμένη στο vSUB, η οποία δεδομένου του ρόλου της συγκεκριμένης περιοχής να έχει αρνητικό αντίκτυπο, σε θεμελιώδεις περιοχές του μεταϊχμιακού συστήματος όπως η VTA και το ραβδωτό σώμα οι οποίες εμφάνισαν μεταβολές στη ντοπαμινεργική τους λειτουργία που προσομοιάζουν εκείνες που εμφανίζονται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια.

Συγκεντρωτικά, οι εστιασμένες μειώσεις στον αριθμό των PV ανοσοθετικών κυττάρων που παρατηρήθηκαν συνδέονται με τη διαταραχή στην ισορροπία E/I, στη γλουταματεργική και ντοπαμινεργική λειτουργία και το συμπεριφορικό φαινότυπο. Οι μεταβολές αυτές λειτουργούν συμπληρωματικά στο χαρακτηρισμό του βιοφαινότυπου που εμφανίζεται μετά από επαναλαμβανόμενη κεταμίνη, συνεισφέροντας στη σύνθεση της ευρύτερης εικόνας που προκύπτει για τη δράση της και στην ευρύτερη κατανόηση των υποκείμενων

μηχανισμών. Παράλληλα, στο πλαίσιο αυτό αξιολογείται και η δράση της CBD η οποία παρουσιάζει αντισταθμιστικό ρόλο στη δράση της κεταμίνης.

5.4.8. Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού της ανοσοϊστοχημικής χρώσης CB1 υποδοχέων στα σημεία συνεντοπισμού με τις χρώσεις για το πεπτίδιο CCK8 και τον κυστιδιακό μεταφορέα vGAT:

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές ως προς το συνολικό όγκο και τη μέση ένταση φθορισμού του σήματος για τους CB1 υποδοχείς στα ανατομικά διαμερίσματα που μελετήθηκαν.

Η κεταμίνη αύξησε την επιφάνεια συνεντοπισμού των CB1 υποδοχέων με το πεπτίδιο CCK8 και τον κυστιδιακό μεταφορέα του GABA (GABA vesicular transporter, vGAT) στην περιοχή stratum pyramidae της CA1 του VHIP, όπως και σε ολόκληρο το εύρος των ληφθέντων εικόνων, οι οποίες περιείχαν τμήμα από το stratum oriens, το stratum pyramidae και το stratum radiatum. Η CBD επέδρασε ανασταλτικά στη δράση αυτή της κεταμίνης, ενώ δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή από μόνη της. Επίσης η κεταμίνη προκάλεσε μείωση της μέσης έντασης φθορισμού προερχόμενη από τη σήμανση των CB1 υποδοχέων όταν αυτοί εντοπιζόνταν αποκλειστικά σε κοινά σημεία (voxel) με τις άλλες 2 πρωτεΐνες στόχους (τριπλός συνεντοπισμός των τριών πρωτεϊνών στόχων). Η CBD εμφάνισε επίσης ανασταλτική δράση και σε αυτό το φαινόμενο.

Η CCK-8 αποτελεί ένα οκτα-πεπτίδιο που προκύπτει από πέψη της χολεκυστοκινίνης (CCK) και εκφράζεται σε ανασταλτικούς ενδονευρώνες. Σε αντίθεση με την προ-χολεκυστοκινίνη που εντοπίζεται αμιγώς στο σώμα, η CCK-8 μπορεί να εντοπιστεί σε διαφορετικά διαμερίσματα των νευρώνων, συμπεριλαμβανομένων και των προσυναπτικών απολήξεων (Früh *et al.*, 2016; Rhombert *et al.*, 2018). Παράλληλα, ο vGAT εντοπίζεται στις προσυναπτικές απολήξεις των ανασταλτικών νευρώνων. Τα σημεία που συνεντοπίζονται οι δυο αυτές πρωτεΐνες είναι οι προσυναπτικές ανασταλτικές απολήξεις των νευρώνων που εκφράζουν CCK. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στον όγκο κατανομής και την ένταση φθορισμού των CB1 υποδοχέων γενικά, αλλά μόνο όταν συνεντοπίζονται με τις CCK-8 και vGAT, τουτέστιν στις ανασταλτικές απολήξεις των CCK+ νευρώνων.

Το σημείο όπου παρατηρείται η μεγαλύτερη πυκνότητα των CB1 υποδοχέων στον εγκέφαλο είναι στους ανασταλτικούς ενδονευρώνες που εκφράζουν χολεκυστοκινίνη (CCK+), ενώ δεν απαντώνται στους ενδονευρώνες που εκφράζουν PV (Tsuji *et al.*, 1999; Katona 1999). Οι CCK+ ενδονευρώνες, όπως και οι PV+ παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του υποκάμπτου, μέσω των απολήξεων τους που σχηματίζουν ένα πυκνό πλέγμα γύρω από τα σώματα των πυραμιδικών νευρώνων παρέχοντας προεξέχοντα ανασταλτικά σήματα (Freund and Katona, 2007). Η περισματική αναστολή των πυραμιδικών νευρώνων του υποκάμπτου ρυθμίζει την ευόδωση (gain) των συναπτικών συμβάντων ενώ εκκινεί και συγχρονίζει τη ρυθμική δραστηριότητα των νευρωνικών δικτύων για τους θ και γ ρυθμούς (Skosnik *et al.*, 2016; Lupica *et al.*, 2017; Ballaz and Bourin, 2021; Dudok *et al.*, 2021). Η ψυχομμητική δράση των αγωνιστών των CB1 υποδοχέων που συνδέεται με διαταραχή των θ και γ ρυθμών είναι συσχετισμένη με τη δράση τους στις προσυναπτικές απολήξεις των CCK+ ανασταλτικών ενδονευρώνων σύμφωνα με μεγάλο πλήθος ερευνητικών δεδομένων (Sherif *et al.*, 2016; Skosnik *et al.*, 2016; Lupica *et al.*, 2017). Η λειτουργία των PV+ και των CCK+ ανασταλτικών ενδονευρώνων εμφανίζει εκ διαμέτρου αντίθετο και αλληλοσυμπληρούμενο έλεγχο στη λειτουργία των πυραμιδικών νευρώνων και κατ' επέκταση στη λειτουργία του υποκάμπτου και των δικτύων που συμμετέχει (Dudok *et al.*, 2021). Πέρα από τον έλεγχο που ασκούν οι ενδονευρώνες στα πυραμιδικά, αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους, καθώς οι PV+ λαμβάνουν ανασταλτικές απολήξεις από τους CCK+, ενώ ταυτόχρονα εκφράζουν τη MAGL και συνθέτουν 2-AG ρυθμίζοντας τη δράση των CCK+ (Lupica *et al.*, 2017).

Θα μπορούσε λοιπόν να προταθεί ότι στη σχιζοφρένεια, ή στα προκλινικά πρότυπα που την προσεγγίζουν, όπου συναντάται έκπτωση στη λειτουργία των PV+ ενδονευρώνων, η ισορροπία αυτή να διαταράσσεται οδηγώντας στην προβληματική λειτουργία των επιμέρους στοιχείων. Σε αυτό το πλαίσιο εντάσσεται η αύξηση της επιφάνειας εντοπισμού των CB1 υποδοχέων σε ανασταλτικές απολήξεις CCK+ ενδονευρώνων, μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης, καθώς και η μείωση της μέσης έντασης φθορισμού της χρώσης τους. Οι μεταβολές στα επίπεδα του CB1 πιθανώς να αντανακλούν ομοιοστατικές μεταβολές στην προσυναπτική λειτουργία των CCK+ νευρώνων αλλά και διαταραγμένης σύνθεσης 2-AG από τα PV+.

Από την άλλη η CBD περιτέλλει την αύξηση της επιφάνειας εντοπισμού των CB1 υποδοχέων στις απολήξεις των CCK+ ενδονευρώνων, γεγονός που θα μπορούσε να συνδέεται με τη δράση της ως αναστολέας της FAAH η οποία εκφράζεται επίσης στους PV+ ενδονευρώνες (Rivera *et al.*, 2014; Lurica *et al.*, 2017), η οποία θα παράτεινε τη δράση της ανανδαμίδης, έναντι της 2-AG στους CB1, προκαλώντας μεταβολές σε επίπεδο συναπτικής πλαστικότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι κλινικές μελέτες έχουν εντοπίσει αυξημένα επίπεδα 2-AG σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Giuffrida *et al.*, 2004), και μειωμένη διαθεσιμότητα CB1 υποδοχέων (Ranganathan *et al.*, 2016). Επιπλέον η αντιψυχωσική δράση της CBD σε ασθενείς είναι θετικά συσχετισμένη με τα επίπεδα της ανανδαμίδης στο αίμα των ασθενών (Leweke *et al.*, 2012).

Οι μεταβολές που προκαλεί η κεταμίνη στους CB1 υποδοχείς των ανασταλτικών απολήξεων των CCK+ ενδονευρώνων στον ιππόκαμπο μπορούν να συσχετιστούν με τη διαταραχή της αλληλεπίδρασης των ενδονευρώνων που ασκούν περισωματικό έλεγχο στους πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου επηρεάζοντας τη ρυθμική τους δραστηριότητα. Η χορήγηση CBD εμφανίζει αντισταθμιστική δράση η οποία ενδέχεται να συνδέεται με τη δράση της ως αναστολέας της FAAH, η οποία βιβλιογραφικά είναι συνδεδεμένη με την αντιψυχωτική της δράση. Με αυτό τον τρόπο η CBD πιθανώς εξισορροπεί με ρυθμιστικό τρόπο, τη σύνθετη δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδονευρώνων αλλά και της συνολικότερης περισωματικής αναστολής στους πυραμιδικούς νευρώνες και κατ' επέκταση επιτυγχάνει ύφεση της διαταραγμένης ρυθμικής δραστηριότητας σε τοπικό επίπεδο ανά εγκεφαλική περιοχή.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επίδραση της **οξείας χορήγησης CBD** στο πρότυπο της **οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης** δεν επέφερε καθολική αναστροφή των συμπεριφορικών προσεγγίσεων οι οποίες αντανάκλουν ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογία. Ειδικότερα, η οξεία χορήγηση CBD εμφάνισε ήπια ανασχετική επίδραση ως προς την υπερκινητικότητα που προκαλεί η d-αμφεταμίνη κατά την υψηλότερη δόση και μερική επαναφορά της αισθητικοκινητικής διαταραχής. Η οξεία χορήγηση CBD *per se* διατάραξε τη λειτουργία του αισθητικοκινητικού ηθμού, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η χρόνια χορήγηση CBD εμφανίζει ανασχετική δράση στο προκλινικό πρότυπο υπερευασθητοποίησης και υπεραποκρισιμότητας κατόπιν ντοπαμινεργικής διέγερσης λόγω επαναλαμβανόμενων σταδιακά αυξανόμενων δόσεων d-αμφεταμίνης. Πιο συγκεκριμένα, όταν η CBD χορηγείται χρονίως, εμφανίζει ανασχετικές ιδιότητες ως προς το συμπεριφορικό προφίλ της αμφεταμίνης. Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση d-αμφεταμίνης προκάλεσε μεταβολές στη ντοπαμινεργική λειτουργία με έμφαση σε υποδιαίρεσεις του ραβδωτού σώματος, στις οποίες επέδρασε ανασχετικά η χρόνια χορήγηση κανναβιδιόλης.

Η οξεία χορήγηση CBD δεν ανέστειλε παρά τροποποίησε την υπερκινητικότητα και τις συνοδευόμενες μεταβολές της ντοπαμινεργικής λειτουργίες που παρατηρούνται κατά την οξεία χορήγηση κεταμίνης, πιθανώς λόγω φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών αλληλεπιδράσεων. Κατά αντιστοιχία των ευρημάτων στο πρότυπο της οξείας αμφεταμίνης, και εδώ η CBD *per se* διατάραξε τη λειτουργία του αισθητικοκινητικού ηθμού, ενώ παράλληλα εμφάνισε μικρή ανασχετική επίδραση κατά τη συγχορήγησης της με την κεταμίνη. Σχετικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων υπομονάδων των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού, η CBD εμφανίζει αντιροπιστική επίδραση ως προς τις δράσεις της κεταμίνης. Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης απέδωσε ένα συμπεριφορικό προφίλ που αντανάκλα παραμέτρους θετικής, αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας και υποδεικνύει διατάραξη της αισθητικοκινητικής λειτουργίας. Η χορήγηση CBD εμφάνισε ανασχετική επίδραση ως προς τις υπό μελέτη παραμέτρους, με εξαίρεση τη διαταραγμένη αισθητικοκινητική λειτουργία, όπου η ανασχετική της δράση ήταν πολύ ήπια. Η χορήγηση CBD εμφάνισε ανασχετική δράση ως προς τη μείωση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας στον PFC και την αύξηση της βιοσύνθεσης της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα.

Αντίστοιχα ως προς τη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση, η κεταμίνη αύξησε το ρυθμό κύκλισης του γλουταμικού στον PFC, ενώ προκάλεσε μείωση του στο DMS, ενώ η CBD εμφάνισε ανασχετική δράση ως προς τις μεταβολές αυτές.

Η κεταμίνη προκάλεσε μεταβολές στη σύνθεση των επιμέρους υπομονάδων των NMDA και AMPA υποδοχέων σε PFC και NAc, τις οποίες ανέστειλε η CBD μόνο στο PFC. Παράλληλα καθοδικοί σηματοδοτικοί τελεστές (ERK1/2) εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης σε PFC και το ραβδωτό σώμα, με τη CBD να εμφανίζει ανασταλτική δράση μόνο στο ραβδωτό σώμα.

Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης προκάλεσε μείωση της φασματικής πυκνότητας ισχύος για τα εύρη συχνοτήτων θ , β και χαμηλών γ στον PFC ενώ η CBD είχε ανασχετική δράση στις μεταβολές που προκάλεσε η κεταμίνη. Αντίθετα, στο DMS η κεταμίνη προκάλεσε αύξηση της φασματικής πυκνότητας ισχύος για θ , β και χαμηλές γ , οι οποίες δεν παρατηρήθηκαν παρουσία CBD.

Η κεταμίνη μείωσε τον αριθμό των ανοσοθετικών σε PV νευρώνων στον ACC και στο vSUB, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση CBD.

Η κεταμίνη αύξησε την επιφάνεια συνεντοπισμού των CB1 υποδοχέων στις προσυναπτικές ανασταλτικές απολήξεις των CCK+ ενδονευρώνων στη CA1 του VHIP, ενώ εμφάνισε μειωμένη μέση ένταση φθορισμού στις

σημεία συνεντοπισμού. Η CBD επέδρασε ανασταλτικά στη δράση αυτή της κεταμίνης, ενώ δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή από μόνη της.

Συνολικά, η CBD εμφάνισε ήπια δράση κατά την εφαρμογή οξείων προτύπων χορήγησης ψυχομιμητικών ουσιών. Σε συγκεκριμένες παραμέτρους η CBD φαίνεται να ενισχύει τις συμπεριφορικές επιδράσεις, ενώ λειτούργησε αντιρροπιστικά στις υποκείμενες μεταβολές που σχετίζονται με το νευροβιολογικό υπόστρωμα της νόσου.

Η χρόνια CBD τόσο στην επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης, όσο και στην υπερευασθητοποίηση από αμφεταμίνη ανέστρεψε το βιο-φαινότυπο που αναπτύχθηκε γεγονός που υποστηρίζει τις αντιψυχωσικές ιδιότητες του συγκεκριμένου κανναβινοειδούς.

Η χρόνια ΚΕΤ προκάλεσε ένα συγκεκριμένο βιοφαινότυπο που χαρακτηρίζεται από συμπεριφορικές μεταβολές που αντανακλούν ένα ευρύ φάσμα συμπτωματολογίας και μεταβολές σε επίπεδο μικροπεριβάλλοντος κυρίως του φλοιού του ιπποκάμπου και του ραβδωτού σώματος.

Η επίδραση της CBD αποτυπώνεται σε διαφορετικά επίπεδα νευροβιολογικών μηχανισμών που σχετίζονται με την εμφάνιση του φαινοτύπου που προσομοιάζει όλο το εύρος της ψυχωσικής συμπτωματολογίας. Οι επιδράσεις της CBD είναι εμφανείς από το επίπεδο του τοπικού μικροκυκλώματος στον ιππόκαμπο που σχετίζεται με τη συντονισμένη δραστηριότητα των πυραμιδικών κυττάρων, μέχρι και την μακροσκοπική εκτίμηση της ρυθμικής δραστηριότητας του εγκεφάλου σε περιοχές που υποστηρίζονται από τη γλουταματεργική λειτουργία και ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης και μεσολαβούν την εμφάνιση της συμπτωματολογίας.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σχιζοφρένεια αποτελεί μια πολύ σοβαρή ψυχιατρική νόσο με υψηλό επιπολασμό και έλλειψη ικανοποιητικών φαρμακευτικών παρεμβάσεων, γεγονός που καθιστά έντονη την ανάγκη ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών προσεγγίσεων. Το μεγαλύτερο εμπόδιο σε αυτή την προσπάθεια αποτελεί η ελλιπής κατανόηση του παθοφυσιολογικού της υποστρώματος και η απουσία έγκυρων πειραματικών μοντέλων από πλευράς φαινομενολογικής ομοιότητας και προβλεπτικής ισχύος. Παράλληλα, η κανναβιδιόλη (CBD), το κύριο μη εθιστικό συστατικό της κάνναβης, εμφανίζει θετικά αποτελέσματα σε κλινικές μελέτες ως προς τις αντιψυχωτικές της ιδιότητες, με τα πειραματικά ευρήματα ωστόσο να είναι ασαφή και χωρίς να προτείνουν κάποιο μηχανισμό δράσης. Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην αξιολόγηση της αντιψυχωσικής δράσης της κανναβιδιόλης σε προκλινικά πρότυπα ψύχωσης που προσομοιάζουν τη δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού και του γλουταματεργικού συστήματος μέσω της χορήγησης d-αμφεταμίνης και κεταμίνης αντίστοιχα σε επίμυες.

Η επίδραση της CBD στο πρότυπο της οξείας χορήγησης d-αμφεταμίνης δεν επέφερε καθολική αναστροφή της υπερκινητικότητας και της αναστολής προ-παλμού οι οποίες αντανakλούν ψυχωτικού τύπου συμπτωματολογία. Στο προκλινικό πρότυπο υπερευαθητοποίησης μέσω επαναλαμβανόμενων σταδιακά αυξανόμενων δόσεων d-αμφεταμίνης, το οποίο προκαλεί την εγκατάσταση ενός βιο-φαινοτύπου που προσομοιάζει τη θετική συμπτωματολογία στη σχιζοφρένεια, η CBD εμφάνισε ανασχετική δράση ως προς την απόκριση στην αμφεταμίνη στο ανοικτό πεδίο, την αναστολή προ-παλμού, αλλά και τις μεταβολές της ντοπαμινεργικής λειτουργίας σε συγκεκριμένες ανατομικές υποδιαιρέσεις του ραβδωτού σώματος.

Η οξεία χορήγηση υπο-αναισθητικής κεταμίνης που προσομοιάζει τη δυσλειτουργία των NMDA υποδοχέων στις ψυχώσεις προκάλεσε υπερκινητικότητα την οποία η CBD δεν αναχαίτισε, αλλά αντιθέτως διεύρυνε χρονικά, ενώ φαίνεται πως αντίστοιχα διεύρυνε και την αυξημένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα στον επικλινή πυρήνα που αναμένεται από την κεταμίνη.

Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση κεταμίνης έχει χρησιμοποιηθεί ως μια προκλινική προσέγγιση που εγκαθιστά έναν βιο-φαινότυπο που προσομοιάζει τη θετική, αρνητική και γνωστική συμπτωματολογία. Στην παρούσα μελέτη τα δεδομένα αυτά προεκτείνονται καθώς εντοπίστηκε μείωση της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC) με ταυτόχρονη αύξηση της βιοσύνθεσης στο έσω ραχιαίο ραβδωτό (DMS). Η γλουταματεργική νευροδιαβίβαση υπέστη μεταβολές σε ανάλογο μοτίβο με αύξηση στο ρυθμό κύκλισης του γλουταμικού στον PFC, και μείωση του στο DMS. Αυτή η αντίρροπη μεταβολή μεταξύ των δυο αυτών δομών μεταφράζεται και σε επίπεδο ανισορροπίας διέγερσης/αναστολής (Δ/Α) για τις φασματικές πυκνότητες ισχύος στις συχνότητες θ, β και γ ρυθμών, ενώ η συνοχή μεταξύ PFC και κοιλιακού ιπποκάμπου ή PFC και DMS δεν εμφάνισε σημαντικές παρεκκλίσεις. Η ισορροπία Δ/Α υφίσταται ρύθμιση από τους ενδονευρώνες που είναι ανοσοθετικοί στην παρβαλβουμίνη (PV) και τη χολεκυστοκινίνη (CCK), οι οποίοι εμφανίστηκαν με μειωμένη πυκνότητα ή αυξημένη επιφάνεια κατανομής των CB1 υποδοχέων στις απολήξεις τους αντίστοιχα.

Η CBD εμφάνισε ανασχετική δράση σε όλους τους δείκτες θετικής αρνητικής και γνωστικής συμπτωματολογίας, ολική επαναφορά στις μεταβολές της ντοπαμινεργικής και γλουταματεργικής δραστηριότητας και ισορροπίας Δ/Α στον PFC, αλλά είχε πιο ήπια επίδραση στις αντίρροπες παρεκκλίσεις που παρατηρήθηκαν στο DMS. Επιπρόσθετα, εμφάνισε και ανασχετική δράση στις μεταβολές που αφορούν τους ενδονευρώνες PV και CCK, προτείνοντας ότι η αντιψυχωτική της δράση σε συμπεριφορικό επίπεδο συνδέεται με πολυεπίπεδη επίδραση στους υποκείμενους νευροβιολογικούς μηχανισμούς, ξεκινώντας από

τη λειτουργία τοπικών μικροδικτύων και τον έλεγχο της ρυθμικής δραστηριότητας δομών που εμπλέκονται κεντρικά στο νευροβιολογικό υπόστρωμα της νόσου και επεκτείνεται στην ευρύτερη γλουταματεργική και γλουταματεργική λειτουργία, δρώντας εύρωστα στον PFC αλλά πιο ήπια στο ραβδωτό.

Συνολικά τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προτείνουν ότι η CBD δεν εμφανίζει ικανοποιητικές αντιψυχωτικές ιδιότητες όταν μελετάται σε πειραματικές προσεγγίσεις της ψύχωσης κατόπιν οξείας χορήγησης ψυχομιμητικών, έχει ωστόσο πολύ-επίπεδη δράση όταν μελετάται σε εγκατεστημένους βιοφαινότυπους που προσομοιάζουν ψυχο-παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που απαντώνται στη σχιζοφρένεια.

8. SUMMARY

“The role of cannabinoids in animal models of psychosis. Emphasizing on Cannabidiol”

Charalampos Brakatselos, Biologist

Schizophrenia is a debilitating mental disorder with a high lifetime prevalence that cannot be adequately addressed by current pharmacological approaches. The development of novel therapeutic approaches is constantly challenged by the elusive understanding of the pathophysiological mechanisms and the lack of preclinical models that display construct and predictive validity. Clinical studies provide promising data regarding the antipsychotic potential of cannabidiol (CBD), the major non-addictive component of *Cannabis sativa*. However, preclinical studies display considerable inconsistencies in this regard, while there is a lack of prominent mechanistic explanations for CBD's antipsychotic action.

The objective of this dissertation lays on the evaluation of CBD's antipsychotic action using preclinical models that mimic the dysfunction in the dopaminergic and the glutamatergic system by administering d-amphetamine and ketamine respectively, to rats.

CBD did not counteract the hyperlocomotion and sensorimotor deficits that acute d-amphetamine elicited, which resemble psychotic symptomatology. However, following amphetamine sensitization which is considered a schizophrenia-related bio-phenotype reflecting aspects of positive symptomatology, CBD was able to mitigate the exaggerated response to acute d-amphetamine, ameliorate the sensorimotor gating dysfunction, while modulating the underlying deviations of dopaminergic function in the ventral striatum.

Acute subanesthetic ketamine treatment, used to mimic NMDA receptor dysfunction in schizophrenia, induced transient hyperlocomotion. CBD prolonged this effect to a broader time frame and also resulted in a sustained increase in dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens.

Repeated ketamine administration has been used as a preclinical model that resembles positive, negative, and cognitive symptomatology in schizophrenia. Additional to this behavioral phenotype, we have observed a dampened dopaminergic neurotransmission in the prefrontal cortex (PFC) and elevated biosynthesis rate in the dorsomedial striatum (DMS). Glutamatergic status was also altered, with increased glutamate cycling rate in the PFC and decreased rate in the DMS. This opposite fashion of alterations was also profound in the of excitation:inhibition (E:I) imbalance, which was observed as power spectrum densities. However, the coherence between PFC and the ventral hippocampus, as well as the PFC and DMS did not display major effects of ketamine. The E:I imbalance could be attributed to the reduced density of parvalbumin-immunoreactive interneurons observed, or the increase of cannabinoid receptor in the perisomatic terminals of cholecystinin expressing interneurons, since these two interneuron subtypes play a central role on tuning brain rhythmic activity.

CBD attenuated positive, negative, cognitive symptomatology examined, reversed the deviations of dopaminergic and glutamatergic neurotransmission, and restored the E:I balance in the PFC, while displayed subtle mitigatory action for the corresponding ketamine-induced effects on the DMS. Additionally, CBD attenuated ketamine effects on parvalbumin- and cholecystinin-immunoreactive interneurons, suggesting

that its behavioral antipsychotic effects are connected to a multi-level action in the underlying neurobiological mechanisms, stretching from the local micro-circuit function and the regulation of E:I balance to the glutamatergic and dopaminergic neurotransmission, presenting more robust effects on the PFC rather than the striatum.

Overall, our data support that CBD is not displaying a robust antipsychotic action on psychosis-related pathological manifestations induced by acute administration of psychotomimetic drugs. However, it exhibits a broad range of modulatory actions on the neurobiological underpinnings of positive, negative, and cognitive symptomatology, when studied using established bio-phenotypes that resemble schizophrenia-related pathologies.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdallah CG, De Feyter HM, Averill LA, Jiang L, Averill CL, Chowdhury GMI, Purohit P, de Graaf RA, Esterlis I, Juchem C, Pittman BP, Krystal JH, Rothman DL, Sanacora G, and Mason GF (2018) The effects of ketamine on prefrontal glutamate neurotransmission in healthy and depressed subjects. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **43**:2154–2160.
- Abram S V, Roach BJ, Fryer SL, Calhoun VD, Preda A, van Erp TGM, Bustillo JR, Lim KO, Loewy RL, Stuart BK, Krystal JH, Ford JM, and Mathalon DH (2022) Validation of ketamine as a pharmacological model of thalamic dysconnectivity across the illness course of schizophrenia. *Mol Psychiatry* **27**:2448–2456.
- Ahnaou A, Huysmans H, Biermans R, Manyakov N V., and Drinkenburg WHIM (2017) Ketamine: differential neurophysiological dynamics in functional networks in the rat brain. *Transl Psychiatry* **7**:e1237, Nature Publishing Group.
- Aleman A, Lincoln TM, Bruggeman R, Melle I, Arends J, Arango C, and Knegtering H (2017) Treatment of negative symptoms: Where do we stand, and where do we go? *Schizophr Res* **186**:55–62.
- Alger BE (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: Focus on endocannabinoids.
- Antoniou K, Kafetzopoulos E, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, and Marselos M (1998) D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci Biobehav Rev* **23**:189–196, United States.
- Antoniou K, Papathanasiou G, Panagis G, Nomikos GG, Hyphantis T, and Papadopoulou-Daifoti Z (2004) Individual responses to novelty predict qualitative differences in d-amphetamine-induced open field but not reward-related behaviors in rats. *Neuroscience* **123**:613–623, United States.
- Aroni F, Iacovidou N, Dontas I, Pourzitaki C, and Xanthos T (2009) Pharmacological aspects and potential new clinical applications of ketamine: Reevaluation of an old drug.
- Ash ES, Heal DJ, and Clare Stanford S (2014) Contrasting changes in extracellular dopamine and glutamate along the rostrocaudal axis of the anterior cingulate cortex of the rat following an acute d-amphetamine or dopamine challenge. *Neuropharmacology* **87**:180–187.
- Baik JH (2013) Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits* **7**:1–16.
- Ballaz SJ, and Bourin M (2021) Cholecystokinin-Mediated Neuromodulation of Anxiety and Schizophrenia: A “Dimmer-Switch” Hypothesis. *Curr Neuropharmacol* **19**:925–938, United Arab Emirates.
- Barr JL, Bray B, and Forster GL (2017) The Hippocampus as a Neural Link between Negative Affect and Vulnerability for Psychostimulant Relapse, in (Stuchlik A ed) p Ch. 6, IntechOpen, Rijeka.
- Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G, and Grecksch G (2003) Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*, doi: 10.1016/S0278-5846(03)00080-0.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, and Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, doi: 10.1016/S0006-3223(99)00230-9.
- Bernstein H-G, Becker A, Keilhoff G, Spilker C, Gorczyca WA, Braunewell K-H, and Grecksch G (2003) Brain region-specific changes in the expression of calcium sensor proteins after repeated applications of ketamine to rats. *Neurosci Lett* **339**:95–98, Ireland.
- Bian XL, Qin C, Cai CY, Zhou Y, Tao Y, Lin YH, Wu HY, Chang L, Luo CX, and Zhu DY (2021) Anterior cingulate cortex to ventral hippocampus circuit mediates contextual fear generalization. *J Neurosci* **39**:5728–5739.

- Bisogno T, Hanuš L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, and Di Marzo V (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* **134**:845–852, John Wiley and Sons Inc.
- Boekhoudt L, Omrani A, Luijendijk MCM, Wolterink-Donselaar IG, Wijbrans EC, van der Plasse G, and Adan RAH (2016) Chemogenetic activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area, but not substantia nigra, induces hyperactivity in rats. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol* **26**:1784–1793, Netherlands.
- Brakatselos C, Delis F, Asprogerakas MZ, Lekkas P, Tseti I, Tzimas PS, Petrakis EA, Halabalaki M, Skaltsounis LA, and Antoniou K (2021) Cannabidiol Modulates the Motor Profile and NMDA Receptor-related Alterations Induced by Ketamine. *Neuroscience*, doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.09.029.
- Burke AR, and Miczek KA (2014) Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis., Springer, Burke, Andrew R.: Department of Psychology, Tufts University, 530 Boston Avenue, Medford, MA, US, 02155, Andrew.Burke@tufts.edu.
- Burton AC, Nakamura K, and Roesch MR (2015) From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiol Learn Mem* **117**:51–59, United States.
- Bushlin I, Gupta A, Stockton SDJ, Miller LK, and Devi LA (2012) Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLoS One* **7**:e49789, United States.
- Bygrave AM, Kilonzo K, Kullmann DM, Bannerman DM, and Kätzel D (2019) Can N-Methyl-D-Aspartate Receptor Hypofunction in Schizophrenia Be Localized to an Individual Cell Type? *Front Psychiatry* **10**:1–23.
- Bygrave AM, Masiulis S, Nicholson E, Berkemann M, Barkus C, Sprengel R, Harrison PJ, Kullmann DM, Bannerman DM, and Kätzel D (2016) Knockout of NMDA-receptors from parvalbumin interneurons sensitizes to schizophrenia-related deficits induced by MK-801. *Transl Psychiatry* **6**:e778.
- Cadinu D, Grayson B, Podda G, Harte MK, Doostdar N, and Neill JC (2018) NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update. *Neuropharmacology* **142**:41–62, England.
- Campos AC, and Guimarães FS (2009) Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **33**:1517–1521, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.
- Cass DK, Flores-Barrera E, Thomases DR, Vital WF, Caballero A, and Tseng KY (2014) CB1 cannabinoid receptor stimulation during adolescence impairs the maturation of GABA function in the adult rat prefrontal cortex. *Mol Psychiatry* **19**:536–543, England.
- Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, and Hashimoto Y (2012) Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron* **76**:70–81.
- Chalkiadaki K, Velli A, Kyriazidis E, Stavroulaki V, Vouvoutsis V, Chatzaki E, Aivaliotis M, and Sidiropoulou K (2019) Development of the MAM model of schizophrenia in mice: Sex similarities and differences of hippocampal and prefrontal cortical function. *Neuropharmacology* **144**:193–207, Elsevier Ltd.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, and Huang ZJ (2004) Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **24**:9598–9611.
- Chen JL, Lin WC, Cha JW, So PT, Kubota Y, and Nedivi E (2011) Structural basis for the role of inhibition in

facilitating adult brain plasticity. *Nat Neurosci* **14**:587–594.

- Chen WS, and Bear MF (2007) Activity-dependent regulation of NR2B translation contributes to metaplasticity in mouse visual cortex. *Neuropharmacology* **52**:200–214, England.
- Cilia J, Hatcher P, Reavill C, and Jones DNC (2007) (+/-) Ketamine-induced prepulse inhibition deficits of an acoustic startle response in rats are not reversed by antipsychotics. *J Psychopharmacol* **21**:302–311, United States.
- Cohen SM, Tsien RW, Goff DC, and Halassa MM (2015) The impact of NMDA receptor hypofunction on GABAergic neurons in the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophr Res* **167**:98–107.
- Corssen G, and Domino EF (1966) Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581. *Anesth Analg*, doi: 10.1213/0000539-196601000-00007.
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, and Buzsáki G (2003) Mechanisms of Gamma Oscillations in the Hippocampus of the Behaving Rat. *Neuron* **37**:311–322.
- Davidson M, Galderisi S, Weiser M, Werbeloff N, Fleischhacker WW, Keefe RS, Boter H, Keet IPM, Prelipceanu D, Rybakowski JK, Libiger J, Hummer M, Dollfus S, López-Ibor JJ, Hranov LG, Gaebel W, Peuskens J, Lindefors N, Riecher-Rössler A, and Kahn RS (2009) Cognitive Effects of Antipsychotic Drugs in First-Episode Schizophrenia and Schizophreniform Disorder: A Randomized, Open-Label Clinical Trial (EUFEST). *Am J Psychiatry* **166**:675–682, American Psychiatric Publishing.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, and Davidson M (1991) Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* **148**:1474–1486, United States.
- De Felice M, Chen C, Rodríguez-Ruiz M, Szkudlarek HJ, Lam M, Sert S, Whitehead SN, Yeung KKC, Rushlow WJ, and Laviolette SR (2022) Adolescent Δ -9-tetrahydrocannabinol exposure induces differential acute and long-term neuronal and molecular disturbances in dorsal vs. ventral hippocampal subregions. *Neuropsychopharmacology*, doi: 10.1038/s41386-022-01496-x, Springer US.
- De Petrocellis L, Cascio MG, and Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: A general view and latest additions.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, and Di Marzo V (2011) Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol* **163**:1479–1494.
- DeFelipe J, and Fariñas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* **39**:563–607, England.
- Deiana S, Watanabe A, Yamasaki Y, Amada N, Kikuchi T, Stott C, and Riedel G (2015) MK-801-induced deficits in social recognition in rats: reversal by aripiprazole, but not olanzapine, risperidone, or cannabidiol. *Behav Pharmacol* **26**:748–765, England.
- DELAY J, DENIKER P, HARL, and GRASSET A (1952) [N-dimethylamino-propylchlorophenothiazine (4560 RP) therapy of confusional states]. *Ann Med Psychol (Paris)* **110**:398–403, France.
- Delis F, Polissidis A, Poulia N, Justinova Z, Nomikos GG, Goldberg SR, and Antoniou K (2017) Attenuation of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference and Motor Activity via Cannabinoid CB2 Receptor Agonism and CB1 Receptor Antagonism in Rats. *Int J Neuropsychopharmacol* **20**:269–278, England.
- Domino E (2010) Taming the ketamine tiger. 1965.o Title. *Anesthesiology*.
- Dudok B, Klein PM, Hwaun E, Lee BR, Yao Z, Fong O, Bowler JC, Terada S, Sparks FT, Szabo GG, Farrell JS, Berg J, Daigle TL, Tasic B, Dimidschstein J, Fishell G, Losonczy A, Zeng H, and Soltesz I (2021) Alternating

sources of perisomatic inhibition during behavior. *Neuron* **109**:997-1012.e9.

- Ebert B, Mikkelsen S, Thorkildsen C, and Borgbjerg FM (1997) Norketamine, the main metabolite of ketamine, is a non-competitive NMDA receptor antagonist in the rat cortex and spinal cord. *Eur J Pharmacol* **333**:99–104, Netherlands.
- Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du JH, Zhang L, Manji HK, and Chen G (2003) The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci* **23**:7311–7316.
- El-Gaamouch F, Buisson A, Moustié O, Lemieux M, Labrecque S, Bontempi B, De Koninck P, and Nicole O (2012) Interaction between α CaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity. *J Neurosci* **32**:10767–10779.
- Elsaid S, Kloiber S, and Le Foll B (2019) *Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings*, 1st ed., Elsevier Inc.
- Ennaceur A, and Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* **31**:47–59, Netherlands.
- Fadda P, Robinson L, Fratta W, Pertwee RG, and Riedel G (2006) Scopolamine and MK801-induced working memory deficits in rats are not reversed by CBD-rich cannabis extracts. *Behav Brain Res* **168**:307–311, Netherlands.
- Featherstone RE, Rizos Z, Kapur S, and Fletcher PJ (2008) A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. *Behav Brain Res* **189**:170–179, Netherlands.
- Ferré S, Lluís C, Justinova Z, Quiroz C, Orru M, Navarro G, Canela EI, Franco R, and Goldberg SR (2010) Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *Br J Pharmacol* **160**:443–453, England.
- Fino E, Vandecasteele M, Perez S, Saudou F, and Venance L (2018) Region-specific and state-dependent action of striatal GABAergic interneurons. *Nat Commun* **9**:3339, England.
- Fischer-Barnicol D, Lanquillon S, Haen E, Zöfel P, Koch HJ, Dose M, and Klein HE (2008) Typical and Atypical Antipsychotics – The Misleading Dichotomy. *Neuropsychobiology* **57**:80–87.
- Fray PJ, Sahakian BJ, Robbins TW, Koob GF, and Iversen SD (1980) An observational method for quantifying the behavioural effects of dopamine agonists: contrasting effects of d-amphetamine and apomorphine. *Psychopharmacology (Berl)* **69**:253–259, Germany.
- French ED, Dillon K, and Wu X (1997) Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* **8**:649–652, England.
- Freund TF, and Katona I (2007) Perisomatic inhibition. *Neuron* **56**:33–42, United States.
- Frohlich J, and Van Horn JD (2014) Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol* **28**:287–302.
- Früh S, Romanos J, Panzanelli P, Bürgisser D, Tyagarajan SK, Campbell KP, Santello M, and Fritschy J-M (2016) Neuronal Dystroglycan Is Necessary for Formation and Maintenance of Functional CCK-Positive Basket Cell Terminals on Pyramidal Cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **36**:10296–10313, United States.
- Fu L, Tang R, Bao N, Wang J, and Ma H (2011) Ketamine and propofol in combination induce neuroapoptosis and down-regulate the expression of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor NR2B subunit in rat forebrain culture. *Pharmazie* **66**:771–776, Germany.
- Fujikawa R, Yamada J, and Jinno S (2021) Subclass imbalance of parvalbumin-expressing GABAergic neurons

in the hippocampus of a mouse ketamine model for schizophrenia, with reference to perineuronal nets. *Schizophr Res* **229**:80–93, Elsevier B.V.

- Fusar-Poli P, Howes OD, Allen P, Broome M, Valli I, Asselin M-C, Grasby PM, and McGuire PK (2010) Abnormal Frontostriatal Interactions in People With Prodromal Signs of Psychosis: A Multimodal Imaging Study. *Arch Gen Psychiatry* **67**:683–691.
- Fusar-Poli P, Papanastasiou E, Stahl D, Rocchetti M, Carpenter W, Shergill S, and McGuire P (2015) Treatments of Negative Symptoms in Schizophrenia: Meta-Analysis of 168 Randomized Placebo-Controlled Trials. *Schizophr Bull* **41**:892–899.
- G DC, and Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci* **85**:5274–5278, Proceedings of the National Academy of Sciences.
- Galanopoulos A, Polissidis A, Georgiadou G, Papadopoulou-Daifoti Z, Nomikos GG, Pitsikas N, and Antoniou K (2014) WIN55,212-2 impairs non-associative recognition and spatial memory in rats via CB1 receptor stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* **124**:58–66, Elsevier Inc.
- Gao R (2016) Interpreting the electrophysiological power spectrum. *J Neurophysiol* **115**:628–630.
- Gaston TE, Bebin EM, Cutter GR, Liu Y, and Szaflarski JP (2017) Interactions between cannabidiol and commonly used antiepileptic drugs. *Epilepsia* **58**:1586–1592.
- Gatica RI, Aguilar-Rivera MÍ, Azocar VH, and Fuentealba JA (2020) Individual Differences in Amphetamine Locomotor Sensitization are Accompanied with Changes in Dopamine Release and Firing Pattern in the Dorsolateral Striatum of Rats. *Neuroscience* **427**:116–126.
- George SR, Watanabe M, Di Paolo T, Falardeau P, Labrie F, and Seeman P (1985) The functional state of the dopamine receptor in the anterior pituitary is in the high affinity form. *Endocrinology* **117**:690–697, United States.
- Georgiadou G, Grivas V, Tarantilis PA, and Pitsikas N (2014) Crocins, the active constituents of *Crocus Sativus* L., counteracted ketamine-induced behavioural deficits in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **231**:717–726, Germany.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, and Swerdlow NR (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* **156**:117–154, Germany.
- Geyer Mark A, Olivier B, Joëls M, and Kahn RS (2012) From antipsychotic to anti-schizophrenia drugs: role of animal models. , doi: 10.1016/j.tips.2012.06.006.
- Geyer Mark A., Olivier B, Joëls M, and Kahn RS (2012) From antipsychotic to anti-schizophrenia drugs: Role of animal models. *Trends Pharmacol Sci* **33**:515–521.
- Giakoumaki SG (2012) Cognitive and Prepulse Inhibition Deficits in Psychometrically High Schizotypal Subjects in the General Population: Relevance to Schizophrenia Research. *J Int Neuropsychol Soc* **18**:643–656, Cambridge University Press.
- GIBBS FA (1951) ICTAL AND NON-ICTAL PSYCHIATRIC DISORDERS IN TEMPORAL LOBE EPILEPSY. *J Nerv Ment Dis* **113**.
- Gittis AH, and Yttri EA (2018) Translating Insights From Optogenetics To Therapies For Parkinson’s Disease. *Curr Opin Biomed Eng* **8**:14–19, England.
- Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, Klosterkötter J, and Piomelli D (2004) Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with

psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **29**:2108–2114, England.

- Gogos JA, Crabtree G, and Diamantopoulou A (2020) The abiding relevance of mouse models of rare mutations to psychiatric neuroscience and therapeutics. *Schizophr Res* **217**:37–51, Elsevier B.V.
- Gomes F V., Issy AC, Ferreira FR, Viveros MP, Del Bel EA, and Guimaraes FS (2015) Cannabidiol attenuates sensorimotor gating disruption and molecular changes induced by chronic antagonism of NMDA receptors in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol* **18**:1–10.
- Gomes F V., Llorente R, Del Bel EA, Viveros MP, López-Gallardo M, and Guimarães FS (2015) Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. *Schizophr Res* **164**:155–163, Elsevier.
- Gomes F V, Issy AC, Ferreira FR, Viveros M-P, Del Bel EA, and Guimarães FS (2014) Cannabidiol attenuates sensorimotor gating disruption and molecular changes induced by chronic antagonism of NMDA receptors in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* **18**.
- Gonzalez-Burgos G, Fish KN, and Lewis DA (2011) GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural Plast* **2011**.
- Goonawardena A V, Riedel G, and Hampson RE (2011) Cannabinoids alter spontaneous firing, bursting, and cell synchrony of hippocampal principal cells. *Hippocampus* **21**:520–531, John Wiley & Sons, Ltd.
- Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, and Yamamoto S (1998) Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett* **422**:69–73, England.
- Goulart BK, de Lima MNM, de Farias CB, Reolon GK, Almeida VR, Quevedo J, Kapczinski F, Schröder N, and Roesler R (2010) Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* **167**:969–973.
- Gould TD, Zanos P, and Zarate CA (2017) Ketamine Mechanism of Action: Separating the Wheat from the Chaff.
- Grace AA (2016) Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat Rev Neurosci* **17**:524–532.
- Graham FK (1975) The More or Less Startling Effects of Weak Prestimulation. *Psychophysiology* **12**:238–248, John Wiley & Sons, Ltd.
- Gu X, Wu X, Liu Y, Cui S, and Ma Z (2009) Tyrosine phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor 2B subunit in spinal cord contributes to remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia: the preventive effect of ketamine. *Mol Pain* **5**:76.
- Guillen J (2012) FELASA guidelines and recommendations.
- Gururajan A, Taylor DA, and Malone DT (2012) Cannabidiol and clozapine reverse MK-801-induced deficits in social interaction and hyperactivity in Sprague-Dawley rats. *J Psychopharmacol* **26**:1317–1332.
- Gururajan A, Taylor DA, and Malone DT (2011) Effect of cannabidiol in a MK-801-rodent model of aspects of schizophrenia. *Behav Brain Res* **222**:299–308, Netherlands.
- Hajós M, Hoffmann WE, and Kocsis B (2008) Activation of Cannabinoid-1 Receptors Disrupts Sensory Gating and Neuronal Oscillation: Relevance to Schizophrenia. *Biol Psychiatry* **63**:1075–1083.
- Hall M-H, Jensen JE, Du F, Smoller JW, O'Connor L, Spencer KM, and Öngür D (2015) Frontal P3 event-related potential is related to brain glutamine/glutamate ratio measured in vivo. *Neuroimage* **111**:186–191, United States.

- Hallak JEC, Dursun SM, Bosi DC, de Macedo LRH, Machado-de-Sousa JP, Abrão J, Crippa JAS, McGuire P, Krystal JH, Baker GB, and Zuardi AW (2011) The interplay of cannabinoid and NMDA glutamate receptor systems in humans: Preliminary evidence of interactive effects of cannabidiol and ketamine in healthy human subjects. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **35**:198–202, Elsevier B.V.
- Hamm JP, Peterka DS, Gogos JA, and Yuste R (2017) Altered Cortical Ensembles in Mouse Models of Schizophrenia. *Neuron* **94**:153-167.e8, Elsevier Inc.
- Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, and Mackie K (2007) The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci* **28**:83–92, England.
- Harkany T, Mackie K, and Doherty P (2008) Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Curr Opin Neurobiol* **18**:338–345, England.
- Harrison PJ, and Eastwood SL (2001) Neuropathological studies of synaptic connectivity in the hippocampal formation in schizophrenia. *Hippocampus* **11**:508–519, United States.
- Hartling L, Abou-Setta AM, Dursun S, Mousavi SS, Pasichnyk D, and Newton AS (2012) Antipsychotics in Adults With Schizophrenia: Comparative Effectiveness of First-Generation Versus Second-Generation Medications. *Ann Intern Med* **157**:498–511, American College of Physicians.
- Heckers S, and Konradi C (2010) Hippocampal pathology in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci* **4**:529–553, Germany.
- Heusner CL, Hnasko TS, Szczycka MS, Liu Y, During MJ, and Palmiter RD (2003) Viral restoration of dopamine to the nucleus accumbens is sufficient to induce a locomotor response to amphetamine. *Brain Res* **980**:266–274, Netherlands.
- Hložek T, Uttl L, Kadeřábek L, Balíková M, Lhotková E, Horsley RR, Nováková P, Šíchová K, Štefková K, Tylš F, Kuchař M, and Páleníček T (2017) Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *Eur Neuropsychopharmacol* **27**:1223–1237.
- Homayoun H, and Moghaddam B (2007) NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**:11496–11500, United States.
- Honeycutt JA, and Chrobak JJ (2018) Parvalbumin Loss Following Chronic Sub-Anesthetic NMDA Antagonist Treatment is Age-Dependent in the Hippocampus: Implications for Modeling NMDA Hypofunction. *Neuroscience* **393**:73–82, IBRO.
- Horwitz T, Lam K, Chen Y, Xia Y, and Liu C (2019) A decade in psychiatric GWAS research. *Mol Psychiatry* **24**:378–389.
- Hotz J, Fehlmann B, Papassotiropoulos A, de Quervain DJF, and Schick Tanz NS (2021) Cannabidiol enhances verbal episodic memory in healthy young participants: A randomized clinical trial. *J Psychiatr Res* **143**:327–333.
- Hu W, MacDonald ML, Elswick DE, and Sweet RA (2015) The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. *Ann N Y Acad Sci* **1338**:38–57, John Wiley & Sons, Ltd.
- Hudson MR, Rind G, O'Brien TJ, and Jones NC (2016) Reversal of evoked gamma oscillation deficits is predictive of antipsychotic activity with a unique profile for clozapine. *Transl Psychiatry* **6**:18–20.
- Hudson R, Renard J, Norris C, Rushlow WJ, and Laviolette SR (2019) Cannabidiol Counteracts the Psychotropic Side-Effects of Δ -9-Tetrahydrocannabinol in the Ventral Hippocampus through Bidirectional Control of ERK1-2 Phosphorylation. *J Neurosci* **39**:8762–8777.

- Huestis MA, Solimini R, Pichini S, Pacifici R, Carlier J, and Busardò FP (2019) Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Curr Neuropharmacol* **17**:974–989, Bentham Science Publishers Ltd.
- Hutson PH, Rowley HL, Gosden J, Kulkarni RS, Slater N, Love PL, Wang Y, and Heal D (2016) The effects in rats of lisdexamfetamine in combination with olanzapine on mesocorticolimbic dopamine efflux, striatal dopamine D2 receptor occupancy and stimulus generalization to a D-amphetamine cue. *Neuropharmacology* **101**:24–35, England.
- Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AVW, Bazelot M, Dallas M, and Whalley BJ (2015) Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders.
- Idänpään-Heikkilä J, Alhava E, Olkinuora M, and Palva I (1975) CLOZAPINE AND AGRANULOCYTOSIS. *Lancet* **306**:611, Elsevier.
- Iffland K, and Grotenhermen F (2017) An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis Cannabinoid Res* **2**:139–154, Mary Ann Liebert Inc.
- Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* **56**:27–78, Netherlands.
- Imre G, Fokkema DS, Den Boer JA, and Ter Horst GJ (2006) Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Res Bull* **69**:338–345, United States.
- Irifune M, Shimizu T, and Nomoto M (1991) Ketamine-induced hyperlocomotion associated with alteration of presynaptic components of dopamine neurons in the nucleus accumbens of mice. *Pharmacol Biochem Behav* **40**:399–407, United States.
- Izumi Y, and Zorumski CF (2014) Metaplastic effects of subanesthetic ketamine on CA1 hippocampal function. *Neuropharmacology* **86**:273–281.
- Janowsky DS, el-Yousel MK, Davis JM, and Sekerke HJ (1973) Provocation of schizophrenic symptoms by intravenous administration of methylphenidate. *Arch Gen Psychiatry* **28**:185–191, United States.
- Joel D, and Weiner I (2000) The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience* **96**:451–474, United States.
- Jones C, Watson D, and Fone K (2011) Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol* **164**:1162–1194.
- Kafetzopoulos V, Kokras N, Sotiropoulos I, Oliveira JF, Leite-Almeida H, Vasalou A, Sardinha VM, Papadopoulou-Daifoti Z, Almeida OFX, Antoniou K, Sousa N, and Dalla C (2018) The nucleus reuniens: a key node in the neurocircuitry of stress and depression. *Mol Psychiatry* **23**:579–586.
- Kamiyama H, Matsumoto M, Otani S, Kimura S-I, Shimamura K-I, Ishikawa S, Yanagawa Y, and Togashi H (2011) Mechanisms underlying ketamine-induced synaptic depression in rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway. *Neuroscience* **177**:159–169.
- Kapur S, and Seeman P (2001) Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. *Am J Psychiatry* **158**:360–369, United States.
- Karayorgou M, Simon TJ, and Gogos JA (2010) 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **11**:402–416.
- Karson MA, Tang A-H, Milner TA, and Alger BE (2009) Synaptic Cross Talk between Perisomatic-Targeting Interneuron Classes Expressing Cholecystinin and Parvalbumin in Hippocampus. *J Neurosci* **29**:4140 LP – 4154.

- Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, and Schlicker E (2006) Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, doi: 10.1007/s00210-006-0033-x.
- Katsidoni V, Kastellakis A, and Panagis G (2013) Biphasic effects of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol on brain stimulation reward and motor activity. *Int J Neuropsychopharmacol* **16**:2273–2284, England.
- Kaushik R, Lipachev N, Matuszko G, Kochneva A, Dvoeglazova A, Becker A, Paveliev M, and Dityatev A (2021) Fine structure analysis of perineuronal nets in the ketamine model of schizophrenia. *Eur J Neurosci* **53**:3988–4004.
- Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Wolf G, and Bernstein H-G (2004) Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cFOS similar to those found in human schizophrenia. *Neuroscience* **126**:591–598, United States.
- Keilhoff Gerburg, Bernstein HG, Becker A, Grecksch G, and Wolf G (2004) Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **56**:317–322.
- Keith VA, Mansbach RS, and Geyer MA (1991) Failure of haloperidol to block the effects of phencyclidine and dizocilpine on prepulse inhibition of startle. *Biol Psychiatry* **30**:557–566, United States.
- Khasawneh FT, and Shankar GS (2014) Minimizing Cardiovascular Adverse Effects of Atypical Antipsychotic Drugs in Patients with Schizophrenia. *Cardiol Res Pract* **2014**:273060, Hindawi Publishing Corporation.
- Kittelberger K, Hur EE, Sazegar S, Keshavan V, and Kocsis B (2012) Comparison of the effects of acute and chronic administration of ketamine on hippocampal oscillations: Relevance for the NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *Brain Struct Funct* **217**:395–409.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JHJ, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J, and Somogyi P (2005) Complementary Roles of Cholecystokinin- and Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Hippocampal Network Oscillations. *J Neurosci* **25**:9782 LP – 9793.
- Kocsis B, Brown RE, Mccarley RW, and Hajos M (2013) Impact of Ketamine on Neuronal Network Dynamics: Translational Modeling of Schizophrenia-Relevant Deficits. *CNS Neurosci Ther* **19**:437–447.
- Kohrs R, and Durieux ME (1998) Ketamine: Teaching an old drug new tricks.
- Kokkinou M, Ashok AH, and Howes OD (2018) The effects of ketamine on dopaminergic function: meta-analysis and review of the implications for neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* **23**:59–69.
- Kokkinou M, Irvine EE, Bonsall DR, Natesan S, Wells LA, Smith M, Glegola J, Paul EJ, Tossell K, Veronese M, Khadayate S, Dedic N, Hopkins SC, Ungless MA, Withers DJ, and Howes OD (2021) Reproducing the dopamine pathophysiology of schizophrenia and approaches to ameliorate it: a translational imaging study with ketamine. *Mol Psychiatry* **26**:2562–2576.
- Kokkinou M, Irvine EE, Bonsall DR, Natesan S, Wells LA, Smith M, Glegola J, Paul EJ, Tossell K, Veronese M, Khadayate S, Dedic N, Hopkins SC, Ungless MA, Withers DJ, and Howes OD (2020) Reproducing the dopamine pathophysiology of schizophrenia and approaches to ameliorate it: a translational imaging study with ketamine. *Mol Psychiatry*, doi: 10.1038/s41380-020-0740-6, Springer US.
- Kokras N, Baltas D, Theocharis F, and Dalla C (2017) Kinoscope: An open-source computer program for behavioral pharmacologists. *Front Behav Neurosci*, doi: 10.3389/fnbeh.2017.00088.
- Kozela E, Krawczyk M, Kos T, Juknat A, Vogel Z, and Popik P (2020) Cannabidiol Improves Cognitive Impairment and Reverses Cortical Transcriptional Changes Induced by Ketamine, in Schizophrenia-Like Model in Rats. *Mol Neurobiol* **57**:1733–1747, Molecular Neurobiology.

- Kucewicz MT, Tricklebank MD, Bogacz R, and Jones MW (2011) Dysfunctional prefrontal cortical network activity and interactions following cannabinoid receptor activation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **31**:15560–15568, United States.
- Kuczenski R, Segal DS, and Aizenstein ML (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **11**:2703–2712, United States.
- Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, and Tamminga CA (1995) Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **13**:9–19, England.
- Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, and Denovan-Wright EM (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol*, doi: 10.1111/bph.13250.
- Laruelle M, and Abi-Dargham A (1999) Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. *J Psychopharmacol* **13**:358–371, United States.
- Lauder JM, and Bloom FE (1974) Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol* **155**:469–481, United States.
- Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, and Davis JM (2009) Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* **373**:31–41, Elsevier.
- Leweke FM, Mueller JK, Lange B, and Rohleder C (2016) Therapeutic potential of cannabinoids in psychosis. *Biol Psychiatry* **79**:604–612, Elsevier.
- Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, Klosterkötter J, Hellmich M, and Koethe D (2012) Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* **2**:e94.
- Lindenmayer J-P, Nasrallah H, Pucci M, James S, and Citrome L (2013) A systematic review of psychostimulant treatment of negative symptoms of schizophrenia: challenges and therapeutic opportunities. *Schizophr Res* **147**:241–252, Netherlands.
- Lodge DJ, and Grace AA (2007) Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**:11424–11430.
- Lodge DJ, and Grace AA (2008) Amphetamine Activation of Hippocampal Drive of Mesolimbic Dopamine Neurons: A Mechanism of Behavioral Sensitization. *J Neurosci* **28**:7876 LP – 7882.
- Lodge DJ, and Grace AA (2012) Divergent activation of ventromedial and ventrolateral dopamine systems in animal models of amphetamine sensitization and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* **15**:69–76.
- Lopez-Rodriguez AB, Llorente-Berzal A, Garcia-Segura LM, and Viveros M-P (2014) Sex-dependent long-term effects of adolescent exposure to THC and/or MDMA on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems in rats. *Br J Pharmacol* **171**:1435–1447, England.
- Lu HC, and Mackie K (2020) Review of the Endocannabinoid System.
- Lu HC, and MacKie K (2016) An introduction to the endogenous cannabinoid system.
- Luisada P V (1978) The phencyclidine psychosis: phenomenology and treatment. *NIDA Res Monogr* 241–253, United States.
- Luo Y, Yu Y, Zhang M, He H, and Fan N (2020) Chronic administration of ketamine induces cognitive deterioration by restraining synaptic signaling. *Mol Psychiatry*, doi: 10.1038/s41380-020-0793-6.
- Lupica CR, Hu Y, Devinsky O, and Hoffman AF (2017) Cannabinoids as hippocampal network administrators.

Neuropharmacology **124**:25–37, Elsevier Ltd.

- Lüscher C, Pascoli V, and Creed M (2015) Optogenetic dissection of neural circuitry: from synaptic causalities to blue prints for novel treatments of behavioral diseases. *Curr Opin Neurobiol* **35**:95–100, England.
- Lüscher C, and Pollak P (2016) Optogenetically inspired deep brain stimulation: linking basic with clinical research. *Swiss Med Wkly* **146**:w14278, Switzerland.
- Lutz B (2007) The endocannabinoid system and extinction learning.
- Ma J, and Leung LS (2018) Involvement of posterior cingulate cortex in ketamine-induced psychosis relevant behaviors in rats. *Behav Brain Res* **338**:17–27, Netherlands.
- Machado Bergamaschi M, Helena Costa Queiroz R, Waldo Zuardi A, and Alexandre S. Crippa J (2011) Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. *Curr Drug Saf* **6**:237–249, Bentham Science Publishers Ltd.
- Mackie K (2006) Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes* **30**:S19–S23.
- Manning JR, Jacobs J, Fried I, and Kahana MJ (2009) Broadband shifts in local field potential power spectra are correlated with single-neuron spiking in humans. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **29**:13613–13620, United States.
- Mao L-M, Reusch JM, Fibuch EE, Liu Z, and Wang JQ (2013) Amphetamine increases phosphorylation of MAPK/ERK at synaptic sites in the rat striatum and medial prefrontal cortex. *Brain Res* **1494**:101–108.
- Marissal T, Salazar RF, Bertollini C, Mutel S, De Roo M, Rodriguez I, Müller D, and Carleton A (2018) Restoring wild-type-like CA1 network dynamics and behavior during adulthood in a mouse model of schizophrenia. *Nat Neurosci* **21**:1412–1420.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Ziegglängsberger W, Di Marzo V, Behl C, and Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**:84–88, United States.
- Marsicano G, and Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* **11**:4213–4225, France.
- Matosin N, Fernandez-Enright F, Lum JS, Engel M, Andrews JL, Gassen NC, Wagner K V, Schmidt M V, and Newell KA (2016) Molecular evidence of synaptic pathology in the CA1 region in schizophrenia. *NPJ Schizophr* **2**:16022.
- Matricon J, Bellon A, Frieling H, Kebir O, Le Pen G, Beuvon F, Dumas-Duport C, Jay TM, and Krebs M-O (2010) Neuropathological and Reelin deficiencies in the hippocampal formation of rats exposed to MAM; differences and similarities with schizophrenia. *PLoS One* **5**:e10291, United States.
- Matuszko G, Curreli S, Kaushik R, Becker A, and Dityatev A (2017a) Extracellular matrix alterations in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience* **350**:13–22, IBRO.
- Matuszko G, Curreli S, Kaushik R, Becker A, and Dityatev A (2017b) Extracellular matrix alterations in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience* **350**:13–22, IBRO.
- McCutcheon RA, Abi-Dargham A, and Howes OD (2019) Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. *Trends Neurosci* **42**:205–220, Elsevier Ltd.
- McCutcheon Robert A., Krystal JH, and Howes OD (2020) Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World Psychiatry* **19**:15–33.

- McCutcheon Robert A, Reis Marques T, and Howes OD (2020) Schizophrenia—An Overview. *JAMA Psychiatry* **77**:201–210.
- McDonald WM, Sibley DR, Kilpatrick BF, and Caron MG (1984) Dopaminergic inhibition of adenylate cyclase correlates with high affinity agonist binding to anterior pituitary D2 dopamine receptors. *Mol Cell Endocrinol* **36**:201–209, Ireland.
- McNally JM, McCarley RW, and Brown RE (2013) Chronic ketamine reduces the peak frequency of gamma oscillations in mouse prefrontal cortex ex vivo. *Front Psychiatry* **4**:1–8.
- Mechoulam R, Parker LA, and Gallily R (2002) Cannabidiol: An overview of some pharmacological aspects.
- Mena A, Ruiz-Salas JC, Puentes A, Dorado I, Ruiz-Veguilla M, and De la Casa LG (2016) Reduced Prepulse Inhibition as a Biomarker of Schizophrenia. *Front Behav Neurosci* **10**:202.
- Meng C, Yao X-Q, Chang R-J, Wang S-L, Wang X, Ma D-Q, Li Q, and Wang X-Y (2020) Exogenous GM1 Ganglioside Attenuates Ketamine-Induced Neurocognitive Impairment in the Developing Rat Brain. *Anesth Analg* **130**:505–517, United States.
- Meyer D, Bonhoeffer T, and Scheuss V (2014) Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron* **82**:430–443, Elsevier Inc.
- Michaels TI, Long LL, Stevenson IH, Chrobak JJ, and Chen CMA (2018) Effects of chronic ketamine on hippocampal cross-frequency coupling: implications for schizophrenia pathophysiology. *Eur J Neurosci* **48**:2903–2914.
- Millan MJ, and Bales KL (2013) Towards improved animal models for evaluating social cognition and its disruption in schizophrenia: the CNTRICS initiative. *Neurosci Biobehav Rev* **37**:2166–2180, United States.
- Mitra PP, and Pesaran B (1999) Analysis of dynamic brain imaging data. *Biophys J* **76**:691–708, United States.
- Moghaddam B, and Javitt D (2012) From Revolution to Evolution: The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia and its Implication for Treatment. *Neuropsychopharmacology* **37**:4–15.
- Moreira FA, and Guimarães FS (2005) Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* **512**:199–205, Netherlands.
- Muetzelfeldt L, Kamboj SK, Rees H, Taylor J, Morgan CJA, and Curran H V. (2008) Journey through the K-hole: Phenomenological aspects of ketamine use. *Drug Alcohol Depend*, doi: 10.1016/j.drugalcdep.2008.01.024.
- Mukherjee A, Carvalho F, Eliez S, and Caroni P (2019) Long-Lasting Rescue of Network and Cognitive Dysfunction in a Genetic Schizophrenia Model. *Cell* **178**:1387-1402.e14, Elsevier Inc.
- Murataeva N, Straiker A, and MacKie K (2014) Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol* **171**:1379–1391.
- Narushima M, Uchigashima M, Fukaya M, Matsui M, Manabe T, Hashimoto K, Watanabe M, and Kano M (2007) Tonic enhancement of endocannabinoid-mediated retrograde suppression of inhibition by cholinergic interneuron activity in the striatum. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**:496–506, United States.
- Navarrete M, and Araque A (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* **57**:883–893, United States.
- Nestler EJ, and Hyman SE (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders.
- Niesters M, and Dahan A (2012) Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for NMDA receptor

antagonists in the treatment of chronic neuropathic pain.

- Nikiforuk A, and Popik P (2012) Effects of quetiapine and sertindole on subchronic ketamine-induced deficits in attentional set-shifting in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **220**:65–74.
- Nikiforuk A, and Popik P (2014) The effects of acute and repeated administration of ketamine on attentional performance in the five-choice serial reaction time task in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* **24**:1381–1393, Elsevier.
- Norris C, Loureiro M, Kramar C, Zunder J, Renard J, Rushlow W, and Laviolette SR (2016) Cannabidiol modulates fear memory formation through interactions with serotonergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropsychopharmacology*, doi: 10.1038/npp.2016.93.
- Nummenmaa L, Seppälä K, and Putkinen V (n.d.)) Social and Affective Neuroscience of Everyday Human Interaction-From Theory to Methodology. Molecular imaging of the human emotion circuit.
- Oliveira JF, Dias NS, Correia M, Gama-Pereira F, Sardinha VM, Lima A, Oliveira AF, Jacinto LR, Ferreira DS, Silva AM, Reis JS, Cerqueira JJ, and Sousa N (2013) Chronic stress disrupts neural coherence between cortico-limbic structures. *Front Neural Circuits* **7**:1–12.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MCT, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, and Reynet C (2006) Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*, doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.004.
- Owens DC (2008) How CATIE brought us back to Kansas: a critical re-evaluation of the concept of atypical antipsychotics and their place in the treatment of schizophrenia. *Adv Psychiatr Treat* **14**:17–28, Cambridge University Press.
- Pagotto U, Cervino C, Vicennati V, Marsicano G, Lutz B, and Pasquali R (2006) How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism?
- Pedrazzi JFC, Issy AC, Gomes F V, Guimarães FS, and Del-Bel EA (2015) Cannabidiol effects in the prepulse inhibition disruption induced by amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* **232**:3057–3065, Germany.
- Peleg-Raibstein D, Knuesel I, and Feldon J (2008) Amphetamine sensitization in rats as an animal model of schizophrenia. *Behav Brain Res* **191**:190–201, Netherlands.
- Peleg-Raibstein D, Yee BK, Feldon J, and Hauser J (2009) The amphetamine sensitization model of schizophrenia: relevance beyond psychotic symptoms? *Psychopharmacology (Berl)* **206**:603–621.
- Peres FF, Levin R, Almeida V, Zuardi AW, Hallak JE, Crippa JA, and Abilio VC (2016) Cannabidiol, among Other Cannabinoid Drugs, Modulates Prepulse Inhibition of Startle in the SHR Animal Model: Implications for Schizophrenia Pharmacotherapy .
- Phillips ML, Robinson HA, and Pozzo-Miller L (2019) Ventral hippocampal projections to the medial prefrontal cortex regulate social memory. *Elife* **8**:e44182, eLife Sciences Publications, Ltd.
- Pijnenburg AJJ, Honig WMM, and Van Rossum JM (1975) Inhibition of d-amphetamine-induced locomotor activity by injection of haloperidol into the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacologia* **41**:87–95.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, doi: 10.1038/nrn1247.
- Polissidis A, Chouliara O, Galanopoulos A, Marselos M, Papadopoulou-Daifoti Z, and Antoniou K (2009) Behavioural and dopaminergic alterations induced by a low dose of WIN 55,212-2 in a conditioned place preference procedure. *Life Sci*, doi: 10.1016/j.lfs.2009.05.015.

- Polissidis A, Chouliara O, Galanopoulos A, Naxakis G, Papahatjis D, Papadopoulou-Daifoti Z, and Antoniou K (2014) Cannabinoids negatively modulate striatal glutamate and dopamine release and behavioural output of acute d-amphetamine. *Behav Brain Res*, doi: 10.1016/j.bbr.2014.05.029.
- Polissidis A, Koronaiou M, Kollia V, Koronaiou E, Nakos-Bimpos M, Bogiongko M, Vrettou S, Karali K, Casadei N, Riess O, Sardi SP, Xilouri M, and Stefanis L (2021) Psychosis-Like Behavior and Hyperdopaminergic Dysregulation in Human α -Synuclein BAC Transgenic Rats. *Mov Disord* **36**:716–728.
- Poulia N, Delis F, Brakatselos C, Lekkas P, Kokras N, Dalla C, and Antoniou K (2020) Escalating low-dose Δ 9-tetrahydrocannabinol exposure during adolescence induces differential behavioral and neurochemical effects in male and female adult rats. *Eur J Neurosci*, doi: 10.1111/ejn.14598.
- Poulia N, Delis F, Brakatselos C, Lekkas P, Kokras N, Dalla C, and Antoniou K (2019) Escalating low-dose Δ 9-tetrahydrocannabinol exposure during adolescence induces differential behavioral and neurochemical effects in male and female adult rats. *Eur J Neurosci* 1–13.
- Poulia N, Delis F, Brakatselos C, Ntoulas G, Asprogerakas MZ, and Antoniou K (2021) CBD Effects on Motor Profile and Neurobiological Indices Related to Glutamatergic Function Induced by Repeated Ketamine Pre-Administration. *Front Pharmacol* **12**:1–15.
- Poulia N, Delis F, Brakatselos C, Polissidis A, Koutmani Y, Kokras N, Dalla C, Politis PK, and Antoniou K (2021) Detrimental effects of adolescent escalating low-dose Δ 9-tetrahydrocannabinol lead to a specific bio-behavioural profile in adult male rats. *Br J Pharmacol*, doi: 10.1111/bph.15394.
- Powell CM, and Miyakawa T (2006) Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol Psychiatry* **59**:1198–1207.
- Qian Y, Gurley BJ, and Markowitz JS (2019) The Potential for Pharmacokinetic Interactions Between Cannabis Products and Conventional Medications. *J Clin Psychopharmacol* **39**:462–471, United States.
- R.G. P (2008) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin.
- Rame M, Caudal D, Schenker E, Svenningsson P, Spedding M, Jay TM, and Godsil BP (2017) Clozapine counteracts a ketamine-induced depression of hippocampal-prefrontal neuroplasticity and alters signaling pathway phosphorylation. *PLoS One* **12**:e0177036, United States.
- Ranganathan M, Cortes-Briones J, Radhakrishnan R, Thurnauer H, Planeta B, Skosnik P, Gao H, Labaree D, Neumeister A, Pittman B, Surti T, Huang Y, Carson RE, and D'Souza DC (2016) Reduced Brain Cannabinoid Receptor Availability in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* **79**:997–1005, United States.
- Reep RL, Cheatwood JL, and Corwin J V (2003) The associative striatum: organization of cortical projections to the dorsocentral striatum in rats. *J Comp Neurol* **467**:271–292, United States.
- Reid MA, Salibi N, White DM, Gawne TJ, Denney TS, and Lahti AC (2019) 7T Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of the Anterior Cingulate Cortex in First-Episode Schizophrenia. *Schizophr Bull* **45**:180–189.
- Reid MJ, and Bornheim LM (2001) Cannabinoid-induced alterations in brain disposition of drugs of abuse. *Biochem Pharmacol* **61**:1357–1367.
- Renard J, Loureiro M, Rosen LG, Zunder J, de Oliveira C, Schmid S, Rushlow WJ, and Laviolette SR (2016) Cannabidiol Counteracts Amphetamine-Induced Neuronal and Behavioral Sensitization of the Mesolimbic Dopamine Pathway through a Novel mTOR/p70S6 Kinase Signaling Pathway. *J Neurosci* **36**:5160–5169.
- Renard J, Norris C, Rushlow W, and Laviolette SR (2017) Neuronal and molecular effects of cannabidiol on the mesolimbic dopamine system: Implications for novel schizophrenia treatments.

- Rhomberg T, Rovira-Esteban L, Vikór A, Paradiso E, Kremser C, Nagy-Pál P, Papp OI, Tasan R, Erdélyi F, Szabó G, Ferraguti F, and Hájos N (2018) Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons within circuits of the mouse basolateral amygdala. *J Neurosci* **38**:6983–7003.
- Rios C, Gomes I, and Devi LA (2006) mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* **148**:387–395, England.
- Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh K-H, Holmans PA, Lee P, Bulik-Sullivan B, Collier DA, Huang H, Pers TH, Agartz I, Agerbo E, Albus M, Alexander M, Amin F, Bacanu SA, Begemann M, Belliveau Jr RA, Bene J, Bergen SE, Bevilacqua E, Bigdeli TB, Black DW, Bruggeman R, Buccola NG, Buckner RL, Byerley W, Cahn W, Cai G, Campion D, Cantor RM, Carr VJ, Carrera N, Catts S V, Chambert KD, Chan RCK, Chen RYL, Chen EYH, Cheng W, Cheung EFC, Ann Chong S, Robert Cloninger C, Cohen D, Cohen N, Cormican P, Craddock N, Crowley JJ, Curtis D, Davidson M, Davis KL, Degenhardt F, Del Favero J, Demontis D, Dikeos D, Dinan T, Djurovic S, Donohoe G, Drapeau E, Duan J, Dudbridge F, Durmishi N, Eichhammer P, Eriksson J, Escott-Price V, Essioux L, Fanous AH, Farrell MS, Frank J, Franke L, Freedman R, Freimer NB, Friedl M, Friedman JI, Fromer M, Genovese G, Georgieva L, Giegling I, Giusti-Rodríguez P, Godard S, Goldstein JI, Golimbet V, Gopal S, Gratten J, de Haan L, Hammer C, Hamshere ML, Hansen M, Hansen T, Haroutunian V, Hartmann AM, Henskens FA, Herms S, Hirschhorn JN, Hoffmann P, Hofman A, Hollegaard M V, Hougaard DM, et al. (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**:421–427.
- Rivera P, Arrabal S, Cifuentes M, Grondona JM, Pérez-Martín M, Rubio L, Vargas A, Serrano A, Pavón FJ, Suárez J, and Rodríguez de Fonseca F (2014) Localization of the cannabinoid CB1 receptor and the 2-AG synthesizing (DAGL α) and degrading (MAGL, FAAH) enzymes in cells expressing the Ca(2+)-binding proteins calbindin, calretinin, and parvalbumin in the adult rat hippocampus. *Front Neuroanat* **8**:56, Switzerland.
- Robbe D, and Buzsáki G (2009) Alteration of theta timescale dynamics of hippocampal place cells by a cannabinoid is associated with memory impairment. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **29**:12597–12605, United States.
- Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, and Buzsaki G (2006) Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci* **9**:1526–1533.
- Rohleder C, Müller JK, Lange B, and Leweke FM (2016) Cannabidiol as a potential new type of an antipsychotic. A critical review of the evidence. *Front Pharmacol* **7**:1–11.
- Rothman DL, Behar KL, Hyder F, and Shulman RG (2003) In vivo NMR studies of the glutamate neurotransmitter flux and neuroenergetics: implications for brain function. *Annu Rev Physiol* **65**:401–427, United States.
- Rowland LM (2005) Subanesthetic ketamine: How it alters physiology and behavior in humans.
- Rubino T, and Parolaro D (2016) The Impact of Exposure to Cannabinoids in Adolescence: Insights From Animal Models. *Biol Psychiatry* **79**:578–585, United States.
- Rushforth SL, Steckler T, and Shoaib M (2011) Nicotine improves working memory span capacity in rats following sub-chronic ketamine exposure. *Neuropsychopharmacology* **36**:2774–2781, Nature Publishing Group.
- Russo EB, Burnett A, Hall B, and Parker KK (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res* **30**:1037–1043, United States.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, and Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, doi: 10.1038/sj.bjp.0707460.

- Sagheddu C, Muntoni AL, Pistis M, and Melis M (2015) *Endocannabinoid Signaling in Motivation, Reward, and Addiction: Influences on Mesocorticolimbic Dopamine Function*, 1st ed., Elsevier Inc.
- Sales AJ, Fogaça M V., Sartim AG, Pereira VS, Wegener G, Guimarães FS, and Joca SRL (2019) Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex. *Mol Neurobiol* **56**:1070–1081, Molecular Neurobiology.
- Saletti PG, and Tomaz C (2019) Cannabidiol effects on prepulse inhibition in nonhuman primates. *Rev Neurosci* **30**:95–105.
- Salgado S, and Kaplitt MG (2015) The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. *Stereotact Funct Neurosurg* **93**:75–93, Switzerland.
- Sampaio LRL, Cysne Filho FMS, de Almeida JC, Diniz DDS, Patrocínio CFV, de Sousa CNS, Patrocínio MCA, Macêdo D, and Vasconcelos SMM (2018) Advantages of the Alpha-lipoic Acid Association with Chlorpromazine in a Model of Schizophrenia Induced by Ketamine in Rats: Behavioral and Oxidative Stress evidences. *Neuroscience* **373**:72–81, United States.
- Sams-Dodd F (1995) Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. *Behav Pharmacol* **6**:55–65, England.
- Sartim AG, Marques J, Silveira KM, Gobira PH, Guimarães FS, Wegener G, and Joca SR (2021) Co-administration of cannabidiol and ketamine induces antidepressant-like effects devoid of hyperlocomotor side-effects. *Neuropharmacology* 108679, England.
- Schobel SA, Chaudhury NH, Khan UA, Paniagua B, Styner MA, Asllani I, Inbar BP, Corcoran CM, Lieberman JA, Moore H, and Small SA (2013) Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spreading pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate as a driver. *Neuron* **78**:81–93.
- Schumacher A, Sivanandan B, Tolledo EC, Woldegabriel J, and Ito R (2016) Different dosing regimens of repeated ketamine administration have opposite effects on novelty processing in rats. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **69**:1–10, Elsevier Inc.
- Seeman P (2016) Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Transl Psychiatry*, doi: 10.1038/tp.2016.195.
- Seeman P, and Tallerico T (1998) Antipsychotic drugs which elicit little or no Parkinsonism bind more loosely than dopamine to brain D2 receptors, yet occupy high levels of these receptors. *Mol Psychiatry* **3**:123–134.
- Sharir H, and Abood ME (2010) Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor, *Pharmacol Ther*.
- Shipman ML, Johnson GC, Bouton ME, and Green JT (2019) Chemogenetic Silencing of Prelimbic Cortex to Anterior Dorsomedial Striatum Projection Attenuates Operant Responding. *eNeuro* **6**, United States.
- Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, and Shulman RG (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:316–321.
- Siegel RK (1978) Phencyclidine and ketamine intoxication: a study of four populations of recreational users. *NIDA Res Monogr*.
- Silbersweig DA, Stern E, Frith C, Cahill C, Holmes A, Grootenck S, Seaward J, McKenna P, Chua SE, and Schnorr L (1995) A functional neuroanatomy of hallucinations in schizophrenia. *Nature* **378**:176–179, England.
- Silote GP, Sartim A, Sales A, Eskelund A, Guimarães FS, Wegener G, and Joca S (2019) Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. *J Chem Neuroanat*

98:104–116, Elsevier.

Simmler LD, Li Y, Hadjas LC, Hiver A, and Zessen R Van (2022) Dual action of ketamine confines addiction liability. , doi: 10.1038/s41586-022-04993-7.

Skosnik PD, Cortes-Briones JA, and Hajós M (2016) It's All in the Rhythm: The Role of Cannabinoids in Neural Oscillations and Psychosis. *Biol Psychiatry* **79**:568–577, United States.

Skosnik PD, Cortes-Briones JA, Hajós M, Lupica CR, Hu Y, Devinsky O, Hoffman AF, Kocsis, Sherif MA, Cortes-Briones JA, Ranganathan M, Skosnik PD, Donahoe, Oscillations N, and Networks C (2015) Cannabinoid–glutamate interactions and neural oscillations: implications for psychosis. *Neuropharmacology* **304**:1–7, Elsevier Ltd, United States.

Slifstein M, van de Giessen E, Van Snellenberg J, Thompson JL, Narendran R, Gil R, Hackett E, Girgis R, Ojeil N, Moore H, D'Souza D, Malison RT, Huang Y, Lim K, Nabulsi N, Carson RE, Lieberman JA, and Abi-Dargham A (2015) Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia: a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA psychiatry* **72**:316–324.

Smith DJ, Bouchal RL, DeSanctis CA, Monroe PJ, Amedro JB, Perrotti JM, and Crisp T (1987) Properties of the interaction between ketamine and opiate binding sites in vivo and in vitro. *Neuropharmacology*, doi: 10.1016/0028-3908(87)90084-0.

Snyder SH (1980) Phencyclidine. *Nature* **285**:355–356.

Socała K, Wyska E, Szafarz M, Nieoczym D, and Wlaź P (2019) Acute effect of cannabidiol on the activity of various novel antiepileptic drugs in the maximal electroshock- and 6 Hz-induced seizures in mice: Pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. *Neuropharmacology* **158**, Elsevier Ltd.

Sotiropoulos MG, Pouligiannopoulou E, Delis F, Dalla C, Antoniou K, and Kokras N (2021) Innovative screening models for the discovery of new schizophrenia drug therapies: an integrated approach. *Expert Opin Drug Discov* **16**:791–806, Taylor & Francis.

Spiegel I, Mardinly AR, Gabel HW, Bazinet JE, Couch CH, Tzeng CP, Harmin DA, and Greenberg ME (2014) Npas4 Regulates Excitatory-Inhibitory Balance within Neural Circuits through Cell-Type-Specific Gene Programs. *Cell* **157**:1216–1229.

Spix TA, Nanivadekar S, Toong N, Kaplow IM, Isett BR, Goksen Y, Pfenning AR, and Gittis AH (2021) Population-specific neuromodulation prolongs therapeutic benefits of deep brain stimulation. *Science* **374**:201–206, United States.

Stark T, Di Bartolomeo M, Di Marco R, Dražanova E, Platania CBM, Iannotti FA, Ruda-Kucerova J, D'Addario C, Kratka L, Pekarik V, Piscitelli F, Babinska Z, Fedotova J, Giuridanella G, Salomone S, Sulcova A, Bucolo C, Wotjak CT, Starcuk ZJ, Drago F, Mechoulam R, Di Marzo V, and Micale V (2020) Altered dopamine D3 receptor gene expression in MAM model of schizophrenia is reversed by peripubertal cannabidiol treatment. *Biochem Pharmacol* **177**:114004, England.

Stark T, Ruda-Kucerova J, Iannotti FA, D'Addario C, Di Marco R, Pekarik V, Dražanova E, Piscitelli F, Bari M, Babinska Z, Giuridanella G, Di Bartolomeo M, Salomone S, Sulcova A, Maccarrone M, Wotjak CT, Starcuk ZJ, Drago F, Mechoulam R, Di Marzo V, and Micale V (2019) Peripubertal cannabidiol treatment rescues behavioral and neurochemical abnormalities in the MAM model of schizophrenia. *Neuropharmacology* **146**:212–221, England.

Suddath RL, Christison GW, Torrey EF, Casanova MF, and Weinberger DR (1990) Anatomical Abnormalities in the Brains of Monozygotic Twins Discordant for Schizophrenia. *N Engl J Med* **322**:789–794, Massachusetts Medical Society.

Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*

14:311–317.

- Swordlow NR, Stephany N, Wasserman LC, Talledo J, Shoemaker J, and Auerbach PP (2003) Amphetamine Effects on Prepulse Inhibition Across-Species: Replication and Parametric Extension. *Neuropsychopharmacology* **28**:640–650.
- Swordlow NR, Weber M, Qu Y, Light GA, and Braff DL (2008) Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology (Berl)* **199**:331–388.
- Szkudlarek HJ, Desai SJ, Renard J, Pereira B, Norris C, Jobson CEL, Rajakumar N, Allman BL, and Laviolette SR (2019) Δ -9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol produce dissociable effects on prefrontal cortical executive function and regulation of affective behaviors. *Neuropsychopharmacology* **44**:817–825, Springer US.
- Taly A (2013) Novel approaches to drug design for the treatment of schizophrenia. *Expert Opin Drug Discov* **8**:1285–1296, England.
- Taylor R, Neufeld RWJ, Schaefer B, Densmore M, Rajakumar N, Osuch EA, Williamson PC, and Théberge J (2015) Functional magnetic resonance spectroscopy of glutamate in schizophrenia and major depressive disorder: anterior cingulate activity during a color-word Stroop task. *npj Schizophr* **1**:15028.
- Thiel CM, Müller CP, Huston JP, and Schwarting RK (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* **93**:243–251, United States.
- Thomas GM, and Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**:173–183.
- Touriño C, Eban-Rothschild A, and de Lecea L (2013) Optogenetics in psychiatric diseases. *Curr Opin Neurobiol* **23**:430–435.
- Turgeon SM, Pollack AE, and Fink JS (1997) Enhanced CREB phosphorylation and changes in c-Fos and FRA expression in striatum accompany amphetamine sensitization. *Brain Res* **749**:120–126, Netherlands.
- Tyler MW, Yourish HB, Ionescu DF, and Haggarty SJ (2017) Classics in Chemical Neuroscience: Ketamine.
- Tyrer P, and Kendall T (2009) The spurious advance of antipsychotic drug therapy. *Lancet* **373**:4–5, Elsevier.
- Tzimas PS, Petrakis EA, Halabalaki M, and Skaltsounis LA (2021) Effective determination of the principal non-psychoactive cannabinoids in fiber-type Cannabis sativa L. by UPLC-PDA following a comprehensive design and optimization of extraction methodology. *Anal Chim Acta*, doi: 10.1016/j.aca.2021.338200.
- Uhlhaas PJ, and Singer W (2010) Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **11**:100–113, Nature Publishing Group.
- Uno Y, and Coyle JT (2019) Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* **73**:204–215, John Wiley & Sons, Ltd.
- Valvassori SS, Elias G, De Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Trzesniak C, Tumas V, Dursun S, Nishihara Chagas MH, Hallak JE, Zuardi AW, Quevedo J, and Crippa JA (2011) Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychopharmacol* **25**:274–279.
- van den Buuse M, Mingon RL, and Gogos A (2015) Chronic estrogen and progesterone treatment inhibits ketamine-induced disruption of prepulse inhibition in rats. *Neurosci Lett* **607**:72–76, Ireland.
- van den Buuse M, Wischhof L, Lee RX, Martin S, and Karl T (2009) Neuregulin 1 hypomorphic mutant mice: enhanced baseline locomotor activity but normal psychotropic drug-induced hyperlocomotion and

prepulse inhibition regulation. *Int J Neuropsychopharmacol* **12**:1383–1393, England.

- Veilleux-Lemieux D, Castel A, Carrier D, Beaudry F, and Vachon P (2013) Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **52**:567–570, United States.
- Wan FJ, Geyer MA, and Swerdlow NR (1995) Presynaptic dopamine-glutamate interactions in the nucleus accumbens regulate sensorimotor gating. *Psychopharmacology (Berl)* **120**:433–441, Germany.
- Wan FJ, and Swerdlow NR (1996) Sensorimotor gating in rats is regulated by different dopamine-glutamate interactions in the nucleus accumbens core and shell subregions. *Brain Res* **722**:168–176, Netherlands.
- Wang AM, Pradhan S, Coughlin JM, Trivedi A, DuBois SL, Crawford JL, Sedlak TW, Nucifora FCJ, Nestadt G, Nucifora LG, Schretlen DJ, Sawa A, and Barker PB (2019) Assessing Brain Metabolism With 7-T Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Patients With First-Episode Psychosis. *JAMA psychiatry* **76**:314–323.
- Wang AY, Lohmann KM, Yang CK, Zimmerman EI, Pantazopoulos H, Herring N, Berretta S, Heckers S, and Konradi C (2011) Bipolar disorder type 1 and schizophrenia are accompanied by decreased density of parvalbumin- and somatostatin-positive interneurons in the parahippocampal region. *Acta Neuropathol* **122**:615–626, Germany.
- Weinberger DR, and Berman KF (1988) Speculation on the meaning of cerebral metabolic hypofrontality in schizophrenia. *Schizophr Bull* **14**:157–168, United States.
- Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, Baxter AJ, Ferrari AJ, Erskine HE, Charlson FJ, Norman RE, Flaxman AD, Johns N, Burstein R, Murray CJL, and Vos T (2013) Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)* **382**:1575–1586, England.
- Whittingstall K, and Logothetis NK (2009) Frequency-band coupling in surface EEG reflects spiking activity in monkey visual cortex. *Neuron* **64**:281–289, United States.
- Wilson C, and Terry AVJ (2010) Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: role in novel drug discovery and development. *Clin Schizophr Relat Psychoses* **4**:124–137.
- Winship IR, Dursun SM, Baker GB, Balista PA, Kandratavicius L, Maia-de-Oliveira JP, Hallak J, and Howland JG (2019) An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *Can J Psychiatry* **64**:5–17.
- Wolff AR, Bygrave AM, Sanderson DJ, Boyden ES, Bannerman DM, Kullmann DM, and Kätzel D (2018) Optogenetic induction of the schizophrenia-related endophenotype of ventral hippocampal hyperactivity causes rodent correlates of positive and cognitive symptoms. *Sci Rep* **8**:12871.
- Xu W, Li H, Wang L, Zhang J, Liu C, Wan X, Liu X, Hu Y, Fang Q, Xiao Y, Bu Q, Wang H, Tian J, Zhao Y, and Cen X (2020) Endocannabinoid signaling regulates the reinforcing and psychostimulant effects of ketamine in mice. *Nat Commun* **11**, Springer US.
- Xu Z, Chen R-Q, Gu Q-H, Yan J-Z, Wang S-H, Liu S-Y, and Lu W (2009) Metaplastic Regulation of Long-Term Potentiation/Long-Term Depression Threshold by Activity-Dependent Changes of NR2A/NR2B Ratio. *J Neurosci* **29**:8764 LP – 8773.
- Yamamoto M, Mizuki Y, Suetsugi M, Ozawa Y, Ooyama M, and Suzuki M (1997) Effects of dopamine antagonists on changes in spontaneous EEG and locomotor activity in ketamine-treated rats. *Pharmacol Biochem Behav* **57**:361–365, United States.
- Yamaori S, Ebisawa J, Okushima Y, Yamamoto I, and Watanabe K (2011) Potent inhibition of human cytochrome P450 3A isoforms by cannabidiol: role of phenolic hydroxyl groups in the resorcinol moiety. *Life Sci* **88**:730–736, Netherlands.

- Yang AC, and Tsai S-J (2017) New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *Int J Mol Sci* **18**.
- Yashiro K, and Philpot BD (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* **55**:1081–1094.
- Yu Y, Yang Z, Jin B, Qin X, Zhu X, Sun J, Huo L, Wang R, Shi Y, Jia Z, Shi YS, Chu S, Kong D, and Zhang W (2020) Cannabidiol inhibits febrile seizure by modulating AMPA receptor kinetics through its interaction with the N-terminal domain of GluA1/GluA2. *Pharmacol Res* **161**:105128, Netherlands.
- Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, Dossou KSS, Fang Y, Huang XP, Mayo CL, Wainer IW, Albuquerque EX, Thompson SM, Thomas CJ, Zarate CA, and Gould TD (2016) NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, doi: 10.1038/nature17998.
- Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Riggs LM, Highland JN, Georgiou P, Pereira EFR, Albuquerque EX, Thomas CJ, Zarate CA, and Gould TD (2018) Ketamine and ketamine metabolite pharmacology: Insights into therapeutic mechanisms. *Pharmacol Rev*, doi: 10.1124/pr.117.015198.
- Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, and Xu M (2002) c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet* **30**:416–420, United States.
- Zhang ZJ, and Reynolds GP (2002) A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res* **55**:1–10, Netherlands.
- Zhornitsky S, and Potvin S (2012) Cannabidiol in humans-The quest for therapeutic targets. *Pharmaceuticals* **5**:529–552.
- Zhou ZQ, Zhang GF, Li XM, Liu XY, Wang N, Qiu LL, Liu WX, Zuo ZY, and Yang JJ (2015) Loss of Phenotype of Parvalbumin Interneurons in Rat Prefrontal Cortex Is Involved in Antidepressant- and Pro-psychotic-Like Behaviors Following Acute and Repeated Ketamine Administration. *Mol Neurobiol* **51**:808–819.
- Zurawek D, Salerno-Kochan A, Dziedzicka-Wasylewska M, Nikiforuk A, Kos T, and Popik P (2018) Changes in the expression of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in a ketamine-based animal model of schizophrenia. *Schizophr Res* **192**:423–430, Elsevier B.V.