



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Magdalena Białoń

**Porównanie wpływu 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (1MeTIQ)
i olanzapiny na zaburzenia behawioralne i molekularne obserwowane
w zwierzęcych modelach schizofrenii**

Praca doktorska została wykonana pod opieką

Pani Promotor dr hab. Agnieszki Wąsik

w Zakładzie Neurochemii

Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN

Kraków, 2023

Dziękuję Pani Promotor, dr hab. Agnieszce Wąsik za bycie mentorem, a także za pomoc i wsparcie w pracy naukowej.

Pani Profesor Lucynie Antkiewicz-Michaluk za pomoc i wsparcie merytoryczne w przygotowaniu niniejszej rozprawy doktorskiej.

Współpracownikom – koleżankom i kolegom z Zakładu Neurochemii za nieocenioną pomoc podczas eksperymentów, a przede wszystkim – za wspaniałą atmosferę w miejscu pracy.

Mojej Rodzinie – za cierpliwość, i wsparcie w chwilach zwątpienia. Zawsze byliście i będziecie moją największą motywacją.

***Niniejszą Rozprawę Dokorską dedykuję mojemu Ś. P. Tacie,
który pokazał mi, że nauka to przywilej – nie obowiązek.***

Dziękuję Ci Tato.

Badania zostały sfinansowane z grantu NCN OPUS 13 2017/25/B/NZ7/01096

oraz środków statutowych Zakładu Neurochemii IF PAN



NARODOWE CENTRUM NAUKI



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Spis treści

1. WSTĘP	5
1.1. Objawy i etiologia schizofrenii.....	5
1.2. Hipoteza dopaminowa schizofrenii	7
1.3. Hipoteza glutaminianowa schizofrenii.....	9
1.3.1. Modele zwierzęce oparte na glutaminianowej teorii schizofrenii.....	12
1.4. Rola stresu oksydacyjnego w schizofrenii	14
1.5. Rola stanu zapalnego w schizofrenii	17
1.6. Metody leczenia schizofrenii	21
1.6.1. Olanzapina i jej zastosowanie w leczeniu schizofrenii.....	24
1.7. Charakterystyka 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (1MeTIQ)	24
1.7.1. Właściwości neuroprotektoryjne 1MeTIQ.....	25
2. CEL PRACY	28
3. MATERIAŁY I METODY.....	29
3.1. Zwierzęta	29
3.2. Testy behawioralne	29
3.3. Badania biochemiczne i molekularne	33
3.3.1. Badania biochemiczne <i>ex vivo</i> w wybranych strukturach tkanki mózgowej (FCX, HIP, STR).....	33
3.3.2. Eksperyment mikrodializy <i>in vivo</i>	34
3.3.3. Analiza aktywności enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym	36
3.3.4. Analiza poziomu cytokin (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10)	37
3.3.5. Badania <i>in vitro</i>	38
3.4. Analiza statystyczna	40
4. WYNIKI	41
4.1. Test podniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)	41

4.2.	Test rozpoznawania nowego obiektu (NORT)	45
4.3.	Test interakcji socjalnych (SIT)	51
4.4.	Test pamięci warunkowanej strachem (FMT)	55
4.5.	Eksperymenty mikrodializy <i>in vivo</i>	59
4.6.	Badania <i>ex vivo</i>	98
4.7.	Analiza aktywności enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym w wybranych strukturach (FCX, HIP)	134
4.8.	Analiza poziomu interleukin (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10) w wybranych strukturach (FCX, HIP, STR)	138
4.9.	Badania <i>in vitro</i> – analiza ilości jąder pyknotycznych, żywotności komórek oraz uwalniania LDH w hodowlach komórkowych	143
5.	DYSKUSJA	149
5.1.	Testy behawioralne skorelowane z badaniami neurochemicznymi: <i>ex vivo</i> i <i>in vivo</i>	149
5.2.	Badania molekularne	158
5.2.1.	Stres oksydacyjny	158
5.2.2.	Interleukiny	161
5.2.3.	Badania cytotoksyczne <i>in vitro</i>	162
6.	PODSUMOWANIE	166
7.	WNIOSKI	167
8.	WYKAZ UŻYTYCH SKRÓTÓW	168
9.	LITERATURA	171

1. WSTĘP

1.1. Objawy i etiologia schizofrenii

Schizofrenia jest ciężkim zaburzeniem psychicznym, którego częstość występowania w populacji wynosi około 1%. Choroba wpływa negatywnie na ogólny stan zdrowia, funkcjonowanie, samopoczucie, aktywność społeczną i zawodową (Światowa Organizacja Zdrowia, WHO, 2022). Dodatkowo, schizofrenia jest zaliczana do 15 głównych przyczyn niepełnosprawności na całym świecie (GBD, 2016).

Do podstawowych objawów choroby należą objawy wytwórcze (urojenia, halucynacje, dezorganizacja myśli i mowy), negatywne (wycofanie społeczne, brak motywacji, alogia, spłylenie afektu) oraz poznawcze (upośledzenie pamięci roboczej, uwagi i funkcji wykonawczych) (McCutcheon i wsp., 2020; Białoń i Wąsik, 2022). Objawy negatywne dotyczą około 40% pacjentów, a objawy poznawcze występują nawet u 80% osób, u których zdiagnozowano schizofrenię (Kahn i wsp., 2015). Co więcej, schizofrenia wiąże się ze skróconą oczekiwaną długością życia (~15 lat) w porównaniu do populacji ogólnej oraz o 10-15% wyższym ryzykiem śmierci samobójczej (Hjorthøj i wsp., 2017). Pierwsze objawy choroby pojawiają się zwykle w okresie dojrzewania lub wczesnej dorosłości (Jaaro-Peled i Sawa, 2020) i mogą być poprzedzone fazą prodromalną (Vandeveldt i Dollfus, 2021). Można rozpoznać również cięższy początek schizofrenii u dzieci, jednak jest to bardzo rzadkie zjawisko (Driver i wsp., 2013).

Podczas gdy wytwórcze objawy choroby na ogół dobrze reagują na leczenie farmakologiczne, objawy negatywne i poznawcze mogą rozpocząć się na długo przed pojawieniem się symptomów wytwórczych (McCutcheon i wsp., 2020) i są one związane z gorszymi prognozami i ograniczonymi możliwościami leczenia (Bulubas i wsp., 2021). Podczas gdy farmakoterapia często skupia się na wytwórczych objawach schizofrenii, to symptomy negatywne i poznawcze są w większości związane z długotrwałymi trudnościami związanymi z chorobą (Provencher i wsp., 1997). Warto wspomnieć, że przypadki schizofrenii charakteryzują się heterogenicznymi fenotypami i przebiegiem (Hasan i wsp., 2020) z obecnością różnych objawów oraz różnym stopniem ich nasilenia.

Pomimo wieloletnich badań nad patofizjologią schizofrenii, nadal nie można wyróżnić jednego, konkretnego czynnika wywołującego chorobę. Obecnie schizofrenia postrzegana jest jako złożona i wieloczynnikowa choroba psychiczna, do której rozwoju przyczyniają się

zarówno czynniki genetyczne, jak i niegenetyczne (środowiskowe). Mimo, że pierwsze objawy schizofrenii pojawiają się na ogół w okresie dojrzewania lub wczesnej dorosłości, większość dowodów sugeruje, że stan patologiczny układu nerwowego może rozpocząć się nawet we wczesnym stadium rozwoju neurologicznego, dlatego schizofrenia w niektórych badaniach jest uważana za zaburzenie neurorozwojowe (Morris-Rosendahl i Crocq, 2020). Patologiczny stan zdrowia matki w czasie ciąży taki jak niedobór witaminy D₃ (Eyles i wsp., 2013), infekcje i aktywacja układu immunologicznego (Brown i Derkits, 2010), stres (Fineberg i wsp., 2016), cukrzyca (patrz: Jaaro-Peled i Sawa, 2020) czy powikłania okołoporodowe (Fusar-Poli i wsp., 2017) mogą predysponować potomstwo do rozwoju schizofrenii w późniejszym życiu. Badania wykazały także, że czynniki psychologiczno-społeczne, takie jak trauma, problemy społeczne, izolacja, migracja i zamieszkanie w terenie miejskim, zwiększają ryzyko schizofrenii (Stillo i Murray, 2019). Co ciekawe, ryzyko zachorowania jest dwukrotnie wyższe u dzieci zmieniających miejsce zamieszkania ze środowiska wiejskiego na miejskie, a badania w Danii wykazały związek między zamieszkaniem w otoczeniu terenów zielonych, a ryzykiem zachorowania na schizofrenię w późniejszym życiu (Pedersen i Mortensen, 2006; Engemann i wsp., 2018). Te wyniki sugerują, że środowisko i otoczenie może wpływać na predyspozycje do rozwoju chorób psychicznych, w tym schizofrenii.

Innym ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby jest nadużywanie substancji psychoaktywnych. Powszechnie wiadomo, że substancje psychostymulujące, takie jak amfetamina czy kokaina, mogą prowadzić do rozwoju psychozy (Sara i wsp., 2015). Niektóre badania wskazywały na nadużywanie alkoholu jako czynnik predysponujący do rozwoju psychozy (Koskinen i wsp., 2009). Wiele dowodów wskazuje także na rolę nadużywania konopi indyjskich w rozwoju schizofrenii (Stillo i Murray, 2019), ponieważ szacowane ryzyko psychozy u osób odurzających się konopiami jest nawet 2-3 razy większe (van Os i wsp., 2002) i zależy od częstotliwości i dawki (Marconi i wsp., 2016). Co więcej, używanie konopi po pierwszym epizodzie psychotycznym wiąże się z gorszym rokowaniem, większym prawdopodobieństwem nawrotu choroby, dłuższą hospitalizacją i nasileniem objawów wytwórczych (Stillo i Murray, 2019). Wykazano, że nadużywanie konopi indyjskich w okresie dojrzewania, czyli w fazie intensywnego rozwoju mózgu, wpływa na wystąpienie, ogólny przebieg i ryzyko nawrotu choroby (Löhrs i Hasan, 2019). Badania te sugerują, że substancje silnie oddziałujące na układy neuroprzekazników w mózgu mogą predysponować

do zwiększonego ryzyka zachorowania na schizofrenię i wpływać zarówno na przebieg choroby, jak i efekty zastosowanego leczenia.

W przypadku czynników genetycznych, dziedziczność schizofrenii określa się na około 80% (Sullivan i wsp., 2003). Gdy u jednego z rodziców zostanie zdiagnozowana schizofrenia, prawdopodobieństwo zachorowania u potomstwa wynosi 13%, a ryzyko to wzrasta do 20% w przypadku diagnozy u obojga z rodziców (Janoutová i wsp., 2016). Obserwacje te sugerują, że komponenta genetyczna jest istotna w rozwoju choroby, co było szeroko badane w poprzednich latach.

Wiele badań skupia się obecnie na poznaniu mutacji czy zaburzeń genetycznych, które mogą predysponować do rozwoju schizofrenii. Wskazano wiele genów, które mogą w mniejszym lub większym stopniu przyczyniać się do wystąpienia bądź nasilenia symptomów choroby, np. gen Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) oraz gen kodujący dysbindynę-1 (DTNBP1), którego produkty białkowe odpowiadają za regulację procesów takich jak morfogeneza, dojrzewanie, migracja, integracja synaptyczna komórek neuronalnych i neuroplastyczność (Morosawa i wsp., 2017; Tranham-Davidson i Lavin, 2019). Również zespół delecji fragmentu chromosomu 22q.11.2, którego rozpowszechnienie w populacji ogólnej wynosi 1%, został powiązany ze zwiększonym ryzykiem schizofrenii, ponieważ u 30% osób z tą aberracją genetyczną zostaje rozpoznana schizofrenia (Pulver i wsp., 1994; Qin i wsp., 2020). Warto dodać, że większość genów tego fragmentu chromosomu ulega ekspresji podczas rozwoju mózgu (Ellegood i wsp., 2014). Co więcej, wiele badań wykazało również korelację między aberracjami genetycznymi a nasileniem objawów choroby (Chen i wsp., 2022) lub odpowiedzią na farmakoterapię (Sheggia i wsp., 2018). Wyniki wyżej wymienionych badań sugerują ważną rolę „tła genetycznego”, które może być czynnikiem predysponującym do rozwoju schizofrenii.

1.2. Hipoteza dopaminowa schizofrenii

Poszukując molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za zaburzenia obserwowane w przebiegu schizofrenii, sformułowano hipotezę zakładającą, że dysfunkcja w układzie dopaminowym może odgrywać istotną rolę w rozwoju objawów psychotycznych. Jest to jedna z najstarszych hipotez etiologii schizofrenii. Wiele dowodów sugeruje, że zaburzona transmisja dopaminergiczna w obszarach podkorowych może być odpowiedzialna za wytwórcze objawy choroby, a patologiczna transmisja dopaminergiczna w obszarach

prążkowia (*striatum* – STR) ma fundamentalne znaczenie dla modeli, które próbują wyjaśnić źródło objawów schizofrenii (McCutcheon i wsp., 2019). Obserwacja efektów blokady receptorów dopaminowych przez chloropromazynę i haloperidol, dokonana przez A. Carlssona i M. Lindqvista w 1963 (Carlsson i Lindqvist, 1963) była kamieniem milowym w psychiatrii. Zablockowanie transmisji dopaminergicznej jest nadal podstawową cechą wielu leków przeciwpsychotycznych (Vikram i wsp., 2010).

U zdrowych osób, substancje zwiększające uwalnianie DA (np. amfetamina) lub prekursor DA taki jak L-DOPA, mogą wywołać objawy psychotyczne, a osoby ze schizofrenią wykazują większą wrażliwość na ich działanie (Vikram i wsp., 2010; Lieberman i wsp., 1987). W wielu badaniach obserwowano zwiększoną aktywność układu dopaminergicznego w STR w kontekście schizofrenii (Howes i wsp., 2012). Większość neuronów dopaminergicznych znajduje się w śródmózgowiu, głównie w istocie czarnej zbitej (*substantia nigra pars compacta* - SNpc) i brzusznej okolicy nakrywki (*ventral tegmental area* - VTA), wysyłając projekcje do STR, jądra półleżącego przegrody (*nucleus accumbens* – NAc) oraz kory (*cortex* – CX) (Haber, 2014). Warto zauważyć, że wraz z rozwojem precyzyjnych technik obrazowania *in vivo*, asocjacyjny region STR został zidentyfikowany jako główne źródło dysfunkcji transmisji dopaminergicznej (Kegeles i wsp., 2010) i wynik ten został wielokrotnie potwierdzony w kolejnych badaniach (McCutcheon i wsp., 2018). Nadaktywność układu dopaminergicznego w STR powiązano z nadmierną aktywnością dopaminergiczną w szlaku mezo limbicznym (McCutcheon i wsp., 2019), w tym ze zwiększoną zdolnością syntezy i uwalniania DA (McCutcheon i wsp., 2018; 2020). Laruelle i współpracownicy (1999) wykazali, że przejściowe nasilenie objawów psychotycznych wywołane substancjami stymulującymi jest związane z nadmierną aktywacją układu dopaminergicznego w STR u osób ze schizofrenią i zjawisko to było obserwowane na początku choroby i podczas jej zaostrzeń, ale nie w okresach remisji. Dodatkowo wykazano, że wzrost syntezy DA wiąże się bezpośrednio z nasileniem objawów wytwórczych u pacjentów (Jauhar i wsp., 2017), a zwiększona zawartość DA w obszarach podkorowych uważa się za prognostyczną dla pozytywnego wyniku leczenia (Abi-Dargham i wsp., 2000). Interesującym jest, że pacjenci oporni na leczenie farmakologiczne wykazują brak istotnych zmian we wskaźnikach syntezy DA (Demjaha i wsp., 2011), a pacjenci wykazujący gorszą odpowiedź na leczenie przeciwpsychotyczne wykazują niższe poziomy DA w obszarach synaptycznych (Abi-Dargham i wsp., 2000), co potwierdza istotną rolę właściwości antydopaminergicznych stosowanej farmakoterapii.

Hipoteza dopaminergiczna może wyjaśniać źródło pewnych symptomów schizofrenii, zwłaszcza objawów wytwórczych (Yui i wsp., 2000), niemniej jednak fizjologiczne źródło pochodzenia negatywnych i poznawczych objawów choroby wciąż pozostawało niewyjaśnione. Przedstawiono więc teorię, że dysfunkcja układu dopaminergicznego musi rozciągać się na inne regiony mózgu (Weinberger i wsp., 1992). Kolejne badania wykazały osłabioną sygnalizację dopaminergiczną w grzbietowo-bocznej korze przedczołowej (*dorsolateral prefrontal cortex* - DLPFC) w schizofrenii. DLPFC jest regionem mózgu kluczowym dla różnych zadań behawioralnych i funkcji wykonawczych, takich jak pamięć robocza, elastyczność poznawcza, planowanie, hamowanie zachowania i rozumowanie abstrakcyjne (Jung i wsp., 2022). Wykazano, że pacjenci ze schizofrenią wykazują zmniejszone uwalnianie DA w DLPFC po stymulacji amfetaminą i dowiedziono, że zmiana ta koreluje z aktywacją DLPFC w zadaniach wymagających aktywacji procesów pamięci roboczej (Slifstein i wsp., 2015). Badania nad wpływem atypowych leków przeciwpsychotycznych na funkcje poznawcze wykazały zwiększoną aktywność w obszarach czołowych u pacjentów ze schizofrenią po zastosowaniu leczenia przeciwpsychotycznego (Abbot i wsp., 2013). Odnosząc się do przedstawionych wyników, nie jest zaskakujące, że leki przeciwpsychotyczne blokujące transmisję dopaminergiczną nie są w stanie zniwelować tych objawów u pacjentów.

1.3. Hipoteza glutaminianowa schizofrenii

Biorąc pod uwagę fakt, że leki przeciwpsychotyczne mają znikomy wpływ na objawy negatywne i poznawcze, hipoteza zaburzonej transmisji dopaminergicznej nie tłumaczy w pełni patofizjologii schizofrenii (Lim i wsp., 2016). Dodatkowo zmiany w obszarach korowych korelują w większym stopniu z objawami negatywnymi lub poznawczymi niż z epizodami psychotycznymi (Davis i wsp., 1998; Johnstone i wsp., 1989). Jest zatem mało prawdopodobne, aby szlaki dopaminergiczne były jedynym zaburzonym systemem w przebiegu choroby (Coyle i Balu, 2018). Obserwacje te wskazują na obecność innych zaburzonych układów neuroprzekąźnictwa w patofizjologii choroby.

Glutaminian (GLU) jest najobficiej występującym neuroprzekąźnikiem w mózgu kręgowców, o działaniu pobudzającym na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) (Zhou i wsp., 2014), a komórki glutaminianergiczne wykazują około 60-80% całkowitej aktywności metabolicznej mózgu (Rothman i wsp., 2003). GLU wykazuje działanie na szereg receptorów, takich jak

jonotropowy receptor N-metylo-D-asparaginianowy (NMDAR), receptor kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) czy receptor kainowy oraz metabotropowe receptory glutaminianowe (mGlu) (Ribeiro i wsp., 2017). Poprzez aktywację wyżej wymienionych receptorów, GLU kontroluje podstawowe funkcje mózgu, takie jak tworzenie sieci neuronalnych podczas rozwoju układu nerwowego, plastyczność neuronalną (kluczową dla uczenia się i pamięci) oraz regenerację OUN (McEntee i Crook, 1993; Meldrum, 2000). W kontekście schizofrenii, najważniejszą rolę w patofizjologii choroby wydają się pełnić NMDAR (Hyun i wsp., 2020).

Po odkryciu receptorów NMDA nastąpiła synteza i badanie NMDA przez Watkinsa i współpracowników (Watkins, 1981). W dalszych badaniach stwierdzono, że NMDAR odgrywają zasadniczą rolę w funkcjach synaptycznych, takich jak transmisja i plastyczność, uczenie się, pamięć, rozwój neuronalny, udar, drgawki, ekscytotoksyczność i innych, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych procesach mózgu (Monaghan i Jane, 2009).

Pierwsze przesłanki na temat zaburzonych funkcji układu glutaminianergicznego w przebiegu schizofrenii pojawiły się pod koniec lat 40. XX wieku, kiedy odkryto, że leczenie GLU pacjentów ze schizofrenią katatoniczną przynosi pozytywne efekty (Kintzinger i Arnold, 1949). Później, w 1980 roku zaobserwowano obniżony poziom GLU (o około 50%) w płynie mózgowo-rdzeniowym (*cerebrospinal fluid* - CSF) osób ze schizofrenią (Kim i wsp., 1980), co rozpoczęło kolejne lata badań nad rolą GLU w przebiegu choroby i jej rozwoju. Od tego czasu wciąż rośnie liczba dowodów na zmiany w funkcjonowaniu układu glutaminianergicznego i transmisji GLU.

Pierwotnie teoria glutaminianowa schizofrenii mówiła o osłabionej transmisji GLU, jednak na przestrzeni lat, wraz z rozwojem badań, teoria ta była modyfikowana i rozwijana (Howes i wsp., 2015). Istotną rolę systemu glutaminianergicznego w schizofrenii potwierdzają również badania genetyczne, w których wykazano zaburzenia w obrębie genów związanych z kodowaniem podjednostek NMDAR (np. gen GRIN2A) czy genów istotnych dla aktywacji NMDAR (np. gen SRR) (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Jedna z metaanaliz wykazała obniżone poziomy matrycowego RNA (mRNA) dla białka GluN1 (obligatoryjnej podjednostki NMDAR) w pośmiertnych badaniach tkanki mózgowej pacjentów ze zdiagnozowaną schizofrenią (Catts i wsp., 2016) oraz obniżone poziomy GluN1 w zakręcie zębatym hipokampa (*hippocampus* – HIP) (Stan i wsp., 2015). Co więcej, we frakcji postsynaptycznej uzyskanej pośmiertnie z tkanek pacjentów

chorych na schizofrenię, stwierdzono zmniejszenie aktywności kaskad sygnałowych związanych z NMDAR w obrębie DLPFC (Banerjee i wsp. 2015). Istnieją również dowody na obniżoną funkcjonalność NMDAR, które zostały uzyskane w badaniach obrazowania *in vivo*. W jednej z metaanaliz przedstawiono wyniki sugerujące obniżony poziom GLU w obszarach czołowych pacjentów ze schizofrenią, mierzony metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu protonowego (Marsman i wsp., 2013).

Istnieje kilka hipotez wyjaśniających rolę obniżonej aktywności NMDAR w symptomach schizofrenii. Po pierwsze, niedostateczna aktywacja NMDAR na interneuronach kwasu γ -aminomasłowego (GABA), zwłaszcza tych wykazujących ekspresję parwalbuminy (*parvalbumin* - PV), prowadzi do zaburzonej funkcji sieci korowej i efekt ten obserwowany jest u pacjentów ze schizofrenią (Lisman i wsp., 2008; Jasi i wsp., 2015). Co więcej, obniżona aktywność NMDAR na interneuronach korowych może prowadzić do zwiększonej aktywacji neuronów glutaminianergicznych, co skutkuje zbyt wysoką aktywnością interneuronów GABA w regionie VTA. Efekt ten osłabia mezoakrotykalną transmisję dopaminergiczną, prowadząc do zmniejszonego uwalniania DA i tym samym przyczynia się do powstawania negatywnych i/lub poznawczych symptomów schizofrenii. Ponadto odhamowanie interneuronów w obszarach kory prowadzi do wzmożonej aktywacji korowych projekcji glutaminianergicznych, a tym samym do zwiększonej aktywacji dopaminergicznego szlaku mezoakrotycznego, przyczyniając się tym samym do wystąpienia objawów wytwórczych (Ellaithy i wsp., 2015). Dodatkowo, w korze przedczołowej (*prefrontal cortex* – PFC) pacjentów ze schizofrenią stwierdzono zaburzony poziom receptorów dla serotoniny (5-HT) – 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, które są celem dla leków przeciwpsychotycznych, a dodatkowo regulują aktywność NMDAR (Youen i wsp., 2005; Selvaraj i wsp., 2014; Dantsuji i wsp., 2019).

Glutaminianowa teoria schizofrenii jest silnie wspierana przez badania określające wpływ antagonistów NMDAR na osoby zdrowe i pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą. Fencyklidyna (*phencyclidine* - PCP) i ketamina, antagoniści NMDAR, wywołują objawy schizofrenii u zdrowych ochotników, w tym objawy wytwórcze i negatywne, a także pogorszenie funkcji poznawczych. Warto zauważyć, że stan psychotyczny wywołany przez PCP lub ketaminę u osób zdrowych jest trudny do odróżnienia od psychozy występującej w schizofrenii (Uno i Coyle, 2019). Dodatkowo, antagoniści NMDAR podawani pacjentom ze schizofrenią znacząco nasilają objawy choroby (Adell, 2020). Wykazano również, że ketamina zwiększa uwalnianie DA w brzusznej części STR, co jest związane z

pojawieniem się objawów psychotycznych (Vollenweider i wsp., 2000). Podobny efekt obserwuje się w badaniach na zwierzętach, w których zaobserwowano wzrost uwalniania DA w STR po podaniu antagonisty NMDAR. Co więcej, podanie PCP powoduje zmniejszone uwalnianie DA w obszarach przedczołowych mózgu, co jest cechą charakterystyczną patofizjologii schizofrenii (Nakazawa i Sapkota, 2021).

Biorąc pod uwagę obecność miejsca wiązania dla PCP i ketaminy w NMDAR oraz fakt, że leki te wiążą się z receptorem jako niekompetycyjny antagonistą i wywołują objawy podobne do tych obserwowanych w schizofrenii, wysunięto wniosek, że symptomy choroby występują w wyniku niedostatecznej aktywacji NMDAR (Uno i Coyle, 2019; Adell 2020). Teoria glutaminianowa schizofrenii, obok teorii dopaminowej, jest obecnie najbardziej ugruntowaną hipotezą dotyczącą patofizjologii choroby, a jej założenia służą do tworzenia zwierzęcych modeli schizofrenii.

1.3.1. Modele zwierzęce oparte na glutaminianowej teorii schizofrenii

W odniesieniu do hipotezy glutaminianowej schizofrenii, warto wspomnieć o zwierzęcych modelach choroby opartych na tej teorii. Do modelowania objawów schizofrenii u zwierząt (głównie gryzoni) w badaniach przedklinicznych, wykorzystuje się podania antagonistów NMDAR takich jak ketamina, PCP czy dizocylpina (MK-801), a leki przeciwpsychotyczne są w stanie odwrócić zaburzenia wywołane przez podanie wymienionych substancji (Neill i wsp., 2022). Niemniej jednak warto wspomnieć, że żaden z modeli zwierzęcych nie jest w stanie odtworzyć pełnego zakresu objawów danego schorzenia, zwłaszcza w przypadku tak złożonej choroby psychicznej jak schizofrenia.

Wykazano, że antagoniści NMDAR powodują wzrost poziomu DA w szlaku mezolimbicznym, co jest związane ze zwiększoną aktywnością lokomotoryczną badanych zwierząt (Yan i wsp., 1997; Sitges i wsp., 2000; Kraeuter i wsp., 2020) i przyjmuje się, że takie zachowanie odzwierciedla wytwórcze objawy choroby (Brisch i wsp., 2014). Dodatkowo, niedostateczna aktywacja NMDAR prowadzi do nadmiernego uwalniania GLU w rejonach czołowych, co może być związane z występowaniem objawów negatywnych (Moghaddam i Javitt, 2012). Uważa się, że zachowania zwierząt wskazujące na zaburzenia funkcji pamięciowych i zaburzone zachowania socjalne odzwierciedlają poznawcze i negatywne objawy schizofrenii, a antagoniści NMDAR wykazują wysoką skuteczność w wywoływaniu tego typu zaburzeń (Neill i wsp., 2010; Perdikaris i Dermon, 2022). Objawy

negatywne i pogorszenie funkcji poznawczych u zwierząt można mierzyć przy pomocy szeregu testów behawioralnych, które oceniają: zaburzenia pamięci (np. test rozpoznawania nowego obiektu (*novel object recognition test* - NORT), test labiryntu Y, test pamięci strachu (*fear memory test* - FMT), procesy związane z uwagą (np. test przełączania uwagi) i zachowania socjalne (np. test interakcji socjalnych; *social interaction test* - SIT). Wykazano także, że antagoniści NMDAR powodują zaburzenia bramkowania sensomotorycznego, co jest charakterystyczne dla pacjentów ze schizofrenią (Geyer, 2006; San-Martin i wsp., 2020). U zwierząt zjawisko to można zmierzyć za pomocą testu bramkowania sensomotorycznego (*prepulse inhibition* - PPI) w odpowiedzi na przestraszenie. Ocena PPI jest bezpośrednio związana z oceną neuronalnych mechanizmów bramkowania sensomotorycznego, co ma kluczowe znaczenie dla zapobiegania nadmiernej stymulacji i zdolności koncentracji na ważnym bodźcu wśród innych dystraktorów (Gómez-Nieto i wsp., 2020).

Poza odpowiedzią behawioralną, antagoniści NMDAR wywołują także szereg zmian molekularnych w OUN, które są charakterystyczne dla pacjentów ze schizofrenią.

Po pierwsze, wykazano, że niedoczynność NMDAR zaburza poziomy neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (*brain derived neurotrophic factor* - BDNF) w mózgach zwierząt (Białoń i Wąsik, 2022). BDNF jest cząsteczką kluczową dla procesów neurogenezy, synaptogenezy i plastyczności synaptycznej, a jej funkcje i ekspresja mogą być regulowane przez aktywność NMDAR (Libman-Sokołowska i wsp., 2015; Yu i wsp., 2021). Obniżony poziom BDNF zaobserwowano w surowicy i tkance mózgowej (badanej *post mortem*) pacjentów ze schizofrenią (Libman-Sokołowska i wsp., 2015), a badania pokazały, że niskie stężenie BDNF jest związane z pogorszeniem funkcji poznawczych (Chen i wsp., 2020).

Co więcej, doniesiono, że antagoniści NMDAR wpływają na układ immunologiczny i procesy oksydacyjne w OUN. W badaniach przedklinicznych MK-801, PCP i ketamina zwiększyły poziom cytokin prozapalnych, takich jak interleukina 6 (IL-6), interleukina 1 β (IL-1 β) czy czynnik martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor α* – TNF- α) (da Silva Araújo i wsp., 2017; Xiao i wsp., 2019; Wang i wsp., 2021), wpływając na odpowiedź zapalną organizmu. Dodatkowo związki te zmieniają przebieg procesów oksydacyjnych i zaburzają wewnętrzne systemy obronne przed stresem oksydacyjnym (*oxidative stress* - OS), gdyż po podaniu antagonisty NMDAR zaobserwowano obniżone poziomy glutationu (*glutathione* – GSH), zmienioną aktywność enzymów związanych z procesami oksydacyjnymi oraz zwiększone stężenia dialdehydu malonowego (*malondialdehyde* – MDA) (Białoń i Wąsik, 2022).

Wreszcie, indukowanie hipoaktywności NMDAR przez podawanie antagonistów tego receptora, prowadzi do zaburzenia równowagi w procesach pobudzenia/hamowania w OUN.

Zaburzone uwalnianie DA, 5-HT, noradrenaliny (NA) czy GLU odnotowano w zwierzęcych modelach choroby (Białoń i Wąsik, 2022). Dodatkowo wykazano, że substancje takie jak ketamina, PCP i MK-801 zaburzają transmisję GABA oraz obniżają poziom tego neuroprzekaźnika (Pérez i wsp., 2019; Wang i wsp., 2021).

Podsumowując, farmakologicznie indukowana hipofunkcja NMDAR służy jako dobrze zbadany i szeroko stosowany model do badania zaburzeń podobnych do schizofrenii u zwierząt. Jednak warto pamiętać, że narzędzia farmakologiczne wykorzystywane do modelowania choroby nie są w stanie w pełni naśladować złożoności choroby. Modele te są przydatne raczej do naśladowania objawów podobnych do schizofrenii i działania potencjalnych leków, niż badania czynników wywołujących chorobę.

1.4. Rola stresu oksydacyjnego w schizofrenii

Obecnie duża liczba badań wskazuje na obecność wzmożonego stresu oksydacyjnego w licznych chorobach OUN. Około 90% energii mózgu jest dostarczane przez procesy tlenowe (Lohr i wsp., 1995), dlatego tkanka OUN jest silnie narażona na intensywny metabolizm oksydacyjny. Co więcej, sam proces metabolizmu neuroprzekaźników jest obciążony generowaniem wolnych rodników (Wang i wsp., 2010) czyniąc OUN bardziej podatnym na uszkodzenia spowodowane OS. Warto zauważyć, że komórki neuronalne wykazują słaby system obrony antyoksydacyjnej wykazując stosunkowo niski poziom zredukowanego GSH, katalazy (*catalase* - CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (*superoxide dismutase* - SOD) i peroksydazy glutationowej (*glutathione peroxidase* - GPx) (Baxter i Hardingham, 2016; Dwivedi i wsp., 2020; Djordjević, 2021), a cząsteczki te są kluczowe w utrzymaniu homeostazy oksydacyjnej. Większość dowodów wskazuje na rolę zaburzonych procesów OS również w schizofrenii, pokazując, że genetyczne i środowiskowe czynniki ryzyka choroby mogą być powiązane z OS i mogą wpływać na procesy neurorozwojowe czy neuromodulacyjne kluczowe dla patogenezy choroby (Koga i wsp., 2015). Wcześniejsze badania wykazały, że brak równowagi w procesach OS może wpływać na patofizjologię schizofrenii na poprzez różne mechanizmy. Odnosząc się do dostępnej literatury, polimorfizmy genetyczne związane z genami związanymi z OS (np. transferazy glutationu-S) mogą być związane z podatnością na schizofrenię (Chowdari i wsp., 2011). Wykazano również, że zaburzenia występujące w genach związanych z syntezą GSH i przeciwutleniaczami zależnymi od GSH mają związek ze schizofrenią (Gysin i wsp., 2007).

Ponadto wykazano, że nieprawidłowości genetyczne związane z genami dla tlenku azotu (*nitric oxide* - NO) są zaburzone w przebiegu choroby (Nasyrova i wsp., 2015). Zmniejszona synteza NO w mózgu jest sugerowana jako czynnik ryzyka zaburzeń psychicznych, a brak neuronalnego NO wydaje się być związany ze spadkiem funkcji poznawczych (Kirchner i wsp., 2004; Dec i wsp., 2014). Po drugie, nasilone procesy OS i podwyższone poziomy reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species* - ROS) podczas procesów neurorozwojowych, mogą być spowodowane np. infekcją lub cukrzycą u matki i mogą wpływać na funkcjonalność błon komórkowych i prowadzić do zaburzeń równowagi neuroprzekazników w mózgu płodu (Ermakov i wsp., 2021), tym samym zwiększając ryzyko epizodów psychiatrycznych w przyszłości.

Poprzednie badania dotyczyły roli i zaburzeń markerów OS w przebiegu schizofrenii, zarówno u ludzi, jak i zwierząt. Jednym z szeroko badanych markerów OS jest wspomniany wcześniej MDA, końcowy produkt peroksydacji lipidów, w której ROS powodują bezpośrednie uszkodzenie lipidów w błonach komórkowych (Ayala i wsp., 2014), co może prowadzić do uszkodzeń oksydacyjnych mózgu (Mahadik i wsp., 2001). Stwierdzono wzrost poziomu MDA w surowicy (Hurşitoğlu i wsp., 2021) i osoczu (Buosi i wsp., 2021) osób ze schizofrenią. Również ostatnie badania przedkliniczne wykazały wzrost stężenia MDA w zwierzęcych modelach schizofrenii (Estaphan i wsp., 2021; Liang i wsp., 2022).

Innym szeroko badanym związkiem związanym z OS w schizofrenii jest GSH, który jest fizjologicznym przeciwutleniaczem i odgrywa kluczową rolę w ochronie komórek przed ich uszkodzeniem w wyniku procesów OS (Homma i Fujii, 2015). Wykazano, że poziom GSH jest obniżony zarówno u pacjentów na etapie epizodu ostrej psychozy, jak i u pacjentów przewlekłe chorujących na schizofrenię (Bókkon i Anta, 2011; Upthegrove i Khandaker, 2020). Podobne rezultaty otrzymano w badaniach w wykorzystaniem modeli zwierzęcych (Radonjić i wsp., 2012; Białoń i Wąsik, 2022). Warto zauważyć, że farmakologicznie indukowany niedobór GSH jest wykorzystywany do modelowania objawów schizofrenii u gryzoni w stadium neurorozwoju (Górny i wsp., 2020). Dodatkowo, GSH wzmacnia odpowiedź indukowaną przez interneurony GABA, a niski poziom GSH może prowadzić do osłabionych procesów hamowania w których pośredniczy GABA. Tym samym zmniejszone poziomy GSH wpływają negatywnie na oczekiwaną funkcję neuronów GABAergicznych w PFC poprzez eliminację efektu hamującego w tym regionie, co może przyczyniać się do powstawania wytwórczych objawów choroby (Cabungcal i wsp., 2006).

Co więcej, również poziom i aktywność enzymów związanych z OS wydają się być zaburzone w przebiegu choroby, jednak wyniki badań oceniających te parametry są raczej

niespójne. Poziomy i/lub aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak SOD, GPx i CAT, są najczęściej mierzone w celu oznaczenia zdolności antyoksydacyjnej organizmu w różnych stanach fizjologicznych i chorobowych, w tym schizofrenii (Bošković i wsp., 2011). Wykazano, że poziomy SOD, GPx i CAT są obniżone w przebiegu choroby (Tsugawa i wsp., 2019; Ermakov i wsp., 2021), a aktywność SOD koreluje negatywnie z występowaniem objawów pozytywnych u pacjentów w pierwszym epizodzie schizofrenii (Wu i wsp., 2012). Niemniej jednak niektóre badania wykazały zwiększoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych w mózgu pacjentów ze schizofrenią, co może sugerować nasilenie procesów związanych z OS i zaburzenie pracy systemów antyoksydacyjnych, poprzez trwałą ekspozycję na OS (Rukmini i wsp., 2004). Dodatkowo, aktywność SOD może być zależna od przebiegu choroby: liczby epizodów psychiatrycznych, czasu trwania i początku choroby oraz leczenia – przykładowo aktywność SOD jest wyższa u młodych pacjentów, we wczesnym stadium schizofrenii (Đorđević i wsp., 2017).

W przypadku GPx wykazano, że aktywność tego enzymu jest zmniejszona o około 67% w krwi pacjentów ze schizofrenią w porównaniu do osób zdrowych (Dietrich-Muszalska i Kwiatkowska, 2014), niemniej jednak w niektórych badaniach stwierdzono niezmienną poziom GPx u osób cierpiących na tę chorobę (Buosi i wsp., 2021). Co ciekawe, znacznie niższe poziomy SOD i GPx stwierdzono u młodych osób z bardzo wysokim ryzykiem psychozy, co sugeruje, że zachwiana równowaga systemu obrony przed OS może wystąpić jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby (Zeni-Graff i wsp., 2019). Większość badań wykazała zmniejszoną aktywność CAT u pacjentów ze schizofrenią, jednak pacjenci poddani stałej farmakoterapii wykazują zwiększoną aktywność CAT (Flatow i wsp., 2003). Warto zauważyć, że aktywność CAT i SOD jest też ujemnie skorelowana z dawką leków przeciwpsychotycznych (Raffa i wsp., 2012).

Badania dotyczące poziomów i/lub aktywności enzymów wydają się przynosić niespójne wyniki porównujące parametry uzyskane od pacjentów ze schizofrenią i osób zdrowych. Warto jednak zauważyć, że schizofrenia jest chorobą wysoce niejednorodną, a wewnętrzny mechanizm obrony przed OS może być zależny od etapu choroby. Dodatkowo zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych mogą odzwierciedlać mechanizmy kompensacyjne zależne od czasu trwania ekspozycji organizmu na OS (Djordjević, 2022).

W odniesieniu do hipotezy rozwoju choroby związanej z GLU oraz badań potwierdzających rolę OS w patofizjologii schizofrenii, warto wspomnieć, że aktywność NMDAR może być redukowana przez OS, co może prowadzić do odhamowania komórek piramidowych i niekontrolowanego uwalniania GLU (Traynelis i wsp. 2010). Dodatkowo, niedostateczna

aktywacja NMDAR może prowadzić do nasilenia procesów OS – badania wykazały, że właściwa aktywność synaptycznych NMDAR kontroluje wydajność szlaków antyoksydacyjnych (np. powiązanego z GSH) poprzez kontrolowanie kilku kluczowych genów antyoksydacyjnych na poziomie transkrypcji (Baxter i wsp., 2015; Papadia i wsp., 2008). Poprzednie badania wskazują, że cząsteczki utleniające bądź redukujące GSH, osłabiają prądy wytwarzane przez NMDAR w FCX (Aizenman i wsp., 1990) oraz HIP (Do i wsp., 2009)

Co ważne, większość dowodów wskazuje na skuteczność leczenia związkami antyoksydacyjnymi w łagodzeniu objawów schizofrenii u zwierząt (Garcia-Partida i wsp., 2022). Wykazano, że N-acetylocysteina (NAC) stosowana jako dodatkowa terapia do atypowych leków przeciwpsychotycznych, skutecznie łagodzi wytwórcze, negatywne i ogólne objawy u pacjentów ze schizofrenią (Chen i wsp., 2016). Biorąc pod uwagę fakt, że cząsteczki przeciwutleniające, takie jak np. NAC, wykazują wysoki profil bezpieczeństwa, wyniki te sugerują korzystne działanie związków przeciwutleniających jako dodatkowa terapia w przebiegu schizofrenii.

1.5. Rola stanu zapalnego w schizofrenii

Stan zapalny w OUN ma dwojaki charakter – może mieć działanie neuroprotektcyjne lub neurotoksyczne (Holfheld i wsp., 2007). Ostra odpowiedź zapalna w OUN (np. ostre zapalenie mózgu) może stanowić stan zagrożenia życia w ciągu kilku godzin lub dni, podczas gdy przewlekłe zapalenie może być powiązane z upośledzeniem funkcji OUN utrzymującym się przez miesiące, lata, a nawet przez całe życie (Müller i wsp., 2015).

Wiele dowodów wskazuje na związek pomiędzy przewlekłym stanem zapalnym w OUN i schizofrenią oraz zwiększonymi poziomami cytokin prozapalnych i zaburzeniem bariery krew-mózg u pacjentów (Nakazawa i Sapkota, 2020). Co więcej, ostatnie badania wykazały zależność pomiędzy chorobą jaką jest schizofrenia a układem immunologicznym, a u pacjentów znaleziono przeciwciała związane z autoimmunizacją, takie jak przeciwciała anty-DNA, anty-histonowe lub anty-NMDAR (Reale i wsp., 2021).

Wcześniejsze badania wykazały, że zaburzenia inne niż obejmujące OUN (np. zaburzenia układu immunologicznego) występują z podobną częstością jak nieprawidłowości związane z OUN w pierwszym epizodzie psychiatrycznym (Pillinger i wsp., 2019). Dodatkowo, objawy schizofrenii, takie jak psychoza, zaobserwowano u pacjentów z rozpoznaniem wirusowego

zakażenia OUN (Chiveri i wsp., 2003), encefalicznej postaci stwardnienia rozsianego (Becker 1997), odry (Stein-Zamir i wsp., 2021) i innych (Müller i wsp., 2015).

Liczne badania wykazały także wpływ matczynej aktywacji immunologicznej (*maternal immune activation* - MIA) na zwiększone ryzyko wystąpienia schizofrenii u potomstwa, a jedną z pierwszych obserwacji był związek z wystąpieniem zwiększonej ilości przypadków psychoz i schizofrenii po pandemii grypy (Brown i wsp., 2010; Kępińska i wsp., 2020). Dalsze badania na modelach zwierzęcych potwierdziły rolę stanu zapalnego w patofizjologii schizofrenii i pokazały, że prenatalne zaburzenia w obrębie układu immunologicznego przyczyniają się zarówno do zmian morfologicznych, jak i czynnościowych w mózgu (Boksa i wsp., 2010). W zwierzęcych modelach choroby, w których wykorzystuje się prenatalną aktywację immunologiczną, dorosłe potomstwo wykazuje nieprawidłowy poziom cytokin we krwi na etapie rozwoju, który odpowiada wiekowi zachorowania na schizofrenię (Miller i wsp., 2011). Wykazano, że prenatalna ekspozycja na stan zapalny zmienia ekspresję genów w HIP i znaczne upośledza funkcje szlaków GABAergicznych, glutaminianergicznych i serotoninergergicznych, dając efekty podobne do tych obserwowanych w schizofrenii (de Bartolomeis i wsp., 2022). Podczas infekcji w czasie ciąży, cząsteczki prozapalne są w stanie dostać się do mózgu płodu wraz z krwią matki i aktywować dalszą odpowiedź zapalną poprzez zwiększenie poziomu cytokin i uwalnianie przeciwciał, które nasilają stan zapalny OUN. Kaskada reakcji związana z nasilonym stanem zapalnym negatywnie wpływa na fizjologiczne etapy rozwoju mózgu, takie jak mielinizacja, eliminacja synaps lub tworzenie się sieci neuronalnych (Barichello i wsp., 2020).

W 2009 roku Monji i współpracownicy przedstawili interesującą teorię schizofrenii związaną z procesem zapalnym. Zasugerowali, że czynniki stresujące, takie jak powikłania okołoporodowe czy infekcje, mogą prowadzić do aktywacji mikrogleju, a w efekcie do zwiększonego uwalniania cytokin prozapalnych. Te z kolei prowadzą do zaburzenia procesów neurogenezy, postępującej neurodegeneracji i zaburzeń w obrębie istoty białej, które przyczyniają się do patofizjologii choroby (Monji i wsp., 2009). Hipoteza ta wskazuje na ważną rolę procesów neurorozwojowych i immunologicznych w etiologii choroby.

Badając krew obwodową pacjentów ze schizofrenią można wnioskować, że występują u nich zaburzenia w obrębie różnych układów, w tym immunologicznego (Pillinger i wsp., 2019). Wyniki badań wskazują na nieprawidłowy poziom cytokin zarówno u pacjentów, jak i ich krewnych pierwszego stopnia, sugerując upośledzenie układu immunologicznego jako możliwy endofenotyp choroby (Miller i wsp., 2011). Wcześniejsze badania wykazały, że geny związane z układem odpornościowym, cytokinami i szlakami cytokin są powiązane ze

schizofrenią (Jia i wsp., 2010). Częsteczki związane ze stanem zapalnym były szeroko badane w schizofrenii i uważane za możliwe, łatwy do zmierzenia biomarker choroby oparty na badaniach krwi, który może być również przydatny w opracowaniu nowych metod leczenia.

IL-6 jest wydzielana przez różnego rodzaju komórki w przebiegu stanu zapalnego i jest najczęściej badaną cytokiną w kontekście patofizjologii o podłożu zapalnym, wykazując tym samym konsekwentnie zwiększone poziomy w badanych chorobach (Fond i wsp., 2020). Badania wskazują, że nadmierna ekspresja IL-6 w OUN jest głównym czynnikiem podtrzymującym przewlekły stan zapalny w zaburzeniach neurologicznych, m.in. w autoimmunologicznym zapaleniu mózgu (Hunter i Jones, 2015). Badania populacyjne wykazały korelację pomiędzy podwyższonym poziomem IL-6 w surowicy a ryzykiem wystąpienia epizodów psychiatrycznych u młodych ludzi (Khandaker i wsp., 2014). Pierwsza metaanaliza, która weryfikowała wyniki odnośnie związku poziomu cytokin i schizofrenii, wykazała istotny wzrost poziomu IL-6 u pacjentów z pierwszym epizodem psychicznym i ostrym nawrotem choroby (Borovcanin i wsp., 2017). Ponadto poziom IL-6 koreluje z wystąpieniem i intensywnością objawów wytwórczych (Chase i wsp., 2016), negatywnych (Kim i wsp., 2000) oraz poznawczych (Frydecka i wsp., 2015). Niemniej jednak niektóre badania wykazały brak korelacji między poziomem IL-6 a nasileniem wspomnianych symptomów (Chumakov i wsp., 2022). Wcześniejsze badania wykazały także obniżenie poziomu IL-6 po zastosowaniu farmakologicznego leczenia przeciwpsychotycznego (Miller i wsp., 2011).

Wyniki poprzednich badań wskazują, że IL-6 wpływa na neurotrasnmisję katecholamin, takich jak DA lub 5-HT, zwiększając ich wychwyt zwrotny w FCX i HIP. Ponadto IL-6 aktywuje szlak kynureninowy, który jest zaangażowany w kontrolę neurotransmisji glutaminianergicznej (Borovcanin i wsp., 2017). W badaniach przedklinicznych wykazano rolę IL-6 w rozwoju choroby. Iniekcje IL-6 podane gryzoniom spowodowały rozwój fenotypu behawioralnego charakterystycznego dla schizofrenii, który związany jest z nadmierną transmisją dopaminergiczną i charakteryzuje się zachowaniem takim jak zwiększona aktywność lokomotoryczna czy uwrażliwienie zwierząt na stymulujące działanie amfetaminy. Wyniki te sugerują rolę i zaangażowanie mezo limbicznego szlaku dopaminergicznego (Girgis i wsp., 2014). Dodatkowo wykazano, że cytokiny prozapalne wpływają na rozwój sieci neuronalnych - badania pokazały, że IL-6 zmniejsza przeżywalność komórek serotoninergetycznych, podczas gdy IL-1 β indukuje konwersję szczurzych komórek progenitorowych w komórki dopaminergiczne (Müller, 2018). Ketamina lub MK-801, których iniekcje są dobrze znanym i szeroko stosowanym modelem farmakologicznym

schizofrenii u zwierząt, prowadzą do wzrostu markerów prozapalnych, w tym IL-6 u zwierząt (Bae i wsp., 2023). Co więcej, nadmierna ekspresja IL-6 może być związana z wystąpieniem deficytów poznawczych, które są obserwowane w przebiegu schizofrenii. Zaburzenia te są szeroko badane w modelach zwierzęcych i dotyczą deficytów takich jak zaburzenia pamięci przestrzennej, zaburzenia procesów uczenia się i długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (Tancredi i wsp., 2000; Balschun i wsp., 2004).

Białko C-reaktywne (*C reactive protein* - CRP), obok innych czynników immunologicznych, zostało szeroko zbadane w przebiegu psychoz. Badania wykazały, że CRP wiąże się z wyższym odsetkiem objawów wytwórczych (ale nie negatywnych), a wyższe poziomy CRP są związane z pogorszeniem funkcji poznawczych (Chumakov i wsp., 2022). Co więcej, badania wykazały, że stopień zaawansowania choroby ma wpływ na poziom CRP i jest on wyższy u osób z dłuższym czasem trwania schizofrenii. Jednak niektóre rezultaty wskazały na brak zmian w poziomach CRP, które były porównywane na różnych stadiach choroby (Chumakov i wsp., 2022).

Poza zwiększonymi poziomami cytokin prozapalnych, dostępna literatura donosi również o zaburzonym poziomie cząsteczek przeciwzapalnych u pacjentów ze schizofrenią, a zaburzenia te mogą wpływać na stan kliniczny pacjentów i wyniki neuroobrazowania (Dawidowski i wsp., 2021). Poziomy cytokin, takich jak interleukina 10 (IL-10) (Trovão i wsp., 2019) lub interleukina 4 (IL-4) (Nani i wsp., 2022) są obniżone u pacjentów z diagnozą schizofrenii w porównaniu do osób zdrowych, co sugeruje zaburzenia równowagi procesów pro- i przeciwzapalnych w przebiegu choroby (Dawidowski i wsp., 2021).

Biorąc pod uwagę zwiększenie poziomów markerów stanu zapalnego i ich wpływ na zaburzenia obserwowane w schizofrenii, oczekiwanym efektem leczenia przeciwpsychotycznego powinno być zmniejszenie nasilenia stanu zapalnego, jednak działanie farmakoterapii przeciwpsychotycznej zależy od rodzaju stosowanych leków. Badania wykazały, że typowe leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji (*first generation antipsychotics* – FGA) obniżają poziom cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6 czy TNF- α , u pacjentów ze schizofrenią. W badaniach na zwierzętach, leczenie haloperidolem spowodowało spadek poziomów IL-1 β i TNF- α . Z drugiej strony, leki atypowe (drugiej generacji, *second generation antipsychotics* – SGA) mogą nasilać odpowiedź immunologiczną - np. kłozapina zwiększa poziom markerów prozapalnych (Na i wsp., 2012). Stwierdzono, że risperidon, inny lek z grupy SGA, obniża poziom cytokin, takich jak IL-6 czy IL-1 β w pierwszym etapie leczenia, jednak po dłuższym stosowaniu zwiększa poziom cząsteczek prozapalnych u pacjentów ze schizofrenią (Song i wsp., 2014). Niejednoznaczne

wyniki badań weryfikujących wpływ leków przeciwpsychotycznych na stan zapalny mogą być spowodowane tym, że wpływają na odpowiedź immunologiczną zarówno w sposób bezpośredni, jak i pośredni (Na i wsp., 2012). Niemniej jednak większość dowodów wskazuje, że terapia addytywna z wykorzystaniem związków przeciwzapalnych, jako dodatkowymi do farmakoterapii przeciwpsychotycznej, jest korzystna dla pacjentów i prowadzi do lepszych rezultatów niż użycie wyłącznie leków przeciwpsychotycznych (Sommer i wsp., 2014).

1.6. Metody leczenia schizofrenii

Farmakoterapia jest podstawą leczenia schizofrenii i stabilizacji klinicznej pacjentów (Giordano i wsp., 2022). Pierwszy lek przeciwpsychotyczny, chloropromazyna, został odkryty i wprowadzony w latach 50-tych XX wieku (Ban, 2007). Od tego czasu na rynku pojawiły się różne inne środki farmakologiczne, które pomimo odmiennej budowy chemicznej mają jedną wspólną cechę: silnie blokują receptory dopaminowe (D_2R) (Li i wsp., 2016).

Leki przeciwpsychotyczne z grupy FGA są reprezentowane głównie przez chloropromazynę i haloperidol i są wysoce skuteczne w redukowaniu objawów wytwórczych, takich jak halucynacje czy urojenia (Chokhawala i Stevens, 2022), jednak charakteryzują się niską selektywnością odnośnie miejsca działania - nie wykazują selektywności wobec żadnego ze szlaków DA w mózgu (Li i wsp., 2016; Stępnicki i wsp., 2018). Wykazano, że FGA oddziałują również z receptorami cholinergicznymi, adrenergicznymi i histaminergicznymi i ta cecha jest odpowiedzialna za występowanie skutków ubocznych (Miyamoto i wsp., 2005). Najbardziej dotkliwym działaniem niepożądanym jest efekt pozapiramidowy – dysfunkcje ruchowe, takie jak dystonia, drżenie, spowolnienie ruchowe i sztywność mięśni, powstające w wyniku blokady D_2R w szlaku nigrostriatalnym (Stępnicki i wsp., 2018; Giordano i wsp., 2022). Ponadto leki z grupy FGA mogą wywoływać skutki uboczne takie jak hiperprolaktynemia - w wyniku blokady D_2R w szlaku guzkowo-lejkowym (Leppien i wsp., 2019) i pogorszenie funkcji poznawczych (efekt blokady transmisji DA w szlaku mezokortykalnym), które wraz z dysfunkcją motoryczną wiążą się z wysokim poziomem blokowania D_2R (Li i wsp., 2016).

Dodatkowo wykazano, że typowe leki przeciwpsychotyczne mają negatywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy i mogą prowadzić do wystąpienia tachykardii, hipotonii lub arytmii u pacjentów (Arana, 2000).

Mimo, że leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji, takie jak haloperidol czy chloropromazyna, znacząco przyczyniły się do leczenia schizofrenii, nie wywierają one zadowalającego wpływu na objawy negatywne i poznawcze. Dodatkowo wykazują niewielką skuteczność w niwelowaniu objawów wytwórczych u pacjentów opornych na farmakoterapię. Co więcej, w przypadku innych objawów współwystępujących, takich jak zachowania depresyjne lub pogorszenie funkcji poznawczych, ich skuteczność może być trudna do oceny (Ishigooka i wsp., 2001). W związku z tym przez lata intensywnie opracowywano i badano nowe klasy leków w celu poprawy standardów leczenia farmakologicznego schizofrenii. Na przestrzeni ostatnich lat leki przeciwpsychotyczne z grupy FGA były stopniowo wypierane przez nowsze leki atypowe, głównie ze względu na lepszą tolerancję i mniejsze ryzyko wystąpienia motorycznych skutków ubocznych (Stępnicki i wsp., 2018).

Klozapina była pierwszym atypowym lekiem przeciwpsychotycznym i została wprowadzona do klinik w 1990 roku (Orzelska-Górka i wsp., 2022). Zarówno typowe, jak i atypowe leki przeciwpsychotyczne mają wspólną farmakologiczną zdolność do blokowania transmisji DA przez D₂R (Ohmori, 2013), jednak z różnym potencjałem, a leki z grupy SGA wykazują większą selektywność. Atypowe leki przeciwpsychotyczne mają zdolność do wiązania się z wieloma receptorami dla monoamin w mózgu (Bymaster i wsp., 1996). Klozapina i inne związki z grupy SGA, takie jak risperidon czy olanzapina, poza zdolnością do blokowania transmisji DA w szlaku mezolimbicznym, wykazują antagonizm względem receptorów 5-HT_{2A} (Orzelska-Górka i wsp., 2022). Blokada receptora 5-HT_{2A} wywiera pośrednie działanie przeciwpsychotyczne poprzez zmniejszenie transmisji DA, które z kolei spowodowane jest przez zmniejszone uwalnianie GLU w VTA (Pourhamzeh i wsp., 2022).

W porównaniu z lekami z grupy FGA, atypowe leki przeciwpsychotyczne wykazują mniejsze ryzyko efektów pozapiramidowych (Shulman i wsp., 2014), wykazują większą skuteczność w łagodzeniu negatywnych czy wytwórczych objawów schizofrenii oraz wykazują lepszy efekt w łagodzeniu ogólnych symptomów choroby (Leucht i wsp., 2009). Związki z grupy SGA są jednak obciążone zaburzeniami w obrębie układu hormonalnego, sercowo-naczyniowego i metabolicznego, w tym cukrzycą typu II, przyrostem masy ciała czy dyslipidemią (Hasnain i wsp., 2009). Niektóre badania wykazały, że metaboliczne skutki uboczne leków przeciwpsychotycznych mogą niekorzystnie wpływać na zdolności poznawcze osób ze schizofrenią (Bora i wsp., 2017), a tym samym negatywnie oddziaływać na wynik leczenia. Dodatkowo nawet u 30% pacjentów ze schizofrenią obserwuje się słabą odpowiedź lub nawet oporność na atypowe leki przeciwpsychotyczne (Harvey i Rosenthal, 2016). Jednak ogólna odpowiedź na leczenie farmakologiczne wydaje się zależeć od czasu trwania choroby i

historii leczenia farmakologicznego, ponieważ dłużej trwające epizody czy wcześniejsze stosowanie leków przeciwpsychotycznych pogarszają ogólne efekty leczenia (Sinkeviciute i wsp., 2021).

W dostępnej literaturze istnieją spójne dowody na to, że pozapiramidowe skutki uboczne występują częściej u osób stosujących leki z grupy FGA w porównaniu z pacjentami leczonych związkami z rodziny SGA (Giordano i wsp., 2022). Stwierdzono, że atypowe leki przeciwpsychotyczne są bardziej skuteczne w łagodzeniu objawów poznawczych w porównaniu z FGA (Vita i wsp., 2018). Warto zauważyć, że blokada transmisji dopaminergicznej w brzusznych obszarach STR przez typowe leki przeciwpsychotyczne może negatywnie wpływać na motywację i procesy afektywne, a w efekcie nasilać objawy negatywne (Howes i wsp., 2017). Dodatkowo wykazano, że obecność dysfunkcji motorycznych wywołanych przez związki z grupy FGA może pogłębiać deficyty poznawcze i powodować wtórne objawy negatywne (np. poznanie społeczne), pośrednio wpływając na efekt leczenia (Monteleone i wsp., 2021).

Wiele dowodów wskazuje na przewagę atypowych leków przeciwpsychotycznych nad typowymi w leczeniu schizofrenii (Medici i wsp., 2020). Ze względu na złożoność choroby, mało prawdopodobnym jest, aby leki o zawężonym polu działania względem receptorów były efektywne w niwelowaniu symptomów schizofrenii (Orzelska-Górka i wsp., 2022), ponieważ patofizjologia choroby obejmuje wiele układów neuroprzekaźników. Co więcej, obecnie stosowane terapie farmakologiczne wydają się być skuteczne tylko u połowy pacjentów (Stroup i wsp., 2000), wykazując działanie głównie w łagodzeniu objawów psychotycznych (Carbon i wsp., 2014).

Jak wspomniano wyżej, żaden z opracowanych już leków nie jest wolny od skutków ubocznych, dlatego istnieje realna i pilna potrzeba poszukiwania nowych, bezpieczniejszych terapii. Ze względu na fakt, że leczenie schizofrenii często jest długotrwałe, a nawet trwające całe życie, istnieje potrzeba poszukiwania dobrze tolerowanego sposobu leczenia farmakologicznego, które będzie w stanie złagodzić, poza wytwórczymi, także negatywne i poznawcze symptomy choroby.

1.6.1. Olanzapina i jej zastosowanie w leczeniu schizofrenii

Olanzapina jest tienobenzodiazepiną, chemicznym analogiem klozapiny o dobrze poznanych właściwościach farmakologicznych i działa głównie na receptory DA i 5-HT (Laguado i Saklad, 2022). Olanzapina uważana jest za jeden z najskuteczniejszych środków w leczeniu schizofrenii (Meftah i wsp., 2020). Przez blokowanie mezo limbicznych D₂R, zapobiega potencjalnemu działaniu DA na receptory postsynaptyczne (Thomas i Saadabadi, 2022), jednak selektywność olanzapiny dla D₂R jest znacznie niższa niż dla typowych leków przeciwpsychotycznych. Antagonistyczne działanie olanzapiny na receptory 5-HT_{2A} jest silniejsze niż na D₂R, natomiast działanie antagonistyczne olanzapiny wobec 5-HT_{2C} jest podobne do D₂R. Dodatkowo, olanzapina działa na receptory α₁-adrenergiczne, H₁-histaminergiczne i muskarynowe M₁₋₅ jako antagonistę (Pryor i Storer, 2019).

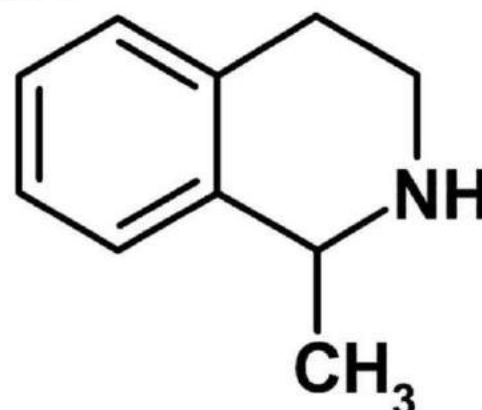
Wpływ olanzapiny na układ serotoninergiczny prowadzi do złagodzenia negatywnych objawów schizofrenii, takich jak spłaszczenie afektu, awolucja czy alogia (Tollens i wsp., 2018). Co ważne, olanzapina wykazuje niski profil toksyczności (Thomas i Saadabadi, 2022). Jako atypowy typ leku przeciwpsychotyczny, olanzapina charakteryzuje się niskim ryzykiem wystąpienia objawów pozapiramidowych wśród leczonych pacjentów (Ishigooka i wsp., 2001). Jednak, podobnie jak inne leki przeciwpsychotyczne, stosowanie olanzapiny jest obciążone skutkami ubocznymi, takimi jak zwiększony apetyt, przyrost masy ciała i zmniejszona wrażliwość na insulinę, co może prowadzić do zaburzeń tolerancji glukozy (Nicoool i wsp., 2018; Thomas i Saadabadi, 2022).

1.7. Charakterystyka 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (1MeTIQ)

1-Metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina (1MeTIQ) jest endogenną aminą występującą w mózgu ssaków, m. in. gryzoni, małp i człowieka (Niwa i wsp., 1987; Ohta i wsp., 1987; Igarashi i wsp., 1999). 1MeTIQ został odkryty w 1986 roku przez Kohno i współpracowników w mózgu zdrowego szczura jako metylowa pochodna tetrahydroizochinoliny (TIQ) (Kohno i wsp., 1986).

Ponadto stwierdzono obecność 1MeTIQ w **Rys. 1**

żywności bogatej w 2-fenyletyloaminę (*phenethylamine* - PEA), m.in. w kakao, serze i winie (Makino i wsp., 1988), z którego w niezmienionej postaci jest w stanie łatwo przeniknąć przez barierę krew-mózg (Kikuchi i wsp., 1991). Dodatkowo, 1MeTIQ może być syntetyzowany enzymatycznie z PEA i pirogronianu w mózgu (Yamakawa i Ohta, 1997). Syntetyzujący enzym – 1MeTIQaza – jest obecny w mitochondriach frakcji



Rys. 1: Wzór strukturalny 1MeTIQ

synaptosomalnej mózgu szczura (Tasaki i wsp., 1993), a jego aktywność wykazuje najwyższe wartości w strukturach związanych z DA, takich jak STR, istota czarna (*substantia nigra* – SN) i CX, jednocześnie malejąc wraz z wiekiem (Ayala i wsp., 1994; Absi i wsp., 2002). W obszarach mózgu, takich jak HIP, PFC czy podwzgórze (*hypothalamus* – HTH), nie zaobserwowano zmian w aktywności 1-MeTIQazy (Absi i wsp., 2002). Wcześniejsze badania na małpach wykazały, że regionalny rozkład aktywności 1MeTIQazy i 1MeTIQ jest powiązany (Yamakawa i Ohta, 1999).

1MeTIQ może występować w postaci stereoizomerów R- i S-, jednak ich działanie biologiczne jest zbliżone (Wąsik i wsp., 2012). Natomiast wcześniejsze badania wykazały, że w żywności i w mózgu 1MeTIQ występuje jako racemat (Makino i wsp., 1990). Stężenie 1MeTIQ w zdrowym mózgu szczura oszacowano na około 3.5 ng/g tkanki, co kilkukrotnie przekracza stężenia innych związków z grupy tetrahydroizochinolin. W mózgu małpy zaobserwowano najwyższe poziomy 1MeTIQ w strukturach silnie dopaminowych, takich jak STR i SN (Inoue i wsp., 2008).

1.7.1. Właściwości neuroprotektcyjne 1MeTIQ

1MeTIQ wykazuje dobrze udokumentowane właściwości neuroprotektcyjne, co wiąże się z jego hamującym wpływem na aktywność enzymów monoaminooksydazy (MAO) (Patsenka i Antkiewicz-Michaluk, 2004). Wykazano, że 1MeTIQ ma działanie hamujące na enzymy MAO-A i MAO-B i właściwość ta wydaje się być kluczowa dla jego działania neuroprotektyjnego. Badania przedkliniczne *in vitro* wykazały, że 1MeTIQ, w przeciwieństwie do innych tetrahydroizochinolin, hamuje aktywność enzymów MAO-A i

MAO-B związanych z utlenianiem DA i produkcją wolnych rodników w przebiegu reakcji Fentona (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2006). Dodatkowo, 1MeTIQ nasila katabolizm monoamin zależny od enzymu katecholo-O-metylotransferazy (COMT) oraz procesy O-metylacji (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2006), które nie są związane z generacją wolnych rodników. MAO to rodzina enzymów zlokalizowanych w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i zaangażowanych w procesy oksydacyjne różnych amin i procesy deaminacji neuroprzekaźników (Duarte i wsp., 2021). W reakcji deaminacji kontrolowanej przez MAO powstaje nadtlenek wodoru (H_2O_2), który może prowadzić do powstania wolnych rodników (Duarte i wsp., 2021) powodujących zarówno strukturalne, jak i funkcjonalne uszkodzenia komórek. OS spowodowany obecnością wolnych rodników jest uznawany za istotny czynnik różnych schorzeń, takich jak choroba Alzheimera (AD) (Chen i Zhong, 2014), choroba Parkinsona (PD) (Trist i wsp., 2019) czy depresja (Black i wsp., 2015). Wiele dowodów wskazuje na rolę OS również w schizofrenii (Upthegrove i Khandaker, 2020). Głównym źródłem wolnych rodników w mózgu są reakcje katalizowane przez MAO, np. deaminacja bioamin w procesach katabolicznych DA (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2014). Kolejną istotną cechą 1MeTIQ jest fakt, że wywiera on silne działanie antydopaminergiczne, hamując nienaturalne wzmocnienie transmisji DA (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2001), co może mieć kluczowe znaczenie dla jego korzystnego działania w schizofrenii, gdyż nasiloną transmisja DA wydaje się być podstawową cechą choroby. Badania *in vitro* wykazały, że 1MeTIQ wypiera agonistę receptora DA - [3H]-apomorfinę, ale nie antagonistę DA ([3H]-spiperon) z miejsca wiązania receptora. Obserwacje te sugerują oddziaływanie 1MeTIQ z aktywną (agonistyczną) formą receptora DA (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2007), co może tłumaczyć fakt, że 1MeTIQ nie powoduje objawów pozapiramidowych (Wąsik i wsp., 2010). Dobrze udokumentowane są ochronne właściwości 1MeTIQ w dopaminergicznych strukturach mózgu. Wcześniejsze badania *in vivo* i *ex vivo* wykazały, że wielokrotne iniekcje 1MeTIQ są w stanie zapobiegać zaburzeniom neurotransmisji DA, wywierać działanie neuroprotekcyjne na komórki dopaminergiczne i utrzymywać prawidłowe, fizjologiczne funkcje neuronów dopaminowych (Wąsik i wsp., 2018). Co więcej, wielokrotne podania 1MeTIQ nie prowadzą do rozwoju tolerancji, co oznacza, że siła działania związku nie zmniejsza się wraz z kolejnymi podaniami (Wąsik i wsp., 2016). Inną istotną właściwością 1MeTIQ jest to, że wpływa on również na transmisję glutaminianergiczną. Badania wykazały, że 1MeTIQ działa jako antagonist NMDAR, jednak jego powinowactwo do NMDAR jest 1000 razy słabsze niż MK-801 i jest obserwowane w stężeniach μ -molowych (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2006). Wyniki eksperymentów *in vitro*

wykazały, że 1MeTIQ jest związkiem zdolnym do hamowania ekscytotoksyczności indukowanej GLU, nadmiernego napływu Ca^{2+} i zapobiegania śmierci komórek spowodowanej neurotoksycznością GLU (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2006). Co ciekawe, 1MeTIQ jest zdolny do indukcji wzrostu poziomu BDNF i czynnika wzrostu nerwów (*nerve growth factor* - NGF) (Kikuchi i wsp., 1991), które wydają się być zaburzone w przebiegu schizofrenii (Turkmen i wsp., 2021).

Podsumowując, neuroprotektoryjne działanie 1MeTIQ jest spowodowane zdolnością do hamowania MAO, głównego enzymu związanego z utlenianiem monoamin, a także zmiatania wolnych rodników i hamowania ekscytotoksyczności indukowanej GLU (Wąsik i Antkiewicz-Michaluk, 2017).

Co więcej, wcześniejsze badania donosiły o istotnych właściwościach przeciwdepresyjnych 1MeTIQ. W zwierzęcych modelach depresji, takich jak model rezerpinowy czy klonidynowy, wykazano, że 1MeTIQ łagodzi zachowania podobne do depresji (Wąsik i wsp. 2014; Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2017), skracając czas bezruchu w teście wymuszonego pływania (*forced swimming test* - FST). Ponadto wykazano, że przeciwdepresyjny potencjał 1MeTIQ w FST zbliżony jest siłą działania do imipraminy - klasycznego leku przeciwdepresyjnego (Wąsik i wsp., 2013). Badania neurochemiczne potwierdzają przeciwdepresyjne działanie 1MeTIQ (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2017). Efekt przeciwdepresyjny 1MeTIQ może być związany z jego złożonym i szerokim mechanizmem działania w OUN. 1MeTIQ reguluje stężenie monoamin: DA, NA i 5-HT poprzez odwracalne hamowanie aktywności MAO, wpływa na aktywność receptorów NMDA, a także ma właściwości zmiatacza wolnych rodników (Wąsik i wsp., 2014). Co ciekawe, ostatnie badania przedkliniczne wskazują na skuteczność leczenia skojarzonego lekami przeciwdepresyjnymi i nieaktywną dawką leków przeciwpsychotycznych w łagodzeniu objawów negatywnych i poznawczych schizofrenii (Hereta i wsp., 2020).

Biorąc pod uwagę neuroprotektoryjne i przeciwdepresyjne działanie 1MeTIQ, jego zdolność do kontrolowania transmisji monoaminergicznej oraz wpływ na aktywność receptorów NMDA, jest wysoce prawdopodobne, że 1MeTIQ może wywierać korzystny wpływ na symptomy związane ze schizofrenią.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena przeciwpsychotycznego potencjału endogennej aminy, 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (1MeTIQ) badanego w zwierzęcych modelach schizofrenii w testach behawioralnych, biochemicznych i molekularnych oraz porównanie jego efektów z atypowym lekiem przeciwpsychotycznym - olanzapiną.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Zwierzęta

W eksperymentach wykorzystano samce szczurów szczepu Sprague Dawley o wadze początkowej 225-250 g. Zwierzęta bytowały w poliakrylowych klatkach (5 osobników w klatce) z nieograniczonym dostępem do wody oraz pożywienia, w warunkach sztucznego rytmu dzień/noc (12 godzin/12 godzin) w temperaturze $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Wszystkie eksperymenty na zwierzętach zostały przeprowadzone po uzyskaniu stosownej zgody Lokalnej Komisji Etycznej i były przeprowadzone zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi minimalizacji bólu i cierpienia zwierząt (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych).

3.2. Testy behawioralne

3.2.1. Test podniesionego labiryntu krzyżowego (Elevated Plus Maze – EPM)

Pleksiglasowy labirynt krzyżowy został podniesiony do wysokości 50 cm i składał się z dwóch ramion otwartych (40×12 cm) i dwóch ramion zamkniętych ($40 \times 12 \times 20$ cm), umieszczonych prostopadle do siebie i rozciągających się z centralnej platformy (12×12 cm). Eksperymenty zostały przeprowadzone w oświetleniu o średniej intensywności (30 lux). Zwierzę zostało umieszczone w centralnej części labiryntu, przodem do otwartego ramienia. Czas testu dla każdego zwierzęcia wynosił 5 minut i został zarejestrowany kamerą przy pomocy systemu Any-maze®. W czasie testu zostały zmierzone parametry określające poziom lęku u zwierząt: % wejść do otwartych ramion i % czasu spędzony w otwartych ramionach. Dodatkowo zmierzono całkowitą liczbę wejść do ramion (zarówno otwartych, jak i zamkniętych) oraz liczbę wspięć, jako wskaźnik aktywności lokomotorycznej zwierząt. Wspięcia traktowano jako uniesienie tułowia zwierzęcia, opierającego się na tylnych kończynach. Aparat został dokładnie wyczyszczony po każdym teście.

Grupa kontrolna otrzymała roztwór soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Zwierzęta otrzymały także następujące związki: 1MeTIQ (w dawce 25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapinę (w dawce 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych, 20 minut przed dootrzewnową iniekcją ketaminy (10 mg/kg, i.p.), zwierzęta otrzymały dootrzewnową iniekcję 1MeTIQ (w dawce 25 lub 50

mg/kg, i.p.) lub olanzapinę (3 mg/kg, i.p.). Test został przeprowadzony 90 minut po iniekcji ketaminy. Każda z grup liczyła 10 osobników. Dawki leków zostały wyznaczone na podstawie poprzednich badań (w przypadku 1MeTIQ) oraz na podstawie literatury (w przypadku ketaminy i olanzapiny).

Po zakończonym eksperymencie zwierzęta zostały poddane dekapitacji, a struktury (FCX, HIP, STR) zostały pobrane i natychmiast umieszczone w suchym lodzie (-70°C) do czasu dalszej analizy biochemicznej.

3.2.2. Test rozpoznawania nowego obiektu (*Novel Object Recognition Test - NORT*)

Zwierzęta zostały poddane testowi rozpoznawania nowego obiektu w aparacie otwartego pola o wymiarach 60×60×25 cm w warunkach oświetlenia o średniej intensywności (20 lux). Test składał się z adaptacji (24 h przed właściwym testem) oraz dwóch faz (T1 i T2) o interwale trwającym 1 h pomiędzy fazami:

- adaptacja: zwierzę zostało umieszczone w pustym aparacie typu otwartego pola i mogło przez 5 minut swobodnie eksplorować środowisko;
- faza 1 (T1): dwa identyczne obiekty (puszki wypełnione piaskiem i owinięte szarą taśmą) zostały umieszczone w aparacie obok siebie w odległości 15 cm od ścian aparatu. Zwierzę mogło dowolnie eksplorować obiekty przez okres 5 minut. Po zakończeniu fazy T1 zwierzę wróciło do swojej klatki domowej;
- faza 2 (T2): dwa różne obiekty (jeden obiekt użyty w T1 - *familiar object*; FO i jeden nowy - szklana butelka wypełniona wodą - *novel object*; NO) o zbliżonym rozmiarze zostały umieszczone w aparacie w odległości 15 cm od ścian aparatu. Zwierzę mogło dowolnie eksplorować obiekty przez okres 5 minut.

Fazy T1 i T2 zostały zarejestrowane przy użyciu kamery oraz oprogramowania Any-maze®. Zmierzono następujące parametry: czas eksploracji każdego obiektu (zarówno w fazie T1, jak i T2). Na podstawie czasu eksploatacji wyznaczono parametry takie jak: indeks rozpoznania (*recognition index - RI* = czas eksploracji NO / [czas eksploracji NO + czas eksploracji FO]) oraz indeks dyskryminacji (*discrimination index - DI* = [czas eksploracji NO - czas eksploracji FO] / [czas eksploracji NO + czas eksploracji FO]).

Umieszczenie nowego obiektu w fazie T2 było losowe, aby uniknąć zjawiska preferencji miejsca. Eksploracja była definiowana jako oglądanie, lizanie, wąchanie bądź dotykanie obiektów przez zwierzę. Każdy z obiektów był wystarczająco ciężki, aby nie został

przewrócony bądź przesunięty przez zwierzę w czasie trwania testu. Po każdym teście aparat został dokładnie wyczyszczony.

Grupa kontrolna otrzymała roztwór soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Zwierzęta otrzymały także następujące związki: 1MeTIQ (w dawce 25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapinę (w dawce 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych, 30 minut przed dootrzewnowym podaniem ketaminy (20 mg/kg, i.p.), zostały podane dootrzewnowo 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapina (3 mg/kg, i.p.). Test rozpoznawania nowego obiektu został przeprowadzony 30 minut po podaniu ketaminy. Każda z grup liczyła 10 osobników. Dawki 1MeTIQ zostały wyznaczone na podstawie poprzednich badań, natomiast dawki ketaminy i olanzapiny na podstawie dostępnej literatury.

3.2.3. Test interakcji socjalnych (*Social Interaction Test* - SIT)

Test interakcji socjalnych został przeprowadzony w aparacie typu otwartego pola (60×60×25 cm) w warunkach umiarkowanego oświetlenia (18 lux). 24 godziny przed właściwym testem zwierzęta zostały umieszczone kolejno w aparacie w celu habituacji.

W każdym z testów udział brały dwa osobniki, dobrane na podstawie wagi (maksymalna różnica wagi: 15 g), otrzymanych związków (osobniki otrzymały iniekcje tych samych związków), natomiast nie bytowały w jednej klatce.

Każda z par została umieszczona w przeciwległych bokach aparatu. Czas zachowań socjalnych zwierząt takich jak obwąchiwanie (również ano-genitalne), wzajemne ściganie czy walka, został zmierzony manualnie przez eksperymentatora w czasie 10 minut trwania testu dla każdej z par. Dodatkowo zmierzono liczbę incydentów socjalnych. Każda z grup liczyła 12 osobników (6 par zwierząt).

Zwierzęta otrzymały podskórną iniekcję MK-801 (0.1 mg/kg, s.c.) 240 minut przed testem. 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapina (3 mg/kg, i.p.) zostały podane dootrzewnowo 30 minut przed testem (w grupach łącznych - 210 minut po podaniu MK-801). W przypadku chronicznych podań 1MeTIQ (w dawce 25 mg/kg, i.p.), podania miały miejsce przez 7 dni, przy czym ostatnie - siódme podanie miało miejsce 30 minut przed testem. Grupa kontrolna otrzymała roztwór soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.).

Dawki 1MeTIQ zostały ustalone na podstawie wcześniejszych badań, natomiast dawki MK-801 oraz olanzapiny zostały ustalone na podstawie dostępnej literatury.

3.2.4. Test pamięci strachu (*Fear Memory Test – FMT*)

Warunkowanie strachu (*fear conditioning - FC*) i test pamięci warunkowanej strachem zostały wykonane z wykorzystaniem dwóch różnych aparatów i kontekstów (kontekst A i kontekst B). Każda z jednostek aparatu składała się z obudowy wygłuszającej z głośnikiem, kamery, wentylatora, czterech symetrycznie rozmieszczonych lamp i aparatu testowego.

W kontekście A, aparat o wymiarach 46×46×47 cm został wykonany z przezroczystego akrylu. Podłoga została wykonana z prętów z nierdzewnej stali (o średnicy 4 mm i odstępach 8.9 mm pomiędzy nimi), które zostały podłączone do prądu, z możliwością wysyłania impulsów elektrycznych o określonej sile i długości trwania. Aparat został wyposażony także w wentylator generujący dźwięk (tzw. “biały szum”) o natężeniu 65 dB i lampy o natężeniu światła 60 lux.

Aparat wykorzystany do testu był czyszczony 1% roztworem kwasu octowego. Podczas testu w kontekście A, światła w pokoju eksperymentalnym zostały włączone. Zwierzęta były transportowane do pokoju eksperymentalnego w przezroczystych, plastikowych klatkach. Eksperymentatorzy nosili białe fartuchy i rękawiczki.

W kontekście B, aparat o wymiarach 46×46×47 cm został wykonany z czarnego akrylu, natomiast podłoga z szarego plastiku. Aparat był czyszczony 70% roztworem alkoholu etylowego. Natężenie oświetlenia aparatu, w którym zwierzęta zostały poddane testom, wynosiło 4 lux, natomiast światło w pokoju eksperymentalnym zostało wyłączone na czas testu. Zwierzęta były transportowane do pokoju eksperymentalnego w czarnych, plastikowych pudełkach. Eksperymentatorzy nosili niebieskie fartuchy i rękawiczki.

Warunkowanie strachu i pamięć zostały oceniane wykorzystując paradygmat Pawłowa. W dzień 1 eksperymentu, wszystkie zwierzęta zostały poddane warunkowaniu strachu w kontekście A. Grupa kontrolna otrzymała dootrzewnową iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Dootrzewnowa iniekcja 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) lub olanzapiny (3 mg/kg, i.p.) miała miejsce 35 minut przed poddaniem zwierząt treningowi, natomiast dootrzewnowa iniekcja MK-801 (0.3 mg/kg, i.p.) została wykonana 15 minut przed treningiem. W grupach łącznych zwierzęta najpierw otrzymały podania 1MeTIQ lub olanzapinę (35 minut przed treningiem), natomiast MK-801 zostało podane po 20 minutach od podania 1MeTIQ lub olanzapiny (15 minut przed fazą treningu). W przypadku wielokrotnych podań 1MeTIQ (również w dawce 25 mg/kg, i.p.), zwierzęta otrzymywały codzienne iniekcje przez 6 dni poprzedzających test. Ostatnia dawka 1MeTIQ została podana w dniu eksperymentu, w czasie określonym powyżej.

Zwierzęta zostały umieszczone w aparacie w kontekście A i zostały poddane habituacji trwającej 180 sekund. Następnie zwierzęta otrzymały 5 sparowanych bodźców dźwięk - szok elektryczny (dźwięk o amplitudzie 80 dB, częstotliwości 2 kHz i czasie trwania 10 sekund; bodziec elektryczny o natężeniu 1 mA i czasie trwania 1 sekundy). Przerwy pomiędzy bodźcami wynosiły 60 sekund. Zwierzęta zostały zabrane z kontekstu A 60 sekund po ostatnim bodźcu.

W drugi dzień eksperymentu, zwierzęta po raz kolejny zostały umieszczone w kontekście A i pozostawione w aparacie na 6 minut (w celu sprawdzenia ekspresji strachu uwarunkowanego kontekstem (*contextual fear conditioning* - CFC), po czym powróciły do swoich klatek. Dwie godziny później, zwierzęta zostały umieszczone w kontekście B i poddane habituacji przez 180 sekund. Następnie zwierzętom pięciokrotnie zaprezentowano bodziec dźwiękowy w odstępach 61 sekund, w celu zmierzenia reakcji strachu uwarunkowanego bodźcem dźwiękowym (*auditory fear conditioning* - AFC). Zachowanie zwierząt w każdej z poszczególnych sesji eksperymentu było automatycznie rejestrowane i analizowane przy pomocy kontrolowanego przez komputer systemu (TSE, Bad Homburg, Germany), tak jak opisano w protokole (Białoń i wsp., 2021). Reakcja bezruchu (tzw. *freezing*) stanowiła miarę strachu zwierząt i była definiowana jako brak jakichkolwiek ruchów (niebędących ruchami oddechowymi) przez co najmniej 2 sekundy. Całkowita suma czasu bezruchu została zmierzona dla każdej z sesji i wyrażona jako procent całkowitego czasu trwania sesji (z wyjątkiem czasu habituacji w przypadku AFC).

3.3. Badania biochemiczne i molekularne

3.3.1. Badania biochemiczne *ex vivo* w wybranych strukturach tkanki mózgowej (FCX, HIP, STR)

Poziomy DA i jej metabolitów: zewnątrzneuronalnej 3-metoksytyraminy (3-MT), wewnątrzneuronalnego kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC) i końcowego kwasu hmowanilinowego (HVA); 5-HT i jej metabolitu kwasu 5-hydroksyindoloctowego (5-HIAA) oraz NA i jej metabolitu normetanefryny (NM), zostały zmierzone w homogenatach poszczególnych struktur przy pomocy aparatu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej z elektrochemiczną detekcją (HPLC-ED) wyposażonego w kolumnę C18. Tkanka została zważona a następnie poddana homogenizacji w 0.1 M kwasie trichlorooctowym zawierającym 0.05 mM kwasu askorbinowego. Homogenat został poddany wirowaniu

(10 000×g, 5 min.). Następnie zebrany supernatant został przefiltrowany przez membranę celulozową (RC58 0.2-μm). Faza ruchoma składała się z: 0.05 M buforu cytrynianowo-fosforanowego o pH 3.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM oktylowego sulfonianu sodu i 3.5 % metanolu. Wielkość przepływu została ustalona na 1 ml/min. Poziom wskazanych monoamin i ich metabolitów został oszacowany na podstawie wykresów z chromatografu i porównania wielkości pików z wzorem uzyskanym w wyniku analizy standardów o określonym stężeniu przygotowanych w danym dniu.

3.3.2. Eksperyment mikrodializy *in vivo*

Zwierzęta zostały poddane anestezji w procedurze domięśniowych iniekcji ketaminy (75 mg/kg, i.m.) i ksylazyny (10 mg/kg, i.m.). Następnie szczury zostały umieszczone w aparacie stereotaktycznym. Po nacięciu skóry i odsłonięciu czaszki, wertykalne kaniule prowadzące zostały wprowadzone do mózgu według koordynatów (według atlasu stereotaktycznego G. Patsinos i C. H. Watson, 1998) dla struktur odpowiednich dla każdego eksperymentu:

- a) prążkowie: A/P + 1.0, L/M + 2.5 i V/D – 3.5 mm, licząc od umiejscowienia bregmy i dury
- b) hipokamp: A/P – 5.5, L/M + 5.0 and V/D – 4.8 mm, licząc od umiejscowienia bregmy i dury
- c) kora frontalna: A/P + 2.9; L/M + 0.8 and V/D – 4.0 mm, licząc od umiejscowienia bregmy i dury.

Przez 7 kolejnych dni zwierzęta zostały poddane okresowi rekonwalescencji w pojedynczych klatkach. W 7 dniu od przeprowadzenia operacji, kaniule mikrodializacyjne (o długości 4 mm dla STR i 2 mm dla FCX i HIP) zostały wprowadzone do kaniul prowadzących i odpowiednie struktury zostały poddane procesowi płukania z wykorzystaniem sztucznego płynu mózgowo rdzeniowego o następującym składzie: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.3 mM NaH₂PO₄ i 1.7 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4). Prędkość przepływu wynosiła 1.5 μl/min i była stale utrzymywana dzięki pompie mikroinfuzyjnej. Próbkki były kolekcjonowane u swobodnie poruszających się zwierząt w odstępie 20 minut (dla analizy monoamin) i 30 minut (dla analizy glutaminianu) po 3-godzinym okresie płukania i natychmiast zostały umieszczone w temp. -70°C, oczekując na dalszą analizę.

3.3.2.1. Analiza poziomu monoamin i ich metabolitów w mikrodializatach uzyskanych w eksperymencie mikrodializy *in vivo*

Poziomy DA, 5-HT, NA i ich metabolitów (DOPAC, 3-MT, HVA, NM i 5-HIAA) zostały zmierzone w mikrodializatach o objętości 20 μ l z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją elektrochemiczną. Chromatografia została wykonana przy użyciu pompy LC-10 AD, detektora amperometrycznego LC-4B i kolumny analitycznej BDS-Hypersil C18. Faza ruchoma składała się z 0.1 M kwasu monochlorooctowego o pH 3.7, 0.5 mM EDTA, soli sodowej kwasu 1-oktanosulfonowego o stężeniu 25 mg/l, 5.7 % metanolu i 2.5 % acetonitrylu. Wielkość przepływu została ustalona na 0.5 ml/min. Potencjał elektrody wynosił +600 mV o czułości 2 nA/V.

Dane chromatograficzne zostały zanalizowane przy pomocy programu Chromax 2009. Poziom wskazanych monoamin i ich metabolitów został oszacowany na podstawie wykresów z chromatografu i porównania wielkości pików z wzorem uzyskanym w wyniku analizy standardów o określonym stężeniu.

3.3.2.2. Analiza poziomu glutaminianu w mikrodializatach uzyskanych w eksperymencie mikrodializy *in vivo*

100 μ L roztworu zmieszanych aminokwasów bądź mikrodializatu, 175 μ L roztworu buforu boranowego, 200 μ l acetonitrylu i 25 μ l roboczego roztworu NBD-F zmieszano w probówce wirówkowej. Zmieszany roztwór pozostawiono w zaciemnionej kąpeli wodnej (60°C) na 7 minut, w celu umożliwienia zajścia reakcji (NBD-F reaguje z grupami aminowymi i umożliwia wykrycie aminokwasów przy użyciu światła ultrafioletowego - UV). Po ochłodzeniu roztworu do temperatury pokojowej, 20 μ L roztworu zostało poddane analizie z użyciem aparatu HPLC wyposażonego w detektor UV (472 nm) i kolumnę C18. Faza ruchoma składała się z 0.02 M buforu fosforanowego (pH 6.0) i 16 % acetonitrylu. Wielkość przepływu została ustalona na 0.75 ml/min. Poziom glutaminianu został oszacowany na podstawie wykresów z chromatografu i porównania wielkości pików z wzorem uzyskanym w wyniku analizy standardów o określonym stężeniu.

3.3.3. Analiza aktywności enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym

Zwierzęta otrzymały wielokrotne (7x), dootrzewnowe iniekcje 1MeTIQ (w dawce 25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub MK-801 (w dawce 0.3 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podawany 30 minut przed iniekcją MK-801. Grupa kontrolna otrzymywała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu, zwierzęta zostały uśmiercone przez dekapitację 2 godziny po podaniu ostatniej dawki MK-801. Pobrano struktury takie jak FCX i HIP, które natychmiast umieszczono na suchym lodzie (-70°C) i poddane dalszej analizie z wykorzystaniem odpowiednich zestawów.

3.3.3.1. Peroksydaza glutationowa

Tkanka mózgowa została poddana procesowi homogenizacji na lodzie w buforze (50 mM Tris-Hydrochloride, pH 7.5; 5 mM kwas wersenowy (EDTA); 1 mM ditiotritol (DDT)) w proporcji 7 ml buforu/1 g tkanki. Następnie homogenat został poddany wirowaniu (10 000×g, 15 minut, 4°C). Zebrano nadsącz do dalszej analizy z wykorzystaniem zestawu Glutathione Peroxidase Assay Kit (nr kat. 703102, Cayman Chemical), według protokołu producenta.

3.3.3.2. Reduktaza glutationowa

Tkanka mózgowa została poddana procesowi homogenizacji na lodzie w buforze (50 mM fosforan potasu, pH 7.5; 1 mM EDTA) w proporcji 7 ml buforu/1 g tkanki. Następnie homogenat został poddany wirowaniu (10 000×g, 15 minut, 4°C). Zebrano nadsącz do dalszej analizy z wykorzystaniem zestawu Glutathione Reductase Assay Kit (nr kat. 703202, Cayman Chemical) według protokołu producenta.

3.3.3.3. Katalaza

Tkanka mózgowa została poddana procesowi homogenizacji na lodzie w buforze (50 mM fosforan potasu, pH 7.0; 1 mM EDTA) w proporcji 7 ml buforu/1 g tkanki. Następnie homogenat został poddany wirowaniu (10 000×g, 15 minut, 4°C). Zebrano nadsącz do dalszej analizy z wykorzystaniem zestawu Catalase Assay Kit (nr kat. 707002, Cayman Chemical) według protokołu producenta.

3.3.3.4. Dysmutaza nadtlenkowa

Tkanka mózgowa została poddana procesowi homogenizacji na lodzie w buforze HEPES o pH 7.2 (zawierającym 1 mM EGTA; 210 mM mannitolu; 70 mM sacharozy) w proporcji 1 ml

buforu/ 1 g tkanki. Następnie homogenat został poddany wirowaniu (1500×g, 5 minut, 4°C). Zebrano nadsącz do dalszej analizy z wykorzystaniem zestawu Superoxide Dismutase Assay Kit (nr kat. 706002, Cayman Chemical) według protokołu producenta.

3.3.4. Analiza poziomu cytokin (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10)

Zwierzęta otrzymały wielokrotne (7x), dootrzewnowe iniekcje 1MeTIQ (w dawce 25 mg/kg lub 50 mg/kg, i.p.) lub MK-801 (w dawce 0.3 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podawany 30 minut przed iniekcją MK-801. Grupa kontrolna otrzymywała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu, zwierzęta zostały uśmiercone przed dekapitacją 2 godziny po podaniu ostatniej dawki MK-801. Pobrano struktury takie jak FCX, HIP i STR, które natychmiast umieszczono na suchym lodzie (-70°C) i poddane dalszej analizie z wykorzystaniem odpowiednich zestawów.

3.3.4.1. IL-6

Tkanka mózgowa (FCX, HIP, STR) została poddana procesowi homogenizacji w PBS (0.01M; pH = 7.4) w proporcji 9ml buforu/1 g tkanki. Następnie homogenaty zostały poddane wirowaniu (500×g, 5 minut, 4°C). Zebrano nadsącz do dalszej analizy z wykorzystaniem zestawu Rat IL-6 (Interleukin-6) ELISA Kit (nr kat. ER0042, Fine Test), zgodnie z protokołem producenta. Zawartość białka w próbce została określona z wykorzystaniem zestawu BCA Protein Assay Kit (nr kat. 23227, Thermo Scientific™).

3.3.4.2. IL-1 β

Tkanka mózgowa (FCX, HIP, STR) została poddana procesowi homogenizacji w PBS (0.01M; pH = 7.4) w proporcji 9ml buforu/1 g tkanki. Następnie homogenaty zostały poddane wirowaniu (500×g, 5 minut, 4°C). Zebrano nadsącz do dalszej analizy z wykorzystaniem zestawu Rat IL- β (Interleukin-1 β) ELISA Kit (nr kat. ER1094, Fine Test), zgodnie z protokołem producenta. Zawartość białka w próbce została określona z wykorzystaniem zestawu BCA Protein Assay Kit (nr kat. 23227, Thermo Scientific™).

3.3.4.3. TNF- α

Tkanka mózgowa (FCX, HIP, STR) została poddana procesowi homogenizacji w PBS (0.01M; pH = 7.4) w proporcji 9ml buforu/1 g tkanki. Następnie homogenaty zostały poddane wirowaniu (500×g, 5 minut, 4°C). Zebrano nadsącz do dalszej analizy z wykorzystaniem zestawu Rat TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit (nr kat. ER1393, Fine Test), zgodnie z protokołem producenta. Zawartość białka w próbce została określona z wykorzystaniem zestawu BCA Protein Assay Kit (nr kat. 23227, Thermo Scientific™).

3.3.4.4. IL-10

Tkanka mózgowa (FCX, HIP, STR) została poddana procesowi homogenizacji w PBS (0.01M; pH = 7.4) w proporcji 9ml buforu/1 g tkanki. Następnie homogenaty zostały poddane wirowaniu (500×g, 5 minut, 4°C). Zebrano nadsącz do dalszej analizy z wykorzystaniem zestawu Rat IL-10 (Interleukin-10) ELISA Kit (nr kat. ER0033, Fine Test), zgodnie z protokołem producenta. Zawartość białka w próbce została określona z wykorzystaniem zestawu BCA Protein Assay Kit (nr kat. 23227, Thermo Scientific™).

3.3.5. Badania *in vitro*

Hodowle pierwotne komórek neuronalnych zostały pozyskane z przodomózgowia zarodków myszy szczepu Albino Swiss (w 15 dniu ciąży, Charles River), zgodnie z procedurą opisaną w publikacji autorstwa Wąsik i wsp., 2021. Wyizolowane komórki zawieszono i utrzymywano w pożywce Neurobasal, dodatkowo uzupełnionej B27 (bez przeciwutleniaczy) i antybiotykami. Pożywkę zmieniano co 2 dni. Hodowle utrzymywano w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ przez 3 dni przed właściwym eksperymentem.

Zawartość gleju w hodowlach komórek neuronalnych zweryfikowano za pomocą podwójnej immunocytochemii: anty-MAP2 (marker neuronalny) i anty-GFAP (marker astrocytów), gdzie liczba astrocytów nie przekraczała 10%. Protokół generowania pierwotnych hodowli komórek nerwowych był zgodny z lokalnymi i międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi etycznego wykorzystywania zwierząt.

W pierwszej kolejności, po 24 i 48 godzinach określono efektywne stężenie i czas ekspozycji komórek na MK-801 (50–200 μ M) w celu wywołania znacznego uszkodzenia komórek w 3 dniu *in vitro* (DIV). Następnie zbadano wpływ 1MeTIQ (50, 100 i 500 μ M) podawanego w

monoterapii do hodowli komórkowej na 24 godziny w celu zweryfikowania bezpieczeństwa biologicznego 1MeTIQ dla hodowli komórek neuronalnych. W celu zbadania potencjału neuroprotektynowego 1MeTIQ, hodowle komórkowe w 3 DIV traktowano jednocześnie 1MeTIQ (10, 50, 100, 250 i 500 μ M) i MK-801 (200 μ M) przez 24 godziny.

3.3.5.1. Test redukcji MTT

Żywotność komórek określono ilościowo przy użyciu testu kolorymetrycznego soli tetrazoliowej z bromkiem [4,5-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenylotetrazoliowym (MTT), jak opisano w publikacji autorstwa Wąsik i wsp., 2021. Absorbancję każdej próbki mierzono przy długości fali 570 nm przy użyciu czytnika mikropłytek (Infinite M200 PRO, Tecan). Dane znormalizowano do komórek potraktowanych nośnikiem (100%) i wyrażono jako procent kontroli $\pm$ SEM ustalonej w 2 do 3 niezależnych eksperymentach z 2-4 powtórzeniami.

3.3.5.2. Test uwalniania LDH

Poziom cytotoksyczności po traktowaniu komórek 1MeTIQ i MK-801 oszacowano przez pomiar dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwalnianej z komórek do pożywki hodowlanej z wykorzystaniem zestawu do wykrywania cytotoksyczności (Roche), jak opisano w publikacji autorstwa Wąsik i wsp., 2021. Absorbancję każdej próbki mierzono przy długości fali 490 nm przy użyciu czytnika mikropłytek (Infinite M200 PRO, Tecan). Dane z 2 do 3 niezależnych eksperymentów z 2–4 powtórzeniami znormalizowano względem komórek poddanych działaniu Triton X100 (100%) i wyrażono jako procent całości $\pm$ SEM.

3.3.5.3. Immunocytochemia i barwienie Hoechst 33342 – analiza jąder pyknotycznych

Czystość pierwotnych hodowli komórek neuronalnych i zmiany morfologiczne po traktowaniu hodowli 1MeTIQ i MK-801 w poszczególnych typach komórek określono metodą immunocytochemiczną, jak opisano w publikacji autorstwa Wąsik i wsp. 2021. Próbkę z hodowli komórek neuronalnych w 3 DIV, po utrwaleniu, permeabilizacji i zablokowaniu, inkubowano przez noc z przeciwciałami swoistymi dla neuronów (anty-MAP-2, 1:250) i astrocytów (anty-GFAP, 1:500), a następnie przez 60 minut znakowano przeciwciałami wtórnymi (przeciwciała anty-mysie, Alexa Fluor®488 i anty-

królicze Alexa Fluor®568, rozcieńczenie 1:500). Jądra uwidoczniono przez barwienie barwnikiem Hoechst 33342, jak opisano wcześniej w publikacji autorstwa Wąsik i wsp., 2021. Następnie próbki poddano działaniu ProLong®Gold (Invitrogen, USA), a sondy badano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego AxioObserver (Carl Zeiss, Niemcy) o długości fali wzbudzenia 355 nm (Hoechst 33342), 470 nm (Alexa® 488) i 555 nm (Alexa®568). Dla każdego panelu wykonano 5 mikrofotografii (w dwóch egzemplarzach) dla każdej z badanych grup przy użyciu czarno-białej kamery (Axio-CamMRm, Carl Zeiss). Obrazy z barwienia Hoechst 33342 oceniano ilościowo, określając jednolicie wybarwione jądra jako zdrowe, podczas gdy te o skondensowanej lub fragmentarycznej morfologii zidentyfikowano jako jądra pyknotyczne. Dane obliczono jako procent komórek z obecnością jąder pyknotycznych i przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM.

3.4. Analiza statystyczna

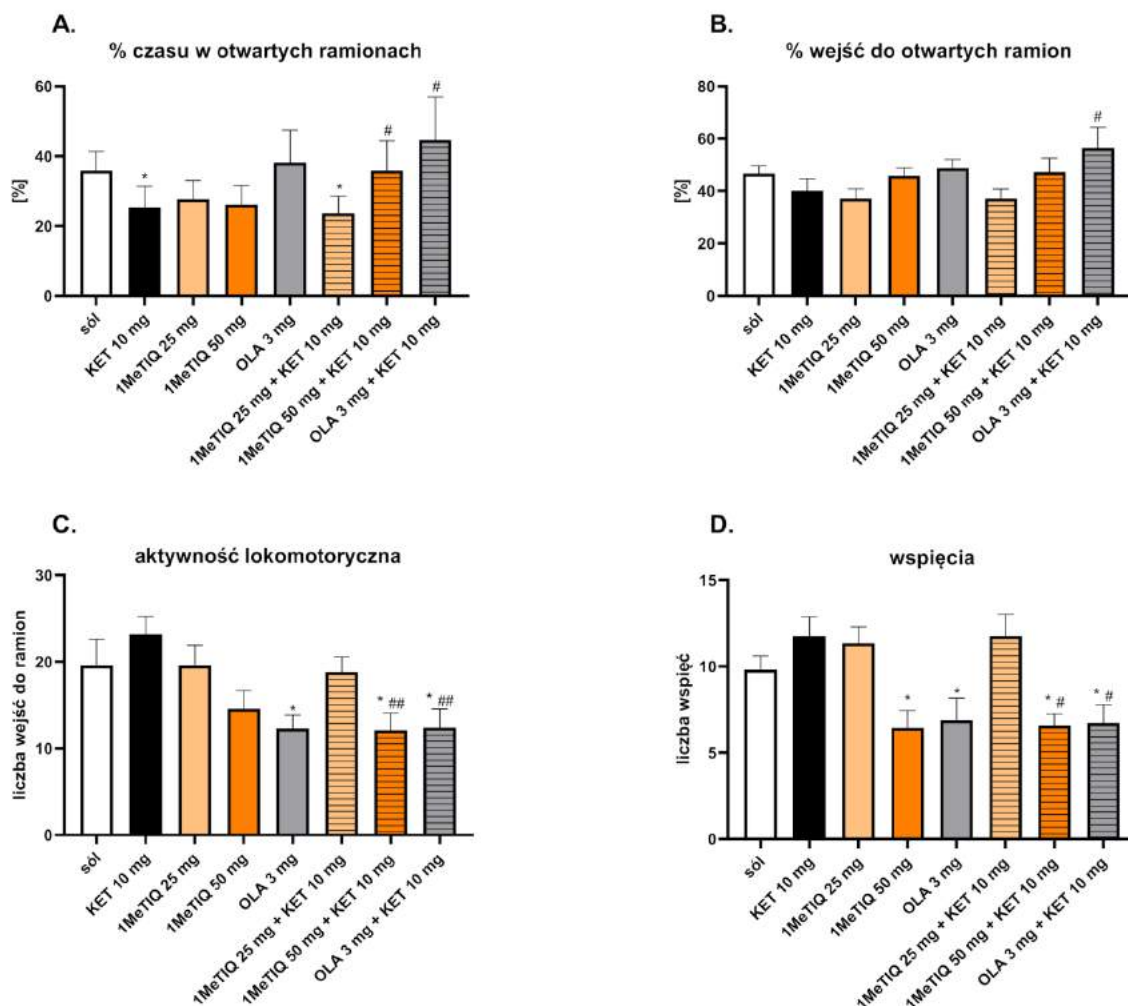
Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). W zależności od eksperymentu, do analizy wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (w przypadku analizy testów behawioralnych oraz analizy wyników w eksperymentach z podaniami jednokrotnymi 1MeTIQ), dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA (w przypadku analizy danych z podaniami chronicznymi 1MeTIQ), dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów (w przypadku analizy danych z eksperymentu mikrodializy) lub test t-studenta (w przypadku analizy danych z testu NORT). Do analizy post hoc wykorzystano test Duncana. Wynik był uznany za istotny statystycznie gdy $p < 0.05$.

4. WYNIKI

4.1. Test podniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

4.1.1. Podania jednokrotne 1MeTIQ w dawce 25 i 50 mg/kg

Rys. 2



Rys. 2: Wpływ 1MeTIQ i olanzapiny (OLA) na zmiany w zachowaniu zwierząt wywołane ketaminą w teście EPM. Zwierzęta otrzymały jednokrotne iniekcje soli fizjologicznej (grupa kontrolna), ketaminy (KET; 10 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg i.p.). W grupach łącznych, 1MeTIQ lub OLA podano 20 min przed iniekcją KET. Test EPM przeprowadzono 90 min po podaniu KET. Czas trwania testu wynosił 5 minut. Zmierzono zachowania takie jak: % czasu spędzonego w otwartych ramionach (A), % wejść do otwartych ramion (B), aktywność lokomotoryczną (C) oraz wspięcia (D). Dane przedstawione są jako średnie $\pm$ SEM. Liczba zwierząt na grupę: $n = 9-10$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ oznaczają różnice w stosunku do grupy kontrolnej (sól); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ oznaczają różnice w stosunku do grupy KET.

Analiza statystyczna wykazała, że % czasu spędzonego w otwartych ramionach labiryntu znacznie różniły się wśród badanych grup ($F[7,61]=3.07$, $p < 0.05$). Test post hoc wykazał, że jednokrotna dawka KET istotnie zmniejszyła ($p < 0.05$) % czasu spędzonego w otwartych ramionach w porównaniu z grupą kontrolną. 1MeTIQ podawany w dawce 25 mg/kg wraz z KET nie odwrócił jej efektu. 1MeTIQ podawany w dawce 50 mg/kg, jak również OLA, całkowicie zablokowały efekt wywołany przez KET (rys. 2 A).

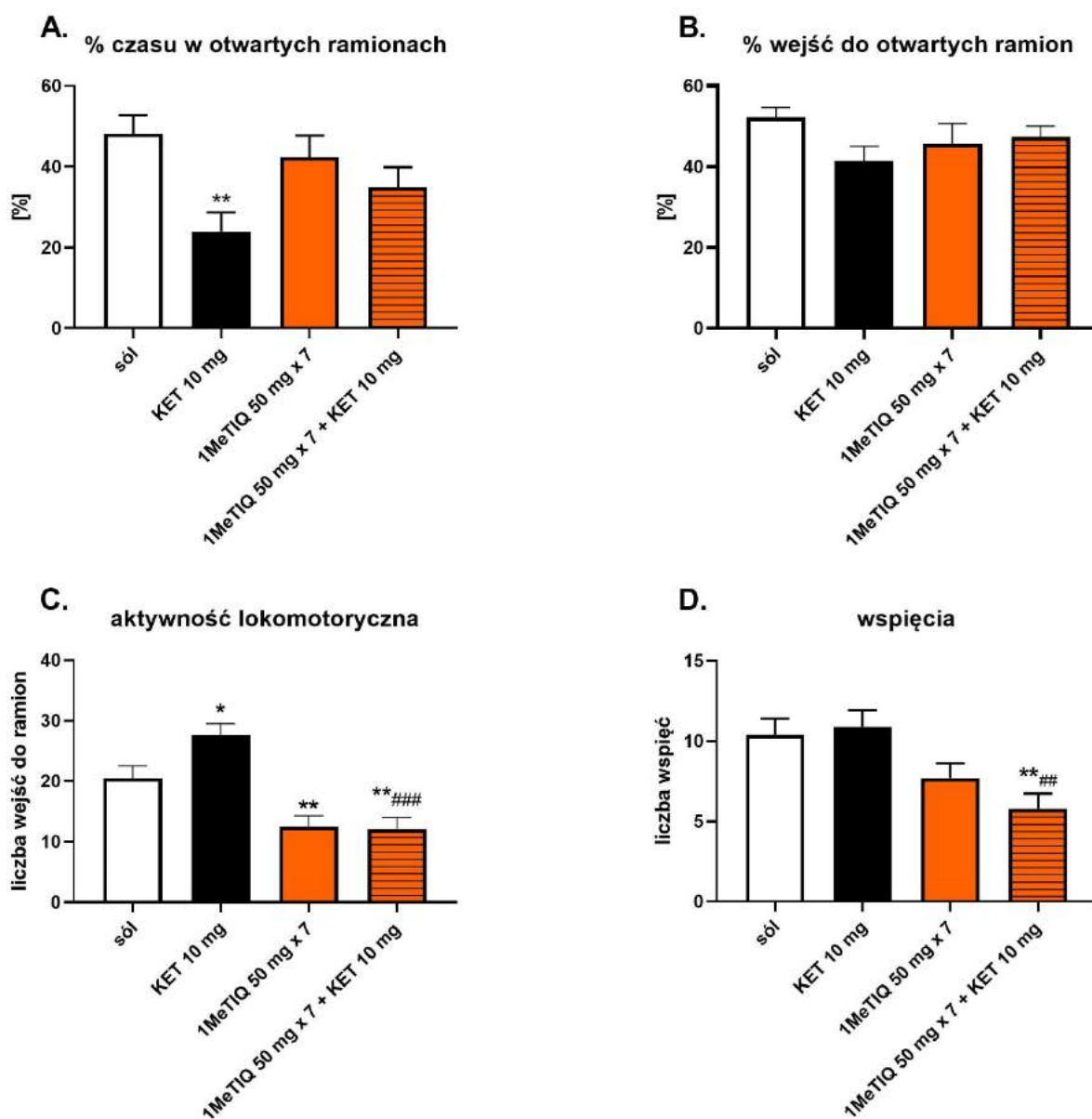
Jednoczynnikowa wariancji ANOVA wykazała brak istotnego wpływu podanych związków na % wejść do otwartych ramion ($F[7,68]=2.04$, N. S.) (rys. 2 B).

Analiza statystyczna wykazała wpływ na aktywność lokomotoryczną zwierząt (całkowita liczba wejść do otwartych i zamkniętych ramion labiryntu) ($F[7,71]=3.77$, $p < 0.01$). Test post hoc wykazał, że 1MeTIQ (50 mg/kg) podany w połączeniu z KET wywołał istotny spadek aktywności lokomotorycznej ($p < 0.05$) w porównaniu z grupą kontrolną. Podobny efekt zaobserwowano po podaniu OLA ($p < 0.01$). Dodatkowo, iniekcja OLA z KET również znacząco zmniejszyła całkowitą liczbę wejść do ramion labiryntu ($p < 0.05$) (rys. 2 C).

Analiza statystyczna ANOVA wykazała, że ilość wspięć istotnie różniła się pomiędzy badanymi grupami ($F[7,60]=5.64$, $p < 0.01$). Test post hoc wykazał, że zarówno 1MeTIQ (50 mg/kg), jak i OLA (3 mg/kg) podawane oddzielnie znacząco zmniejszyły liczbę wspięć ($p < 0.05$). Podobny efekt zaobserwowano w grupach łącznych, gdzie 1MeTIQ (50 mg/kg) i OLA podano wraz z KET ($p < 0.05$) (rys. 2 D).

4.1.2. Podania chroniczne (7x) 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg

Rys. 3



Rys. 3: Wpływ wielokrotnych (7x) podań 1MeTIQ na zmiany w zachowaniu zwierząt wywołane jednokrotnym podaniem ketaminy w teście EPM. Zwierzęta otrzymały wielokrotne iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p., grupa kontrolna), jednokrotną iniekcję ketaminy (KET; 10 mg/kg, i.p.) lub wielokrotne iniekcje (przez 7 kolejnych dni) 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych, 1MeTIQ podano 20 min przed iniekcją KET. W dniu testu, zwierzęta otrzymały ostatnią dawkę 1MeTIQ. Test EPM przeprowadzono 90 min po podaniu KET. Czas trwania testu wynosił 5 minut. Zmierzono zachowania takie jak: % czasu spędzonego w otwartych ramionach (A), % wejść do otwartych ramion (B), aktywność lokomotoryczną (C) oraz wspięcia (D). Dane przedstawione są jako średnie $\pm$ SEM. Liczba zwierząt na grupę: $n = 9-10$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ oznaczają różnice w

stosunku do grupy kontrolnej (sól); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ oznaczają różnicę w stosunku do grupy KET.

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA nie wykazała istotnego wpływu wielokrotnych podań 1MeTIQ (odpowiednio $F[1,33]=0.29$, N. S.) na % czasu spędzonego w otwartych ramionach. Natomiast ta sama analiza wykazała istotny statystycznie wpływ ($F[1,33]=10.33$, $p < 0.01$) iniekcji KET na badany parametr. Interakcja obu iniekcji okazała się być nieistotna statystycznie ($F[1,33]=2.86$, N. S.). Test post hoc wykazał, że KET istotnie ($p < 0.01$) obniżyła % czasu spędzonego w otwartych ramionach labiryntu w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych zmian w pozostałych grupach (rys. 3 A)

Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnego wpływu wielokrotnych podań 1MeTIQ ($F[1,33]=0.008$, N. S.), jednokrotnego podania KET ($F[1,33]=1.70$, N. S.) oraz ich interakcji ($F[1,33]=3.21$, N. S.) na % wejść do otwartych ramion labiryntu (rys. 3 B)

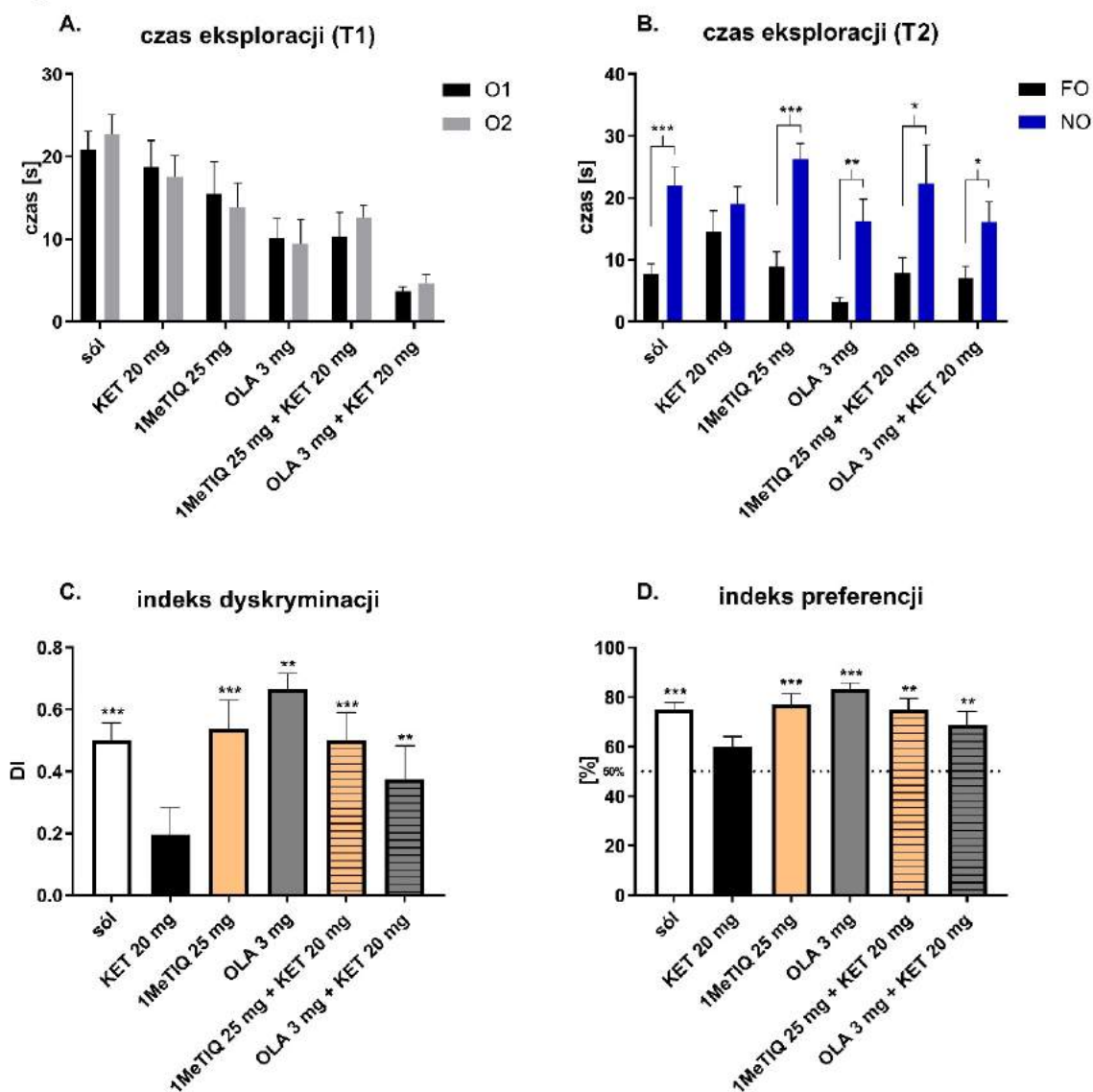
Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ wielokrotnych podań 1MeTIQ ($F[1,31]=36.95$, $p < 0.001$) na aktywność lokomotoryczną zwierząt wyrażoną jako suma wejść do wszystkich ramion aparatu. Jednokrotne podanie KET ($F[1,31]=2.95$, N. S.) oraz interakcja obu iniekcji ($F[1,31]=3.69$, N. S.) okazały się być nieistotne. Test post hoc wykazał istotnie zwiększoną aktywność po podaniu KET ($p < 0.05$), natomiast wielokrotne podania samego 1MeTIQ istotnie ($p < 0.01$) obniżyły wskazany parametr w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie łącznej (1MeTIQ x7 + KET) również zaobserwowano istotny spadek aktywności lokomotorycznej w porównaniu zarówno do grupy kontrolnej ($p < 0.01$) oraz grupy, która otrzymała samą KET ($p < 0.01$) (rys. 3 C).

Dwuczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny wpływ chronicznych podań 1MeTIQ (50 mg/kg) na liczbę wspięć ($F[1,31]=15.84$, $p < 0.001$) w podniesionym labiryncie krzyżowym. Jednokrotna iniekcja KET ($F[1,31]=0.53$, N. S.) oraz interakcja obu związków ($F[1,31]=1.54$, N. S.) okazały się nie mieć istotnego wpływu na badany parametr. Test post hoc wykazał istotny ($p < 0.01$) spadek liczby wspięć w grupie łącznej (1MeTIQ x7 + KET) w porównaniu zarówno do grupy kontrolnej ($p < 0.01$) jak i grupy, która otrzymała KET ($p < 0.01$). Analiza ANOVA nie wykazała istotnego wpływu jednokrotnej iniekcji KET oraz interakcji obu związków na badany parametr (rys. 3 D).

4.2. Test rozpoznawania nowego obiektu (NORT)

4.2.1. Podania jednokrotne 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg

Rys. 4



Rys. 4: Wpływ 1MeTIQ i olanzapiny (OLA) na zmiany w zachowaniu zwierząt wywołane ketaminą na czasy eksploracji obiektu 1(O1) i obiektu 2 (O2) w fazie T1 (A) oraz w fazie T2 (B) w teście NORT. Zwierzęta otrzymały jednokrotne dootrzewnowe iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p., grupa kontrolna), ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 mg/kg i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg i.p.). W grupach łącznych, 1MeTIQ lub OLA podano 30 min przed iniekcją KET. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM. $N = 9-10$ szczurów na grupę. Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w czasach eksploracji nowego obiektu (NO) i znanego obiektu (FO) (B). Istotność statystyczna w zmianach indeksu dyskryminacji odnosi się do punktu 0 (C) natomiast w przypadku indeksu preferencji istotność oznacza różnicę względem punktu 50% - losowego poziomu preferencji (linia przerywana) (D).

Test t-studenta nie wykazał istotnych różnic między czasami eksploracji obiektu 1 i obiektu 2 we wszystkich grupach w fazie T1 testu rozpoznawania nowego obiektu (rys. 4 A).

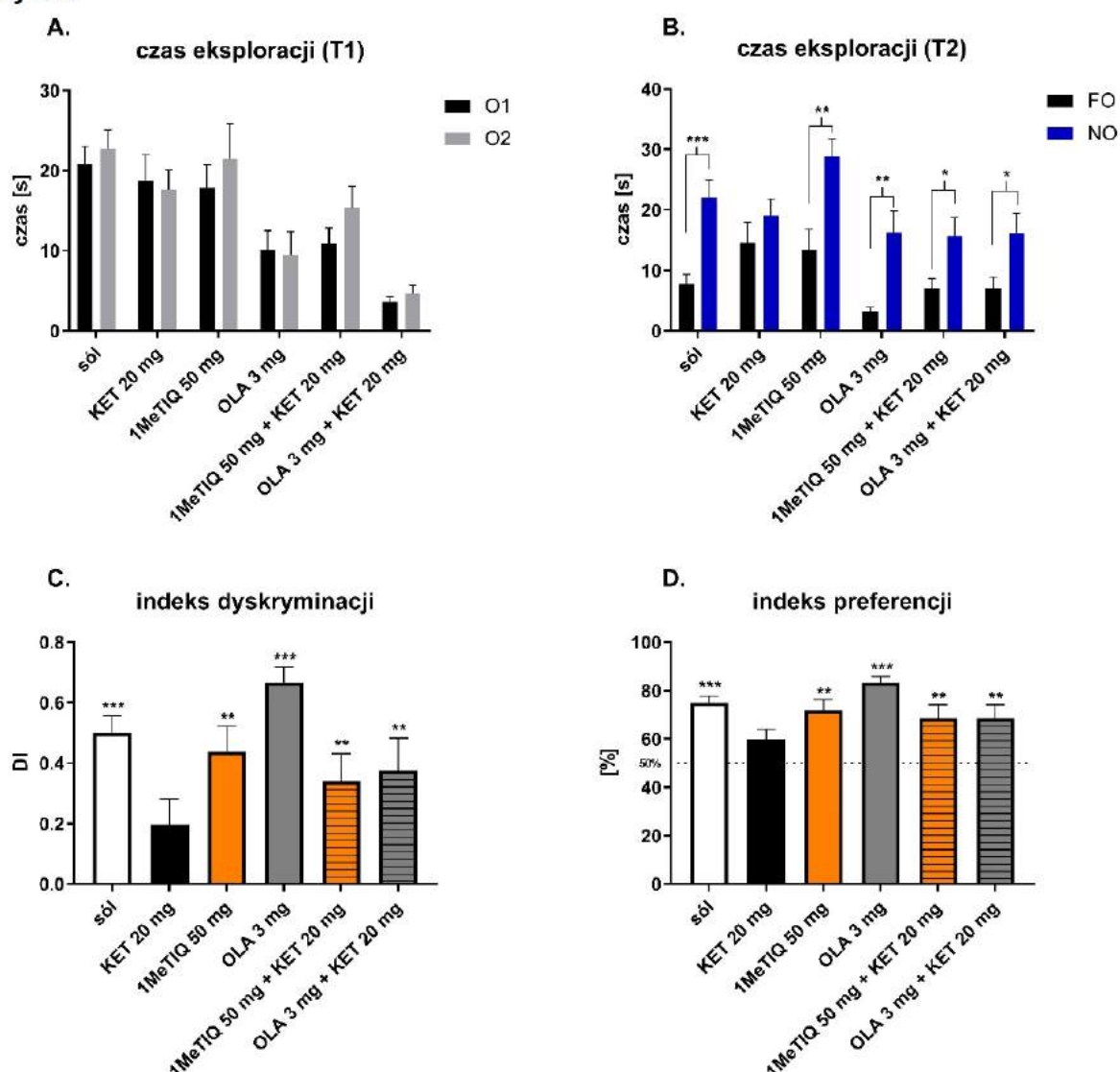
Ten sam test wykazał istotne różnice ($p < 0.001$) w czasie eksploracji dla NO i FO w grupie kontrolnej (sól) w fazie T2. U zwierząt, którym podano KET, nie zaobserwowano istotnych różnic w czasie eksploracji obiektów. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w czasach eksploracji NO i FO w grupach 1MeTIQ ($p < 0.001$), łącznych 1MeTIQ z KET ($p < 0.05$), olanzapiną ($p < 0.01$) oraz łącznych olanzapiną z KET ($p < 0.05$) (rys. 4 B).

Testy t-studenta dla jednej próby wykazał istotność statystyczną dla wartości indeksu dyskryminacji w grupie kontrolnej, 1MeTIQ 25 mg, OLA 3 mg (wszystkie $p < 0.001$), oraz w obu badanych grupach łącznych (oba $p < 0.01$). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy w grupie zwierząt, która otrzymała KET (rys. 4 C)

Ta sama analiza statystyczna wykazała statystycznie istotne różnice w wartościach indeksu preferencji w porównaniu do losowego poziomu szansy – 50%. Istotne różnice zaobserwowano w grupie kontrolnej, 1MeTIQ 25mg, OLA 3 mg (wszystkie $p < 0.001$) oraz w obu badanych grupach łącznych (oba $p < 0.01$). Nie zaobserwowano istotnej różnicy w grupie zwierząt, która otrzymała KET (rys. 4 D).

4.2.2. Podania jednokrotne 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg

Rys. 5



Rys. 5: Wpływ 1MeTIQ i olanzapiny (OLA) na zmiany w zachowaniu zwierząt wywołane ketaminą na czasy eksploracji obiektu 1(O1) i obiektu 2 (O2) w fazie T1 (A) oraz w fazie T2 (B) w teście NORT. Zwierzęta otrzymały jednokrotne dootrzewnowe iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p., grupa kontrolna), ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (50 mg/kg i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych, 1MeTIQ lub OLA podano 30 min przed iniekcją KET. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM. $N = 9-10$ szczurów na grupę. Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w czasach eksploracji nowego obiektu (NO) i znanego obiektu (FO) (B). Istotność statystyczna w zmianach indeksu dyskryminacji odnosi się do punktu 0 (C) natomiast w przypadku indeksu preferencji istotność oznacza różnicę względem punktu 50% - losowego poziomu preferencji (linia przerywana) (D).

Test t-studenta nie wykazał istotnych zmian w czasie eksploracji obiektu 1 i obiektu 2 we wszystkich grupach w fazie T1 testu rozpoznawania nowego obiektu (rys. 5 A).

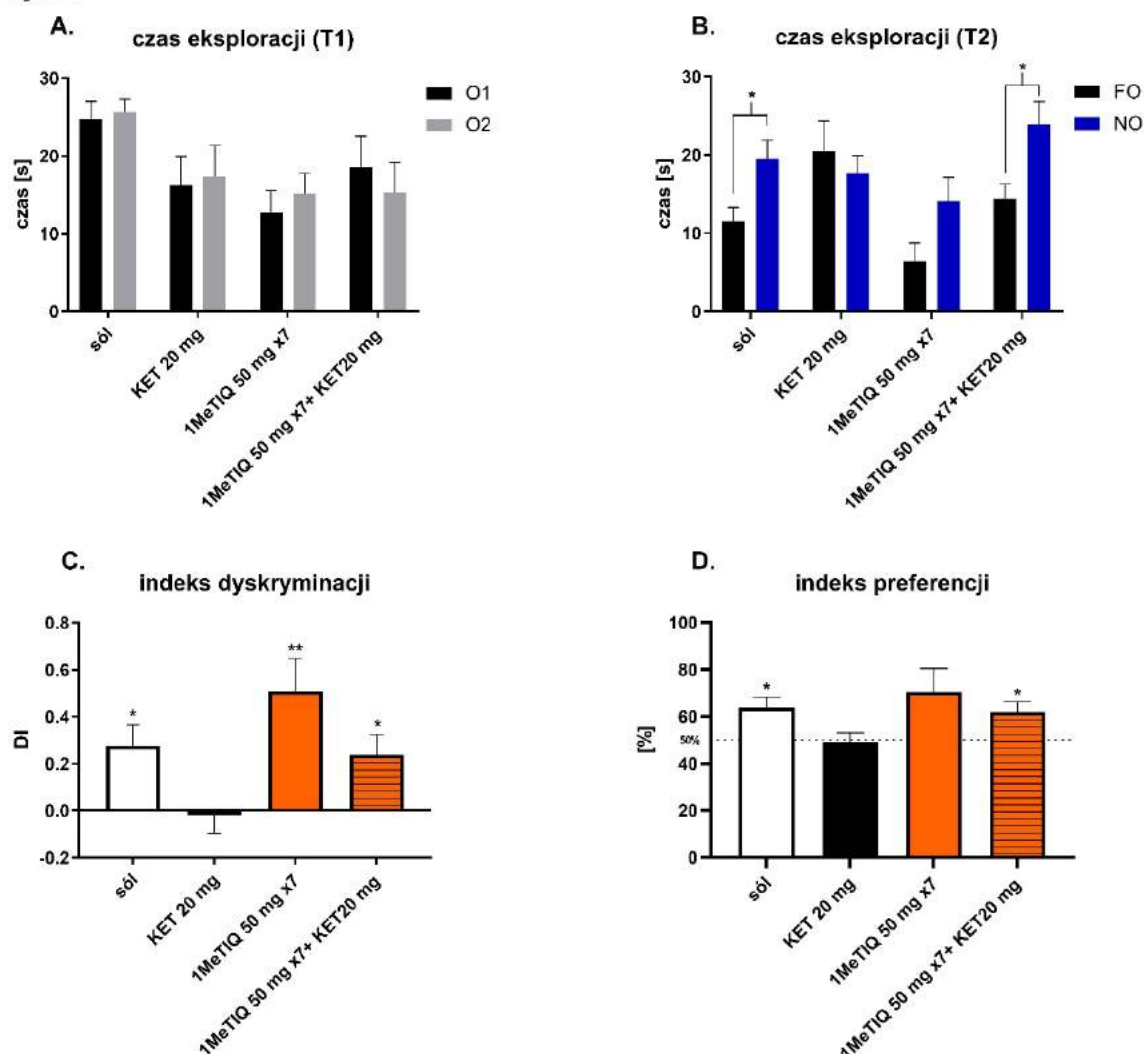
Ta sama analiza statystyczna wykazała istotne zmiany czasów eksploracji dla FO i NO w fazie T2 testu rozpoznawania nowego obiektu w grupie kontrolnej (sól) ($p < 0.001$). U zwierząt, które otrzymały KET, nie zaobserwowano istotnych różnic w czasie eksploracji NO i FO. Statystycznie istotne zmiany czasów eksploracji dla FO i NO wystąpiły w grupach traktowanych 1MeTIQ ($p < 0.01$), 1MeTIQ i KET ($p < 0.05$), OLA ($p < 0.01$) oraz olanzapiną i KET ($p < 0.05$) (rys. 5 B).

Testy t-studenta dla pojedynczej próby wykazały istotne różnice pomiędzy wartością indeksu dyskryminacji a wartością 0 w następujących grupach: kontrolnej, 1MeTIQ 50 mg, obu grupach łącznych (wszystkie $p < 0.01$) oraz w grupie zwierząt, która otrzymała OLA ($p < 0.001$). W grupie, której podano jednokrotną dawkę KET nie zaobserwowano istotnej różnicy pomiędzy wartością indeksu dyskryminacji a punktem „0” (rys. 5 C).

Ta sama analiza wykazała istotne statystycznie różnice w wartościach indeksu preferencji w porównaniu do losowego poziomu szansy (50%) w grupie kontrolnej, 1MeTIQ 50 mg, w obu grupach łącznych (wszystkie $p < 0.01$) oraz w grupie, która otrzymała iniekcję samej OLA ($p < 0.001$). Wartość indeksu preferencji w grupie, która otrzymała KET nie różniła się istotnie od losowego poziomu szansy (rys. 5 D).

4.2.3. Podania chroniczne (7x) 1MeTIQ w dawce 50mg/kg

Rys. 6



Rys. 6: Wpływ wielokrotnych (7x) podań 1MeTIQ na zmiany w zachowaniu zwierząt wywołane jednokrotnym podaniem ketaminy w teście NORT. Zwierzęta otrzymały wielokrotne iniekcje dootrzewnowe soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p., grupa kontrolna), jednokrotną iniekcję ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) lub wielokrotne iniekcje (przez 7 kolejnych dni) 1MeTIQ (50 mg/kg i.p.). W grupach łącznych, 1MeTIQ podano 30 min przed iniekcją KET. W dniu testu, zwierzęta otrzymały ostatnią dawkę 1MeTIQ. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM. $N = 9-10$ szczurów na grupę. Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w czasach eksploracji nowego obiektu (NO) i znanego obiektu (FO) (B). Istotność statystyczna w zmianach indeksu dyskryminacji odnosi się do punktu 0 (C) natomiast w przypadku indeksu preferencji istotność oznacza różnicę względem punktu 50% - losowego poziomu preferencji (linia przerywana) (D).

Test t-studenta nie wykazał statystycznie istotnych zmian w czasie eksploracji obiektu 1 i obiektu 2 we wszystkich grupach w fazie T1 testu (rys. 6 A), natomiast w fazie T2, zwierzęta

w grupie kontrolnej (sól) oraz łącznej (1MeTIQx7 + KET) eksplorowały NO istotnie dłużej niż FO (oba $p < 0.05$). Nie zaobserwowano istotnych różnic w grupach, które otrzymały KET lub chroniczne iniekcje 1MeTIQ (rys. 6 B).

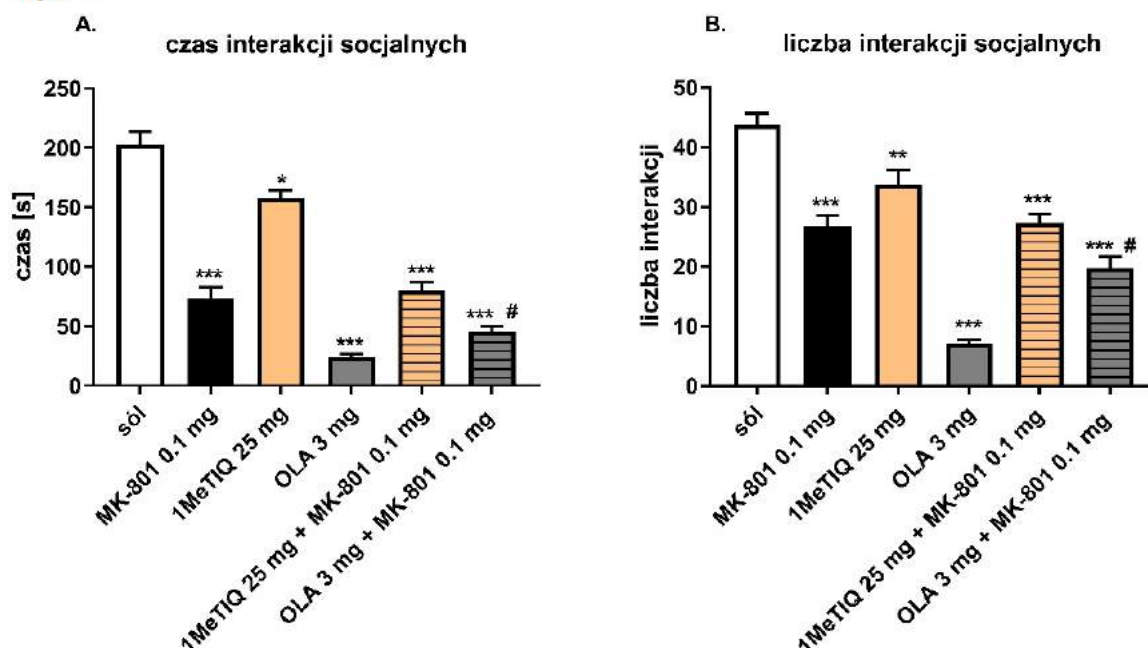
Test t-studenta dla pojedynczych prób wykazał istotne różnice pomiędzy wartością indeksu dyskryminacji w grupie kontrolnej ($p < 0.05$), 1MeTIQ x7 ($p < 0.01$) i grupie łącznej ($p < 0.05$) a punktem „0”. Nie wykryto istotnych różnic w obrębie badanego parametru w grupie, która otrzymała jednokrotną iniekcję KET (rys. 6 C).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotne różnice pomiędzy wartością indeksu preferencji a losowym poziomem szansy (50%) w grupie kontrolnej oraz łącznej (oba $p < 0.05$). Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy indeksem preferencji a poziomem szansy w grupie która otrzymała KET bądź chroniczne iniekcje 1MeTIQ (rys. 6 D).

4.2.4. Test interakcji społecznych (SIT)

4.2.4.1. Podania jednokrotne 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg

Rys. 7



Rys. 7: Wpływ 1MeTIQ i olanzapiny (OLA) na zmiany w zachowaniu zwierząt wywołane MK-801 na czas trwania interakcji (A) i liczbę interakcji (B) społecznych w teście SIT. Zwierzęta otrzymały jednokrotne dootrzewnowe iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p., grupa kontrolna), MK-801 (0.1 mg/kg, s.c.), 1MeTIQ (25 mg/kg i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg i.p.). W grupach łącznych, 1MeTIQ lub OLA podano 30 min przed iniekcją MK-801. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. $N = 8-10$ szczurów na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu z grupą kontrolną (sól). # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu z grupą MK-801.

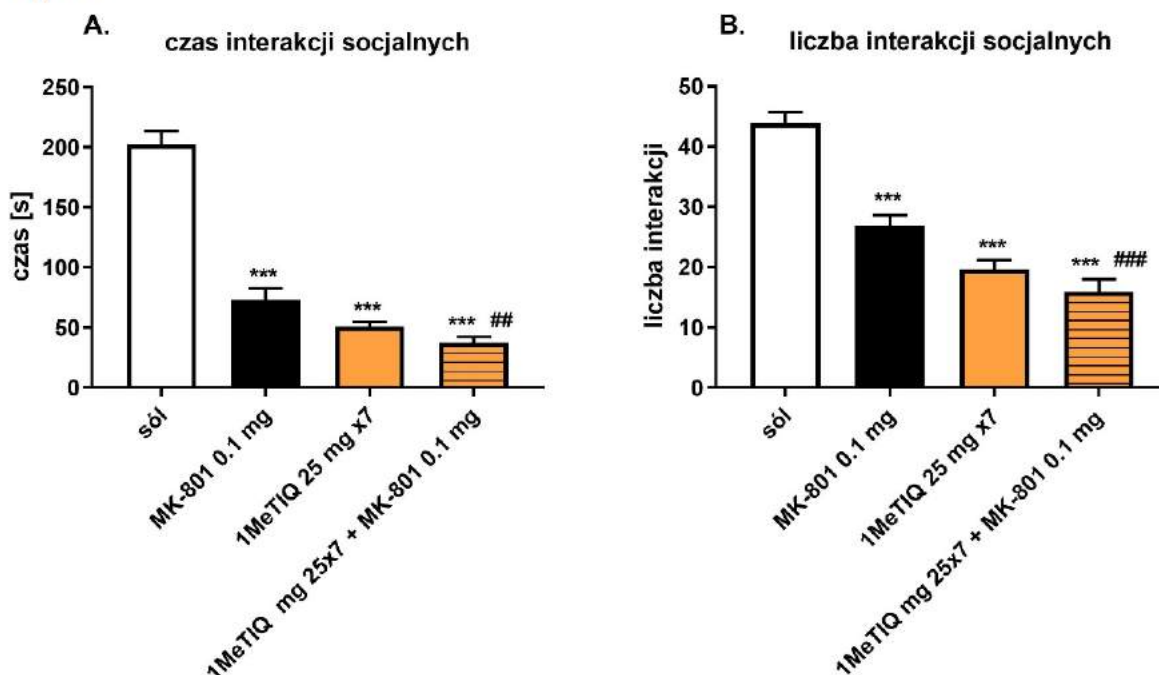
Jednoczynnikowa ANOVA wykazała istotny statystycznie ($F[5,48] = 90.77$, $p < 0.001$) wpływ zastosowanych związków na czas interakcji społecznych. Test post hoc wykazał istotny ($p < 0.001$) spadek czasu interakcji społecznych po iniekcji MK-801 w porównaniu z grupą kontrolną. Pojedyncza dawka 1MeTIQ istotnie ($p < 0.05$) skróciła czas interakcji społecznych w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie, która otrzymała iniekcję OLA, zaobserwowano silne skrócenie czasu interakcji ($p < 0.001$). U zwierząt, które otrzymały zarówno 1MeTIQ, jak i MK-801, czas interakcji społecznych był istotnie ($p < 0.001$) zmniejszony w porównaniu z grupą kontrolną. Zwierzęta, które otrzymały iniekcję zarówno OLA, jak i MK-80,

wykazywały istotnie obniżony czas interakcji socjalnych w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej i grupy MK-801 (odpowiednio $p < 0.001$ i $p < 0.05$) (rys. 7 A).

Analiza statystyczna wykazała istotny ($F[5,48]=43.71$, $p < 0.001$) wpływ podanych związków na liczbę interakcji socjalnych. Analiza post hoc wykazała spadek liczby incydentów socjalnych po podaniu MK-801, 1MeTIQ lub OLA ($p < 0.001$) w porównaniu z grupą kontrolną (sól). Podobny efekt zaobserwowano w grupie łącznej (1MeTIQ + MK-801). Podanie łączne OLA i MK-801 istotnie obniżyło liczbę interakcji socjalnych w porównaniu z grupą kontrolną i MK-801 (odpowiednio $p < 0.001$ i $p < 0.05$) (rys. 7 B).

4.2.5. Podania chroniczne (7x) 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg

Rys. 8



Rys. 8: Wpływ wielokrotnych (7x) podań 1MeTIQ na czas trwania interakcji socjalnych (A) i liczbę interakcji socjalnych (B) w teście SIT. Zwierzęta otrzymały wielokrotne iniekcje dootrzewnowe soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p., grupa kontrolna), jednokrotną iniekcję MK-801 (MK-801; 0.1 mg/kg, s.c.) lub wielokrotne iniekcje (przez 7 kolejnych dni) 1MeTIQ (25 mg/kg i.p.) W grupach łącznych, 1MeTIQ podano 30 min przed iniekcją KET. W dniu testu, zwierzęta otrzymały ostatnią dawkę 1MeTIQ. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM. $N = 8-10$ szczurów na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu z grupą kontrolną (sól). # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu z grupą MK-801.

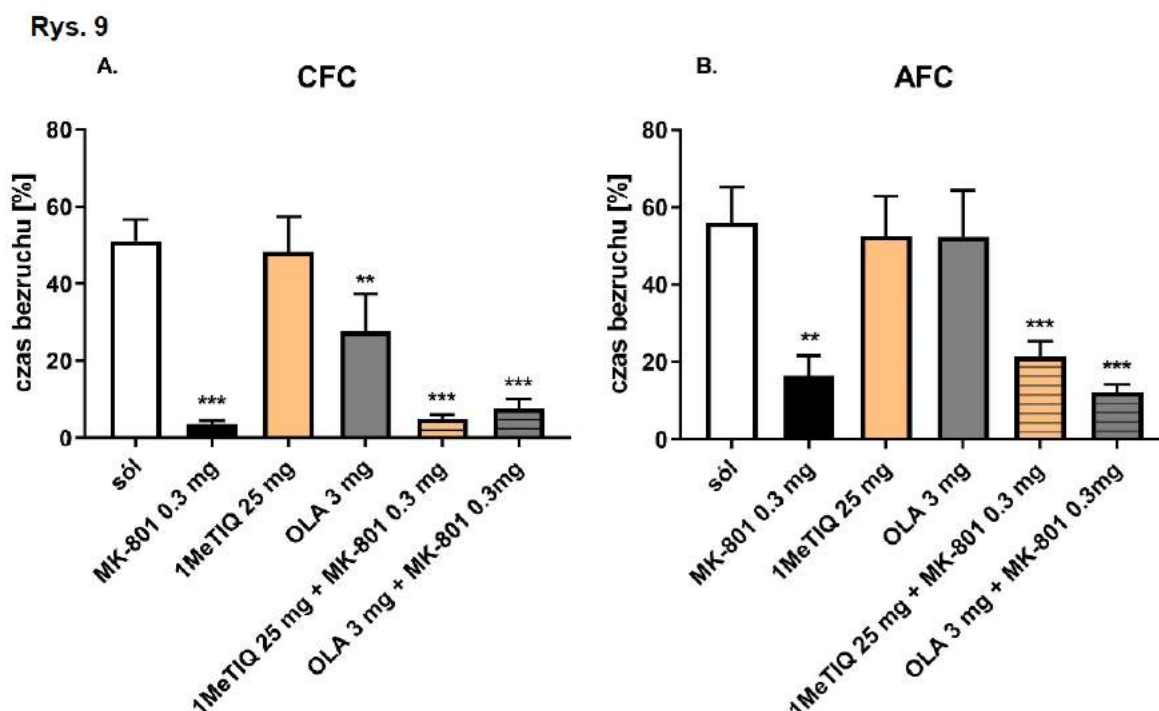
Dwuczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny wpływ podań MK-801 ($F[1,17] = 58.40$, $p < 0.001$), wielokrotnych podań 1MeTIQ ($F[1,17] = 100.77$, $p < 0.001$) i interakcji obu związków ($F[1,17] = 38.04$, $p < 0.001$) na czas interakcji socjalnych mierzonych w teście SIT. Test post hoc wykazał istotne zmniejszenie czasu interakcji ($p < 0.001$) w grupie, której podano MK-801 lub chronicznie 1MeTIQ. W grupie łącznej, wielokrotne podania 1MeTIQ podawane razem z jednokrotną dawką MK-801, spowodowały istotny spadek czasu interakcji socjalnych w porównaniu zarówno ze zwierzętami z grupy kontrolnej ($p < 0.001$) jak i z grupy MK-801 ($p < 0.05$) (rys. 8 A).

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała istotny wpływ podań MK-801 ($F[1,17] = 17.62$, $p < 0.001$), wielokrotnych podań 1MeTIQ ($F[1,17] = 51.71$, $p < 0.001$) lub interakcji obu związków ($F[1,17] = 7.44$, $p < 0.05$) na liczbę interakcji społecznych. Analiza post hoc

ujawniła istotny spadek liczby interakcji socjalnych po jednokrotnej iniekcji MK-801 lub wielokrotnych podaniach 1MeTIQ (oba $p < 0.001$). 7-krotne podanie 1MeTIQ wraz z jednokrotną iniekcją MK-801 spowodowało istotny spadek liczby interakcji socjalnych w porównaniu z grupami otrzymującymi sól fizjologiczną ($p < 0.001$) i MK-801 ($p < 0.01$) (rys. 8 B).

4.3. Test pamięci warunkowanej strachem (FMT)

4.3.1. Podania jednokrotne 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg



Rys. 9: Wpływ 1MeTIQ i olanzapiny (OLA) na zmiany w zachowaniu zwierząt wywołane MK-801 na ekspresję strachu uwarunkowanego kontekstem (CFC) (A) i strachu uwarunkowanego bodźcem dźwiękowym (AFC) (B) w fazie testu (dzień 2 eksperymentu). Zwierzęta otrzymały jednokrotne dootrzewne iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p., grupa kontrolna), MK-801 (0.3 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 mg/kg i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg i.p.). W grupach łącznych, 1MeTIQ lub OLA podano 20 min przed iniekcją MK-801. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM i wyrażono jako procent czasu trwania sesji. $N = 8-10$ szczurów na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu z grupą kontrolną (sól). Nie zaobserwowano istotnych zmian w porównaniu z grupą MK-801.

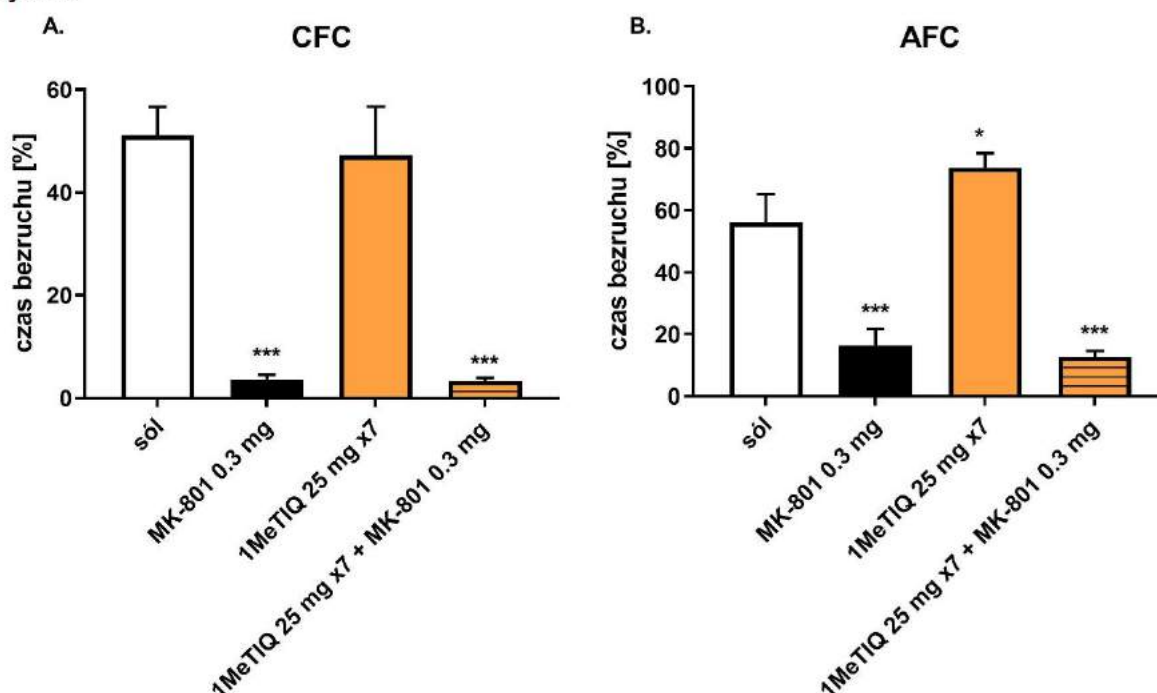
Jednoczynnikowa ANOVA wykazała statystycznie istotny wpływ ($F[5,46] = 15.50$, $p < 0.001$) podanych związków na % czasu bezruchu w CFC. Test post hoc wykazał istotny ($p < 0.001$) spadek % czasu bezruchu po jednokrotnej iniekcji MK-801. Jednorazowe podanie olanzapiny istotnie ($p < 0.01$) zmniejszyło % czasu bezruchu w porównaniu z grupą kontrolą (sól). Łączne podanie 1MeTIQ z MK-801 istotnie ($p < 0.001$) obniżyło % czasu bezruchu w porównaniu z grupą kontrolną. Podobny efekt – zmniejszony % czasu bezruchu – obserwowano w grupie łącznej (OLA + MK-801) ($p < 0.001$) (rys. 9 A).

Jednoczynnikowa ANOVA wykazała istotny statystycznie wpływ ($F_{5,45} = 7.14$, $p < 0.001$) zastosowanych związków na % czasu bezruchu w AFC. Test post hoc wykazał istotny

($p < 0.01$) spadek % czasu bezruchu po podaniu MK-801. Zarówno 1MeTIQ, jak i OLA, podane łącznie z MK-801 istotnie ($p < 0.001$) zmniejszyły % czasu bezruchu w AFC w porównaniu z grupą kontrolną. Olanzapina podana razem z MK-801 istotnie ($p < 0.001$) skróciła % czasu bezruchu. Oba badane związki nie odwróciły efektu wywołanego przez MK-801 (rys. 9 B).

4.3.2. Podania chroniczne (7x) 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg

Rys. 10



Rys. 10: Wpływ wielokrotnych (7x) podań 1MeTIQ na ekspresję strachu uwarunkowanego kontekstem (CFC) (A) i strachu uwarunkowanego bodźcem dźwiękowym (AFC) (B) w fazie testu (dzień 2 eksperymentu). Zwierzęta otrzymały wielokrotne dootrzewnowe iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p., grupa kontrolna), jednokrotną iniekcję MK-801 (MK-801; 0.3 mg/kg, i.p.) lub wielokrotne iniekcje (przez 7 kolejnych dni) 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych, 1MeTIQ podano 20 min przed iniekcją MK-801. W dniu testu, zwierzęta otrzymały ostatnią dawkę 1MeTIQ. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM i wyrażono jako procent czasu trwania sesji. $N = 8-10$ szczurów na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu z grupą kontrolną (sól). Nie zaobserwowano istotnych zmian w porównaniu z grupą MK-801.

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ MK-801 ($F[1,32] = 87.9$, $p < 0.001$) na % czasu bezruchu w CFC. Ta sama analiza nie wykazała istotnego wpływu ($F[1,32] = 0.17$, N. S.) wielokrotnych podań 1MeTIQ na badany parametr. Interakcja obu związków nie miała istotnego wpływu ($F[1,32] = 0.13$, N. S.) na % czasu bezruchu. Test post hoc wykazał istotny ($p < 0.001$) spadek % czasu bezruchu w CFC po iniekcji MK-801. Wykazał także istotnie statystycznie ($p < 0.001$) zmniejszenie % czasu bezruchu w grupie podań łącznych (1MeTIQ 7x i MK-801) (rys. 10 A).

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała statystycznie istotny wpływ podań MK-801 ($F[1,31] = 84.28$, $p < 0.001$) na % czasu bezruchu. Ta sama analiza nie wykazała znaczącego

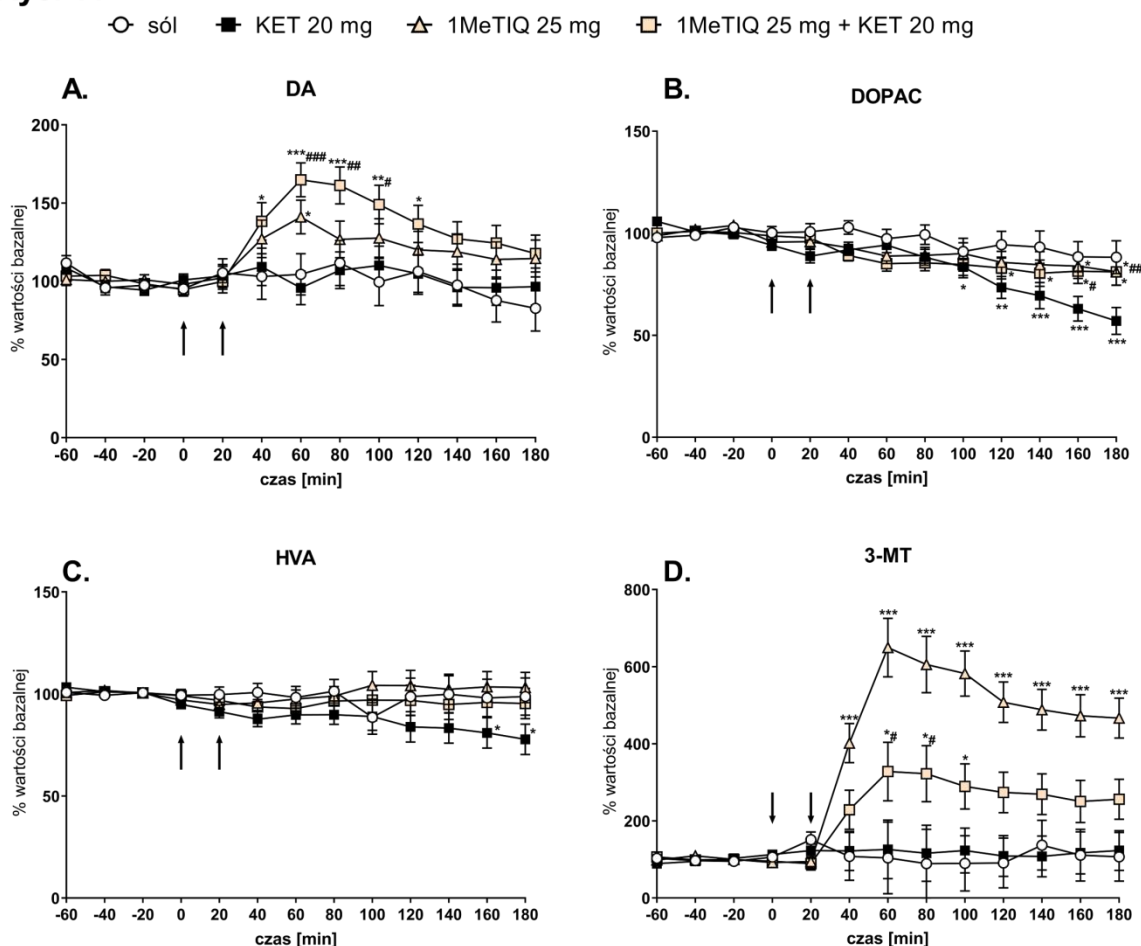
wpływu ($F[1,31] = 1.66$, N. S.) wielokrotnych podań 1MeTIQ na % czasu bezruchu w AFC. Interakcja obu substancji nie miała istotnego wpływu ($F[1,32] = 3.88$, N. S.) na % czasu bezruchu. Test post hoc wykazał istotny ($p < 0.001$) spadek % czasu bezruchu u zwierząt, którym podano MK-801 ($p < 0.001$). Chroniczne iniekcje 1MeTIQ wraz z jednokrotnym podaniem MK-801 znacząco ($p < 0.001$) zmniejszyły % czasu bezruchu, w porównaniu do grupy kontrolnej (rys. 10 B).

4.4. Eksperymenty mikrodializy *in vivo*

4.4.1. Mikrodializa w STR – jednorazowe podania 1MeTIQ 25 mg/kg i ketaminy 20 mg/kg, analiza poziomu monoamin i ich metabolitów

4.4.1.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Rys. 11



Rys. 11: Wpływ jednorazowego podania 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia DA (A) i jej metabolitów DOPAC (B) HVA (C) i 3-MT (D) wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ podanych substancji ($F[3,18]=3.18$, $p < 0.05$), czasu ($F[12,216]=7.28$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu

analizowanych czynników ($F[36,216]=2.23$, $p < 0.001$) na stężenie DA w STR szczura. Analiza post hoc wykazała znaczne stężenie DA w punkcie czasowym „60” w grupie, która otrzymała jednokrotne podanie 1MeTIQ (25 mg/kg) w porównaniu do poziomu bazalnego. W grupie łącznej zaobserwowano istotne zwiększenie uwalniania DA w 40 – 120 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „40” i „120”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „100”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” i „80”) w porównaniu do poziomu kontrolnego. Dodatkowo w tej grupie wykazano istotny wzrost stężenia DA w 40 – 100 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „100”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „80”; $p < 0.001$ dla punktu czasowego „60”) w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy KET (rys. 11 A).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak istotnego wpływu podanych substancji ($F[3,18]=1.96$, N. S.) na stężenie DOPAC w STR, natomiast efekt czasu ($F[13,216]=24.82$, $p < 0.001$) oraz interakcja obu analizowanych czynników ($F[36,216]=2.71$, $p < 0.001$) okazały się być statystycznie istotne dla poziomu DOPAC. Analiza post hoc wykazała istotny spadek stężenia DOPAC w czasie 100 – 180 minuty eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „100”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „120”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „140” – „180”) w grupie KET w porównaniu do wartości kontrolnej. Znamienny spadek poziomu DOPAC, porównując do poziomu bazalnego, zaobserwowano także w grupie, która otrzymała 1MeTIQ (25 mg/kg) w 160 i 180 minucie ($p < 0.05$). Podobny efekt wykazano także w grupie łącznej, w 120 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$) w porównaniu do wartości kontrolnej. Dodatkowo w tej grupie wykazano istotne zwiększenie poziomu DOPAC w 160 ($p < 0.05$) i 180 ($p < 0.01$) minucie eksperymentu, w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy KET (rys 11 B).

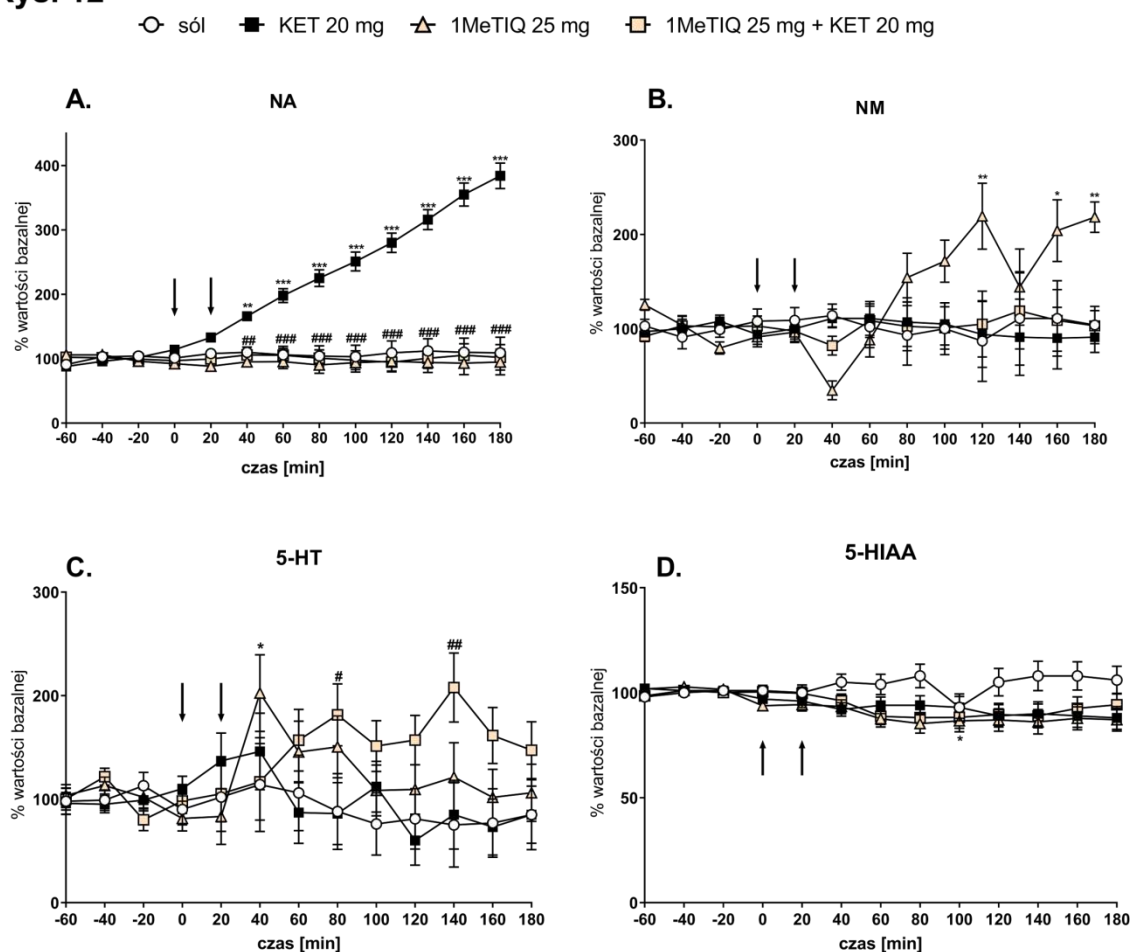
Analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ iniekcji ($F[3,18]=10.20$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=22.38$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu zmiennych ($F[36,216]=10.06$, $p < 0.001$) na poziom HVA. Analiza post hoc wykazała znaczny spadek poziomu HVA w grupie KET w 160 i 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$). Nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia w pozostałych grupach w analizowanych punktach czasowych (rys. 11 C).

Analiza statystyczna ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego wpływu podanych substancji ($F[3,18]=1.30$, N. S.) na poziom 3-MT w STR szczura. Efekt czasu ($F[12,216]=1.90$, $p < 0.05$) oraz interakcja obu analizowanych zmiennych ($F[36, 216]=1.53$,

$p < 0.05$) okazały się być znamienne dla stężenia 3-MT. Test post hoc ujawnił istotne statystycznie zwiększenie poziomu 3-MT w grupie, która otrzymała iniekcję 1MeTIQ (25 mg/kg) w punktach czasowych „40” – „180” (wszystkie $p < 0.001$), w porównaniu do poziomu kontrolnego. W grupie łącznej wykazano znamienny wzrost poziomu 3-MT w 60 – 100 minucie eksperymentu ($p < 0.05$), porównując do wartości bazalnej. Dodatkowo w grupie łącznej zaobserwowano istotny wzrost stężenia 3-MT w 60 i 80 minucie ($p < 0.05$), w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy KET (rys. 11 D).

4.4.1.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Rys. 12



Rys. 12: Wpływ jednokrotnego podania 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia NA (A) i jej metabolitu NM (B) oraz 5-HT (C) i jej metabolitu 5-HIAA (D) wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Analiza statystyczna ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny efekt podanych związków ($F[3,18]=38.96$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=34.10$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu badanych czynników ($F[36,216]=32.43$, $p < 0.001$) na poziom NM w STR szczura. Test post

hoc wykazał istotny wzrost stężenia NA w 40 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „40”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „180”) w porównaniu do poziomu kontrolnego. Efekt ten został całkowicie zablokowany przez podanie 1MeTIQ (25 mg/kg) w grupie łącznej, gdzie wykazano istotny spadek poziomu NA w 40 – 180 minucie w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy KET ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „40”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „180”) (rys. 12 A).

Ta sama analiza wykazała brak istotnego efektu podanych związków ($F[3,18]=1.44$, N. S.) na stężenie NM w STR. Efekt czasu ($F[12,216]=2.04$, $p < 0.05$) oraz interakcja obu zmiennych ($F[36,216]=2.71$, $p < 0.001$) okazały się być istotne dla poziomu NM. Analiza post hoc wykazała znamienne wzrost poziomu NM w 120 ($p < 0.01$), 160 ($p < 0.05$) i 180 ($p < 0.01$) minucie eksperymentu w grupie, która otrzymała 1MeTIQ (25 mg/kg) w porównaniu do poziomu bazalnego. Nie zaobserwowano istotnych zmian w pozostałych grupach (rys. 12 B).

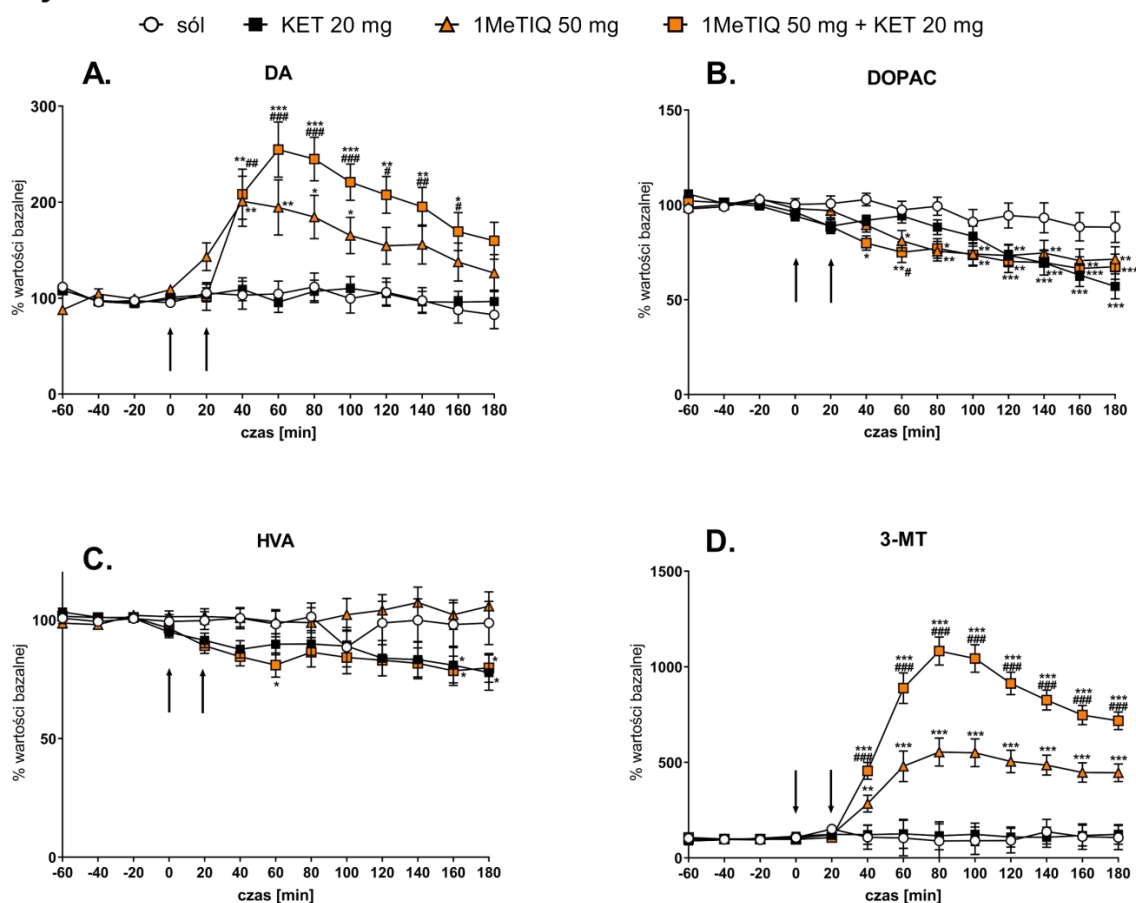
Analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego wpływu iniekcji ($F[3,18]=1.49$, N. S.) na poziom uwalniania 5-HT, natomiast efekt czasu ($F[12,216]=1.83$, $p < 0.05$) oraz interakcja obu badanych zmiennych ($F[36,216]=1.65$, $p < 0.05$) okazał się być istotny. Analiza post hoc wykazała znamienne wzrost stężenia 5-HT w 40 minucie eksperymentu ($p < 0.05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie łącznej zaobserwowano istotne zwiększenie poziomu 5-HT w 80 ($p < 0.05$) i 140 ($p < 0.01$) minucie eksperymentu w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy KET (rys. 12 C).

Analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego efektu podanych związków ($F[3,18]=1.86$, N. S.) na stężenie 5-HIAA w STR szczura. Wpływ czasu ($F[12,216]=5.38$, $p < 0.001$) oraz interakcja obu czynników ($F[36,216]=2.13$, $p < 0.001$) okazały się mieć istotny wpływ na poziom 5-HIAA. Analiza post hoc wykazała znamienne spadek ($p < 0.05$) stężenia 5-HIAA w 100 minucie eksperymentu w grupie, która otrzymała jednokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg), porównując do poziomu kontrolnego (rys. 12 D).

4.4.2. Mikrodializa w STR – jednorazowe podania 1MeTIQ 50 mg/kg i ketaminy 20 mg/kg

4.4.2.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Rys. 13



Rys. 13: Wpływ jednokrotnego podania 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia DA (A) i jej metabolitów DOPAC (B) HVA (C) i 3-MT (D) wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny efekt podanych związków ($F[3,18]=5.45$, $p < 0.01$), czasu ($F[12,216]=13.88$, $p < 0.001$) oraz

interakcji obu czynników ($F[12,216]=5.15$, $p < 0.001$) na poziom DA w STR szczura. Analiza post hoc wykazała istotny wzrost uwalniania DA w czasie 40 – 100 minucie eksperymentu w grupie 1MeTIQ (50 mg/kg) ($p < 0.05$ dla punktów „80” i „100”; $p < 0.01$ dla punktów „40” i „60”) w porównaniu do poziomu kontrolnego. W grupie łącznej zaobserwowano podobny efekt – w 40 – 160 minucie eksperymentu poziom DA istotnie wzrósł ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „160”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „40”, „120” i „140”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „100”) w porównaniu do wartości bazalnej. Dodatkowo w tej grupie wykazano istotne zwiększenie stężenia DA w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy KET, w 40 – 160 minucie ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „160”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „40” i „140”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „100”) (rys. 13 A).

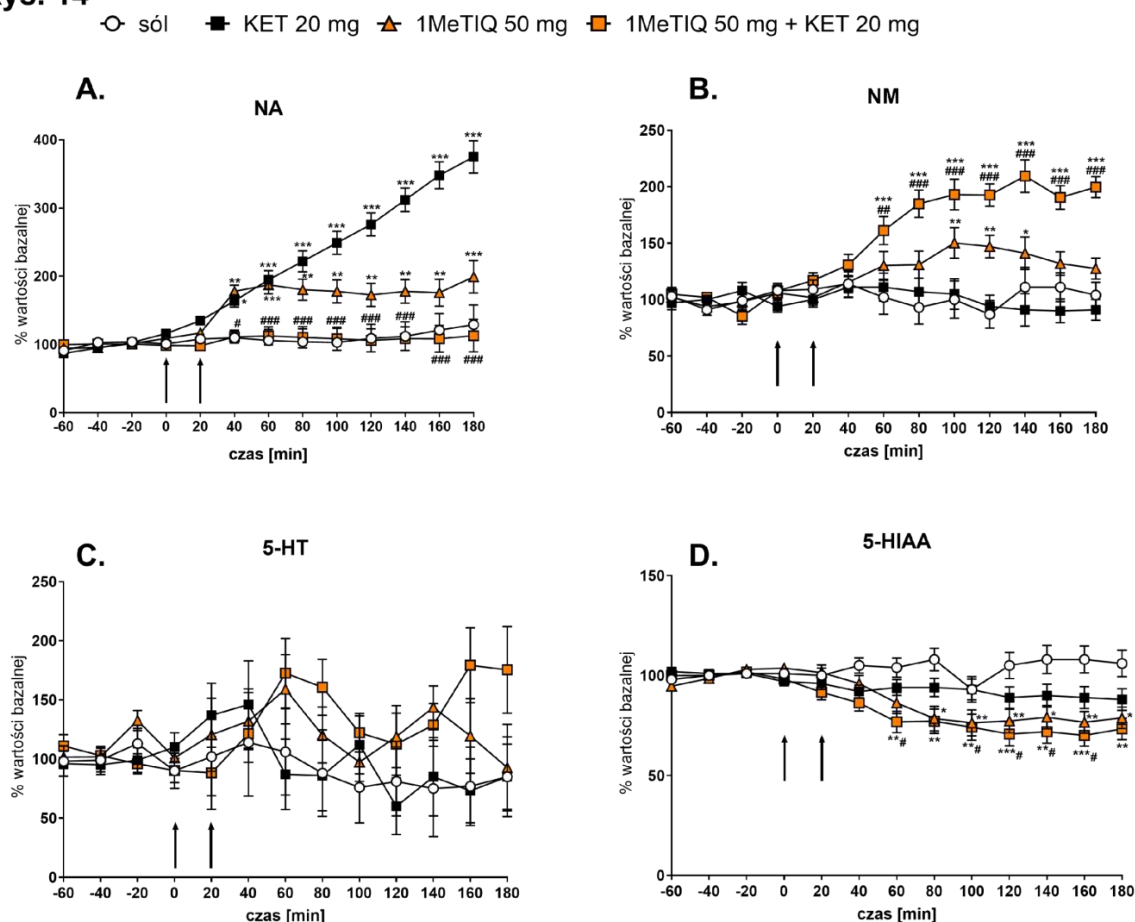
Ta sama analiza statystyczna wykazała brak istotnego wpływu podanych związków ($F[3,18]=2.57$, N. S.) na stężenie DOPAC w STR szczura, natomiast efekt czasu ($F[12,216]=35.38$, $p < 0.001$) oraz interakcja obu zmiennych ($F[36,216]=2.73$, $p < 0.001$) okazały się być istotne dla poziomu DOPAC. Analiza post hoc wykazała obniżony poziom DOPAC w grupie KET w czasie 120 – 160 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „120”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „140” i „160”) w porównaniu do poziomu bazalnego. W grupie zwierząt, która otrzymała iniekcję 1MeTIQ (50 mg/kg), wykazano obniżone stężenie DOPAC w 60 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „60”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „80” – „180”), porównując do wartości kontrolnej. W grupie łącznej także obserwowano spadek poziomu DOPAC w punktach czasowych „40” – „180” ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „40” i „80”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „60” i „100”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „120” – „180”) w porównaniu do poziomu bazalnego. Dodatkowo w tej grupie zaobserwowano obniżone stężenie DOPAC w 60 minucie ($p < 0.05$), porównując do danego punktu czasowego z grupy KET (rys. 13 B).

Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów nie wykazała istotnego wpływu iniekcji ($F[3,18]=2.93$, N. S.) na stężenie HVA w STR. Wpływ czasu ($F[12,216]=5.05$, $p < 0.001$) oraz interakcja obu badanych zmiennych ($F[36,216]=2.60$, $p < 0.001$) okazały się być istotne dla poziomu HVA. Test post hoc wykazał spadek stężenia HVA w 160 i 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$) w porównaniu do poziomu kontrolnego. Podobny efekt był obserwowany w punkcie czasowym „60” w grupie, która otrzymała 1MeTIQ (50 mg/kg), porównując do wartości kontrolnej ($p < 0.05$) (rys. 13 C).

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ zastosowanych związków ($F[3,18]=35.33$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=64.54$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu czynników ($F[36,216]=27.44$), $p < 0.001$) na stężenie 3-MT w STR szczura. Analiza post hoc wykazała znaczne zwiększenie poziomu 3-MT w grupie, która otrzymała 1MeTIQ (50 mg/kg) w 40 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „40”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „180”) w porównaniu do wartości kontrolnej. Istotny wzrost poziomu 3-MT był także obserwowany w grupie łącznej, w punktach czasowych „40” – „180” (wszystkie $p < 0.001$), zarówno w porównaniu do poziomu kontrolnego, jak i danych punktów czasowych w grupie KET (wszystkie $p < 0.001$) (rys. 13 D).

4.4.2.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Rys. 14



Rys. 14: Wpływ jednokrotnego podania 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia NA (A) i jej metabolitu NM (B) oraz 5-HT (C) i jej metabolitu 5-HIAA (D) wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ zastosowanych związków ($F[3,18]=21.44$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=52.28$, $p < 0.001$) oraz obu analizowanych czynników ($F[36,216]=21.45$, $p < 0.001$) na poziom NA w STR szczura. Test post hoc wykazał istotny wzrost stężenia NA w grupie KET w 40 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „40”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „180”) w porównaniu do poziomu kontrolnego. W grupie, która otrzymała 1MeTIQ

(50 mg/kg) również zaobserwowano zwiększony poziom uwalniania NA w czasie 40 – 180 minut ($p < 0.01$ dla punktów czasowych „40” i „80” – „160”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” i „180”) w porównaniu z wartością bazalną. W grupie łącznej wykazano obniżone stężenie NA w 40 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punkty czasowego „40”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „180”) w porównaniu z odpowiednimi punktami czasowymi w grupie KET (rys 14 A).

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny statystycznie wpływ iniekcji ($F[3,18]=12.77$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=14.73$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych czynników ($F[36,216]=8.50$, $p < 0.001$) na stężenie NM w STR. Analiza post hoc wykazała znamienne zwiększenie poziomu NM w grupie, która otrzymała 1MeTIQ (50 mg/kg) w czasie 100 – 140 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „140”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „100” o „120”), porównując do poziomu kontrolnego. Istotnie zwiększony poziom NM zaobserwowano także w grupie łącznej, w 60 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.001$ dla wszystkich punktów czasowych) w porównaniu do poziomu bazalnego. Dodatkowo w tej grupie wykazano istotnie wyższe stężenie NM w punktach czasowych „60” – „180” (dla wszystkich $p < 0.001$), porównując do danych punktów czasowych w grupie KET (rys. 14 B).

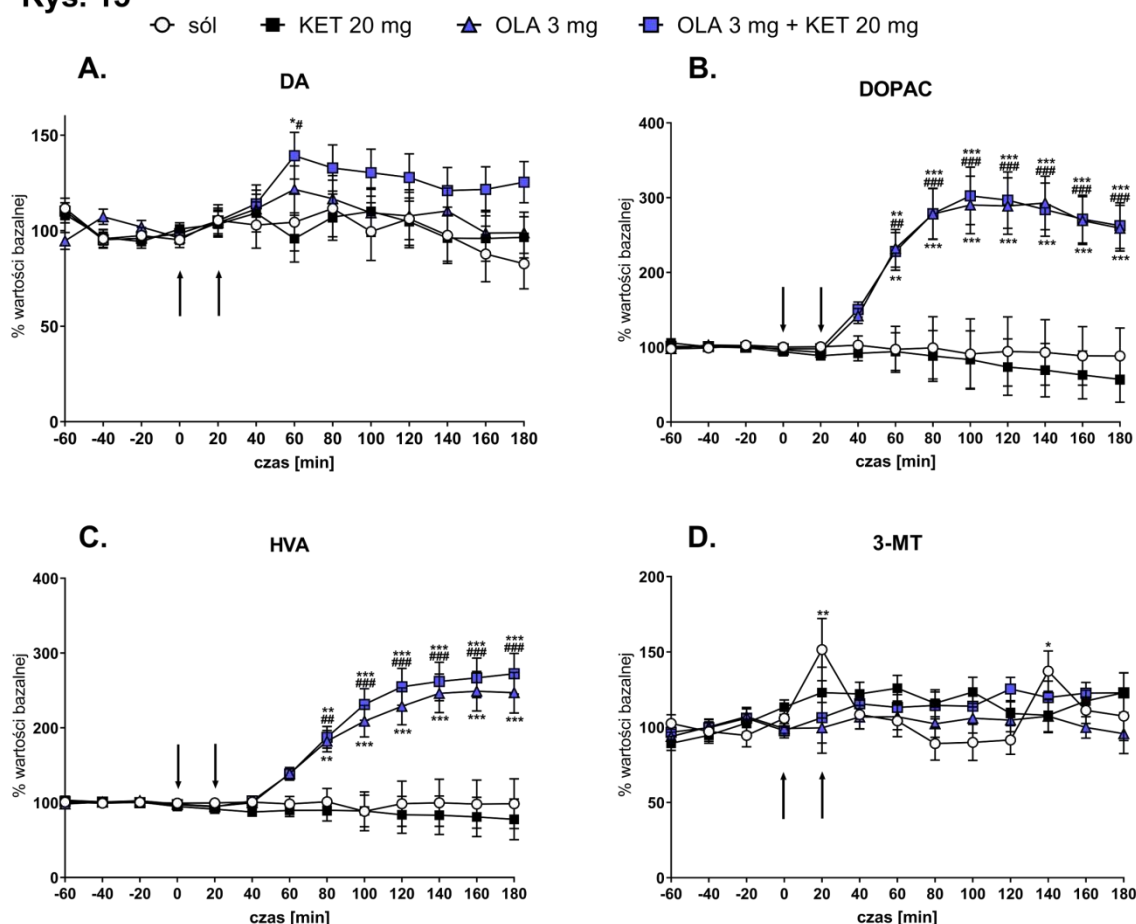
Ta sama analiza statystyczna nie wykazała istotnego wpływu podanych związków ($F[3,18]=2.15$, N. S.), czasu ($F[12,216]=1.14$, N. S.) oraz interakcji obu czynników ($F[12,216]=1.31$, N. S.) na poziom 5-HT w STR szczura (rys. 14 C).

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała statystycznie istotny efekt podanych substancji ($F[3,18]=4.26$, $p < 0.05$), czasu ($F[12,216]=15.53$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu badanych zmiennych ($F[36,216]=4.69$, $p < 0.001$) na stężenie 5-HIAA w STR. Analiza post hoc wykazała obniżenie poziomu 5-HIAA po podaniu 1MeTIQ (50 mg/kg) w 80 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „80”, „140” i „180”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „100”, „120” i „160”) w porównaniu z poziomem kontrolnym. Podobny efekt zaobserwowano w grupie łącznej w punktach czasowych „60” – „180” ($p < 0.01$ dla punktów czasowych „60” – „100”, „140” i „180”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „120” i „160”), porównując do wartości bazalnych. Dodatkowo w tej grupie wykazano istotnie obniżony poziom 5-HIAA w stosunku do punktów czasowych z grupy KET w 60 i 100 – 160 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla wszystkich punktów czasowych) (rys. 14 D).

4.4.3. Mikrodializa w STR – jednorazowe podania olanzapiny 3 mg/kg i ketaminy 20 mg/kg

4.4.3.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Rys. 15



Rys. 15: Wpływ jednokrotnego podania olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia DA (A) i jej metabolitów DOPAC (B) HVA (C) i 3-MT (D) wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano OLA (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, OLA podano 20 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego efektu podanych związków ($F[3,18]=1.27$, N. S.) na poziom DA w STR szczura. Efekt czasu

($F[12,216]=2.91$, $p < 0.001$) okazał się być istotny dla stężenia DA, natomiast interakcja obu czynników ($F[36,216]=1.62$, N. S.) nie była istotna. Test post hoc wykazał znaczne zwiększenie uwalniania DA w grupie łącznej w punkcie czasowym „60”, porównując zarówno do poziomu kontrolnego jak i danego punktu czasowego z grupy KET (rys. 15 A).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt zastosowanych substancji ($F[3,18]=10.27$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=19.54$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu czynników ($F[36,216]=9.56$, $p < 0.001$) na stężenie DOPAC w STR. Analiza post hoc wykazała znaczne zwiększenie poziomu DOPAC w grupie, która otrzymała OLA w 60 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „60”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych) w porównaniu do poziomu bazalnego. Podobny efekt był obserwowany w grupie łącznej w punktach czasowych „60” – „180” ($p < 0.01$ dla punktu „60”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych), porównując do wartości kontrolnej. Dodatkowo zaobserwowano znaczne zwiększenie stężenia DOPAC w 60 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „60”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych) porównując do danych punktów czasowych z grupy KET (rys. 15 B).

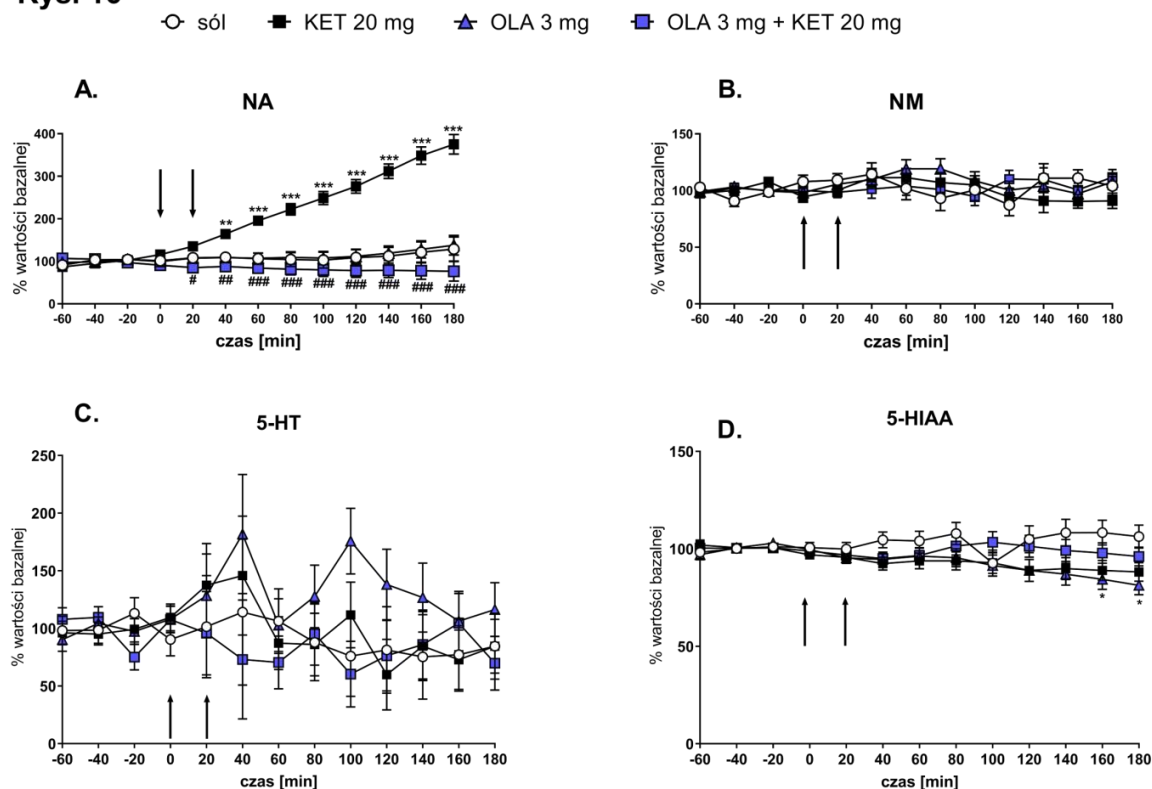
Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ czasu ($F[3,18]=12.23$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=27.60$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych zmiennych ($F[36,216]=12.04$, $p < 0.001$). Test post hoc wykazał istotne zwiększenie stężenia HVA w STR w grupie OLA w 80 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „80”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych) w porównaniu do poziomu kontrolnego. W grupie łącznej wykazano znaczne zwiększenie poziomu HVA w punktach czasowych „80” – „180” ($p < 0.01$ dla punktu „80”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych), porównując do wartości bazalnej. Dodatkowo w tej grupie zaobserwowano zwiększenie poziomu HVA w 80 – 180 minucie ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „80”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych), porównując do danych punktów czasowych z grupy KET (rys.15 C).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak istotnego wpływu zastosowanych substancji ($F[3,18]=1.25$, N. S.) na stężenie 3-MT w STR szczura. Efekt czasu ($F[12,216]=2.63$, $p < 0.01$) okazał się być istotny dla poziomu 3-MT, natomiast wpływ interakcji obu analizowanych czynników ($F[36,216]=1.40$, N. S.) był nieistotny. Analiza post hoc wykazała zwiększone stężenie 3-MT w grupie kontrolnej (sól) w 20 ($p < 0.01$) i 140 ($p < 0.05$) minucie

eksperymentu, porównując do poziomu kontrolnego. Nie zaobserwowano istotnych zmian w pozostałych grupach w analizowanych punktach czasowych (rys. 15 D).

4.4.3.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Rys. 16



Rys. 16: Wpływ jednokrotnego podania olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia NA (A) i jej metabolitu NM (B) oraz 5-HT (C) i jej metabolitu 5-HIAA (D) wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano OLA (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, OLA podano 20 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ iniekcji ($F[3,18]=33.32$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=30.81$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych zmiennych ($F[36,216]=27.32$, $p < 0.001$) na poziom NA w STR. Test post hoc wykazał znaczne zwiększenie stężenia NA po podaniu KET w 40 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „40”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych) w porównaniu do poziomu kontrolnego. W grupie łącznej, podanie OLA odwróciło ten efekt i znacznie obniżyło stężenie NA w 20 – 180 minucie ($p < 0.05$ dla punktu

czasowego „20”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „40”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „180”), porównując do danych punktów czasowych z grupy KET (rys.16 A).

Ta sama analiza statystyczna nie wykazała istotnego wpływu podanych związków ($F[3,18]=0.31$, N. S.), czasu ($F[12,216]=1.34$, N. S.) oraz interakcji obu zmiennych ($F[36,216]=1.34$, N. S.) na stężenie NM w STR szczura (rys. 16 B).

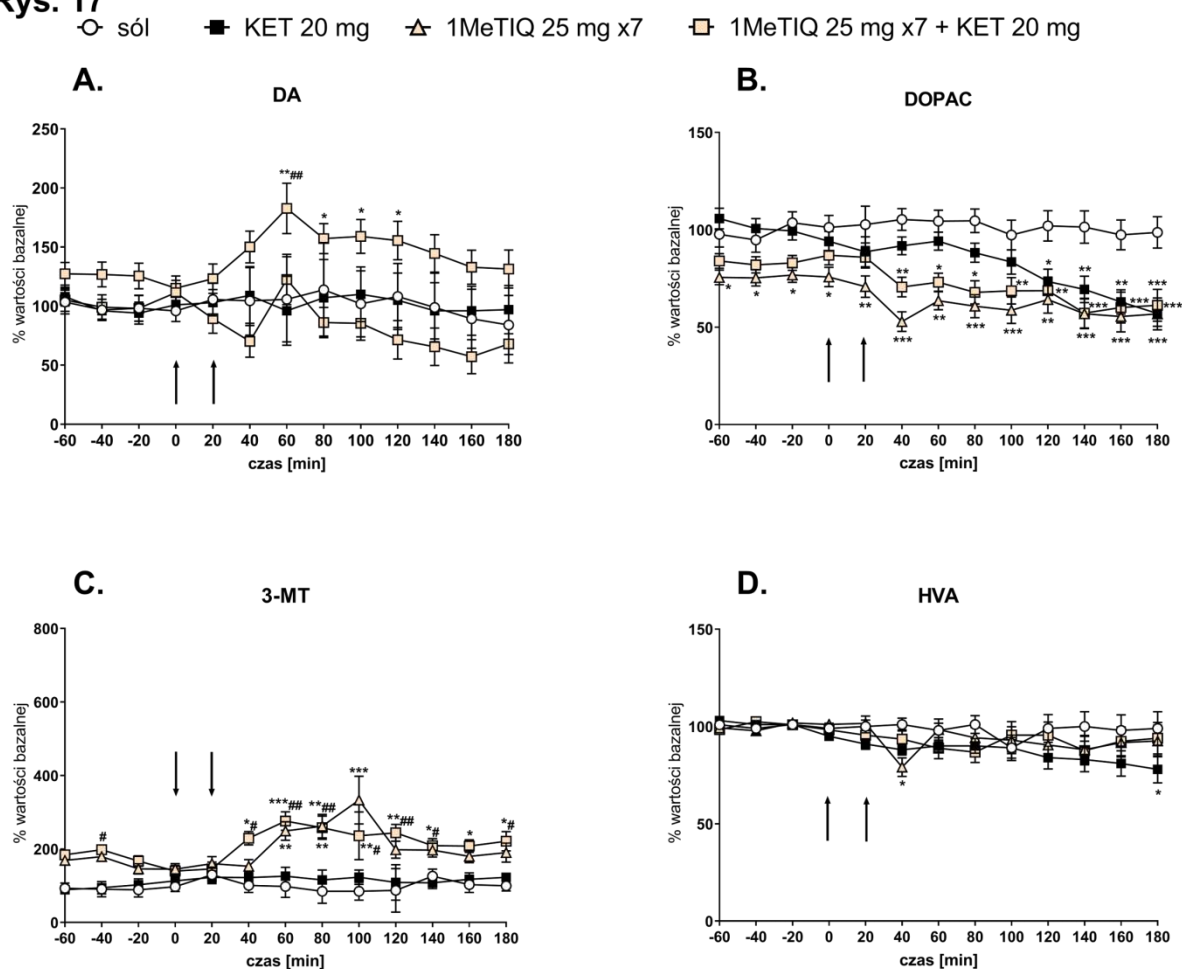
Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów nie wykazała statystycznie istotnego wpływu podanych związków ($F[3,18]=1.24$, N. S.), czasu ($F[12,216]=0.82$, N. S.) oraz interakcji obu zmiennych ($F[36,216]=0.73$, N. S.) na poziom 5-HT w STR szczura (rys. 16 C).

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów nie wykazała znamionnego wpływu iniekcji ($F[3,18]=1.76$, N. S.) na poziom 5-HIAA w STR, natomiast efekt czasu ($F[12,216]=2.59$, $p < 0.01$) oraz interakcja obu czynników ($F[36,216]=2.28$, $p < 0.001$) okazały się być istotne statystycznie dla stężenia 5-HIAA. Analiza post hoc wykazała spadek poziomu 5-HIAA w grupie, która otrzymała OLA w 160 i 180 minucie ($p < 0.05$) porównując do poziomu kontrolnego (rys. 16 D).

4.4.4. Mikrodializa w STR – chroniczne (7x) podania 1MeTIQ 25 mg/kg i jednokrotne podanie ketaminy 20 mg/kg, analiza poziomu monoamin i ich metabolitów

4.4.4.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Rys. 17



Rys. 17: Wpływ wielokrotnych podań 1MeTIQ (7 x 25 mg/kg, i.p.) na zmiany poziomów DA (A) i jej metabolitów: DOPAC (B), HVA (C) i 3-MT (D) wywołane jednokrotnym podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała wielokrotne podania soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano ostatnią dawkę 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 minut przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[3,18]=4.11$, $p < 0.05$), czasu ($F[12,216]=3.73$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu zmiennych ($F[36,216]=2.48$, $p < 0.001$) na poziom uwalniania DA w STR szczura. Test post hoc wykazał znamienny wzrost stężenia DA w grupie łącznej w 60 – 120 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „80” – „120”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „60”) w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo w tej grupie zaobserwowano istotny wzrost poziomu DA w porównaniu do poziomu z grupy KET w punkcie czasowym „60” ($p < 0.01$) (rys. 17 A)

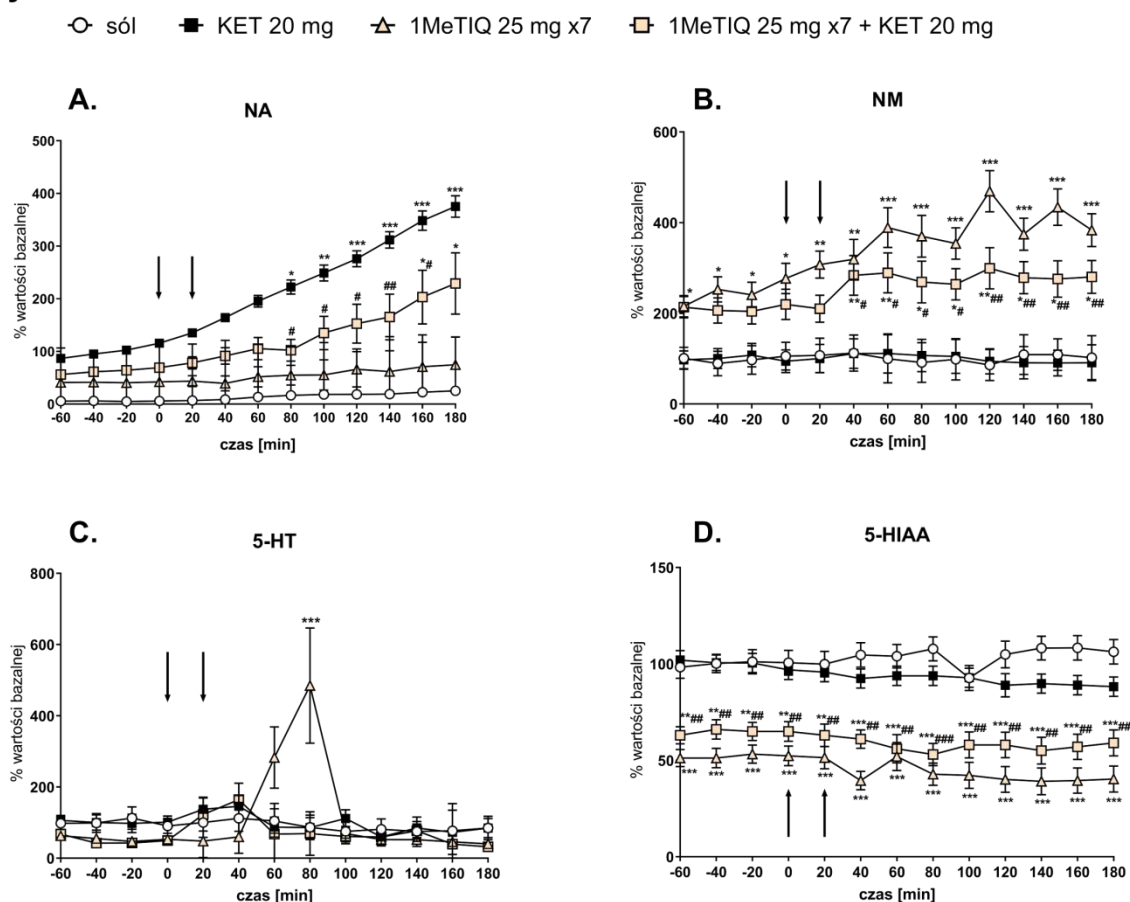
Ta sama analiza wykazała istotny wpływ podanych substancji ($F[3,18]=7.87$, $p < 0.01$), czasu ($F[12,216]=21.65$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych czynników ($F[36,216]=4.06$, $p < 0.001$) na poziom DOPAC w STR szczura. Analiza post hoc wykazała istotny spadek stężenia DOPAC w czasie 120 – 180 minut po podaniu KET w porównaniu do wartości kontrolnej ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „120”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „140” i „160”; $p < 0.001$ dla punktu czasowego „180”). W grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg), zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu DOPAC w STR we wszystkich analizowanych punktach czasowych w porównaniu do poziomu bazalnego ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „-60” – „0”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „20”, „60” i „120”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „40”, „80”, „100” i „140” – „180”). Podobny efekt zaobserwowano w grupie łącznej, w 40 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „60” i „80”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „40”, „100” i „120”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „140” – „180”). W grupie łącznej nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia DOPAC w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy KET (rys. 17 B).

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała istotny wpływ czasu ($F[12,216]=4.47$, $p < 0.001$) na poziom HVA w STR, natomiast wpływ zastosowanych związków ($F[3,18]=0.65$, N. S.) oraz interakcja obu analizowanych czynników ($F[36,216]=1.37$, N. S.) okazały się być nieistotne. Test post hoc wykazał znamienny spadek poziomu HVA w STR szczura w grupie KET w 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$) w porównaniu do wartości kontrolnej. W grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg), zaobserwowano znamienny spadek stężenia HVA 40 minut po podaniu ostatniej dawki związku ($p < 0.05$), porównując do poziomu kontrolnego. W grupie łącznej nie wykazano istotnych zmian w poziomie HVA we wszystkich analizowanych punktach czasowych (rys. 17 C).

Ta sama analiza wykazała istotny statystycznie wpływ zastosowanych związków ($F[3,18]=7.64$, $p < 0.01$), czasu ($F[12,216]=5.09$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych czynników ($F[26,216]=2.60$, $p < 0.001$) na poziom 3-MT w STR szczura. Analiza post hoc wykazała istotny wzrost poziomu 3-MT w grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg) w 60 – 100 minucie eksperymentu w porównaniu do wartości kontrolnych ($p < 0.01$ dla punktów czasowych „60” i „80”; $p < 0.001$ dla punktu czasowego „100”). Podobny efekt zaobserwowano w grupie łącznej w punktach czasowych „40” – „180”, porównując do poziomu kontrolnego ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „40” i „140” – „180”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „80” – „120”; $p < 0.001$ dla punktu czasowego „60”). W grupie łącznej zaobserwowano także znamieny wzrost stężenia 3-MT w porównaniu do danych punktów czasowych w grupie KET ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „-40”, „40”, „100”, „140” i „180”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „60”, „80” i „120”) (rys. 17 D).

4.4.4.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Rys. 18



Rys. 18: Wpływ wielokrotnych (7x) podań 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) na zmiany poziomów NA (A) i jej metabolitu NM (B) oraz 5-HT (C) i jej metabolitu 5-HIAA (D) wywołane jednokrotnym podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała wielokrotne podania soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano ostatnią dawkę 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 minut przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM. $N=6$ zwierząt na grupę. Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ podanych substancji ($F[3,17]=9.08$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,204]=20.04$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu czynników ($F[36,204]=5.29$, $p < 0.001$) na stężenie NA w STR szczura. Test post hoc wykazał znaczne zwiększenie uwalniania NA w 80 – 180 minucie

eksperymentu w grupie KET w porównaniu do poziomu kontrolnego ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „80”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „100”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „120” – „180”). W grupie łącznej zaobserwowano istotny wzrost stężenia NA w porównaniu do poziomu bazalnego w 160 i 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$). Dodatkowo w grupie łącznej, w porównaniu do danych punktów czasowych w grupie KET, zaobserwowano spadek poziomu NA w 80 – 160 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „80” – „120” i „160”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „140”) (rys. 18 A).

Ten sam rodzaj analizy statystycznej wykazał istotny wpływ zastosowanych związków ($F[3,18]=2.54$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=7.25$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu czynników ($F[36,216]=3.76$, $p < 0.001$) na stężenie NM w STR. Analiza post hoc ujawniła znamienne wzrost poziomu uwalnianej NM w grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg) we wszystkich analizowanych punktach czasowych eksperymentu w porównaniu do poziomu bazalnego ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „-60” – „0”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „20” i „40”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „180”). W grupie łącznej analiza post hoc wykazała istotny wzrost stężenia NM w 40 – 180 minucie eksperymentu w porównaniu do wartości kontrolnych ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „80”, „100” i „140” – „180”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „40”, „60” i „120”). Dodatkowo w grupie łącznej, w porównaniu do danych punktów czasowych w grupie KET, wykazano wzrost poziomu NM w 40 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „40” – „100”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „120” – „180”) (rys. 18 B).

Analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego efektu podanych substancji ($F[3,18]=0.41$, N. S.) oraz czasu ($F[12,26]=1.70$, N. S.), natomiast efekt interakcji obu analizowanych czynników ($F[36,216]=1.71$, $p < 0.05$) okazał się być istotnym na stężenia 5-HT w STR. Test post hoc wykazał znaczny wzrost uwalniania 5-HT w 80 minucie eksperymentu ($p < 0.001$) w porównaniu do wartości bazalnej w grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTIQ. Nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia 5-HT w pozostałych grupach w analizowanych punktach czasowych (rys. 18 C).

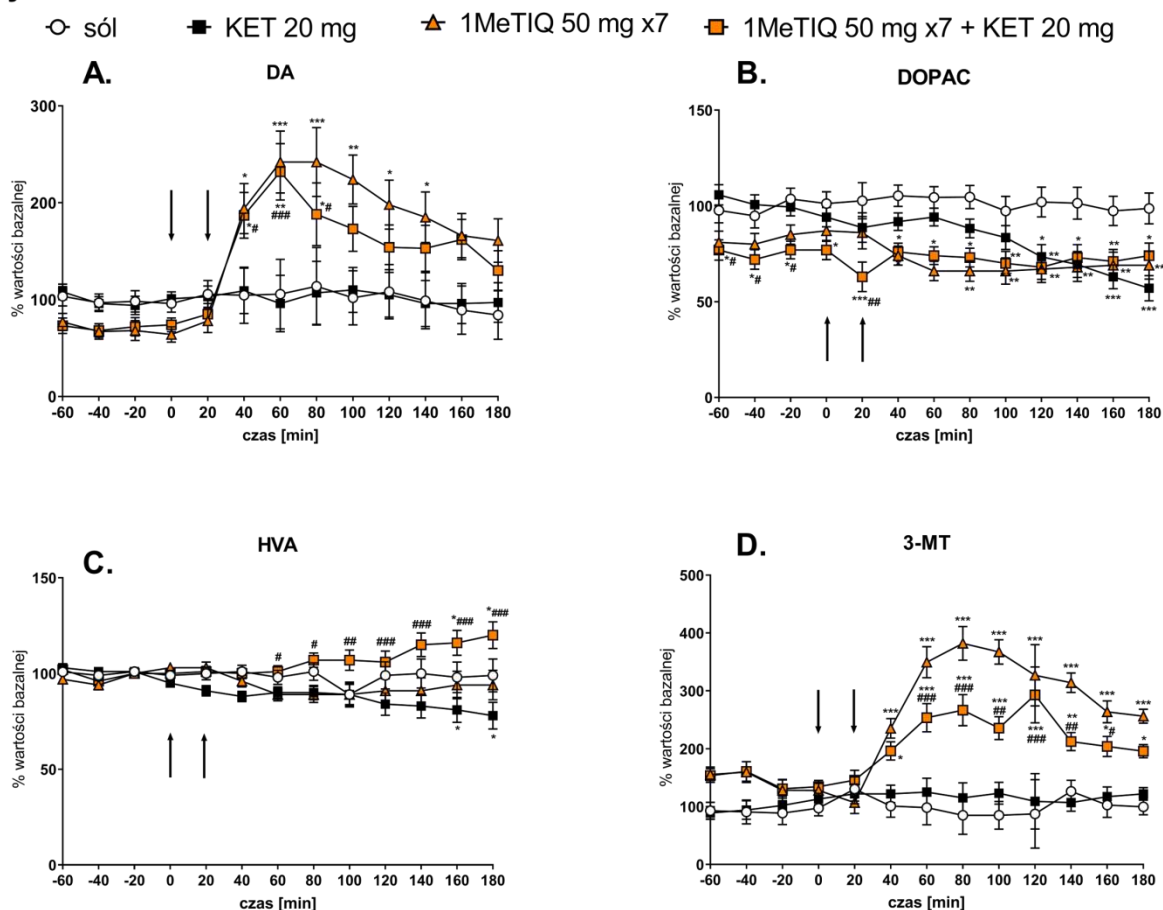
Analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny statystycznie wpływ zastosowanych związków ($F[3,18]=22.43$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,216]=4.13$, $p < 0.001$) i interakcji obu analizowanych zmiennych ($F[36,216]=2.35$, $p < 0.001$) na stężenie 5-HIAA w STR. Test post hoc wykazał istotny spadek poziomu 5-HIAA w grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg) we wszystkich analizowanych punktach czasowych

w porównaniu z wartością bazalną („-60” – „180”; $p < 0.001$). W grupie łącznej zaobserwowano znamienne spadki stężenia 5-HIAA we wszystkich punktach czasowych eksperymentu w odniesieniu do poziomu kontrolnego ($p < 0.01$ dla punktów czasowych „-60” – „20”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „40” – „180”). Dodatkowo w grupie łącznej wykazano istotny statystycznie spadek poziomu 5-HIAA w porównaniu do wszystkich punktów czasowych z grupy KET ($p < 0.01$ dla punktów czasowych „-60” – „60” i „100” – „180”; $p < 0.001$ dla punktu czasowego „80”) (rys. 18 D).

4.4.5. Mikrodializa w STR– chroniczne (7x) podania 1MeTIQ 50 mg/kg i jednorazowe podanie ketaminy 20 mg/kg, analiza poziomu monoamin i ich metabolitów

4.4.5.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Rys. 19



Rys. 19: Wpływ wielokrotnych (7x) podań 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.) na zmiany poziomów DA (A) i jej metabolitów: DOPAC (B), HVA (C) i 3-MT (D) wywołane jednokrotnym podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała wielokrotne podania soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano ostatnią dawkę 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 minut przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego wpływu podanych związków ($F[3,17]=1.93$, N. S.) na poziom uwalnianej DA w STR szczura,

natomiast efekt czasu ($F[12,204]=25.77$, $p < 0.001$) i interakcja obu badanych czynników ($F[36,204]=8.28$, $p < 0.001$) okazały się mieć istotny wpływ na badany parametr. Test post hoc wykazał istotnie zwiększony poziom uwalniania DA w grupie, której wielokrotnie podano 1MeTIQ w czasie 40 – 140 minut po podaniu związku ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „40”, „120” i „140”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” i „80”) w porównaniu do poziomu kontrolnego. Równocześnie, w grupie łącznej zaobserwowano istotny wzrost poziomu DA w punktach czasowych 40 – 80 minut ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „40” i „80”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „60”) w porównaniu do grupy kontrolnej oraz danych punktów czasowych w grupie, która otrzymała KET ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „40” i „80”; $p < 0.001$ dla punktu czasowego „60”) (rys. 19 A).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[3,17]=6.55$, $p < 0.01$), czasu ($F[12,206]=7.18$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu czynników ($F[26,204]=3.76$, $p < 0.001$) na poziom DOPAC w STR. Test post hoc wykazał istotny spadek stężenia DOPAC po podaniu KET w czasie 120 – 180 minut od podania związku ($p < 0.01$ dla punktów czasowych „120” i „140”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „160” i „180”) w porównaniu do poziomu kontrolnego. W grupie, której wielokrotnie podano 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg zaobserwowano istotny spadek poziomu DOPAC w czasie 80 – 180 minut po podaniu ostatniej dawki związku ($p < 0.01$) w porównaniu do poziomu bazalnego. W grupie łącznej zaobserwowano istotny spadek stężenia DOPAC w porównaniu do grupy kontrolnej we wszystkich analizowanych punktach czasowych ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „-60” – „0”, „40” – „80”, „140” i „180”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „100”, „120” i „160”; $p < 0.001$ dla punktu czasowego „20”). Dodatkowo w grupie łącznej wykazano istotny spadek poziomu DOPAC w porównaniu do danych punktów czasowych w grupie, która otrzymała KET ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „-60” – „-20”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „20”). (rys. 19 B).

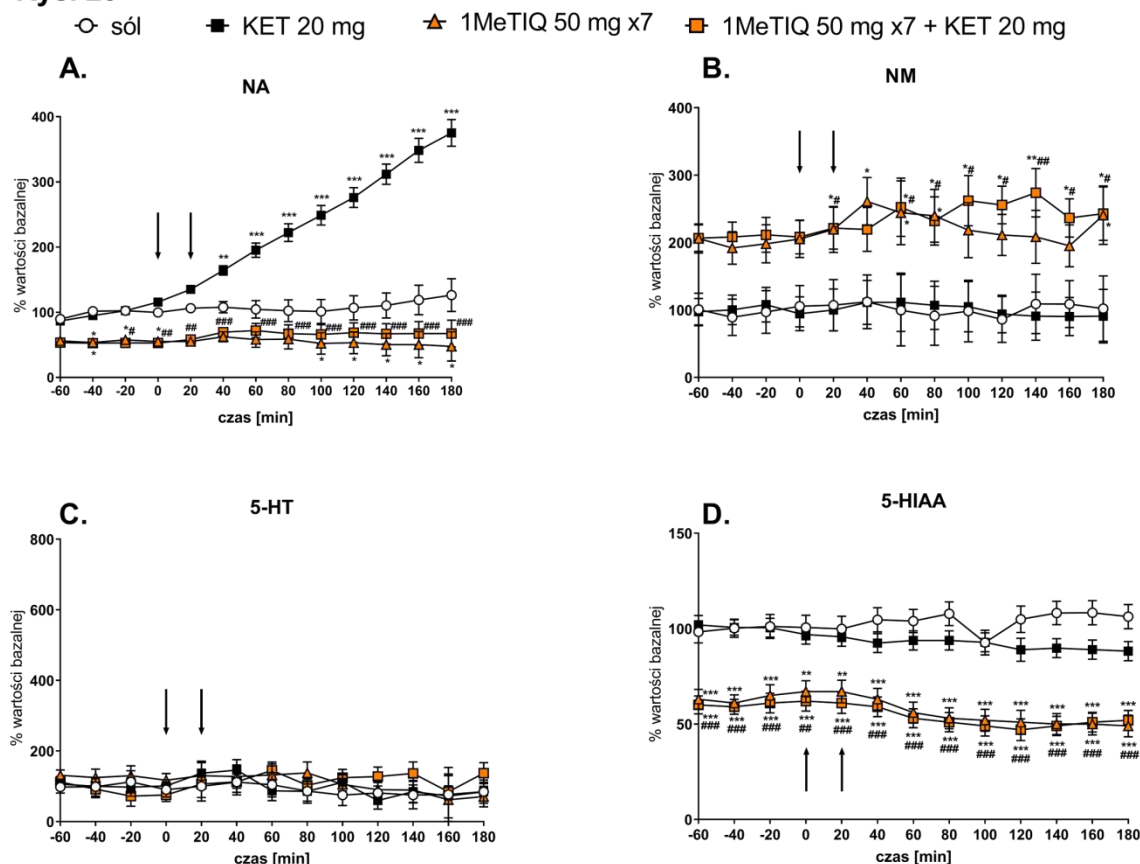
Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[3,17]=5.56$, $p < 0.01$) na stężenie HVA w STR szczura. Efekt czasu okazał się być nieistotny ($F[12,204]=1.36$, N. S.), natomiast interakcja obu czynników ($F[36,204]=3.59$, $p < 0.001$) okazała się być istotna. Test post hoc wykazał istotny spadek poziomu HVA 160 – 180 minut po podaniu KET ($p < 0.05$) w porównaniu do poziomu kontrolnego. W grupie łącznej zaobserwowano znamienny wzrost poziomu HVA w punktach czasowych „160” i „180” w porównaniu do wartości bazalnych ($p < 0.05$). Dodatkowo w grupie łącznej wykazano istotny wzrost stężenia HVA w punktach czasowych „60” – „180”

($p < 0.05$ dla punktów czasowych „60”, „80”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „100”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „120” – „180”) w porównaniu do danych punktów czasowych w grupie KET (rys. 19 C).

Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny statystycznie wpływ podanych substancji ($F[3,17]=31.68$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,204]=13.71$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych czynników ($F[36,204]=5.60$, $p < 0.001$) na poziom 3-MT w STR szczura. Analiza post hoc wykazała znaczny wzrost stężenia 3-MT w grupie, której wielokrotnie podano 1MeTIQ (50 mg/kg) w czasie 40-180 minut po podaniu ostatniej dawki związku, w porównaniu do poziomu kontrolnego ($p < 0.001$ dla wszystkich punktów czasowych). Dodatkowo zaobserwowano istotny wzrost poziomu 3-MT w grupie łącznej w porównaniu do wartości bazalnych, w punktach czasowych „40” – „180” ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „40”, „160” i „180”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „140”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „120”). W grupie łącznej wykazano także istotny wzrost poziomu 3-MT w porównaniu do danych punktów czasowych w grupie KET w czasie 60 – 160 minut od podania 1MeTIQ ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „160”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „140”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „120”) (rys. 19 D).

4.4.5.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Rys. 20



Rys. 20: Wpływ wielokrotnych (7x) podań 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.) na zmiany poziomów NA (A) i jej metabolitu NM (B), 5-HT (C) i jej metabolitu 5-HIAA (D) wywołane jednokrotnym podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w STR szczura. Grupa kontrolna otrzymała wielokrotne podania soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano ostatnią dawkę 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 minut przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM ($N=6$). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny statystycznie efekt podanych związków ($F[1,17]=504.21$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,204]=33.74$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych czynników ($F[36,204]=29.24$, $p < 0.001$) na poziom uwalniania NA w STR szczura. Analiza post hoc wykazała znaczny wzrost poziomu NA w grupie KET w czasie 40 – 180 minut eksperymentu, w porównaniu do poziomu

kontrolnego ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „40”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60” – „180”). W grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTQ (50 mg/kg) zaobserwowano istotny spadek stężenia NA w punktach czasowych „-40” oraz „100” – „180” w porównaniu do wartości bazalnej ($p < 0.05$ dla wszystkich punktów czasowych). W grupie łącznej wykazano spadek uwalniania NA w punktach czasowych „-40” – „0” w porównaniu do wartości kontrolnej oraz w czasie „-20” – „180”, porównując do danego punktu czasowego w grupie KET ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „-20”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „0” i „20”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „40” – 180”) (rys. 20 A).

Ta sama analiza statystyczna ujawniła istotny wpływ podanych substancji ($F[3,17]=5.45$, $p < 0.01$) oraz czasu ($F[12,204]=1.85$, $p < 0.05$) na poziom NM w STR. Efekt interakcji obu czynników okazał się być nieistotny ($F[36,204]=1.32$, N. S.). Analiza post hoc ujawniła znamieny wzrost stężenia NM w punktach czasowych „40” – „80” oraz „180” w grupie, która otrzymała chroniczne podania 1MeTIQ (50 mg/kg) ($p < 0.05$ dla wszystkich punktów czasowych) w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie łącznej wykazano istotny wzrost poziomu NM w punktach czasowych „20” i „60” – „180” w porównaniu do poziomu bazalnego ($p < 0.05$ dla wszystkich punktów czasowych). Ten sam efekt zaobserwowano, porównując poziomy stężenie NM w grupie łącznej do danych punktów czasowych z grupy KET ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „20”, „60” – „120”, „160” – „180”; $p < 0.01$ dla punktu czasowego „140”) (rys. 20 B).

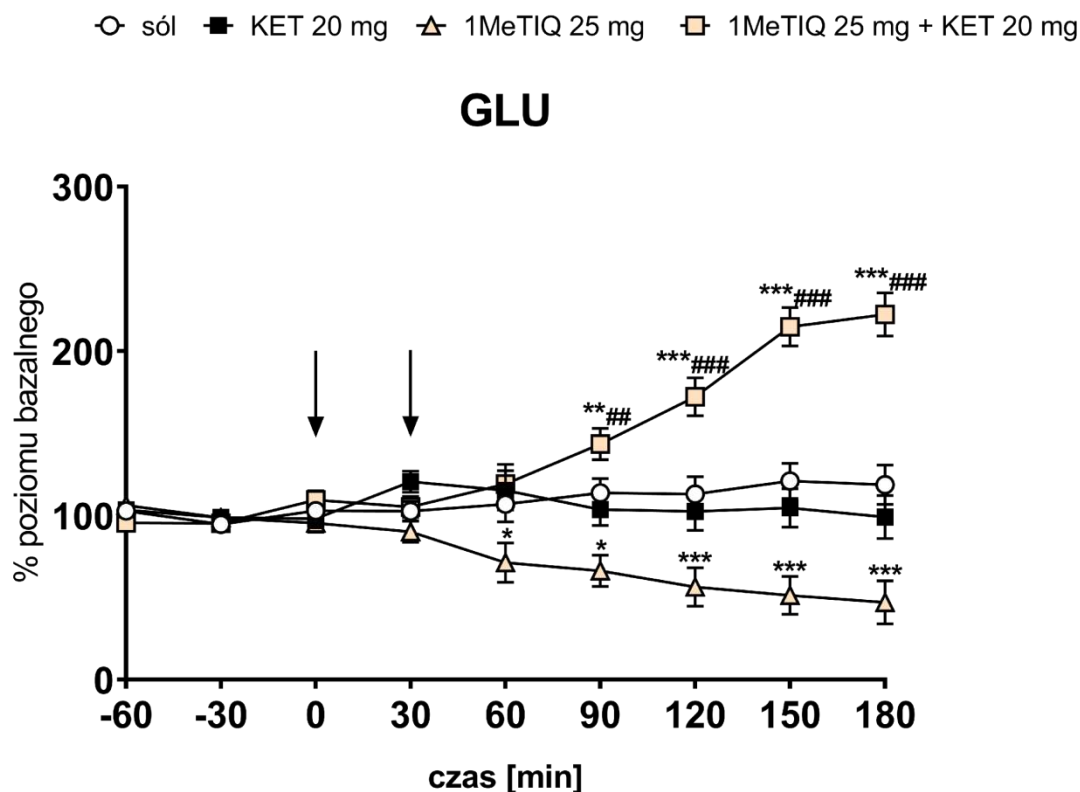
Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego efektu podanych substancji ($F[3,16]=0.37$, N. S.), czasu ($F[12,192]=1.44$, N. S.) oraz interakcji obu czynników ($F[36,192]=0.86$, N. S.) na poziom 5-HT w STR (rys. 20 C).

Ta sama analiza wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[3,17]=24.63$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,294]=8.10$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu badanych czynników ($F[36,204]=3.04$, $p < 0.001$) na poziom 5-HIAA w STR szczura. Analiza post hoc ujawniła istotny statystycznie spadek stężenia 5-HIAA w grupie, która otrzymała chroniczne podania 1MeTIQ (50 mg/kg) we wszystkich badanych punktach czasowych ($p < 0.01$ dla punktów czasowych „0” i „20”, $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych), w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie łącznej również zaobserwowano istotny spadek poziomu 5-HIAA we wszystkich analizowanych punktach czasowych w porównaniu do stężenia bazalnego ($p < 0.001$ dla wszystkich punktów czasowych). Dodatkowo w grupie łącznej wykazano znaczny spadek

5-HIAA we wszystkich punktach czasowych w porównaniu do grupy KET ($p < 0.001$ dla wszystkich punktów czasowych eksperymentu) (rys. 20 D).

4.4.6. Mikrodializa w FCX – jednorazowe podania 1MeTIQ 25 mg/kg i ketaminy 20 mg/kg, analiza poziomu glutaminianu

Rys. 21



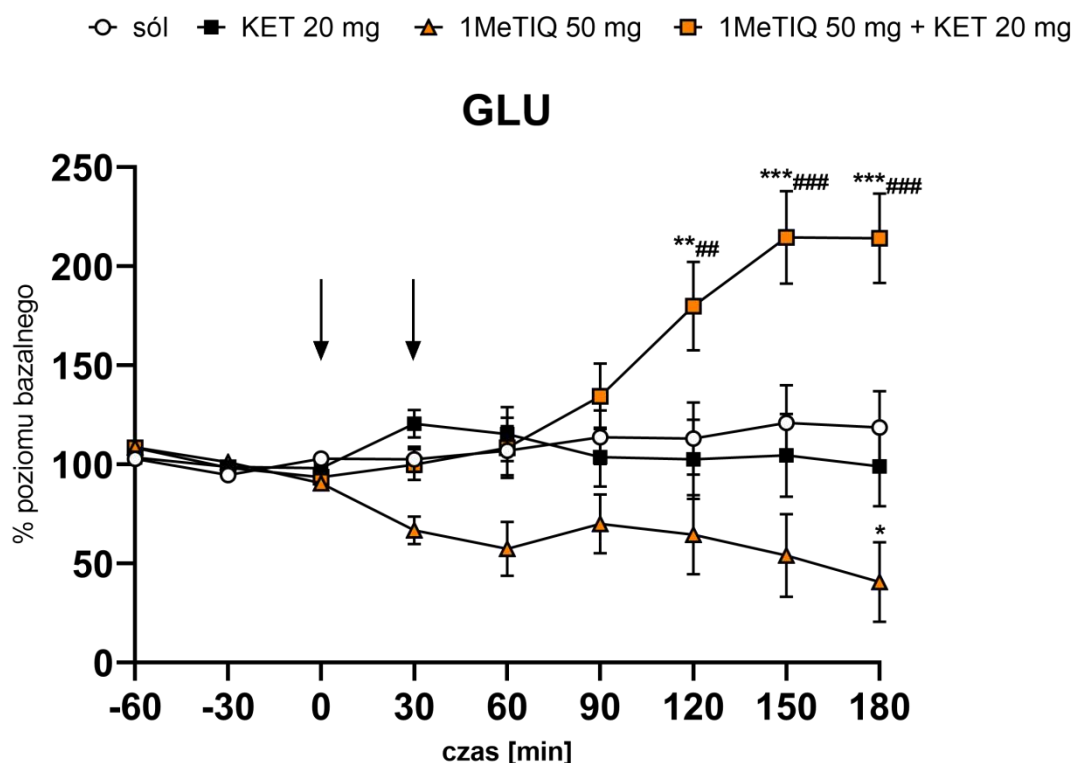
Rys. 21: Wpływ jednorazowego podania 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia GLU wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w FCX szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „30”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 30 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=5-6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 3 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ podanych substancji ($F[3,17]=25.48$, $p < 0.001$), czasu ($F[8,136]=14.26$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych zmiennych ($F[24,136]=14.26$, $p < 0.001$) na stężenie GLU w FCX szczura. Test post hoc wykazał istotny spadek poziomu GLU w grupie, która otrzymała 1MeTIQ (25 mg/kg) w 60 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „60” i „70”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „120” – 180”) w porównaniu do wartości bazalnej. W grupie łącznej zaobserwowano istotnie zwiększony poziom GLU w

czasie 90 – 180 minut ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „90”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych), porównując do poziomu kontrolnego. W tej grupie zaobserwowano także istotne zwiększenie stężenia GLU w stosunku do danych punktów czasowych z grupy KET, w 90 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „90”; $p < 0.001$ dla pozostałych punktów czasowych) (rys. 21).

4.4.7. Mikrodializa w FCX – jednorazowe podania 1MeTIQ 50 mg/kg i ketaminy 20 mg/kg, analiza poziomu glutaminianu

Rys. 22



Rys. 22: Wpływ jednokrotnego podania 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia GLU wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w FCX szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „30”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 30 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=5-6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 3 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

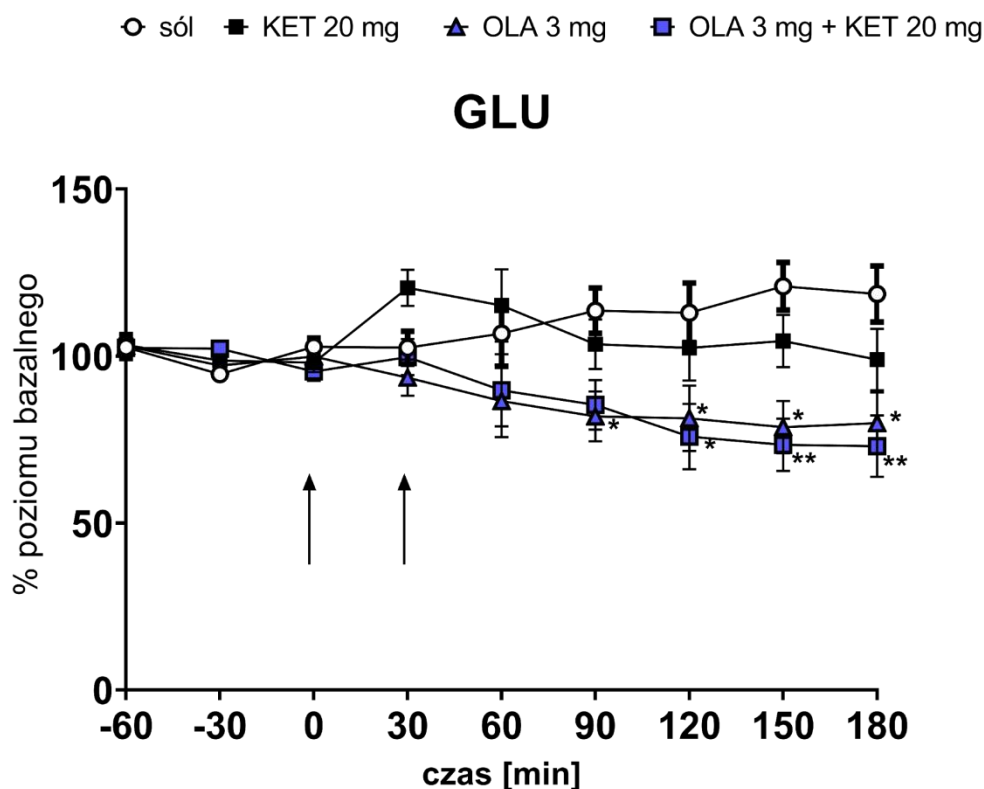
Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny statystycznie wpływ iniekcji ($F[3,16]=7.11$, $p < 0.01$), czasu ($F[8,128]=3.80$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu analizowanych czynników ($F[24,128]=6.33$, $p < 0.001$) na poziom GLU w FCX.

Analiza post hoc wykazała znamienne spadki stężenia GLU w grupie 1MeTIQ (50 mg/kg) w 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$) w porównaniu do wartości kontrolnej. W grupie łącznej

zaobserwowano istotny wzrost uwalniania GLU w 120 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „120”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „120” – „150”), porównując do poziomu kontrolnego. W grupie łącznej zaobserwowano także istotny wzrost stężenia GLU w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy KET: w 120, 150 i 180 minucie eksperymentu ($p < 0.01$ dla punktu czasowego „120”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „150” i „180”) (rys. 22).

4.4.8. Mikrodializa w FCX – jednorazowe podania olanzapiny 3 mg/kg i ketaminy 20 mg/kg, analiza poziomu glutaminianu

Rys. 23



Rys. 23: Wpływ jednorazowego podania olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia GLU wywołane podaniem ketaminy (KET; 20 mg/kg, i.p.) w FCX szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano OLA (w punkcie czasowym „0”) lub KET (w punkcie czasowym „30”). W grupie łącznej, OLA podano 30 min przed podaniem KET. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=5-6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 3 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

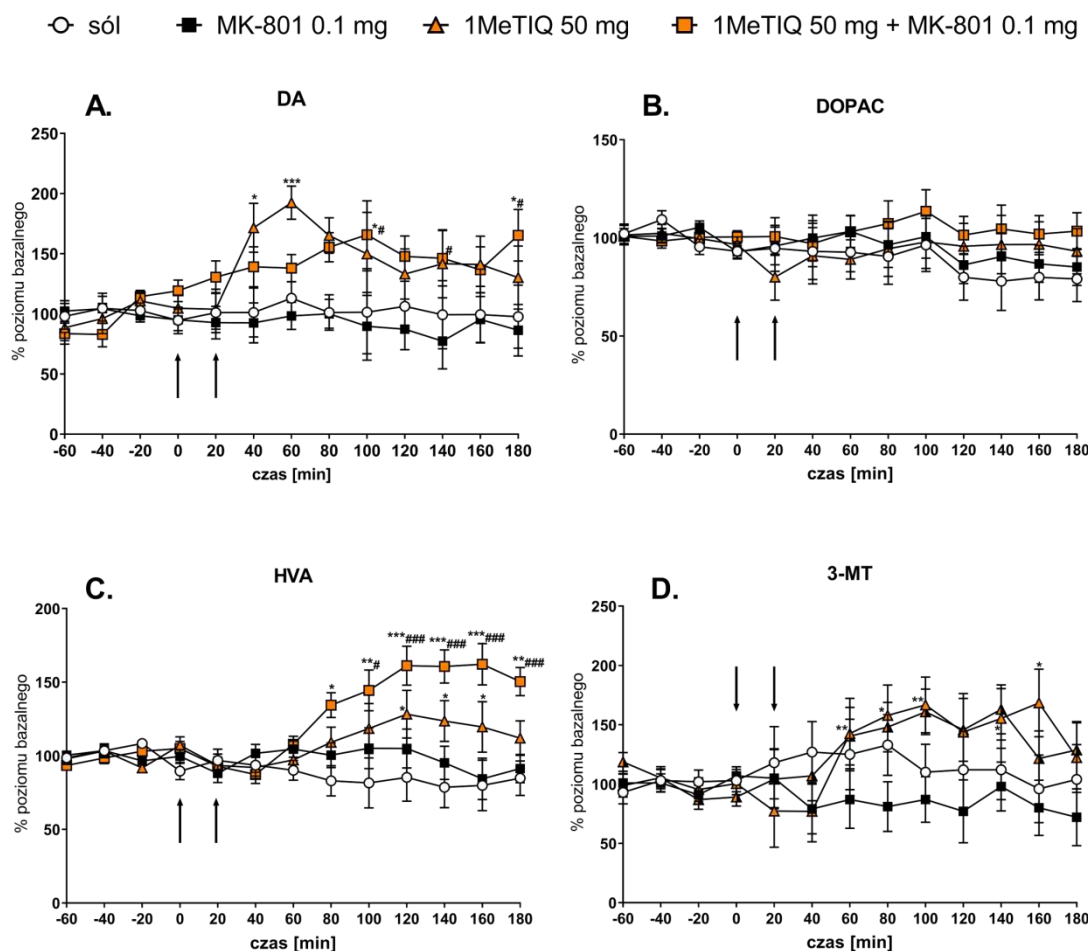
Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego wpływu czasu ($F[8,136]=1.99$, N. S.) na stężenie GLU w FCX szczura. Efekt podanych substancji ($F[3,17]=4.58$, $p < 0.05$) oraz interakcja obu analizowanych zmiennych ($F[24,136]=2.84$, $p < 0.001$) okazały się być istotne dla poziomu GLU. Test post hoc wykazał znamieny spadek stężenia GLU w 90 – 180 minucie eksperymentu w grupie, która otrzymała OLA ($p < 0.05$ dla wszystkich punktów czasowych), porównując do wartości

kontrolnej. W grupie łącznej obserwowano podobny efekt w 120 - 180 minucie ($p < 0.05$ dla punktu czasowego “120”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych “150” i “180”), w porównaniu do poziomu bazalnego (rys. 23).

4.4.9. Mikrodializa w HIP – jednorazowe podania 1MeTIQ 50 mg/kg i MK-801 0.1 mg/kg, analiza poziomu monoamin i ich metabolitów

4.4.9.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Rys. 24



Rys. 24: Wpływ jednokrotnego podania 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia DA (A) i jej metabolitów DOPAC (B), HVA (C) i 3-MT (D) wywołane podaniem MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.) w HIP szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub MK-801 (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 min przed podaniem MK-801. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy MK-801 w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[3,16]=5.54$, $p < 0.01$), czasu ($F[12,192]=3.12$, $p < 0.001$) i interakcji obu tych czynników ($F[36,192]=1.78$, $p < 0.01$) na poziom uwalniania DA w HIP. Analiza post hoc wykazała, że podanie 1MeTIQ powoduje zwiększony poziom uwalniania DA w HIP w czasie 40 - 60 minut po iniekcji w porównaniu do wartości kontrolnej. Podanie obu związków jednocześnie (grupa łączna) spowodowało istotne zwiększenie uwalniania DA w 100 i 180 minucie od podania 1MeTIQ ($p < 0.05$) w porównaniu do wartości kontrolnej, jak i do danych punktów czasowych w grupie MK-801 (rys. 24 A).

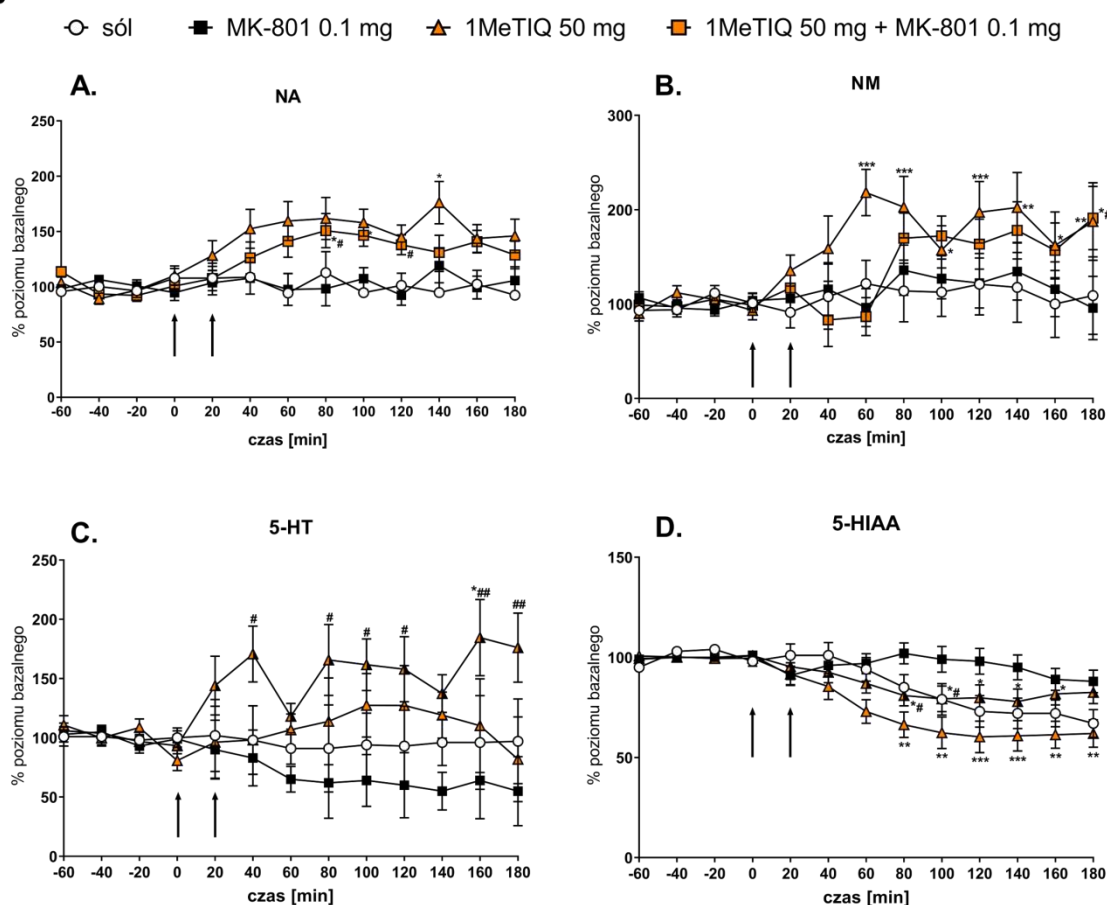
Ta sama analiza wykazała brak istotnego wpływu podanych związków ($F[3,16]=0.64$, N. S.), czasu ($F[12,192]=1.28$, N. S.) czy interakcji obu badanych czynników ($F[36,192]=0.78$, N. S.) na stężenie DOPAC w HIP szczura (rys. 24 B).

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ podanych substancji ($F[3,16]=6.45$, $p < 0.01$), czasu ($F[12,192]=5.62$, $p < 0.001$) i interakcji obu czynników ($F[36,192]=5.11$, $p < 0.001$) na poziom HVA w HIP szczura. Analiza post hoc wykazała, że jednokrotne podanie 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg spowodowało nieznaczne, lecz istotne zwiększenie stężenia HVA w 120 – 160 minucie eksperymentu ($p < 0.05$). W grupie łącznej zaobserwowano zwiększenie poziomu HVA o około 50% w porównaniu do poziomu kontrolnego w 80 – 180 minucie eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „80”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „100” i „180”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „120” – „160”). Dodatkowo w grupie łącznej zaobserwowano istotny wzrost stężenia HVA w odniesieniu do danych punktów czasowych z grupy MK-801 ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „100”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „120” – „180”) (rys. 24 C).

Analiza statystyczna ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny wpływ podań ($F[3,16]=4.72$, $p < 0.05$), czasu ($F[12,192]=3.06$, $p < 0.001$) i interakcji obu badanych czynników ($F[36,192]=2.17$, $p < 0.001$) na poziom 3-MT w HIP. Test post hoc wykazał, że podanie 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg istotnie zwiększa stężenie 3-MT w porównaniu do poziomu kontrolnego ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „80” i „160”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „60” i „100”). Nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie 3-MT w innych badanych grupach w analizowanych punktach czasowych (rys. 24 D).

4.4.9.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Rys. 25



Rys. 25: Wpływ jednokrotnego podania 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia NA (A) i jej metabolitu NM (B), 5-HT (C) i jej metabolitu 5-HIAA (D) wywołane podaniem MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.) w hipokampie szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub MK-801 (w punkcie czasowym „20”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 20 min przed podaniem MK-801. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy MK-801 w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego wpływu podanych substancji ($F[3,16]=2.89$, N. S.) na poziom uwalnianej NA w HIP, natomiast efekt czasu ($F[12,192]=3.13$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu czynników ($F[36,192]=1.52$, $p < 0.05$) okazały się statystycznie istotne. Analiza post hoc wykazała, że podanie 1MeTIQ w dawce 50 mg znamienne zwiększyło uwalnianie NA w 140 minucie po

podaniu ($p < 0.05$) w porównaniu do wartości kontrolnych. W grupie łącznej, zaobserwowano istotne zwiększenie stężenia NA w czasie 80 – 100 minut po podaniu 1MeTIQ w porównaniu do poziomu bazalnego ($p < 0.05$). Dodatkowo w grupie łącznej wykazano zwiększenie poziomu NA w porównaniu do danych punktów czasowych z grupy MK-801 w 80 i 120 minucie eksperymentu ($p < 0.05$) (rys. 25 A).

Ta sama analiza wykazała statystycznie istotny wpływ zastosowanych związków ($F[3,16]=4.01$, $p < 0.001$), czasu ($F[12,192]=8.19$, $p < 0.001$) i interakcji obu wspomnianych czynników ($F[36,192]=2.54$, $p < 0.001$) na poziom NM w HIP szczura. Analiza post hoc wykazała istotnie zwiększone stężenie NM po podaniu 1MeTIQ (do około 200%) do końca trwania eksperymentu ($p < 0.05$ dla punktów czasowych „100” i „140”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „140” i „180”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „60”, „80” i „120”), natomiast łączne podanie 1MeTIQ i MK-801 spowodowało istotne zwiększenie poziomu NM w 180 minucie, w porównaniu zarówno do poziomu kontrolnego, jak i grupy MK-801 (oba $p < 0.05$) (rys. 25 B).

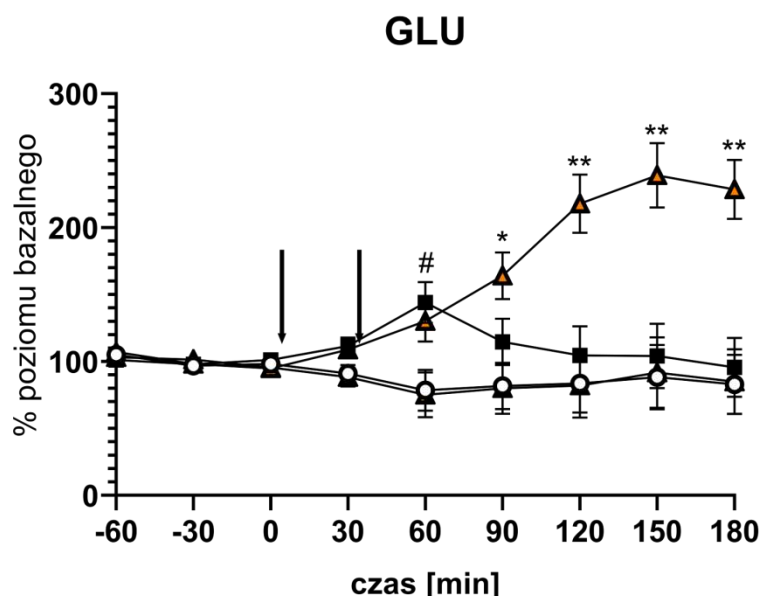
Dwuczynnikowa ANOVA dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny statystycznie wpływ podanych związków ($F[3,16]=4.11$, $p < 0.05$) na stężenie 5-HT. Efekt czasu okazał się być nieistotny ($F[12,192]=0.57$, N. S.), jednak interakcja obu czynników była statystycznie istotna ($F[36,192]=1.69$, $p < 0.05$). Test post hoc wykazał istotny wzrost uwalniania 5-HT 160 minut po podaniu 1MeTIQ, zarówno w porównaniu do poziomu kontrolnego, jak i MK-801 (rys. 25 C).

Analiza statystyczna dla powtarzanych pomiarów wykazała brak istotnego wpływu podanych substancji na poziom 5-HIAA ($F[3,16]=2.07$, N. S.), natomiast efekt czasu ($F[12,192]=25.98$, $p < 0.001$) i interakcja obu badanych czynników ($F[36,192]=3.13$, $p < 0.001$) okazały się istotnie wpływać na poziomy 5-HIAA. Analiza post hoc wykazała istotny spadek (o około 50%) uwalniania 5-HIAA w grupie 1MeTIQ w czasie 80 – 180 minut po podaniu tego związku w porównaniu do poziomu kontrolnego ($p < 0.01$ dla punktów czasowych „80”, „160” i „180”; $p < 0.001$ dla punktów czasowych „100” – „140”). Dodatkowo w grupie łącznej, w czasie 100 – 160 minut po podaniu 1MeTIQ, zaobserwowano istotny spadek poziomu 5-HIAA ($p < 0.05$) (rys. 25 D).

4.4.10. Mikrodializa w HIP – jednorazowe podania 1MeTIQ 50 mg/kg i MK-801 0.1 mg/kg, analiza poziomu glutaminianu

Rys. 26

○ sól ■ MK-801 0.1 mg ▲ 1MeTIQ 50 mg ▲ 1MeTIQ 50 mg + MK-801 0.1 mg



Rys. 26: Wpływ jednokrotnego podania 1MeTIQ (50 mg/kg, i.p.) na zmiany stężenia GLU wywołane podaniem MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.) w HIP szczura. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Próbkę kontrolną (bazalną) pobrano od punktu czasowego „-60” do „0”; następnie podano 1MeTIQ (w punkcie czasowym „0”) lub MK-801 (w punkcie czasowym „30”). W grupie łącznej, 1MeTIQ podano 30 min przed podaniem MK-801. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM (N=6). Istotność statystyczna: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do wartości kontrolnej – średniej dla 4 pomiarów bazalnych; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy MK-801 w danym punkcie czasowym. Strzałki symbolizują czas podania związków.

Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtarzanych pomiarów wykazała istotny efekt iniekcji ($F[3,19]=8.01$, $p < 0.01$), czasu ($F[8,152]=4.05$, $p < 0.001$) oraz interakcji obu tych czynników ($F[24,152]=7.91$, $p < 0.001$) na poziom uwalnianego GLU w HIP szczura. Test post hoc wykazał istotny wzrost stężenia GLU w grupie, która otrzymała 1MeTIQ (50 mg/kg) w czasie 90 – 180 minut po podaniu związku ($p < 0.05$ dla punktu czasowego „90”; $p < 0.01$ dla punktów czasowych „120”-„180” min) w porównaniu do poziomu kontrolnego. W grupie

łącznie zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu GLU w 60 minucie eksperymentu ($p < 0.05$) w porównaniu do danego punktu czasowego z grupy MK-801 (rys. 26).

4.5. Badania ex vivo

4.5.1. Analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w FCX (model ketaminowy)

4.5.1.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Tab.1

FCX				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	422 ± 35	132 ± 10	181 ± 10	7.5 ± 0.8
KET 10 mg/kg	493 ± 29	139 ± 8	194 ± 12	4.5 ± 1.3
1MeTIQ 25 mg/kg	568 ± 65	93 ± 8	169 ± 16	6 ± 1.9
1MeTIQ 50 mg/kg	614 ± 51*	80 ± 5	99 ± 31*	3.7 ± 0.8*
OLA 3 mg/kg	463 ± 48	334 ± 24**	575 ± 23**	6 ± 0.3
1MeTIQ 25 mg/kg + KET 10 mg/kg	672 ± 64**#	115 ± 6	172 ± 22	5.5 ± 1.4
1MeTIQ 50 mg/kg + KET 10 mg/kg	588 ± 86	87 ± 13	59 ± 12 **##	2.8 ± 0.7 *
OLA 3 mg/kg + KET 10 mg/kg	382 ± 49	322 ± 33**##	583 ± 48 **##	2.1 ± 0.4**

Tab. 1: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z FCX. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę ketaminy (KET; 10 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem KET. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01;

*** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy KET.

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[7,40]=3.30$, $p < 0.01$) na poziom DA w FCX szczura. Analiza post hoc wykazała znamienne wzrost stężenia DA w grupie, która otrzymała 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg ($p < 0.05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie łącznej (1MeTIQ 25 mg/kg + KET) zaobserwowano istotne zwiększenie poziomu DA, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.01$), jak i grupy KET ($p < 0.05$) (tab. 1).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny wpływ iniekcji ($F[7,40]=39.59$, $p < 0.01$) na stężenie DOPAC w FCX. Test post hoc wykazał, że OLA, podana zarówno sama, jak i z KET, istotnie zwiększyła stężenie tego metabolitu, porównując do grupy kontrolnej (oba $p < 0.01$). W grupie łącznej zaobserwowano także istotny wzrost stężenia DOPAC w stosunku do grupy KET ($p < 0.01$). Nie zaobserwowano istotnych zmian w pozostałych grupach badawczych (tab. 1).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny efekt podanych związków ($F[7,40]=67.83$, $p < 0.01$) na stężenie HVA w FCX. Test post hoc wykazał znamienne spadki poziomu HVA w grupie, która otrzymała 1 MeTIQ w dawce 50 mg/kg ($p < 0.05$), w porównaniu do stężenia z grupy kontrolnej, natomiast podanie OLA spowodowało istotny wzrost stężenia tego metabolitu ($p < 0.01$) w stosunku do wartości kontrolnej. W grupie łącznej (1MeTIQ 50 mg/kg + KET) zaobserwowano istotnie obniżone stężenie HVA, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, jak i grupy KET (oba $p < 0.01$). W grupie, która otrzymała łączne podanie OLA i KET, wykazano znaczny wzrost stężenia HVA, w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.01$) i grupy KET ($p < 0.01$) (tab. 1).

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[7,40]=2.80$, $p < 0.05$) na stężenie 3-MT w FCX. Analiza post hoc ujawniła znamienne spadki poziomu tego metabolitu w stosunku do grupy kontrolnej w grupie, która otrzymała 1MeTIQ (50 mg/kg), zarówno sam, jak i w połączeniu z KET (oba $p < 0.05$). W grupie łącznej (OLA + KET) również zaobserwowano istotne zmniejszenie poziomu 3-MT ($p < 0.01$), porównując do poziomu kontrolnego (tab. 1).

4.5.1.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 2

FCX				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	351 ± 10	44 ± 7	421 ± 27	185 ± 7
KET 10 mg/kg	361 ± 9	44 ± 5	434 ± 19	210 ± 17
1MeTIQ 25 mg/kg	362 ± 18	66 ± 7*	570 ± 26**	170 ± 9
1MeTIQ 50 mg/kg	365 ± 17	98 ± 4**	533 ± 17**	147 ± 15*
OLA 3 mg/kg	293 ± 11*	37 ± 4	385 ± 23	202 ± 17
1MeTIQ 25 mg/kg + KET 10 mg/kg	368 ± 19	61 ± 6	551 ± 23**	155 ± 14#
1MeTIQ 50 mg/kg + KET 10 mg/kg	365 ± 17	85 ± 10***##	487 ± 25	147 ± 15##
OLA 3 mg/kg + KET 10 mg/kg	308 ± 13*#	27 ± 4	338 ± 23*	215 ± 14

Tab. 2: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z FCX. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę ketaminy (KET; 10 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem KET. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i. p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy KET.

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny wpływ iniekcji (F[7,40]=3.91, p < 0.01) na stężenie NA w FCX. Test post hoc wykazał znamienny spadek poziomu NA w grupie, która otrzymała OLA, zarówno samą, jak i z KET (oba p < 0.05), w

porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo w grupie łącznej (OLA + KET) wykazano znamienny spadek poziomu NA w stosunku do grupy KET ($p < 0.05$) (tab. 2).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt podanych substancji ($F[7,40]=15.7$, $p < 0.01$) na stężenie NM w FCX. Test post hoc wykazał istotny wzrost w grupie, która otrzymała 1MeTIQ ($p < 0.05$ dla dawki 25 mg/kg; $p < 0.01$ dla dawki 50 mg/kg) w stosunku do wartości kontrolnej. W grupie łącznej (1MeTIQ 50 mg/kg + KET) zaobserwowano istotny wzrost poziomu tego metabolitu, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej, jak i grupy ket (oba $p < 0.01$) (tab. 2).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny efekt iniekcji ($F[7,40]=14.14$, $p < 0.01$) na stężenie 5-HT w FCX. Analiza post hoc wykazała, że podanie 1 MeTIQ, zarówno w dawce 25, jak i 50 mg/kg, istotnie zwiększa poziom 5-HT ($p < 0.01$) w stosunku do wartości kontrolnej. W grupie łącznej (1MeTIQ 25 mg/kg + KET) wykazano istotny wzrost stężenia 5-HT ($p < 0.01$) w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast podanie OLA łącznie z KET spowodowało spadek poziomu tego neuroprzekaźnika ($p < 0.05$) (tab. 2).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt podanych substancji ($F[7,40]=5.19$, $p < 0.01$) na poziom 5-HIAA w FCX. Analiza post hoc wykazała znamienny spadek stężenia tego metabolitu w stosunku do poziomu kontrolnego po podaniu OLA ($p < 0.05$). Obniżenie poziomu 5-HIAA zaobserwowano również w grupach łącznych (1MeTIQ 25 mg/kg + KET oraz 1MeTIQ 50 mg/kg + KET) w stosunku do wartości z grupy KET (odpowiednio $p < 0.05$ oraz $p < 0.01$) (tab. 2).

4.5.2. Analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w HIP (model ketaminowy)

4.5.2.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Tab.3

HIP				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	51 ± 9	18 ± 3	25 ± 8	44 ± 15
KET 10 mg/kg	56 ± 9	24 ± 4	33 ± 10	58 ± 6
1MeTIQ 25 mg/kg	65 ± 4	19.7 ± 2	25 ± 9	73 ± 6
1MeTIQ 50 mg/kg	92 ± 3**	19.5 ± 2	12 ± 7	51.7 ± 12
OLA 3 mg/kg	65 ± 6	37.5 ± 3**	44 ± 16	66 ± 15
1MeTIQ 25 mg/kg + KET 10 mg/kg	86 ± 11*#	19.5 ± 2	17 ± 10	56.5 ± 9
1MeTIQ 50 mg/kg + KET 10 mg/kg	97 ± 11***##	19.8 ± 1	7 ± 6	46 ± 3
OLA 3 mg/kg + KET 10 mg/kg	65 ± 8	40 ± 3***##	61 ± 22	74 ± 16

Tab. 3: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z HIP. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę ketaminy (KET; 10 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem KET. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy KET.

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ iniekcji (F[7,37]=4.10, p < 0.01) na poziom DA w HIP szczura. Test post hoc wykazał istotne zwiększenie poziomu

tego neuroprzekaźnika po podaniu 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg ($p < 0.01$) w stosunku do grupy kontrolnej. W grupach łącznych (MeTIQ 25 mg/kg + KET oraz 1MeTIQ 50 mg/kg + KET) wykazano istotny wzrost stężenia DA zarówno w stosunku do poziomu kontrolnego, jak i wartości z grupy KET (odpowiednio $p < 0.05$ oraz $p < 0.01$) (tab. 3).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt podanych związków ($F[7,39]=10.65$, $p < 0.01$) na stężenie DOPAC w HIP. Analiza post hoc ujawniła istotny wzrost poziomu tego metabolitu w porównaniu do poziomu kontrolnego w grupie, która otrzymała OLA, zarówno samą, jak i w połączeniu z KET (oba $p < 0.01$). Podobny efekt obserwowano w grupie łącznej (OLA + KET) w stosunku do wartości z grupy KET (tab. 3).

Jednoczynnikowa analiza ANOVA nie wykazała istotnego wpływu zastosowanych związków, zarówno na poziom HVA ($F[7,40]=2.06$, N. S.) jak i na poziom 3-MT ($F[7,32]=1.02$, N. S.) w HIP szczura (tab. 3).

4.5.2.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 4

HIP				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	421 ± 43	70 ± 1	403 ± 107	339 ± 24
KET 10 mg/kg	333 ± 35*	60 ± 15	257 ± 16*	350 ± 30
1MeTIQ 25 mg/kg	371 ± 21	78 ± 8	387 ± 9	291 ± 8
1MeTIQ 50 mg/kg	308 ± 10**	113 ± 9*	289 ± 10	219 ± 19**
OLA 3 mg/kg	253 ± 14**	41 ± 13	261 ± 24*	325 ± 27
1MeTIQ 25 mg/kg +	328 ± 23*	92 ± 15	314 ± 16	275 ± 25
KET 10 mg/kg				
1MeTIQ 50 mg/kg +	292 ± 17**	96 ± 15	265 ± 15*	205 ± 27***##
KET 10 mg/kg				
OLA 3 mg/kg +	308 ± 21**	75 ± 4	264 ± 13*	382 ± 27
KET 10 mg/kg				

Tab. 4: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z HIP. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę ketaminy (KET; 10 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i. p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem KET. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy KET.

Jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny efekt iniekcji (F[7,40]=4.00, p < 0.01) na stężenie NA w HIP. Test post hoc wykazał znamieny spadek poziomu NA w grupie KET (p < 0.05) w stosunku do poziomu kontrolnego. Istotne obniżenie stężenia NA w stosunku do

grupy kontrolnej obserwowano także po podaniu 1MeTIQ (50 mg/kg) oraz OLA (oba $p < 0.01$). Podobny efekt – spadek poziomu NA - wykazano we wszystkich grupach łącznych, porównując do wartości z grupy kontrolnej ($p < 0.05$ dla grupy 1MeTIQ 25 mg/kg + KET; $p < 0.01$ dla pozostałych grup) (tab. 4).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[7,38]=2.61$, $p < 0.01$) na poziom NM w HIP szczura. Analiza post hoc wykazała znamienne wzrost stężenia NM ($p < 0.05$) w grupie, która otrzymała 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg, porównując do wartości kontrolnej. Nie zaobserwowano innych zmian w pozostałych grupach badawczych (tab. 4).

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała znamienne wpływy zastosowanych związków ($F[7,36]=2.39$, $p < 0.05$) na stężenie 5-HT w HIP. Test post hoc ujawnił znamienne spadki poziomu 5-HT w grupie KET oraz OLA (oba $p < 0.05$) w stosunku do grupy kontrolnej. Podobny efekt zaobserwowano w grupach łącznych (1MeTIQ 50 mg/kg + KET oraz OLA + KET), porównując do poziomu kontrolnego (oba $p < 0.05$) (tab. 4).

Ta sama analiza statystyczna ujawniła istotny wpływ iniekcji ($F[7,40]=6.71$, $p < 0.01$) na poziom 5-HIAA w HIP szczura. Test post hoc wykazał istotny spadek stężenia 5-HIAA ($p < 0.01$) w grupie 1MeTIQ, która otrzymała 1MeTIQ (50 mg/kg) zarówno sam, jak i w połączeniu z KET (oba $p < 0.05$) w stosunku do grupy kontrolnej. Dodatkowo, we wspomnianej wcześniej grupie łącznej, obserwowano istotny spadek poziomu 5-HIAA w stosunku do grupy KET ($p < 0.01$) (tab. 4).

4.5.3. Badania *ex vivo* - analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w STR (model ketaminowy)

4.5.3.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA i 3-MT)

Tab. 5

STR				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	10 472 ± 181	1337 ± 58	1136 ± 95	306 ± 42
KET 10 mg/kg	9904 ± 325	1328 ± 72	1073 ± 50	291 ± 18
1MeTIQ 25 mg/kg	10 972 ± 682	1413 ± 47	1191 ± 61	657 ± 20**
1MeTIQ 50 mg/kg	11 699 ± 345*	767 ± 37*	1011 ± 67	803 ± 43**
OLA 3 mg/kg	10 704 ± 298	4053 ± 176**	4022 ± 125**	280 ± 26
1MeTIQ 25 mg/kg + KET 10 mg/kg	12 884 ± 390 **##	1002 ± 40	1222 ± 70	443 ± 36*
1MeTIQ 50 mg/kg + KET 10 mg/kg	10 280 ± 500	1757 ± 345	1190 ± 11.4	1021 ± 90***##
OLA 3 mg/kg + KET 10 mg/kg	10 544 ± 187	4619 ± 289 **##	4384 ± 250 **##	275 ± 33

Tab. 5: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z STR. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę ketaminy (KET; 10 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem KET. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #*p* < 0.05; ##*p* < 0.01; ###*p* < 0.001 w porównaniu do grupy KET.

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ iniekcji ($F[7,40]=5.76$, $p < 0.01$) na stężenie DA w STR szczura. Analiza post hoc wykazała znamienne wzrost poziomu tego neuroprzekaźnika po podaniu 1MeTIQ (50 mg/kg) w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie łącznej (1MeTIQ 25 mg/kg + KET) obserwowano istotne zwiększenie stężenia DA, zarówno w stosunku do poziomu kontrolnego ($p < 0.01$) jak i poziomu z grupy KET ($p < 0.01$) (tab. 5).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotne efekt podanych związków ($F[7,39]=79.66$, $p < 0.01$) na stężenie DOPAC w STR. Test post hoc wykazał spadek stężenia DOPAC po podaniu 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg, porównując do poziomu kontrolnego. Wykazano też znaczne zwiększenie poziomu tego metabolitu po podaniu OLA, zarówno samej, jak i w połączeniu z KET, w stosunku do grupy kontrolnej (oba $p < 0.01$). We wspomnianej grupie łącznej zaobserwowano także wzrost stężenia DOPAC w porównaniu do grupy KET ($p < 0.01$) (tab. 5).

Jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ iniekcji ($F[7,40]=140.22$, $p < 0.01$) na stężenie HVA w STR szczura. Analiza post hoc wykazała znaczne stężenie tego metabolitu po podaniu OLA ($p < 0.01$) w stosunku do poziomu z grupy kontrolnej. W grupie łącznej (OLA + KET) obserwowano podobny efekt, zarówno w stosunku do poziomu kontrolnego, jak i wartości z grupy KET (oba $p < 0.01$) (tab. 5).

Ta sama analiza statystyczna wykazała statystycznie istotny wpływ zastosowanych związków ($F[7,40]=42.07$, $p < 0.01$) na stężenie 3-MT w STR. Analiza post hoc ujawniła istotny wzrost poziomu tego metabolitu po podaniu 1MeTIQ, zarówno w dawce 25, jak i 50 mg/kg (oba $p < 0.01$) w porównaniu do poziomu kontrolnego. Znamienne wzrost stężenia 3-MT obserwowano także w grupie łącznej (1MeTIQ 25 mg/kg + KET) ($p < 0.05$), w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie łącznej (1MeTIQ 50 mg/kg + KET) wykazano znaczny wzrost poziomu 3-MT, zarówno w stosunku do poziomu kontrolnego, jak i poziomu z grupy KET (oba $p < 0.01$) (tab. 5).

4.5.3.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 6

STR				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	454 ± 18	110 ± 29	200 ± 8	288 ± 7
KET 10 mg/kg	443 ± 22	84 ± 19	196 ± 7	291 ± 20
1MeTIQ 25 mg/kg	379 ± 14**	84 ± 10	230 ± 14	243 ± 17
1MeTIQ 50 mg/kg	439 ± 14	99 ± 6	280 ± 16**	237 ± 14
OLA 3 mg/kg	434 ± 8	103 ± 12	192 ± 11	304 ± 17
1MeTIQ 25 mg/kg + KET 10 mg/kg	444 ± 16	111 ± 13	255 ± 22*##	252 ± 24
1MeTIQ 50 mg/kg + KET 10 mg/kg	211 ± 15 **##	58 ± 13*	209 ± 15	243 ± 22
OLA 3 mg/kg + KET 10 mg/kg	399 ± 17*	84 ± 11	150 ± 11 *#	294 ± 18

Tab. 6: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z STR. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę ketaminy (KET; 10 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapiny (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem KET. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy KET.

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała znamienny wpływ iniekcji (F[7,40]=25.39, p < 0.05) na poziom NA w STR szczura. Analiza post hoc ujawniła istotny spadek stężenia NA w grupie 1MeTIQ (25 mg/kg) (p < 0.01) w porównaniu do grupy

kontrolnej. Znaczne obniżenie poziomu tego neuroprzekaźnika było obserwowane w grupie łącznej (1MeTIQ 50 mg/kg + KET), zarówno w stosunku do wartości kontrolnej, jak i wartości z grupy KET (oba $p < 0.01$) (tab. 6).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny wpływ iniekcji badanych związków ($F[7,40]=1.25$, $p < 0.05$.) na stężenie NM w STR. Analiza post hoc wykazała znamienny spadek ($p < 0.05$) stężenia NM w grupie łącznej (1MeTIQ 50 mg/kg + KET) w stosunku do grupy kontrolnej. Nie wykazano istotnych zmian w pozostałych grupach badawczych (tab. 6).

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny wpływ zastosowanych związków ($F[7,40]=8.52$, $p < 0.01$) na stężenie 5-HT w STR. Analiza post hoc ujawniła, że podanie 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg, spowodowało istotne zwiększenie poziomu tego neuroprzekaźnika ($p < 0.01$) w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie łącznej (1MeTIQ 25 mg/kg + KET) obserwowano znamienny wzrost stężenia 5-HT w stosunku do poziomu kontrolnego ($p < 0.05$) oraz wartości z grupy KET ($p < 0.01$). Łączne podanie OLA i KET spowodowało natomiast znamienny spadek poziomu 5-HT, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej, jak i grupy KET (oba $p < 0.05$) (tab. 6).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ podanych substancji ($F[7,40]=2.30$, $p < 0.05$) na stężenie 5-HIAA w STR szczura, natomiast analiza post hoc nie wykazała znamiennych różnic w poziomie 5-HIAA pomiędzy badanymi grupami (tab. 6).

4.5.4. Analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w FCX (model MK-801)

4.5.4.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Tab. 7

FCX				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	510 ± 29	159 ± 7	155 ± 14	14 ± 1
MK-801 0.1 mg/kg	213 ± 36***	158 ± 10	121 ± 16	17 ± 2
1MeTIQ 25 mg/kg	458 ± 39	96 ± 6	152 ± 7	27 ± 5
OLA 3 mg/kg	319 ± 26**	326 ± 14***	272 ± 20***	30 ± 11
1MeTIQ 25 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	490 ± 46###	92 ± 8*#	127 ± 6	24 ± 4
OLA 3 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	543 ± 37###	370 ± 36***###	245 ± 23***###	19 ± 2

Tab. 7: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z STR. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę MK-801 0.1 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) lub olanzapinę (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ podanych związków (F[5,36]=11.31, p < 0.001) na poziom DA w FCX. Test post hoc wykazał znaczny spadek stężenia DA po jednokrotnym podaniu MK-801 (p < 0.001) w stosunku do grupy kontrolnej.

Podobny efekt, w porównaniu do poziomu kontrolnego, zaobserwowano w grupie, która otrzymała iniekcję OLA ($p < 0.01$). Podanie 1MeTIQ lub OLA w grupach łącznych całkowicie zablokowało efekt MK-801 i przywróciło stężenie DA do poziomu kontrolnego (oba $p < 0.001$, w porównaniu do grupy MK-801) (tab. 7).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt iniekcji ($F[5,38]=37.92$, $p < 0.001$) na stężenie DOPAC w FCX szczura. Analiza post hoc wykazała, że podanie OLA, zarówno samej, jak i z MK-801, istotnie zwiększa poziom DOPAC w stosunku do poziomu kontrolnego (oba $p < 0.001$). We wspomnianej grupie łącznej zaobserwowano również istotny wzrost stężenia tego metabolitu w porównaniu do grupy MK-801 ($p < 0.001$) (tab. 7).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny efekt iniekcji ($F[5,39]=12.72$, $p < 0.001$) na stężenie HVA w FCX. Analiza post hoc ujawniła zwiększony poziom tego metabolitu po podaniu OLA ($p < 0.001$) w porównaniu do poziomu kontrolnego. Dodatkowo, w grupie łącznej (OLA + MK-801) zaobserwowano istotny wzrost stężenia HVA, zarówno w stosunku do wartości kontrolnej ($p < 0.01$), jak i wartości z grupy MK-801 ($p < 0.001$) (tab. 7).

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała brak istotnego wpływu zastosowanych związków ($F[5,39]=0.97$, N. S.) na stężenie 3-MT w FCX (tab. 7).

4.5.4.2. NA i jej metabolit (NM) raz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 8

FCX				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	265 ± 15	17 ± 3	253 ± 12	243 ± 5
MK-801 0.1 mg/kg	307 ± 22*	26 ± 3	250 ± 18	241 ± 11
1MeTIQ 25 mg/kg	336 ± 11***	44 ± 4***	343 ± 11***	202 ± 9**
OLA 3 mg/kg	316 ± 7**	20 ± 3	262 ± 9	254 ± 11
1MeTIQ 25 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	341 ± 10***	48 ± 7***###	333 ± 14***###	171 ± 11***###
OLA 3 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	319 ± 9**	22 ± 2	252 ± 9	244 ± 7

Tab. 8: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z FCX. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) lub olanzapinę (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny efekt podań związków (F[5,39]=4.38, p < 0.01) na stężenie NA w FCX szczura. Analiza post hoc wykazała istotny wzrost poziomu NA po podaniu MK-801 (p < 0.05) w stosunku do grupy kontrolnej. Zarówno podanie 1MeTIQ (25 mg/kg), jak i OLA (odpowiednio p < 0.001 i p < 0.01), zwiększyło stężenie tego neuroprzekaźnika w porównaniu do wartości kontrolnej. Podobny

efekt zaobserwowano w obu grupach łącznych, gdzie stężenie NA istotnie wzrosło po podaniu substancji ($p < 0.01$ dla grupy OLA + MK-801; $p < 0.001$ dla grupy 1MeTIQ + MK-801) (tab. 8).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny wpływ iniekcji ($F[5,37]=12.65$, $p < 0.001$) na stężenie NM w FCX. Test post hoc ujawnił istotny wzrost poziomu tego metabolitu po podaniu 1MeTIQ (25 mg/kg), zarówno samego, jak i w połączeniu z MK-801 (oba $p < 0.001$), w stosunku do grupy kontrolnej. Dodatkowo we wspomnianej wcześniej grupie łącznej zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia NM w stosunku do wartości z grupy MK-801 (tab. 8).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała znamienny wpływ zastosowanych substancji na poziom 5-HT w FCX. Test post wykazał istotny wzrost stężenia tego neuroprzekaźnika po podaniu 1MeTIQ (25 mg/kg) ($p < 0.001$) w stosunku do grupy kontrolnej. Podanie 1MeTIQ łącznie z MK-801 również spowodowało znamienny wzrost poziomu 5-HT w FCX, zarówno w stosunku do wartości kontrolnej ($p < 0.001$), jak i wartości z grupy MK-801 ($p < 0.001$) (tab. 8).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny efekt podanych związków ($F[5,41]=10.40$, $p < 0.001$) na stężenie 5-HIAA w FCX szczura. Analiza post hoc ujawniła obniżenie poziomu tego metabolitu po podaniu 1MeTIQ (25 mg/kg) w porównaniu do wartości kontrolnej ($p < 0.01$). Podobny efekt zaobserwowano w grupie łącznej (1MeTIQ + MK-801), gdzie podanie związków obniżyło stężenie 5-HIAA, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0.001$), jak i grupy MK-801 ($p < 0.001$) (tab. 8).

4.5.5. Analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w HIP (model MK-801)

4.5.5.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Tab. 9

HIP				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	25 ± 1	11 ± 1	17 ± 2	15 ± 2
MK-801 0.1 mg/kg	23 ± 3	17 ± 1*	21 ± 3	13 ± 1
1MeTIQ 25 mg/kg	34 ± 2*	12 ± 1	26 ± 3	20 ± 3
OLA 3 mg/kg	31 ± 2	26 ± 2***	26 ± 3	22 ± 3*
1MeTIQ 25 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	29 ± 2	12 ± 1#	19 ± 3	10 ± 1
OLA 3 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	22 ± 2	17 ± 2*	26 ± 3	11 ± 1

Tab. 9: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z HIP. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) lub olanzapinę (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny efekt podanych substancji (F[5,40]=4.38, p < 0.01) na stężenie DA w HIP. Test post hoc wykazał istotny wzrost poziomu tego neuroprzekaźnika w stosunku do wartości kontrolnej (p < 0.05) po podaniu

1MeTIQ (25 mg/kg). Nie zaobserwowano istotnych różnic w pozostałych grupach badawczych (tab. 9).

Ta sama analiza wykazała znamienny wpływ iniekcji ($F[5,39]=15.42$, $p < 0.001$) na poziom DOPAC w HIP. Test post hoc wykazał znamienny wzrost poziomu tego metabolitu po podaniu MK-801 ($p < 0.05$), w porównaniu z grupą kontrolną. Znaczne zwiększenie stężenia DOPAC w stosunku do wartości kontrolnej było obserwowane po podaniu OLA ($p < 0.001$) (tab. 9).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA nie wykazała istotnego statystycznie wpływu podanych związków ($F[5,38]=1.51$, N. S.) na stężenie HVA w HIP (tab. 9).

Ta sama analiza statystyczna ujawniła istotny efekt zastosowanych związków ($F[5,38]=4.36$, $p < 0.01$) na poziom 3-MT w HIP. Analiza post hoc wykazała znamienny wzrost stężenia tego metabolitu w stosunku do grupy kontrolnej po podaniu OLA ($p < 0.05$). Nie zaobserwowano istotnych różnic w pozostałych grupach badawczych (tab. 9).

4.5.5.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 10

HIP				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	301 ± 20	24 ± 3	226 ± 13	309 ± 12
MK-801 0.1 mg/kg	295 ± 16	25 ± 4	202 ± 18	327 ± 16
1MeTIQ 25 mg/kg	341 ± 20	44 ± 4***	284 ± 14**	288 ± 10
OLA 3 mg/kg	289 ± 10	33 ± 3	235 ± 10	356 ± 9
1MeTIQ 25 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	295 ± 14	32 ± 3	265 ± 10*##	255 ± 22#
OLA 3 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	313 ± 21	22 ± 1	217 ± 8	302 ± 23

Tab.10: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z HIP. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) lub olanzapinę (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy MK-801.

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA nie wykazała istotnego wpływu iniekcji (F[5,40]=1.35, N. S.) na stężenie NA w HIP szczura (tab. 10).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt podanych związków na poziom NM w HIP. Test post hoc ujawnił znaczne zwiększenie poziomu tego metabolitu po podaniu

1MeTIQ (25 mg/kg) ($p < 0.001$) w stosunku do grupy kontrolnej. Nie obserwowano istotnych zmian w pozostałych grupach badawczych (tab. 10).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ zastosowanych substancji ($F[5,40]=6.33$, $p < 0.001$) na stężenie 5-HT w HIP. Analiza post hoc ujawniła istotnie zwiększony poziom tego metabolitu po podaniu 1MeTIQ (25 mg/kg) ($p < 0.01$) w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie łącznej (1MeTIQ + MK-801) zaobserwowano znamienne wzrost stężenia 5-HT, zarówno w stosunku do wartości kontrolnej ($p < 0.05$), jak i wartości z grupy MK-801 ($p < 0.01$) (tab. 10).

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny efekt iniekcji ($F[5,40]=3.91$, $p < 0.01$) na poziom 5-HIAA w HIP. Test post hoc wykazał znamienne spadek stężenia tego metabolitu ($p < 0.05$) w grupie łącznej (1MeTIQ + MK-801) w stosunku do wartości z grupy MK-801 (tab. 10).

4.5.6. Analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w FCX (model MK-801) z zastosowaniem podań chronicznych 1MeTIQ

4.5.6.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Tab. 11

FCX				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	510 ± 29	159 ± 7	155 ± 14	159 ± 7
MK-801 0.1 mg/kg	213 ± 36**	158 ± 10	121 ± 16	158 ± 10
1MeTIQ 25 mg/kg x7	435 ± 61	81 ± 7***	126 ± 8	81 ± 7***
1MeTIQ 25 mg/kg x7 + MK-801 0.1 mg/kg	614 ± 54###	94 ± 8****###	128 ± 7	94 ± 8****###

Tab. 11: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z FCX. Zwierzęta otrzymały chroniczne podania 1MeTIQ (7x; 25 mg/kg, i.p.) lub jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone 2 godziny po ostatniej iniekcji 1MeTIQ. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA nie wykazała istotnego wpływu wielokrotnych podań 1MeTIQ (25 mg/kg) (F[1,18]=1.28, N. S.), natomiast jednokrotne podanie MK-801 (F[1,18]=9.91, p < 0.01) oraz interakcja obu iniekcji (F[1,18]=21.10, p < 0.001) okazały się być istotne. Test post hoc wykazał znaczny spadek poziomu tego neuroprzekaźnika po podaniu MK-801 (p < 0.01) w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie łącznej

zaobserwowano natomiast istotny wzrost stężenia DA ($p < 0.001$) stosunku do wartości z grupy MK-801 (tab. 11).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak istotnego wpływu jednokrotnego podania MK-801 ($F[1,19]=0.58$, N. S.) na poziom DOPAC w FCX, natomiast wpływ wielokrotnych podań 1MeTIQ (25 mg/kg) ($F[1,19]=71.72$, $p < 0.001$) okazał się być istotny. Nie zaobserwowano istotnego wpływu interakcji obu iniekcji ($F[1,19]=0.73$, N. S.) na stężenie tego metabolitu. Analiza post hoc ujawniła znaczny spadek poziomu DOPAC ($p < 0.001$) po chronicznych podaniach 1MeTIQ (25 mg/kg) w stosunku do wartości kontrolnej. W grupie łącznej obserwowano podobny efekt, gdzie stężenie DOPAC było niższe zarówno w stosunku do wartości z grupy kontrolnej, jak i wartości z grupy MK-801 (oba $p < 0.001$) (tab. 11).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak istotnego wpływu podania MK-801 ($F[1,22]=1.90$, N. S.), chronicznych podań 1MeTIQ ($F[1,22]=0.96$, N. S.) oraz interakcji obu czynników ($F[1,22]=2.48$, N. S.) na stężenie HVA w FCX szczura (tab. 11).

Ta sama analiza wykazała brak znamiennego wpływu iniekcji MK-801 ($F[1,21]=0.29$, N. S.) na poziom 3-MT w FCX. Chroniczne podania 1MeTIQ (25 mg/kg) okazały się mieć istotny statystycznie wpływ ($F[1,21]=12.50$, $p < 0.001$) na stężenie 3-MT, natomiast interakcja obu iniekcji ($F[1,21]=1.48$, N. S.) okazała się być nieistotna. W grupie, która otrzymała wielokrotnie 1MeTIQ, zaobserwowano istotny spadek poziomu tego metabolitu ($p < 0.001$) w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie łącznej zaobserwowano podobny efekt – obniżenie poziomu 3-MT – zarówno w stosunku do wartości kontrolnej ($p < 0.001$), jak i wartości z grupy MK-801 ($p < 0.001$) (tab. 11).

4.5.6.2. NA i jej metabolit (NM) raz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 12

FCX				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	265 ± 15	17 ± 3	253 ± 12	243 ± 8
MK-801 0.1 mg/kg	307 ± 22	26 ± 3	250 ± 18	241 ± 8
1MeTIQ 25 mg/kg x7	368 ± 16***	53 ± 3***	358 ± 17***	187 ± 6***
1MeTIQ 25 mg/kg x7 + MK-801 0.1 mg/kg	354 ± 13**	42 ± 3 ***###	349 ± 15 ***###	196 ± 8***###

Tab. 12: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z FCX. Zwierzęta otrzymały chroniczne podania 1MeTIQ (7x; 25 mg/kg, i.p.) lub jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone 2 godziny po ostatniej iniekcji 1MeTIQ. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. **p < 0.01; *p < 0.05; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak istotnego efektu podania MK-801 (F[1,21]=0.65, N. S.) na poziom NA w FCX, natomiast wielokrotne podania 1MeTIQ (F[1,21]=18.44, p < 0.001) okazały się być istotne. Interakcja obu iniekcji (F[1,21]=2.52, N. S.) nie miała istotnego wpływu na stężenie NA. Test post hoc wykazał znaczne zwiększenie poziomu tego neuroprzekaźnika (p < 0.001) po wielokrotnych podaniach 1MeTIQ (25 mg/kg), w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie łącznej również zaobserwowano wzrost stężenia NA (p < 0.01), porównując do wartości kontrolnej (tab. 12).

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała brak istotnego wpływu jednokrotnego podania MK-801 (F[1,22]=0.21, N. S.) na poziom NM w FCX. Jednocześnie, wielokrotne podania 1MeTIQ (F[1,22]=83.58, p < 0.001) oraz interakcja obu iniekcji

($F[1,22]=11.17$, $p < 0.01$) okazały się być znamienne. Test post hoc wykazał istotny wzrost stężenia tego metabolitu ($p < 0.001$) w grupie, która otrzymała chroniczne podania 1MeTIQ (25 mg/kg), w stosunku do wartości kontrolnej. Wzrost poziomu NM obserwowano również w grupie łącznej, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej, jak i grupy MK-801 (oba $p < 0.001$) (tab. 12).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak istotnego efektu podania MK-801 ($F[1,23]=0.11$, N. S.) na stężenie 5-HT w FCX szczura. Wielokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg) ($F[1,23]=38.21$, $p < 0.001$) okazały się być znamienne dla poziomu tego neuroprzekaźnika, natomiast interakcja obu iniekcji ($F[1,23]=0.03$, N. S.) nie była istotna. Test post hoc wykazał znaczny wzrost stężenia 5-HT zarówno w grupie, która otrzymała chroniczne podania 1MeTIQ ($p < 0.001$), jak i w grupie łącznej ($p < 0.001$) w stosunku do wartości kontrolnej. Dodatkowo, w grupie łącznej zaobserwowano istotny wzrost poziomu 5-HT ($p < 0.001$) w porównaniu do grupy MK-801 (tab. 12).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak znamienego wpływu jednokrotnego podania MK-801 ($F[1,22]=0.22$, N. S.) na poziom 5-HIAA w FCX szczura, natomiast wielokrotne podania 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg ($F[1,22]=43.59$, $p < 0.001$) okazały się być istotne. Interakcja obu iniekcji ($F[1,23]=0.8$, N. S.) okazała się być nieistotna dla stężenia tego metabolitu. Test post hoc wykazał istotny statystycznie spadek poziomu 5-HIAA w grupie, która otrzymała wielokrotne iniekcje 1MeTIQ ($p < 0.001$) oraz w grupie łącznej ($P < 0.001$). Dodatkowo w grupie łącznej zaobserwowano znamieny spadek stężenia 5-HIAA w stosunku do wartości z grupy MK-801 ($p < 0.001$) (tab. 12).

4.5.7. Analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w HIP (model MK-801) z zastosowaniem podań chronicznych 1MeTIQ

4.5.7.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Tab. 13

HIP				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	25 ± 1	11 ± 1	17 ± 2	15 ± 2
MK-801 0.1 mg/kg	23 ± 3	17 ± 1*	21 ± 3	13 ± 1
1MeTIQ 25 mg/kg x7	34 ± 2	10 ± 1	29 ± 2**	18 ± 2
1MeTIQ 25 mg/kg x7 + MK-801 0.1 mg/kg	35 ± 7#	10 ± 3#	21 ± 1	15 ± 2

Tab. 13: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z HIP. Zwierzęta otrzymały chroniczne podania 1MeTIQ (7x; 25 mg/kg, i.p.) lub jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone 2 godziny po ostatniej iniekcji 1MeTIQ. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak istotnego wpływu jednokrotnego podania MK-801 (F[1,19]=1.28, N. S.) na stężenie DA w HIP szczura, natomiast efekt wielokrotnych podań 1MeTIQ (F[1,19]=9.18, p < 0.01) okazał się być istotny. Interakcja obu iniekcji (F[1,19]=0.73, N. S.) była nieistotna dla poziomu tego neuroprzekaźnika. Analiza post hoc wykazała znamienny wzrost stężenia DA w grupie łącznej (p < 0.05), w stosunku do wartości z grupy MK-801 (tab. 13).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak istotnego wpływu podania MK-801 ($F[1,21]=3.22$, N. S.) na stężenie DOPAC w HIP. Wielokrotne podanie 1MeTIQ (25 mg/kg) miało istotny efekt ($F[1,21]=4.68$, $p < 0.05$), natomiast interakcja obu podań ($F[1,21]=3.27$, N. S.) okazała się być nieistotna dla poziomu DOPAC. Test post hoc wykazał znamieny wzrost stężenia tego metabolitu w HIP w grupie, która otrzymała jednokrotną iniekcję MK-801 ($p < 0.05$) w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 13).

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała brak istotnego efektu jednokrotnego podania MK-801 ($F[1,21]=0.90$, N. S.) na stężenie HVA w HIP. Wielokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg) ($F[1,21]=5.94$, $p < 0.05$) oraz interakcja obu związków ($F[1,21]=5.53$, $p < 0.05$) okazały się mieć znamieny efekt dla poziomu tego metabolitu. Test post hoc wykazał istotny wzrost stężenia HVA w grupie, która otrzymała chroniczne podania 1MeTIQ ($p < 0.01$) w stosunku do wartości kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych różnic w pozostałych grupach badawczych (tab. 13).

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA nie wykazała znamienego wpływu jednokrotnego podania MK-801 ($F[1,22]=1.15$, N. S.), wielokrotnych podań 1MeTIQ ($F[1,22]=2.02$, N. S.) oraz interakcji obu iniekcji ($F[1,22]=0.19$, N. S.) na poziom 3-MT w HIP szczura (tab. 13).

4.5.7.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 14

HIP				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	301 ± 20	24 ± 3	226 ± 13	309 ± 12
MK-801 0.1 mg/kg	295 ± 16	25 ± 4	202 ± 18	327 ± 16
1MeTIQ 25 mg/kg x7	356 ± 16*	44 ± 3**	337 ± 26**	273 ± 9
1MeTIQ 25 mg/kg x7 + MK-801 0.1 mg/kg	369 ± 18*#	41 ± 4**##	317 ± 21**##	299 ± 32

Tab. 14: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z HIP. Zwierzęta otrzymały chroniczne podania 1MeTIQ (7x; 25 mg/kg, i.p.) lub jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone 2 godziny po ostatniej iniekcji 1MeTIQ. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy MK-801.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak istotnego efektu jednokrotnego podania MK-801 ($F[1,23]=0.03$, N.S.) na stężenie NA w HIP szczura. Wielokrotne iniekcje 1MeTIQ (25 mg/kg) ($F[1,23]=12.13$, $p < 0.01$) okazały się być istotne, natomiast interakcja obu czynników ($F[1,23]=0.26$, N. S.) nie miała znamionnego wpływu na poziom tego neuroprzekaźnika. Test post hoc wykazał znamienny wzrost stężenia NA w grupie, która otrzymała chroniczne podania 1MeTIQ ($p < 0.05$) w stosunku do grupy kontrolnej. Podobny efekt zaobserwowano w grupie łącznej, zarówno w stosunku do wartości kontrolnej, jak i wartości z grupy MK-801 (oba $p < 0.05$) (tab. 14).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak istotnego wpływu podania MK-801 ($F[1,22]=0.08$, N. S.) na stężenie NM w HIP. Chroniczne podania 1MeTIQ (25 mg/kg) okazały się mieć istotny statystycznie wpływ na poziom tego metabolitu, natomiast interakcja obu podań ($F[1,22]=0.36$, N. S.) okazała się być nieznamienne. Test post hoc ujawnił istotne zwiększenie stężenia NM w grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTIQ ($p < 0.01$), w porównaniu do wartości kontrolnej. W grupie łącznej zaobserwowano podobny efekt – zwiększenie stężenia NM – zarówno w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0.01$), jak i grupy MK-801 ($p < 0.01$) (tab. 14).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak znamienego wpływu podania MK-801 ($F[1,23]=0.94$, N. S.) na stężenie 5-HT w HIP szczura. Efekt wielokrotnych podań 1MeTIQ (25 mg/kg) ($F[1,23]=25.25$, $p < 0.001$) oraz iniekcji obu związków ($F[1,23]=0.01$, $p < 0.01$) okazał się być istotny dla poziomu 5-HT. Test post hoc wykazał znamieny wzrost stężenia tego neuroprzekaźnika w grupie, która otrzymała wielokrotne iniekcje 1MeTIQ ($p < 0.01$) w stosunku do wartości kontrolnej. W grupie łącznej również zaobserwowano istotny wzrost stężenia tego neuroprzekaźnika, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej, jak i grupy MK-801 (oba $p < 0.01$) (tab. 14).

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała brak istotnego efektu jednokrotnego podania MK-801 ($F[1,22]=1.40$, N. S.), chronicznych podań 1MeTIQ ($F[1,22]=2.89$, N. S.) oraz interakcji obu związków ($F[1,22]=0.04$, N. S.) na stężenie 5-HIAA w HIP szczura (tab. 14).

4.5.8. Analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w STR (model MK-801) z zastosowaniem podań chronicznych 1MeTIQ

4.5.8.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Tab. 15

STR				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	7551 ± 468	1269 ± 59	744 ± 71	287 ± 21
MK-801 0.1 mg/kg	8455 ± 297	876 ± 27	788 ± 38	458 ± 28***
1MeTIQ 25 mg/kg	8180 ± 247	931 ± 32	802 ± 31	470 ± 1***
OLA 3 mg/kg	7183 ± 337	3763 ± 215***	1640 ± 70***	246 ± 8
1MeTIQ 25 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	8035 ± 236	848 ± 42	621 ± 29	440 ± 21***
OLA 3 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	7433 ± 233#	3040 ± 290***####	1457 ± 110***####	293 ± 20####

Tab. 15: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z STR. Zwierzęta otrzymały jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.), 1MeTIQ (25 mg/kg, i.p.) lub olanzapinę (OLA; 3 mg/kg, i.p.). W grupach łącznych 1MeTIQ lub OLA były podane 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy MK-801.

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny efekt podanych związków ($F[5,41]=2.71$, $p < 0.05$) na poziom DA w STR. Test post hoc wykazał istotny spadek

poziomu DA w grupie, która otrzymała łączne podanie OLA i MK-801 w stosunku do wartości z grupy MK-801 ($p < 0.05$) (tab. 15).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny wpływ badanych związków ($F[5,41]=49.05$, $p < 0.001$) na stężenie DOPAC w STR szczura. Test post hoc wykazał istotny wzrost poziomu tego metabolitu w stosunku do grupy kontrolnej po podaniu OLA zarówno samej ($p < 0.001$), jak i w połączeniu z MK-801 ($p < 0.001$). Dodatkowo, we wspomnianej grupie łącznej (OLA + MK-801) zaobserwowano znaczny wzrost poziomu DOPAC ($p < 0.001$) w stosunku do grupy MK-801 (tab. 15).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ podanych substancji ($F[5,41]=38.79$, $p < 0.001$) na poziom HVA w STR szczur. Analiza post hoc wykazała znaczny wzrost stężenia HVA po podaniu OLA ($p < 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobny efekt zaobserwowano w grupie łącznej (OLA + MK-801), zarówno w stosunku do wartości kontrolnej ($p < 0.001$) jak i wartości z grupy MK-801 ($p < 0.001$) (tab. 15).

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny efekt iniekcji ($F[5,42]=28.77$, $p < 0.001$) na stężenie 3-MT w STR. Test post hoc wykazał znaczny wzrost stężenia 3-MT po podaniu MK-801 ($p < 0.001$) w stosunku do grupy kontrolnej. Podobny efekt – zwiększenie poziomu 3-MT w porównaniu z wartością kontrolną – zaobserwowano w grupie, która otrzymała jednokrotne podanie 1MeTIQ, zarówno samo ($p < 0.001$), jak i w połączeniu z iniekcją MK-801 ($p < 0.001$). W grupie łącznej (OLA + MK-801) zaobserwowano znaczny spadek stężenia tego metabolitu w porównaniu do wartości z grupy MK-801 (tab. 15).

4.5.8.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 16

STR				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	362 ± 20	10.4 ± 1	164 ± 11	196 ± 16
MK-801 0.1 mg/kg	405 ± 26	20.8*	177 ± 9	164 ± 11
1MeTIQ 25 mg/kg	423 ± 20	19.3 ± 1.4*	349 ± 53**	302 ± 44
OLA 3 mg/kg	374 ± 22	9.5 ± 1.5	329 ± 35*	420 ± 38**
1MeTIQ 25 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	416 ± 22	20 ± 5.1*	489 ± 25***###	402 ± 26***###
OLA 3 mg/kg + MK-801 0.1 mg/kg	415 ± 19	17.1 ± 2.1	292 ± 43	376 ± 49***##

Tab. 16: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z STR. Zwierzęta otrzymały chroniczne podania 1MeTIQ (7x; 25 mg/kg, i.p.) lub jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone 2 godziny po ostatniej iniekcji 1MeTIQ. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak znamienego efektu podanych związków (F[5,42]=1.30, N. S.) na poziom NA w STR (tab. 16).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt zastosowanych substancji ($F[5,36]=4.18$, $p < 0.01$) na stężenie NM w STR szczura. Analiza post hoc wykazała znamienne wzrost poziomu NM po podaniu MK-801 lub 1MeTIQ (oba $p < 0.05$) w stosunku do grupy kontrolnej. Podobny efekt zaobserwowano w grupie łącznej (1MeTIQ + MK-801), gdzie stężenie NM uległo zwiększeniu ($p < 0.05$) w porównaniu do wartości kontrolnych (tab. 16).

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny wpływ iniekcji ($F[5,41]=6.25$, $p < 0.001$) na poziom 5-HT w STR. Test post hoc wykazał istotny wzrost stężenia 5-HT po podaniu 1MeTIQ ($p < 0.01$) lub OLA ($p < 0.05$) w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie łącznej (1MeTIQ + MK-801) zaobserwowany znaczny wzrost poziomu 5-HT zarówno w stosunku do grupy kontrolnej, jak i wartości z grupy MK-801 (tab. 16).

Jednoczynnikowa analiza statystyczna wykazała istotny wpływ podanych związków ($F[5,42]=6.30$, $p < 0.001$) na stężenie 5-HIAA w STR szczura. Analiza post hoc wykazała wzrost poziomu 5-HIAA po podaniach OLA ($p < 0.01$), porównując do grupy kontrolnej. Podobny efekt zaobserwowano w grupach łącznych (1MeTIQ + MK-801 lub OLA + MK-801), gdzie wykazano wzrost poziomu tego metabolitu, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej (oba $p < 0.01$), jak i grupy MK-801 (odpowiednio $p < 0.001$, $p < 0.01$) (tab. 16).

4.5.9. Analiza biochemiczna poziomu monoamin i ich metabolitów w STR (model MK-801) z zastosowaniem podań wielokrotnych 1MeTIQ

4.5.9.1. DA i jej metabolity (DOPAC, HVA, 3-MT)

Tab. 17

STR				
Grupa	DA	DOPAC	HVA	3-MT
Sól	7551 ± 469	1270 ± 59	744 ± 71	287 ± 21
MK-801 0.1 mg/kg	8455 ± 297	876 ± 28***	788 ± 38	458 ± 28***
1MeTIQ 25 mg/kg x7	8625 ± 273	775 ± 31***	671 ± 34	505 ± 20***
1MeTIQ 25 mg/kg x7 + MK-801 0.1 mg/kg	8520 ± 303	721 ± 13***##	605 ± 32#	412 ± 26**

Tab. 17: Poziomy DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA i 3-MT) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z STR. Zwierzęta otrzymały chroniczne podania 1MeTIQ (7x; 25 mg/kg, i.p.) lub jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone 2 godziny po ostatniej iniekcji 1MeTIQ. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01 ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak istotnego efektu jednokrotnego podania MK-801 (F[1,23]=1.40, N. S.), wielokrotnych podań 1MeTIQ (F[1,23]=2.84, N. S.) oraz interakcji obu iniekcji (F[1,23]=2.23, N. S.) na stężenie DA w STR szczura.

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny wpływ podania MK-801 (F[1,23]=39.45, p < 0.001), chronicznych podań 1MeTIQ (F[1,23]=82.80, p < 0.001) oraz interakcji obu czynników (F[1,23]=22.56, p < 0.001) na poziom DOPAC w STR. Analiza post hoc wykazała znaczny spadek stężenia DOPAC po podaniach MK-801, 1MeTIQ oraz w grupie łącznej

(wszystkie $p < 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo w grupie łącznej zaobserwowano istotny spadek poziomu DOPAC ($p < 0.01$) w stosunku do wartości z grupy MK-801 (tab. 17).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak znamienego efektu jednokrotnego podania MK-801 ($F[1,24]=0.06$, N. S.) na poziom HVA, natomiast wielokrotne podania 1MeTIQ ($F[1,24]=7.91$, $p < 0.01$) okazały się być istotne. Interakcja obu iniekcji ($F[1,24]=1.45$, N. S.) nie miała istotnego efektu na stężenie HVA w STR. Test post hoc wykazał znamieny spadek poziomu tego metabolitu w grupie łącznej ($p < 0.05$) w stosunku do wartości z grupy MK-801. Nie zaobserwowano istotnych zmian w pozostałych grupach (tab. 17).

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała brak znamienego efektu jednokrotnej iniekcji MK-801 ($F[1,24]=2.59$, N. S.) na stężenie 3-MT, natomiast efekt wielokrotnych podań 1MeTIQ ($F[1,24]=12.57$, $p < 0.01$) oraz interakcja obu związków ($F[1,24]=29.51$, $p < 0.001$) okazały się być istotne. Analiza post hoc wykazała istotny wzrost poziomu 3-MT w grupach, które otrzymały MK-801 ($p < 0.001$) lub wielokrotne podania 1MeTIQ ($p < 0.001$) w porównaniu z grupą kontrolną. Podobny efekt obserwowany był także w grupie łącznej ($p < 0.01$).

4.5.9.2. NA i jej metabolit (NM) oraz 5-HT i jej metabolit (5-HIAA)

Tab. 18

STR				
Grupa	NA	NM	5-HT	5-HIAA
Sól	362 ± 20	10.4 ± 1	164 ± 11	196 ± 16
MK-801 0.1 mg/kg	405 ± 26	20.8*	177 ± 9	164 ± 11
1MeTIQ 25 mg/kg x7	444 ± 20	27 ± 2.4**	349 ± 55*	323 ± 49
1MeTIQ 25 mg/kg x7 + MK-801 0.1 mg/kg	414 ± 34	21.5 ± 3.2*	376 ± 60*#	532 ± 108 ***##

Tab. 18: Poziomy NA oraz 5-HT i ich metabolitów (odpowiednio NM i 5-HIAA) mierzone metodą HPLC w homogenatach tkankowych z STR. Zwierzęta otrzymały chroniczne podania 1MeTIQ (7x; 25 mg/kg, i.p.) lub jednokrotną dawkę MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed podaniem MK-801. Grupa kontrolna otrzymała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone 2 godziny po ostatniej iniekcji 1MeTIQ. Wartości wyrażono jako średnie ± SEM (ng/g tkanki). N = 9-10 zwierząt na grupę. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001 w porównaniu do grupy MK-801.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA nie wykazała istotnego wpływu jednokrotnego podania MK-801 (F[1,24]=0.06, N. S.), wielokrotnych iniekcji 1MeTIQ (F[1,24]=3.21, N. S.) lub interakcji obu związków (F[1,24]=2.14, N. S.) na stężenie NA w STR szczura (tab. 18).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak znamienego efektu jednokrotnego podania MK-801 (F[1,22]=0.42, N. S.) na stężenie NM w STR, natomiast chroniczne iniekcje 1MeTIQ (F[1,22]=8.22, p < 0.01) oraz interakcja obu związków (F[1,22]=7.00, p < 0.05) okazały się być istotne. Analiza post hoc wykazała znamieny wzrost poziomu NM po podaniu MK-801 (p < 0.05), w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobny efekt obserwowano po wielokrotnych podaniach 1MeTIQ, zarówno samego, jak i w połączeniu z MK-801 (odpowiednio p < 0.01, p < 0.05) (tab. 18).

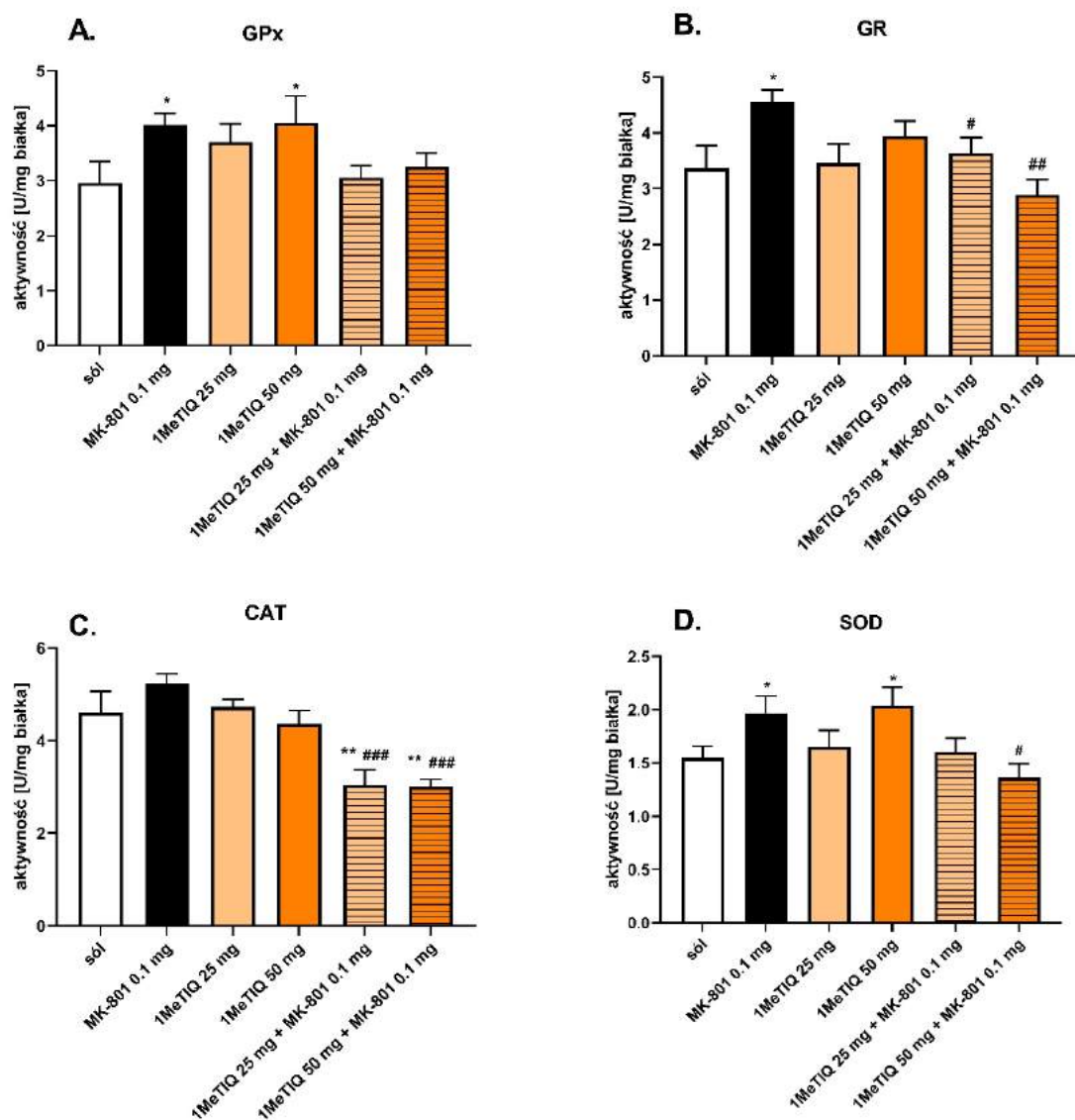
Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak znamienego efektu podania MK-801 ($F[1,22]=0.15$, N. S.) na poziom 5-HT w STR szczura. Wielokrotne podania 1MeTIQ ($F[1,22]=13.84$, $p < 0.01$) okazały się mieć istotny efekt na stężenie 5-HT, natomiast interakcja obu substancji ($F[1,22]=0.02$, N. S.) nie była znamienna. Analiza post hoc wykazała zwiększenie poziomu 5-HT po wielokrotnych podaniach 1MeTIQ, zarówno samego, jak i w połączeniu z MK-801 (oba $p < 0.05$) w porównaniu do wartości kontrolnej. Dodatkowo w grupie łącznej zaobserwowano znamienny wzrost stężenia tego neuroprzekaźnika ($p < 0.05$) w stosunku do grupy MK-801 (tab. 18).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak znamienego efektu jednokrotnego podania MK-801 ($F[1,23]=2.50$, N. S.) na poziom 5-HIAA w STR, natomiast wpływ wielokrotnych podań 1MeTIQ ($F[1,23]=19.32$, $p < 0.001$) oraz interakcja obu czynników ($F[1,23]=5.44$, $p < 0.05$) okazały się być istotne. Test post hoc wykazał, że łączne podania 1MeTIQ i jednokrotne podanie MK-801 znacznie zwiększa stężenie 5-HIAA, zarówno w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0.001$) oraz w stosunku do wartości z grupy MK-801 ($p < 0.01$). Nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia tego metabolitu w pozostałych grupach badawczych (tab. 18).

4.6. Analiza aktywności enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym w wybranych strukturach (FCX, HIP)

4.6.1. Analiza aktywności enzymatycznej w FCX

Rys. 27



Rys. 27: Wpływ 1MeTIQ i MK-801 na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (GPx, GR, CAT i SOD) w FCX szczura. Zwierzęta otrzymały wielokrotne iniekcje MK-801 (7 x 0.1 mg/kg, i.p.) lub 1MeTIQ (7 x 25 lub 50 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed MK-801. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM z 5–6 różnych próbek homogenatów tkankowych. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy, która otrzymała MK-801.

Peroksydaza glutationowa (GPx)

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała statystycznie istotny wpływ ($F[5,26] = 3.09$, $p < 0.05$) podanych związków na aktywność GPx. Test post hoc wykazał znaczny wzrost aktywności GPx po podaniu samego MK-801 lub 1 MeTIQ (50 mg/kg) (oba $p < 0.05$) w porównaniu z grupą kontrolną (rys. 27 A).

Reduktaza glutationowa (GR)

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ ($F[5,26] = 3.67$, $p < 0.05$) podanych związków na aktywność GR. Test post hoc wykazał istotny ($p < 0.05$) wzrost aktywności GR po iniekcjach MK-801 w porównaniu z grupą kontrolną. W grupach łącznych obie dawki 1MeTIQ (25 i 50 mg/kg) odwróciły działanie MK-801 i obniżyły aktywność GR (odpowiednio $p < 0.05$ i $p < 0.01$) (rys. 27 B).

Katalaza (CAT)

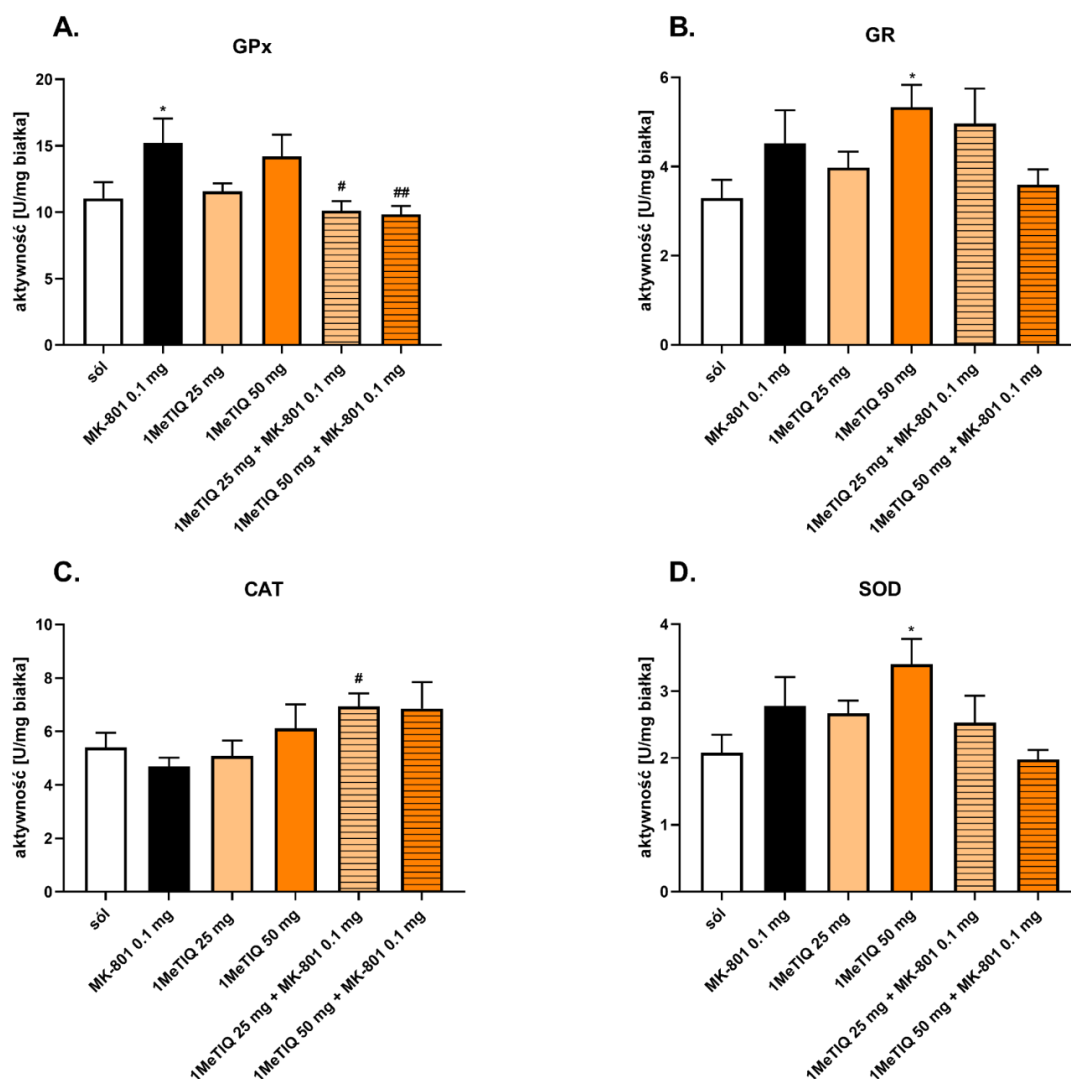
Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ ($F[5,24] = 9.26$, $p < 0.001$) podanych związków na aktywność CAT. Analiza post hoc wykazała zmianę aktywności CAT w grupach łącznych - 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg) podany razem z MK-801 znacząco obniżył aktywność enzymu w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej (oba $p < 0.01$) lub grupy MK-801 (oba $p < 0.001$) (rys. 27 C).

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny statystycznie wpływ ($F[5,28] = 3.15$, $p < 0.05$) podanych związków na aktywność SOD. Zarówno MK-801, jak i 1MeTIQ (50 mg/kg) podane osobno istotnie ($p < 0.05$) zwiększyły aktywność SOD w porównaniu z grupą kontrolną. 1MeTIQ (50 mg) podawany razem z MK-801 znamienne ($p < 0.05$) obniżył aktywność enzymu w porównaniu z grupą, która otrzymała sam MK-801 (rys. 27 D).

4.6.2. Analiza aktywności enzymatycznej w HIP

Rys. 28



Rys. 28: Wpływ 1MeTIQ i MK-801 na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (GPx, GR, CAT i SOD) w HIP szczura. Zwierzęta otrzymały wielokrotne iniekcje MK-801 (7 x 0.1 mg/kg, i.p.) lub 1MeTIQ (7 x 25 lub 50 mg/kg, i.p.). W grupie łącznej 1MeTIQ był podany 30 minut przed MK-801. Grupa kontrolna otrzymała sól fizjologiczną (0.9% NaCl, i.p.). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM z 5–6 różnych próbek homogenatów tkankowych. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej (sól); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy, która otrzymała MK-801.

Peroksydaza glutationowa (GPx)

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny wpływ ($F[5,22]=3.28$, $p < 0.05$) podanych substancji na aktywność GPx w HIP. Test post hoc wykazał istotnie ($p < 0.05$)

zwiększoną aktywność GPx po podaniach MK-801 w porównaniu z grupą kontrolną. W grupach łącznych, 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg) podawany razem z MK-801 odwracał efekt MK-801 i znacząco (oba $p < 0.05$) zmniejszał aktywność GPx (rys. 28 A).

Reduktaza glutationowa

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała statystycznie istotny wpływ ($F[5,25]=3.13$, $p < 0.05$) podanych związków na aktywność GR. Analiza post hoc wykazała istotny ($p < 0.05$) wzrost aktywności GR po iniekcjach MK-801 lub 1MeTIQ (50 mg/kg) w porównaniu z grupą kontrolną (rys. 28 B).

Katalaza

Jednoczynnikowa analiza ANOVA nie wykazała istotnego wpływu ($F[5,22]=2.04$, N.S.) zastosowanych związków na aktywność CAT w HIP szczura (rys. 28 C).

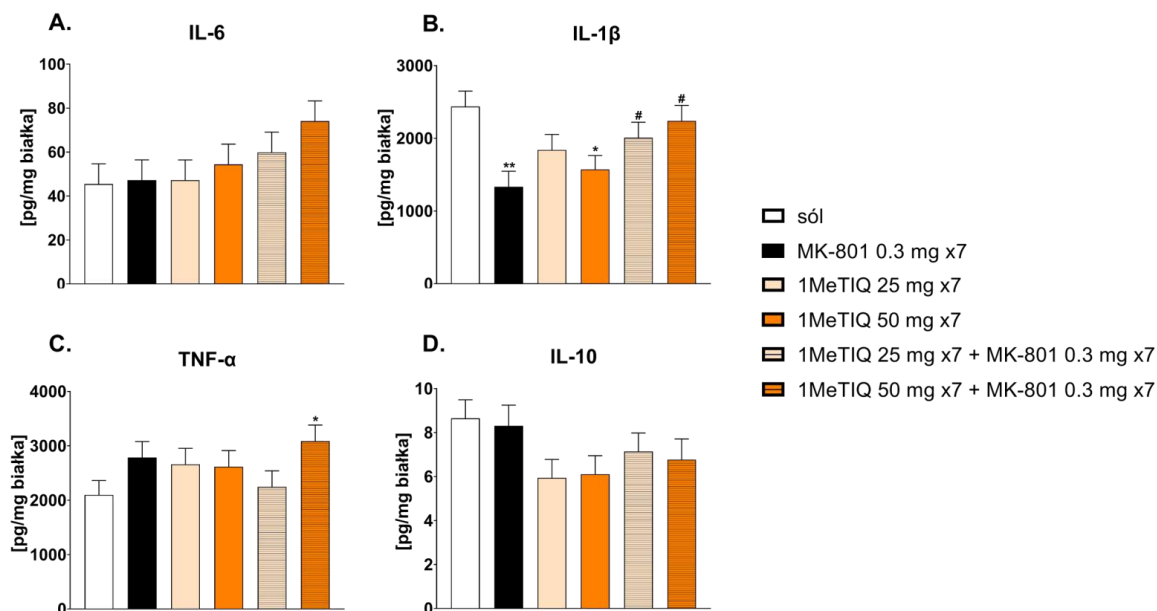
Dysmutaza ponadtlenkowa

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny wpływ ($F[5,28]=2.67$, $p < 0.05$) podanych substancji na aktywność SOD. Analiza post hoc wykazała statystycznie istotny ($p < 0.05$) wzrost aktywności SOD po podaniu samego MK-801 lub 1 MeTIQ (50 mg/kg) w porównaniu z grupą kontrolną. W grupach łącznych 1MeTIQ (50 mg/kg) podany razem z MK-801 istotnie ($p < 0.05$) obniżył aktywność SOD, przywracając ją do poziomu kontrolnego (rys. 28 D).

4.7. Analiza poziomu interleukin (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10) w wybranych strukturach (FCX, HIP, STR)

4.7.1. Analiza poziomu interleukin w FCX

Rys. 29



Rys. 29: Analiza poziomu cytokin: IL-6 (A), IL-1 β (B), TNF- α (C) i IL-10 (D) w FCX szczura. Zwierzęta otrzymały 7-krotne iniekcje 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) oraz MK-801 (0.3 mg/kg, i.p.) w odstępie 30 minut. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymały 7-krotne iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu, 2 godziny po ostatniej dawce związków, zwierzęta zostały uśmiercone, a FCX została pobrana do dalszej analizy. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM. $N = 4-5$ zwierząt na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy, która otrzymała MK-801.

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak istotnego wpływu podanych związków ($F[5,24]=1.42$, N. S.) na poziom IL-6 w FCX szczura (rys. 29 A).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt iniekcji ($F[5,19]=3.83$, $p < 0.05$) na poziom IL-1 β w FCX szczura. Test post hoc wykazał istotny spadek poziomu IL-1 β w grupie, która otrzymała wielokrotne podania MK-801 ($p < 0.01$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Spadek stężenia IL-1 β zaobserwowano także w grupie, która otrzymała 7-krotne podania 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg ($p < 0.05$), porównując do grupy kontrolnej. W obu grupach łącznych, podania 1MeTIQ (zarówno w dawce 25 mg/kg, jak i 50 mg/kg) zablokowały efekt

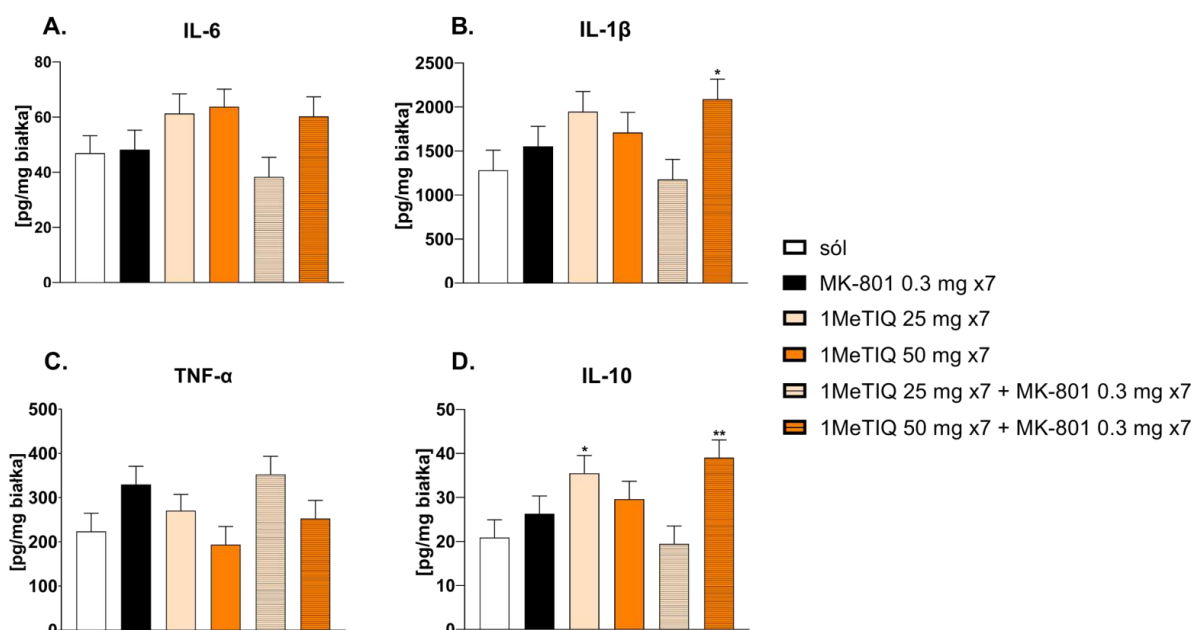
MK-801 i przywróciły poziom IL-1 β do poziomu kontrolnego ($p < 0.05$, w porównaniu do grupy MK-801) (rys. 29 B).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała znamienny wpływ podanych związków ($F[5,19]=1.63$, $p < 0.05$) na poziom TNF- α w FCX szczura. Analiza post hoc wykazała istotny wzrost ($p < 0.05$) poziomu TNF- α w grupie łącznej (1MeTIQ 50 mg + MK-801) w stosunku do grupy kontrolnej. Nie wykazano istotnych zmian w pozostałych grupach badawczych (rys. 29 C).

Ta sama analiza statystyczna wykazała brak statystycznie istotnego wpływu iniekcji ($F[5,22]=1.69$, N. S.) na stężenie IL-10 w FCX szczura (rys. 29 D).

4.7.2. Analiza poziomu interleukin w HIP

Rys. 30



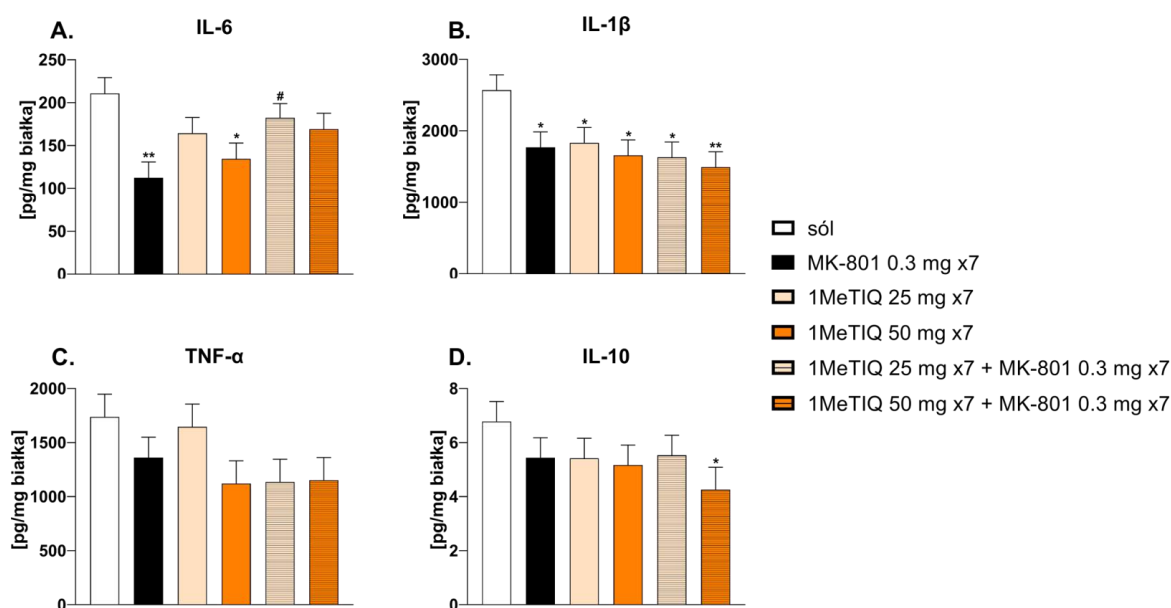
Rys. 30: Analiza poziomu cytokin: IL-6 (A), IL-1 β (B), TNF- α (C) i IL-10 (D) w HIP szczura. Zwierzęta otrzymały 7-krotne iniekcje 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) oraz MK-801 (0.3 mg/kg, i.p.) w odstępie 30 minut. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymały 7-krotne iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu, 2 godziny po ostatniej dawce związków, zwierzęta zostały uśmiercone, a HIP został pobrany do dalszej analizy. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM. $N = 4-5$ zwierząt na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono różnic w porównaniu z grupą MK-801.

Jednoczynnikowa analiza ANOVA nie wykazała istotnego efektu podanych substancji na poziom IL-6 ($F[5,20]=2.20$, N. S.), IL-1 β ($F[5,18]=2.50$, N. S.) oraz TNF- α ($F[5,19]=2.22$, N. S.) w HIP szczura (rys. 30 A-C).

Ta sama analiza statystyczna wykazała natomiast istotny wpływ iniekcji ($F[5,18]=3.73$, $p < 0.05$) na stężenie IL-10 w HIP. Test post hoc wykazał znamienny wzrost poziomu IL-10 w grupie, która otrzymała wielokrotne iniekcje 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg ($p < 0.05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Istotny statystycznie wzrost stężenia IL-10 obserwowano także w grupie łącznej (w której 1MeTIQ podano w dawce 50 mg/kg), w stosunku do poziomu kontrolnego ($p < 0.01$) (rys. 30 D).

4.7.3. Analiza poziomu interleukin w STR

Rys. 31



Rys. 31: Analiza poziomu cytokin: IL-6 (A), IL-1 β (B), TNF- α (C) i IL-10 (D) w STR szczura. Zwierzęta otrzymały 7-krotne iniekcje 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg, i.p.) oraz MK-801 (0.3 mg/kg, i.p.) w odstępie 30 minut. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymały 7-krotne iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl, i.p.). W ostatnim dniu, 2 godziny po ostatniej dawce związków, zwierzęta zostały uśmiercone, a STR zostało pobrane do dalszej analizy. Wartości wyrażono jako średnie $\pm$ SEM. $N = 4-5$ zwierząt na grupę. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy, która otrzymała MK-801.

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny wpływ iniekcji ($F[5,19]=3.62$, $p < 0.001$) na stężenie IL-6 w STR szczura. Test post hoc wykazał istotny spadek poziomu IL-6 w grupie MK-801 ($p < 0.01$) w porównaniu do poziomu z grupy kontrolnej. W grupie, która otrzymała wielokrotne podania 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg również zaobserwowano znamieny spadek IL-6 ($p < 0.05$), porównując do grupy kontrolnej. W grupie łącznej, podania 1MeTIQ w dawce 25 mg/kg zablokowały efekt MK-801 i przywróciły stężenie IL-6 do poziomu kontrolnego ($p < 0.05$, w porównaniu do grupy MK-801) (rys. 31 A).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt podanych związków ($F[5,18]=3.19$, $p < 0.05$) na stężenie IL-1 β w STR szczura. Analiza post hoc wykazała znamieny spadek

poziomu IL-1 β we wszystkich analizowanych grupach w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.05$ dla grup MK-801, 1MeTIQ 25 mg/kg, 1MeTIQ 50 mg/kg oraz 1MeTIQ 25 mg/kg + MK-801; $p < 0.01$ dla grupy 1MeTIQ 50 mg/kg + MK-801) (rys. 31 B).

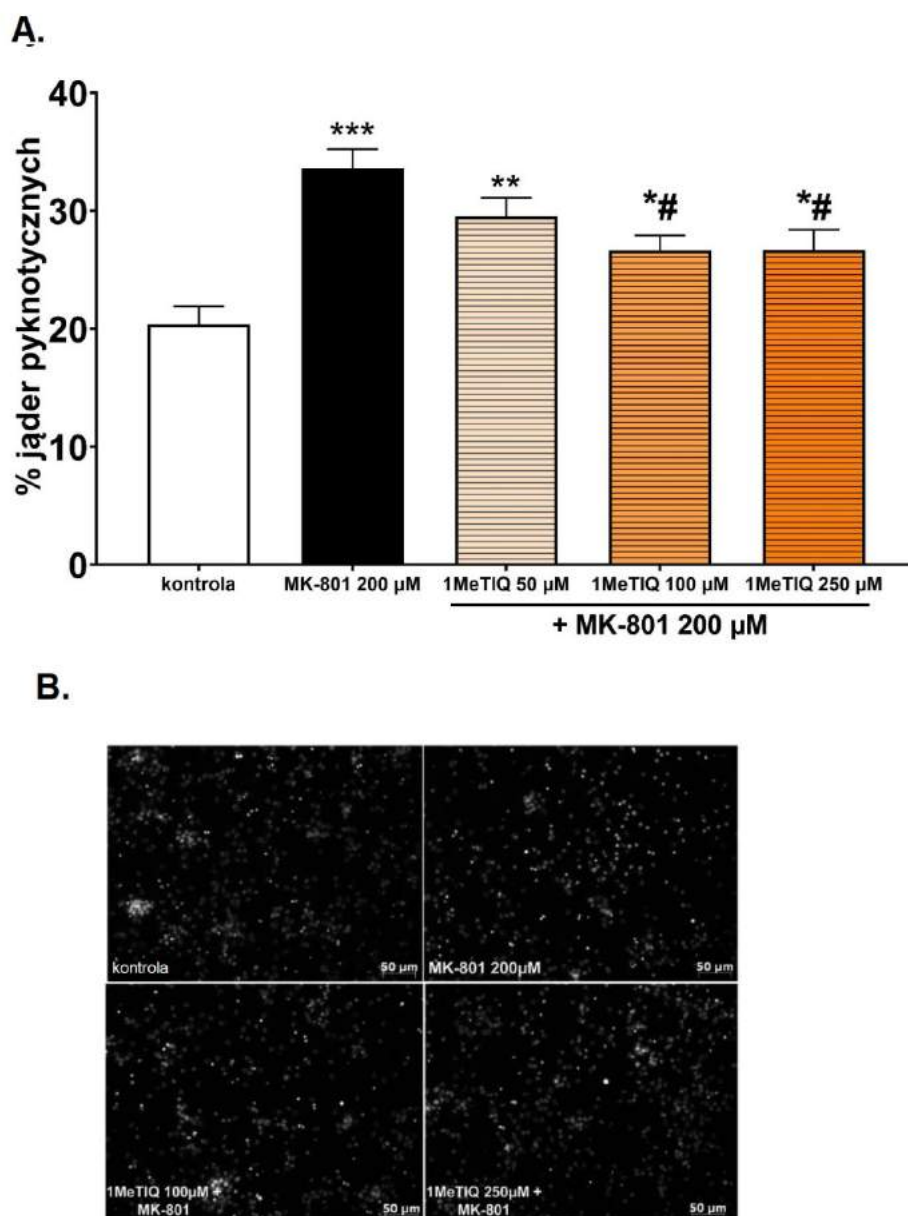
Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA nie wykazała istotnego wpływu iniekcji ($F[5,19]=1.70$, N. S.) na stężenie TNF- α w STR szczura (rys. 31 C).

Ta sama analiza statystyczna wykazała znamienne zastosowanych substancji ($F[5,23]=1.09$, $p < 0.05$) na poziom IL-10 w STR. Analiza post hoc ujawniła spadek stężenia IL-10 w grupie łącznej (1MeTIQ 50 mg + MK-801) w stosunku do wartości kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych różnic w pozostałych grupach badawczych (rys. 31 D).

4.8. Badania *in vitro* – analiza ilości jąder pyknotycznych, żywotności komórek oraz uwalniania LDH w hodowlach komórkowych

4.8.1. Analiza ilości jąder pyknotycznych w hodowlach komórkowych

Rys. 32



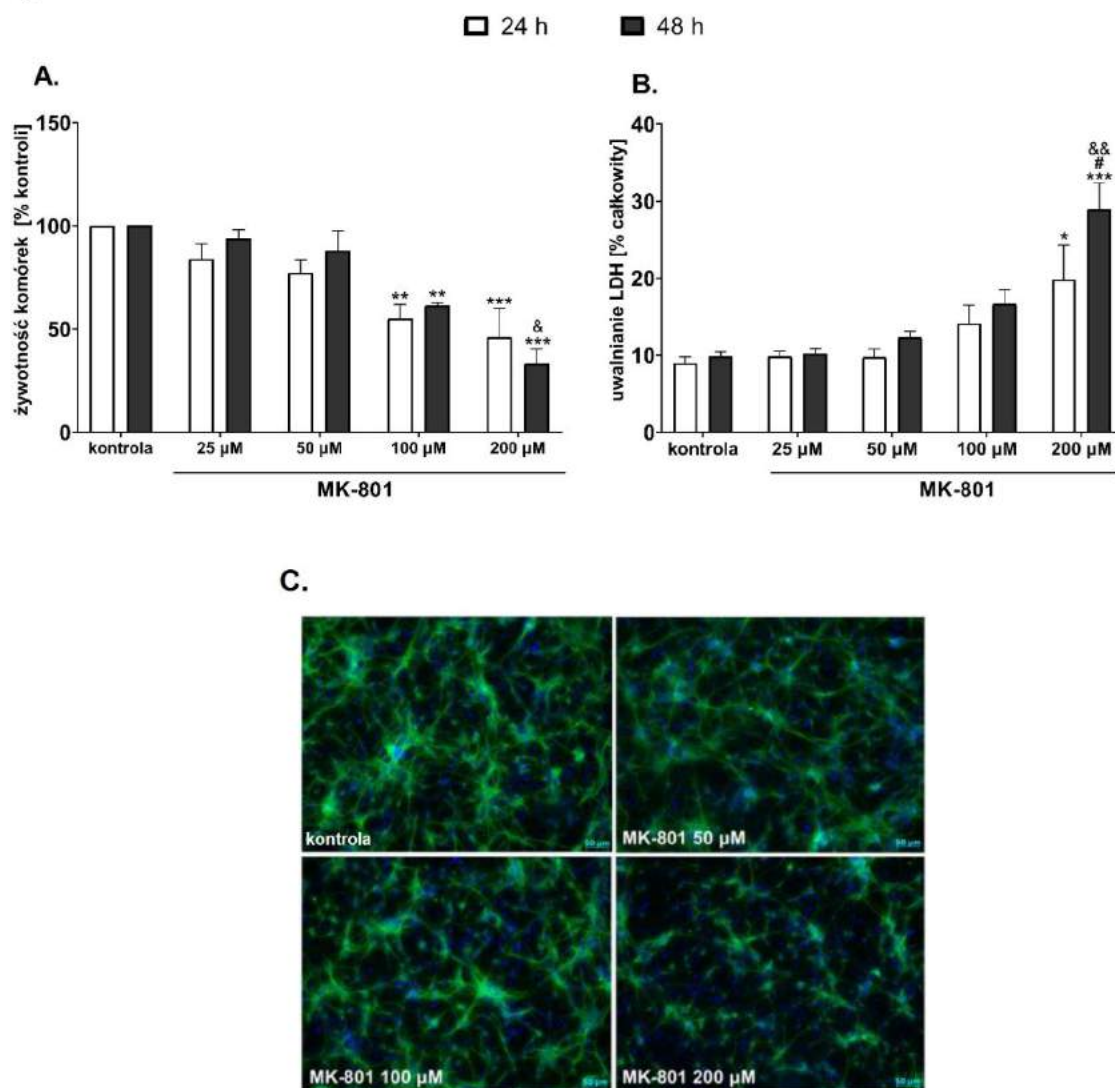
Rys. 32: Porównanie ilości jąder pyknotycznych w hodowli homórkowej po stymulacji komórek MK-801 oraz MK-801 (200 µM) w połączeniu z 1MeTIQ (50, 100 lub 250 µM). Wyniki wyrażono jako średnie ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy MK-801 (A);

reprezentacyjne mikrofotografie pierwotnych hodowli neuronalnych inkubowanych przez 24 godziny z 1MeTIQ (100 and 250 μ M) i MK-801 (200 μ M), barwione Hoechst 33-342 (B).

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała istotny wpływ zastosowanych związków ($F[5,59]=8.14$, $p < 0.001$) na procent jąder pyknotycznych komórek w hodowli *in vitro*. Test post hoc wykazał istotny wzrost ilości pyknotycznych jąder po stymulacji komórek MK-801 ($p < 0.001$) w porównaniu do hodowli kontrolnej. Podobny efekt obserwowano w grupie łącznej (1MeTIQ 50 μ M + MK-801), w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0.01$). W grupie komórek, które były stymulowane 1MeTIQ 100 μ M i MK-801, również zaobserwowano znamienny wzrost ilości pyknotycznych jąder ($p < 0.05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. W tej samej grupie zaobserwowano również istotny spadek liczby jąder pyknotycznych w stosunku do wartości z grupy MK-801 ($p < 0.05$). W grupie komórek, która była stymulowana 1MeTIQ w dawce 250 μ M i MK-801, obserwowano istotny wzrost liczby jąder pyknotycznych ($p < 0.05$) w stosunku do wartości kontrolnej. W tej samej grupie wykazano także spadek liczby jąder pyknotycznych w stosunku do grupy, która była traktowana MK-801 ($p < 0.05$) (rys. 32 A).

4.8.2. Analiza żywotności komórek oraz poziomu uwalniania LDH w hodowlach komórkowych stymulowanych MK-801

Rys. 33



Rys. 33: Porównanie żywotności komórek (A) i poziomu uwalniania LDH (B) w hodowlach komórkowych po stymulacji hodowli MK-801 w stężeniach: 25, 50, 100 i 200 μ M oraz reprezentacyjne mikrofotografie komórek nerwowych inkubowanych przez 24 godziny z MK-801 (50, 100 i 200 μ M) (C). Po inkubacji komórki utrwalono i wybarwiono markerami: neuronalnym (anty-MAP2; zielony) i jądrowym (Hoechst 3342; niebieski). Wyniki wyrażono jako średnie $\pm$ SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 w porównaniu do grupy kontrolnej; # p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001 w porównaniu do tożsamej dawki

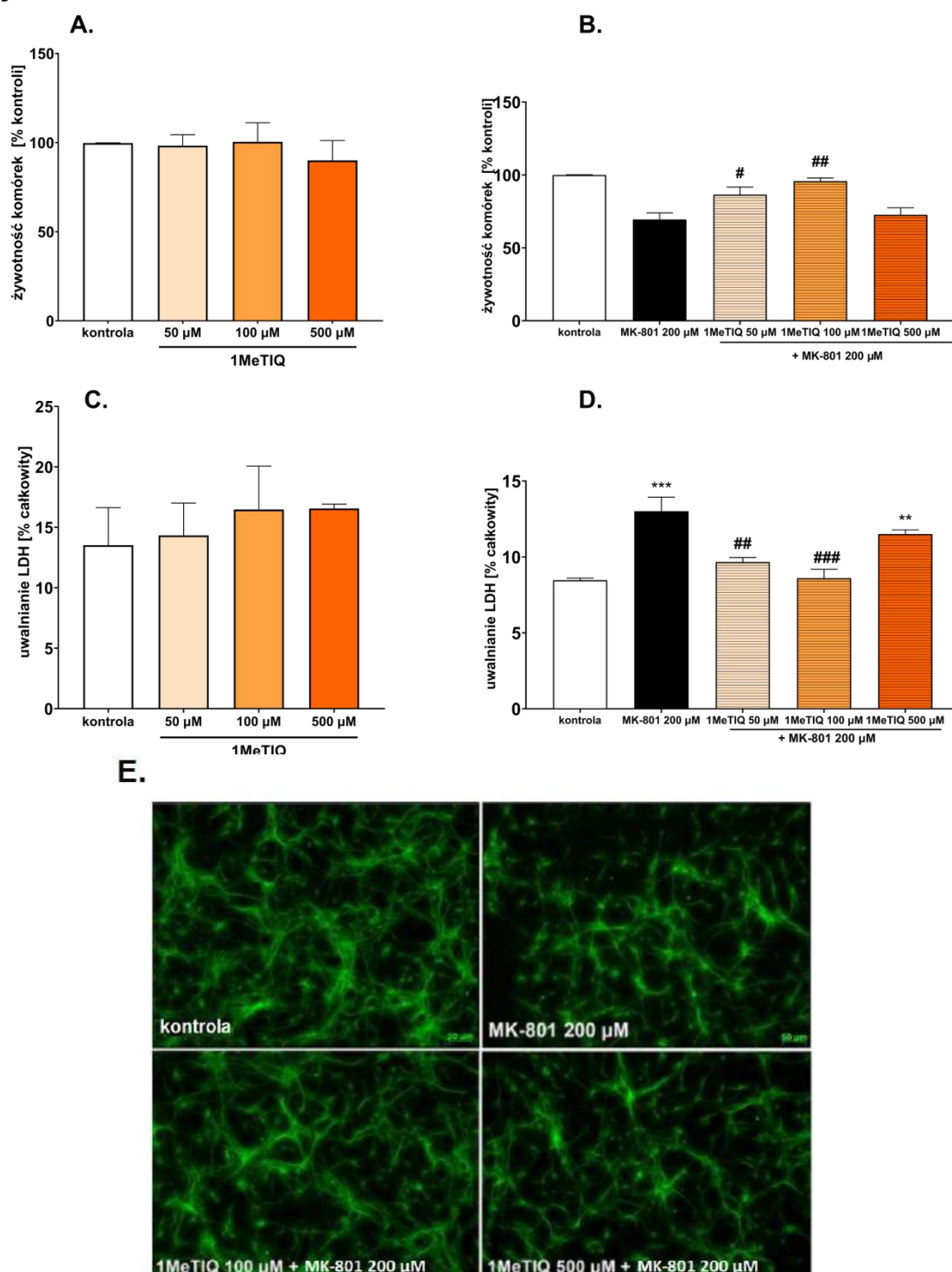
inkubowanej 24 godziny; $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$ w porównaniu do tożsamego czasu inkubacji z dawką 100 μM .

Dwuczynnikowa analiza statystyczna ANOVA wykazała brak istotnego wpływu czasu ($F[1,12]=1.82$, N. S.) na żywotność komórek nerwowych w hodowli, natomiast efekt dawki MK-801 ($F[5,12]=16.25$, $p < 0.001$) okazał się być istotny. Interakcja obu czynników ($F[5,12]=0.76$, N. S.) okazała się nie mieć znamionnego efektu na badany parametr. Test post hoc wykazał istotne obniżenie żywotności komórek, zarówno po 24 jak i 48 godzinach inkubacji z MK-801 w dawce 100 μM , w stosunku do wartości kontrolnych. Podobny, jednak bardziej nasilony efekt, porównując do grup kontrolnych, obserwowano w hodowli komórek, które były inkubowane z MK-801 200 μM zarówno przez 24, jak i 48 godzin (oba $p < 0.001$). Inkubacja komórek przez 48 godzin z MK-801 w dawce 200 μM spowodowała również istotne zmniejszenie ich żywotności w stosunku do tożsamego czasu inkubacji z dawką MK-801 100 μM ($p < 0.05$) (rys. 33 A).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt czasu inkubacji ($F[1,121]=7.60$, $p < 0.05$) oraz zastosowanych dawek MK-801 ($F[5,12]=22.60$, $p < 0.001$) na poziom uwalnianego LDH w hodowlach komórkowych. Interakcja obu badanych zmiennych ($F[5,12]=1.70$, N. S.) okazała się być nieistotna statystycznie. Test post hoc wykazał znamienny wzrost poziomu uwalnianego LDH ($p < 0.05$) w porównaniu do poziomu kontrolnego w hodowli komórkowej, która była inkubowana przez 24 godziny z MK-801 w dawce 200 μM . Inkubowanie komórek tożsamą dawką, ale przez 48 godzin, spowodowało znamienny wzrost poziomu uwalnianego LDH w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.001$), grupy MK-801 100 μM ($p < 0.01$) oraz do hodowli, w której inkubacja trwała 24 godziny ($p < 0.05$) (rys. 33 B).

4.8.3. Analiza żywotności komórek i poziomu uwalniania LDH w hodowlach komórkowych stymulowanych MK-801 oraz 1MeTIQ

Rys. 34



Rys. 34 : Porównanie żywotności komórek w hodowli komórkowej po stymulacji 1MeTIQ w dawkach 50, 100 i 500 μ M (A), stymulacji komórek MK-801 w połączeniu z 1MeTIQ (B) oraz porównanie poziomu uwalniania LDH w hodowli komórkowej po stymulacji 1MeTIQ w

dawkach 50, 100 i 500 μM (C), stymulacji komórek MK-801 w połączeniu z 1MeTIQ (D). Dodatkowo wykonano reprezentatywne mikrofotografie komórek nerwowych inkubowanych przez 24 godzin z 1MeTIQ (100 i 500 μM) oraz MK-801 (200 μM). Po inkubacji komórki utrwalono i wybarwiono markerem neuronalnym (anty-MAP2; zielony) (E). Wyniki wyrażono jako średnie $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ w porównaniu do grupy kontrolnej; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ w porównaniu do grupy MK-801.

Jednoczynnikowa analiza statystyczna ANOVA nie wykazała istotnego wpływu różnych dawek 1MeTIQ ($F[3,9]=0.31$, N. S.) na żywotność komórek w hodowli (rys. 34 A).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt związków, z którymi inkubowane były komórki ($F[6,29]=5.68$, $p < 0.001$) na ich żywotność w hodowli komórkowej. Analiza post hoc wykazała znamienne wzrost poziomu żywotności komórek w grupach łącznych: 1MeTIQ 50 μM + MK-801 oraz 1MeTIQ 100 μM + MK-801 (odpowiednio $p < 0.05$ i $p < 0.01$) w stosunku do wartości z grupy MK-801 (rys. 34 B).

Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA nie wykazała znamienego wpływu różnych dawek 1MeTIQ ($F[3,4]=0.32$, N. S.) na ilość uwalnianego LDH w hodowli komórkowej (rys. 34 C).

Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny wpływ zastosowanych substancji ($F[4,14]=12.44$, $p < 0.01$) na poziom uwalnianego LDH w badanych hodowlach komórkowych. Test post hoc wykazał znaczny wzrost ilości uwalnianego LDH w grupie MK-801 ($p < 0.001$) w stosunku do poziomu kontrolnego. W grupach łącznych: 1MeTIQ 50 μM + MK-801 oraz 1MeTIQ 100 μM + MK-801 zaobserwowano istotny spadek wartości uwalnianego LDH (odpowiednio $p < 0.01$ i $p < 0.001$) w porównaniu do wartości z grupy MK-801. W grupie łącznej, gdzie komórki traktowano 1MeTIQ 500 μM + MK-801, zaobserwowano znamienne wzrost uwalniania LDH ($p < 0.01$) w stosunku do grupy kontrolnej (rys. 34 D).

5. DYSKUSJA

5.1. Testy behawioralne skorelowane z badaniami neurochemicznymi: *ex vivo* i *in vivo*

5.1.1. Test podniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Lęk jest jednym z częstych objawów występujących u pacjentów ze schizofrenią i silnie wpływa na codzienne funkcjonowanie pacjentów (Buonocore i wsp., 2018). W niniejszej rozprawie doktorskiej wykorzystano test EPM do weryfikacji zachowań lękowych w zwierzęcym modelu tej choroby. Ketamina, jako substancja modelująca objawy schizofrenii u zwierząt wykazuje także działanie prołękowe (Frohlich i Van Horn, 2013). W obecnych badaniach, w teście EPM zaobserwowano, że dawka 10 mg/kg ketaminy powoduje u zwierząt zachowania lękowe, wyrażone jako obniżony czas spędzony w otwartych ramionach, czy mniejsza ilość wejść do otwartych ramion aparatu (rys. 2 A, 2 B). Jednocześnie podanie wyższej dawki 1MeTIQ (50 mg/kg), odwróciło efekt działania ketaminy (rys. 2 A). Podobny efekt obserwowano po podaniu olanzapiny, szeroko stosowanego leku przeciwpsychotycznego (rys. 2 A). W badaniach klinicznych wykazano skuteczność olanzapiny w łagodzeniu lęku u pacjentów ze schizofrenią (Crapanzano i wsp., 2022). W badaniach biochemicznych (tab. 4) przeprowadzonych po teście EPM wykazano spadek poziomu 5-HT w HIP po podaniu ketaminy, jednak ani 1MeTIQ, ani olanzapina, nie odwróciły tego efektu. Niemniej jednak podanie 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg, zarówno samego, jak i z ketaminą, istotnie obniżyło poziom metabolitu 5-HT – 5-HIAA, tym samym wskazując na zmniejszenie tempa metabolizmu 5-HT i zwiększenie jej ilości w synapsach. Dostępna literatura wskazuje na istotną rolę 5-HT w skomplikowanej regulacji zachowań lękowych (Zangrossi w wsp., 2020), przy czym przypisuje się jej właściwości anksjolityczne (Deakin i Graeff, 1991), dlatego też zwiększenie jej dostępności w strukturach synaptycznych może mieć korzystny wpływ na zachowania lękowe.

Co więcej, 1MeTIQ należy do grupy odwracalnych inhibitorów enzymów MAO, których efektywność w łagodzeniu zachowań lękowych została udowodniona w badaniach klinicznych już w latach 90' XX wieku (Fahlen i wsp., 1995). Dzięki hamowaniu aktywności MAO-A i MAO-B, 1MeTIQ silnie wpływa na transmisję monoamin – DA, 5-HT i NA - w układzie nerwowym, modulując ich katabolizm. Niektóre badania wskazują na istotną rolę monoamin (szczególnie układu dopaminergicznego i serotonergicznego) w modulacji zachowań lękowych, (Williams i wsp., 2017). 1MeTIQ hamując drogę oksydacji DA zależną od MAO, jednocześnie nasila katabolizm tego neuroprzekaźnika zależny od COMT,

zwiększając tym samym zewnątrzneuronalne stężenie metabolitu 3-MT w STR (tab. 5). 3-MT jest biologicznie aktywnym związkiem, który może pełnić rolę regulatora działania katecholamin. Wykazano także, że 3-MT odwraca stymulujący efekt amfetaminy, zarówno w badaniach behawioralnych jak i molekularnych (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2008). Ponadto 3-MT posiada zdolność wiązania do receptorów dopaminergicznych i receptora α -1 noradrenergicznego (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2008). Biorąc pod uwagę rolę transmisji noradrenergicznej w zachowaniach lękowych (Purvis i wsp., 2018), przeciwlękowe działanie 1MeTIQ może być spowodowane jego zdolnością do zwiększania stężenia 3-MT, działającego jako antagonist receptorów α -1 noradrenergicznych.

Dostępne w literaturze badania nad związkami działającymi antagonistycznie na miejsce glicynowe receptora NMDA, jak np. kwas 7-chlorokynureninowy (Anthony i Nevins, 1993), wskazują na potencjalne działanie przeciwlękowe w badaniach na zwierzętach (Barkus i wsp., 2010). Do tej samej grupy związków należy właśnie 1MeTIQ, co może tłumaczyć jego anksjolityczny efekt.

W przeprowadzonym teście EPM również olanzapina wykazała działanie przeciwlękowe, odwracając efekt ketaminy (rys. 2). Olanzapina, atypowy lek przeciwpsychotyczny, działa jako antagonist receptorów dopaminowych (D_2 , D_3 , D_4), serotoninowych ($5-HT_{2A}$, $5-HT_{2C}$, $5-HT_6$) oraz noradrenergicznych (α -1) (Angelucci i wsp., 2005). Cechą wspólną obu badanych substancji jest więc działanie antagonistyczne na receptor α -1 noradrenergiczny, co może wyjaśniać działanie przeciwlękowe obu związków (Wąsik i wsp., 2019). Ponadto badania dostępne w literaturze wskazują także na rolę układu glutaminianergicznego w zachowaniach lękowych. Wykazano, że inhibitory transmisji glutaminianergicznej (np. riluzol) łagodzą symptomy zachowań obsesyjno-kompulsywnych czy zaburzeń lękowych (Cortese i Phan, 2005).

W przeprowadzonym eksperymencie mikrodializy *in vivo* w FCX podanie olanzapiny, zarówno samej, jak i z ketaminą, doprowadziło do obniżenia poziomu uwalniania GLU (rys. 23), co może tłumaczyć anksjolityczne działanie tego związku.

5.1.2. Test rozpoznawania nowego obiektu (NORT)

W celu weryfikacji zaburzeń pamięci w zwierzęcym modelu schizofrenii, wykorzystano test NORT, który jest szeroko stosowany w badaniach przedklinicznych. Test ten bada zaburzenia pamięci rozpoznawczej, wykorzystując tendencję gryzoni do eksploracji nowych, nieznanych

obiektów (Białoń i wsp., 2020). W teście NORT, przeprowadzonym w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wykorzystano ketaminę jako modelującą substancję zaburzającą procesy pamięciowe. W literaturze ketamina w dawce subanestetycznej prezentowana jest jako substancja zaburzająca pamięć (Kos i wsp., 2006) i jest szeroko stosowana w testach analizujących procesy pamięciowe gryzoni. W prezentowanym teście NORT, ketamina spowodowała zaburzenia pamięci u samców szczurów wyrażających się brakiem różnic w czasie eksploracji znanego i nowego obiektu w fazie T1 testu (rys. 4 B; 5 B; 6 B). Dodatkowo ketamina spowodowała spadek wartości indeksu dyskryminacji oraz preferencji w przeprowadzonym teście, co świadczy o braku zdolności zwierząt do dyskryminacji zwierząt pomiędzy poznanym wcześniej, a całkowicie nowym przedmiotem (rys. 4 C, D; 5 C, D; 6 C, D). Badania wskazują, że jednorazowe ketaminy może prowadzić do osłabionego funkcjonowania synaps w HIP, co może leżeć u podstaw zaburzeń procesów pamięciowych (Duan i wsp., 2013). Ponadto ketamina wpływa negatywnie w większym stopniu na proces zapamiętywania i kodowania informacji, niż na odzyskiwanie informacji z dostępnych zasobów pamięci (Honey i wsp., 2005).

W przeprowadzonym teście wykazano, że jednorazowe podanie 1MeTIQ zarówno w dawce 25 mg/kg (rys. 4), jak i 50 mg/kg (rys. 5) odwraca zaburzenia wywołane przez ketaminę w teście pamięciowym NORT, przywracając indeks dyskryminacji (rys. 4 C; 5 C) oraz indeks preferencji (rys. 4 D) do wartości kontrolnych. Dodatkowo, jednokrotne podanie 1MeTIQ w obu dawkach istotnie zwiększa czas eksploracji nowego obiektu w fazie T2 testu, wskazując na identyfikację nieznanego obiektu jako nowego (rys. 4 B; 5 B). W przypadku chronicznych podań 1MeTIQ (rys. 6), zwierzęta z tej grupy wykazywały tendencję do zwiększonego czasu eksploracji nowego obiektu w fazie T2 testu, jednak wynik okazał się nieistotny statystycznie (rys. 6 B). Wielokrotne podania 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg również zaburzyły indeks preferencji, sugerując losową eksplorację obiektów w fazie T2 testu (rys. 6 D). Niemniej jednak podania chroniczne nie zaburzyły indeksu dyskryminacji w teście NORT (rys. 6 C).

1MeTIQ wykazuje słabe działanie antagonistyczne do receptora NMDA (wiąże się z receptorem około 1000-krotnie słabiej niż MK-801), wiążąc się z miejscem glicynowym (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2006), a farmakologiczna modulacja miejsca glicynowego może mieć wpływ na dysfunkcje kognitywne obserwowane w zwierzęcym modelu schizofrenii (Fone i wsp., 2020). Poprzednie badania wskazują także na rolę miejsca glicynowego w modulacji procesów pamięciowych układu nagrody (Zhou i wsp., 2012). Warto zauważyć, że zarówno DA jak i NA odgrywają ważną rolę w procesach pamięciowych – zarówno zbyt duże, jak i zbyt małe stężenie wspomnianych neuroprzekaźników może

prorowadzić do zaburzeń w obrębie funkcji pamięci (Arnsten, 1997; Inagaki i wsp., 2010). Analogicznie jak w teście NORT, przeprowadzono eksperyment mikrodializy *in vivo* w STR, stosując tożsame związki i ich dawki (rys. 11-16). Wykazano wówczas, że ketamina znacznie zwiększa poziom uwalnianej NA (do około 400% wartości bazalnej) w STR szczura (rys. 12 A; 14 A; 16 A; 18 A), nie zmieniając jednocześnie stężenia jej metabolitu – NM (rys. 12 B; 14 B; 16 B; 18 B). Prawdopodobnym mechanizmem obserwowanego zjawiska jest zablokowanie receptorów NMDA na komórkach GABA-ergicznych, co z kolei prowadzi do odhamowania neuronów noradrenergicznych (Boultadakis i Pitsikas, 2011).

Dostępne badania wskazują też na fakt, że zwiększony poziom NA może być charakterystyczny dla schizofrenii, dodatkowo przyczyniając się do objawów negatywnych choroby, w tym zaburzeń pamięci (Fitzgerald, 2014). Co więcej, NA może modulować transmisję glutaminianergiczną (Egli i wsp., 2005), również poprzez modulację receptorów α -1 adrenergicznych (Scheiderer i wsp., 2004), co może być istotne dla rozwoju choroby jaką jest schizofrenia.

Antagoniści NMDA, jak np. PCP czy ketamina (w dawkach subanestetycznych), modulują stężenie NA poprzez zahamowanie jej transportera a tym samym wychwyty zwrotnego (Pechnick i wsp., 2006). Dane literaturowe wskazują, że zablokowanie receptorów NMDA zlokalizowanych na interneuronach GABA-ergicznych prowadzi do odhamowania aktywności innych neuronów, m. in. noradrenergicznych (Boultadakis i Pitsikas, 2011).

W przeprowadzonym eksperymencie jednokrotne podanie 1MeTIQ wraz z ketaminą całkowicie zablokowało jej efekt (rys. 12 A, 14 A, 16 A), utrzymując uwalnianie NA na poziomie kontrolnym, natomiast podania chroniczne 1MeTIQ wraz z jednokrotną iniekcją ketaminy, jedynie osłabiły efekt antagonisty receptora NMDA i zwiększyły uwalnianie NA (rys. 18 A). Jednocześnie wielokrotne podania 1MeTIQ w grupie łącznej doprowadziły do nasilonego katabolizmu NA, co sugeruje zwiększoną aktywność układu noradrenergicznego (rys. 18 B).

Istotny efekt wykazano także w przypadku wpływu chronicznych podań 1MeTIQ na katabolizm 5-HT w STR. Wielokrotne iniekcje 1MeTIQ, również w połączeniu z jednokrotnym podaniem ketaminy, obniżyły stężenie 5-HIAA w STR (rys. 18 D), nie zmieniając jednocześnie uwalniania 5-HT (rys. 18 C). Badania wskazują, że 5-HT posiada zdolność modulacji transmisji dopaminergicznej w szlaku mezo limbicznym i mezo krotkałnym, niemniej jednak istnieją rozbieżności w wynikach badań, które pokazują zarówno stymulację, jak i zahamowanie wydzielania DA w STR pod wpływem 5-HT (Vollenweder i wsp., 1999).

W przeprowadzonych testach wykorzystano także olanzapinę, jako lek referencyjny. Badania pokazują skuteczność olanzapiny w poprawie procesów kognitywnych, w tym pamięciowych, u pacjentów ze schizofrenią (Wang i wsp., 2013) i w zwierzęcych modelach choroby (Liu i wsp., 2018). W zaprezentowanym teście NORT olanzapina skutecznie odwróciła działanie ketaminy i wykazywała działanie prokognitywne, poprzez istotne zwiększenie czasu eksploracji nowego obiektu (rys. 4 B; 5 B) w fazie T2 oraz przywrócenie indeksów dyskryminacji i preferencji do poziomu kontrolnego (rys. 4 C, D; 5 C, D), wskazując na brak zaburzeń procesów pamięci u badanych zwierząt. W przeprowadzonych testach wykazano, że 1MeTIQ, zarówno w dawce 25, jak i 50 mg/kg, wywiera działanie prokognitywne, podobne do olanzapiny.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej po raz pierwszy zbadano wpływ 1MeTIQ (50 mg/kg) na poziom uwalniania GLU w strukturze HIP (rys. 26). Obserwowany efekt był odwrotny niż w przypadku FCX (rys. 21) - podanie 1MeTIQ zwiększyło wydzielanie GLU w tej strukturze (rys. 26). Badania wskazują, że odhamowanie i wzrost aktywności komórek HIP może skutkować nasiloną transmisją dopaminergiczną (również obserwowanej w tej strukturze – rys. 24 A, C, D), wyrażonej jako zwiększone uwalnianie DA, 3-MT i HVA (McGarrrity i wsp., 2016). Podanie 1MeTIQ (50 mg/kg) spowodowało także wzrost stężenia 5-HT, z jednocześnie obserwowanym spadkiem poziomu 5-HIAA (rys. 25 C, D). Szlaki serotoninergiczne HIP są istotne dla formacji szlaków pamięciowych (Teixeira i wsp., 2018), a badania dowodzą także, że zaburzenia poziomów 5-HT wpływają m. in. na pamięć przestrzenną zwierząt, przy czym zwiększone stężenie 5-HT ma pozytywny wpływ na ten aspekt pamięci (Glikmann-Johnston i wsp., 2015). Pozytywna rola 5-HT jest także wspierana przez obserwacje, gdzie deficyty kognitywne obserwowane u pacjentów z depresją związane są z obniżonym poziomem 5-HT (Cowen i Sherwood, 2013). Warto podkreślić, że 1MeTIQ wykazuje także działanie przeciwdepresyjne, poprzez wpływ na układy neuroprzekątnictwa katecholamin (Wąsik i wsp., 2014).

5.1.3. Test interakcji socjalnych (SIT)

U pacjentów ze schizofrenią również często obserwuje się zaburzenia życia społecznego czy interakcji międzyludzkich, znacznie utrudniając codziennie funkcjonowanie osób chorych. Powyższe objawy zaliczane są do objawów negatywnych choroby. W badaniach przedklinicznych, w zwierzęcym modelu tego schorzenia, zachowania socjalne zwierząt

można mierzyć w teście interakcji socjalnych (SIT), określającym częstość i czas trwania tego typu zachowań.

W przeprowadzonym teście SIT w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano model farmakologiczny schizofrenii – iniekcję MK-801. MK-801 jest szeroko stosowanym związkiem, wykorzystywanym w badaniach przedklinicznych do indukcji zachowań u zwierząt odpowiadającym tym, u pacjentów ze schizofrenią, powodując m. in. zmniejszenie ilości kontaktów socjalnych między osobnikami (Cieślik i wsp., 2019). W przeprowadzonym teście SIT MK-801 spowodowało istotne skrócenie czasu interakcji socjalnych (rys. 7 A; 8 A) oraz ich liczby (rys. 7 B; 8 B).

Zachowania socjalne są złożonym rodzajem zachowań, które wymagają integracji procesów kognitywnych, bodźców socjalnych odbieranych ze środowiska oraz motywacji do zainicjowania bądź odpowiedzi na taki kontakt (Zoicas i Kornhuber, 2019). Badania przedkliniczne wskazują, że zaburzona transmisja glutaminianergiczna kontrolowana przez NMDAR, ma istotne znaczenie dla zachowań socjalnych gryzoni (Zoicas i Kornhuber, 2019), zmniejszając ich częstotliwość oraz czas trwania. Zaburzenie interakcji socjalnych było obserwowane także u genetycznie modyfikowanych myszy, wykazujących jedynie 5% funkcjonalnych receptorów NMDA (Duncan i wsp., 2004). Powyższe badania wskazują na istotną rolę prawidłowego funkcjonowania receptorów NMDA w procesach regulujących zachowania społeczne. Jacobs i Tsien (Jacobs i Tzien, 2017) wskazują na rolę motywacji w kontekście interakcji społecznych, kontrolowanej przez transmisję dopaminergiczną, zaznaczając również częste sprzężenie receptorów dopaminergicznych D₁ z receptorami NMDA. Badania wykazały, że neurony dopaminowe charakteryzują się nasilonymi prądami Ca²⁺ w czasie trwania interakcji społecznych (Gunaydin i wsp., 2014), a zmniejszona aktywność dopaminergiczna w FCX wiązana jest z zaburzeniami interakcji socjalnych (Novick i wsp., 2015). Badania biochemiczne *ex vivo* wykonane po teście SIT (tab. 7) wskazują na znacznie obniżone stężenie DA w FCX po podaniu MK-801, tłumacząc tym samym deficyty obserwowane w interakcjach socjalnych szczurów.

W przeprowadzonym teście SIT, zarówno 1MeTIQ, jak i olanzapina, spowodowały skrócenie czasu trwania interakcji socjalnych u zwierząt (rys. 7 A). Podobny efekt obserwowano w przypadku iniekcji chronicznych (7x) 1MeTIQ (rys. 8 A). Zarówno 1MeTIQ (podany zarówno jednokrotnie, jak i chronicznie), ani olanzapina nie odwróciły efektu MK-801 także w przypadku liczby interakcji socjalnych zwierząt (rys. 7 B; 8 B). Obserwowany efekt może być spowodowany zauważalnym obniżeniem aktywności lokomotorycznej szczurów (dane niepublikowane). Zmniejszoną ruchliwość zwierząt po podaniu olanzapiny obserwowano w

teście EPM, gdzie iniekcja tego związku spowodowała istotny spadek liczby wspięć oraz liczbę wejść do ramion (rys. 2 C, D). Dostępna literatura również wskazuje na zaburzenia aktywności lokomotorycznej zwierząt, którym podano olanzapinę. W badaniach van der Zwaala (van der Zwaal i wsp., 2010) zastosowano doustną bądź dożylną iniekcję leku w celu jak najlepszego odzwierciedlenia sposobu podań pacjentom i wykazano dawkozależny wpływ olanzapiny na ruchliwość zwierząt, przy czym największa dawka powodowała najsilniejszy spadek aktywności lokomotorycznej. Podobny efekt obniżenia ruchliwości zwierząt był obserwowany w badaniach Chee i współpracowników (Chee i wsp., 2016), w których wykazano również rolę jądra półleżącego w modulacji aktywności lokomotorycznej zwierząt, gdzie podania olanzapiny powodują osłabienie transmisji GABA-ergicznego. Dodatkowo olanzapina może wybiórczo hamować receptory D₂ na średnich neuronach kolczastych, a tym samym wywierać efekt obniżenia aktywności motorycznej zwierząt (Chee i wsp., 2016).

Dostępne w literaturze badania wskazują na rolę DA w modulacji zachowań socjalnych, a aktywność neuronów dopaminergicznych jest kluczowa dla motywacji prowadzących do interakcji społecznych (Solie i wsp., 2022). W badaniach biochemicznych *ex vivo* wykazano znaczny spadek poziomu DA (tab. 7) po podaniu MK-801, co korelowało ze spadkiem zarówno czasu, jak i interakcji socjalnych w przeprowadzonym teście behawioralnym (rys. 7; 8). W badaniach neurochemicznych podanie 1MeTIQ odwróciło efekt antagonisty receptora NMDA, przywracając poziom DA do poziomu kontrolnego. 1MeTIQ, pomimo odwrócenia deficytów obserwowanych w badaniach *ex vivo*, spowodowanych podaniem MK-801, nie odwrócił efektów behawioralnych, czego przyczyną może być wspomniane wcześniej obniżenie aktywności motorycznej zwierząt poddanych testowi.

W badaniach biochemicznych *ex vivo* zaobserwowano istotny spadek poziomu DA w FCX po podaniu MK-801 (0.1 mg/kg) (tab. 7), natomiast nie było takiego efektu po podaniu ketaminy (10 mg/kg) (tab. 2). Jedna z metaanaliz wykazała natomiast, że badania *in vivo* wskazują na zwiększone uwalnianie DA w obszarach frontalnych po jednorazowym podaniu ketaminy, natomiast efekt ten nie jest obserwowany w przypadku badań *ex vivo*, gdzie homogenizacji i analizie zostaje poddana cała badana struktura (Kokkinou i wsp., 2018). Zarówno 1MeTIQ, jak i olanzapina, odwróciły efekt MK-801 i przywróciły poziom DA do poziomu kontrolnego (tab. 7) w FCX. Zmniejszona transmisja dopaminergiczna w obszarach przedczołowych jest – według dopaminowej teorii choroby – jedną ze zmian przyczyniających się do powstawania objawów negatywnych i kognitywnych obserwowanych w przebiegu schizofrenii. Z tego względu zwiększenie poziomu DA przez 1MeTIQ lub olanzapinę i przywrócenie go do

poziomu kontrolnego może wydawać się istotne dla procesów takich jak zaburzenia uwagi czy pamięci, obecnych w symptomatologii schizofrenii.

Podanie 1MeTIQ (25 mg/kg), również w połączeniu z antagonistą receptora NMDA, istotnie zwiększyło poziomy NA, 5-HT oraz poziom ich metabolitów - odpowiednio NM i 5-HIAA (tab. 8; 16) w badanych strukturach, co świadczy o nasilonej aktywności układów noradrenergicznego oraz serotonergicznego. Dostępne w literaturze badania wskazują na pozytywny efekt zwiększonej aktywności układu noradrenergicznego w niwelowaniu zaburzeń kognitywnych w schizofrenii. Efekt ten został wykazany w eksperymentach z wykorzystaniem mazindolu (inhibitora zwrotnego wychwyty DA i NA), w których związek ten skutecznie odwrócił deficyty obserwowane m. in. w teście przełączenia uwagi (Nikiforuk i wsp., 2010). Wielokrotne podania 1MeTIQ (25 mg/kg) także spowodowały zwiększenie aktywności układu serotonergicznego w FCX, niemniej jednak zaobserwowano spadek stężenia 5-HIAA, co sugeruje obniżenie katabolizmu świadczące o obniżonym metabolizmie 5-HT (tab. 12). Neurony serotonergiczne wysyłają swoje projekcje do większości obszarów korowych, zwłaszcza do regionów czołowych (Celada i wsp., 2013), a transmisja serotonergiczna odgrywa ważną rolę w funkcjach kognitywnych i emocjonalnych zależnych od tego obszaru mózgu (Lu i Liu, 2017).

5.1.4. Test warunkowania i pamięci strachu (FMT)

Pamięć warunkowana strachem jest istotnym mechanizmem uczenia się przewidywania bodźców sygnalizujących zagrożenie, a tym samym uczenia się odpowiedniej reakcji na potencjalne zagrożenie (Latusz i wsp., 2017). Przedstawione badania wskazują, że podanie MK-801 znacznie obniżyło % czasu bezruchu w obu fazach testu, natomiast jednokrotna dawka 1MeTIQ nie zaburza procesów pamięci strachu warunkowanych zarówno bodźcem dźwiękowym, jak i kontekstowym (rys. 9 A, B).

Dane literaturowe wskazują na istotną rolę receptorów NMDA w warunkowaniu strachu, gdyż podania antagonistów tego receptora do ciała migdałowatego blokują proces nabycia warunkowanego lęku (Liu i wsp., 2009). Niemniej jednak badania z użyciem MK-801 wskazują na niejednoznaczne efekty tego antagonisty na pamięć warunkowaną strachem (Zhang i Feldon, 2001). Autorzy ci wykazali deficyty jedynie w procesach warunkowanych kontekstem, natomiast inne badania (Csernansky i wsp., 2005; Białoń i wsp., 2021) wskazują na efekt MK-801 w obu fazach testu. Efekt antagonisty receptora NMDA zależy także od

momentu podania substancji a iniekcja MK-801 w dawce 0.3 mg/kg po przebytych treningu, może wspomagać procesy pamięci warunkowanej strachem (Gould i wsp., 2002).

Warto jednak zaznaczyć, że obniżenie czasu bezruchu analizowane w teście pamięci warunkowanej strachem, może być także przypisywane zmianom w aktywności lokomotorycznej zwierząt, gdyż antagoniści receptora NMDA, w tym MK-801, mogą powodować zwiększoną ruchliwość, m. in. w teście otwartego pola (Hesegawa i wsp., 2016).

W teście FMT przeprowadzonym w ramach niniejszej rozprawy, podanie olanzapiny nie odwróciło efektów MK-801, zarówno w przypadku strachu warunkowanego kontekstem (rys. 9 A), jak i bodźcem dźwiękowym (rys. 9 B), natomiast 1MeTIQ (25 mg/kg) nie zablokował efektu antagonisty NMDAR (rys. 9). Wyniki badań dostępne w literaturze wskazują na różne efekty olanzapiny w badaniach dotyczących pamięci. Inoue i współpracownicy wykazali, że zarówno olanzapina, jak i klopapina (inny atypowy lek przeciwpsychotyczny) mogą zaburzyć pamięć warunkowaną strachem, a obserwowane deficyty są zależne od zastosowanej dawki (Inoue i wsp., 1996). Inne badania wskazują, że wielokrotne podania olanzapiny mogą skutkować w zaburzeniach pamięci i zanikaniu nabytego strachu (Milstein i wsp., 2013). Z kolei badania Ohya i współpracowników (Ohya i wsp., 2016) wskazują na brak efektu olanzapiny na czas bezruchu w teście warunkowania strachu.

W przeprowadzonym teście FMT również wielokrotne podania 1MeTIQ nie odwróciły efektu MK-801 (rys. 10 A; 10 B), natomiast w przypadku AFC, chroniczne iniekcje 1MeTIQ zwiększyły czas bezruchu (rys. 10 B). Istnieją dowody wskazujące na istotną rolę transmisji dopaminergicznej (Stubbendorff i Stevenson, 2020) oraz receptora D₂ w warunkowaniu strachu (de Vita i wsp., 2021) dlatego też chroniczne podania 1MeTIQ, jako związku modulującego transmisję dopaminergiczną, powinny wpływać na czas bezruchu w teście pamięci strachu. Z tego też powodu, do badań w kontekście warunkowania strachu, wybierane są takie związki jak bupropion (inhibitor wychwytu zwrotnego DA i NA) czy aripiprazol (częściowy agonista receptora D₂) (Portugal i Gould, 2007; Biojone i wsp., 2011).

5.2. Badania molekularne

5.2.1. Stres oksydacyjny

Coraz więcej danych wskazuje OS w patofizjologii schizofrenii (Murray i wsp., 2021), dlatego w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonano pomiary aktywności enzymów związanych z OS w wybranych strukturach mózgu (FCX, HIP). Eksperymenty z użyciem MK-801 wskazują na jego zdolność do generowania nasilonych procesów OS u gryzoni (Kovacic i Somanathan, 2010).

W obecnych badaniach, w FCX, wielokrotne podanie MK-801 spowodowało znamienne zwiększenie aktywności GPx, GR i SOD, natomiast wielokrotne iniekcje 1MeTIQ w dawce 50 mg/kg doprowadziły do zwiększenia aktywności GPx i SOD (rys. 27). W grupie łącznej, 1MeTIQ odwrócił efekt MK-801 i przywrócił aktywność enzymatyczną GR i SOD do poziomu kontrolnego w FCX. W HIP, obserwowano jedynie zwiększenie aktywności enzymatycznej GPx po podaniu MK-801 – aktywność pozostałych enzymów nie uległa istotnej zmianie po podaniu antagonisty receptora NMDA (rys. 28). Chroniczne podanie 1MeTIQ w obu badanych dawkach skutecznie odwróciło efekt MK-801 i przywróciło aktywność GPx do poziomu kontrolnego. W przypadku GR i SOD, wielokrotnie podania 1MeTIQ w dawce nasiliło aktywność wymienionych enzymów, natomiast nie zaobserwowano zmian w pozostałych grupach badawczych (rys. 28 C, D).

Dostępna literatura wskazuje na znacznie zaburzony system oksydacji – redukcji w schizofrenii, a mechanizm ten został wskazany jako potencjalny cel farmakoterapii tej choroby (Huhn i wsp., 2019). Dodatkowo zaburzenia procesów oksydacyjnych związane są z progresją choroby, która stymulowana może być przez wzrost poziomu ROS, obniżoną wydajność systemów antyoksydacyjnych organizmu bądź połączenie obu tych czynników (Buosi i wsp., 2021).

Enzymy związane z regulacją OS stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed szkodliwym działaniem ROS, utrzymując homeostazę pomiędzy układami oksydacji i redukcji. Zwiększony poziom aktywności enzymów związanych z OS może świadczyć o nasilonych reakcjach utleniania w badanej tkance i ekspozycji komórek na szkodliwe działanie ROS. Tym samym nasilona aktywność GPx, GR, SOD czy CAT może świadczyć o mobilizacji wewnętrznych systemów antyoksydacyjnych w warunkach nasilonych reakcji OS (Wąsik i wsp., 2021).

Dane literaturowe pokazują, że istotną rolę w procesach OS może pełnić transmisja regulowana przez receptory NMDA. Badania Bahrens i współpracowników (Behrens i wsp., 2007) wskazują, że utrata interneuronów GABA-ergiczných spowodowana antagonizmem receptora NMDA, może być modulowana przez zwiększoną generację ROS. Badania Ozyurt i współpracowników (Ozyurt i wsp., 2007) wskazują na zwiększone poziomy SOD i GPx po podaniu MK-801, przy jednoczesnym braku zmiany w poziomie aktywności CAT. Z kolei eksperymenty przeprowadzone przez Szaromę i współpracowników wskazują na istotnie obniżoną aktywność SOD, CAT i GPx po iniekcji MK-801 (Szaroma i wsp., 2014). Taka rozbieżność wyników może być spowodowana różnicą zastosowanych dawek MK-801 bądź ilością iniekcji.

Jeśli chodzi o wpływ MK-801 na procesy OS warto dodać, że istnieje wiele badań, w których MK-801 działa neuroprotekcyjnie (Sönmez i wsp., 2015), jednak jego działanie w dużej mierze zależne jest od badanego modelu oraz zastosowanej dawki.

W dostępnej literaturze istnieją również badania dowodzące roli OS w kognitywnych symptomach schizofrenii. Maas i współpracownicy (Maas i wsp., 2017) wskazali OS jako jeden z czynników zaburzających procesy mielinizacji w obszarach kory czołowej, prowadzi jednocześnie do deficytów kognitywnych obserwowanych w chorobie. Procesy OS obecne w interneuronach FCX mogą być także odpowiedzialne za zaburzone zachowania zwierząt w przedklinicznym modelu choroby (O'Donnell, 2012). Badania *post mortem* wykazały też zmniejszone stężenie GSH – głównej cząsteczki antyoksydacyjnej organizmu – w obszarach korowych pacjentów ze schizofrenią, wskazując na osłabiony mechanizm obronny przed procesami OS (Zhang i wsp., 2018). Warto dodać, że obniżony poziom GSH u osób ze schizofrenią jest korelowany z nasileniem objawów negatywnych (Matsuzawa i Hashimoto, 2011).

HIP jest strukturą bardzo podatną na patologiczne zmiany zachodzące w OUN, w tym OS (Huang i wsp., 2015). Badania pokazują, że utrata homeostazy w obrębie HIP może prowadzić do zaburzonych procesów neurogenezy, funkcjonalności dendrytów i procesów uczenia się, a tym samym zaburzeń w obrębie procesów kognitywnych (Huang i wsp., 2015). Badania na zwierzętach wykazały, że antagonizm receptora NMDA może prowadzić do nasilenia procesów oksydacyjnych w obszarach korowych oraz HIP (Wesseling i wsp., 2015). Z kolei badania *post mortem* z wykorzystaniem tkanki HIP pochodzącej od pacjentów ze schizofrenią wskazują na uszkodzenia DNA spowodowane nasilonym stresem oksydacyjnym w obrębie tej struktury (Nishioka i Arnold, 2004).

Jednym z wielu źródeł OS może być nasilony metabolizm DA, który prowadzi do powstania rodnika hydroksylowego (reakcja Fentona), jednego z najbardziej toksycznych wolnych rodników (Li i wsp., 2020). Poprzednie badania wykazały zdolność 1MeTIQ do hamowania generacji ROS powstałych wskutek katabolizmu DA, poprzez przestrojenie jej katabolizmu z drogi utleniania zależnej od MAO na drogę O-metylacji zależnej od COMT (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2006). Niemniej jednak w przedstawionych wynikach, wielokrotna dawka (7x) 1MeTIQ zwiększyła aktywność GPx, GR i SOD w strukturach FCX i HIP (rys. 27; 28), sugerując ekspozycję tkanki na procesy OS. Zaistniały efekt może być efektem wydłużonego czasu ekspozycji receptorów NMDA na wysoką dawkę związku hamującego jego działanie.

Kolejnym źródłem OS w tkance mózgowej może być chroniczna hipofunkcja receptorów NMDA, która prowadzi do zaburzeń w obrębie transmisji glutaminianergicznej, prowadząc do nadmiernego stężenia GLU w obszarach korowych (Cieślik i wsp., 2019) i HIP (Genius i wsp., 2013). Wyraźnie zwiększony napływ GLU związany jest z ekscytotoksycznym działaniem tego neuroprzekaźnika, co może skutkować uszkodzeniami OUN spowodowanymi procesami OS (Parfenova i wsp., 2006). Poprzednie badania *in vitro* z zastosowaniem 1MeTIQ wskazują na jego zdolność do przeciwdziałania śmierci komórek spowodowanej ekscytotoksycznym działaniem glutaminianu (Kuszczyk i wsp., 2010; Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2006). Neuroprotekcyjny efekt 1MeTIQ był obserwowany nawet wtedy, gdy 1MeTIQ był dodany do hodowli komórkowej 3 godziny po dodaniu glutaminianu (Kuszczyk i wsp., 2010), co świadczy o zdolności tej substancji do odwrócenia negatywnych skutków zaistniałych już procesów ekscytotoksyczności w komórkach.

W naszych badaniach biochemicznych *ex vivo* wykazano – podobnie jak w eksperymencie mikrodializy *in vivo* – prooksydacyjne działanie olanzapiny. Olanzapina podana zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z antagonistą receptora NMDA, istotnie zwiększyła poziom DOPAC oraz HVA (rys. 15), co jest wynikiem nasilonego procesu oksydacji DA i skutkuje zwiększoną produkcją wolnych rodników oraz indukcją procesów OS, a tym samym może prowadzić do uszkodzeń komórek nerwowych (tab. 1; 7). Efekt ten był obserwowany we wszystkich badanych strukturach. Badania przedkliniczne wskazują, że podania olanzapiny przez 4 tygodnie regulują ekspresję enzymów takich jak MAO-A, MAO-B czy COMT (Chen i Chen, 2007). Dodatkowo, olanzapina, podobnie jak 1MeTIQ, skutecznie zablokowała efekt ketaminy pod względem znacznie zwiększonego uwalniania NA w eksperymencie mikrodializy *in vivo* (rys. 16). Interesującym jest fakt, że w badaniach innych autorów podanie olanzapiny powoduje raczej aktywację neuronów noradrenergicznych i zwiększenie

poziomu uwalnianej NA (Zhang i wsp., 2000), natomiast Lahti i współpracownicy (Lahti i wsp., 1999) nie wykazali wpływu podania olanzapiny na psychomimetyczne zmiany wywołane ketaminą.

5.2.2. Interleukiny

Wiele współczesnych badań dostępnych w literaturze przedstawia rolę stanu zapalnego jako istotną (bądź nawet kluczową) w patogenezie schizofrenii (Müller, 2018; Williams i wsp., 2022), tym samym poszukując nowych terapii wśród leków o właściwościach przeciwzapalnych.

W przedstawionej analizie poziomu cytokin w wybranych strukturach mózgu zaobserwowano obniżenie poziomu IL-1 β w FCX po wielokrotnych iniekcjach MK-801, natomiast podania 1MeTIQ w obu badanych dawkach (25 i 50 mg/kg) odwróciły ten efekt i przywróciły poziom IL-1 β do poziomu kontrolnego (rys. 29 D). Spadek poziomu IL-1 β i IL-6 po podaniach MK-801 był także obserwowany w STR (rys. 31).

Dostępne w literaturze badania wskazują na zdolność antagonistów receptora NMDA do indukcji odpowiedzi zapalnej poprzez zwiększenie poziomów cytokin prozapalnych. Wang i współpracownicy (Wang i wsp., 2021) wykazali zwiększenie poziomów mRNA cytokin takich jak IL-6, TNF- α oraz IL-1 β w zwierzęcym modelu schizofrenii indukowanym PCP. Podobne wyniki uzyskano stosując ketaminę jako zwierzęcy model choroby (Li i wsp., 2017). Jednakże badania przeprowadzone przez Réus i współpracowników nie wykazały istotnych zmian poziomów IL-1 β , IL-6 i TNF- α w różnych strukturach mózgu po kilkukrotnych podaniach ketaminy (Réus i wsp., 2016). Xiao i współpracownicy (Xiao i wsp., 2019) wykazali natomiast znaczny wzrost poziomu aktywacji mikrogleju oraz zwiększenie poziomu IL-6 i IL-1 β po 7-krotnych podaniach MK-801 w hipokampie myszy. Co ciekawe, Amani i współpracownicy (Amani i wsp., 2019) wykazali natomiast brak zmiany poziomów cytokin prozapalnych takich jak IL-6, IL-1 β i TNF- α po podaniach MK-801 do struktury hipokampa. Niemniej jednak wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują na przeciwzapalne działanie antagonisty receptora NMDA jakim jest MK-801, wyrażone poprzez obniżenie poziomów IL-6 i IL-1 β w strukturach takich jak FCX czy STR (rys. 29; 31). Niektóre z badań dostępnych w literaturze wykazały przeciwzapalne działanie MK-801. W badaniach zespołu Wong (Liu i wsp., 2011) zaobserwowano przeciwzapalne działanie dooponowego podania MK-801, poprzez zmniejszenie poziomu cytokin

prozapalnych takich jak IL-6, TNF-alfa czy IL-1 β u zwierząt z rozwiniętą tolerancją na morfinę.

Tak rozbieżne wyniki badań mogą być spowodowane różnicą w zastosowanych dawkach leku, sposobem podania lub ilością iniekcji związku. Niemniej jednak określenie efektu MK-801 jako pro- lub przeciwzapalnego wymaga dalszych badań.

W przeprowadzonej analizie poziomu cytokin zweryfikowano również wpływ wielokrotnych podań MK-801 i 1MeTIQ na poziom cytokiny przeciwzapalnej jaką jest IL-10. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego wpływu MK-801 na poziom tej interleukiny we wszystkich analizowanych strukturach (rys. 29 D; 30 D; 31 D), natomiast łączne podania 1MeTIQ (50 mg/kg) oraz MK-801 spowodowały wzrost stężenia IL-10 w HIP (rys. 30 D) oraz spadek poziomu IL-10 w STR (rys. 32 D). Simma i współpracownicy (Simma i wsp., 2014) wykazali, że blokada receptora NMDA może doprowadzić do wzmożonej ekspresji IL-10, co potwierdza otrzymany wynik w strukturze HIP. Obniżenie stężenia IL-10 w STR może być efektem addytywnego antagonistycznego działania obu związków wobec receptora NMDA, a tym samym zaburzać mechanizmy przeciwzapalne w obrębie tkanki mózgowej.

5.2.3. Badania cytotoksyczne *in vitro*

Pacjenci ze schizofrenią wykazują dysfunkcje sieci neuronalnych w różnych strukturach mózgu, jak np. FCX, HIP czy w strukturach podkorowych (Kuppberg i Heckers, 2000). Nasilone procesy apoptozy zmniejszają przeżywalność zarówno komórek nerwowych, jak i glejowych na różnych etapach rozwoju układu nerwowego, co może prowadzić do deficytów funkcjonalnych synaps (Glantz i wsp., 2006), czy utraty komórek nerwowych (Csernansky i wsp., 2006) obserwowanych m. in. w schizofrenii, dlatego też sugeruje się wpływ procesów apoptotycznych na patofizjologię choroby (Jarskog i wsp., 2004).

Jednym z charakterystycznych objawów śmierci komórek w wyniku apoptozy jest zwiększenie ilości jąder pyknotycznych (zmiany w chromatynie jądrowej), co jest efektem kondensacji chromatyny w jądrach komórkowych (Hou i wsp., 2016). W przedstawionych badaniach *in vitro*, 200 μ M stężenie MK-801 spowodowało znaczne zwiększenie ilości jąder pyknotycznych w hodowli komórkowej (rys. 32). W przeprowadzonym eksperymencie inkubacja komórek z 1MeTIQ (w stężeniach 100 i 250 μ M) częściowo odwróciła efekt

MK-801 i obniżyła liczbę komórek pyknotycznych, natomiast ich poziom wciąż był zwiększony w stosunku do grupy kontrolnej (rys. 32 A).

Poprzednie badania wskazują na toksyczne działanie MK-801 na komórki, obserwowane przez zwiększenie liczby apoptotycznych jąder komórkowych (Manning i wsp., 2011). W badaniach zespołu Ohyashiki (Takadera i wsp., 2002) wykazano dawkozależne działanie MK-801 w hodowli komórkowej na nasilenie procesów apoptozy komórek, a śmierć komórek obserwowana była już w stężeniach 0.001 μ M MK-801. Wykazali oni także nasilone procesy apoptozy (charakteryzowane przez skurczenie komórek, kondensację i fragmentaryzację jąder komórkowych oraz fragmentację DNA) po inkubacji komórek z innym antagonistą receptora NMDA – ifenprodilem (Takadera i wsp., 2004). Dawkozależne działanie antagonistów NMDA na procesy apoptozy, skorelowane jest z poziomem aktywacji kaspazy-3 (Takadera i wsp., 2004), która jest głównym mediatorem procesów apoptotycznych w komórkach nerwowych (D’Amelio i wsp., 2010). Badania dostępne w literaturze wskazują na aktywację kaspazy – 3 przez MK-801 (Turner i wsp., 2009).

Prawdopodobnym mechanizmem proapoptotycznego działania hipofunkcji receptora NMDA jest aktywacja właśnie kaspazy-3 (Takadera i wsp., 1999). Blokada receptora NMDA prowadzi do aktywacji enzymów proteolitycznych (m. in. kaspazy-3 w hipokampalnych hodowlach komórkowych (Hardingham i wsp., 2002). Co ciekawe, za inicjację procesów apoptotycznych odpowiadają receptory NMDA umiejscowione poza synapsą, co odróżnia je od receptorów synaptycznych, które wykazują działanie protekcyjne wobec neuronów (Hardingham i wsp., 2002).

W obecnych badaniach *in vitro* zbadano także wpływ 1MeTIQ (w stężeniach 50, 100 i 500 μ M) na żywotność komórek w hodowli (rys. 34 A). Analiza nie wykazała wpływu inkubacji komórek z 1MeTIQ w każdym z analizowanych stężeń, wskazując na brak toksycznego działania 1MeTIQ (rys. 34 A). Inkubacja komórek z MK-801 spowodowała tendencję do spadku ich żywotności, jednak zmiana ta nie była istotna statystycznie (rys. 34 B). Analiza wpływu inkubacji pierwotnych hodowli komórkowych neuronów z uwzględnieniem różnego czasu inkubacji i różnych dawek MK-801 wykazała jednak spadek żywotności komórek po 24 i 48 godzinach dla dawek MK-801 100 i 200 μ M (rys. 33 A). Łączna inkubacja komórek z 1MeTIQ i MK-801 spowodowała zwiększenie ich żywotności, przywracając analizowany parametr do wartości z grupy kontrolnej (rys. 34 B).

1MeTIQ, podobnie jak MK-801, wykazuje działanie antagonistyczne wobec receptora NMDA, jednak łączy się on z miejscem glicynowym receptora, w przeciwieństwie do MK-801, który bezpośrednio blokuje jego kanał. W dodatku wiązanie 1MeTIQ do receptora

NMDA jest 1000-krotnie słabsze niż wiązanie MK-801. Fakt ten może tłumaczyć brak toksycznego efektu 1MeTIQ wobec komórek nerwowych, w przeciwieństwie do MK-801. Podobny efekt uzyskano w badaniach Ding i współpracowników (Ding i wsp., 2017), gdzie MK-801 wykazało dawkozależny efekt i obniżyło żywotność hipokampalnych komórek macierzystych. Zespół Zhu (Yu i wsp., 2021) wykazał natomiast zwiększenie żywotności komórek astrocytarnych hipokampa po inkubacji z 20 μ M MK-801, wskazując na protekcyjne działanie MK-801 w niższych dawkach. Rzeczywiście, MK-801 jest jednym ze związków szeroko badanych pod kątem neuroprotekcji np. w modelach hipoksji *in vitro*, gdzie stosowany w niższych dawkach wykazuje działanie ochronnie wobec neuronów (Słomka i wsp., 2014).

Istnieją także badania dotyczące wpływu olanzapiny na żywotność komórek w hodowlach *in vitro*. He i współpracownicy (He i wsp., 2021) wykazali, że inkubacja astrocytów przez 24 lub 48 godzin z olanzapiną zwiększa ich żywotność, natomiast wydłużenie czasu inkubacji do 72 godzin istotnie obniża wspomniany parametr i zwiększa cytotoksyczność. W tym samym eksperymencie wykazano, że inkubacja komórek PC12 z olanzapiną przez 48 lub 72 godziny znacznie zmniejsza ich żywotność, powtórnie wskazując na działanie cytotoksyczne związku (He i wsp., 2021).

Kolejnym istotnym wskaźnikiem śmierci komórkowej na skutek apoptozy bądź nekrozy jest wydzielanie dehydrogenazy mleczanowej (LDH). LDH jest enzymem cytozolowym, wydzielanym do medium hodowli komórkowej wskutek uszkodzenia błon komórkowych (Cox i wsp., 2021) i służy do pomiaru procesów śmierci komórkowych. Inkubacja komórek z 1MeTIQ (w stężeniach 50, 100 i 500 μ M) nie zmieniła poziomu uwalniania LDH do medium komórkowego, co podobnie jak w przypadku żywotności komórek, świadczy o braku toksycznego efektu 1MeTIQ (rys. 34 C). W przypadku inkubacji komórek z MK-801 (200 μ M) zaobserwowano znacznie zwiększone uwalnianie LDH (rys. 34 D). Przeprowadzone badania wykazały, że 1MeTIQ w stężeniu 50 oraz 100 μ M jest w stanie odwrócić toksyczny efekt MK-801 i przywrócić poziom wydzielanego LDH do wartości kontrolnej (rys. 34 D).

Interesującym jest fakt, że niewiele poprzednich badań wskazuje na wzmożone wydzielanie LDH po inkubacji komórek z MK-801. Zespół Johnson (Lei i wsp., 2007) wskazuje na cytotoksyczne działanie PCP w badaniach *in vitro*, natomiast Bosnjak i współpracownicy (Bosnjak i wsp., 2013) wykazali dawkozależne, toksyczne działanie ketaminy w hodowli ludzkich komórek nerwowych.

Większość badań dostępnych w obecnej literaturze wskazuje na neuroprotektoryjne działanie MK-801 w modelach cytotoxyczności *in vitro*. Badania Iizuki i współpracowników (Iizuka i wsp., 2010) wskazują na ochronne działanie antagonisty receptora NMDA w dawkach 1-100 μ M w modelu cytotoxyczności indukowanym H_2O_2 , natomiast badania Zhao i współpracowników (Zhao i wsp., 2000) wykazały działanie protekcyjne MK-801 (w dawkach 10 – 500 μ M) w modelu ekscytotoxycznego działania GLU *in vitro*. Powyższe rozbieżności w uzyskanych wynikach w badaniach związanych z uwalnianiem LDH po inkubacji z MK-801 mogą być spowodowane różnym typem hodowli komórkowych (a tym samym różnym typem komórek nerwowych oraz obecnością komórek glejowych w hodowli) oraz zastosowanym modelem badawczym.

Podsumowując przeprowadzone badania w ramach niniejszej pracy doktorskiej, można wskazać na cytotoxyczne działanie antagonisty receptora NMDA jakim jest MK-801 w hodowli komórek nerwowych. Wykazano, że 1MeTIQ częściowo odwraca efekt MK-801 (rys. 34 B, D), co można przypisać właściwościom modulującym 1MeTIQ wobec receptora NMDA. Dodatkowo wcześniejsze badania wykazały zdolność 1MeTIQ do hamowania wiązania radioaktywnego [3H]MK-801 do wyizolowanych błon komórkowych mózgu (Antkiewicz-Michaluk i wsp., 2006). Wydaje się, że ten antagonistyczny mechanizm działania 1MeTIQ w stosunku do MK-801 mógłby być odpowiedzialny za niwelowanie jego cytotoxycznego efektu na komórki nerwowe mózgu.

6. PODSUMOWANIE

- 1MeTIQ częściowo odwraca efekty antagonisty receptora NMDA w zwierzęcym modelu schizofrenii niwelując zachowania lękowe oraz zaburzenia pamięci w testach behawioralnych, wykazując działanie podobne do olanzapiny;
- 1MeTIQ nie odwraca efektów MK-801 w testach interakcji socjalnych oraz pamięci warunkowanej strachem;
- w badaniach biochemicznych *ex vivo* oraz mikrodializy *in vivo* 1MeTIQ wykazuje silny wpływ na metabolizm monoamin oraz na poziom uwalnianego GLU;
- olanzapina wykazuje silne działanie prooksydacyjne poprzez nasilenie procesów oksydacji DA;
- podania 1MeTIQ częściowo odwracają efekt MK-801 i niwelują stres oksydacyjny powodując zmiany aktywności enzymów oksydacyjnych
- 1MeTIQ w połączeniu z antagonistą receptora NMDA może zwiększać poziomy prozapalnych cytokin w tkance mózgowej;
- w badaniach *in vitro* 1MeTIQ hamuje toksyczne działanie indukowane przez MK-801.

7. WNIOSKI

- Szeroki wachlarz przeprowadzonych badań behawioralnych wskazuje na przeciwłękowe i przeciwpsychotyczne działanie 1MeTIQ, analizowane w zwierzęcych modelach schizofrenii.
- Mechanizmem, który mógłby być odpowiedzialny za obserwowane efekty 1MeTIQ jest jego znaczący wpływ na transmisję monoaminergiczną i glutaminianergiczną oraz istotne działanie neuroprotekcyjne, związane z redukcją stresu oksydacyjnego.

8. WYKAZ UŻYTYCH SKRÓTÓW

1MeTIQ – 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina

3-MT – 3-metoksytyramina

5- HIAA – kwas 5-hydroksyindolooctowy

5-HT – serotonina

A/P – anterior/posterior

AFC – warunkowanie strachu bodźcem dźwiękowym

AMPA – receptor kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego

CAT – katalaza

CFC – warunkowanie strachu kontekstem

COMT - katecholo-O-metylotransferaza

CRP – białko C reaktywne

CSF – płyn mózgowo – rdzeniowy

CX – kora mózgowa

D₂R – receptor dopaminowy typu 2

DA – dopamina

DDT – dichlorodifenylotrichloroetan

DLPFC – grzbietowo-boczna kora przedczołowa

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy

EDTA – kwas wersenowy

EPM – test podniesionego labiryntu krzyżowego

FC – warunkowanie strachu

FCX – kora czołowa

FGA – leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji

FMT – test pamięci strachu

FO – znany obiekt

FST – test wymuszonego pływania

GABA - kwas gamma-aminomasłowy

GLU –glutaminian

GPx – peroksydaza glutationowa

GR – reduktaza glutationowa

GSH – glutation
HIP – hipokamp
HPLC-ED – wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną
HTH – podwzgórze
HVA – kwas homowanilinowy
i.m. – domięśniowy (*intramuscular*)
i.p. – dootrzewnowo (*intraperitoneal*)
IL-10 – interleukina-10
IL-1 β – interleukina-1 β
IL-4 – interleukina-4
IL-6 – interleukina-6
KET – ketamina
L/M – lateral/medial
LDH – dehydrogenaza mleczanowa
L-DOPA – lewodopa
MAO – monoaminooksydaza
MDA - dialdehyd malonowy
mGLU – metabotropowy receptor glutaminianowy
MIA – matczyzna aktywacja immunologiczna
MK-801 – dizocylpina
mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy
MTT – bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenyлотetrazoliowy
NA – noradrenalina
NAc – jądro półleżące przegrody
NAC – N-acetylocysteina
NM – normetanefryna
NMDAR – receptor N-metylo-D-asparaginowy
NO – nowy obiekt
NORT – test rozpoznawania nowego obiektu
OLA – olanzapina
OS – stres oksydacyjny
OUN – ośrodkowy układ nerwowy
PCP – fencyklidyna
PD – choroba Parkinson’a

PEA - 2-fenyletyloamina
PFC – kora przedczołowa
PPI – bramkowanie sensomotoryczne
PV – parwalbumina
ROS – reaktywne formy tlenu
s.c. – podskórny (*subcutaneous*)
SGA – leki przeciwpsychotyczne drugiej generacji
SIT – test interakcji socjalnych
SN – istota czarna
SNpc – część zbita istoty czarnej
SOD – dysmutaza nadtlenkowa
STR – prążkowie
TIQ – tetrahydroizochinolina
TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α
V/D – ventral/dorsal
VTA – pole brzuszne nakrywki

9. LITERATURA

- Abbott, C. C., Jaramillo, A., Wilcox, C. E., & Hamilton, D. A. (2013). Antipsychotic drug effects in schizophrenia: a review of longitudinal fMRI investigations and neural interpretations. *Current Medicinal Chemistry*, **20**(3), 428–437.
- Abi-Dargham, A., Rodenhiser, J., Printz, D., Zea-Ponce, Y., Gil, R., Kegeles, L. S., Weiss, R., Cooper, T. B., Mann, J. J., Van Heertum, R. L., Gorman, J. M., & Laruelle, M. (2000). Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(14), 8104-8109.
- Absi, E., Parrado, J., Ayala, A., & Machado, A. (2002). Decrease of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline synthesizing enzyme activity in the brain areas of aged rat. *Brain Research*, **955**(1-2), 161–163.
- Adell A. (2020). Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression. *Biomolecules*, **10**(6), 947.
- Aizenman, E., White, W. F., Loring, R. H., & Rosenberg, P. A. (1990). A 3,4-dihydroxyphenylalanine oxidation product is a non-N-methyl-D-aspartate glutamatergic agonist in rat cortical neurons. *Neuroscience Letters*, **116**(1-2), 168–171.
- Amani, M., Zolghadrnasab, M., & Salari, A. A. (2019). NMDA receptor in the hippocampus alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiology & Behavior*, **202**, 52–61.
- Angelucci, F., Aloe, L., Iannitelli, A., Gruber, S. H., & Mathé, A. A. (2005). Effect of chronic olanzapine treatment on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *European Neuropsychopharmacology : the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **15**(3), 311–317.
- Anthony, E. W., & Nevins, M. E. (1993). Anxiolytic-like effects of N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor ligands in the rat potentiated startle test. *European Journal of Pharmacology*, **250**(2), 317–324.
- Antkiewicz-Michaluk, L., Filip, M., Michaluk, J., Romańska, I., Przeglasiński, E., & Vetulani, J. (2007). An endogenous neuroprotectant substance, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1MeTIQ), prevents the behavioral and neurochemical effects

of cocaine reinstatement in drug-dependent rats. *Journal of Neural Transmission* (Vienna, Austria: 1996), **114**(3), 307–317.

- Antkiewicz-Michaluk, L., Lazarewicz, J. W., Patsenka, A., Kajta, M., Zieminska, E., Salinska, E., Wasik, A., Golembiowska, K., & Vetulani, J. (2006). The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: the importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, **97**(3), 846–856.
- Antkiewicz-Michaluk, L., Michaluk, J., Mokrosz, M., Romanska, I., Lorenc-Koci, E., Ohta, S., & Vetulani, J. (2001). Different action on dopamine catabolic pathways of two endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines with similar antidopaminergic properties. *Journal of Neurochemistry*, **78**(1), 100–108.
- Antkiewicz-Michaluk, L., Ossowska, K., Romańska, I., Michaluk, J., & Vetulani, J. (2008). 3-Methoxytyramine, an extraneuronal dopamine metabolite plays a physiological role in the brain as an inhibitory regulator of catecholaminergic activity. *European Journal of Pharmacology*, **599**(1-3), 32–35.
- Antkiewicz-Michaluk, L., Wąsik, A., & Michaluk, J. (2014). 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine with unexpected mechanism of action: new vistas of therapeutic application. *Neurotoxicity Research*, **25**(1), 1–12.
- Arana G. W. (2000). An overview of side effects caused by typical antipsychotics. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **61 Suppl 8**, 5–13.
- Arnsten A. F. (1997). Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. *Journal of Psychopharmacology* (Oxford, England), **11**(2), 151–162.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**, 360438.
- Ayala, A., Parrado, J., Cano, J., & Machado, A. (1994). Reduction of 1-methyl 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline level in substantia nigra of the aged rat. *Brain Research*, **638**(1-2), 334–336.
- Bae, H. J., Bae, H. J., Kim, J. Y., Park, K., Yang, X., Jung, S. Y., Park, S. J., Kim, D. H., Shin, C. Y., & Ryu, J. H. (2023). The effect of lansoprazole on MK-801-induced schizophrenia-like behaviors in mice. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **120**, 110646.

- Balschun, D., Wetzel, W., Del Rey, A., Pitossi, F., Schneider, H., Zuschratter, W., & Besedovsky, H. O. (2004). Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **18(14)**, 1788–1790.
- Ban T. A. (2007). Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **3(4)**, 495–500.
- Banerjee, A., Wang, H. Y., Borgmann-Winter, K. E., MacDonald, M. L., Kaprielian, H., Stucky, A., Kvasic, J., Egbujo, C., Ray, R., Talbot, K., Hemby, S. E., Siegel, S. J., Arnold, S. E., Sleiman, P., Chang, X., Hakonarson, H., Gur, R. E., & Hahn, C. G. (2015). Src kinase as a mediator of convergent molecular abnormalities leading to NMDAR hypoactivity in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, **20(9)**, 1091–1100.
- Barichello, T., Simoes, L. R., Quevedo, J., & Zhang, X. Y. (2020). Microglial Activation and Psychotic Disorders: Evidence from Pre-clinical and Clinical Studies. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, **44**, 161–205.
- Barkus, C., McHugh, S. B., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N., & Bannerman, D. M. (2010). Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *European Journal of Pharmacology*, **626(1)**, 49–56.
- Baxter, P. S., & Hardingham, G. E. (2016). Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, **100**, 147–152.
- Baxter, P. S., Bell, K. F., Hasel, P., Kaindl, A. M., Fricker, M., Thomson, D., Cregan, S. P., Gillingwater, T. H., & Hardingham, G. E. (2015). Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. *Nature Communications*, **6**, 6761.
- Becker H. (1997). Psychotische Erscheinungsbilder als Erstmanifestation einer multiplen Sklerose? (MS) [Psychotic symptoms as the initial manifestation of multiple sclerosis?] *Psychiatrische Praxis*, **24(2)**, 69–72.
- Behrens, M. M., Ali, S. S., Dao, D. N., Lucero, J., Shekhtman, G., Quick, K. L., & Dugan, L. L. (2007). Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. *Science (New York, N.Y.)*, **318(5856)**, 1645–1647.
- Białoń, M., & Wąsik, A. (2022). Advantages and Limitations of Animal Schizophrenia Models. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 5968.

- Białoń, M., Chocyk, A., Majcher-Maślanka, I., Żarnowska, M., Michalski, K., Antkiewicz-Michaluk, L. & Wąsik, A. (2021). 1MeTIQ and olanzapine, despite their neurochemical impact, did not ameliorate performance in fear conditioning and social interaction tests in an MK-801 rat model of schizophrenia. *Pharmacological Reports*, **73**(2), 490-505.
- Białoń, M., Żarnowska, M., Antkiewicz-Michaluk, L., & Wąsik, A. (2020). Pro-cognitive effect of 1MeTIQ on recognition memory in the ketamine model of schizophrenia in rats: the behavioural and neurochemical effects. *Psychopharmacology*, **237**(6), 1577–1593.
- Biojone, C., Casarotto, P. C., Resstel, L. B., Zangrossi, H., Jr, Guimarães, F. S., & Moreira, F. A. (2011). Anti-aversive effects of the atypical antipsychotic, aripiprazole, in animal models of anxiety. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, **25**(6), 801–807.
- Black, C. N., Bot, M., Scheffer, P. G., Cuijpers, P., & Penninx, B. W. (2015). Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, **51**, 164–175.
- Bókkon, I., & Antal, I. (2011). Schizophrenia: redox regulation and volume neurotransmission. *Current Neuropharmacology*, **9**(2), 289–300.
- Boksa P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity*, **24**(6), 881–897.
- Bora, E., Akdede, B. B., & Alptekin, K. (2017). The relationship between cognitive impairment in schizophrenia and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Psychological Medicine*, **47**(6), 1030–1040.
- Borovcanin, M. M., Jovanovic, I., Radosavljevic, G., Pantic, J., Minic Janicijevic, S., Arsenijevic, N., & Lukic, M. L. (2017). Interleukin-6 in Schizophrenia-Is There a Therapeutic Relevance? *Frontiers in Psychiatry*, **8**, 221.
- Bošković, M., Vovk, T., Kores Plesničar, B., & Grabnar, I. (2011). Oxidative stress in schizophrenia. *Current Neuropharmacology*, **9**(2), 301–312.
- Bosnjak, Z. J., Yan, Y., Canfield, S., Muravyeva, M. Y., Kikuchi, C., Wells, C. W., Corbett, J. A., & Bai, X. (2012). Ketamine induces toxicity in human neurons differentiated from embryonic stem cells via mitochondrial apoptosis pathway. *Current Drug Safety*, **7**(2), 106–119.

- Boultradakis, A., & Pitsikas, N. (2011). Anesthetic ketamine impairs rats' recall of previous information: the nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methylester antagonizes this ketamine-induced recognition memory deficit. *Anesthesiology*, **114**(6), 1345–1353.
- Brisch, R., Saniotis, A., Wolf, R., Biellau, H., Bernstein, H. G., Steiner, J., Bogerts, B., Braun, K., Jankowski, Z., Kumaratilake, J., Henneberg, M., & Gos, T. (2014). The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Frontiers in Psychiatry*, **5**, 47.
- Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *The American Journal of Psychiatry*, **167**(3), 261–280.
- Bulubas, L., Goerigk, S., Gomes, J. S., Brem, A. K., Carvalho, J. B., Pinto, B. S., Elkis, H., Gattaz, W. F., Padberg, F., Brunoni, A. R., & Valiengo, L. (2021). Cognitive outcomes after tDCS in schizophrenia patients with prominent negative symptoms: Results from the placebo-controlled STARTS trial. *Schizophrenia Research*, **235**, 44-51.
- Buonocore, M., Bosia, M., Baraldi, M. A., Bechi, M., Spangaro, M., Cocchi, F., Bianchi, L., Guglielmino, C., Mastromatteo, A. R., & Cavallaro, R. (2018). Exploring anxiety in schizophrenia: New light on a hidden figure. *Psychiatry Research*, **268**, 312–316.
- Buosi, P., Borghi, F. A., Lopes, A. M., Facincani, I. D. S., Fernandes-Ferreira, R., Oliveira-Brancati, C. I. F., do Carmo, T. S., Souza, D. R. S., da Silva, D. G. H., de Almeida, E. A., & de Araújo Filho, G. M. (2021). Oxidative stress biomarkers in treatment-responsive and treatment-resistant schizophrenia patients. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, **43**(4), 278–285.
- Bymaster, F. P., Calligaro, D. O., Falcone, J. F., Marsh, R. D., Moore, N. A., Tye, N. C., Seeman, P., & Wong, D. T. (1996). Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **14**(2), 87–96.
- Cabungcal, J. H., Nicolas, D., Kraftsik, R., Cuénod, M., Do, K. Q., & Hornung, J. P. (2006). Glutathione deficit during development induces anomalies in the rat anterior cingulate GABAergic neurons: Relevance to schizophrenia. *Neurobiology of Disease*, **22**(3), 624–637.

- Carbon, M., & Correll, C. (2014). Thinking and acting beyond the positive: The role of the cognitive and negative symptoms in schizophrenia. *CNS Spectrums*, **19**(S1), 35-53.
- Carlsson, A., & Lindqvist, M. (1963). Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacologica et Toxicologica (Copenhagen)*, **20**, 140-144.
- Catts, V. S., Lai, Y. L., Weickert, C. S., Weickert, T. W., & Catts, S. V. (2016). A quantitative review of the postmortem evidence for decreased cortical N-methyl-D-aspartate receptor expression levels in schizophrenia: How can we link molecular abnormalities to mismatch negativity deficits? *Biological psychology*, **116**, 57–67.
- Celada, P., Puig, M. V., & Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, **7**, 25.
- Chase, K. A., Cone, J. J., Rosen, C., & Sharma, R. P. (2016). The value of interleukin 6 as a peripheral diagnostic marker in schizophrenia. *BMC Psychiatry*, **16**, 152.
- Chee, M. J., Douris, N., Forrow, A. B., Monnard, A., Lu, S., Flaherty, S. E., 3rd, Adams, A. C., & Maratos-Flier, E. (2015). Melanin-concentrating hormone is necessary for olanzapine-inhibited locomotor activity in male mice. *European Neuropsychopharmacology : the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **25**(10), 1808–1816.
- Chen, A. T., Chibnall, J. T., & Nasrallah, H. A. (2016). Placebo-controlled augmentation trials of the antioxidant NAC in schizophrenia: A review. *Annals of Clinical Psychiatry : Official Journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists*, **28**(3), 190–196.
- Chen, L., Li, X. S., Zheng, G. E., Xie, G. J., & Cheng, Y. (2020). Peripheral blood BDNF-TrkB signaling in first-episode, drug-free patients with major depressive disorder and schizophrenia. *Neuroscience Letters*, **714**, 134618.
- Chen, M. L., & Chen, C. H. (2007). Chronic antipsychotics treatment regulates MAOA, MAOB and COMT gene expression in rat frontal cortex. *Journal of Psychiatric Research*, **41**(1-2), 57–62.
- Chen, Y. M, Lin, C. H., & Lane, H. Y. (2022). Distinctively lower DISC1 mRNA levels in patients with schizophrenia, especially in those with higher positive, negative, and depressive symptoms. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **213**, 173335.

- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, **30**(2), 271–281.
- Chiveri, L., Sciacco, M., & Prella, A. (2003). Schizophreniform disorder with cerebrospinal fluid PCR positivity for herpes simplex virus type 1. *European Neurology*, **50**(3), 182–183.
- Chokhawala, K., & Stevens, L. (2022). Antipsychotic Medications. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Chowdari, K. V., Bamne, M. N., & Nimgaonkar, V. L. (2011). Genetic association studies of antioxidant pathway genes and schizophrenia. *Antioxidants & Redox Signaling*, **15**(7), 2037–2045.
- Chumakov, E., Dorofeikova, M., Tsyrenova, K., & Petrova, N. (2022). A Cross-Sectional Study on Associations Between BDNF, CRP, IL-6 and Clinical Symptoms, Cognitive and Personal Performance in Patients With Paranoid Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, **13**, 943869.
- Cieřlik, P., Radulska, A., Pelikant-Maęcka, I., Płoska, A., Kalinowski, L., & Wierońska, J. M. (2019). Reversal of MK-801-Induced Disruptions in Social Interactions and Working Memory with Simultaneous Administration of LY487379 and VU152100 in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(11), 2781.
- Cortese, B. M., & Phan, K. L. (2005). The Role of Glutamate in Anxiety and Related Disorders. *CNS Spectrums*, **10**(10), 820–830.
- Cowen, P., & Sherwood, A. C. (2013). The role of serotonin in cognitive function: evidence from recent studies and implications for understanding depression. *Journal of Ppsychopharmacology (Oxford, England)*, **27**(7), 575–583.
- Cox, M. C., Mendes, R., Silva, F., Mendes, T. F., Zelaya-Lazo, A., Halwachs, K., Purkal, J. J., Isidro, I. A., Félix, A., Boghaert, E. R., & Brito, C. (2021). Application of LDH assay for therapeutic efficacy evaluation of ex vivo tumor models. *Scientific Reports*, **11**(1), 18571.
- Coyle, J. T., & Balu, D. T. (2018). The Role of Serine Racemase in the Pathophysiology of Brain Disorders. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, **82**, 35–56.
- Crapanzano, C., Casolaro, I., Damiani, S., & Amendola, C. (2022). Efficacy of Olanzapine in Anxiety Dimension of Schizophrenia: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience : the*

Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology, **20(4)**, 592–599.

- Csernansky, J. G., Martin, M. V., Czeisler, B., Meltzer, M. A., Ali, Z., & Dong, H. (2006). Neuroprotective effects of olanzapine in a rat model of neurodevelopmental injury. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **83(2)**, 208–213.
- Csernansky, J. G., Martin, M., Shah, R., Bertchume, A., Colvin, J., & Dong, H. (2005). Cholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits induced by MK-801 in mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **30(12)**, 2135–2143.
- da Silva Araújo, T., Maia Chaves Filho, A. J., Monte, A.S., Isabelle de Góis Queiroz, A., Cordeiro, R. C., de Jesus Souza Machado, M., de Freitas Lima, R., Freitas de Lucena, D., Maes, M., & Macêdo, D. (2017). Reversal of schizophrenia-like symptoms and immune alterations in mice by immunomodulatory drugs. *Journal of Psychiatric Research*, **84**, 49–58.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death and Differentiation*, **17(7)**, 1104–1114.
- Dantsuji, M., Nakamura, S., Nakayama, K., Mochizuki, A., Park, S. K., Bae, Y. C., Ozeki, M., & Inoue, T. (2019). 5-HT_{2A} receptor activation enhances NMDA receptor-mediated glutamate responses through Src kinase in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons. *The Journal of Physiology*, **597(9)**, 2565–2589.
- Davis, K. L., Buchsbaum, M. S., Shihabuddin, L., Spiegel-Cohen, J., Metzger, M., Frecska, E., Keefe, R. S., & Powchik, P. (1998). Ventricular enlargement in poor-outcome schizophrenia. *Biological Psychiatry*, **43(11)**, 783–793.
- Dawidowski, B., Górniak, A., Podwalski, P., Lebiecka, Z., Misiak, B., & Samochowiec, J. (2021). The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Schizophrenia. *Journal of Clinical Medicine*, **10(17)**, 3849.
- de Bartolomeis, A., Barone, A., Vellucci, L., Mazza, B., Austin, M. C., Iasevoli, F., & Ciccarelli, M. (2022). Linking Inflammation, Aberrant Glutamate-Dopamine Interaction, and Post-synaptic Changes: Translational Relevance for Schizophrenia and Antipsychotic Treatment: a Systematic Review. *Molecular Neurobiology*, **59(10)**, 6460–6501.

- de Vita, V. M., Zapparoli, H. R., Reimer, A. E., Brandão, M. L., & de Oliveira, A. R. (2021). Dopamine D2 receptors in the expression and extinction of contextual and cued conditioned fear in rats. *Experimental Brain Research*, **239**(6), 1963–1974.
- Deakin, J. F. W., & Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*, **5**(4), 305-315.
- Dec, A. M., Kohlhaas, K. L., Nelson, C. L., Hoque, K. E., Leilabadi, S. N., Folk, J., Wolf, M. E., & West, A. R. (2014). Impact of neonatal NOS-1 inhibitor exposure on neurobehavioural measures and prefrontal-temporolimbic integration in the rat nucleus accumbens. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **17**(2), 275–287.
- Demjaha, A., Murray, R. M., Kapur, S., & Howes, O. D. (2011). Dopaminergic function in treatment resistant schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, **37**, 123 - 123.
- Dietrich-Muszalska, A., & Kwiatkowska, A. (2014). Generation of superoxide anion radicals and platelet glutathione peroxidase activity in patients with schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **10**, 703–709.
- Ding, J., Shao, Y., Zhou, H. H., Ma, Q. R., Zhang, Y. W., Ding, Y. X., He, Y. Q., & Liu, J. (2018). Effect of NMDA on proliferation and apoptosis in hippocampal neural stem cells treated with MK-801. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **16**(2), 1137–1142.
- Djordjević, V. (2022). Superoxide Dismutase in Psychiatric Diseases. *Biochemistry*. doi: 10.5772/intechopen.99847
- Do, K. Q., Cabungcal, J. H., Frank, A., Steullet, P., & Cuenod, M. (2009). Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Current Opinion in Neurobiology*, **19**(2), 220–230.
- Đorđević, V. V., Lazarević, D., Ćosić, V., Knežević, M., & Đorđević, V. B. (2017). Age-related changes of superoxide dismutase activity in patients with schizophrenia. *Vojnosanitetski Pregled*, **74**(1), 31–37.
- Duan, T. T., Tan, J. W., Yuan, Q., Cao, J., Zhou, Q. X., & Xu, L. (2013). Acute ketamine induces hippocampal synaptic depression and spatial memory impairment through dopamine D1/D5 receptors. *Psychopharmacology*, **228**(3), 451–461.
- Duarte, P., Cuadrado, A., & León, R. (2021). Monoamine Oxidase Inhibitors: From Classic to New Clinical Approaches. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **264**, 229–259.

- Duncan, G. E., Moy, S. S., Perez, A., Eddy, D. M., Zinzow, W. M., Lieberman, J. A., Snouwaert, J. N., & Koller, B. H. (2004). Deficits in sensorimotor gating and tests of social behavior in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Behavioural Brain Research*, **153**(2), 507–519.
- Dwivedi, D., Megha, K., Mishra, R., & Mandal, P. K. (2020). Glutathione in Brain: Overview of Its Conformations, Functions, Biochemical Characteristics, Quantitation and Potential Therapeutic Role in Brain Disorders. *Neurochemical Research*, **45**(7), 1461–1480.
- Egli, R. E., Kash, T. L., Choo, K., Savchenko, V., Matthews, R. T., Blakely, R. D., & Winder, D. G. (2005). Norepinephrine modulates glutamatergic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **30**(4), 657–668.
- Ellaithy, A., Younkin, J., González-Maeso, J., & Logothetis, D. E. (2015). Positive allosteric modulators of metabotropic glutamate 2 receptors in schizophrenia treatment. *Trends in Neurosciences*, **38**(8), 506–516.
- Ellegood, J., Markx, S., Lerch, J. P., Steadman, P. E., Genç, C., Provenzano, F., Kushner, S. A., Henkelman, R. M., Karayiorgou, M., & Gogos, J.A. (2014). Neuroanatomical phenotypes in a mouse model of the 22q11.2 microdeletion. *Molecular Psychiatry*, **19**(1), 99–107.
- Engemann, K., Pedersen, C. B., Arge, L., Tsirogiannis, C., Mortensen, P. B., & Svenning, J. C. (2018). Childhood exposure to green space-a novel risk-decreasing mechanism for schizophrenia? *Schizophrenia Research*, **199**, 142–148.
- Ermakov, E. A., Dmitrieva, E. M., Parshukova, D. A., Kazantseva, D. V., Vasilieva, A. R., & Smirnova, L. P. (2021). Oxidative Stress-Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2021**, 8881770.
- Estaphan, S., Curpăn, A. S., Khalifa, D., Rashed, L., Ciobica, A., Cantemir, A., Ciobica, A., Trus, C., Ali, M., & ShamsEldeen, A. (2021). Combined Low Dose of Ketamine and Social Isolation: A Possible Model of Induced Chronic Schizophrenia-Like Symptoms in Male Albino Rats. *Brain Sciences*, **11**(7), 917.
- Eyles, D. W., Burne, T. H., & McGrath, J. J. (2013). Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **34**(1), 47-64.

- Fahlén, T., Nilsson, H. L., Borg, K., Humble, M., & Pauli, U. (1995). Social phobia: the clinical efficacy and tolerability of the monoamine oxidase -A and serotonin uptake inhibitor brofaromine. A double-blind placebo-controlled study. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, **92**(5), 351–358.
- Fineberg, A. M., Ellman, L. M., Schaefer, C. A., Maxwell, S. D., Shen, L., Chaudhury, N. H., Cook, A. L., Bresnahan, M. A., Susser, E. S., & Brown, A. S. (2016). Fetal exposure to maternal stress and risk for schizophrenia spectrum disorders among offspring: Differential influences of fetal sex. *Psychiatry Research*, **236**, 91-97.
- Fitzgerald P. J. (2014). Is elevated norepinephrine an etiological factor in some cases of schizophrenia? *Psychiatry Research*, **215**(3), 497–504.
- Flatow, J., Buckley, P., & Miller, B. J. (2013). Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, **74**(6), 400–409.
- Fond, G., Lançon, C., Korchia, T., Auquier, P., & Boyer, L. (2020). The Role of Inflammation in the Treatment of Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, **11**, 160.
- Fone, K. C. F., Watson, D. J. G., Billiras, R. I., Sicard, D. I., Dekeyne, A., Rivet, J. M., Gobert, A., & Millan, M. J. (2020). Comparative Pro-cognitive and Neurochemical Profiles of Glycine Modulatory Site Agonists and Glycine Reuptake Inhibitors in the Rat: Potential Relevance to Cognitive Dysfunction and Its Management. *Molecular Neurobiology*, **57**(5), 2144–2166.
- Frohlich, J., & Van Horn, J. D. (2014). Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology*, **28**(4), 287-302.
- Frydecka, D., Misiak, B., Pawlak-Adamska, E., Karabon, L., Tomkiewicz, A., Sedlacek, P., Kiejna, A., & Beszlej, J. A. (2015). Interleukin-6: the missing element of the neurocognitive deterioration in schizophrenia? The focus on genetic underpinnings, cognitive impairment and clinical manifestation. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, **265**(6), 449–459.
- Fusar-Poli, P., Tantardini, M., De Simone, S., Ramella-Cravaro, V., Oliver, D., Kingdon, J., Kotlicka-Antczak, M., Valmaggia, L., Lee, J., Millan, M. J., Galderisi, S., Balottin, U., Ricca, V., & McGuire, P. (2017). Deconstructing vulnerability for psychosis: Meta-analysis of environmental risk factors for psychosis in subjects at ultra high-risk. *European Psychiatry: the Journal of Association of European Psychiatrists*, **40**, 65-75.

- Garcia-Partida, J. A., Torres-Sanchez, S., MacDowell, K., Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Soto-Montenegro, M. L., Romero-Miguel, D., Lamanna-Rama, N., Leza, J. C., Desco, M., & Berrocoso, E. (2022). The effects of mango leaf extract during adolescence and adulthood in a rat model of schizophrenia. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, 886514.
- GBD 2016. (2017). Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators . Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, **390**, 1211–1259.
- Genius, J., Geiger, J., Dölzer, A. L., Benninghoff, J., Giegling, I., Hartmann, A. M., Möller, H. J., & Rujescu, D. (2013). Glutamatergic dysbalance and oxidative stress in in vivo and in vitro models of psychosis based on chronic NMDA receptor antagonism. *PloS One*, **8(7)**, e59395.
- Geyer M. A. (2006). Are cross-species measures of sensorimotor gating useful for the discovery of procognitive cotreatments for schizophrenia? *Dialogues in Clinical Neuroscience*, **8(1)**, 9–16.
- Giordano, G. M., Brando, F., Pezzella, P., De Angelis, M., Mucci, A., & Galderisi, S. (2022). Factors influencing the outcome of integrated therapy approach in schizophrenia: A narrative review of the literature. *Frontiers in Psychiatry*, **13**, 970210.
- Girgis, R. R., Kumar, S. S., & Brown, A. S. (2014). The cytokine model of schizophrenia: emerging therapeutic strategies. *Biological Psychiatry*, **75(4)**, 292–299.
- Glantz, L. A., Gilmore, J. H., Lieberman, J. A., & Jarskog, L. F. (2006). Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **81(1)**, 47–63.
- Glikmann-Johnston, Y., Saling, M. M., Reutens, D. C., & Stout, J. C. (2015). Hippocampal 5-HT1A Receptor and Spatial Learning and Memory. *Frontiers in Pharmacology*, **6**, 289.
- Gómez-Nieto, R., Hormigo, S., & López, D. E. (2020). Prepulse Inhibition of the Auditory Startle Reflex Assessment as a Hallmark of Brainstem Sensorimotor Gating Mechanisms. *Brain Sciences*, **10(9)**, 639.

- Gómez-Nieto, R., Hormigo, S., & López, D. E. (2020). Prepulse Inhibition of the Auditory Startle Reflex Assessment as a Hallmark of Brainstem Sensorimotor Gating Mechanisms. *Brain Sciences*, **10**(9), 639.
- Górny, M., Bilska-Wilkosz, A., Iciek, M., Hereta, M., Kamińska, K., Kamińska, A., Chwatko, G., Rogóż, Z., & Lorenc-Koci, E. (2020). Alterations in the Antioxidant Enzyme Activities in the Neurodevelopmental Rat Model of Schizophrenia Induced by Glutathione Deficiency during Early Postnatal Life. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, **9**(6), 538.
- Gould, T. J., McCarthy, M. M., & Keith, R. A. (2002). MK-801 disrupts acquisition of contextual fear conditioning but enhances memory consolidation of cued fear conditioning. *Behavioural Pharmacology*, **13**(4), 287–294.
- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J. J., Airan, R. D., Zalocusky, K. A., Tye, K. M., Anikeeva, P., Malenka, R. C., & Deisseroth, K. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, **157**(7), 1535–1551.
- Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., Tosic, M., Werge, T., Cuénod, M., & Do, K. Q. (2007). Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(42), 16621–16626.
- Haber, S. N. (2014). The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience*, **282**, 248–257.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*, **5**(5), 405–414.
- Harvey, P. D., & Rosenthal, J. B. (2016). Treatment resistant schizophrenia: Course of brain structure and function. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **70**, 111–116.
- Hasan, A., Falkai, P., Lehmann, I., & Gaebel W. (2020). Schizophrenia. *Deutsches Ärzteblatt International*, **117**(24), 412-419.
- Hasnain, M., Vieweg, W. V., Fredrickson, S. K., Beatty-Brooks, M., Fernandez, A., & Pandurangi, A. K. (2009). Clinical monitoring and management of the metabolic

syndrome in patients receiving atypical antipsychotic medications. *Primary Care Diabetes*, **3**(1), 5–15.

- He, M., Qian, K., Zhang, Y., Huang, X. F., Deng, C., Zhang, B., Gao, G., Li, J., Xie, H., & Sun, T. (2021). Olanzapine-Induced Activation of Hypothalamic Astrocytes and Toll-Like Receptor-4 Signaling via Endoplasmic Reticulum Stress Were Related to Olanzapine-Induced Weight Gain. *Frontiers in Neuroscience*, **14**, 589650.
- Hereta, M., Kamińska, K., Białoń, M., Wąsik, A., Lorenc-Koci, E., & Rogóż, Z. (2020). Effect of combined treatment with aripiprazole and antidepressants on the MK-801-induced deficits in recognition memory in novel recognition test and on the release of monoamines in the rat frontal cortex. *Behavioural Brain Research*, **393**, 112769.
- Hjorthøj, C., Stürup, A. E., Mcgrath, J. J., & Nordentoft, M. (2017). Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry*, **4**, 295-301.
- Hohlfeld, R., Kerschensteiner, M., & Meinl, E. (2007). Dual role of inflammation in CNS disease. *Neurology*, **68**(22 Suppl 3), S58–S96.
- Homma, T., & Fujii, J. (2015). Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Current Drug Metabolism*, **16**(7), 560–571.
- Honey, G. D., Honey, R. A., Sharar, S. R., Turner, D. C., Pomarol-Clotet, E., Kumaran, D., Simons, J. S., Hu, X., Rugg, M. D., Bullmore, E. T., & Fletcher, P. C. (2005). Impairment of specific episodic memory processes by sub-psychotic doses of ketamine: the effects of levels of processing at encoding and of the subsequent retrieval task. *Psychopharmacology*, **181**(3), 445–457.
- Hou, L., Liu, K., Li, Y., Ma, S., Ji, X., & Liu, L. (2016). Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. *Journal of Cell Science*, **129**(16), 3084–3090.
- Howes, O. D., McCutcheon, R., Owen, M. J., & Murray, R. M. (2017). The Role of Genes, Stress, and Dopamine in the Development of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, **81**(1), 9–20.
- Howes, O., McCutcheon, R., & Stone, J. (2015). Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, **29**(2), 97–115.

- Huang, T. T., Leu, D., & Zou, Y. (2015). Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **576**, 2–7.
- Huhn, M., Nikolakopoulou, A., Schneider-Thoma, J., Krause, M., Samara, M., Peter, N., Arndt, T., Bäckers, L., Rothe, P., Cipriani, A., Davis, J., Salanti, G., & Leucht, S. (2019). Comparative efficacy and tolerability of 32 oral antipsychotics for the acute treatment of adults with multi-episode schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet (London, England)*, **394(10202)**, 939–951.
- Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, **16(5)**, 448–457.
- Hurşitoğlu, O., Orhan, F. Ö., Kurutaş, E. B., Doğaner, A., Durmuş, H. T., & Kopar, H. (2021). Diagnostic Performance of Increased Malondialdehyde Level and Oxidative Stress in Patients with Schizophrenia. *Noro Psikiyatri Arsivi*, **58(3)**, 184–188.
- Hyun, J. S., Inoue, T., & Hayashi-Takagi, A. (2020). Multi-Scale Understanding of NMDA Receptor Function in Schizophrenia. *Biomolecules*, **10(8)**, 1172.
- Igarashi, K., Sugiyama, Y., Kasuya, F., Saiki, K., Yamakawa, T., & Ohata, S. (1999). Determination of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in mouse brain after treatment with haloperidol by gas chromatography-selected ion monitoring. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, **731(1)**, 53–58.
- Iizuka, Y., Hong, S., Kim, C. Y., Yang, W. I., Lee, J. E., & Seong, G. J. (2010). Protective mechanism of agmatine pretreatment on RGC-5 cells injured by oxidative stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **43(4)**, 356–358.
- Inagaki, T., Gautreaux, C., & Luine, V. (2010). Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas. *Hormones and Behavior*, **58(3)**, 415–426.
- Inoue, H., Matsubara, D., & Tsuruta, Y. (2008). Simultaneous analysis of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines by high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent. *Journal of Chromatography B*, **867(1)**, 32–36.
- Inoue, T., Tsuchiya, K., & Koyama, T. (1996). Effects of typical and atypical antipsychotic drugs on freezing behavior induced by conditioned fear. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **55(2)**, 195–201.

- Ishigooka, J., Murasaki, M., Miura, S., & Olanzapine Early-Phase II Study Group (2001). Efficacy and safety of olanzapine, an atypical antipsychotic, in patients with schizophrenia: results of an open-label multicenter study in Japan. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **55**(4), 353–363.
- Jaaro-Peled, H., & Sawaa A. (2020). Neurodevelopmental Factors in Schizophrenia. *The Psychiatric Clinics of North America*, **43**, 263-274.
- Jacobs, S., & Tsien, J. Z. (2017). Adult forebrain NMDA receptors gate social motivation and social memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, **138**, 164–172.
- Jadi, M. P., Behrens, M. M., & Sejnowski, T. J. (2016). Abnormal Gamma Oscillations in N-Methyl-D-Aspartate Receptor Hypofunction Models of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, **79**(9), 716–726.
- Janoutová, J., Janácková, P., Serý, O., Zeman, T., Ambroz, P., Kovalová, M., Varechová, K., Hosák, L., Jirík, V., & Janout, V. (2016). Epidemiology and risk factors of schizophrenia. *Neuro Endocrinology Letters*, **37**(1), 1-8.
- Jarskog, L. F., Selinger, E. S., Lieberman, J. A., & Gilmore, J. H. (2004). Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. *The American Journal of Psychiatry*, **161**(1), 109–115.
- Jauhar, S., Nour, M. M., Veronese, M., Rogdaki, M., Bonoldi, I., Azis, M., Turkheimer, F., McGuire, P., Young, A. H., & Howes, O. D. (2017). A Test of the Transdiagnostic Dopamine Hypothesis of Psychosis Using Positron Emission Tomographic Imaging in Bipolar Affective Disorder and Schizophrenia. *JAMA Psychiatry*, **74**(12), 1206-1213.
- Jeon, S. J., Kim, E., Lee, J. S., Oh, H. K., Zhang, J., Kwon, Y., Jang, D. S., & Ryu, J. H. (2017). Maslinic acid ameliorates NMDA receptor blockade-induced schizophrenia-like behaviors in mice. *Neuropharmacology*, **126**, 168–178.
- Jia, P., Wang, L., Meltzer, H. Y., & Zhao, Z. (2010). Common variants conferring risk of schizophrenia: a pathway analysis of GWAS data. *Schizophrenia Research*, **122**(1-3), 38–42.
- Johnstone, E. C., Owens, D. G., Bydder, G. M., Colter, N., Crow, T. J., & Frith, C. D. (1989). The spectrum of structural brain changes in schizophrenia: age of onset as a predictor of cognitive and clinical impairments and their cerebral correlates. *Psychological Medicine*, **19**(1), 91–103.

- Jung, J., Lambon Ralph, M. A., & Jackson, R. L. (2022). Subregions of DLPFC Display Graded yet Distinct Structural and Functional Connectivity. *Journal of Neuroscience*, **42(15)**, 3241-3252.
- Kahn, R. S., Sommer, I. E., Murray, R. M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., Cannon, T. D., O'Donovan, M., Correll, C. U., Kane, J. M., van Os, J., & Insel, T. R. (2015). Schizophrenia. *Nature Reviews. Disease Primers*, **12**, 15067.
- Kegeles, L. S., Abi-Dargham, A., Frankle, W. G., Gil, R., Cooper, T. B., Slifstein, M., Hwang, D. R., Huang, Y., Haber, S. N., & Laruelle, M. (2010). Increased synaptic dopamine function in associative regions of the striatum in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, **67**, 231-239.
- Kępińska, A. P., Iyegbe, C. O., Vernon, A. C., Yolken, R., Murray, R. M., & Pollak, T. A. (2020). Schizophrenia and Influenza at the Centenary of the 1918-1919 Spanish Influenza Pandemic: Mechanisms of Psychosis Risk. *Frontiers in Psychiatry*, **11**, 72.
- Khandaker, G. M., Pearson, R. M., Zammit, S., Lewis, G., & Jones, P. B. (2014). Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study. *JAMA Psychiatry*, **71(10)**, 1121–1128.
- Kikuchi, K., Nagatsu, Y., Makino, Y., Mashino, T., Ohta, S., & Hirobe, M. (1991). Metabolism and penetration through blood-brain barrier of parkinsonism-related compounds. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, **19(1)**, 257–262.
- Kim, J. S., Kornhuber, H. H., Schmid-Burgk, W., & Holzmüller, B. (1980). Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neuroscience Letters*, **20(3)**, 379–382.
- Kim, Y. K., Kim, L., & Lee, M. S. (2000). Relationships between interleukins, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics. *Schizophrenia Research*, **44(3)**, 165–175.
- Kirchner, L., Weitzdoerfer, R., Hoeger, H., Url, A., Schmidt, P., Engelmann, M., Villar, S. R., Fountoulakis, M., Lubec, G., & Lubec, B. (2004). Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, **11(4)**, 316–330.

- Kitzinger, H., & Arnold, D. G. (1949). A preliminary study of the effects of glutamic acid on catatonic schizophrenics. *Rorschach Research Exchange and Journal of Projective Techniques*, **13**(2), 210–218.
- Koga, M., Serritella, A. V., Sawa, A., & Sedlak, T. W. (2016). Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophrenia Research*, **176**(1), 52–71.
- Kohno, M., Ohta, S., & Hirobe, M. (1986). Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinoline as novel endogenous amines in rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **140**(1), 448–454.
- Kokkinou, M., Ashok, A. H., & Howes, O. D. (2018). The effects of ketamine on dopaminergic function: meta-analysis and review of the implications for neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, **23**(1), 59–69.
- Kos, T., Popik, P., Pietraszek, M., Schäfer, D., Danysz, W., Dravolina, O., Blokhina, E., Galankin, T., & Beshpalov, A. Y. (2006). Effect of 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. *European Neuropsychopharmacology : the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **16**(4), 297–310.
- Koskinen, J., Lohonen, J., Koponen, H., Isohanni, M., & Miettunen, J. (2009). Prevalence of alcohol use disorders in schizophrenia-a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, **120**(2), 85–96.
- Kovacic, P., & Somanathan, R. (2010). Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **3**(1), 13–22.
- Kraeuter, A. K., Mashavave, T., Suvarna, A., van den Buuse, M., & Sarnyai, Z. (2020). Effects of beta-hydroxybutyrate administration on MK-801-induced schizophrenia-like behaviour in mice. *Psychopharmacology*, **237**(5), 1397–1405.
- Kuperberg, G., & Heckers, S. (2000). Schizophrenia and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*, **10**(2), 205–210.
- Kuszczyk, M., Słomka, M., Antkiewicz-Michaluk, L., Salińska, E., & Łazarewicz, J. W. (2010). 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and established uncompetitive NMDA receptor antagonists induce tolerance to excitotoxicity. *Pharmacological Reports: PR*, **62**(6), 1041–1050.

- Laguado, S. A., & Saklad, S. R. (2022). Opioid antagonists to prevent olanzapine-induced weight gain: A systematic review. *The Mental Health Clinician*, **12(4)**, 254–262.
- Lahti, A. C., Weiler, M. A., Parwani, A., Holcomb, H. H., Michaelidis, T., Warfel, D., & Tamminga, C. A. (1999). Blockade of ketamine-induced psychosis with olanzapine. *Schizophrenia Research*, **36(1-3)**, 310-310.
- Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L., & Innis, R. (1999). Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biological psychiatry*, **46(1)**, 56–72.
- Latusz, J., Radaszkiewicz, A., Bator, E., Wędzony, K., & Maćkowiak, M. (2017). Fear memory in a neurodevelopmental model of schizophrenia based on the postnatal blockade of NMDA receptors. *Pharmacological Reports: PR*, **69(1)**, 71–76.
- Lei, G., Xia, Y., & Johnson, K. M. (2008). The role of Akt-GSK-3beta signaling and synaptic strength in phencyclidine-induced neurodegeneration. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **33(6)**, 1343–1353.
- Leppien, E., Bystrak, T., & Doughty, B. (2019). Chapter 6 - Antipsychotic agents. *Side Effects of Drugs Annual*, **41**, 51-63.
- Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R. R., Li, C., & Davis, J. M. (2009). Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet (London, England)*, **373(9657)**, 31–41.
- Li, H., Yang, P., Knight, W., Guo, Y., Perlmutter, J. S., Benzinger, T. L. S., Morris, J. C., & Xu, J. (2020). The interactions of dopamine and oxidative damage in the striatum of patients with neurodegenerative diseases. *Journal of neurochemistry*, **152(2)**, 235–251.
- Li, P., Snyder, G. L., & Vanover, K. E. (2016). Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **16(29)**, 3385–3403.
- Li, Y., Shen, R., Wen, G., Ding, R., Du, A., Zhou, J., Dong, Z., Ren, X., Yao, H., Zhao, R., Zhang, G., Lu, Y., & Wu, X. (2017). Effects of Ketamine on Levels of Inflammatory Cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the Hippocampus of Mice Following Acute or Chronic Administration. *Frontiers in pharmacology*, **8**, 139.

- Liang, J. Q., Chen, X., & Cheng, Y. (2022). Paeoniflorin Rescued MK-801-Induced Schizophrenia-Like Behaviors in Mice via Oxidative Stress Pathway. *Frontiers in Nutrition*, **9**, 870032.
- Libman-Sokołowska, M., Drozdowicz, E., & Nasierowski, T. (2015). BDNF as a biomarker in the course and treatment of schizophrenia. *Psychiatria Polska*, **49(6)**, 1149–1158.
- Lieberman, J. A., Kane, J. M. & Alvir, J. (1987). Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology* **91(4)**, 415–433.
- Lim, J., Lee, S. A., Lam, M., Rapisarda, A., Kraus, M., Keefe, R. S., & Lee, J. (2016). The relationship between negative symptom subdomains and cognition. *Psychological Medicine*, **46(10)**, 2169–2177.
- Lisman, J. E., Coyle, J. T., Green, R. W., Javitt, D. C., Benes, F. M., Heckers, S., & Grace, A. A. (2008). Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, **31(5)**, 234–242.
- Liu, C. H., Cherng, C. H., Lin, S. L., Yeh, C. C., Wu, C. T., Tai, Y. H., & Wong, C. S. (2011). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 suppresses glial pro-inflammatory cytokine expression in morphine-tolerant rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **99(3)**, 371–380.
- Liu, J. L., Li, M., Dang, X. R., Wang, Z. H., Rao, Z. R., Wu, S. X., Li, Y. Q., & Wang, W. (2009). A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. *PloS One*, **4(10)**, e7548.
- Liu, X., Li, J., Guo, C., Wang, H., Sun, Y., Wang, H., Su, Y. A., Li, K., & Si, T. (2018). Olanzapine Reverses MK-801-Induced Cognitive Deficits and Region-Specific Alterations of NMDA Receptor Subunits. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **11**, 260.
- Lohr, J. B., & Browning, J. A. (1995). Free radical involvement in neuropsychiatric illnesses. *Psychopharmacology Bulletin*, **31(1)**, 159–165.
- Löhrs, L., & Hasan, A. (2019). Risk factors for the development of schizophrenia. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*, **87(2)**, 133-143.
- Lu, H., & Liu, Q. S. (2017). Serotonin in the Frontal Cortex: A Potential Therapeutic Target for Neurological Disorders. *Biochemistry & Pharmacology : open access*, **6(1)**, e184.

- Mahadik, S. P., Evans, D., & Lal, H. (2001). Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **25**(3), 463–493.
- Makino, Y., Ohta, S., Tachikawa, O., & Hirobe, M. (1988). Presence of tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydro-isoquinoline in foods: compounds related to Parkinson's disease. *Life Sciences*, **43**(4), 373–378.
- Makino, Y., Tasaki, Y., Ohta, S., & Hirobe, M. (1990). Confirmation of the enantiomers of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in the mouse brain and foods applying gas chromatography/mass spectrometry with negative ion chemical ionization. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, **19**(7), 415–419.
- Manning, S. M., Boll, G., Fitzgerald, E., Selip, D. B., Volpe, J. J., & Jensen, F. E. (2011). The clinically available NMDA receptor antagonist, memantine, exhibits relative safety in the developing rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience : the Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, **29**(7), 767–773.
- Marconi, A., Di Forti, M., Lewis, C. M., Murray, R. M., & Vassos, E. (2016). Meta-analysis of the association between the level of cannabis use and risk of psychosis. *Schizophrenia Bulletin*, **42**(5), 1262–1269.
- Marsman, A., van den Heuvel, M. P., Klomp, D. W., Kahn, R. S., Luijten, P. R., & Hulshoff Pol, H. E. (2013). Glutamate in schizophrenia: a focused review and meta-analysis of ¹H-MRS studies. *Schizophrenia Bulletin*, **39**(1), 120–129.
- Matsuzawa, D., & Hashimoto, K. (2011). Magnetic resonance spectroscopy study of the antioxidant defense system in schizophrenia. *Antioxidants & Redox Signaling*, **15**(7), 2057–2065.
- McCutcheon, R. A., Abi-Dargham, A., & Howes, O. D. (2019). Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. *Trends in Neurosciences*, **42**, 205-220.
- McCutcheon, R. A., Krystal, J. H., & Howes, O. D. (2020). Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World Psychiatry*, **19**, 15-33.
- McCutcheon, R. A., Reis Marques, T., & Howes, O.D. (2020). Schizophrenia-An Overview. *JAMA Psychiatry*, **77**, 201-210.

- McCutcheon, R., Beck, K., Jauhar, S., & Howes, O. D. (2018). Defining the Locus of Dopaminergic Dysfunction in Schizophrenia: A Meta-analysis and Test of the Mesolimbic Hypothesis. *Schizophrenia Bulletin*, **44**, 1301-1311.
- McEntee, W. J., & Crook, T. H. (1993). Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*, **111(4)**, 391–401.
- McGarrity, S., Mason, R., Fone, K. C., Pezze, M., & Bast, T. (2017). Hippocampal Neural Disinhibition Causes Attentional and Memory Deficits. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, **27(9)**, 4447–4462.
- Medici, C. R., Kai, L. M., Kristensen, S. B., Kirkedal, C., Munk-Jørgensen, P., & Straszek, S. (2020). Typical Versus Atypical Antipsychotics for Acute Mania. *American Journal of Therapeutics*, **27(3)**, e243–e248.
- Meftah, A. M., Deckler, E., Citrome, L., & Kantrowitz, J. T. (2020). New discoveries for an old drug: a review of recent olanzapine research. *Postgraduate Medicine*, **132(1)**, 80–90.
- Meldrum B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, **130(4S Suppl)**, 1007S–1015S.
- Miller, B. J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., & Kirkpatrick, B. (2011). Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological Psychiatry*, **70(7)**, 663–671.
- Milstein, J. A., Elnabawi, A., Vinish, M., Swanson, T., Enos, J. K., Bailey, A. M., Kolb, B., & Frost, D. O. (2013). Olanzapine treatment of adolescent rats causes enduring specific memory impairments and alters cortical development and function. *PloS One*, **8(2)**, e57308.
- Miyamoto, S., Duncan, G. E., Marx, C. E., & Lieberman, J. A. (2005). Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Molecular Psychiatry*, **10(1)**, 79–104.
- Moghaddam, B., & Javitt, D. (2012). From Revolution to Evolution: The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia and its Implication for Treatment. *Neuropsychopharmacology*, **37**, 4–15.
- Monaghan, D. T., & Jane, D. E. (2009). Pharmacology of NMDA Receptors. In A. M. Van Dongen (Ed.), *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Monji, A., Kato, T., & Kanba, S. (2009). Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **63(3)**, 257–265.

- Monteleone, P., Cascino, G., Monteleone, A. M., Rocca, P., Rossi, A., Bertolino, A., Aguglia, E., Amore, M., Collantoni, E., Corrivetti, G., Cuomo, A., Bellomo, A., D'Ambrosio, E., Dell'Osso, L., Frascarelli, M., Giordano, G. M., Giuliani, L., Marchesi, C., Montemagni, C., Oldani, L., ... Italian Network for Research on Psychoses (2021). Prevalence of antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms and their association with neurocognition and social cognition in outpatients with schizophrenia in the "real-life". *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **109**, 110250.
- Morosawa, S., Iritani, S., Fujishiro, H., Sekiguchi, H., Torii, Y., Habuchi, C., Kuroda, K., Kaibuchi, K., & Ozaki, N. (2017). Neuropeptide Y neuronal network dysfunction in the frontal lobe of a genetic mouse model of schizophrenia. *Neuropeptides*, **62**, 27–35.
- Morris-Rosendahl, D. J., & Crocq, M. A. (2020). Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, **22(1)**, 65-72.
- Müller N. (2018). Inflammation in Schizophrenia: Pathogenetic Aspects and Therapeutic Considerations. *Schizophrenia Bulletin*, **44(5)**, 973–982.
- Müller, N., Weidinger, E., Leitner, B., & Schwarz, M. J. (2015). The role of inflammation in schizophrenia. *Frontiers in Neuroscience*, **9**, 372.
- Murray, A. J., Rogers, J. C., Katshu, M. Z. U. H., Liddle, P. F., & Upthegrove, R. (2021). Oxidative Stress and the Pathophysiology and Symptom Profile of Schizophrenia Spectrum Disorders. *Frontiers in Psychiatry*, **12**, 703452.
- Na, K. S., Jung, H. Y., & Kim, Y. K. (2014). The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **48**, 277–286.
- Nakazawa, K., & Sapkota, K. (2020). The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Pharmacology & Therapeutics*, **205**, 107426.
- Nani, J. V., Almeida, P. G. C., Noto, C., Bressan, R. A., Brietzke, E., & Hayashi, M. A. F. (2022). Unraveling the correlation among neurodevelopmental and inflammatory biomarkers in patients with chronic schizophrenia. *Nordic Journal of Psychiatry*, **76(7)**, 559–564.

- Nasyrova, R. F., Ivashchenko, D. V., Ivanov, M. V., & Neznanov, N. G. (2015). Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: biochemical, genetic and clinical aspects. *Frontiers in Physiology*, **6**, 139.
- Neill, J. C., Barnes, S., Cook, S., Grayson, B., Idris, N. F., McLean, S. L., Snigdha, S., Rajagopal, L., & Harte, M. K. (2010). Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacology & Therapeutics*, **128**(3), 419–432.
- Nicol, G. E., Yingling, M. D., Flavin, K. S., Schweiger, J. A., Patterson, B. W., Schechtman, K. B., & Newcomer, J. W. (2018). Metabolic Effects of Antipsychotics on Adiposity and Insulin Sensitivity in Youths: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, **75**(8), 788–796.
- Nikiforuk, A., Gołembiowska, K., & Popik, P. (2010). Mazindol attenuates ketamine-induced cognitive deficit in the attentional set shifting task in rats. *European Neuropsychopharmacology : the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **20**(1), 37–48.
- Nishioka, N., & Arnold, S. E. (2004). Evidence for oxidative DNA damage in the hippocampus of elderly patients with chronic schizophrenia. *The American Journal of Geriatric Psychiatry : Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, **12**(2), 167–175.
- Niwa, T., Takeda, N., Kaneda, N., Hashizume, Y., & Nagatsu, T. (1987). Presence of tetrahydroisoquinoline and 2-methyl-tetrahydroquinoline in parkinsonian and normal human brains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **144**(2), 1084–1089.
- Novick, A. M., Forster, G. L., Hassell, J. E., Davies, D. R., Scholl, J. L., Renner, K. J., & Watt, M. J. (2015). Increased dopamine transporter function as a mechanism for dopamine hypoactivity in the adult infralimbic medial prefrontal cortex following adolescent social stress. *Neuropharmacology*, **97**, 194–200.
- O'Donnell P. (2012). Cortical interneurons, immune factors and oxidative stress as early targets for schizophrenia. *The European Journal of Neuroscience*, **35**(12), 1866–1870.
- Ohmori T. (2013). Pharmacology and clinical implication of typical antipsychotics. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, **71**(4), 648–653.

- Ohyama, M., Kondo, M., Yamauchi, M., Imanishi, T., & Koyama, T. (2016). Asenapine reduces anxiety-related behaviours in rat conditioned fear stress model. *Acta Neuropsychiatrica*, **28**(6), 327–336.
- Orzelska-Górka, J., Mikulska, J., Wiszniewska, A., & Biała, G. (2022). New Atypical Antipsychotics in the Treatment of Schizophrenia and Depression. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(18), 10624.
- Ozyurt, B., Sarsilmaz, M., Akpolat, N., Ozyurt, H., Akyol, O., Herken, H., & Kus, I. (2007). The protective effects of omega-3 fatty acids against MK-801-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rat. *Neurochemistry International*, **50**(1), 196–202.
- Papadia, S., Soriano, F. X., Léveillé, F., Martel, M. A., Dakin, K. A., Hansen, H. H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovskaja, V., McKenzie, G., Craigho, M., Corriveau, R., Ghazal, P., Horsburgh, K., Yankner, B. A., Wyllie, D. J., Ikonomidou, C., & Hardingham, G. E. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nature Neuroscience*, **11**(4), 476–487.
- Patsenka, A., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2004). Inhibition of rodent brain monoamine oxidase and tyrosine hydroxylase by endogenous compounds - 1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline alkaloids. *Polish Journal of Pharmacology*, **56**(6), 727–734.
- Pechnick, R. N., Bresee, C. J., & Poland, R. E. (2006). The role of antagonism of NMDA receptor-mediated neurotransmission and inhibition of the dopamine reuptake in the neuroendocrine effects of phencyclidine. *Life Sciences*, **78**(17), 2006–2011.
- Pedersen, C. B., & Mortensen, P. B. (2006). Are the cause(s) responsible for urban-rural differences in schizophrenia risk rooted in families or in individuals? *American Journal of Epidemiology*, **163**(11), 971–978.
- Perdikaris, P., & Dermon, C. R. (2022). Behavioral and neurochemical profile of MK-801 adult zebrafish model: Forebrain β 2-adrenoceptors contribute to social withdrawal and anxiety-like behavior. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **115**, 110494.
- Pérez, M. Á., Morales, C., Santander, O., García, F., Gómez, I., Peñaloza-Sancho, V., Fuentealba, P., Dagnino-Subiabre, A., Moya, P. R., & Fuenzalida, M. (2019). Ketamine-Treatment During Late Adolescence Impairs Inhibitory Synaptic Transmission in the Prefrontal Cortex and Working Memory in Adult Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **13**, 372.

- Pillinger, T., D'Ambrosio, E., McCutcheon, R., & Howes, O. D. (2019). Is psychosis a multisystem disorder? A meta-review of central nervous system, immune, cardiometabolic, and endocrine alterations in first-episode psychosis and perspective on potential models. *Molecular Psychiatry*, **24(6)**, 776–794.
- Portugal, G. S., & Gould, T. J. (2007). Bupropion dose-dependently reverses nicotine withdrawal deficits in contextual fear conditioning. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **88(2)**, 179–187.
- Pourhamzeh, M., Moravej, F. G., Arabi, M., Shahriari, E., Mehrabi, S., Ward, R., Ahadi, R., & Joghataei, M. T. (2022). The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **42(6)**, 1671–1692.
- Provencher, H. L., & Mueser, K.T. (1997). Positive and negative symptom behaviors and caregiver burden in the relatives of persons with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **26**, 71-80.
- Pryor, K.O., & Storer, K.P. (2019). Drugs for Neuropsychiatric Disorders. In *Pharmacology and Physiology for Anesthesia*; Elsevier, 241–269.
- Pulver, A. E., Nestadt, G., Goldberg, R., Shprintzen, R. J., Lamacz, M., Wolyniec, P. S., Morrow, B., Karayiorgou, M., Antonarakis, S. E., Housman, D., & Kucheriapati, R. (1994). Psychotic illness in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome and their relatives. *Journal of Nervous and Mental Disease*, **182(8)**, 476–478.
- Purvis, E. M., Klein, A. K., & Ettenberg, A. (2018). Lateral habenular norepinephrine contributes to states of arousal and anxiety in male rats. *Behavioural Brain Research*, **347**, 108–115.
- Qin, X., Chen, J., & Zhou, T. (2020). 22q11.2 deletion syndrome and schizophrenia. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, **52(11)**, 1181-1190.
- Radonjić, N. V., Knezević, I. D., Vilimanovich, U., Kravić-Stevović, T., Marina, L. V., Nikolić, T., Todorović, V., Bumbasirević, V., & Petronijević, N. D. (2010). Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in an animal model of schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. *Neuropharmacology*, **58(4-5)**, 739–745.
- Raffa, M., Fendri, C., Ben Othmen, L., Slama, H., Amri, M., Kerkeni, A., & Mechri, A. (2012). The reduction of superoxide dismutase activity is associated with the severity of neurological soft signs in patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **39(1)**, 52–56.

- Reale, M., Costantini, E., & Greig, N. H. (2021). Cytokine Imbalance in Schizophrenia. From Research to Clinic: Potential Implications for Treatment. *Frontiers in Psychiatry*, **12**, 536257.
- Réus, G. Z., Simões, L. R., Colpo, G. D., Scaini, G., Oses, J. P., Generoso, J. S., Prossin, A. R., Kaddurah-Daouk, R., Quevedo, J., & Barichello, T. (2017). Ketamine potentiates oxidative stress and influences behavior and inflammation in response to lipopolysaccharide (LPS) exposure in early life. *Neuroscience*, **353**, 17–25.
- Ribeiro, F. M., Vieira, L. B., Pires, R. G., Olmo, R. P., & Ferguson, S. S. (2017). Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, **115**, 179–191.
- Rothman, D. L., Behar, K. L., Hyder, F., & Shulman, R. G. (2003). In vivo NMR studies of the glutamate neurotransmitter flux and neuroenergetics: implications for brain function. *Annual Review of Physiology*, **65**, 401–427.
- Rukmini, M. S., D'Souza, B., & D'Souza, V. (2004). Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, **19(2)**, 114–118.
- San-Martin, R., Castro, L. A., Menezes, P. R., Fraga, F. J., Simões, P. W., & Salum, C. (2020). Meta-Analysis of Sensorimotor Gating Deficits in Patients With Schizophrenia Evaluated by Prepulse Inhibition Test. *Schizophrenia Bulletin*, **46(6)**, 1482–1497.
- Sara, G. E., Large, M. M., Matheson, S. L., Burgess, P. M., Malhi, G. S., Whiteford, H.A., & Hall W. D. (2015). Stimulant use disorders in people with psychosis: a meta-analysis of rate and factors affecting variation. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, **49(2)**, 106–117.
- Scheggia, D., Mastrogiacomo, R., Mereu, M., Sannino, S., Straub, R. E., Armando, M., Managò, F., Guadagna, S., Piras, F., Zhang, F., Kleinman, J. E., Hyde, T. M., Kaalund, S. S., Pontillo, M., Orso, G., Caltagirone, C., Borrelli, E., De Luca, M. A., Vicari, S., (...) & Papaleo, F. (2018). Variations in Dysbindin-1 are associated with cognitive response to antipsychotic drug treatment. *Nature Communications*, **9(1)**, 2265.
- Scheiderer, C. L., Dobrunz, L. E., & McMahon, L. L. (2004). Novel form of long-term synaptic depression in rat hippocampus induced by activation of alpha 1 adrenergic receptors. *Journal of Neurophysiology*, **91(2)**, 1071–1077.

- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, **511**, 421–427.
- Selvaraj, S., Arnone, D., Cappai, A., & Howes, O. (2014). Alterations in the serotonin system in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **45**, 233–245.
- Shulman, M., Miller, A., Misher, J., & Tentler, A. (2014). Managing cardiovascular disease risk in patients treated with antipsychotics: a multidisciplinary approach. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, **7**, 489–501.
- Simma, N., Bose, T., Kahlfuss, S., Mankiewicz, J., Lowinus, T., Lühder, F., Schüller, T., Schraven, B., Heine, M., & Bommhardt, U. (2014). NMDA-receptor antagonists block B-cell function but foster IL-10 production in BCR/CD40-activated B cells. *Cell Communication and Signaling: CCS*, **12**, 75.
- Sinkeviciute, I., Hugdahl, K., Bartz-Johannessen, C., Kroken, R. A., Løberg, E. M., Kjelby, E., Rettenbacher, M. A., Joa, I., Reitan, S. K., Alisauskiene, R., Fathian, F., & Johnsen, E. (2021). Differential Effectiveness of Atypical Antipsychotics on Hallucinations: A Pragmatic Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **41(4)**, 389–396.
- Sitges, M., Nekrassov, V., & Guarneros, A. (2000). Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Research*, **854(1-2)**, 48–56.
- Slifstein, M., van de Giessen, E., Van Snellenberg, J., Thompson, J. L., Narendran, R., Gil, R., Hackett, E., Girgis, R., Ojeil, N., Moore, H., D'Souza, D., Malison, R. T., Huang, Y., Lim, K., Nabulsi, N., Carson, R. E., Lieberman, J. A., & 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(4)**, 316–324.
- Słomka, M., Kuszczak, M., Łazarewicz, J. W., & Makarewicz, D. (2014). NMDA receptor antagonists MK-801 and memantine induce tolerance to oxygen and glucose deprivation in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, **74(4)**, 396–404.

- Solié, C., Girard, B., Righetti, B., Tapparel, M., & Bellone, C. (2022). VTA dopamine neuron activity encodes social interaction and promotes reinforcement learning through social prediction error. *Nature Neuroscience*, **25(1)**, 86–97.
- Sommer, I. E., van Westrhenen, R., Begemann, M. J., de Witte, L. D., Leucht, S., & Kahn, R. S. (2014). Efficacy of anti-inflammatory agents to improve symptoms in patients with schizophrenia: an update. *Schizophrenia Bulletin*, **40(1)**, 181–191.
- Song, X., Fan, X., Li, X., Zhang, W., Gao, J., Zhao, J., Harrington, A., Ziedonis, D., & Lv, L. (2014). Changes in pro-inflammatory cytokines and body weight during 6-month risperidone treatment in drug naïve, first-episode schizophrenia. *Psychopharmacology*, **231(2)**, 319–325.
- Sönmez, A., Sayın, O., Gürgen, S. G., & Çalışır, M. (2015). Neuroprotective effects of MK-801 against traumatic brain injury in immature rats. *Neuroscience Letters*, **597**, 137–142.
- Stan, A. D., Ghose, S., Zhao, C., Hulsey, K., Mihalakos, P., Yanagi, M., Morris, S. U., Bartko, J. J., Choi, C., & Tamminga, C. A. (2015). Magnetic resonance spectroscopy and tissue protein concentrations together suggest lower glutamate signaling in dentate gyrus in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, **20(4)**, 433–439.
- Stein-Zamir, C., Abramson, N., Sonnenfeld-Alroey, H., Charnes, J., Eckstein, D., Dienstag, A., Wolf, D., Moses, A. E., & Weiss, Y. G. (2021). Utilization of the Public Health Ordinance to prevent nosocomial spread in a case of acute measles-associated psychosis. *Israel Journal of Health Policy Research*, **10(1)**, 2.
- Stępnicki, P., Kondej, M., & Kaczor, A. A. (2018). Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **23(8)**, 2087.
- Stilo, S. A., & Murray, R. M. (2019). Non-Genetic Factors in Schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*, **21(10)**, 100.
- Stroup, T. S., A Lieberman, J., S Swartz, M., & McEvoy, J. P. (2000). Comparative effectiveness of antipsychotic drugs in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, **2(4)**, 373–379.
- Stubbendorff, C., & Stevenson, C. W. (2021). Dopamine regulation of contextual fear and associated neural circuit function. *The European Journal of Neuroscience*, **54(8)**, 6933–6947.
- Sullivan, P. F., Kendler, K. S., & Neale, M. C. (2003). Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. **60(12)**, 1187-1192.

- Szaroma, W., Dziubek, K., & Kapusta, E. (2014). Effect of N-methyl-D-aspartic acid on activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and reduced glutathione level in selected organs of the mouse. *Acta Physiologica Hungarica*, **101**(3), 377–387.
- Takadera, T., Matsuda, I., & Ohyashiki, T. (1999). Apoptotic cell death and caspase-3 activation induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and their prevention by insulin-like growth factor I. *Journal of Neurochemistry*, **73**(2), 548–556.
- Takadera, T., Sakamoto, Y., & Ohyashiki, T. (2004). NMDA receptor 2B-selective antagonist ifenprodil-induced apoptosis was prevented by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in cultured rat cortical neurons. *Brain Research*, **1020**(1-2), 196–203.
- Tancredi, V., D'Antuono, M., Cafè, C., Giovedì, S., Buè, M. C., D'Arcangelo, G., Onofri, F., & Benfenati, F. (2000). The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *Journal of Neurochemistry*, **75**(2), 634–643.
- Tasaki, Y., Makino, Y., Ohta, S., & Hirobe, M. (1993). Biosynthesis of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1MeTIQ), a possible antiparkinsonism agent. *Advances in Neurology*, **60**, 231–233.
- Teixeira, C. M., Rosen, Z. B., Suri, D., Sun, Q., Hersh, M., Sargin, D., Dincheva, I., Morgan, A. A., Spivack, S., Krok, A. C., Hirschfeld-Stoler, T., Lambe, E. K., Siegelbaum, S. A., & Ansorge, M. S. (2018). Hippocampal 5-HT Input Regulates Memory Formation and Schaffer Collateral Excitation. *Neuron*, **98**(5), 992–1004.e4.
- Thomas, K., & Saadabadi, A. (2022). Olanzapine. In: StatPearls. StatPearls Publishing.
- Tollens, F., Gass, N., Becker, R., Schwarz, A. J., Risterucci, C., Künnecke, B., Lehardt, P., Reinwald, J., Sack, M., Weber-Fahr, W., Meyer-Lindenberg, A., & Sartorius, A. (2018). The affinity of antipsychotic drugs to dopamine and serotonin 5-HT₂ receptors determines their effects on prefrontal-striatal functional connectivity. *European Neuropsychopharmacology : the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **28**(9), 1035–1046.
- Trantham-Davidson, H., & Lavin, A. (2019). Loss of dysbindin-1 affects GABAergic transmission in the PFC. *Psychopharmacology*, **236**(11), 3291–3300.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010). Glutamate

receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, **62**(3), 405–496.

- Trist, B. G., Hare, D. J., & Double, K. L. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*, **18**(6), e13031.
- Trovão, N., Prata, J., VonDoellinger, O., Santos, S., Barbosa, M., & Coelho, R. (2019). Peripheral Biomarkers for First-Episode Psychosis-Opportunities from the Neuroinflammatory Hypothesis of Schizophrenia. *Psychiatry Investigation*, **16**(3), 177–184.
- Tsugawa, S., Noda, Y., Tarumi, R., Mimura, Y., Yoshida, K., Iwata, Y., Elsalhy, M., Kuromiya, M., Kurose, S., Masuda, F., Morita, S., Ogyu, K., Plitman, E., Wada, M., Miyazaki, T., Graff-Guerrero, A., Mimura, M., & Nakajima, S. (2019). Glutathione levels and activities of glutathione metabolism enzymes in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychopharmacology*, **33**(10), 1199–1214.
- Turkmen, B. A., Yazici, E., Erdogan, D. G., Suda, M. A., & Yazici, A. B. (2021). BDNF, GDNF, NGF and Klotho levels and neurocognitive functions in acute term of schizophrenia. *BMC Psychiatry*, **21**(1), 562.
- Turner, C. P., DeBenedetto, D., Ware, E., Walburg, C., Lee, A., Stowe, R., Swanson, J., Lambert, A., Lyle, M., Desai, P., Johnson, R., & Liu, C. (2009). MK801-induced activated caspase-3 exhibits selective co-localization with GAD67. *Neuroscience Letters*, **462**(2), 152–156.
- Uno, Y., & Coyle, J. T. (2019). Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **73**(5), 204–215.
- Upthegrove, R., & Khandaker, G. M. (2020). Cytokines, Oxidative Stress and Cellular Markers of Inflammation in Schizophrenia. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, **44**, 49–66.
- van der Zwaal, E. M., Luijendijk, M. C., Evers, S. S., la Fleur, S. E., & Adan, R. A. (2010). Olanzapine affects locomotor activity and meal size in male rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **97**(1), 130–137.
- van Os, J., Bak, M., Hanssen, M., Bijl, R. V., de Graaf, R., & Verdoux, H. (2002). Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. *American Journal of Epidemiology*, **156**(4), 319–327.

- Vita, A., Mussoni, C., Deste, G., Ferlenghi, G., Turrina, C., & Valsecchi, P. (2018). Psychopharmacological treatment of cognitive deficits in Schizophrenia and mood disorders. *Official Journal of the Italian Society of Psychopathology*, **24**, 62–72.
- Vollenweider, F. X., Vontobel, P., Hell, D., & Leenders, K. L. (1999). 5-HT modulation of dopamine release in basal ganglia in psilocybin-induced psychosis in man--a PET study with [11C]raclopride. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **20(5)**, 424–433.
- Vollenweider, F. X., Vontobel, P., Oye, I., Hell, D., & Leenders, K. L. (2000). Effects of (S)-ketamine on striatal dopamine: a [11C]raclopride PET study of a model psychosis in humans. *Journal of Psychiatric Research*, **34(1)**, 35–43.
- Wang, C. H., Li, Y., Yang, J., Su, L. Y., Geng, Y. G., Li, H., Wang, J. K., & Mu, J. L. (2013). A randomized controlled trial of olanzapine improving memory deficits in Han Chinese patients with first-episode schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **144(1-3)**, 129–135.
- Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **2**, 12.
- Wang, X., Liu, J., Dai, Z., & Sui, Y. (2021). Andrographolide improves PCP-induced schizophrenia-like behaviors through blocking interaction between NRF2 and KEAP1. *Journal of Pharmacological Sciences*, **147(1)**, 9–17.
- Wąsik, A., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2017). The mechanism of neuroprotective action of natural compounds. *Pharmacological Reports: PR*, **69(5)**, 851–860.
- Wąsik, A., Białoń, M., Jantas, D., & Żarnowska, M. (2021). The Impact of the Combined Administration of 1MeTIQ and MK-801 on Cell Viability, Oxidative Stress Markers, and Glutamate Release in the Rat Hippocampus. *Neurotoxicity Research*, **39(6)**, 1747–1761.
- Wąsik, A., Białoń, M., Żarnowska, M., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2019). Comparison of the effects of 1MeTIQ and olanzapine on performance in the elevated plus maze test and monoamine metabolism in the brain after ketamine treatment. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **181**, 17–27.
- Wąsik, A., Możdżeń, E., Michaluk, J., Romańska, I., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2014). 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous Neuroprotectant and MAO inhibitor with antidepressant-like properties in the rat. *Neurotoxicity Research*, **25(4)**, 323–334.

- Wąsik, A., Możdżeń, E., Romańska, I., Michaluk, J., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2013). Antidepressant-like activity of the endogenous amine, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in the behavioral despair test in the rat, and its neurochemical correlates: a comparison with the classical antidepressant, imipramine. *European Journal of Pharmacology*, **700(1-3)**, 110–117.
- Wąsik, A., Romańska, I., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2010). Important role of 3-methoxytyramine in the inhibition of cocaine sensitization by 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline: an in vivo microdialysis study. *Pharmacological Reports: PR*, **62(6)**, 983–997.
- Wąsik, A., Romańska, I., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2016). Comparison of the Effects of Acute and Chronic Administration of Tetrahydroisoquinoline Amines on the In Vivo Dopamine Release: A Microdialysis Study in the Rat Striatum. *Neurotoxicity Research*, **30(4)**, 648–657.
- Wąsik, A., Romańska, I., Michaluk, J., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2012). Comparative behavioral and neurochemical studies of R- and S-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline stereoisomers in the rat. *Pharmacological Reports : PR*, **64(4)**, 857–869.
- Wąsik, A., Romańska, I., Zelek-Molik, A., Nalepa, I., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2018). The Protective Effect of Repeated 1MeTIQ Administration on the Lactacystin-Induced Impairment of Dopamine Release and Decline in TH Level in the Rat Brain. *Neurotoxicity Research*, **34(3)**, 706–716.
- Watkins J. C. (1981). Pharmacology of excitatory amino acid transmitters. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, **29**, 205–212.
- Weinberger, D. R., Berman, K. F., & Daniel, D. G. (1992). Mesoprefrontal cortical dopaminergic activity and prefrontal hypofunction in schizophrenia. *Clinical Neuropharmacology*, **15 Suppl 1 Pt A**, 568A–569A.
- Wesseling, H., Want, E. J., Guest, P. C., Rahmoune, H., Holmes, E., & Bahn, S. (2015). Hippocampal Proteomic and Metabonomic Abnormalities in Neurotransmission, Oxidative Stress, and Apoptotic Pathways in a Chronic Phencyclidine Rat Model. *Journal of Proteome Research*, **14(8)**, 3174–3187.
- Williams, J. A., Burgess, S., Suckling, J., Lalouis, P. A., Batool, F., Griffiths, S. L., Palmer, E., Karwath, A., Barsky, A., Gkoutos, G. V., Wood, S., Barnes, N. M., David, A. S., Donohoe, G., Neill, J. C., Deakin, B., Khandaker, G. M., Upthegrove, R., &

- PIMS Collaboration (2022). Inflammation and Brain Structure in Schizophrenia and Other Neuropsychiatric Disorders: A Mendelian Randomization Study. *JAMA Psychiatry*, **79**(5), 498–507.
- Williams, T., Hattingh, C. J., Kariuki, C. M., Tromp, S. A., van Balkom, A. J., Ipser, J. C., & Stein, D. J. (2017). Pharmacotherapy for social anxiety disorder (SAnD). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, **10**(10), CD001206.
 - World Health Organization (16 stycznia 2022). Schizophrenia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>
 - Wu, Z., Zhang, X. Y., Wang, H., Tang, W., Xia, Y., Zhang, F., Liu, J., Fu, Y., Hu, J., Chen, Y., Liu, L., Chen, D. C., Xiu, M. H., Kosten, T. R., & He, J. (2012). Elevated plasma superoxide dismutase in first-episode and drug naive patients with schizophrenia: inverse association with positive symptoms. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **36**(1), 34–38.
 - Xiao, X., Xu, X., Li, F., Xie, G., & Zhang, T. (2019). Anti-inflammatory treatment with β -asarone improves impairments in social interaction and cognition in MK-801 treated mice. *Brain Research Bulletin*, **150**, 150–159.
 - Yamakawa, T., & Ohta, S. (1997). Isolation of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-synthesizing enzyme from rat brain: a possible Parkinson's disease-preventing enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **236**(3), 676–681.
 - Yamakawa, T., & Ohta, S. (1999). Biosynthesis of a parkinsonism-preventing substance, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, is inhibited by parkinsonism-inducing compounds in rat brain mitochondrial fraction. *Neuroscience Letters*, **259**(3), 157–160.
 - Yan, Q. S., Reith, M. E., Jobe, P. C., & Dailey, J. W. (1997). Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats. *Brain Research*, **765**(1), 149–158.
 - Yeragani, V. K., Tancer, M., Chokka, P., & Baker, G. B. (2010). Arvid Carlsson, and the story of dopamine. *Indian Journal of Psychiatry*, **52**(1), 87-88.
 - Yu, W., Fang, H., Zhang, L., Hu, M., He, S., Li, H., & Zhu, H. (2021). Reversible Changes in BDNF Expression in MK-801-Induced Hippocampal Astrocytes Through NMDAR/PI3K/ERK Signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **15**, 672136.

- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Gu, Z., Feng, J., & Yan, Z. (2005). Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**(23), 5488–5501.
- Yui, K., Ikemoto, S., Ishiguro, T., & Goto, K. (2000). Studies of amphetamine or methamphetamine psychosis in Japan: Relation of methamphetamine psychosis to schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **914**, 1–12.
- Zeni-Graiff, M., Rios, A. C., Maurya, P. K., Rizzo, L. B., Sethi, S., Yamagata, A. S., Mansur, R. B., Pan, P. M., Asevedo, E., Cunha, G. R., Zugman, A., Bressan, R. A., Gadelha, A., & Brietzke, E. (2019). Peripheral levels of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in youths in ultra-high risk for psychosis: a pilot study. *CNS Spectrums*, **24**(3), 333–337.
- Zhang, W. N., Bast, T., & Feldon, J. (2001). The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. *Behavioural Brain Research*, **126**(1-2), 159–174.
- Zhang, W., Perry, K. W., Wong, D. T., Potts, B. D., Bao, J., Tollefson, G. D., & Bymaster, F. P. (2000). Synergistic effects of olanzapine and other antipsychotic agents in combination with fluoxetine on norepinephrine and dopamine release in rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology: Official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **23**(3), 250–262.
- Zhang, Y., Catts, V. S., & Shannon Weickert, C. (2018). Lower antioxidant capacity in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, **52**(7), 690–698.
- Zhao, X., Newcomb, J. K., Pike, B. R., Wang, K. K., d'Avella, D., & Hayes, R. L. (2000). Novel characteristics of glutamate-induced cell death in primary septohippocampal cultures: relationship to calpain and caspase-3 protease activation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **20**(3), 550–562.
- Zhou, S. J., Xue, L. F., Wang, X. Y., Jiang, W. G., Xue, Y. X., Liu, J. F., He, Y. Y., Luo, Y. X., & Lu, L. (2012). NMDA receptor glycine modulatory site in the ventral tegmental area regulates the acquisition, retrieval, and reconsolidation of cocaine reward memory. *Psychopharmacology*, **221**(1), 79–89.

- Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, **121(8)**, 799–817.
- Zoicas, I., & Kornhuber, J. (2019). The Role of the N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Social Behavior in Rodents. *International Journal of Molecular Sciences*, **20(22)**, 5599.