



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΜΣ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΣΥΝΙΣΤΩΣΕΣ  
ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΓΩΝΙΣΤΗ ΤΩΝ  $D_3/D_2$   
ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΡΟΠΙΝΙΡΟΛΗ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
Μαυρικάκη Μαρία-Υπακοή  
Α.Μ. 205  
*Επιβλέποντες Καθηγητές:*  
Παναγής Γεώργιος,  
Svenningsson Per

Ηράκλειο, 12/10/2010



*<sup>1</sup> Center of Molecular Medicine, Department of Physiology and Pharmacology,  
Section of Translational Neuropharmacology, Karolinska Institute, Sweden*

*<sup>2</sup> Εργαστήριο Νευροεπιστημών και Συμπεριφοράς, Τμήμα Ψυχολογίας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ρέθυμνο*



**Τριμελής Επιτροπή:**

- 1. Θερού Κυριακή, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας**
- 2. Καστελλάκης Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχοφυσιολογίας**
- 3. Μπίτσιος Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Ψυχιατρικής**



*Ποια διαμαντένια πολιτεία  
κοιμάται πίσω απ' τα βουνά;  
Ποια φώτα τρέμουν πέρα στη νύχτα  
και μας φωνάζουν;*

**Γιάννης Ρίτσος,  
από το «Εμβατήριο του Ωκεανού»**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Ι.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>10</b>
<b>1.Νόσος Parkinson: Συμπτωματολογία, παθοφυσιολογία και φαρμακοθεραπεία.....</b>	<b>10</b>
<b>2.Ντοπαμινεργικό Σύστημα: Ενδοκυττάρια διαβίβαση σήματος και η σημασία της φωσφορύλιωσης.....</b>	<b>15</b>
I.Πρώτο ενδοκυττάριο ντοπαμινεργικό μονοπάτι:	
Ενδοκυττάριο μονοπάτι εξαρτώμενο από πρωτεΐνη G -κυκλικό AMP.....	15
II.Δεύτερο ενδοκυττάριο ντοπαμινεργικό μονοπάτι:	
Ενδοκυττάριο μονοπάτι ανεξάρτητο από το κυκλικό AMP-Μεταφορά ενδοκυττάριου σήματος μέσω β-αρρεστίνης 2.....	18
III.Ντοπαμινεργική ρύθμιση των ERK/MAPK κινασών.....	22
<b>3.Έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων: <i>c-fos</i> και <i>arc</i>.....</b>	<b>24</b>
I. <i>c-fos</i> .....	26
II. <i>arc</i> .....	29
<b>4.Συμπεριφορικές επιδράσεις αγωνιστών της οικογένειας D<sub>2</sub> υποδοχέων:</b>	
A.Επιδράσεις στην κινητική δραστηριότητα.....	31
B.Επιδράσεις στην ενίσχυση-ανταμοιβή.....	33
Γ. Αγχόλυση.....	36
Δ. Αντικαταθλιπτικές δράσεις.....	38
E. Ανώτερες γνωστικές λειτουργίες: χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας.....	41
<b>II.ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>45</b>

<b>III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>48</b>
<b>A. Συμπεριφορικές μελέτες.....</b>	<b>48</b>
Υποκείμενα.....	48
1. Πειραματικές μελέτες καταγραφής της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας.....	48
2. Πειραματικές μελέτες ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.....	49
3. Πειραματικές μελέτες καταγραφής αγχώδους συμπεριφοράς στον υπερυψωμένο λαβύρινθο.....	53
4. Πειραματικές μελέτες καταγραφής καταθλιπτικής συμπεριφοράς με τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης .....	55
5. Πειραματικές μελέτες εκτίμησης γνωστικών λειτουργιών στον ακτινωτό λαβύρινθο.....	57
<b>B. Μοριακές μελέτες.....</b>	<b>62</b>
1. Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	62
2. In situ υβριδοποίηση.....	63
3. Μέτρηση και ανάλυση μοριακών δεδομένων.....	66
<b>Γ. Στατιστική ανάλυση.....</b>	<b>66</b>
<b>IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>67</b>
<b>A. Συμπεριφορικές μ.ελέτες.....</b>	<b>67</b>
1. Πειραματικές μελέτες καταγραφής της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας.....	67

2. Πειραματικές μελέτες ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.....	68
3. Πειραματικές μελέτες καταγραφής αγχώδους συμπεριφοράς στον υπερυψωμένο λαβύρινθο.....	70
4. Πειραματικές μελέτες καταγραφής καταθλιπτικής συμπεριφοράς με τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης .....	72
5. Πειραματικές μελέτες εκτίμησης γνωστικών λειτουργιών στον ακτινωτό λαβύρινθο.....	73
<b>B. Μοριακές μελέτες.....</b>	<b>76</b>
1. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western.....	76
2. In situ υβριδοποίηση.....	80
<b>V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>82</b>
<b>A. Συμπεριφορικές μελέτες.....</b>	<b>82</b>
1. Αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα .....	82
2. Δράσεις στον ενδοκρανιακό αυτοερεθισμό.....	83
3. Αγχώδης συμπεριφορά.....	84
4. Αντικαταθλιπτικές Δράσεις.....	86
5. Γνωστικές λειτουργίες.....	86
<b>Σύνοψη συμπεριφορικών δεδομένων.....</b>	<b>88</b>
<b>B. Μοριακά ευρήματα.....</b>	<b>89</b>
<b>ΒΙ. Επιδράσεις σε ενδοκυττάρια μονοπάτια διαβίβασης σήματος.....</b>	<b>89</b>
ΒΙ1. Επιδράσεις στο ενδοκυττάριο μονοπάτι του κυκλικού AMP.....	89
ΒΙ2. Επιδράσεις στο ενδοκυττάριο μονοπάτι των Akt/GSK-3β.....	91
ΒΙ3. Επιδράσεις στο ενδοκυττάριο μονοπάτι των MAPK.....	92



<b>ΒΙΙ. Επιδράσεις στην έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων.....</b>	<b>93</b>
ΒΙΙ1. Επιδράσεις στο mRNA του <i>c-fos</i> .....	93
ΒΙΙ2. Επιδράσεις στο mRNA του <i>arc</i> .....	93
Σύνοψη μοριακών δεδομένων.....	94
<b>Γ. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>95</b>
<b>VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>100</b>
<b>VI. ABSTRACT.....</b>	<b>101</b>
<b>VII. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</b>	<b>103</b>
<b>VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>104</b>

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Νόσος Parkinson: Συμπτωματολογία, παθοφυσιολογία και φαρμακοθεραπεία

Η κυρίαρχη συμπτωματολογία της νόσου Parkinson χαρακτηρίζεται από τρόμο ηρεμίας, υποκινησία, ακαμψία και διαταραχές βάδισης. Η νόσος Parkinson κατηγοριοποιείται στις διαταραχές της κίνησης αλλά έχει επίσης συσχετιστεί με ποικίλες γνωστικές και συναισθηματικές διαταραχές κυριότερη εκ των οποίων είναι η κατάθλιψη (Parkinson, 1817). Μάλιστα, αυξανόμενα επιδημιολογικά δεδομένα και κλινικές μελέτες στηρίζουν την ύπαρξη πρόδρομων συμπτωμάτων μη σχετιζόμενων με τα κλασικά κινητικά χαρακτηριστικά της νόσου κατά την αποκαλούμενη προκινητική φάση. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από καταθλιπτική συμπτωματολογία, άγχος και γνωστικά ελλείμματα (Tadaiesky et al., 2008).

Κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου φαίνεται ότι τα καταθλιπτικά συμπτώματα παρουσιάζονται περίπου στο 40% των ασθενών (Migueluez et al., 2010; Tadaiesky et al., 2008). Παρόλα αυτά πιστεύεται ότι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφάνιση των συμπτωμάτων αυτών διαφέρουν από την παθοφυσιολογία των διαταραχών του συναισθήματος (Tadaiesky et al., 2008) και η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων ενδεχομένως αποτελεί έναν από τους υποκείμενους μηχανισμούς (Migueluez et al., 2010). Επιπροσθέτως, πάνω από το 40% των ασθενών με νόσο Parkinson υποφέρουν από κλινικά σημαντικό άγχος. Τέλος, γνωστικά ελλείμματα παρατηρούνται στο 15-20% των ασθενών με νόσο Parkinson. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι τα μείζονα γνωστικά ελλείμματα αφορούν την απόκτηση νέων διαδικαστικών μνημών γεγονός που οφείλεται σε αλλαγές της λειτουργίας του ραβδωτού (Tadaiesky et al., 2008).

Κύρια νευροχημική ανωμαλία στη νόσο Parkinson είναι τα μειωμένα επίπεδα ντοπαμίνης του εγκεφάλου που οφείλονται κυρίως αλλά όχι αποκλειστικά στην εκφύλιση ντοπαμινεργικών νευρώνων της μελαινοραβδωτής οδού (Migueluez et al., 2010; Tassinigh et al., 1998). Συγκεκριμένα, παρατηρείται δυσλειτουργία και απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας με αποτέλεσμα την έλλειψη ντοπαμίνης στο ραβδωτό (Migueluez et al., 2010). Τα χαρακτηριστικά κινητικά συμπτώματα που απαιτούνται για την διάγνωση της νόσου Parkinson εμφανίζονται έπειτα από εκφύλιση του 58-64% των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας και του 60-80% των

ντοπαμινεργικών νευρώνων του ραβδωτού (Tissinhigh et al., 1998). Μάλιστα, η κλινική διάγνωση της νόσου τίθεται περίπου 4-6 χρόνια μετά την έναρξη της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Αν και τα αίτια της εκφύλισης δεν είναι γνωστά φαίνεται ότι οι εμπλεκόμενοι παράγοντες είναι πολλαπλοί συμπεριλαμβανομένων γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων αλλά και της διεργασίας της γήρανσης.

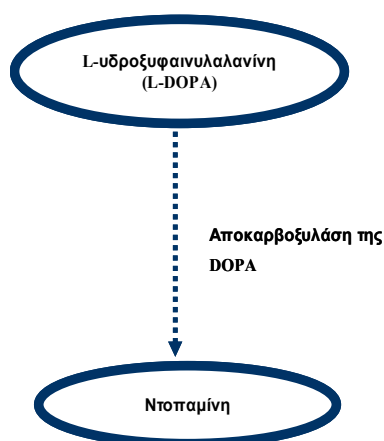
Παρόλο που σε μεγάλο ποσοστό η συμπτωματολογία της νόσου Parkinson οφείλεται στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων, η παθοφυσιολογία της νόσου είναι πιο ευρεία εμπλέκοντας νοραδρενεργικούς και σεροτονινεργικούς νευρώνες. Τα συστήματα αυτά επηρεάζονται από τα πρώτα στάδια της νόσου κατά την προκινητική φάση της διαταραχής (Dauer & Przedborski, 2003). Ο μεγαλύτερος πληθυσμός νοραδρενεργικών και σεροτονινεργικών νευρώνων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) βρίσκεται στον υπομέλανα τόπο και τους πυρήνες της ραφής αντίστοιχα και υπόκεινται νευροεκφυλισμού στους ασθενείς με νόσο Parkinson. Τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων αυτών στέλνουν νευράξονες σε περιοχές εμπλεκόμενες στην κατάθλιψη (Migueluez et al., 2010).

Παθολογικές μελέτες έχουν δείξει συσσώρευση σωματίων Lewy, δηλαδή συσσωματώσεων συνουκλείνης. Τα συσσωματώματα αυτά αρχικά ξεκινούν από το εγκεφαλικό στέλεχος και στη συνέχεια επεκτείνονται σε έξι στάδια. Στο πρώτο στάδιο εμπλέκεται ο ραχιαίος κινητικός πυρήνας πνευμονογαστρικού νεύρου, ενώ στο δεύτερο στάδιο παρουσιάζονται συσσωματώματα στους κατώτερους πυρήνες της ραφής, στο δικτυωτό σχηματισμό και τον υπομέλανα τόπο. Στο τρίτο στάδιο πλήττεται η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας. Στα στάδια 4-6 συσσωματώματα παρουσιάζονται στους θαλαμικούς πυρήνες που προβάλλουν από το ραβδωτό στον εγκεφαλικό φλοιό. Από παθοφυσιολογικής απόψεως στη νόσο Parkinson έχει παρατηθεί μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, οξειδωτικό στρες, διεγερσιτοξικότητα, απόπτωση, φλεγμονή και ανεπάρκεια πρωτεασώματος (Dauer & Przedborski, 2003).

Ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων είναι σταδιακός και κατά τα πρώτα στάδια μπορεί να ελεγχθεί από ποικίλα φάρμακα που διευκολύνουν τη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση (Dauer & Przedborski, 2003). Καθώς η ντοπαμίνη δεν περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου Parkinson. Για το λόγο αυτό, από τα τέλη της δεκαετίας του 1960, χρησιμοποιήθηκε θεραπευτικά η πρόδρομη ουσία της ντοπαμίνης, L-DOPA, η οποία διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δρα

θεραπευτικά στην αντιμετώπιση της ακινησίας, της υπέρτονίας και του τρόμου της νόσου (Victor & Ropper, 2003; Eden et al., 1990).

Εκτός από τα πρώτα στάδια εξέλιξης της νόσου και στα μετέπειτα στάδια της, σχεδόν όλοι οι ασθενείς λαμβάνουν ως θεραπεία L-DOPA (Katzenschlager et al., 2008) σε συνδυασμό με άλλες φαρμακοθεραπείες. Η L-DOPA μετατρέπεται σε ντοπαμίνη σε νευρώνες που έχουν το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της DOPA (ΣΧΗΜΑ E1), όπως οι κατεχολαμινεργικοί νευρώνες. Παρόλα αυτά, μακροχρόνια φαρμακοθεραπεία με L-DOPA οδηγεί σε ανάπτυξη αντοχής και ποικίλες ανεπιθύμητες ενέργειες (Dauer & Przedborski, 2003). Χαρακτηριστικό των διακυμάνσεων στην απόδοση είναι το φαινόμενο ‘on-off’ όπου κατά την ‘on’ φάση ο ασθενής βιώνει σοβαρή δυσκινησία και δυστονία, ενώ κατά την φάση ‘off’ παρατηρείται επανεμφάνιση της παρκινσονικής ακινησίας (Eden et al., 1990). Η χορήγηση L-DOPA φαίνεται ότι βελτιώνει και την καταθλιπτική συμπτωματολογία σε κάποιες περιπτώσεις ασθενών αλλά όχι σε άλλες (Migueliz et al., 2010).



**ΣΧΗΜΑ E1.** Η L-DOPA, που χρησιμοποιείται ως θεραπεία στη νόσο Parkinson, μετατρέπεται σε ντοπαμίνη παρουσία του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της DOPA.

Η δράση της L-DOPA ενισχύεται από αναστολείς της αποκαρβοξυλάσης της DOPA. Αναστολείς της αποκαρβοξυλάσης της DOPA όπως η καρβιντόπα και η βενσεραζίδη, οδηγούν σε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης ντοπαμίνης στον εγκέφαλο. Φάρμακα που αναστέλλουν το ένζυμο κατεχολο-μεθυλο-τρανσφεράση (COMT), όπως η τολκαπόνη επίσης παρατείνουν τη δράση της ντοπαμίνης (Victor & Ropper, 2003).

Παρόλα αυτά, μέχρι και σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία που να επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου. Αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης Β (MAO-B) έχει δειχθεί να

έχουν νευροπροστατευτικές δράσεις σε διάφορα ζωικά μοντέλα για τη νόσο Parkinson (Wu et al., 2000). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η σελεργιλίνη καθυστερεί την ανάπτυξη της συμπτωματολογίας της νόσου, αυξάνοντας όμως και την θνησιμότητα ενδεχομένως αλληλεπιδρώντας με το καρδιαγγειακό σύστημα (Katzenschlager et al., 2008).

Μελέτες των τελευταίων δύο δεκαετιών έχουν υποστηρίξει τη χρησιμότητα αγωνιστών των ντοπαμινεργικών υποδοχέων στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου Parkinson. Αρχικά αγωνιστές των ντοπαμινεργικών υποδοχέων χρησιμοποιήθηκαν ως συμπληρωματική θεραπεία στην L-DOPA, ενώ τελευταία χρησιμοποιούνται και ως μονοθεραπεία στα πρώτα στάδια της νόσου (Bonuccelli et al., 2009). Δεν υπάρχουν κλινικώς χρησιμοποιούμενοι αγωνιστές των D<sub>1</sub> υποδοχέων, αλλά αγωνιστές των D<sub>2</sub> υποδοχέων καθώς παρουσιάζουν ήπιο προφίλ δυσκινησίας. Μάλιστα, δυσκινησία έχει παρατηρηθεί έπειτα από παρατεταμένη χορήγηση D<sub>2</sub> ή D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> αγωνιστών, γεγονός που σχετίζεται όχι μόνο με τη φαρμακοδυναμική αλλά και τη φαρμακοκινητική των συγκεκριμένων φαρμάκων (Carta et al., 2008). Γενικότερα, η λογική της χρήσης άμεσων ντοπαμινεργικών αγωνιστών στη θεραπεία της νόσου Parkinson ήταν η αποφυγή των ανεπιθύμητων διαταραχών της κίνησης που οφείλονταν στη μακροχρόνια χορήγηση L-DOPA (Bonuccelli et al., 2009; Lledó, 2000; Edem et al., 1990). Κλινικές μελέτες με εργολίνες και μη-εργολίνες ντοπαμινεργικούς αγωνιστές όπως η αμπεργολίνη, περγολίδη, πραμιπεξόλη, κουινπιρόλη και ροπινιρόλη έχουν δείξει μικρότερη πιθανότητα κινητικών διακυμάνσεων και δυσκινησίας συγκριτικά με την L-DOPA όταν χρησιμοποιούνται ως μονοθεραπεία (Bonuccelli et al., 2009; Lledó, 2000). Παρόλα αυτά, το γεγονός του ότι οι ντοπαμινεργικοί αγωνιστές έχουν λιγότερες ανεπιθύμητες κινητικές επιπλοκές σχετίζεται και με μικρότερη αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση των κινητικών συμπτωμάτων σε σχέση με την L-DOPA. Επιπροσθέτως, οι άμεσοι ντοπαμινεργικοί αγωνιστές παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης παραισθήσεων, υπνηλίας και οιδήματος των ποδιών. Γενικά, οι εργολίνες (ergot) (βρωμοκρυπτίνη, καμπεργολίνη και περγολίδη) δεν συνιστούνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής στην αντιμετώπιση της νόσου καθώς παρουσιάζουν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες (Bonuccelli et al., 2009).

Η ροπινιρόλη είναι ένας αγωνιστής των ντοπαμινεργικών υποδοχέων που δεν ανήκει στις εργολίνες και αναπτύχθηκε για την αντιμετώπιση της νόσου Parkinson (Eden et al., 1990). Αποτελεί πλήρη και εκλεκτικό αγωνιστή για τους D<sub>3</sub>, D<sub>2</sub> και D<sub>4</sub>

υποδοχείς ενώ η εκλεκτικότητα της για τους D<sub>3</sub> υποδοχείς φαίνεται ότι είναι τουλάχιστον 10 (Rogers et al., 2000) με 20 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τους άλλους υποδοχείς της οικογένειας D<sub>2</sub> (Eden et al., 1991). Είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι D<sub>3</sub> υποδοχείς εκφράζονται κατά προτίμηση σε μεταχιακές περιοχές του προσθίου εγκεφάλου (Carr et al., 2002) συμπεριλαμβανομένων του επικλινούς πυρήνα και του προμετωπιαίου φλοιού (Southam et al., 2007) και ότι στις περιοχές αυτές εκφράζονται τόσο προσυναπτικά όσο και μετασυναπτικά (Zapata et al., 2007).

Αντίθετα, η συγγένεια της ροπινιρόλης με τους D<sub>1</sub> υποδοχείς είναι χαμηλή (Erichsen et al., 2010; Eden et al., 1991) και in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι δεν έχει καμία εκλεκτικότητα για τους υποδοχείς 5-HT, βενζοδιαζεπινών και γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), ενώ η συγγένειά της για τους α<sub>1</sub> και β αδρενεργικούς υποδοχείς είναι αμφιλεγόμενη (Eden et al., 1991).

Η ροπινιρόλη είναι ένας βραδείας δράσης αγωνιστής και για το λόγο αυτό έχει χαμηλότερο δυναμικό πρόκλησης δυσκινησίας σε σχέση με άλλους D<sub>2</sub> αγωνιστές (Carta et al., 2008). Λόγω του ότι δρα και σε D<sub>2</sub> υποδοχείς του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος (ΠΝΣ), μπορεί να επάγει συμπαθομιμητική αντίδραση οδηγώντας σε αύξηση της πίεσης καθώς και ναυτία. Οι ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες της ροπινιρόλης μπορούν εν μέρει να προληφθούν με σταδιακές μικρές αυξήσεις της δοσολογίας μέχρι τα επίπεδα να βρεθούν εντός του θεραπευτικού εύρους (Erichsen et al., 2010). Χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική θεραπεία στην L-DOPA αλλά και ως μονοθεραπεία στα πρώτα στάδια της νόσου Parkinson (Matheson & Spencer, 2000).

Στη θεραπεία της νόσου Parkinson χρησιμοποιούνται επίσης φάρμακα που δεν στοχεύουν άμεσα το ντοπαμινεργικό σύστημα. Καθώς φαίνεται ότι στη νόσο Parkinson παρατηρείται και δυσλειτουργία του χολινεργικού συστήματος, μεταξύ των φαρμάκων πρώτης επιλογής βρίσκονται και οι ανταγωνιστές των μουςκαρινικών υποδοχέων. Τα φάρμακα αυτά στοχεύουν στη ρύθμιση της ισορροπίας των επιπέδων ντοπαμίνης και ακετυλοχολίνης στο ραβδωτό σώμα. Καθώς στη νόσο Parkinson υπάρχει μειωμένη απελευθέρωση ντοπαμίνης από τη μέλαινα ουσία στο ραβδωτό, το αποτέλεσμα είναι άρση της αναστολής των νευρώνων που συνθέτουν ακετυλοχολίνη και κατ' επέκταση χολινεργική υπερδραστηριότητα (Victor & Ropper, 2003). Έτσι, τα αντιχολινεργικά αποκαθιστούν την ισορροπία αυτή και είναι αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση ποικίλων συμπτωμάτων και ιδίως του τρόμου ηρεμίας. Στα

σημαντικότερα προβλήματα που έχουν συγκαταλέγεται η παρεμπόδιση των γνωστικών λειτουργιών (Katzenschlager et al., 2003). Επιπλέον, σε προχωρημένες μορφές της νόσου έχουν χρησιμοποιηθεί ανταγωνιστές των NMDA υποδοχέων.

Εκτός των φαρμακοθεραπειών, για τη θεραπεία της νόσου Parkinson έχει χρησιμοποιηθεί ο εν τω βάθει ηλεκτρικός ερεθισμός (Deep Brain Stimulation-DBS) του υποθαλάμιου πυρήνα. Η θεραπεία αυτή θεωρείται η πλέον αποτελεσματική νευροχειρουργική θεραπεία για τις διαταραχές της κίνησης (Limousin et al., 1998). Πέραν της ηλεκτρικής διέγερσης του υποθαλάμιου πυρήνα, ηλεκτρικός ερεθισμός της έσω μοίρας της ωχράς σφαίρας έχει δείχθει να είναι αποτελεσματικός σε κάποιες περιπτώσεις ασθενών (Taba et al., 2010).

## **2. Ντοπαμινεργικό Σύστημα:**

### **Ενδοκυττάρια διαβίβαση σήματος και η σημασία της φωσφορύλιωσης**

Η ντοπαμίνη λειτουργεί ως μείζων νευροδιαβιβαστής ρυθμίζοντας την κίνηση (μελαινοραβδωτή οδός), τις συμπεριφορές κινητοποίησης (μεσομεταιχμιακή οδός) καθώς και τη μάθηση και μνήμη (μεσοφλοιϊκή οδός) (Tran et al., 2005). Επιπλέον, το ντοπαμινεργικό σύστημα δρα ρυθμιστικά στην ταχεία νευροδιαβίβαση των μείζονων διεγερτικών και ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών, του γλουταμινικού και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Για τους λόγους αυτούς φάρμακα που ρυθμίζουν τη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση έχουν χρησιμοποιηθεί στην αντιμετώπιση ποικίλων νευροψυχιατρικών διαταραχών συμπεριλαμβανομένης της σχιζοφρένειας, των συναισθηματικών διαταραχών, της νόσου Parkinson καθώς και της διαταραχής ελλειμματικής προσοχής-υπερκινητικότητας (ΔΕΠΥ) (Beaulieu et al., 2007).

### **I. Πρώτο ενδοκυττάριο ντοπαμινεργικό μονοπάτι:**

#### **Ενδοκυττάριο μονοπάτι εξαρτώμενο από πρωτεΐνη G -κυκλικό AMP**

Οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς (DAR) είναι μεταβολοτροπικοί και επομένως σχετίζονται με τη βραδεία μετάδοση σήματος. Οι υποδοχείς αυτοί είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (G-protein coupled receptors-GPCRs) και έχουν επτά διαμεμβρανικές

περιοχές (Kandel et al., 2004). Οι πρωτεΐνες G έχουν ονομαστεί έτσι λόγω της ικανότητάς τους να προσδένουν νουκλεοτίδια γουανίνης, διφωσφορική γουανοσίνη (GDP) και τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) (Nestler et al., 2008).

Η πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή στον υποδοχέα ενεργοποιεί την μεταγωγή πρωτεΐνη G γεγονός που θα οδηγήσει σε ένα «καταρράκτη» γεγονότων που συμβάλλουν στην βραδεία μεταφορά σήματος. Ουσιαστικά η πρωτεΐνη G είναι ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από τρεις υπομονάδες ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Η πρωτεΐνη G όταν είναι ανενεργή έχει προσδεμένο ένα μόριο GDP (Nestler et al., 2008; Kandel et al., 2004) και δεν είναι λειτουργικά συνδεδεμένη με τον υποδοχέα ή με ενδοκυττάριας πρωτεΐνες τελεστές. Η πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή στον υποδοχέα οδηγεί στην αλλαγή της χωροδιάταξής του, που οδηγεί σε αλληλεπίδραση στις  $\alpha$  υπομονάδας με τον υποδοχέα. Αυτή η αλληλεπίδραση αλλάζει τη διαμόρφωση της  $\alpha$  υπομονάδας και μειώνει την συγγένεια της για το GDP οδηγώντας σε προσάρτηση GTP, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης G (Nestler et al., 2008).

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί στη διάσπαση του τριμερούς της πρωτεΐνης G ( $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$  υπομονάδα) με αποτέλεσμα η  $\alpha$  υπομονάδα να προσδεθεί σε ένα ένζυμο τελεστή (στο μονοπάτι του κυκλικού AMP το ένζυμο αυτό είναι η αδενυλική κυκλάση) και το ένζυμο αυτό θα προκαλέσει ποικίλες ενδοκυττάριας μεταβολές είτε μέσω άμεσης πρόσδεσης σε πρωτεΐνη-στόχο είτε ενεργοποιώντας μια πρωτεϊνική κινάση που θα φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη στόχο. Κινάσες λέγονται όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιούν ATP ως δότη φωσφορυλομάδων και μπορούν να οδηγήσουν σε ενδυνάμωση σήματος φωσφορυλιώνοντας πολλαπλά υποστρώματα. Σε γενικές γραμμές, η έννοια της φωσφορυλίωσης είναι σημαντική αναφορικά με την ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος, καθώς η προσθήκη της φωσφορυλομάδας μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή της χωροδιάταξης μιας πρωτεΐνης ή ελάττωση ή αύξηση της συγγένειας ενός ενζύμου με τα υποστρώματά του. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω ρύθμιση της μηνυματοδότησης μέσω ανοίγματος και κλεισίματος ιοντικών διαύλων (Kandel et al., 2004). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μεταφορά σήματος δεν έχουμε μόνο μέσω της  $\alpha$  υπομονάδας όπως πιστεύαμε παλιότερα. Σήμερα γνωρίζουμε ότι και οι ελεύθερες  $\beta$  και  $\gamma$  υπομονάδες σχηματίζουν βιολογικά ενεργά σύμπλοκα που επίσης ρυθμίζουν ειδικές πρωτεΐνες τελεστές (Nestler et al., 2008).

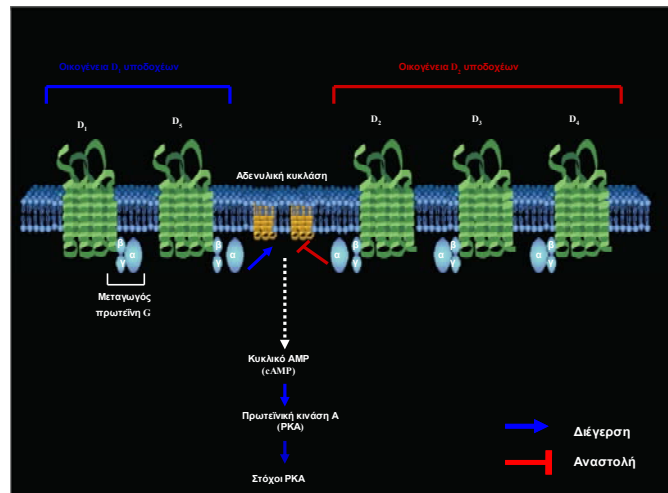
Η αδενυλική κυκλάση είναι ένα ένζυμο, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία καταλύει τη μετατροπή του ATP σε κυκλικό AMP (Kandel et al., 2004). Κλασικά, οι



δράσεις της ντοπαμίνης έχουν συσχετιστεί με τη δραστηριότητα του κυκλικού AMP (cAMP) και της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) τα οποία ενεργοποιούνται έπειτα από τη διέγερση της διαμεσολαβούμενης από την πρωτεΐνη G σηματοδότησης (ΣΧΗΜΑ E2). Η ντοπαμίνη ασκεί τις δράσεις της δρώντας σε δύο διαφορετικές οικογένειες υποδοχέων:

1. **την οικογένεια των D<sub>1</sub> υποδοχέων (D<sub>1</sub> και D<sub>5</sub>)** που είναι προσδεδεμένοι με G<sub>s</sub> πρωτεΐνες που διεγείρουν την δράση της αδενυλικής κυκλάσης και την παραγωγή κυκλικού AMP καθώς και τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Στα υποστρώματα της PKA περιλαμβάνονται ο μεταγραφικός παράγοντας CREB (cAMP response element-binding protein-στοιχείο απόκρισης στο κυκλικό AMP) και η εξαρτώμενη από τη ντοπαμίνη και το κυκλικό AMP φωσφοπρωτεΐνη 32 kDa (DARPP-32) που παίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση του μονοπατιού του κυκλικού AMP. Επιπλέον, η ρυθμιζόμενη από εξωκυττάριο σήμα πρωτεϊνική κινάση (extracellular signal-regulated kinase-ERK ή MAPK) έχει ταυτοποιηθεί ως σημαντικός μεσολαβητής του συγκεκριμένου μονοπατιού που σχετίζεται με τις οξείες και χρόνιες δράσεις ντοπαμινεργικών φαρμάκων.
2. **την οικογένεια των D<sub>2</sub> υποδοχέων (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> και D<sub>4</sub>)** που είναι προσδεδεμένοι με G<sub>i/o</sub> και ρυθμίζουν αρνητικά την παραγωγή κυκλικού AMP και την περαιτέρω μετάδοση σήματος. Η οικογένεια των D<sub>2</sub> υποδοχέων ρυθμίζει επιπλέον τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca<sup>2+</sup> δρώντας στους αντίστοιχους διαύλους ή διεγείροντας την απελευθέρωση των ενδοκυττάρων αποθηκών Ca<sup>2+</sup>. Η σηματοδότηση μέσω D<sub>2</sub> υποδοχέων περιλαμβάνει άλλο ένα σημαντικό μονοπάτι ανεξάρτητο από το κυκλικό AMP (Beaulieu et al., 2007) για το οποίο θα γίνει αναφορά στη συνέχεια.

Η διέγερση των D<sub>2</sub> υποδοχέων οδηγεί σε εξασθένηση της γλουταμινεργικής απόκρισης στο ραβδωτό και η δράση αυτή κατά βάση διαμεσολαβείται από αρνητική ρύθμιση των AMPA υποδοχέων. Η φωσφορυλίωση της GluR1 υπομονάδας φαίνεται ότι παίζει μείζονα ρόλο στη ρύθμιση της γλουταμινεργικής νευροδιαβίβασης. Η φωσφορυλίωση της GluR1 υπομονάδας στη Ser<sup>845</sup> είναι εκλεκτικά επαγόμενη από την PKA (Hakansson et al., 2006). Έτσι, μελέτη της φωσφορυλίωσης της GluR1 υπομονάδας στη Ser<sup>845</sup> αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δραστηριότητας της PKA.



**ΣΧΗΜΑ Ε2. Ντοπαμινεργικοί υποδοχείς-συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (DA GPCRs).**

Ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος: το μονοπάτι του κυκλικού AMP. Η οικογένεια των D<sub>1</sub> υποδοχέων διεγείρει την παραγωγή του δεύτερου αγγελιαφόρου κυκλικού AMP και την πρωτεϊνική κινάση A ενώ η οικογένεια των D<sub>2</sub> υποδοχέων ασκεί ανασταλτικές δράσεις.

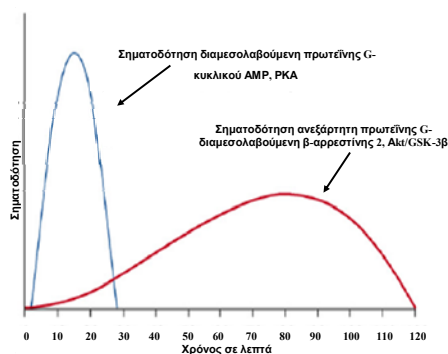
Αντίθετα, ανταγωνιστές των D<sub>2</sub> υποδοχέων αυξάνουν την φωσφορυλίωση της GluR1 υπομονάδας στη Ser<sup>845</sup>, ενώ αντίθετα, ο αγωνιστής των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουνιπρόλη μειώνει την φωσφορυλιωμένη GluR1 στη Ser<sup>845</sup> στο ραβδωτό (Hakansson et al., 2006).

**II. Δεύτερο ενδοκυττάριο ντοπαμινεργικό μονοπάτι:**

**Ενδοκυττάριο μονοπάτι ανεξάρτητο από το κυκλικό AMP-Μεταφορά ενδοκυττάριου σήματος μέσω β-αρρεστίνης 2**

Η σηματοδότηση που σχετίζεται με υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G «απενεργοποιείται» από μηχανισμούς που οδηγούν στην απευαισθητοποίηση του υποδοχέα, την ενδοκυττάρωσή του και τη λήξη της μετάδοσης σήματος. Η φωσφορυλίωση των υποδοχέων από τις πρωτεϊνικές κινάσες οδηγούν στην προσάρτηση πρωτεϊνών που λειτουργούν ως «σκάλες» (scaffolding), τις λεγόμενες αρρεστίνες. Δύο αρρεστίνες εκφράζονται στον εγκέφαλο θηλαστικών: η β-αρρεστίνη 1 και η β-αρρεστίνη 2. Η αλληλεπίδραση των αρρεστίνων με τον υποδοχέα οδηγεί στην προσάρτηση ενός ενδοκυττάριου συμπλόκου που θα συμβάλει στην ενδοκυττάρωση του υποδοχέα. Παρόλο που οι αρρεστίνες είχαν κατά βάση συνδεθεί

με απευαισθητοποίηση και ενδοκυττάρωση υποδοχέων, πρόσφατα δεδομένα στηρίζουν την ύπαρξη ενός δεύτερου, ανεξάρτητου από το κυκλικό AMP, μονοπατιού το οποίο διαμεσολαβούν οι β-αρρεστίνες (Beaulieu et al., 2007). Λόγω της προαπαιτούμενης αλληλουχίας των γεγονότων, δεν θα πρέπει να μας εκπλήσσει το γεγονός ότι παρουσιάζονται χρονικές διαφορές στη σηματοδότηση μέσω των δύο ενδοκυττάρων ντοπαμινεργικών συστημάτων (Βλ. ΣΧΗΜΑ Ε3).



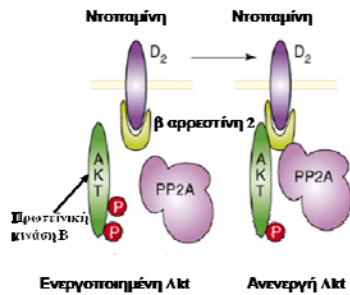
**ΣΧΗΜΑ Ε3.** Χρονικές διαφορές στην σηματοδότηση των δύο ντοπαμινεργικών μονοπατιών. Δράσεις έπειτα από τη χορήγηση αμφεταμίνης στο ραβδωτό ποντικίου (Beaulieu et al., 2007).

Η διέγερση του D<sub>2</sub> υποδοχέα οδηγεί στην προσάρτηση της β-αρρεστίνης 2 και στο σχηματισμό συμπλόκου που αποτελείται από τη β-αρρεστίνη 2, την PP2A και την πρωτεϊνική κινάση B ή Akt. Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού οδηγεί σε απενεργοποίηση της Akt από την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A) και κατ' επέκταση, ενεργοποίηση της σηματοδότησης που σχετίζεται με τη κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3 (GSK-3) (Freyberg et al, 2010; Beaulieu et al., 2007).

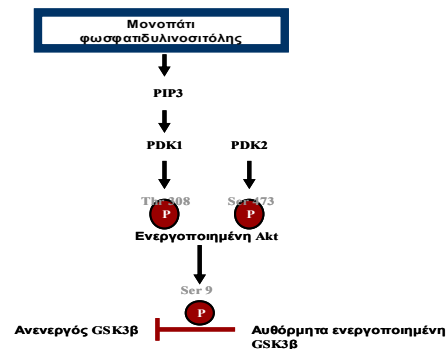
Η Akt είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία ρυθμίζεται μέσω του μονοπατιού της φωσφατιδυλνινοσιτόλης. Η ενεργοποίηση της Akt προϋποθέτει την προσάρτησή της στην πλασματική μεμβράνη από τη φωσφορυλιωμένη φωσφατιδυλνινοσιτόλη, τη φωσφορυλίωσή της σε ένα ρυθμιστικό κατάλοιπο θρεονίνης (Thr<sup>308</sup>) από την κινάση που εξαρτάται από την φωσφατιδυλνινοσιτόλη 1 (PDK1) και περαιτέρω φωσφορυλίωσή της σε ένα άλλο ρυθμιστικό κατάλοιπο σερίνης (Ser<sup>473</sup>) από την κινάση που εξαρτάται από την φωσφατιδυλνινοσιτόλη 2 (PDK2)/ mTOR σύμπλοκο (Freyberg et al., 2010; Beaulieu et al., 2009). Η Akt εμπλέκεται στην συναπτική πλαστικότητα, στο μεταβολισμό και στον κυτταρικό κύκλο (Freyberg et al., 2010), ενώ προάγει την κυτταρική επιβίωση μέσω αναστολής

της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, στον πυρήνα ελέγχει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση μέσω φωσφορυλίωσης μεταγραφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου του CREB (Brami-Cherrier et al., 2002).

I.



II.

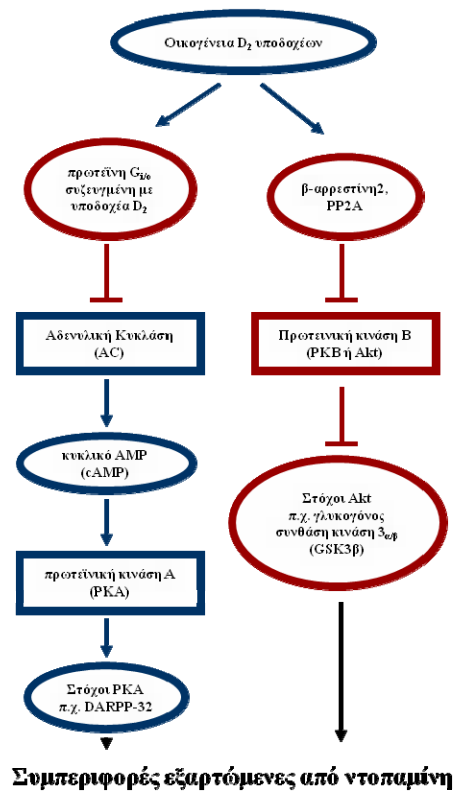


**ΣΧΗΜΑ. Ε4. I. Ντοπαμινεργικό μονοπάτι ανεξάρτητο από το κυκλικό AMP-Μεταφορά σήματος μέσω β-αρρεστίνης 2.** Η Akt είναι ενεργοποιημένη όταν είναι φωσφορυλιωμένη σε δύο ρυθμιστικά κατάλοιπα (Thr<sup>308</sup> και Ser<sup>473</sup>). Διέγερση των D2 υποδοχέων οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκου αποτελούμενο από την Akt, την PP2A και την β-αρρεστίνη 2, οδηγώντας σε αποφωσφορυλίωση της Akt (μεταφρασμένο από Beaulieu et al., 2007). **II. Σχηματική αναπαράσταση σηματοδότησης μέσω Akt/GSK3β.** Η ενεργοποιημένη Akt απενεργοποιεί την GSK3β φωσφορυλιώνοντάς την. PIP3=φωσφατιδυλινοσιτόλη (3,4,5)-τριφωσφάτη, PDK1= φωσφατιδυλινοσιτόλη 1, PDK2= φωσφατιδυλινοσιτόλη 2 (μεταφρασμένο από Beaulieu et al., 2009).

Οι GSK-3α και GSK-3β είναι δύο κινάσες αυθόρμητα ενεργές (constitutively active) και απενεργοποιούνται μέσω της φωσφορυλίωσής τους στη Ser<sup>21</sup> για την GSK-3α και Ser<sup>9</sup> για την GSK-3β. Έτσι η Akt απενεργοποιεί τις GSK-3α και GSK-3β φωσφορυλιώνοντάς τις (Beaulieu et al., 2009). Οι GSK-3 εμπλέκονται στη συναπτική πλαστικότητα, τη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής, στην ενδοκυττάρια «ταξινόμηση-διαλογή» (trafficking), την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση καθώς και την απόπτωση (Freyberg et al., 2010).

Η επαγόμενη από αμφεταμίνη αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων ντοπαμίνης οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση των D<sub>2</sub> μετασυναπτικών υποδοχέων, αυξημένη αποφωσφορυλίωση της Akt και κατ' επέκταση αυξημένη ενεργοποίηση της GSK-3. Έτσι, οι ψυχοδιεγερτικές επιδράσεις της αμφεταμίνης, τουλάχιστον εν μέρει, διαμεσολαβούνται από τη δραστηριότητα της GSK-3 όπως υποδεικνύεται και από

μελέτες όπου η χορήγηση αναστολέων της GSK-3β αναστέλλει την επαγόμενη από αμφεταμίνη υπερκινητικότητα (Freyberg et al., 2010). Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι μειωμένη φωσφορυλίωση της GSK-3 και άρα αυξημένη ενεργοποίησή της διαμεσολαβεί για τις ψυχοδιεγερτικές δράσεις ψυχοδιεγερτικών, όπως η αμφεταμίνη. Επιπλέον, η ρύθμιση της δραστηριότητας της GSK-3β έχει συσχετιστεί τόσο με αντικαταθλιπτικές όσο και με αντιμανιακές δράσεις και έχει συσχετιστεί με την θεραπευτική αποτελεσματικότητα των σταθεροποιητικών της διάθεσης στη διπολική διαταραχή (Catapano & Manji, 2008).



**ΣΧΗΜΑ Ε5. Συγκεντρωτική αναπαράσταση της σηματοδότησης μέσω D<sub>2</sub> υποδοχέων.** Διέγερση των D<sub>2</sub> υποδοχέων οδηγεί σε αναστολή του ενζύμου αδενυλική κυκλάση και κατ' επέκταση μειωμένη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης Α και μειωμένη φωσφορυλίωση της GluR1 υπομονάδας, των AMPA υποδοχέων, στη S<sup>845</sup>. Στη συνέχεια, οι αρρεστίνες συμβάλουν στη λήξη της μεταφοράς σήματος μέσω του μονοπατιού του κυκλικού AMP αλλά ενεργοποιούν τη μηνυματοδότηση μέσω ενός δεύτερου ενδοκυττάριου μονοπατιού μεταφοράς σήματος, καθώς σχηματίζουν το συμπλόκο β-αρρεστίνης 2, PP2A και Akt με αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση της Akt και την ενεργοποίηση της GSK-3β.

### III. Ντοπαμινεργική ρύθμιση των ERK/MAPK κινασών

Οι ERK κινάσες, ανήκουν στην οικογένεια των ενεργοποιούμενων από το μιτογόνο πρωτεϊνικών κινασών (MAPK) (Shiflett et al., 2008). Οι MAPK είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης που κλασικά συσχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση (μάλιστα η επαγωγή του άμεσου πρώιμου γονιδίου *arc* είναι εξαρτώμενη από τις MAPK) και τη συναπτική πλαστικότητα που υπόκειται της μάθησης-μνήμης καθώς και του εθισμού. Η δραστηριότητά τους ρυθμίζεται από τη διέγερση τόσο των D<sub>1</sub> όσο και των D<sub>2</sub> υποδοχέων (Brami-Cherrier et al., 2002).

Η διέγερση των D<sub>1</sub> υποδοχέων, επάγει τη δραστηριότητα της PKA η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει την MAPK κινάση μέσω της ενεργοποίησης της Rap-1 και της έκφρασης της B-Raf (Zhang & Xu, 2006). Αντίθετα, η ενεργοποίηση των D<sub>2</sub> υποδοχέων αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση και την PKA αλλά επάγει την ενεργοποίηση κινασών όπως η MAPK (Ahlgren-Beckendorf & Levant, 2004). Έτσι, φαίνεται ότι και η ενεργοποίηση της MAPK από τις οικογένειες D<sub>1</sub> και D<sub>2</sub> υποδοχέων διαμεσολαβείται από διαφορετικούς μηχανισμούς.

Η διαμεσολαβούμενη των D<sub>2</sub> υποδοχέων αύξηση της ενεργοποίησης της MAPK σχετίζεται με ενεργοποίηση της Ras πρωτεΐνης (Cussac et al., 1999; Luo et al., 1998) καθώς με ενεργοποίηση του μονοπατιού της φωσφατυλινοσιτόλης και συνακόλουθη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (Choi et al., 1999; Cussac et al., 1999). Έτσι, η MAPK κινάση αποτελεί σημαντικό υπόστρωμα και άλλων κινασών όπως η PKC, η οποία έχει εμπλακεί στην παθοφυσιολογία και τη θεραπεία της διπολικής διαταραχής (Catapano & Manji, 2008).

Επιπλέον, ένα από τα μείζονα μονοπάτια σχετιζόμενα με τη δραστηριότητα των MAPK κινασών είναι το ενδοκυττάριο μονοπάτι των νευροτροφινών. Οι νευροτροφίνες δρουν σε υποδοχείς κινάσες της τυροσίνης (Trk), διεγείροντας το διμερισμό τους και ενεργοποιώντας τους. Οι Trk υποδοχείς υπόκεινται αυτοφωσφορυλίωση όπου το ένα διμερές φωσφορυλιώνει το άλλο. Μετά την φωσφορυλίωσή του Trk υποδοχέα, ενεργοποιείται πρωτεΐνη G μικρού μοριακού βάρους (Ras πρωτεΐνη), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την Raf πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την MEK κινάση (Nestler et al., 2008). Οι MEK κινάσες ενεργοποιούν τις MAPK φωσφορυλιώνοντάς τις σε κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης και η διπλή φωσφορυλίωση στον

ενεργοποιητικό τους βρόγχο (activation loop) οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Αυτή η διπλή φωσφορυλίωση είναι εύκολο να εντοπιστεί με ειδικά αντισώματα που ουσιαστικά μας δίνουν τη δυνατότητα μέτρησης της δραστηριότητας των MAPK κινασών (Girault et al., 2007). Συγκεκριμένα η MAPK 44kDa (ERK1) ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση στις Thr<sup>202</sup> και Tyr<sup>204</sup> ενώ η MAPK 42kDa (ERK2) ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση στις Thr<sup>183</sup> και Tyr<sup>185</sup> [p44/42MAPK (p-ERK1/2)].

Τόσο ο αγωνιστής των D<sub>1</sub> υποδοχέων, SKF38393, όσο και ο αγωνιστής των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουνιπιρόλη ενεργοποιούν την ERK σε καλλιέργειες νευρώνων του ραβδωτού (Brami-Cherrier et al., 2002), ενώ και σε τομές εγκεφάλου έχειδειχθεί ότι η κουνιπιρόλη επάγει τη φωσφορυλίωση της MAPK (ERK) κινάσης. Η δράση αυτή της κουνιπιρόλης αναστέλλεται με την προ-χορήγηση του D<sub>2</sub> ανταγωνιστή ετικλοπρίδη γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η αύξηση της φωσφορυλίωσης της MAPK είναι διαμεσολαβούμενη από τον D<sub>2</sub> υποδοχέα (Yan et al., 1999). Η χρόνια χορήγηση του αγωνιστή των υποδοχέων της D<sub>2</sub> οικογένειας καμπεργκολίνη επίσης επάγει την ενεργοποίηση της ERK1 (Chiba et al., 2010). Ακόμα, η χορήγηση των εκλεκτικών αγωνιστών των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT και PD 128,907 έχειδειχθεί ότι επάγει την ενεργοποίηση της MAPK μέσω της PKC (Cussac et al., 1999). Επιπρόσθετες μελέτες που επιβεβαιώνουν ότι η κουνιπιρόλη αυξάνει την ενεργοποίηση της MAPK, υποδεικνύουν ότι στη συνέχεια η MAPK ρυθμίζει την δραστηριότητα του μεταφορέα ντοπαμίνης και κατ' επέκταση τα εξωκυττάρια επίπεδα ντοπαμίνης (Zapata et al., 2007). Έτσι, τα δύο ενδοκυττάρια μονοπάτια φαίνεται να αλληλεπιδρούν αμφίδρομα.

Παρόλα αυτά, πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι σε ποντίκια που έχουν εξαλειφθεί οι D<sub>3</sub> υποδοχείς, σε αντίθεση με τα ποντίκια στα οποία έχουν εξαλειφθεί οι D<sub>1</sub> υποδοχείς, παρουσιάζεται κανονική ενεργοποίηση της δραστηριότητας του μονοπατιού της MAPK στην περιοχή του ιππόκαμπου κατά τη διαδικασία εκμάθησης του υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris (Morris Water Maze-MWM). Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν την υπόθεση της εμπλοκής των D<sub>1</sub> αλλά όχι των D<sub>3</sub> υποδοχέων στη ρύθμιση του μονοπατιού της MAPK στην περιοχή του ιππόκαμπου (Xing et al., 2010).

Συμπερασματικά, η δραστηριότητα της MAPK επάγεται τόσο από την ενεργοποίηση υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G όσο και από την

ενεργοποίηση των Trk υποδοχέων ενώ υπάρχουν πολλά δεδομένα που στηρίζουν και την ντοπαμινεργική ρύθμιση της δραστηριότητάς της.

### 3. Έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων: *c-fos*, *arc*

Αν και οι νευροδιαβιβαστές ασκούν βραχυπρόθεσμες δράσεις ρυθμίζοντας ιοντικούς διαύλους και μεταβολοτροπικούς υποδοχείς, ασκούν και πιο μακροπρόθεσμες δράσεις ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων (Yan et al., 1999; Martin & Magistretti, 1998). Με βάση την κινητική της ενεργοποίησης και τη δραστηριότητά τους στο κύτταρο τα γονίδια αυτά μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κύριες κατηγορίες:

1. Πρώιμα άμεσα γονίδια (Immediate Early Genes-IEGs)
2. Γονίδια καθυστερημένης απόκρισης (Late Response Genes-LRGs)

Τα βασικά επίπεδα των πρώιμων άμεσων γονιδίων είναι χαμηλά σε κύτταρα που δεν δέχονται κάποιο ερέθισμα (Martin & Magistretti, 1998). Τα πρώιμα άμεσα γονίδια είναι γονίδια τα οποία ενεργοποιούνται ταχύτατα και παροδικά ως αντίδραση σε ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Kovacs et al., 2001; Martin & Magistretti, 1998; Panagis et al., 1997). Έτσι, η έκφραση των πρώιμων άμεσων γονιδίων μπορεί να αποτελέσει μια έμμεση ένδειξη αλλαγών στη για τη συναπτική διαβίβαση (Dassesse et al., 1999).

Τα γονίδια αυτά αποτελούν έναν σταθερό πρώτης γραμμής μηχανισμό αντίδρασης ο οποίος ενεργοποιείται πριν και ανεξάρτητα από τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών και πιστεύεται ότι διαμεσολαβείτε από την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο CREB (Martin & Magistretti, 1998). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων της οικογένειας D<sub>1</sub> και D<sub>2</sub>, μέσω διακριτών μηχανισμών, οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα CREB που συνεπάγεται την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων. Οι D<sub>1</sub> υποδοχείς αυξάνουν την φωσφορυλίωση του CREB μέσω της ενεργοποίησης της PKA, ενώ οι D<sub>2</sub> υποδοχείς που μειώνουν την



παραγωγή του κυκλικού AMP, αυξάνουν την φωσφορυλίωση του CREB μέσω του μονοπατιού της φωσφατιδυλινοσιτόλης (Brami-Cherrier et al., 2002).

Τα περισσότερα πρώιμα άμεσα γονίδια κωδικεύουν μεταγραφικούς παράγοντες που θεωρούνται ότι διεγείρουν την μετέπειτα μεταγραφή των γονιδίων καθυστερημένης απόκρισης. Τα πρώιμα άμεσα γονίδια διαφοροποιούνται από τα γονίδια καθυστερημένης απόκρισης, τα οποία ενεργοποιούνται μόνο μετά από τη σύνθεση των προϊόντων των πρώιμων άμεσων γονιδίων. Για το λόγο αυτό τα πρώιμα άμεσα γονίδια αποκαλούνται «πύλη της γενομικής αντίδρασης». Έτσι, ενώ η επαγωγή των πρώιμων άμεσων γονιδίων απαιτεί μερικά λεπτά, η επαγωγή των γονιδίων καθυστερημένης απόκρισης γίνεται μετά από μερικές ώρες (Martin & Magistretti, 1998).



**ΣΧΗΜΑ Ε6.** Επαγωγή πρώιμων άμεσων γονιδίων και γονιδίων καθυστερημένης απόκρισης από νευροδιαβιβαστές. Οι νευροδιαβιβαστές ρυθμίζουν συστήματα δεύτερων

αγγελιοφόρων (όπως είδαμε παραπάνω) οδηγώντας σε φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα του κυττάρου και διευκολύνοντας τη μεταγραφή γονιδίων. Με βάση την κινητική της ενεργοποίησής τους και τη λειτουργία τους στο κύτταρο, τα γονίδια που ρυθμίζονται από νευροδιαβιβαστές μπορούν να χωριστούν σε δύο γενικές κατηγορίες: τα πρώιμα άμεσα γονίδια όπως το *c-fos* και τα γονίδια καθυστερημένης απόκρισης όπως *ngf*. Τα πρώιμα άμεσα γονίδια κωδικεύουν κυρίως μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν εν μέρει την έκφραση των γονιδίων καθυστερημένης απόκρισης (Martin & Magistretti, 1998).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 40 πρώιμα άμεσα γονίδια και το *c-fos* αποτελεί ένα από τα πρώτα και καλύτερα χαρακτηρισμένα. Κάποια από αυτά τα γονίδια φαίνεται ότι εκφράζονται αυθόρμητα όπως το *arc* ενώ αντίθετα το *c-fos* δεν συγκαταλέγεται σε αυτή την κατηγορία γονιδίων (Ons et al., 2010).

## I. *c-fos*

Η έκφραση του πρώιμου άμεσου γονιδίου *c-fos* αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη νευρωνικής ενεργοποίησης καθώς το γονίδιο αυτό εκφράζεται όταν οι νευρώνες πυροδοτούν δυναμικά ενεργείας έπειτα από ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Cole & Di Figlia, 1994; Robertson et al., 1991). Έτσι, προς τα πάνω ρύθμιση του mRNA του *c-fos* ή αύξηση του προϊόντος του *c-fos*, δηλαδή της πρωτεΐνης Fos, υποδεικνύει χρονικά σχετιζόμενη νευρωνική δραστηριότητα. Για παράδειγμα, ο ενδοκρανιακός αυτοερεθισμός έχει δείχθει ότι αυξάνει εκλεκτικά την έκφραση της πρωτεΐνης Fos σε περιοχές σχετιζόμενες με τη συμπεριφορά ενίσχυσης-ανταμοιβής, όπως ο έσω προμετωπιαίος φλοιός και ο επικλινής πυρήνας αλλά δεν προκαλεί μεταβολές σε περιοχές μη σχετιζόμενες με το σύστημα ανταμοιβής όπως η μέλαινα ουσία και το ραχιαίο έσω ραβδωτό (Panagis et al., 1997).

Σε γενικές γραμμές, οι αλλαγές στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα οδηγούν στην έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων όπως το *c-fos* (Simpson & Morris, 1995). Παραδείγματος χάριν, η έκφραση του *c-fos* έχει βρεθεί αυξημένη σε περιοχές που προβάλλουν οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες, έπειτα από τη χορήγηση ποικίλων φαρμάκων (κοκαΐνη, αμφεταμίνη, μορφίνη, νικοτίνη) που αυξάνουν τα εξωκυττάρια επίπεδα ντοπαμίνης (Panagis et al., 1996). Θα πρέπει ωστόσο να σημειώσουμε ότι το

*c-fos* δεν επάγεται μόνο από τη ντοπαμίνη αλλά από τους περισσότερους νευροδιαβιβαστές (Martin & Magistretti, 1998).

Η ντοπαμίνη έχειδειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση του mRNA του *c-fos* σε καλλιέργειες νευρώνων του ραβδωτού ενώ η αύξηση αυτή αναπαράγεται με τη χορήγηση του αγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων SKF38393. Επιπλέον, η δράση αυτή της ντοπαμίνης αναστέλλεται με τη χορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων SCH23390 αλλά όχι με τη χορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>2</sub> υποδοχέων ετικλοπρίδη (Simpson & Morris, 1995). Έτσι, η σχετιζόμενη με τη ντοπαμίνη επαγωγή του *c-fos* στο ραβδωτό έχει συσχετιστεί με διέγερση των D<sub>1</sub> υποδοχέων (Wirtshafter & Osborn, 2005; Simpson & Morris, 1995; Robertson et al., 1991).

Παρόλα αυτά, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι και οι D<sub>3</sub> υποδοχείς ελέγχουν την έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων (Morris et al., 2000). Πειραματικά δεδομένα από χορηγήσεις ανταγωνιστών των D<sub>3</sub> υποδοχέων υποδεικνύουν παρόμοιο προφίλ επαγωγής του *c-fos* με τη d-αμφεταμίνη καθώς έχει βρεθεί αύξηση στην έκφραση του *c-fos* στον επικλινή πυρήνα έπειτα από τη χορήγηση του U99194A (Carr et al., 2002) και του SB-277011 (Southam et al., 2007) αλλά και στο ραχιαίο ραβδωτό έπειτα από τη χορήγηση του U99194A (Carr et al., 2002) και του RGH-1756 (Kovacs et al., 2001). Αντίθετα, το SB-277011 έχειδειχθεί ότι δεν επηρεάζει την έκφραση του *c-fos* στο ραβδωτό ή τον προμετωπιαίο φλοιό (Southam et al., 2007).

Ακόμα, ο εκλεκτικός αγωνιστής των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT έχειδειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση του *c-fos* κυρίως στην παρεγκεφαλίδα αλλά σε μεγάλες δόσεις και στον προμετωπιαίο φλοιό, ενώ σε μικρές δόσεις φαίνεται ότι μειώνει την έκφραση του *c-fos* στο ραβδωτό (Ishibashi et al., 2001). Στον αντίποδα, σε καλλιέργειες νευρώνων του ραβδωτού, το 7-OH-DPAT φαίνεται ότι αυξάνει την έκφραση του *c-fos* (Morris et al., 2000). Η δράση του 7-OH-DPAT στην έκφραση του *c-fos* στην παρεγκεφαλίδα φαίνεται ότι αναστέλλεται με τη χορήγηση αλοπεριδόλης αλλά όχι με τη χορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων SCH23390 (Ishibashi et al., 2001) υποδεικνύοντας ότι η επαγόμενη από το 7-OH-DPAT έκφραση του *c-fos* οφείλεται σε ενεργοποίηση της οικογένειας των D<sub>2</sub> υποδοχέων.

Ένας άλλος εκλεκτικός αγωνιστής των D<sub>3</sub> υποδοχέων το cis-8-OH-PBZI έχειδειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης Fos στον προμετωπιαίο φλοιό και στο κέλυφος του επικλινή πυρήνα (Scheideler et al., 1997). Επιπλέον, και ο αγωνιστής των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουινπιρόλη έχει βρεθεί ότι επάγει την έκφραση του *c-fos* στον προμετωπιαίο φλοιό (De Carolis et al., 2010).

Η κουινπιρόλη προκαλεί ακόμα μικρή αύξηση στο mRNA του *c-fos* σε καλλιέργειες νευρώνων του ραβδωτού. Τα ευρήματα όμως αναφορικά με τις επιδράσεις της κουινπιρόλης στην έκφραση του *c-fos* φαίνεται να είναι εν μέρει αντικρουόμενα, καθώς η συγχορήγηση του αγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων SKF38393 μαζί με κουινπιρόλη είχεδειχθεί ότι εξασθενεί την σχετιζόμενη με το SKF38393 επαγωγή του mRNA του *c-fos* (Simpson & Morris, 1995) ενώ σε άλλες μελέτες έχειδειχθεί ότι τα δύο φάρμακα ασκούν συνεργική δράση για την αύξηση του mRNA του *c-fos* (Alonso et al., 1999). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η κουινπιρόλη αναστέλλει στην επαγόμενη από καφεΐνη αύξηση στην έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων του *c-fos* και του *arc* (Dassesse et al., 1999), καθώς και την επαγόμενη από αγωνιστές μουσκαρινικών και σεροτονινεργικών υποδοχέων επαγωγή του *c-fos* στο ραβδωτό (Cook & Wirtshafter, 1998). Άλλες προσεγγίσεις προτείνουν ότι οι αγωνιστές των D<sub>1</sub> και D<sub>2</sub> υποδοχέων δρουν συνεργικά (Wirtshafter & Sheppard, 2003; Keefe & Gerfen, 2000; La Hoste et al., 1993) όμως δρουν ανεξάρτητα όταν χορηγούνται με φαρμακευτικές αγωγές που οδηγούν σε ευαισθητοποίηση στις επιδράσεις των ντοπαμινεργικών αγωνιστών (LaHoste et al., 1993).

Συμπερασματικά, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι εκτός από τους αγωνιστές των D<sub>1</sub> υποδοχέων, και οι αγωνιστές των D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> υποδοχέων επάγουν την έκφραση του *c-fos* κυρίως όμως σε μεταχιακές περιοχές όπως ο επικλινή πυρήνας και ο προμετωπιαίος φλοιός.

## II. *arc*

Το *arc* (ή *arg3.1*) ανήκει στην κατηγορία των πρώιμων άμεσων γονιδίων και (Braham et al., 2010; Molteni et al., 2009) έχει εμπλακεί στη συναπτική πλαστικότητα (Braham et al., 2008; Moro et al., 2007; Zachariou et al., 2006) τόσο σε επίπεδο δομικής αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού (Dassesse et al., 1999) όσο και σε επίπεδο λειτουργικών αλλαγών (Molteni et al., 2009). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν μάλιστα ότι το *arc* αποτελεί μείζον ρυθμιστή της πρωτεϊνικής σύνθεσης που σχετίζεται με συναπτική πλαστικότητα, χωρίς όμως να είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τους ακριβείς υποκείμενους μηχανισμούς (Braham et al., 2010).

Η ισχυρή συσχέτιση του *arc* με τη συναπτική πλαστικότητα, υποδεικνύεται και από το γεγονός ότι το νεοσυσταθέν mRNA που κωδικεύει το *arc* μεταφέρεται στους δενδρίτες ενώ συσσωρεύεται στις συναπτικές απολήξεις με πρόσφατη έντονη νευρωνική δραστηριότητα (Braham et al., 2010; Moro et al., 2007; Pei et al., 2000) όπου ρυθμίζει εκλεκτικά την έκφραση των AMPA υποδοχέων στις διεγερτικές συνάψεις, αυξάνοντας τον ρυθμό ενδοκύττωσης τους (Braham et al., 2010; Molteni et al., 2009; Braham et al., 2008) και μειώνοντας τον αριθμό τους στην πλασματική μεμβράνη, διαμεσολαβώντας με τον τρόπο αυτό τη μακρόχρονη «καταστολή» (Long-Term Depression- LTD) (Braham et al., 2010; Braham et al., 2008). Επιπλέον, η ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA καθώς και της ERK είναι απαραίτητα για τη μεταγραφή του γονιδίου του *arc* (Braham et al., 2010). Έτσι, το *arc* αποτελεί προϊόν μεταγραφής εξαρτώμενο και από το μονοπάτι της MAPK κινάσης (Xing et al., 2010).

Με βάση αυτά, δε θα έπρεπε να μας εκπλήσσει το γεγονός ότι το *arc* ρυθμίζεται σημαντικά σε περιοχές που συμμετέχουν στη μάθηση και τη μνήμη και εμπλέκεται στο σχηματισμό νέων έκδηλων και άδηλων μνημών, ενώ ακόμα σχετίζεται και με συμπεριφορές επεξεργασίας πληροφοριών (Molteni et al., 2009; Braham et al., 2008).

Επιπλέον, καθώς οι διαταραχές της διάθεσης έχουν συσχετιστεί με ελλείμματα στη συναπτική πλαστικότητα του εγκεφάλου, το *arc* έχει μελετηθεί και στο πλαίσιο αυτό και έχει εμπλακεί στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης. Ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί ο αναστολέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SERT), παρουσιάζουν καταθλιπτικό-μορφή συμπεριφορά καθώς και αυξημένα επίπεδα άγχους. Τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση mRNA του *arc* στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο (Molteni et al., 2009). Ωστόσο, τόσο η οξεία όσο και η χρόνια

χορήγηση φλουοξετίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση του *arc* στον προμετωπιαίο φλοιό. Αντίθετα, μόνο η χρόνια χορήγηση φλουοξετίνης φαίνεται ότι αυξάνει εκλεκτικά το mRNA του *arc* στον ιππόκαμπο (Nordheim Alme et al., 2007). Το *arc* έχει ακόμα εμπλακεί στην προσαρμογή στο χρόνιο στρες καθώς και στην υποκείμενη του εθισμού πλαστικότητα (Braham et al., 2010). Συμπερασματικά, το γονίδιο της *arc* φαίνεται ότι εμπλέκεται και σε συναισθηματικές πτυχές της συμπεριφοράς (Banerjee et al., 2009).



**ΣΧΗΜΑ Ε7. Λειτουργίες *arc*.** Το *arc* έχει μείζονα ρόλο στην συναπτική πλαστικότητα και την παγίωση της μνήμης ενώ υπάρχουν και στοιχεία που στηρίζουν την εμπλοκή του στη νευρογένεση, την κατάθλιψη καθώς και τον εθισμό, χωρίς όμως να γνωρίζουμε τους υποκείμενους μηχανισμούς (μεταφρασμένο από Braham et al., 2010).

Όπως προαναφέραμε, η μελέτη της έκφρασης των άμεσων πρώιμων γονιδίων στο ραβδωτό έχει προταθεί ως ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διαλεύκανση των επιδράσεων ντοπαμινεργικών φαρμάκων (Wirtshafter & Sheppard, 2003). Η επαγωγή του *arc* στο ραβδωτό επίμυον έχει προταθεί ότι μπορεί να συσχετίζεται με διατάραξη της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης από αναστολή των D<sub>2</sub> υποδοχέων (Bruins Slot et al., 2009; Wirtshafter & Sheppard, 2003; Dasselssse et al., 1999).

Επιπλέον, τόσο η αμφεταμίνη όσο και ο αγωνιστής των D<sub>1</sub> υποδοχέων SKF-38393 αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του *arc* στον προμετωπιαίο φλοιό (Moro et al., 2007). Η άμεση φαρμακολογική ενεργοποίηση του κυκλικού AMP από φορσκολίνη αυξάνει ραγδαία τα επίπεδα του mRNA του *arc* (Braham et al., 2010). Έτσι, έχει προταθεί ότι η επαγωγή του mRNA του *arc* σχετίζεται με διέγερση των D<sub>1</sub> υποδοχέων και συνακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού του κυκλικού AMP/PKA/CREB οδηγώντας σε σημαντικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων καθώς και συναπτική αναδιοργάνωση (Moro et al., 2007). Για το λόγο αυτό έχει υποστηριχθεί ότι οι αγωνιστές των D<sub>2</sub> υποδοχέων δεν επάγουν την έκφραση πρώιμων

άμεσων γονιδίων στο ραβδωτό και υπό κάποιες συνθήκες μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της έκφρασης τους (Wirtshafter & Sheppard, 2003).

Για παράδειγμα, η οξεία χορήγηση καφεΐνης, ανταγωνιστή των υποδοχέων αδενοσίνης, επάγει την έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων εκλεκτικά στο ραβδωτό (Svenningsson et al., 1995) συμπεριλαμβανομένου και του *arc*. Τόσο ο ανταγωνιστής των D<sub>1</sub> υποδοχέων SCH23390, όσο και ο αγωνιστής των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουνιπιρόλη φαίνεται ότι αναστέλλουν την επαγόμενη από καφεΐνη έκφραση του mRNA του *arc* στο ραβδωτό (Dassesse et al., 1999).

Εν κατακλείδι, το *arc* εμπλέκεται κατά βάση στη συναπτική πλαστικότητα καθώς και στη μάθηση-μνήμη. Στη βιβλιογραφία δεν φαίνεται να υπάρχουν πάρα πολλά δεδομένα αναφορικά με τις επιδράσεις των D<sub>2</sub> αγωνιστών στην έκφραση του *arc*. Ωστόσο, φαίνεται ότι η αύξηση της έκφρασής του σχετίζεται με ενεργοποίηση του μονοπατιού του κυκλικού AMP/PKA/CREB έπειτα από διέγερση D<sub>1</sub> υποδοχέων ή αναστολή των D<sub>2</sub> υποδοχέων.

#### **4. Συμπεριφορικές επιδράσεις αγωνιστών της οικογένειας D<sub>2</sub> υποδοχέων:**

##### **A. Επιδράσεις στην κινητική δραστηριότητα**

Όπως προαναφέρθηκε, το ντοπαμινεργικό σύστημα αποτελεί ένα από τα μείζονα νευροδιαβιβαστικά συστήματα που ελέγχουν την κίνηση. Η κινητική δραστηριότητα ποντικών στα οποία έχει εξαλείψει ο D<sub>1</sub> ή ο D<sub>2</sub> υποδοχέας, έχει βρεθεί ότι είναι μειωμένη (Tran et al., 2005), υποδεικνύοντας το μείζονα ρόλο της παρουσίας τόσο των D<sub>1</sub> όσο και των D<sub>2</sub> υποδοχέων για την ευόδωση της κίνησης.

Σε πειραματόζωα στα οποία δεν έχει προηγηθεί κάποιος πειραματικός χειρισμός (wild type), πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι αγωνιστές των D<sub>1</sub> υποδοχέων, όπως το SKF-81297 αυξάνουν την κινητική δραστηριότητα, ενώ αντίστοιχοι αγωνιστές των D<sub>3</sub> υποδοχέων όπως το 7-OH-DPAT και η κουνιρολάνη δεν επηρεάζουν σημαντικά την κινητική δραστηριότητα. (Moffett et al., 2010). Επιπροσθέτως, υπάρχουν μελέτες σε ποντίκια που υποστηρίζουν ότι και ο D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> αγωνιστής ροπινιρόλη δεν επηρεάζει την κινητική δραστηριότητα (Dhir & Kulkarni, 2007).

Ωστόσο, άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι αγωνιστές των D<sub>3</sub> υποδοχέων προκαλούν υποκινητικότητα μέσω ενεργοποίησης μετασυναπτικών υποδοχέων (Miller et al., 2000). Συγκεκριμένα, οι εκλεκτικοί αγωνιστές για τους D<sub>3</sub> υποδοχείς, cis-8-OH-PBZI (Fink-Jensen et al., 1998) και πραμιπεξόλη έχειδειχθεί ότι μειώνουν την κινητική δραστηριότητα σε ποντίκια (Chand et al., 2010). Αντιθέτως, η χρόνια χορήγηση πραμιπεξόλης (14 ημέρες) έχειδειχθεί ότι προκαλεί υπερκινητικότητα (Maj et al., 1997). Αντίστοιχα ευρήματα με την πραμιπεξόλη έχουν προκύψει και για τον αγωνιστή των υποδοχέων της D<sub>2</sub> οικογένειας καμπεργκολίνη ο οποίος φαίνεται ότι μειώνει την κινητική δραστηριότητα έπειτα από οξεία χορήγηση ενώ αντίθετα την αυξάνει έπειτα από χρόνια (14 ημέρες) χορήγηση (Chiba et al., 2010). Επίσης, η οξεία χορήγηση του μερικού αγωνιστή των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων αριπιπραζόλη έχει βρεθεί ότι μειώνει την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα επίμυων ενώ προλαμβάνει την επαγόμενη από αμφεταμίνη υπερκινητικότητα (Mavrikaki et al., 2010).

Σε ποντίκια που έχει εξαλειφθεί ο D<sub>2</sub> υποδοχέας, οι χαμηλές δόσεις αγωνιστών των D<sub>2</sub> υποδοχέων δεν μειώνουν την κινητική δραστηριότητα. Ωστόσο, η μείωση της κινητικής δραστηριότητας που προκαλείται από χαμηλές δόσεις αγωνιστών των D<sub>2</sub> υποδοχέων σε φυσιολογικά πειραματόζωα δεν αναστέλλεται με την προ-χορήγηση ανταγωνιστών των D<sub>2</sub> ή D<sub>3</sub> υποδοχέων (Li et al., 2010).

Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι αγωνιστές των D<sub>2</sub> υποδοχέων παρουσιάζουν διφασικό προφίλ καθώς σε χαμηλές δόσεις μειώνουν την κινητική δραστηριότητα σε τρωκτικά, γεγονός που έχει αποδοθεί στους προσυναπτικούς D<sub>2</sub> υποδοχείς, ενώ σε υψηλότερες δόσεις επαναφέρουν την κινητική δραστηριότητα στα φυσιολογικά επίπεδα (Li et al., 2010; Benaliouad, et al., 2009). Διφασικές δράσεις έχουνδειχθεί και για τον αγωνιστή των D<sub>3</sub> υποδοχέων PD 128907 όπου φαίνεται να μειώνει την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα σε χαμηλές δόσεις ενώ σε υψηλές δόσεις επιδεικνύει διεγερτικές δράσεις (Pugsley et al., 1995). Παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει διφασικές δράσεις της ροπινιρόλης στην κινητική δραστηριότητα σε ποντίκια όπου δόσεις μεταξύ 1-50mg/kg μειώναν την κινητική δραστηριότητα ενώ πολύ μεγάλες δόσεις (100mg/kg) προκαλούσαν αύξηση της κινητικότητας (Eden et al., 1991).

Σύμφωνα με τους Millan και συν. υπάρχουν διαφορές στις επιδράσεις της ροπινιρόλης στην κινητική δραστηριότητα επίμυων ανάλογα με την εξοικείωση των πειραματόζωων στους κλωβούς μέτρησης κινητικής δραστηριότητας. Πιο



συγκεκριμένα, τα 10mg/kg ροπινιρόλης αύξησαν την κινητική δραστηριότητα σε εξοικειωμένους (habituated) επίμυες ενώ σε μη-εξοικειωμένους επίμυες 0.63-10mg/kg ροπινιρόλης μείωσαν την κινητική δραστηριότητα. Τα δεδομένα τους επαληθεύονται και με μελέτες σε ποντίκια όπου τα 0.63mg/kg ροπινιρόλης μείωσαν την κινητική δραστηριότητα των πειραματοζώων (Millan et al., 2004).

Συμπερασματικά, οι επιδράσεις των D<sub>2</sub> αγωνιστών στην κινητικότητα φαίνεται ότι είναι δοσο-εξαρτώμενες και επηρεαζόμενες από ποικίλους παράγοντες. Τα ευρήματα στη βιβλιογραφία είναι εν μέρει αντικρουόμενα, καθώς υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι γενικότερα οι D<sub>2</sub> αγωνιστές -και ειδικότερα η ροπινιρόλη- δεν επηρεάζουν την κινητική δραστηριότητα και άλλες που στηρίζουν την υπόθεση διφασικών δράσεων με τις μικρές δόσεις να οδηγούν σε μείωση της κινητικότητας ενώ τις μεγάλες δόσεις να οδηγούν σε υπερκινητικότητα ή επαναφορά της κινητικότητας στα φυσιολογικά επίπεδα. Παρεμβαίνουσα μεταβλητή φαίνεται να είναι η εξοικείωση με τους κλωβούς της μέτρησης της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας καθώς τα 10mg/kg ροπινιρόλης έχει δειχθεί ότι αυξάνουν την κινητική δραστηριότητα σε εξοικειωμένα πειραματοζώα ενώ μειώνουν την κινητικότητα σε ζώα που εισέρχονται στους κλωβούς για πρώτη φορά.

## **B. Επιδράσεις στην ενίσχυση-ανταμοιβή**

Ο όρος ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Thorndike (1933) και Skinner (1933) εισηγητές της συντελεστικής μάθησης. Σύμφωνα με τον Skinner, η ενεργητική ενίσχυση αναφέρεται σε ένα ερέθισμα ή γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα μιας αντίδρασης, λειτουργώντας ουσιαστικά ως κίνητρο. Ο Thorndike εισάγει τον όρο ανταμοιβή ο οποίος αν και έχει παρόμοια σημασία με αυτή της ενίσχυσης, περικλείει περισσότερο την έννοια της ηδονής (Παναγής, 1998).

Η μελέτη των συμπεριφορών αυτών (ενίσχυση-ηδονή) γίνεται με το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτεθερισμού, το οποίο βασίζεται στην ανακάλυψη των Olds & Milner (1954) ότι ο άμεσος ηλεκτρικός ερεθισμός του εγκεφάλου μπορεί να είναι ιδιαίτερα ενισχυτικός και ότι επίμυες στους οποίους έχει εμφυτευθεί ηλεκτρόδιο σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου είναι σε θέση να μάθουν να πιέζουν ένα μοχλό σε ένα κλωβό συντελεστικής μάθησης (Skinner Box), για να αυτοερεθίσουν με

ηλεκτρικό ρεύμα την εν λόγω περιοχή. Οι περιοχές αυτές αποκαλέστηκαν από τον Olds «κέντρα ηδονής» (Παναγής, 1998; Παναγής, 2002).

Το καλύτερα μελετημένο κύκλωμα ανταμοιβής του εγκεφάλου αφορά σε ντοπαμινεργικά κυτταρικά σώματα που βρίσκονται στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο και προβάλλουν προς τον επικλινή πυρήνα (Nucleus Accumbens-NAc), τον προμετωπιαίο φλοιό καθώς και την αμυγδαλή και τον ιππόκαμπο. Αλλαγές στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα των περιοχών αυτών οδηγούν σε αλλαγές της αποτελεσματικότητας της ενίσχυσης του εγκεφαλικού αυτοερεθισμού (Panagis & Spyraiki, 1996). Η αμφεταμίνη, όπως και γενικότερα τα ψυχοδιεγερτικά, μειώνει τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού υποδεικνύοντας ενισχυτικές δράσεις, ενώ παράλληλα έχει την τάση να προκαλεί αύξηση στο μέγιστο ποσοστό αποκρίσεων των πειραματοζώων (ασύμπτωτος) (Mavrikaki et al., 2009). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι εξαρτησιογόνοι ουσίες επηρεάζουν τη συμπεριφορά ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού επιδρώντας στο νευρωνικό υπόστρωμα του ενισχυτικού εγκεφαλικού ερεθισμού (Παναγής, 2002; Panagis & Spyraiki, 1996).

Στο πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, ο αγωνιστής των D<sub>1</sub> υποδοχέων SKF-82958 έχει βρεθεί να έχει ενισχυτικές ιδιότητες ανάλογες με αυτές της κοκαΐνης (Gilliss et al., 2002). Ο αγωνιστής των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουινπιρόλη έχει υποστηριχθεί ότι σε χαμηλές δόσεις έχει ανηδονικές δράσεις (Benaliouad et al., 2009; Hatcher & Hagan, 1998), πιθανότατα δρώντας στους προσυναπτικούς D<sub>2</sub> υποδοχείς ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις αυξάνει την ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού. Τα παραπάνω καταδεικνύουν μια σαφή διφασική δράση (Benaliouad et al., 2009).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο αγωνιστής των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT ενώ μειώνει τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, υποδηλώνοντας ενισχυτικές δράσεις, μειώνει και την ασύμπτωτο, δράση αντίστροφος ανάλογη από αυτή της κοκαΐνης (Panagis & Spyraiki, 1996). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν ότι το 7-OH-DPAT δεν επηρεάζει τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού (Hatcher & Hagan, 1998) ενώ άλλες έχουν δείξει διφασικές δράσεις, όπου σε χαμηλές δόσεις μειώνει την ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού ενώ σε μεγάλες δόσεις την αυξάνει. Επιπλέον, η έρευνα αυτή υποδεικνύει ότι συγχορήγηση δόσεων του 7-OH-DPAT που μειώνουν την ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού, μαζί με αμφεταμίνη οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση του ουδού ενδοκρανιακού

αυτοερεθισμού και άρα αύξηση της επαγόμενης από αμφεταμίνη αποτελεσματικότητας της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού (Kling-Petersen et al., 1995)

Αντίθετα, τόσο ο ανταγωνιστής των  $D_1$  υποδοχέων SCH 23390 (Panagis & Spyragi, 1996) όσο και οι ανταγωνιστές των  $D_2$  υποδοχέων αλοπεριδόλη (Flagstad et al., 2006; Panagis & Spyragi, 1996), ρακλοπρίδη και σουλπριρίδη έχει δειχθεί ότι αυξάνουν τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού ενώ μειώνουν την ασύμπτωτο υποδηλώνοντας ανηδονικές δράσεις (Panagis & Spyragi, 1996). Αντίθετα, ο  $D_3$  ανταγωνιστής U99194A δεν επηρεάζει την ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού (Carr et al., 2002; Kling-Petersen et al., 1995) αλλά παρόλα αυτά αυξάνει της ενισχυτικές ιδιότητες της d-αμφεταμίνης (Carr et al., 2002). Ωστόσο, ποντίκια στα οποία έχουν εξαλειφθεί οι  $D_2$  υποδοχείς δεν παρουσιάζουν σημαντικά ελλείμματα στη συμπεριφορά του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, αντίθετα με τα ποντίκια στα οποία έχουν εξαλειφθεί οι  $D_1$  υποδοχείς όπου φαίνεται ότι η συμπεριφορά ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού παρεμποδίζεται σημαντικά (Tran et al., 2005).

Τέλος, ο μερικός αγωνιστής των  $D_2/D_3$  υποδοχέων αριπιπραζόλη αυξάνει δοσο-εξαρτώμενα τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού μειώνοντας την ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει την επαγόμενη από αμφεταμίνη αύξηση της αποτελεσματικότητας της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού (Mavrikaki et al., 2010).

Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι τόσο οι  $D_1$  όσο και οι  $D_2$  υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο σε διεργασίες ενίσχυσης-ανταμοιβής. Χορήγηση του ανταγωνιστή των  $D_1$  υποδοχέων SCH 23390 έχει δειχθεί ότι μειώνει την αυτοχορήγηση φυσικών ενισχυτών (τροφή, νερό) και ηρωίνης. Επιπλέον, η χορήγηση του ανταγωνιστή των  $D_2$  υποδοχέων ρακλοπρίδη έχει δειχθεί ότι μειώνει την αυτοχορήγηση τροφής και ηρωίνης υποδεικνύοντας ότι ενδεχομένως οι  $D_2$  υποδοχείς σχετίζονται και με το είδος του ενισχυτή, ενώ οι  $D_1$  υποδοχείς σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα των ενισχυτών (Nakajima, 1989; Nakajima & Baker, 1989).

Ωστόσο, διαφορετικές επιδράσεις έχουν βρεθεί για τους αγωνιστές των  $D_1$  και  $D_2$  υποδοχέων στο πρότυπο της εξαρτημένης προτίμησης θέσης το οποίο επίσης χρησιμοποιείται για την εκτίμηση ενισχυτικών ιδιοτήτων φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, αγωνιστές των  $D_1$  υποδοχέων όπως το SKF 81297 και το SKF 82958 έχει δειχθεί ότι προκαλούν εξαρτημένη προτίμηση θέσης ενώ οι  $D_2/D_3$  αγωνιστές

κουινπιρόλη και ο αγωνιστής των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT δεν έχουν καμία δράση (Graham et al., 2007).

Τέλος, σε ένα πρότυπο μειωμένης ενίσχυσης-μειωμένης κατανάλωσης σουκρόζης επαγόμενη από απόσυρση αμφεταμίνης, χορήγηση 1mg/kg ροπινιρόλης δύο φορές τη μέρα για τουλάχιστον 3 ημέρες ανέστρεψε την μειωμένη κατανάλωση σουκρόζης (Hoefler et al., 2006). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ροπινιρόλη μπορεί να αναστείλει την ανηδονία που έχει προκληθεί από την απόσυρση αμφεταμίνης επαναφέροντας τη δραστηριότητα του κυκλώματος ανταμοιβής σε φυσιολογικά επίπεδα και στηρίζει την υπόθεση ότι το φάρμακο αυτό επηρεάζει το εν λόγω κύκλωμα.

Ανακεφαλαιώνοντας, το ντοπαμινεργικό σύστημα παίζει μείζονα ρόλο στους μηχανισμούς ενίσχυσης-ανταμοιβής. Παρόλα αυτά, τα ευρήματά αναφορικά με τη δράση των αγωνιστών των D<sub>2</sub> υποδοχέων στο κύκλωμα ανταμοιβής του εγκεφάλου δεν είναι ξεκάθαρα. Στο πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού υπάρχουν μελέτες που στηρίζουν την υπόθεση ότι οι αγωνιστές αυτοί επιδεικνύουν διφασικές δράσεις με τις μικρές δόσεις να μειώνουν την ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού (ανηδονία) και τις μεγάλες να την αυξάνουν. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το προφίλ του εκλεκτικού αγωνιστή των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT, καθώς μειώνει τόσο τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού όσο και την ασύμπτωτο, αν και τα δεδομένα αναφορικά με τις δράσεις του στον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, φαίνεται να είναι αντικρουώμενα. Η ροπινιρόλη έχει δειχθεί ότι αναστρέφει την ανηδονία που προκαλείται από απόσυρση αμφεταμίνης, στο πρότυπο της κατανάλωσης σουκρόζης, υποδεικνύοντας ενδεχόμενη ρύθμιση του κυκλώματος από τον D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> αγωνιστή χωρίς όμως να έχει μελετηθεί η δράση του φαρμάκου στην ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού.

## **Γ. Αγχόλυση**

Αυξανόμενα στοιχεία στηρίζουν την εμπλοκή της ντοπαμίνης στην παθοφυσιολογία των αγχωδών διαταραχών (Leggio et al., 2010). Επιπλέον, κάποια συμπτώματα της νόσου Parkinson επιδεινώνονται από το άγχος, ενώ πολλοί ασθενείς με νόσο Parkinson παρουσιάζουν κλινικά σημαντικό άγχος. Για το λόγους αυτούς

είναι σημαντική η μελέτη της επίδρασης των ντοπαμινεργικών αγωνιστών στην αγχώδη συμπεριφορά (Rogers et al., 2000).

Το πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου αποτελεί ίσως το πλέον διαδεδομένο πρότυπο για τη μελέτη της αγχώδους συμπεριφοράς στα τρωκτικά. Η συσκευή που χρησιμοποιείται αποτελείται από δύο ανοιχτούς και δύο κλειστούς αντιδιαμετρικούς βραχίονες και τα πειραματόζωα, στα οποία δεν έχει προηγηθεί κάποιος πειραματικός χειρισμός τείνουν να παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους κλειστούς βραχίονες σε σχέση με τους ανοιχτούς. Φάρμακα τα οποία παρουσιάζουν αγχολυτική δράση αυξάνουν τον χρόνο παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες (Violle et al., 2009).

Η απομορφίνη επιδεικνύει αγχολυτικές δράσεις στο πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου (Zarrindast et al., 2010), ενώ ο αγωνιστής των D<sub>1</sub> υποδοχέων SKF 38393 δεν έχει βρεθεί να ασκεί σημαντική δράση στο πρότυπο αυτό (Rodgers et al., 1994). Ενδιαφέροντα ευρήματα υπάρχουν αναφορικά με τους αγωνιστές των υποδοχέων της D<sub>2</sub> οικογένειας. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι και ο αγωνιστής της οικογένειας D<sub>2</sub> υποδοχέων καμπεργκολίνη έχει αγχολυτικές δράσεις καθώς αυξάνει τον χρόνο παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες ενώ μειώνει τον χρόνο παραμονής στους κλειστούς βραχίονες (Chiba et al., 2010). Επιπλέον, ο εκλεκτικός αγωνιστής των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT επιδεικνύει αγχολυτικές δράσεις στο πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου (Rogóz et al., 2004; Rodgers et al., 1996). Οι δράσεις αυτές φαίνεται ότι είναι ανάλογες με της κουνιπιρόλης, υποδεικνύοντας ότι οι D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub> αγωνιστές έχουν παρόμοιο συμπεριφορικό προφίλ (Rodgers et al., 1996).

Οι Rogers και συν. έδειξαν αγχολυτική δράση της ροπινιρόλης στη δόση του 0.1mg/kg στον επίμου αξιοποιώντας το πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου. Χρησιμοποιώντας δόσεις που κυμαίνονταν από 0.01-1mg/kg έδειξαν ότι η ροπινιρόλη ασκεί αγχολυτικές δράσεις με μορφή καμπύλης ανεστραμμένου U, πάντα με τάση αγχόλυσης και με μέγιστη δράση στο 0.1mg/kg όπου η δράση γίνεται συγκρίσιμη με αυτή του 1.5mg/kg της διαζεπάμης. Στο πρότυπο του άσπρου/μαύρου κουτιού σε ποντίκια, που επίσης χρησιμοποιείται για την εκτίμηση ενδεχόμενων αγχολυτικών δράσεων φαρμάκων, η ροπινιρόλη (0.1-10mg/kg) αύξησε τον αριθμό των εισόδων στο άσπρο πεδίο του κουτιού υποδεικνύοντας αγχολυτική δράση που βρέθηκε όμως στατιστικά σημαντική μόνο στο 0.1mg/kg (Rogers et al., 2000).

Αντίθετα, σε μια πιο πρόσφατη έρευνα του Millan και συν. (2004) η ροπινιρόλη δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τις αγχώδεις συμπεριφορές στο πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου στις δόσεις των 0.01-10mg/kg (Millan et al., 2004).

Ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί ο  $D_3$  υποδοχέας επιδεικνύουν χαμηλά επίπεδα άγχους ενώ παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στις αγχολυτικές δράσεις της διαζεπάμης, στηρίζοντας την υπόθεση ότι οι  $D_3$  υποδοχείς εμπλέκονται στις αγχολυτικές δράσεις των βενζοδιαζεπινών (Leggio et al., 2010).

Τέλος, αναφορικά με τις δράσεις των ανταγωνιστών των ντοπαμινεργικών υποδοχέων, έχει δειχθεί ότι τόσο ο ανταγωνιστής των  $D_1$  υποδοχέων SCH23390 όσο και ο ανταγωνιστής των  $D_2$  υποδοχέων σουλπιρίδη ασκούν αγχογόνο δράση (Zarrindast et al., 2010). Αντιθέτως, ο ανταγωνιστής των  $D_4$  υποδοχέων L-741,741 δεν είχε καμία επίδραση στο πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου (Navarro et al., 2003).

Συμπερασματικά, υπάρχουν μελέτες που στηρίζουν την υπόθεση ότι οι αγωνιστές των  $D_2$  υποδοχέων ασκούν αγχολυτικές δράσεις στο πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου. Τόσο, οι  $D_2$  όσο και οι  $D_3$  αγωνιστές φαίνεται ότι παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ αναφορικά με την εν λόγω συμπεριφορά. Παρόλα αυτά, μια πιο πρόσφατη έρευνα (Millan et al., 2004) για τη ροπινιρόλη δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές αγχολυτικές δράσεις αν και στο παρελθόν αγχολυτικές δράσεις είχαν δειχθεί και για το φάρμακο αυτό (Rogers et al., 2000). Ενδιαφέρον πάντως παρουσιάζει το γεγονός ότι αν και οι υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με τις αγχολυτικές δράσεις των αγωνιστών των  $D_2$  υποδοχέων, καμία δε φαίνεται να έχει μετρήσει εθολογικές παραμέτρους στο πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου.

#### **Δ. Αντικαταθλιπτικές δράσεις**

Το πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τους Porsolt και συν. (1978) ως ένα νέο, απλό πρότυπο για τη μελέτη της καταθλιπτικής συμπεριφοράς και με απώτερο στόχο την ανάπτυξη νέων ουσιών με αντικαταθλιπτική δράση. Η δοκιμασία αυτή βασίστηκε στην παρατήρηση ότι επίμυες οι οποίοι εξαναγκάζονται να κολυμπήσουν σε περιορισμένο χώρο από τον οποίο δε

μπορούν να ξεφύγουν, κάνουν προσπάθειες να ξεφύγουν και στη συνέχεια παραμένουν ακίνητοι (immobile) πλην των απαιτούμενων κινήσεων ώστε να διατηρήσουν το κεφάλι τους πάνω απ το νερό. Σύμφωνα με τους Porsolt και συν. η ακινησία αυτή αντικατοπτρίζει την απόγνωση που χαρακτηρίζει την κατάθλιψη και μειώνεται με την χορήγηση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (Porsolt et al., 1978).

Επιπροσθέτως, η δοκιμασία αυτή μπορεί να προβλέψει την κλινική αποτελεσματικότητα διάφορων αντικαταθλιπτικών. Αν και όλα τα αντικαταθλιπτικά μειώνουν την ακινησία, οι ενεργητικές συμπεριφορές (αναρρίχηση και κολύμβηση), οι οποίες προστέθηκαν μετέπειτα στο αρχικό πρωτόκολλο των Porsolt και συν., φαίνεται ότι επηρεάζονται από διαφορετικά νευροδιαβιβαστικά συστήματα και κατ'επέκταση από διαφορετικά αντικαταθλιπτικά. Πιο συγκεκριμένα, οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors-SSRIs) αυξάνουν την κολυμβητική συμπεριφορά στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης, ενώ οι αναστολείς επαναπρόσληψης νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης οδηγούν σε αύξηση της συμπεριφοράς αναρρίχησης (Page et al., 1999; Rénéric & Lucki, 1998).

Η ντοπαμίνη φαίνεται ότι εμπλέκεται στις αντικαταθλιπτικές δράσεις νευροστεροειδών όπως η αλλοπρεγνανολόνη. Στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης η αλλοπρεγνανολόνη αυξάνει τις ενεργητικές συμπεριφορές όπως η κολύμβηση ενώ η συμπεριφορά αυτή αναστέλλεται με την προ-χορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>2</sub> υποδοχέων ρακλοπρίδη αλλά όχι με προ-χορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων SCH 23390 (D'Aquila et al., 2010). Τα ευρήματα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι το ντοπαμινεργικό σύστημα εμπλέκεται στις αντικαταθλιπτικές δράσεις φαρμάκων και οι D<sub>2</sub> υποδοχείς διαμεσολαβούν τις δράσεις αυτές (D'Aquila et al., 2010; Dhir & Kulkarni, 2007). Επιπροσθέτως, οι D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub> υποδοχείς έχουν εμπλακεί στην παθοφυσιολογία των συναισθηματικών διαταραχών λόγω της μεγάλης έκφρασής τους σε μεταιχμιακές περιοχές και του συνεντοπισμού τους με το σεροτονινεργικό σύστημα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Leggio et al., 2010; Dhir & Kulkarni, 2007).

Γενικά, οι ντοπαμινεργικοί αγωνιστές έχειδειχθεί ότι έχουν αντικαταθλιπτικές δράσεις (Chiba et al., 2010). Ο D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> αγωνιστής πραμιπεξόλη έχειδειχθεί κλινικά να βελτιώνει την καταθλιπτική συμπτωματολογία σε περιπτώσεις ανθεκτικής στη

θεραπεία κατάθλιψης (Kitagawa et al., 2009; Lattanzi et al., 2002; Corrigan et al., 2000). Επιπλέον, ηπραμιπεξόλη, μειώνει την ακινησία στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης στον επίμου (Kitagawa et al., 2009; Siuciak & Fujiwara, 2004; Maj et al., 1997) και ενισχύει τις αντικαταθλιπτικές δράσεις φαρμάκων όπως η ιμιπραμίνη και αμιτρυπτιλίνη (Maj et al., 1997). Η αντικαταθλιπτική δράση τηςπραμιπεξόλης φαίνεται ότι είναι εξαρτώμενη από την οικογένεια D<sub>2</sub> υποδοχέων καθώς αναστέλλεται με την προχορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>2</sub> υποδοχέων L-741,626 ή τη χορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>3</sub> υποδοχέων ναφαδοτρίδη (Kitagawa et al., 2009). Παρόλα αυτά, τα ευρήματα για την εμπλοκή των D<sub>3</sub> ή D<sub>2</sub> υποδοχέων φαίνεται να είναι αμφιλεγόμενα καθώς παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει ότι προχορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>2</sub> υποδοχέων αλοπεριδόλη ανέστειλε την αντικαταθλιπτική δράση τηςπραμιπεξόλης σε αντίθεση με την προχορήγηση του ανταγωνιστή των D<sub>3</sub> υποδοχέων LU-201640 που δεν είχε καμία επίδραση στην δράση τηςπραμιπεξόλης. Τα παραπάνω στηρίζουν την υπόθεση ότι μάλλον οι D<sub>2</sub> και όχι οι D<sub>3</sub> υποδοχείς εμπλέκονται στις αντικαταθλιπτικές δράσεις του φαρμάκου (Siuciak & Fujiwara, 2004).

Αντικαταθλιπτικές δράσεις έχουν δειχθεί και για τον αγωνιστή των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουινπιρόλη, καθώς αποδεδειγμένα μειώνει την ακινησία στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης (Brocco et al., 2006; Basso et al., 2005) ενώ αυξάνει και την συμπεριφορά αναρρίχησης (Basso et al., 2005). Επιπλέον και η απομορφίνη διαπιστώθηκε ότι διαθέτει αντικαταθλιπτικές δράσεις (Brocco et al., 2006), ενώ αντίθετα, οι αγωνιστές των D<sub>4</sub> υποδοχέων PD168077 και CP226269 δεν επηρεάζουν ούτε την ακινησία ούτε τις συμπεριφορές αναρρίχησης και κολύμβησης (Basso et al., 2005).

Μια άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη με το πρότυπο της εξαναγκασμένης χορήγησης έδειξε ότι ο αγωνιστής των υποδοχέων της D<sub>2</sub> οικογένειας καμπεργκολίνη (cabergoline) μειώνει την ακινησία ενώ αυξάνει τη συμπεριφορά αναρρίχησης χωρίς όμως να επηρεάζει την συμπεριφορά κολύμβησης έπειτα από οξεία χορήγηση. Αντίθετα, η χρόνια (14 μέρες) χορήγηση καμπεργκολίνης μειώνει την ακινησία και αυξάνει την συμπεριφορά κολύμβησης χωρίς όμως να επηρεάζει την συμπεριφορά αναρρίχησης (Chiba et al., 2010).



Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ο εκλεκτικός αγωνιστής των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT μειώνει την ακινησία στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης, ενώ επίσης ενισχύει τις αντικαταθλιπτικές δράσεις της μιπραμίνης (Rogóz et al., 2004). Στο ίδιο πρότυπο σε ποντίκια, 1mg/kg ροπινιρόλης μείωσε την ακινησία (immobility) επιδεικνύοντας αντικαταθλιπτικές δράσεις (Rogers et al., 2000). Επιπρόσθετες μελέτες σε επίμυες και ποντίκια με τη χρήση του προτύπου της εξαναγκασμένης κολύμβησης έδειξαν μείωση της ακινησίας στις δόσεις των 0.63-2.5mg/kg s.c. (Millan et al., 2004). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα των Dhir & Kulkarni (2007) όπου χρησιμοποιώντας τις δόσεις των 1-10mg/kg σε ποντίκια έδειξαν ότι η ροπινιρόλη ασκεί αντικαταθλιπτικές δράσεις σε μορφή S όπου το 1 και τα 10mg/kg επιδεικνύουν αντικαταθλιπτικές δράσεις ενώ τα 3mg/kg δεν έχουν καμία επίδραση.

Επιπλέον, οι αντικαταθλιπτικές δράσεις της ροπινιρόλης έχουν δειχθεί και κλινικά, καθώς φαίνεται να ενισχύει τις αντικαταθλιπτικές δράσεις φαρμάκων όπως τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά και οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Cassano et al., 2005).

Εν κατακλείδι, πολλές μελέτες στηρίζουν την υπόθεση ότι οι D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub> αγωνιστές έχουν αντικαταθλιπτικές δράσεις (Kitagawa et al., 2009; Dhir & Kulkarni, 2007; Brocco et al., 2006; Millan et al., 2004; Rogóz et al., 2004; Siuciak & Fujiwara, 2004; Rogers et al., 2000). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι η ροπινιρόλη μειώνει την ακινησία στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης (Dhir & Kulkarni, 2007; Millan et al., 2004; Rogers et al., 2000) χωρίς όμως να έχουν μετρήσει τις επιδράσεις της ροπινιρόλης στις ενεργητικές συμπεριφορές.

#### **Ε. Ανώτερες γνωστικές λειτουργίες: χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας**

Πειραματικά δεδομένα στηρίζουν την εμπλοκή του ντοπαμινεργικού συστήματος σε διεργασίες μάθησης και μνήμης. Ωστόσο, έχει υποστηριχθεί ότι η ντοπαμίνη ρυθμίζει τις διεργασίες μακρόχρονης ενδυνάμωσης (Long-Term Potentiation- LTP) και στο σχηματισμό νέων μνημών διεγείροντας τους D<sub>1</sub> υποδοχείς (Xing et al., 2010; Muzzio et al., 2009). Επιπλέον, αντίθετα με τα ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί ο D<sub>1</sub> υποδοχέας, ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί ο D<sub>3</sub>

υποδοχέας δεν φαίνεται να παρουσιάζουν ελλείμματα στην απόκτηση χωρικής μνήμης αναφοράς-μάθηση (Xing et al., 2010).

Αν και γενικές γραμμές αλλαγές στη δραστηριότητα του ντοπαμινεργικού συστήματος έχουν συσχετιστεί με αλλαγές των γνωστικών λειτουργιών (Mehta et al., 2005; Bushnell & Levin, 1993; Levin et al., 1990) υπάρχουν και ευρήματα που αντικρούουν την υπόθεση αυτή. Νευροψυχολογικές δοκιμασίες στον άνθρωπο, έχουν δείξει ότι ο  $D_2$  αγωνιστής βρωμοκρυπτίνη βελτιώνει τη χωρική μνήμη εργασίας (Mehta et al., 2001; Luciana et al., 1998), ενώ ο  $D_2$  ανταγωνιστής αλοπεριδόλη την παρεμποδίζει (Luciana et al., 2004). Αντίθετα, τόσο ο ανταγωνιστής των  $D_2$  υποδοχέων, σουλπριδία (Mehta et al., 2005) όσο και ο ανταγωνιστής των  $D_2/D_3$  υποδοχέων αμισουλπριδία αλλά και ο αγωνιστής των  $D_2/D_3$  υποδοχέων πραμιπεξόλη δε είχαν καμία επίδραση σε δοκιμασίες της χωρικής μνήμης εργασίας (Morein-Zamir et al., 2010; Barrett et al., 2004).

Σε δοκιμασία οπτικής χωρικής μνήμης εργασίας έχει δειχθεί ότι τόσο ο αγωνιστής των  $D_2/D_3$  υποδοχέων πραμιπεξόλη, όσο και ο αγωνιστής των  $D_1$  υποδοχέων περγολίδη βελτιώνουν την απόδοση στη δοκιμασία αυτή μόνο στον πληθυσμό που είχε χαμηλή απόδοση (low performers- βαθμολογία κάτω από τη διάμεσο) και όχι σε πληθυσμό υψηλής απόδοσης (high performers-βαθμολογία πάνω από τη διάμεσο) ασθενών με νόσο Parkinson (Costa et al., 2009).

Στα τρωκτικά, για τη μελέτη της χωρικής μνήμης αναφοράς και εργασίας χρησιμοποιείται παραλλαγή ενός ακτινωτού λαβυρίνθου, συχνά 8 βραχιόνων από τους οποίους μόνο οι μισοί βραχίονες λειτουργούν ως βραχίονες στόχοι: 4-βραχίονες στόχοι σε λαβύρινθο 8-βραχιόνων. Οι βραχίονες αυτοί παραμένουν σταθεροί καθ όλη τη διάρκεια της διαδικασίας και τρωκτικά μπορούν να εκπαιδευτούν στην εκμάθηση των 4 βραχιόνων στόχων έως ότου η μνήμη αυτή παγιωθεί (μακρόχρονη μνήμη αναφοράς). Καθώς η μνήμη αυτή σχετίζεται με την αντίληψη του χώρου και παγιώνεται με την παρουσία περιβαλλοντικών σινιάλων (cues) ονομάζεται χωρική μνήμη αναφοράς και αναφέρεται σε πληροφορίες που παραμένουν σταθερές καθ όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Αντίθετα με τη χωρική μνήμη αναφοράς, η χωρική μνήμη εργασίας αφορά πληροφορίες που αλλάζουν από δοκιμή σε δοκιμή και για το λόγο αυτό πρόκειται για μια πιο δυναμική μνήμη. Στην περίπτωση του ακτινωτού λαβύρινθου, η μνήμη αυτή συμβάλλει στην αποφυγή των επαν-εισόδων σε βραχίονες που το ζώο έχει επισκεφτεί ξανά στην τρέχουσα δοκιμή (Kay et al., 2010).

Ενδοεγκεφαλική έγχυση του αγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων διωδρεξιδίνη ή του ανταγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων SCH 23390 στον κοιλιακό υπόκαμπο δεν επηρεάζει σημαντικά τη χωρική μνήμη εργασίας στο πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου. Αντίθετα, ενδοεγκεφαλική έγχυση του αγωνιστή των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουνιπιρόλη βελτίωσε τη χωρική μνήμη εργασίας στον ακτινωτό λαβύρινθο, ενώ ο ανταγωνιστής των D<sub>2</sub> υποδοχέων ρακλοπρίδη παρεμπόδισε τη χωρική μνήμη εργασίας (Wilkerson & Levin, 1999).

Παρόλα αυτά τα ευρήματα σχετικά με τη δράση της κουνιπιρόλης στον ακτινωτό λαβύρινθο φαίνεται ότι είναι αντικρουώμενα. Αν και όπως προαναφέρθηκε ενδοεγκεφαλική χορήγηση κουνιπιρόλης στον κοιλιακό υπόκαμπο οδηγεί σε βελτίωση της χωρικής μνήμης εργασίας, παλιότερες μελέτες της ίδιας πειραματικής ομάδας είχαν δείξει ότι η συστηματική χορήγηση κουνιπιρόλης (LY 171555) αυξάνει τα λάθη μνήμης εργασίας ενώ ταυτόχρονα αυξάνει δοσο-εξαρτώμενα το χρόνο ολοκλήρωσης της δοκιμασίας, υποδεικνύοντας παρεμποδιστικές δράσεις του φαρμάκου (Levin & Bowman, 1986).

Επιπροσθέτως, η κουνιπιρόλη έχειδειχθεί ότι διευκολύνει την επαγόμενη από νικοτίνη, βελτίωση της μνήμης εργασίας ενώ αναστρέφει το έλλειμμα στη χωρική μνήμη εργασίας που προκαλείται από τη χορήγηση μεκαμυλαμίνης (Levin & Rose, 1995; Levin et al., 1994). Επιπλέον, η κουνιπιρόλη έχειδειχθεί ότι βελτιώνει την επαγόμενη από τον ανταγωνιστή των μουςκαρινικών υποδοχέων, σκοπολαμίνη, παρεμπόδιση της μνήμης εργασίας. Στο ίδιο πειραματικό πρότυπο, ο ανταγωνιστής των D<sub>1</sub> υποδοχέων SCH 23390 μπλόκαρε το έλλειμμα στη χωρική μνήμη εργασίας επαγόμενο από σκοπολαμίνη ενώ ο ανταγωνιστής των D<sub>2</sub> υποδοχέων ρακλοπρίδη δεν είχε καμία επίδραση (Levin, 1988).

Σε ένα άλλο πρότυπο παρεμπόδισης μνήμης εργασίας, επαγόμενο από διατομή του μέσου χολινεργικού μονοπατιού (η οποία έχειδειχθεί ότι προκαλεί ελλείμματα στο πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου), έχειδειχθεί ότι η χορήγηση του αγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων SKF 38393 ή του ανταγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων SCH 23390 ή της κουνιπιρόλης, εξασθενεί ή αναστρέφει το παρατηρούμενο έλλειμμα της μνήμης εργασίας. Αντίθετα, η χορήγηση ρακλοπρίδης δε φαίνεται να έχει ανάλογη δράση (McGurk et al., 1992). Τέλος, μελέτες εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης έδειξαν μειωμένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στον κοιλιακό υπόκαμπο έπειτα από τη

χορήγηση κουινπιρόλης, υποδεικνύοντας ότι τα δύο συστήματα αλληλεπιδρούν (Fujishiro et al., 2005).

Επιπλέον, η κουινπιρόλη, όπως και η απομορφίνη, έχει δειχθεί ότι συμβάλει στη διαδικασία απόκτησης νέων μνημών στο πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου. Πιο συγκεκριμένα, χορήγηση κουινπιρόλης ή απομορφίνης μετά την διαδικασία της εκπαίδευσης στον ακτινωτό λαβύρινθο συμβάλλει στη μάθηση και την παγίωση των πληροφοριών (White et al., 1993). Ωστόσο, ο αγωνιστής των D<sub>1</sub> υποδοχέων SKF 38393 δεν φαίνεται να είχε καμία δράση στην απόκτηση νέων μνημών στο πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου (Packard & White, 1989) αλλά ούτε επηρέασε την χωρική μνήμη αναφοράς στο πρότυπο του υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris (Amico et al., 2007). Επιπροσθέτως, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η αλοπεριδόλη παρεμποδίζει τη χωρική μνήμη αναφοράς και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι παρεμποδίζει τη χωρική μνήμη εργασίας. Αντίθετα, από την αλοπεριδόλη η αμφεταμίνη φαίνεται ότι παρεμποδίζει τη χωρική μνήμη εργασίας αλλά όχι τη χωρική μνήμη αναφοράς (Blokland et al., 1998).

Εν κατακλείδι, φαίνεται ότι δεν στηρίζουν όλα τα υπάρχοντα δεδομένα τον κυρίαρχο ρόλο των D<sub>2</sub> υποδοχέων στην μνήμη εργασίας (Costa et al., 2009) ενώ τα δεδομένα αναφορικά με τις επιδράσεις των ντοπαμινεργικών αγωνιστών στη χωρική μνήμη αναφοράς δε φαίνεται να είναι επαρκή. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία, νευροψυχολογικές δοκιμασίες στον άνθρωπο έχουν δείξει ότι ο αγωνιστής των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων πραμιπεξόλη δεν επηρεάζει τη χωρική μνήμη εργασίας (Morein-Zamir et al., 2010) αν και παλαιότερες μελέτες έδειχναν βελτίωση της χωρικής μνήμης εργασίας έπειτα από τη χορήγηση του αγωνιστή των D<sub>2</sub> υποδοχέων βρωμοκρυπτίνη (Mehta et al., 2001; Luciana et al., 1998). Στο πειραματικό πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου στον επίμυ τα ευρήματα σχετικά με τις δράσεις του αγωνιστή των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουινπιρόλη είναι αντικρουόμενα. Πάντως, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η κουινπιρόλη έχει δειχθεί ότι βελτιώνει ελλείμματα μνήμης εργασίας επαγόμενα από μεκαμυλαμίνη, σκοπολαμίνη και διατομή της μέσης χολινεργικής οδού, υποδεικνύοντας ενδεχόμενες ενισχυτικές δράσεις του φαρμάκου. Επιπλέον, η αλοπεριδόλη έχει δειχθεί ότι παρεμποδίζει τη χωρική μνήμη αναφοράς, εύρημα που εμπλέκει τους D<sub>2</sub> υποδοχείς και στη χωρική μνήμη αναφοράς.

Παρόλα αυτά, η δράση της ροπινιρόλης στο πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου δεν έχει μελετηθεί. Επιπροσθέτως, αν και στη βιβλιογραφία υπάρχουν

αναφορές για τη δράση των αγωνιστών των D<sub>2</sub> υποδοχέων στη χωρική μνήμη εργασίας, δεν υπάρχει κάποια δημοσιευμένη μελέτη που να αναφέρεται στη μελέτη χωρικής μνήμης αναφοράς στο πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου.

## II. ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη και ο συσχετισμός δράσεων του αγωνιστή των D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> υποδοχέων ροπινιρόλη σε συμπεριφορικό και μοριακό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό, εξετάσαμε ένα μεγάλο εύρος δόσεων ροπινιρόλης (0.1-10mg/kg) βασιζόμενοι στις υπάρχουσες δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες (Dhir & Kulkarni, 2007; Millan et al., 2004; Rogers et al., 2000).

Σε συμπεριφορικό επίπεδο μελετήσαμε τις δράσεις της ροπινιρόλης στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα επίμυων, σε συμπεριφορές που ελέγχονται από το μεταιχμιακό σύστημα (ενίσχυση-ανταμοιβή, αγχώδης συμπεριφορά, καταθλιπτική συμπεριφορά) και τέλος σε συμπεριφορές γνωστικού «περιεχομένου» (χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας).

Αρχικά, ξεκινήσαμε με τη μέτρηση της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας. Στο στάδιο αυτό ήταν σημαντικό το να εντοπίσουμε και να χρησιμοποιήσουμε στη μελέτη μας και δόσεις οι οποίες δεν θα επηρεάσουν σημαντικά την κινητικότητα ώστε τα λοιπά αποτελέσματά μας να μπορούν να παραμείνουν ανεπηρέαστα από τη μεταβλητή αυτή.

Στη συνέχεια εξετάσαμε τις επιδράσεις της ροπινιρόλης σε πιο «συναισθηματικές πτυχές» της συμπεριφοράς. Καθώς στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει ανάλογη μελέτη, χρησιμοποιήσαμε το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού για να μελετήσουμε τις δράσεις του φαρμάκου στο κύκλωμα ανταμοιβής του εγκεφάλου. Στη συνέχεια, μελετήσαμε τις δράσεις της ροπινιρόλης στην αγχώδη συμπεριφορά χρησιμοποιώντας το πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου. Αν και υπάρχουν σχετικές μελέτες όπου έχει μετρηθεί ο χρόνος παραμονής και ο αριθμός των εισόδων σε ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες, δεν φαίνεται να υπάρχουν μελέτες που να έχουν μετρήσει εθολογικές παραμέτρους οι οποίες θα μπορούσαν να μας δώσουν επιπρόσθετες πληροφορίες για τις συμπεριφορικές επιδράσεις του φαρμάκου. Τέλος, μελετήσαμε τις ενδεχόμενες αντικαταθλιπτικές δράσεις της ροπινιρόλης στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν κάποιες μελέτες με το πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης όπου έχει μετρηθεί η επίδραση της ροπινιρόλης στην ακινησία. Αν και όλα τα αντικαταθλιπτικά μειώνουν την ακινησία στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης, οι ενεργητικές συμπεριφορές δεν επηρεάζονται από όλα τα αντικαταθλιπτικά. Πιο συγκεκριμένα, οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης έχει δειχθεί ότι αυξάνουν

την κολυμβητική συμπεριφορά, ενώ αντίθετα οι αναστολείς επαναπρόσληψης νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης αυξάνουν τη συμπεριφορά αναρρίχησης. Παρόλα αυτά, οι επιδράσεις της ροπινιρόλης στις συμπεριφορές αυτές δεν είχαν μελετηθεί στο παρελθόν. Έτσι στόχος μας ήταν η μελέτη της δράσης της ροπινιρόλης όχι μόνο στην παθητική συμπεριφορά αλλά και στις πιο ενεργητικές συμπεριφορές ώστε να μπορέσουμε να σκιαγραφήσουμε καλύτερα το ενδεχόμενο αντικαταθλιπτικό της προφίλ.

Στο τρίτο στάδιο των συμπεριφορικών μας μελετών αξιολογήσαμε τις επιδράσεις της ροπινιρόλης σε πιο γνωστικές πτυχές της συμπεριφοράς όπως η χωρική μνήμη. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας έναν ακτινωτό λαβύρινθο 8 βραχιόνων με 4 βραχίονες στόχους μελετήσαμε τις δράσεις της ροπινιρόλης στη χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας. Αν και η μελέτη αυτή επικεντρώνεται στις «συναισθηματικές» πτυχές της συμπεριφοράς θεωρήσαμε σημαντικό να μελετήσουμε και πτυχές των γνωστικών λειτουργιών καθώς αναφερόμαστε σε μια κλινικώς χρησιμοποιούμενη φαρμακευτική αγωγή η οποία δυνητικά θα μπορούσε να επηρεάζει τη γνωστική λειτουργικότητα του ασθενούς.

Αφού «σκιαγραφήσαμε» το συμπεριφορικό προφίλ του φαρμάκου, στη συνέχεια μελετήσαμε τις δράσεις της ροπινιρόλης σε μοριακό επίπεδο. Οι παραδοσιακοί αγωνιστές υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G, διεγείρουν τη σηματοδότηση τόσο μέσω G πρωτεϊνών όσο και μέσω β-αρρεστίνης. Νεότερες προσπάθειες αναφορικά με την ανάπτυξη εκλεκτικών θεραπειών με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες αναφέρονται στην ανάπτυξη αγωνιστών και ανταγωνιστών εκλεκτικών για το ένα εκ των δύο π.χ. ντοπαμινεργικών μονοπατιών, τα λεγόμενα μεροληπτικά προσδέματα (biased ligands) (Zidar et al., 2009). Για παράδειγμα, πρόσφατα αναπτύχθηκαν αγωνιστές των β<sub>2</sub>-αδρενεργικών υποδοχέων μεροληπτικοί για τη β-αρρεστίνη (Drake et al., 2008). Οι παράγοντες αυτοί οδηγούν σε φωσφορυλίωση του υποδοχέα και κατ' επέκταση δραστηριότητα μόνο του μονοπατιού που ρυθμίζεται από τη β-αρρεστίνη απουσία της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης G (Zidar et al., 2009). Τα δεδομένα αυτά ενδέχεται να καταρρίψουν βασικές αρχές της κρατούσας φαρμακολογίας και της μέχρι τώρα προσέγγισης ανάπτυξης φαρμάκων. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός δράσης των μεροληπτικών αγωνιστών δεν είναι μέχρι σήμερα κατανοητός, αν και πιστεύεται ότι μεταξύ των πολλαπλών διαφορετικών στερεοδιατάξεων του υποδοχέα, κάποιες μπορεί να οδηγούν σ' αυτή τη διαφορετική σηματοδότηση (Zidar et al., 2009).

Σήμερα, δε γνωρίζουμε να υπάρχει κάποιος κλινικός χρησιμοποιούμενος παράγοντας με τέτοια χαρακτηριστικά. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσουμε αν η ροπινιρόλη δρα εξίσου και στα δύο ντοπαμινεργικά μονοπάτια ή ενδεχομένως δρα ως μεροληπτικό πρόσδεμα διεγείροντας ένα εκ των δύο ντοπαμινεργικών μονοπατιών.

Για το σκοπό αυτό, μελετήσαμε τη φωσφορυλίωση ενός υποστρώματος της PKA, την υπομονάδα των AMPA υποδοχέων GluR1 σε μια θέση φωσφορυλίωσης εκλεκτικά εξαρτώμενη από την PKA, τη Ser<sup>845</sup>. Για τη μελέτη του μονοπατιού των Akt/GSK-3 μελετήσαμε τη φωσφορυλίωση της GSK-3β στη Ser<sup>9</sup> που αναστέλλει τη δραστηριότητά της. Οι δράσεις της ροπινιρόλης στα δύο ντοπαμινεργικά μονοπάτια μελετήθηκαν στο κοιλιακό ραβδωτό και τον προμετωπιαίο φλοιό. Καθώς τα δύο ντοπαμινεργικά μονοπάτια ρυθμίζονται σε διαφορετικά χρονικά σημεία, επιλέξαμε να θανατώσουμε τα ζώα 20 λεπτά μετά τη χορήγηση ροπινιρόλης ώστε να μη χαθούν οι επιδράσεις της στο μονοπάτι της PKA ενώ να έχει ξεκινήσει και η σηματοδότηση μέσω Akt/GSK3.

Εν συνεχεία, μελετήσαμε τη δραστηριότητα του ενδοκυττάριου μονοπατιού διαβίβασης σήματος της MAPK κινάσης, το οποίο εμπλέκεται στην πλαστικότητα του εγκεφάλου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε επιπρόσθετες μελέτες ανοσοαποτύπωσης για τη μελέτη της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών αυτών στην περιοχή του κοιλιακού ραβδωτού και του προμετωπιαίου φλοιού.

Τέλος, μελετήσαμε ενδεχόμενες αλλαγές στην έκφραση των πρόιμων άμεσων γονιδίων (IEGs) *c-fos* και *arc* καθώς αποτελούν δείκτες νευρωνικής ενεργοποίησης και υποκείμενης πλαστικότητας αντίστοιχα. Έτσι, πραγματοποιήσαμε πειράματα *in situ* υβριδοποίησης και μετρήσαμε την έκφραση του mRNA του *c-fos* και της *arc* στο ραβδωτό και τον προμετωπιαίο φλοιό.



### **III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

#### **A. Συμπεριφορικές Μελέτες**

##### **Υποκείμενα**

Χρησιμοποιήθηκαν άρρενες επίμυες Sprague-Dawley βάρους 300-370g. Τα πειραματόζωα στα πειράματα του υπερυψωμένου λαβυρίνθου, της εξαναγκασμένης κολύμβησης και της κινητικής δραστηριότητας διέμεναν ανά πεντάδες ενώ στα πειράματα του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού και του ακτινωτού λαβυρίνθου διέμεναν σε ατομικούς κλωβούς. Όλα τα ζώα διαβίωναν σε 12ώρο κύκλο φωτός/σκότους και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Στα ζώα του ακτινωτού λαβυρίνθου ακολουθήθηκε συγκεκριμένη διατροφή (βλ. παρακάτω).

##### **1. Πειραματικές μελέτες καταγραφής της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας**

Η αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα των πειραματόζωων υπολογίστηκε μέσω αυτόματου συστήματος καταγραφής της κινητικότητας που διαθέτει φωτοκύτταρα. Οι κλωβοί μέτρησης της κινητικής δραστηριότητας βρίσκονταν μέσα σε μεγάλα μαύρα κουτιά ώστε να εξασφαλίζεται ηχομόνωση και να μην εισέρχεται σε αυτούς φως.

Τρεις μέρες πριν την πρώτη χορήγηση, οι επίμυες εξοικειώθηκαν με τους κλωβούς μέτρησης της κινητικής δραστηριότητας για 30 λεπτά ημερησίως επί τρεις ημέρες. Τα πειραματόζωα μεταφέρονταν στο δωμάτιο μία ώρα πριν την πειραματική διαδικασία, ώστε να εγκλιματιστούν με τον περιβάλλοντα χώρο. Δέκα επίμυες έλαβαν ροπινρόλη (0.1, 1, 10mg/kg) ή έκδοχο σε τυχαιοποιημένη σειρά. Μεταξύ των μετρήσεων παρεμβάλλονταν 3 ημέρες χωρίς πειραματικό χειρισμό.

## 2. Πειραματικές μελέτες ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού

Οι χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν υπό την επήρεια γενικής αναισθησίας που προκλήθηκε με την ενδομυϊκή χορήγηση ξυλαζίνης (10mg/kg) και υδροχλωρικής κεταμίνης (100mg/kg) και την προσθήκη θεικής ατροπίνης (0.6mg/kg). Η χορήγηση ατροπίνης στόχευε στην αποφυγή της βραδυκαρδίας και την ελάττωση των βρογχικών εκκρίσεων καθώς και της πιθανής καρδιακής ανακοπής που μπορεί να προκαλέσει η υδροχλωρική κεταμίνη.

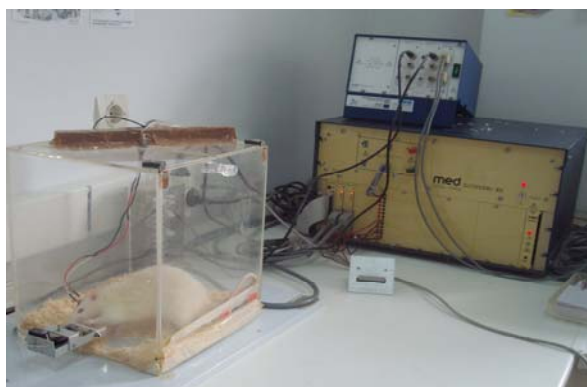
Για την εμφύτευση των ηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκε στερεοταξική συσκευή (David Kopf Instruments). Στον κάθε επίμυ εμφυτεύτηκε ηλεκτρόδιο στην περιοχή του έξω υποθαλάμου. Οι συντεταγμένες προσδιορίστηκαν από τον στερεοταξικό άτλαντα των Paxinos & Watson (1998) [προσθιοπίστια -2.56mm με σημείο αναφοράς το βρέγμα, πλάγια -1.7mm από τη μέση γραμμή και -8.7mm ραχιαίο-κοιλιακά, από την επιφάνεια του κρανίου].

Εμφυτεύθηκαν μονοπολικά ηλεκτρόδια που ήταν κατασκευασμένα από ανοξείδωτο χάλυβα, διαμέτρου 0.25mm. Τα ηλεκτρόδια ήταν μονωμένα με ειδικό βερνίκι σε όλο το μήκος τους εκτός από την κωνική αιχμή τους. Η άνοδος ήταν κατασκευασμένη από βελόνη σύριγγας μιας χρήσεως 21G. Για τη σταθεροποίηση του ηλεκτροδίου και της ανόδου στο κρανίο τοποθετούνταν 5 μικρές βίδες γύρω από τις οποίες περιελισσόταν και το σύρμα της ανόδου. Το σύστημα ηλεκτροδίου-ανόδου σταθεροποιείτο με την προσθήκη ακρυλικού πολυμερούς. Τέλος, στο χειρουργικό τραύμα γινόταν συρραφή με τη χρήση ενός μεταξωτού ράμματος.

Μία εβδομάδα μετά τη στερεοταξική εμφύτευση του ηλεκτροδίου τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε κλωβό συντελεστικής μάθησης Skinner (Skinner Box) και ελέγχθηκαν για το αν εκδηλώνουν συμπεριφορά ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Ο κλωβός ήταν κατασκευασμένος από Plexiglas (25 x 25 x 30). Στο αριστερό μέρος του κλωβού, σε ύψος 4cm πάνω από τη βάση του κλωβού βρισκόταν ένας ατσάλινος μοχλός. Το ηλεκτρόδιο συνδεόταν με ηλεκτρικό διεγέρτη. Η σύνδεση αυτή ήταν κατασκευασμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπει στο ζώο να κινείται ελεύθερα στον κλωβό. Κάθε πίεση του μοχλού ενεργοποιούσε το διεγέρτη με αποτέλεσμα το ζώο να δέχεται ηλεκτρικό ερέθισμα ως ανταμοιβή. Το ηλεκτρικό ερέθισμα που δεχόταν το πειραματόζωο ήταν μια σειρά παλμών με τα εξής χαρακτηριστικά: είχε διάρκεια 0.4sec και αποτελούνταν από τετραγωνικούς καθοδικούς παλμούς σταθερής διάρκειας (0.1msec) και έντασης (250μΑ) και

ποικίλης συχνότητας (15-125 Hz, δηλαδή 6-50 αριθμούς παλμών/0.4sec). Ο αριθμός των πιέσεων του μοχλού καταγράφονταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Πριν την έναρξη των πειραμάτων του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού προηγήθηκε εκπαίδευση των πειραματόζωων. Την πρώτη φορά που το ζώο τοποθετείτο στον κλωβό αφηνόταν ελεύθερο να εξερευνήσει τον χώρο για λίγα λεπτά. Στη συνέχεια, ελάμβανε από τον πειραματιστή ηλεκτρικά ερεθίσματα συχνότητας 50 παλμών και έντασης 250 $\mu$ A κάθε φορά που πλησίαζε το μοχλό. Από την αντίδρασή του πειραματόζωου γινόταν μια πρώτη εκτίμηση για το αν η εμφύτευση του ηλεκτροδίου ήταν επιτυχημένη. Επιπλέον ο επίμυς συνέδεε το μοχλό με το ενισχυτικό ερέθισμα και έτσι στη συνέχεια εκδήλωνε συμπεριφορά ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, πιέζοντας το σχετικό μοχλό. Ακολούθως, ο επίμυς τοποθετούνταν επί μία ώρα για τρεις ημέρες στον κλωβό όπου λάμβανε ερέθισμα σταθερής έντασης και συχνότητας κάθε φορά που πίεζε το μοχλό.



**ΣΧΗΜΑ M1. Πειραματική διάταξη ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.** Ο επίμυς εκπαιδεύεται να πατάει ένα μοχλό σε κλωβό συντελεστικής μάθησης και να δέχεται ένα ηλεκτρικό ερέθισμα στην περιοχή του έξω υποθαλάμου (από Εργαστήριο Νευροεπιστημών & Συμπεριφοράς Παν/μίου Κρήτης).

Μετά την πάροδο των τριών αυτών ημερών οι επίμυες εκπαιδεύονταν να αυτοερεθίζονται με την χορήγηση 4 εναλλασσόμενων σειρών μεταβαλλόμενων συχνοτήτων. Οι συχνότητες ξεκινούσαν από την υψηλότερη και αφού έφθαναν στη χαμηλότερη (2 μετρήσεις ανά συχνότητα) κατέληγαν προοδευτικά και πάλι στην υψηλότερη (επιπλέον 2 μετρήσεις ανά συχνότητα). Λαμβάνονταν συνολικά 4 μετρήσεις ανά συχνότητα.

Κάθε μέτρηση είχε διάρκεια 60sec και ακολουθούνταν από μια περίοδο απόσβεσης 30sec. Πριν από την έναρξη κάθε εκπαίδευσης ή κάθε πειραματικής διαδικασίας ο επίμυς αφηνόταν να πιέζει το μοχλό για 60sec στην υψηλότερη συχνότητα, ως υπενθύμιση της πειραματικής διαδικασίας. Η μέτρηση αυτή δεν καταγραφόταν και δεν λαμβανόταν υπόψη. Επιπροσθέτως, πριν από την έναρξη της κάθε δοκιμής ο επίμυς δεχόταν 3 σειρές παλμών ερεθισμού ως έναυσμα υπενθύμισης (priming), στην ίδια συχνότητα παλμών της δοκιμής που ακολουθούσε. Το σύνολο των δοκιμών μέσα σε μια συνεδρία μας έδινε τη λεγόμενη καμπύλη συχνότητας ερεθισμού-αντιδράσεων πειραματόζωου (καμπύλη ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού).

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν καθημερινά έως ότου η καμπύλη της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού παρέμενε σχετικά σταθερή και δεν παρουσίαζε απόκλιση μεγαλύτερη του 10% για 3 συνεχόμενες ημέρες οπότε και ξεκινούσε η πειραματική διαδικασία.

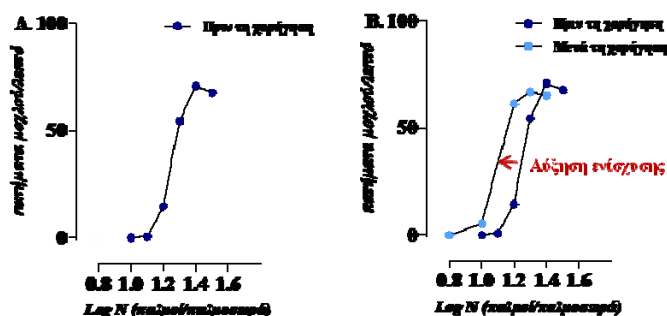
Κάθε καμπύλη ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού αναλύθηκε με βάση την παραλλαγή του σιγμοειδούς μοντέλου του Compertz (Coulombe & Miliaressis, 1987):

$$f(X)=ae^{-e^{b(x_i-x)}}$$

Στην παραπάνω σχέση το  $a$  αντιστοιχεί στο μέγιστο ποσοστό αντιδράσεων του πειραματόζωου (ασύμπτωτος) και το  $x_i$  εκφράζει τη συχνότητα στην οποία αντιστοιχεί ο ουδός ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Ο ουδός είναι ο αριθμός των παλμών που αντιστοιχεί στο 36.7% της τιμής της ασύμπτωτου, δηλαδή την τιμή της ασυμπτώτου που βρίσκεται στην περιοχή της καμπύλης με την μεγαλύτερη κλίση. Η παράμετρος  $b$  αντιπροσωπεύει ένα δείκτη της κλίσης και το  $e$  αποτελεί τη βάση των νεπέριων λογαρίθμων.

Η μέθοδος μετατόπισης της καμπύλης έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα έγκυρη και αξιόπιστη για τη μελέτη των επιδράσεων ψυχοτρόπων ουσιών στη συμπεριφορά ενίσχυσης-ανταμοιβής. Με άλλα λόγια μπορεί να δώσει πληροφορίες για το αν μια ψυχοτρόπος ουσία έχει ενισχυτικές ή ανηδονικές δράσεις. Ουσιαστικά πρόκειται για μια ψυχοφυσική μέθοδο με την οποία καταγράφεται η συμπεριφορά ενός οργανισμού στις μεταβολές μιας παραμέτρου του ερεθίσματος όπως η συχνότητα ερεθίσματος, η

ένταση ερεθίσματος, η διάρκεια παλμού, η διάρκεια παλμοσειράς κτλ. Με τη μέθοδο αυτή προκύπτει μια σιγμοειδής καμπύλη που μοιάζει με τις κλασικές λογαριθμικές δοσοεξαρτώμενες καμπύλες της φαρμακολογίας. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι στη μια περίπτωση μελετάται η αποτελεσματική δόση ενός φαρμάκου και στην άλλη η «δόση» ή η αποτελεσματικότητα του ηλεκτρικού ερεθίσματος.



**ΣΧΗΜΑ M2. Μέθοδος μετατόπισης της καμπύλης.** Στον άξονα x βρίσκονται οι συχνότητες εκφρασμένες ως  $\text{Log } N$  παλμοί/παλμοσειρά ενώ στον άξονα ψ βρίσκεται ο αριθμός των αποκρίσεων του πειραματόζωου εκφρασμένος ως πατήματα μογλού/λεπτό. Α. Αρχικά λαμβάνεται μια βασική μέτρηση συμπεριφοράς ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού. Από τη μέτρηση αυτή προκύπτει μια σιγμοειδής καμπύλη συχνότητας/απόκρισης. Β. Στη συνέχεια χορηγείται το υπό μελέτη φάρμακο και λαμβάνεται μία δεύτερη μέτρηση από την οποία προκύπτει μια δεύτερη σιγμοειδής καμπύλη συχνότητας/απόκρισης. Μετατόπιση της δεύτερης καμπύλης προς τα αριστερά υποδηλώνει τις ενισχυτικές ιδιότητες του φαρμάκου.

Στις μελέτες με το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού που θα περιγραφούν ελήφθησαν δύο καμπύλες: η πρώτη ελήφθη σε συνθήκες ελέγχου ενώ η δεύτερη ήταν αποτέλεσμα της χορήγησης φαρμάκου (ροπινιρόλης) ή εκδόχου (βλ. ΣΧΗΜΑ M2). Οι καμπύλες αυτές συγκρίθηκαν για να διαπιστώσουμε τη δράση του συγκεκριμένου πειραματικού χειρισμού στη συμπεριφορά ενίσχυσης-ανταμοιβής και στην απόδοση του πειραματόζωου. Εκτιμήθηκε αν ο πειραματικός χειρισμός μετατόπισε την καμπύλη κάθετα ή οριζόντια και πόσο. Σημαντική μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά (δηλαδή προς τις υψηλότερες τιμές ερεθισμάτων) ή προς τα αριστερά (προς τις χαμηλότερες τιμές ερεθισμάτων), ερμηνεύθηκε ως αλλαγή στην αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού. Αντίθετα, μετατοπίσεις προς τα πάνω ή προς τα κάτω, δηλαδή προς υψηλότερα ή προς χαμηλότερα ποσοστά αντιδράσεων του πειραματόζωου ερμηνεύθηκαν ως αλλαγές στην απόδοση του πειραματόζωου.

### 3. Πειραματικές μελέτες καταγραφής αγγώδους συμπεριφοράς στον υπερυψωμένο λαβύρινθο

Η συσκευή του υπερυψωμένου λαβυρίνθου αποτελείται από δύο αντιδιαμετρικούς ανοιχτούς βραχίονες (46cm μήκος x 15cm εύρος) και δύο κλειστούς βραχίονες (46cm μήκος x 15cm εύρος x 23cm ύψος). Ο λαβύρινθος ήταν κατασκευασμένος από γκρι πλαστικό υλικό και υπερυψωμένος κατά 70cm από το έδαφος. Οι κλειστοί βραχίονες περιβάλλονταν από πλαστικά τοιχώματα γκρι χρώματος (βλ. ΣΧΗΜΑ Μ3). Η συσκευή ήταν τοποθετημένη σε ένα δωμάτιο με απόσταση από τους περιβάλλοντες τοίχους.

Έπειτα από 3 ημέρες εξοικείωσης με τον πειραματιστή, τα ζώα χωρίστηκαν σε 4 ομάδες (έκδοχο, 0.1, 1 και 10mg/kg ροπινρόλης). Μία μέρα πριν από την έναρξη της πειραματικής δοκιμασίας μεταφέρθηκαν στο χώρο όπου επρόκειτο να πραγματοποιηθεί η πειραματική δοκιμασία και τους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά έκδοχο ώστε να εξοικειωθούν με τη διαδικασία και τον περιβάλλοντα χώρο.



**ΣΧΗΜΑ Μ3. Υπερυψωμένος λαβύρινθος.** Δύο «ανοιχτοί» και δύο «κλειστοί» αντιδιαμετρικοί βραχίονες. Το κέντρο του λαβυρίνθου καθώς και οι κλειστοί βραχίονες συναποτελούν την προστατευμένη περιοχή. Οι στάσεις επιμήκυνσης σώματος και οι βυθίσεις κεφαλιού που πραγματοποιούνται από την περιοχή αυτή ονομάζονται προστατευμένες στάσεις/βυθίσεις.

Την ημέρα πραγματοποίησης της πειραματικής δοκιμασίας οι επίμυες μεταφέρθηκαν στον πειραματικό χώρο μια ώρα πριν την έναρξη της δοκιμασίας. Τους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά έκδοχο ή ροπινρόλη (0.1, 1, 10 mg/kg) και 15

λεπτά μετά τη χορήγηση τοποθετήθηκαν στο κέντρο της συσκευής με προσανατολισμό προς τον ένα ανοιχτό βραχίονα. Υπολογίστηκε ο χρόνος παραμονής σε ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες καθώς και στο κέντρο. Επίσης υπολογίστηκε και ο αριθμός των εισόδων σε ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες καθώς και οι στάσεις επιμήκυνσης σώματος (Stretch Attend Postures-SAP) καθώς και οι στάσεις βύθισης κεφαλής (Head dips). Οι χρόνοι και οι εισοδοί στους βραχίονες υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Anymaze. Επιπλέον υπολογίστηκε το ποσοστό των προστατευμένων στάσεων. Ως προστατευμένες στάσεις ορίστηκαν οι στάσεις που πραγματοποιήθηκαν από την προστατευμένη περιοχή, δηλαδή από τους κλειστούς βραχίονες και το κέντρο. Τέλος υπολογίστηκε το ποσοστό του χρόνου παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι παράμετροι που μελετήθηκαν καθώς και η υπό εκτίμηση συμπεριφορά.

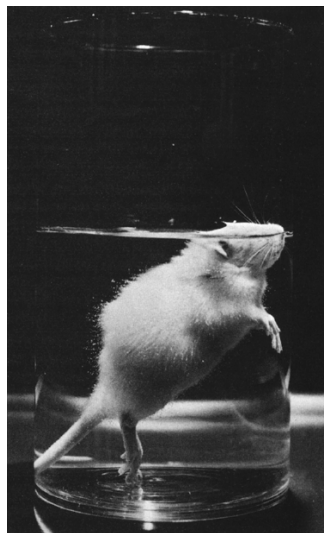
<b>Συμπεριφορά</b>	<b>Ένδειξη</b>
<b>Χρόνος παραμονής σε ανοιχτούς βραχίονες</b>	Αγχώδης συμπεριφορά- Αγχόλυση
<b>% παραμονής σε ανοιχτούς βραχίονες επί του συνολικού χρόνου</b>	Αγχώδης συμπεριφορά- Αγχόλυση
<b>Χρόνος παραμονής σε κλειστούς βραχίονες</b>	Αγχώδης συμπεριφορά
<b>Χρόνος παραμονής στο κέντρο</b>	Σύγκρουση προσέγγισης- αποφυγής (approach-avoid conflict)
<b>Συνολικός αριθμός εισόδων σε βραχίονες</b>	Κινητική δραστηριότητα
<b>Συνολικός αριθμός στάσεων επιμήκυνσης σώματος (Stretch Attend Postures-SAP)</b>	Εξερευνητική συμπεριφορά, Συμπεριφορά εκτίμησης κινδύνου
<b>% προστατευμένες στάσεις ιμήκυνσης σώματος (% protected tch attend postures)</b>	Αγχώδης συμπεριφορά
<b>Συνολικός αριθμός στάσεων βύθισης κεφαλιού</b>	Εξερευνητική συμπεριφορά

% προστατευμένες στάσεις βύθισης κεφαλιού	Λήψη απόφασης, Αγχώδης συμπεριφορά
---	------------------------------------

**ΠΙΝΑΚΑΣ Μ1.** Συμπεριφορές που αξιολογήθηκαν στο πείραμα του υπερυψωμένου λαβυρίνθου και τι αντικατοπτρίζουν.

#### **4. Πειραματικές μελέτες καταγραφής καταθλιπτικής συμπεριφοράς με τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης**

Η δοκιμασία βασίστηκε στο συμπεριφορικό πρότυπο που περιέγραψε ο Porsolt et al (1978). Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από την προ-πειραματική διαδικασία (pre-testing) και τη δοκιμασία κολύμβησης. Έπειτα από μια περίοδο εξοικείωσης με τον πειραματιστή, οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε διαφανείς κυλίνδρους από Plexiglas (60ύψος x 20cm διάμετρος) που περιείχε 30cm νερό σε θερμοκρασία 23-24 °C για 15λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της προ-πειραματικής διαδικασίας (pre-testing) οι επίμυες μεταφέρθηκαν έξω από τον κύλινδρο, στεγνώθηκαν με χαρτί και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πίσω στους κλωβούς διαμονής τους.



**ΣΧΗΜΑ Μ4.** Το πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης όπως παρουσιάστηκε από τους Porsolt και συν (1978).

Έπειτα από 24ώρες, οι επίμυες μεταφέρθηκαν ξανά στο δωμάτιο πραγματοποίησης της πειραματικής διαδικασίας. Αφού παρέμειναν 1 ώρα για



εξοικείωση, τους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά έκδοχο ή ροπινρόλη (0.1, 1 ή 10mg/kg) και 15 λεπτά μετά τη χορήγηση τοποθετήθηκαν στον κύλινδρο για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης. Η πειραματική διαδικασία διήρκησε 5 λεπτά. Η συμπεριφορά του πειραματόζωου βιντεοσκοπήθηκε και ακολούθως εκτιμήθηκε η παθητικότητα, η αναρρίχηση και η κολύμβηση. Η παθητικότητα του ζώου υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος Anymaze.

<b>Συμπεριφορά</b>	<b>Ορισμός</b>
<b>Παθητικές Συμπεριφορές:</b> <b>Ακίνησια (Immobility)</b>	Το ζώο παραμένει σε επίπλευση στο νερό χωρίς έντονη κινητικότητα, παρά μόνο κάνοντας τις κινήσεις που είναι απαραίτητες ώστε να διατηρεί την κεφαλή και τη μύτη του πάνω απ' το νερό
<b>Ενεργητικές Συμπεριφορές:</b> <b>1. Αναρρίχηση (Climbing)</b>	Γρήγορες ενεργητικές κινήσεις και με τα τέσσερα πόδια, παράλληλα με τα τοιχώματα του κυλίνδρου και έχοντας την κεφαλή και τους ώμους πάνω απ' το νερό
<b>2. Κολύμβηση (Swimming)</b>	Κινήσεις και με τα τέσσερα πόδια σε ενεργό κολυμβητική κίνηση η οποία είναι εντονότερη από αυτή που απαιτείται για να διατηρήσει την κεφαλή του πάνω απ' το νερό

**ΠΙΝΑΚΑΣ Μ2.** Συμπεριφορές που αξιολογήθηκαν στο πείραμα της εξαναγκασμένης κολύμβησης και τι αντικατοπτρίζουν.

## 5. Πειραματικές μελέτες εκτίμησης γνωστικών λειτουργιών στον ακτινωτό λαβύρινθο

Χρησιμοποιήθηκαν 10 άρρενες επίμυες Sprague-Dawley βάρους ~250g κατά την άφιξη τους στο εργαστήριο. Έπειτα από μια εβδομάδα ελεύθερης πρόσβασης σε τροφή, τα ζώα τέθηκαν σε συγκεκριμένη διατροφή-δίαιτα με σκοπό τη διατήρηση του 85-90% του φυσιολογικού βάρους ανάπτυξης. Η εκπαίδευση ξεκινούσε μόλις τα ζώα έφθαναν στο επιθυμητό βάρος (περίοδος περίπου 10 ημερών). Η τροφή τους παρέχόταν στο χρονικό σημείο μετά την ολοκλήρωση της εκπαίδευσης ή της πειραματικής διαδικασίας ή στο αντίστοιχο χρονικό σημείο κατά τις μέρες μη πραγματοποίησης της δοκιμασίας. Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό.

Τα ζώα εκπαιδεύτηκαν υπό φυσιολογικό φωτισμό δωματίου με τη χρήση ακτινωτού λαβύρινθου που ήταν κατασκευασμένος από γκρι πλαστικό υλικό και διέθετε 8 βραχίονες. Ο λαβύρινθος ήταν τοποθετημένος σε τραπέζι υπερυψωμένο 70cm από το έδαφος. Η κεντρική αρένα είχε διάμετρο 53cm και οι 8 βραχίονες εκτείνονταν ακτινωτά 43cm μήκος x 15cm εύρος x 22cm ύψος. Οι βραχίονες ήταν καλυμμένοι με διαφανή πλαστικά καπάκια. Οι οπτικές ενδείξεις στο δωμάτιο παρέμεναν σταθερές καθ' όλη την πειραματική διαδικασία.

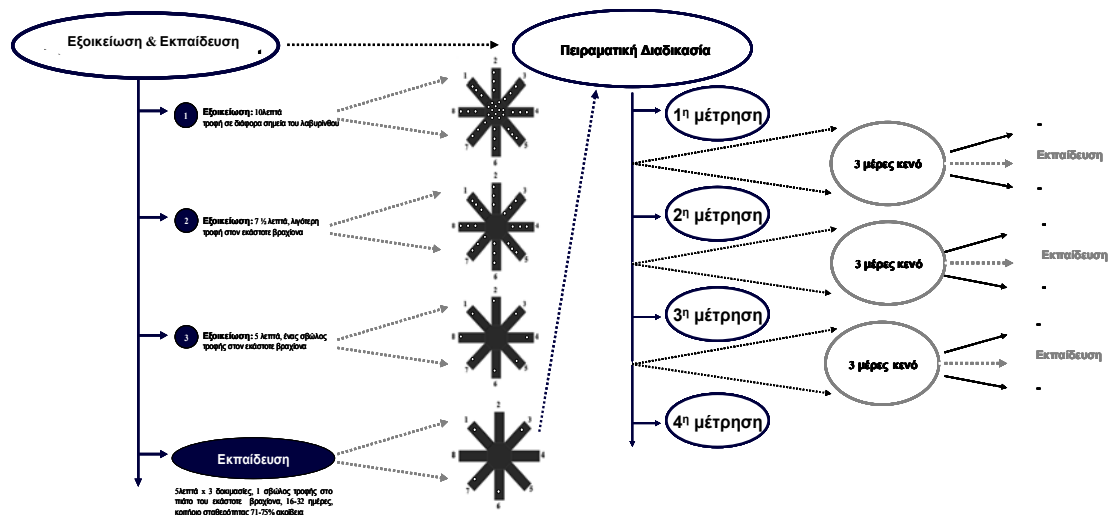
Κατά τη διαδικασία εξοικείωσης τα ζώα τοποθετούνταν στο κέντρο του λαβυρίνθου και αφήνονταν να τον εξερευνήσουν με σκοπό την εξοικείωσή τους. Την πρώτη μέρα της εξοικείωσης στο κέντρο και σε διάφορα σημεία κατά μήκος κάθε βραχίονα τοποθετούνταν σβώλοι τροφής (Noyes precision food pellets, Improved Rodent Diet TSE, Technical and Scientific Equipment GMBH, Sandwown Scientific Esher Surrey, England). Οι επίμυες τοποθετούνταν στο κέντρο του λαβυρίνθου για 10 λεπτά ή έως ότου καταναλώσουν όλους τους σβώλους τροφής. Τη δεύτερη μέρα της εξοικείωσης είχαν στη διάθεσή τους επτάμιση λεπτά ενώ είχε τοποθετηθεί μικρότερη ποσότητα σβώλων τροφής στον εκάστοτε βραχίονα. Τέλος, στην τρίτη ημέρα εξοικείωσης, οι επίμυες τοποθετούνταν στον λαβύρινθο για 5 λεπτά και ένας σβώλος τροφής τοποθετείτο στο 'πίατο' στο άκρο του εκάστοτε βραχίονα. Επιπλέον, καταγράφονταν οι είσοδοι των επίμυων στους βραχίονες με σκοπό την επιβεβαίωση της εισόδου τους σε όλους τους βραχίονες. Στο σημείο αυτό επιλέγονταν τέσσερις βραχίονες 'στόχοι' οι οποίοι θα λειτουργούσαν ως ενισχυόμενοι βραχίονες για τον κάθε επίμυ. Αυτοί οι τέσσερις βραχίονες-στόχοι παρέμεναν σταθεροί για τον κάθε επίμυ τόσο κατά τη διαδικασία της εκπαίδευσης όσο και κατά την πειραματική

διαδικασία. Οι τέσσερις αυτοί βραχίονες ήταν διαφορετικοί για τον κάθε επίμυ ενώ δεν χρησιμοποιήθηκαν περισσότεροι από δύο συνεχόμενοι βραχίονες και ο κάθε βραχίονας χρησιμοποιήθηκε περίπου τις ίδιες φορές μεταξύ των επίμυων.

Στους βραχίονες-στόχους τοποθετείτο ένας σβώλος τροφής ενώ στους βραχίονες μη-στόχους τοποθετείτο ένας σβώλος τροφής εξωτερικά του τελικού τοίχου. Ο τελικός τοίχος του εκάστοτε βραχίονα ήταν υπερυψωμένος 1cm ώστε να διαχέεται η οσμή των σβώλων τροφής αλλά οι επίμυες να μην έχουν πρόσβαση σ' αυτούς. Ο πειραματικός χειρισμός αυτός πραγματοποιήθηκε με σκοπό οι επίμυες να εντοπίζουν τους σβώλους τροφής μέσω μνήμης και όχι μέσω οσμής.

Κατά τη διαδικασία της κυρίως εκπαίδευσης οι επίμυες τοποθετούνταν στο κέντρο του λαβυρίνθου 'προσανατολισμένοι' προς το βραχίονα νούμερο ένα. Στους επίμυες δινόταν χρόνος 5 λεπτών ή έως ότου ανακτήσουν και τους 4 σβώλους τροφής. Στη συνέχεια ο επίμυς απομακρυνόταν και οι βραχίονες καθαρίζονταν με 70% αιθανόλη. Ως είσοδος στο βραχίονα οριζόταν η είσοδος και με τα τέσσερα πόδια. Μετά την ολοκλήρωση της εκάστοτε διαδικασίας, στους βραχίονες επανατοποθετείτο τροφή. Κάθε επίμυς πραγματοποιούσε τρεις συνεχόμενες δοκιμασίες ανά μέρα. Για την καταγραφή της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Radial Arm Maze. Οι εκπαιδευθείς διήρκησαν 15-32 ημέρες, έως ότου το εκάστοτε ζώο έφθανε το κριτήριο του 71-75% ακρίβειας κατά τις τελευταίες 7 ημέρες. Δύο ζώα εξαιρέθηκαν από την πειραματική διαδικασία καθώς δεν έφθασαν τα προβλεπόμενα όρια.

Ο πειραματικός σχεδιασμός που πραγματοποιήθηκε ήταν εντός των υποκειμένων και όλα τα πειραματόζωα έλαβαν όλες τις δόσεις φαρμάκου (0, 0.1, 1 και 10mg/kg) με σταθμισμένη τυχαιοποιημένη σειρά (ανά μέτρηση δύο ζώα λάμβαναν την εκάστοτε δόση). Μεταξύ των μετρήσεων παρεμβάλλονταν τρεις ημέρες και μόνο τη δεύτερη μέρα εξ αυτών πραγματοποιείτο στα ζώα εκπαίδευση-υπενθύμιση με σκοπό την παγίωση της υπάρχουσας μνήμης χωρίς τη βελτίωσή της.



**ΣΧΗΜΑ Μ5.** Χρονοδιάγραμμα των εκπαιδύσεων και της πειραματικής διαδικασίας στο πείραμα του ακτινωτού λαβυρίνθου.

Συμπεριφορά	Μέτρηση
% Ακρίβειας	Συνολική βαθμολογία ακρίβειας αναφορικά με τη χωρική μνήμη αναφοράς και εργασία
Χρόνος Ολοκλήρωσης	Μνήμη εργασίας- επεξεργασία
Λάθη μνήμης αναφοράς	Είσοδος σε βραχίονα μη στόχο
% Λάθη μνήμης αναφοράς	% των εισόδων σε βραχίονες μη στόχους
Λάθη μνήμης εργασίας	Επαν-είσοδος σε βραχίονα όπου ο επίμυς είχε εισέλθει προηγουμένως
% Λάθη μνήμης εργασίας	% επαν-εισόδων σε βραχίονες όπου ο επίμυς είχε εισέλθει προηγουμένως

**ΠΙΝΑΚΑΣ Μ3.** Συμπεριφορές που αξιολογήθηκαν στο πείραμα του ακτινωτού λαβυρίνθου και τι αντικατοπτρίζουν.

Η είσοδος του επίμυ σε βραχίονα μη-στόχο βαθμολογήθηκε ως λάθος μνήμης αναφοράς (Βλ. παρακάτω ΣΧΗΜΑ Μ6 Bii). Το % ποσοστό των λαθών μνήμης αναφοράς υπολογίστηκε ως:

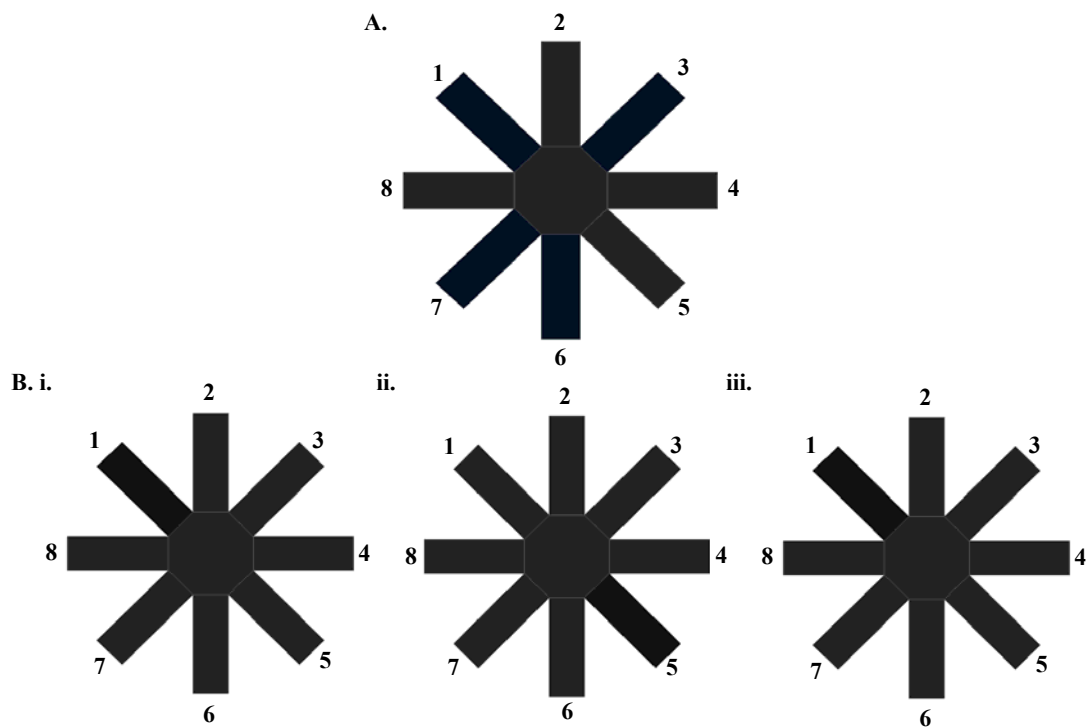
$$\frac{\text{Αριθμός λαθών μνήμης αναφοράς}}{\text{Συνολικός αριθμός εισόδων}} \times 100$$

Όταν ο επίμυ εισερχόταν ξανά σε ένα βραχίονα κατά τη διάρκεια της ίδιας πειραματικής δοκιμασίας (trial) τότε πραγματοποιούσε λάθος μνήμης εργασίας (Βλ. παρακάτω ΣΧΗΜΑ Μ6 Biii). Το % ποσοστό των λαθών μνήμης εργασίας υπολογίστηκε ως:

$$\frac{\text{Αριθμός λαθών μνήμης εργασίας}}{\text{Συνολικός αριθμός εισόδων -1}} \times 100$$

Το % ποσοστό των λαθών μνήμης εργασίας υπολογίστηκε με βάση τον συνολικό αριθμό των εισόδων μείων την πρώτη είσοδο καθώς η πρώτη είσοδος δε θα μπορούσε να αποτελέσει επαν-είσοδο σε βραχίονα.

Για τον υπολογισμό των όλων των παραμέτρων (ακρίβεια, χρόνος ολοκλήρωσης, λάθη μνήμης αναφοράς και εργασίας καθώς και % ποσοστά λαθών μνήμης αναφοράς και εργασίας) χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των τριών δοκιμασιών της κάθε μέτρησης.



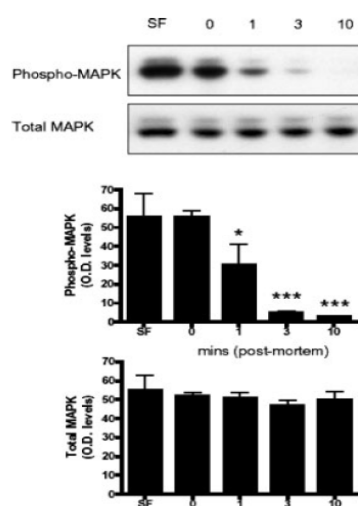
**ΣΧΗΜΑ Μ6. Ακτινωτός Λαβύρινθος 8 βραχιόνων με 4 βραχίονες στόχους.**

A. Πρωτόκολλο ακτινωτού λαβυρίνθου για τη μελέτη χωρικής μνήμης αναφοράς και εργασίας: 4 βραχίονες στόχοι – 4 βραχίονες μη-στόχοι. Με σκούρο μπλε απεικονίζονται οι βραχίονες στόχοι. B. Παράδειγμα μέτρησης συμπεριφοράς πειραματοζώου B.i. Ο επίμυς εισέρχεται σε βραχίονα στόχο (βραχίονας Νο1). B.ii. Ο επίμυς εισέρχεται σε βραχίονα μη-στόχο και πραγματοποιεί λάθος μνήμης αναφοράς. B.iii. Ο επίμυς εισέρχεται σε βραχίονα που είχε εισέλθει ξανά κατά τη διάρκεια της ίδιας δοκιμασίας και πραγματοποιεί λάθος μνήμης εργασίας.

## B.Μοριακές μελέτες

### 1. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για τα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκαν 24 άρρενες επίμυες Spraque-Dawley βάρους 250-300g στους οποίους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 0, 0.1, 1 ή 10mg/kg ροπινρόλης. Τα ζώα θανατώθηκαν 20 λεπτά μετά τη χορήγηση σε ειδική συσκευή εστιασμένης ακτινοβολίας μικροκυμάτων (Focused Microwave Irradiation). Καθώς οι ιστοί μετά θάνατον υπόκεινται σε αποικοδόμηση πρωτεϊνών, ο χρόνος που απαιτείται από τη θανάτωση έως την ψύξη είναι ιδιαίτερος σημαντικός εάν θέλουμε να μετρήσουμε τις πρωτεΐνες αναλλοίωτες από την *in vivo* κατάστασή τους. Αν και οι (συνολικές) πρωτεΐνες δεν φαίνεται να επηρεάζονται τόσο σημαντικά από το χρόνο μετά τη θανάτωση, τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών φαίνεται ότι είναι σημαντικά μειωμένα ήδη από το πρώτο λεπτό μετά την θανάτωση (βλ. ΣΧΗΜΑ M7). Η εστιασμένη ακτινοβολία μικροκυμάτων συμβάλλει στην ταχεία απενεργοποίηση των πρωτεασών (1.4s) και για το λόγο αυτό, η μέθοδος αυτή έχει υποδειχθεί ως η πλέον αποτελεσματική για τη διατήρηση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών συγκριτικά με τον αποκεφαλισμό ή τον αποκεφαλισμό και ταχύ πάγωμα σε υγρό N<sub>2</sub> (Skold et al., 2007).



**ΣΧΗΜΑ M7.** Η επίδραση του χρόνου μετά τη θανάτωση στη φωσφορυλίωση της MAPK έπειτα από ταχύ πάγωμα. Η MAPK είναι διπλά φωσφορυλιωμένη και αποφωσφορυλιώνεται ταχέως με την αύξηση του χρόνου μετά θάνατον.  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ . (Από Skold et al., 2007).

Μετά τη θανάτωση και πριν καταψυχθούν οι ιστοί στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έγινε εξαγωγή του προμετωπιαίου φλοιού καθώς και του κοιλιακού ραβδωτού.

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, τα πρωτεϊνικά δείγματα αναμίχθηκαν με πήκτωμα επιστοιβαζής 1% SDS (450μl για το εκάστοτε δείγμα του ραβδωτού και 550μl για το εκάστοτε δείγμα του προμετωπιαίου φλοιού) και ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμάνθηκαν για 10 λεπτά σε  $95^{\circ}\text{C}$  και τοποθετήθηκαν σε πάγο. Η ποσότητα των πρωτεϊνών των δειγμάτων μετρήθηκε με την μέθοδο BCA (Bicinchoninic Acid) χρησιμοποιώντας Bovine Serum Albumin (BSA) σαν σταθερά.

Ίσες ποσότητες δειγμάτων (40μg) φορτώθηκαν σε 9% αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS/PAGE) και το αποτύπωμα τους μεταφέρθηκε σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (0.2mm). Για τις p-Ser<sup>845</sup>-GluR1, p-Ser<sup>9</sup>-GSK-3β, p-Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>-42MAPK/p-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>-44MAPK (1:500) και τις συνολικές α-actin, GluR1, GSK-3β και 42MAPK/44MAPK (1:1000) χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά αντισώματα. Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το goat anti-rabbit συνδεδεμένο με υπεροξειδάση του ράπανου IgG αντίσωμα (1:6000). Οι μεμβράνες εμβαπτίστηκαν με κατάλληλα διαλύματα ενίσχυσης χημειοφωταύγειας ανοσοαποτυπώματος σε ειδικό σύστημα (GE Healthcare) και ακολούθησε εμφάνιση της αυτοραδιογραφίας σε σκοτεινό θάλαμο. Οι πρωτεϊνικές ζώνες που έδιναν ανοσοαντίδραση αποτυπώνονταν σε φωτογραφικό φίλμ ως ζώνες αμαύρωσης. Όλα τα πρώτα αντισώματα προέρχονταν από τις εταιρείες Upstate Biotechnology και Cell signaling.

## **2. *In situ* υβριδοποίηση**

Η *in situ* υβριδοποίηση αποτελεί μια από τις βασικές τεχνικές υβριδισμού μέσω της οποίας ανιχνεύονται ειδικές DNA ή RNA αλληλουχίες και έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ακέραιο κύτταρο ή ιστό. Στηρίζεται στην αρχή ότι ειδικές αλληλουχίες DNA ή RNA στόχου μπορούν να υβριδοποιηθούν με ειδικούς συμπληρωματικούς σεσημασμένους μονόκλωνους DNA ή RNA ανιχνευτές (probes) κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Παπαδάκη, 1998). Χρησιμοποιήσαμε cRNA ανιχνευτές (ή αλλιώς riboprobes) καθώς έχουν το



πλεονέκτημα ότι δημιουργούν πολύ θερμο-σταθερά RNA-RNA υβρίδια, αν και είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα στις RNάσες και για το λόγο αυτό κάποια στάδια της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν σε ειδικά αποστειρωμένο πάγκο.

Για τα πειράματα της *in situ* υβριδοποίησης χρησιμοποιήθηκαν 20 άρρενες επίμυες Sprague-Dawley στους οποίους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 0, 0.1, 1 ή 10mg/kg ροπινιρόλης. Τα ζώα «αναισθητοποιήθηκαν» παρουσία ξηρού πάγου (CO<sub>2</sub>) και θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό 10 λεπτά μετά τη χορήγηση. Οι εγκεφαλοι καταψύχθηκαν σε ισοπεντάνιο μέχρι 10 δευτερόλεπτα και φυλάχθηκαν στους -80°C. Στη συνέχεια λήφθηκαν τομές (12μm) στο επίπεδο του προμετωπιαίου φλοιού καθώς και στο επίπεδο του ραβδωτού. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα περιείχε τομές από όλες τις ομάδες (0, 0.1, 1 και 10mg/kg) με σκοπό τη μείωση της διακύμανσης της πρόσδεσης μεταξύ των ομάδων που οφειλόταν σε τεχνικά προβλήματα της διαδικασίας. Οι τομές διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.

Για τη μελέτη του *c-fos* mRNA και του *arc* mRNA χρησιμοποιήθηκε από μια σειρά αντικειμενοφόρων πλακών η οποία περιείχε μία τομή για κάθε δομή από το εκάστοτε υποκείμενο. Στην πρώτη φάση (defatting) οι τομές εμποτίστηκαν σε 4% παραφορμαλδεϋδη (PFA) σε διάλυμα PBS για 5λεπτά, με σκοπό τη μονιμοποίησή τους και πλύθηκαν σε 4xSSC (2x5λεπτά) (για τα 20xSSC χρησιμοποιήθηκαν 175.32g NaCl και 88.23g sodium citrate σε 1 λίτρο H<sub>2</sub>O και συνέχεια το διάλυμα αποστειρώθηκε, ενώ για τα 4xSSC το διάλυμα διαλύθηκε με απιονισμένο και αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O). Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε 0.5ml 0.25% διαλύματος οξικού ανυδρίτη (acetic anhydrite) σε 3ml 0.1M τριαιθανολαμίνης (triethanolamine)/200ml 4xSSC pH 8 για 10 λεπτά. Η αφυδάτωση έγινε σταδιακά με εμποτισμό αρχικά σε διάλυμα 70% αιθανόλη για 1 λεπτό, στη συνέχεια σε διάλυμα 80% αιθανόλη για 1 λεπτό, διάλυμα 95% αιθανόλη για 1 λεπτό και τέλος σε 100% αιθανόλη επίσης για 1 λεπτό.

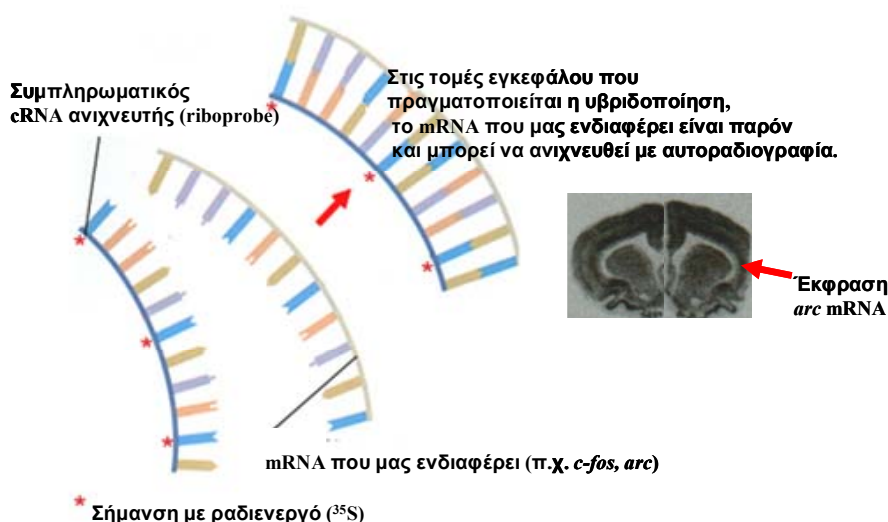
Για την υβριδοποίηση χρησιμοποιήθηκε από το ακόλουθο μείγμα: 1x10<sup>6</sup> cpm του εκάστοτε συμπληρωματικού ανιχνευτή ραδιοσημασμένου με <sup>35</sup>S (probe) συν απιονισμένο νερό έως τα 8μl ενώ προστέθηκαν 4μl μείγματος ριβονουκλεϊκών οξέων και θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 65° C. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πάγο για 2 λεπτά. Προστέθηκαν 84μl ρυθμιστικού διαλύματος υβριδοποίησης (hybridization buffer: 500μl Tris HCl pH 7.4, 200μl 1mM EDTA pH 8, 3.75ml 300mM NaCl, 25ml 50% formamide, 5g 10% dextran sulfate, 1ml 1xDenhardt's, H<sub>2</sub>O έως τα 50ml) και

2μl DTT 5M, 1μl 10% θειοθειικού νατρίου (sodium thiosulfate) και 1μl 10% SDS. Χρησιμοποιήθηκαν 100μl ανά αντικειμενοφόρο πλάκα από το παραπάνω μείγμα. Η επώαση έγινε καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 55° C με σκοπό την αναδιάταξη του στόχου και του ανιχνευτή, με τελικό αποτέλεσμα την υβριδοποίησή τους.

Μετά την υβριδοποίηση ακολούθησε διαδικασία πλύσεων των τομών με σκοπό την μείωση της μη ειδικής πρόσδεσης. Η διαδικασία των πλύσεων πραγματοποιήθηκε σε ειδικό πάγκο με σκοπό την αποφυγή της επιμόλυνσης από RNάσες και έγινε ξεκινώντας με πιο αλμυρά διαλύματα όπου έχουμε τη διατήρηση μεγαλύτερης πρόσδεσης (binding) προς λιγότερο αλμυρά διαλύματα έως ότου διατηρήσουμε σταθερή τη μισή πρόσδεση.

Αρχικά έγιναν 4πλύσεις x 5λεπτά σε 4XSSC σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ ακολούθησε μια πλύση σε ρυθμιστικό διάλυμα RNase A (για 15 λεπτά) στους 37° C. Στη συνέχεια έγιναν 2πλύσεις x 5λεπτά σε 2XSSC σε θερμοκρασία δωματίου, 1 πλύση x 5λεπτά σε 1XSSC, 2πλύσεις x 5λεπτά σε 0.5XSSC σε θερμοκρασία δωματίου, 2πλύσεις x 30λεπτά σε 0.1XSSC στους 65° C και μια για 5λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και πάλι αφυδάτωση, η οποία έγινε σταδιακά με εμποτισμό αρχικά σε διάλυμα 70% αιθανόλη, στη συνέχεια σε διάλυμα 80% αιθανόλη, διάλυμα 95% αιθανόλη και τέλος σε διάλυμα 100% αιθανόλη. Οι πλάκες παρέμεναν στην εκάστοτε συγκέντρωση αιθανόλης για 1 λεπτό.



**ΣΧΗΜΑ M8.** In situ υβριδοποίηση με <sup>35</sup>S-ραδιοσημασμένους cRNA ανιχνευτές. Ο εντοπισμός του mRNA που μας ενδιαφέρει (*c-fos*, *arc*) γίνεται με τη χρήση συμπληρωματικών cRNA ανιχνευτών οι οποίοι υπό συγκεκριμένες συνθήκες δημιουργούν

υβρίδιο με βάση τους κανόνες της συμπληρωματικότητας. Έτσι, το mRNA που μας ενδιαφέρει στη συνέχεια μπορεί να ανιχνευτεί με αυτοραδιογραφία.

Στη συνέχεια, οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε κασέτα και μεταφέρθηκαν σε σκοτεινό δωμάτιο όπου εκτέθηκαν σε Kodak X-ray φιλμ. Η έκθεση πραγματοποιήθηκε για περίπου ενάμιση μήνα.

### **3. Μέτρηση και ανάλυση μοριακών δεδομένων**

Η πυκνομετρική ανάλυση των αυτοραδιογραφιών των πειραμάτων τόσο των ανοσοαποτυπωμάτων κατά Western όσο και της *in situ* υβριδοποίησης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος ανάλυσης εικόνων Scion Image.

Για τον υπολογισμό των πραγματικών τιμών, σε κάθε μέτρηση αφαιρέθηκε η τιμή του «φόντου» (background).

Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ποσοστά % της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου (ομάδα εκδόχου), όπου ο μέσος όρος της ομάδας αυτής ορίστηκε ως 100% και οι λοιπές τιμές εκφράστηκαν ως % διακύμανση στην τιμή αυτή.

Για τη μέτρηση του ποσοστού των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η πρωτογενής πυκνομετρική τιμή της συνολικής πρωτεΐνης. Η πρωτογενής πυκνομετρική τιμή της εκάστοτε φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης εκφράστηκε ως αναλογία της συνολικής πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, οι αναλογίες αυτές εκφράστηκαν ως ποσοστά % της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου.

### **Γ. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του SPSS Statistics 17.0. Τα αποτελέσματα αρχικά αναλύθηκαν με απλή ανάλυση διακύμανσης με ή χωρίς επαναλαμβανόμενες (ANOVA) μετρήσεις ανάλογα με τον πειραματικό σχεδιασμό. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα αναλύθηκαν στη συνέχεια με τη χρήση του κριτηρίου για πολλαπλές συγκρίσεις Bonferroni το οποίο λαμβάνει υπόψη του τον αριθμό των συγκρίσεων.

## IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### A. Συμπεριφορικές Μελέτες

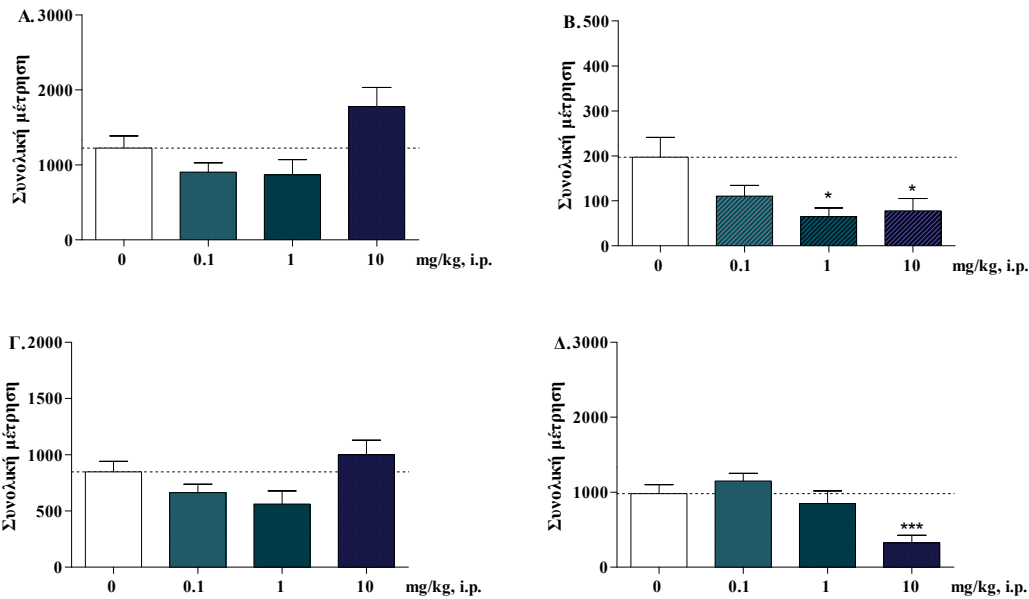
#### 1. Πειραματικές μελέτες καταγραφής της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας

Στα πειράματα μέτρησης της οριζόντιας αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας, η απλή ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με την αυθόρμητη συνολική κινητική δραστηριότητα [ $F(3,27)= 6.549$ ,  $p<0.05$ ]. Αν και η ανάλυση διακύμανσης έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές, καμία δόση δε φαίνεται να είχε στατιστικά σημαντική δράση με βάση το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (ΣΧΗΜΑ ΑΠ1<sup>Α</sup>).

Η ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε στατιστικά σημαντική δράση της ροπινιρόλης στον αριθμό των ανασηκώσεων των πειραματόζωων [ $F(3,27)= 3.845$ ,  $p<0.05$ ]. Το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των ανασηκώσεων στη δόση του 1mg/kg ( $p<0.05$ ) και στη δόση των 10mg/kg ( $p<0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ1<sup>Β</sup>).

Η ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με την περιφερική κινητική δραστηριότητα [ $F(3,27)= 5.548$ ,  $p<0.05$ ]. Παρόλα αυτά το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές επιδράσεις της ροπινιρόλης (ΣΧΗΜΑ ΑΠ1<sup>Γ</sup>).

Τέλος, η ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε στατιστικά σημαντική δράση της ροπινιρόλης στην κινητική δραστηριότητας στις γωνίες [ $F(3,27)= 10.54$ ,  $p<0.001$ ]. Επιπλέον, το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της δραστηριότητας στις γωνίες στα 10mg/kg ( $p=0.001$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ1<sup>Δ</sup>).

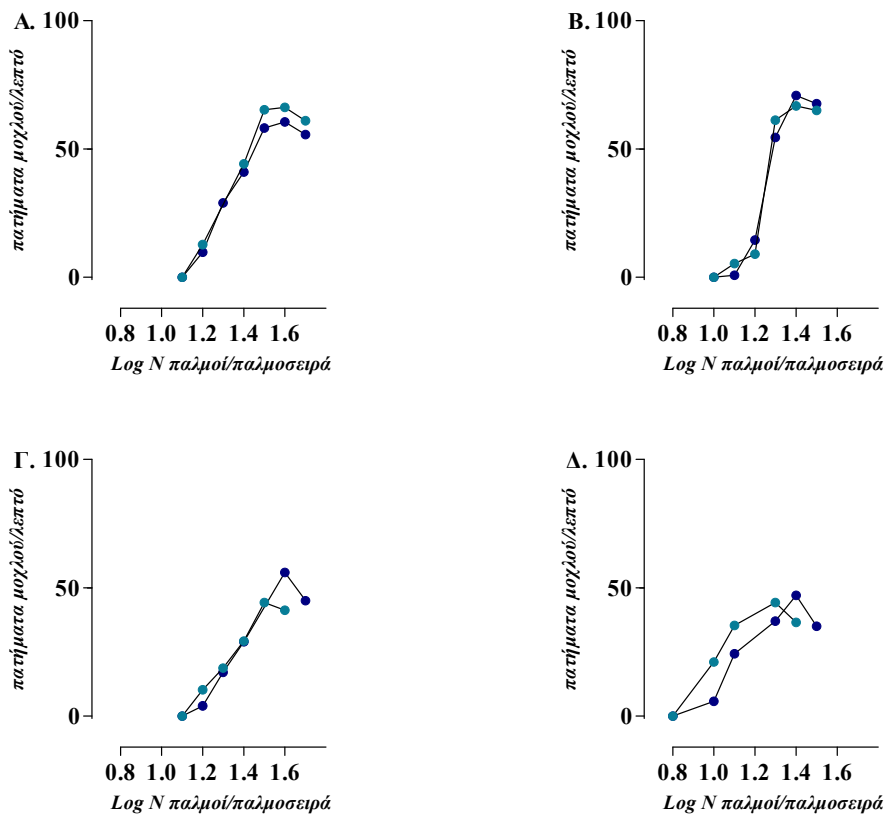


**ΣΧΗΜΑ ΑΠ1. Μελέτη κινητικότητας.** Επιδράσεις της ροπινιρόλης Α. Στην οριζόντια αυθόρμητη συνολική κινητική δραστηριότητα, Β. Στις ανασηκώσεις των πειραματόζωων, Γ. Στην περιφερική κινητική δραστηριότητα, Δ. Στη δραστηριότητα στις γωνίες. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p = 0.001$ .

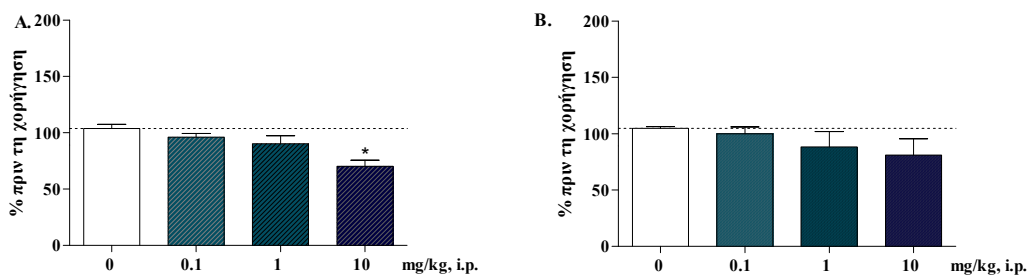
## 2. Πειραματικές μελέτες ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού

Στα πειράματα του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, η απλή ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε στατιστικά σημαντική δράση της ροπινιρόλης [ $F(3,24)=5.683$ ,  $p < 0.01$ ]. Εν συνεχεία, το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του ουδού ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού στη δόση των 10mg/kg ( $p < 0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ3<sup>Α</sup>).

Αναφορικά με την ασύμπτωτο, η ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές [ $F(3,24)=2.015$ ,  $p > 0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ3<sup>Β</sup>).



**ΣΧΗΜΑ ΑΠ2. Μελέτη ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού.** Καμπύλες συχνότητας ερεθισμού (λογάριθμος παλμών/παλμοσειρά) - απόκρισης (πατήματα μοχλού/λεπτό). Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε ένα αντιπροσωπευτικό πειραματόζωο πριν (μπλε σκούροι κύκλοι) και μετά (γαλάζιοι κύκλοι) τη συστηματική χορήγηση: Α. Εκδόχου, Β. 0.1mg/kg ροπινιρόλης, Γ. 1mg/kg ροπινιρόλης, Δ. 10mg/kg ροπινιρόλης.



**ΣΧΗΜΑ ΑΠ3. Μελέτη Ενδοκρανιακού Αυτοερεθισμού.** Επιδράσεις της ροπινιρόλης Α. στον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού Β. στην ασύμπτωτο. \* $p < 0.05$ .

### 3. Πειραματικές μελέτες καταγραφής αγχώδους συμπεριφοράς στον υπερυψωμένο λαβύρινθο

Στα πειράματα του υπερυψωμένου λαβυρίνθου, η ροπινιρόλη επηρέασε τον χρόνο και το % ποσοστό του χρόνου παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες [ $F(3,36)=6.085$ ,  $p<0.05$  και  $F(3,35)=6.085$ ,  $p<0.05$  αντίστοιχα]. Επιπλέον, το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση τόσο του χρόνου παραμονής όσο και του % ποσοστού του χρόνου παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες για το 1mg/kg ( $p<0.05$ ) και για τα 10mg/kg ( $p<0.01$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ4<sup>A</sup> και 4<sup>B</sup>).

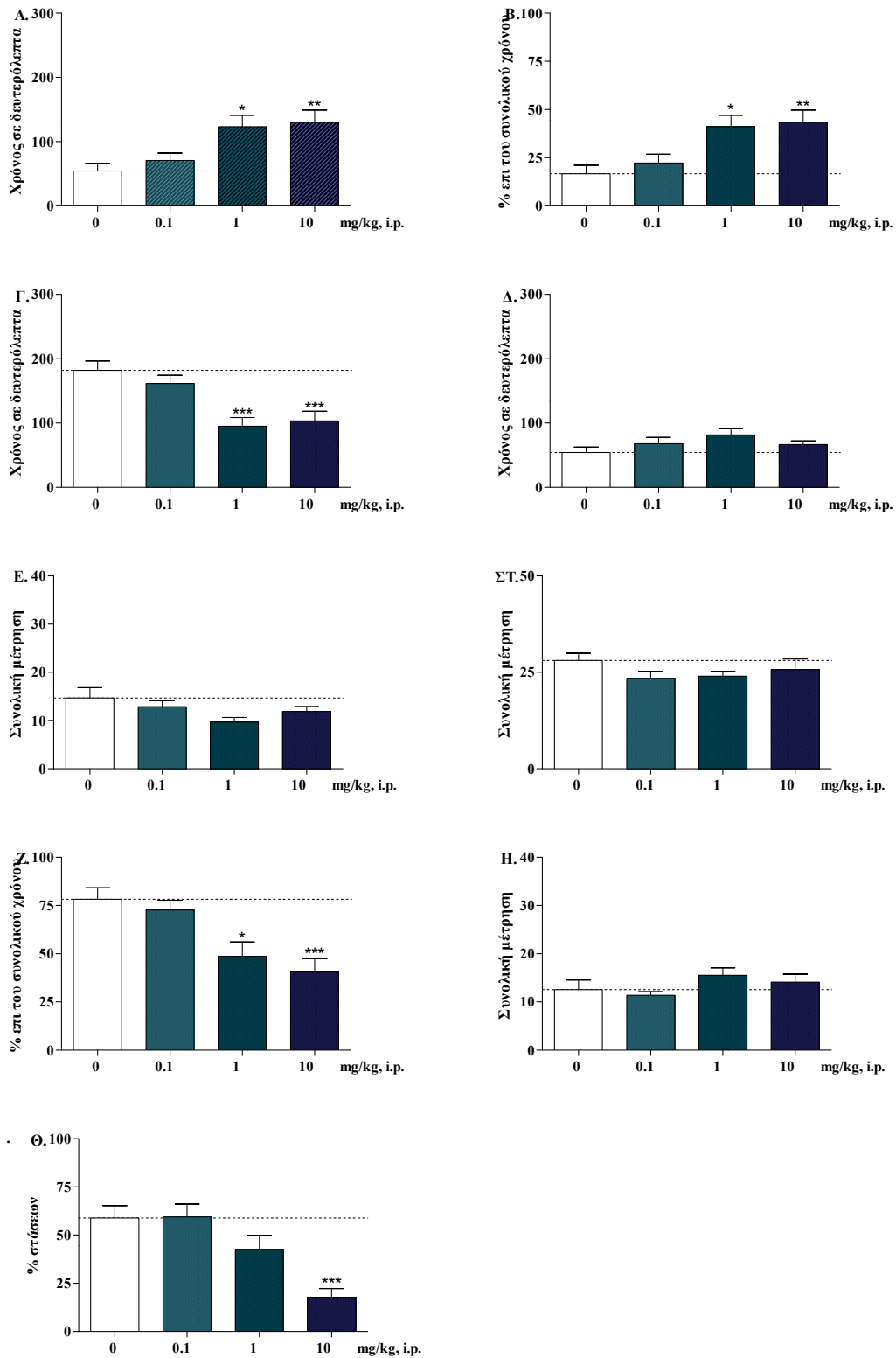
Η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε στατιστικά σημαντική δράση της ροπινιρόλης στο χρόνο παραμονής στους κλειστούς βραχίονες [ $F(3,36)=10.81$ ,  $p<0.001$ ]. Το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του χρόνου παραμονής στους κλειστούς βραχίονες για το 1mg/kg ( $p<0.001$ ) και για τα 10mg/kg ( $p<0.001$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ4<sup>Γ</sup>).

Η απλή ανάλυση διακύμανσης αναφορικά με το χρόνο παραμονής στο κέντρο έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της δράσης της ροπινιρόλης [ $F(3,36)=1.868$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ4<sup>Δ</sup>).

Η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει τον αριθμό των εισόδων στους βραχίονες [ $F(3,36)=2.242$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ4<sup>Ε</sup>).

Αναφορικά με τις εθολογικές παραμέτρους, οι μετρήσεις στάσεων επιμήκυνσης σώματος φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκαν από τη ροπινιρόλη, σύμφωνα με την απλή ανάλυση διακύμανσης ( $F(3,36)=1.041$ ,  $p>0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ4<sup>ΣΤ</sup>). Αντίθετα, ο αριθμός των προστατευμένων στάσεων επιμήκυνσης σώματος φαίνεται ότι επηρεάστηκε από τη δράση του φαρμάκου ( $F(3,36)=9.139$ ,  $p<0.001$ ). Σύμφωνα με το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni οι προστατευμένες στάσεις επιμήκυνσης σώματος μειώθηκαν στο 1mg/kg ( $p<0.05$ ) και στα 10mg/kg ( $p<0.001$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ4<sup>Ζ</sup>).

Σύμφωνα με την απλή ανάλυση διακύμανσης η ροπινιρόλη δεν επηρέασε τον συνολικό αριθμό βυθίσεων κεφαλής ( $F(3,36)=0.833$ ,  $p>0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ4<sup>Η</sup>). Στον αντίποδα, ο αριθμός των προστατευμένων βυθίσεων κεφαλής μειώθηκε με βάση την απλή ανάλυση διακύμανσης ( $F(3,36)=9.275$ ,  $p<0.001$ ). Η μείωση αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική μόνο στα 10mg/kg ( $p<0.001$ ) σύμφωνα με το κριτήριο πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (ΣΧΗΜΑ ΑΠ4<sup>Θ</sup>).



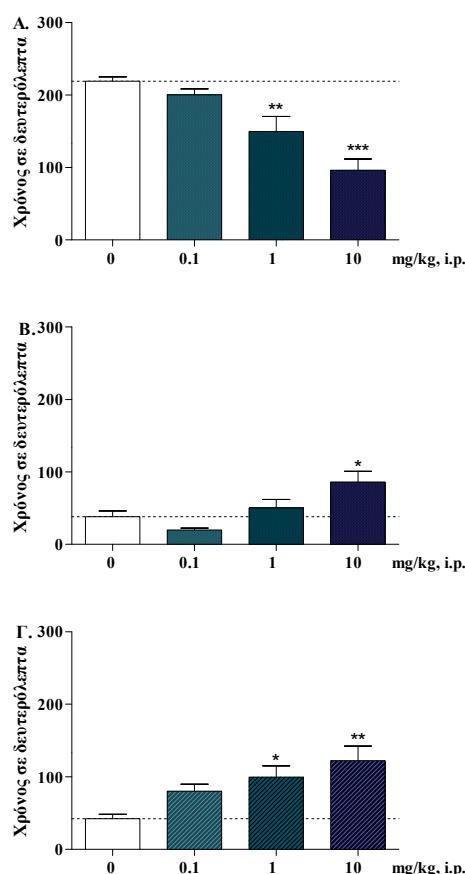
**ΣΧΗΜΑ ΑΠ4. Μελέτη Υπερυψωμένου Λαβυρίνθου.** Επιδράσεις της ροπινρόλης Α. στο χρόνο παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες Β. στο ποσοστό % του χρόνου παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες Γ. στο χρόνο παραμονής στους κλειστούς βραχίονες Δ. στο χρόνο



παραμονής στο κέντρο Ε. στο συνολικό αριθμό εισόδων σε βραχίονες ΣΤ. στον αριθμό των στάσεων επιμήκυνσης (stretch attend postures- SAP) Ζ. στο ποσοστό % προστατευμένων στάσεων επιμήκυνσης Η. στο συνολικό αριθμό βυθίσεων κεφαλής (head dips) Θ. στο ποσοστό % προστατευμένων βυθίσεων κεφαλής. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

#### 4. Πειραματικές μελέτες καταγραφής καταθλιπτικής συμπεριφοράς με τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης

Στα πειράματα της εξαναγκασμένης κολύμβησης η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε στατιστικά σημαντική δράση της ροπινιρόλης αναφορικά με την ακινησία των πειραματόζωων [ $F(3,36)= 15.60$ ,  $p<0.001$ ]. Επιπροσθέτως, το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της ακινησίας στο 1mg/kg ( $p<0.01$ ) και στα 10mg/kg ( $p<0.001$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ5<sup>Α</sup>).



**ΣΧΗΜΑ ΑΠ5. Μελέτη Εξαναγκασμένης Κολύμβησης.** Επιδράσεις της ροπινιρόλης Α. στην ακινησία (immobility) Β. στην αναρρίχηση (climbing) Γ. στην κολύμβηση (swimming).

\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

Αναφορικά με τη συμπεριφορά αναρρίχησης (μείζονα ενεργητική συμπεριφορά), η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε στατιστικά σημαντική δράση της ροπινιρόλης [ $F(3,36)= 7.284$  ,  $p<0.01$ ]. Το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική δράση μόνο των 10mg/kg ( $p<0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ5<sup>B</sup>).

Τέλος, σύμφωνα με την απλή ανάλυση διακύμανσης, η ροπινιρόλη επηρέασε την κολυμβητική συμπεριφορά των πειραματόζωων [ $F(3,36)= 6.036$  ,  $p<0.05$ ], ενώ το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική δράση του 1mg/kg ( $p<0.05$ ) και των 10mg/kg ( $p<0.01$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ5<sup>Γ</sup>).

## **5. Πειραματικές μελέτες εκτίμησης γνωστικών λειτουργιών στον ακτινωτό λαβύρινθο (Radial arm maze)**

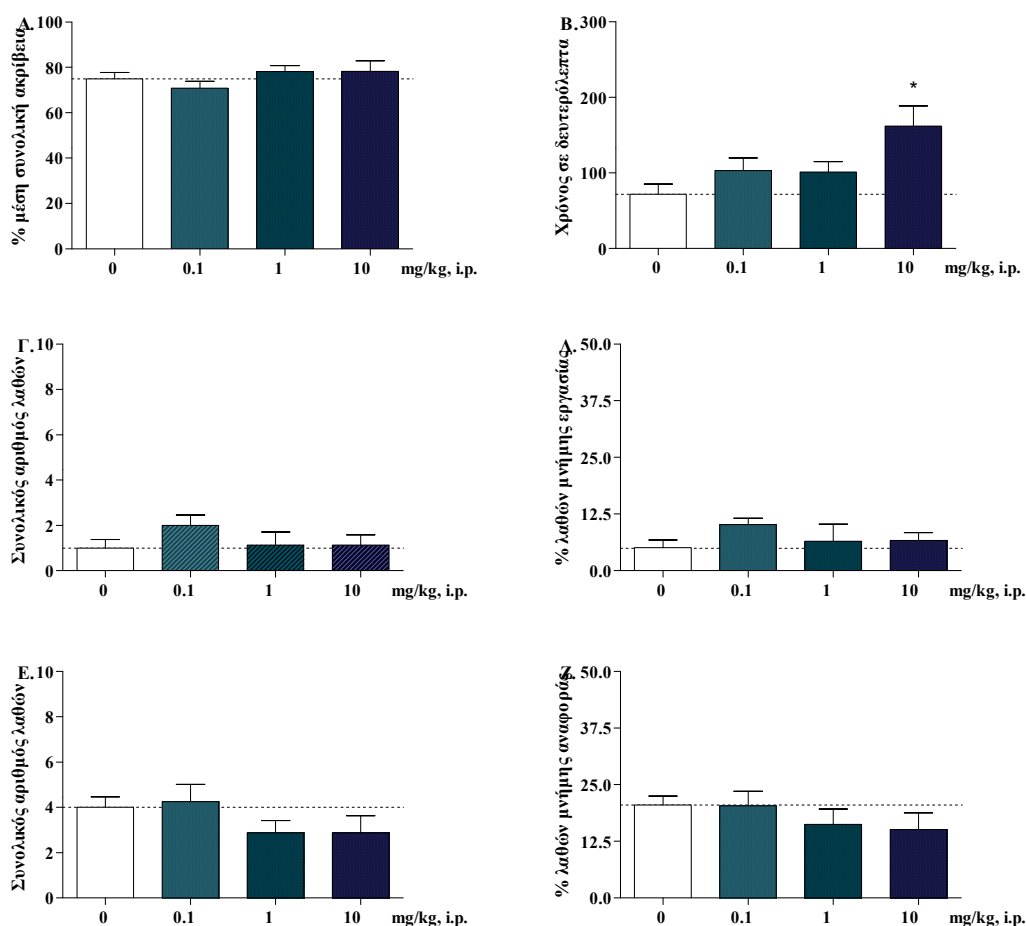
Στα πειράματα του ακτινωτού λαβυρίνθου, η απλή ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι η ροπινιρόλη δεν επηρέασε την συνολική ακρίβεια πραγματοποίησης της διαδικασίας [ $F(3,25)= 1.086$  ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ6<sup>A</sup>).

Αναφορικά με τον μέσο χρόνο ολοκλήρωσης της δοκιμασίας, η ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι η ροπινιρόλη επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον χρόνο ολοκλήρωσης της δοκιμασίας [ $F(3,25)= 4.245$ ,  $p<0.05$ ]. Το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση του χρόνου ολοκλήρωσης της δοκιμασίας στη δόση των 10mg/kg ( $p<0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ6<sup>B</sup>).

Ο χρόνος ολοκλήρωσης της δοκιμασίας φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από την κινητική δραστηριότητα των πειραματόζωων όπως υποδεικνύουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων μέτρησης της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, στα πρώτα 5 λεπτά μέτρησης της αυθόρμητης κινητικότητας (και 15 λεπτά μετά τη χορήγηση ροπινιρόλης) που αντιστοιχούν στην πρώτη δοκιμή του ακτινωτού λαβυρίνθου, η ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει σημαντικά την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα των πειραματόζωων [ $F(3,27)= 1.718$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ7<sup>A</sup>). Στο χρονικό διάστημα 5-10 λεπτών, που αντιστοιχεί στη δεύτερη δοκιμή, η ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε και πάλι ότι η ροπινιρόλη δεν

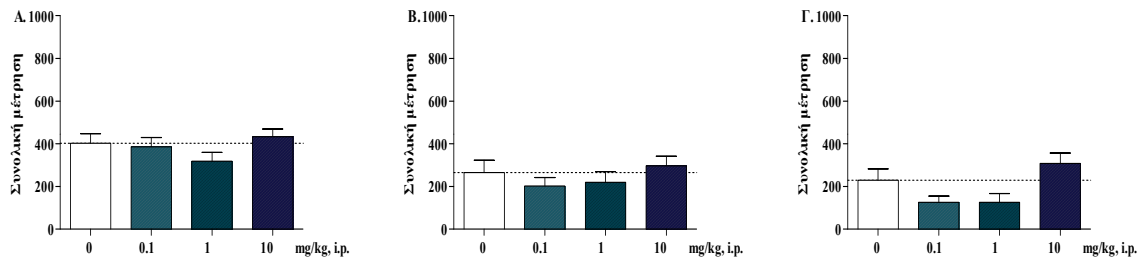
ασκεί σημαντικές δράσεις στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα [ $F(3,27)= 1.121$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ7<sup>B</sup>). Τέλος, στο χρονικό διάστημα 10-15 λεπτών αν και η ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές [ $F(3,27)= 4.188$ ,  $p<0.05$ ], το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές δράσεις της ροπινιρόλης (ΣΧΗΜΑ ΑΠ7<sup>Γ</sup>).

Αναφορικά με τα λάθη χωρικής μνήμης εργασίας καθώς και το % ποσοστό λαθών χωρικής μνήμης εργασίας η ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι η ροπινιρόλη δεν επηρέασε τη χωρική μνήμη εργασίας [ $F(3,25)= 0.897$ ,  $p>0.05$  και  $F(3,25)= 0.828$ ,  $p>0.05$  αντίστοιχα] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ6<sup>Γ</sup> και 6<sup>Δ</sup>).



**ΣΧΗΜΑ ΑΠ6. Μελέτη Ακτινωτού Λαβυρίνθου.** Επιδράσεις της ροπινιρόλης Α. Στη συνολική ακρίβεια πραγματοποίησης της διαδικασίας Β. Στο μέσο χρόνο ολοκλήρωσης της δοκιμασίας Γ. Στον αριθμό λαθών μνήμης εργασίας Δ. Στο ποσοστό % λαθών μνήμης εργασίας. Ε. Στον αριθμό λαθών μνήμης αναφοράς. Ζ. Στο ποσοστό % λαθών μνήμης αναφοράς. \* $p<0.05$ .

Τέλος, αναφορικά με τα λάθη χωρικής μνήμης αναφοράς και το % ποσοστό λαθών χωρικής μνήμης αναφοράς, σύμφωνα με την απλή ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, η ροπινιρόλη δεν είχε καμία δράση [ $F(3,25)= 1.249$ ,  $p>0.05$  και  $F(3,25)= 0.779$ ,  $p>0.05$  αντίστοιχα] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ6<sup>E</sup> και 6<sup>Z</sup>).

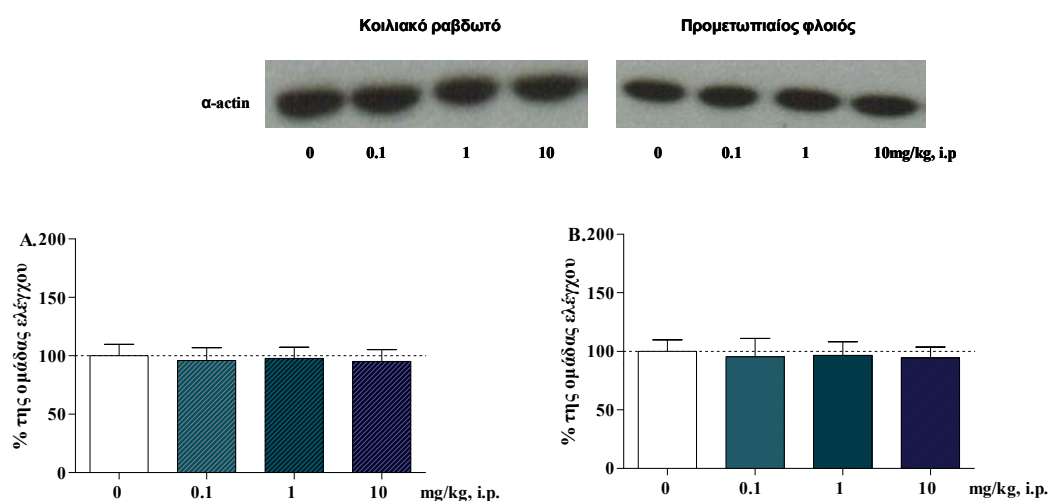


**ΣΧΗΜΑ ΑΠ7. Μελέτη Κινητικής Δραστηριότητας.** Η αύξηση του χρόνου ολοκλήρωσης της διαδικασίας στη δόση των 10mg/kg ροπινιρόλης στο πείραμα του ακτινωτού λαβυρίνθου δεν οφείλεται σε παρεμπόδιση της κινητικής δραστηριότητας. Μετρήσεις οριζόντιας αυθόρμητης κινητικότητας ανά 5 λεπτά Α. Πρώτα 5 λεπτά εισαγωγής των πειραματόζώων στους κλωβούς μέτρησης της κινητικής δραστηριότητας. Β. Στο χρονικό διάστημα 5-10 λεπτών. Γ. Στο χρονικό διάστημα 10-15 λεπτών.

## B. Μοριακές μελέτες

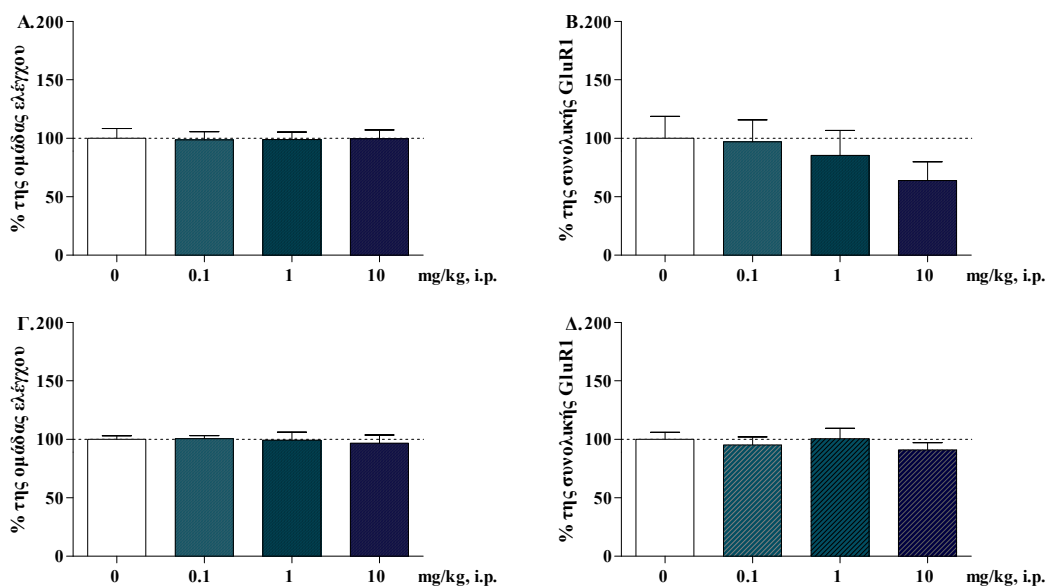
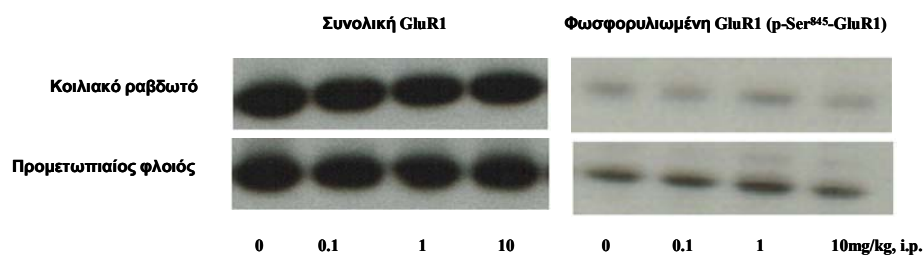
### 1. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Στα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης, η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποσότητα της  $\alpha$ -actin στο κοιλιακό ραβδωτό [ $F(3,20)=0.15$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ8<sup>A</sup>) ούτε στον προμετωπιαίο φλοιό [ $F(3,20)=0.27$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ8<sup>B</sup>).



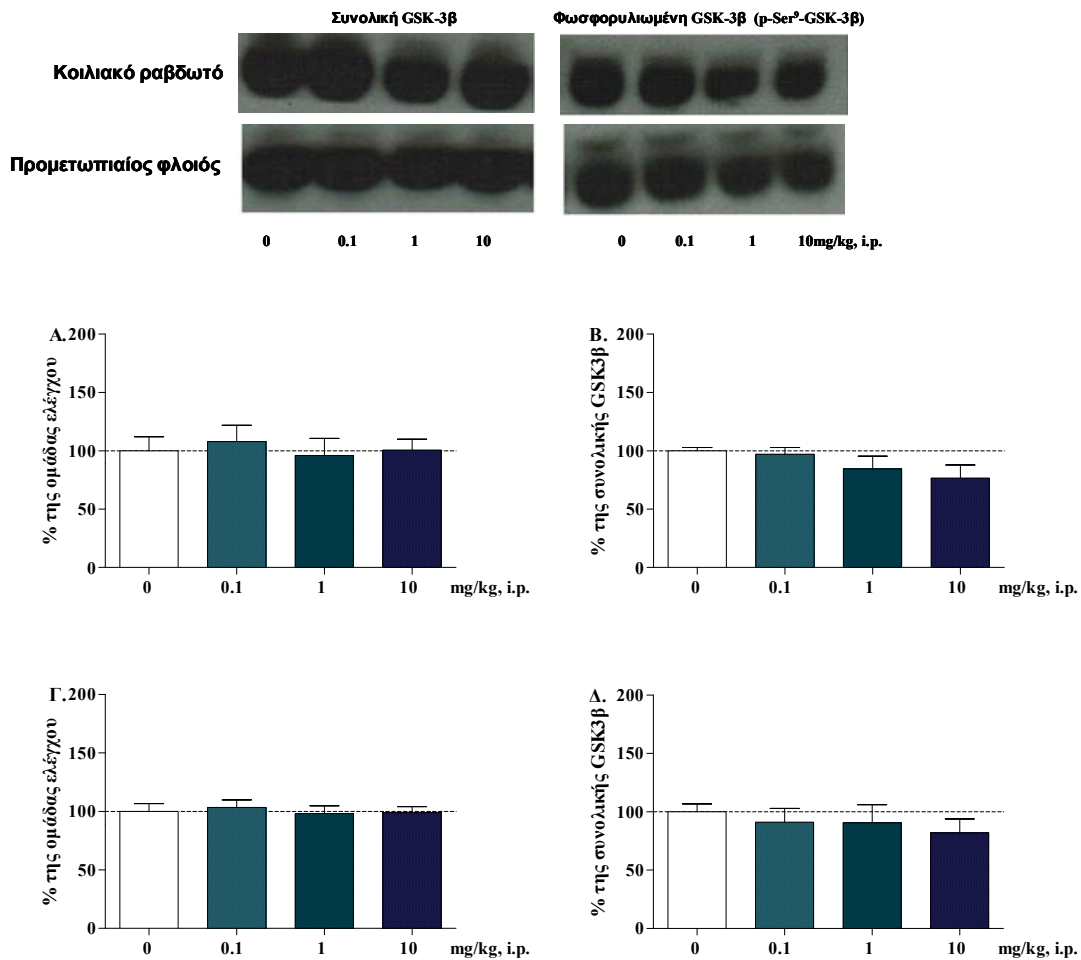
**ΣΧΗΜΑ ΑΠ8. Ανοσοαποτύπωση κατά Western.** Έλεγχος ποσότητας πρωτεϊνών μελετώντας την  $\alpha$ -actin. A. Στο κοιλιακό ραβδωτό. B. Στον προμετωπιαίο φλοιό.

Η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης GluR1 στο κοιλιακό ραβδωτό [ $F(3,18)=0.005$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ9<sup>A</sup>) και στον προμετωπιαίο φλοιό [ $F(3,17)=0.099$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ9<sup>Γ</sup>). Επιπροσθέτως, δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε στο ποσοστό φωσφορυλιωμένης GluR1 (p-Ser<sup>845</sup>-GluR1) πρωτεΐνης στο ραχιαίο ραβδωτό [ $F(3,13)=0.608$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ9<sup>B</sup>) ή τον προμετωπιαίο φλοιό ( $F(3,17)=0.392$ ,  $p>0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ9<sup>Δ</sup>).



**ΣΧΗΜΑ ΑΠ9. Ανοσοαποτύπωση κατά Western. Επιδράσεις της ροπινιρόλης στην εξαρτώμενη από την PKA φωσφορυλίωση της GluR1 υπομονάδας (p-Ser<sup>845</sup>-GluR1). Α. Συνολική πρωτεΐνη GluR1 στο κοιλιακό ραβδωτό. Β. Φωσφορυλιωμένη GluR1 (p-Ser<sup>845</sup>-GluR1) στο κοιλιακό ραβδωτό. Γ. Συνολική πρωτεΐνη GluR1 στον προμετωπιαίο φλοιό. Δ. Φωσφορυλιωμένη GluR1 (p-Ser<sup>845</sup>-GluR1) στον προμετωπιαίο φλοιό.**

Στα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης, η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης GSK-3β στο κοιλιακό ραβδωτό [ $F(3,20)=0.153$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ10<sup>Α</sup>) και στον προμετωπιαίο φλοιό [ $F(3,20)=0.137$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ10<sup>Γ</sup>). Επιπροσθέτως, δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε στο ποσοστό της φωσφορυλιωμένης GSK-3β (p-Ser<sup>9</sup>-GSK-3β) πρωτεΐνης στο κοιλιακό ραβδωτό ( $F(3,18)=1.664$ ,  $p>0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ10<sup>Β</sup>) ή τον προμετωπιαίο φλοιό [ $F(3,18)=0.362$ ,  $p>0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ10<sup>Δ</sup>).



**ΣΧΗΜΑ ΑΠ10. Ανοσοαποτύπωση κατά Western. Επιδράσεις της ροπινιρόλης στη φωσφορυλίωση της GSK-3β (p-Ser<sup>9</sup>-GSK-3β).** Α. Συνολική πρωτεΐνη GSK-3β στο κοιλιακό ραβδωτό. Β. Φωσφορυλιωμένη GSK-3β (p-Ser<sup>9</sup>-GSK-3β) στο κοιλιακό ραβδωτό. Γ. Συνολική πρωτεΐνη GSK-3β στον προμετωπιαίο φλοιό. Δ. Φωσφορυλιωμένη GSK-3β (p-Ser<sup>9</sup>-GSK-3β) στον προμετωπιαίο φλοιό.

Αναφορικά με την ποσότητα της συνολικής MAPK πρωτεΐνη 42kDa (ΣΧΗΜΑ ΑΠ11<sup>Α</sup>) και 44kDa (ΣΧΗΜΑ ΑΠ11<sup>Γ</sup>) δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο κοιλιακό ραβδωτό [F(3,18)=0.69, p>0.05 και F(3,18)=0.093, p>0.05 αντίστοιχα] ούτε στον προμετωπιαίο φλοιό [F(3,20)=0.346, p>0.05 και F(3,20)=, p>0.05 αντίστοιχα] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ11<sup>Ε</sup> και ΑΠ11<sup>Ζ</sup>). Επιπλέον, η ροπινιρόλη δεν επηρέασε το ποσοστό φωσφορυλίωσης ούτε της 42-MAPK (ΣΧΗΜΑ ΑΠ11<sup>Β</sup>) ούτε της 44-MAPK (ΣΧΗΜΑ ΑΠ11<sup>Δ</sup>) στο ραχιαίο ραβδωτό [F(3,13)= 0.33, p>0.05 και

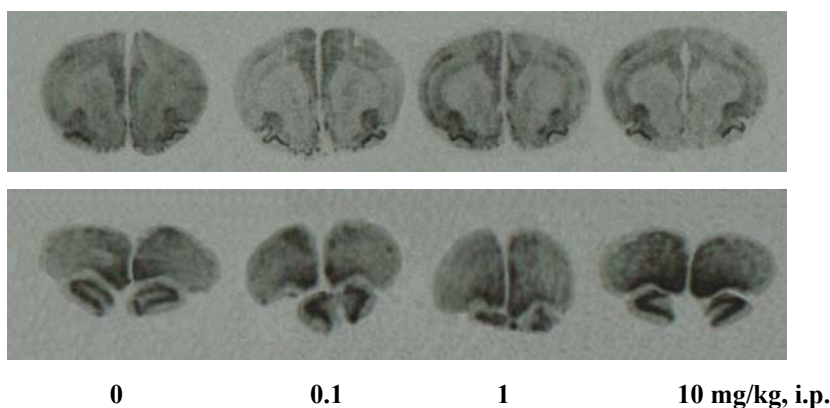


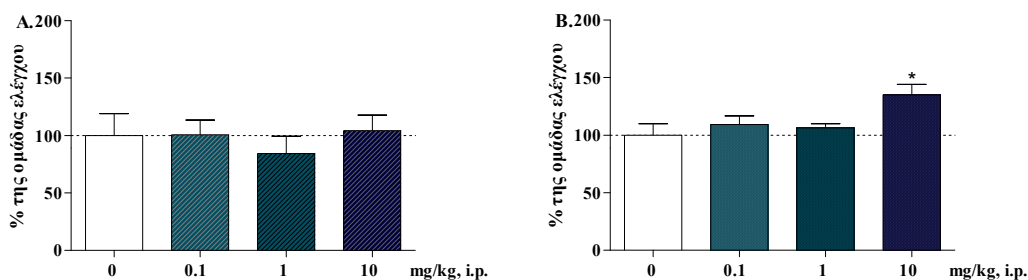


φωσφορυλίωση των MAPK κινασών (p-Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>-42MAPK/p-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>-44MAPK). Α. Στη συνολική MAPK 42 kDa στο κοιλιακό ραβδωτό. Β. Στη φωσφορυλίωση της MAPK 42 kDa (p-Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>-42MAPK.) στο κοιλιακό ραβδωτό. Γ. Συνολική MAPK 44 kDa στο κοιλιακό ραβδωτό. Δ. Στη φωσφορυλίωση της MAPK 44 kDa (p-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>-44MAPK) στο κοιλιακό ραβδωτό. Ε. Στη συνολική MAPK 42 kDa στον προμετωπιαίο φλοιό. Ζ. Στη φωσφορυλίωση της της MAPK 42 kDa (p-Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>-42MAPK.) στον προμετωπιαίο φλοιό. Η. Συνολική MAPK 44 kDa στον προμετωπιαίο φλοιό. ΣΤ. Στη φωσφορυλίωση της MAPK 44 kDa (p-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>-44MAPK) στον προμετωπιαίο φλοιό.

## 2. In situ υβριδοποίηση

Στα πειράματα της in situ υβριδοποίησης, η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο mRNA του *c-fos* στο ραχιαίο ραβδωτό [F(3,15)= 0.332, p>0.05] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ12<sup>Α</sup>). Αντίθετα, σύμφωνα με την απλή ανάλυση διακύμανσης βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές δράσεις της ροπινρόλης στο mRNA του *c-fos* στον προμετωπιαίο φλοιό [F(3,14)= 4.390, p<0.05]. Το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση του mRNA του *c-fos* στον προμετωπιαίο φλοιό στη δόση των 10mg/kg (p<0.05) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ12<sup>Β</sup>).

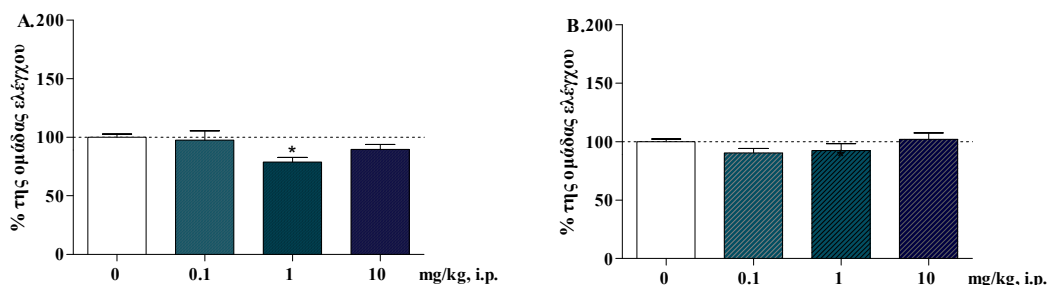
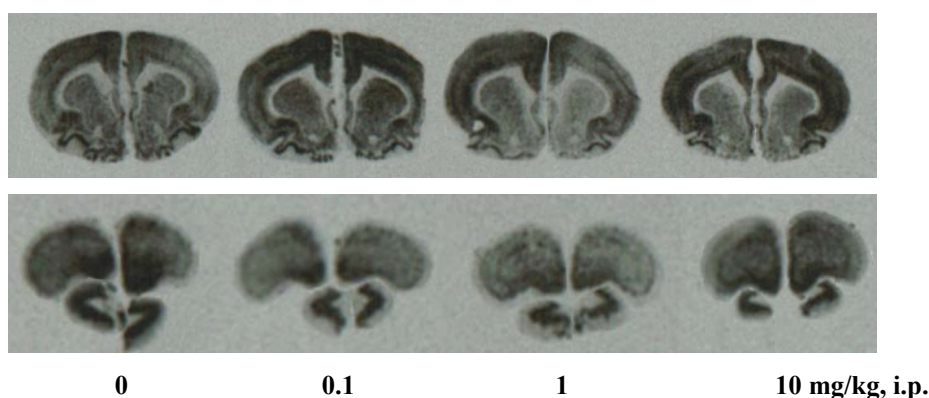




**ΣΧΗΜΑ ΑΠ12. In situ υβριδοποίηση. Αλλαγές στην έκφραση του mRNA του *c-fos*.**

A. Στο ραχιαίο ραβδωτό. B. Στον προμετωπιαίο φλοιό. \* $p < 0.05$ .

Τέλος, αναφορικά με τα αποτελέσματα των πειράματων της in situ υβριδοποίησης για το mRNA της *arc* η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε στατιστικά σημαντική δράση της ροπινιρόλης στην έκφραση του mRNA του *arc* στο κοιλιακό ραβδωτό [ $F(3,15) = 4.093$ ,  $p < 0.05$ ]. Επιπλέον, το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση μόνο στο 1mg/kg ροπινιρόλης ( $p < 0.05$ ) (ΣΧΗΜΑ ΑΠ13<sup>A</sup>). Αντίθετα, η απλή ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές δράσεις της ροπινιρόλης στο mRNA του *arc* στον προμετωπιαίο φλοιό [ $F(3,14) = 0.148$ ,  $p > 0.05$ ] (ΣΧΗΜΑ ΑΠ13<sup>B</sup>).



**ΣΧΗΜΑ ΑΠ13. In situ υβριδοποίηση. Αλλαγές στην έκφραση του mRNA του *arc*.**

A. Στο ραχιαίο ραβδωτό. B. Στον προμετωπιαίο φλοιό. \* $p < 0.05$ .

## V.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### A. Συμπεριφορικές μελέτες

#### 1. Αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης στηρίζουν την υπόθεση ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει σημαντικά την οριζόντια αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα των πειραματόζωων. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με προγενέστερες μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι αγωνιστές των D<sub>3</sub> υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένης της ροπινιρόλης, δεν επηρεάζουν σημαντικά την οριζόντια αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα (Moffett et al., 2010; Dhir & Kulkarni, 2007). Επιπροσθέτως οι τάσεις μείωσης της κινητικής δραστηριότητας που παρατηρούνται στις χαμηλές δόσεις συνάδουν με το γενικότερο προφίλ των αγωνιστών των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων που σε χαμηλές δόσεις φαίνεται ότι μειώνουν την κινητική δραστηριότητα δρώντας μέσω προσυναπτικών D<sub>2</sub> υποδοχέων (Li et al., 2010; Benaliouad, et al., 2009). Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι και η ενεργοποίηση των μετασυναπτικών D<sub>3</sub> υποδοχέων οδηγεί σε υποκινητικότητα (Millan et al., 2000). Καθώς η ροπινιρόλη έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τους D<sub>3</sub> υποδοχείς, εικάζουμε ότι η τάση μείωσης της κινητικότητας στις μικρότερες δόσεις σχετίζεται με μετασυναπτική ενεργοποίηση D<sub>3</sub> υποδοχέων και όχι με ενεργοποίηση των προσυναπτικών D<sub>2</sub> υποδοχέων. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν επίσης με την έρευνα των Millan και συν. (2004) όπου τα 10mg/kg ροπινιρόλης βρέθηκε ότι αυξάνουν την κινητική δραστηριότητα σε εξοικειωμένα πειραματόζωα, εύρημα το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με την τάση που παρατηρείται στα δικά μας δεδομένα.

Ο αριθμός των ανασηκώσεων των πειραματόζωων, ο οποίος αντικατοπτρίζει την εξερευνητική συμπεριφορά των επίμυων ήταν σημαντικά μειωμένος σε όλες τις δόσεις της ροπινιρόλης, αλλά η δράση αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική στις δόσεις των 1 και 10mg/kg. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ότι η ροπινιρόλη επηρεάζει την εξερευνητική συμπεριφορά των πειραματόζωων. Τα δεδομένα αυτά είναι συνεπή με δεδομένα παλαιότερων μελετών αναφορικά με τη δράση της κουινπιρόλης όπου σε μεγάλες δόσεις φαίνεται να παρεμποδίζει την εξερευνητική συμπεριφορά (Rodgers et al., 1994).

Η περιφερική κινητική δραστηριότητα φαίνεται ότι παρουσιάζει ένα ανάλογο προφίλ με τη συνολική αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα, επιδεικνύοντας τάσεις μείωσης της δραστηριότητας στις μικρές δόσεις και τάση για αύξηση στη μεγάλη δόση. Η μέτρηση της περιφερικής κινητικής δραστηριότητας μπορεί να θεωρηθεί ως μια μέτρηση της συνολικής αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας απαλλαγμένη από παρεμβαίνουσες μεταβλητές (εξερευνητική ορμή, αγχώδης συμπεριφορά), επιβεβαιώνοντας με τον τρόπο αυτό το ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει σημαντικά την κινητική δραστηριότητα εξοικειωμένων πειραματόζωων.

Το γεγονός ότι ένα πειραματόζωο αποφεύγει να πηγαίνει στο κέντρο ενός κλωβού αποτελεί μια ένδειξη αγχώδους συμπεριφοράς και κατ' επέκταση, η κινητική δραστηριότητα στις γωνίες θα μπορούσε να αποτελέσει μια επιπλέον ένδειξη της συμπεριφοράς αυτής. Έτσι, μπορούμε να πούμε ότι οι επίμυες έχουν την τάση να παραμένουν στις γωνίες ανοιχτών χώρων όταν βιώνουν αυξημένο άγχος. Η ροπινιρόλη μείωσε την κινητική δραστηριότητα στις γωνίες, δράση που βρέθηκε στατιστικά σημαντική στα 10mg/kg. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μια πρώτη ένδειξη αγχολυτικών δράσεων της ροπινιρόλης.

Εν κατακλείδι, το γεγονός ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα στο μεγάλο εύρος δόσεων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη καθιστά τα λοιπά αποτελέσματά μας ιδιαίτερος σημαντικά καθώς φαίνεται ότι δεν έχουν επηρεαστεί από αλλαγές στην κινητικότητα των πειραματόζωων.

## **2. Δράσεις στον ενδοκρανιακό αυτοερεθισμό**

Αναφορικά με τις επιδράσεις στη συμπεριφορά ανταμοιβής, όπως αυτή εκτιμάται με το πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, η ροπινιρόλη φαίνεται ότι μειώνει τον ουδό του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού επιδεικνύοντας ενισχυτικές ιδιότητες μόνο σε μεγάλες δόσεις (10mg/kg). Η ανηδονία-μειωμένη ενίσχυση αποτελεί μείζον χαρακτηριστικό της καταθλιπτικής διάθεσης, η οποία παρατηρείται στο 40% των ασθενών με νόσο Parkinson (Tadaiesky et al., 2008) και έτσι οι επιδράσεις της ροπινιρόλης στην ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού θα μπορούσαν να είναι ευεργετικές.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενώ το φάρμακο μειώνει τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, δράση ανάλογη με τα ψυχοδιεγερτικά, μειώνει και

την ασύμπτωτο, δράση αντιστρόφως ανάλογη από αυτή των ψυχοδιεγερτικών. Παρόλα αυτά, η δράση της ροπινιρόλης στην ασύμπτωτο δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Το προφίλ της ροπινιρόλης φαίνεται ότι είναι ανάλογο με αυτό του εκλεκτικού αγωνιστή των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT που μειώνει τόσο τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού όσο και την ασύμπτωτο (Panagis & Spyragi, 1996).

Ωστόσο, θα πρέπει να σημειώσουμε ότι οι ενισχυτικές ιδιότητες της ροπινιρόλης παρατηρούνται μόνο σε μεγάλες δόσεις γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με επιδράσεις στους D<sub>2</sub> υποδοχείς. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι οι αγωνιστές των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων, όπως η κουινπιρόλη, σε μεγάλες δόσεις επιδεικνύουν ενισχυτικές ιδιότητες στο πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού (Benaliouad, et al., 2009).

Συμπερασματικά, η ροπινιρόλη παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο προφίλ στο πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, μειώνοντας σημαντικά τον ουδό ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού μόνο σε μεγάλες δόσεις αλλά ταυτόχρονα παρουσιάζοντας και μια τάση μείωσης της ασύμπτωτου, γεγονός που τη διαφοροποιεί από τα ψυχοδιεγερτικά.

### **ΑΙ3. Αγχώδης συμπεριφορά**

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το αγχολυτικό προφίλ της ροπινιρόλης. Προγενέστερες μελέτες στήριζαν την υπόθεση ότι οι αγωνιστές των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων επιδεικνύουν αγχολυτικές δράσεις (Rogóz et al., 2004; Rogers et al., 2000; Rodgers et al., 1996). Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης στηρίζουν μια δοσο-εξαρτώμενη αγχολυτική δράση.

Στο πρότυπο του υπερυψωμένου λαβυρίνθου, η ροπινιρόλη στη δόση του 1 και των 10mg/kg αύξησε στατιστικά σημαντικά το χρόνο παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες καθώς και το % ποσοστό του χρόνου παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες, ενώ μείωσε το χρόνο παραμονής στους κλειστούς βραχίονες υποδεικνύοντας δοσο-εξαρτώμενες αγχολυτικές επιδράσεις.

Η ροπινιρόλη δεν επηρέασε τη συμπεριφορά προσέγγισης-αποφυγής όπως φαίνεται από το γεγονός ότι ο χρόνος παραμονής στο κέντρο παρέμεινε ανεπηρέαστος. Επιπλέον, ο αριθμός των εισόδων σε ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες παρέμεινε ανεπηρέαστος γεγονός που επιβεβαιώνει τα ευρήματα της

κινητικότητα που έδειξαν ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει την κινητική δραστηριότητα.

Αναφορικά με τις εθολογικές παραμέτρους που μετρήσαμε στο πείραμα του υπερυψωμένου λαβυρίνθου, η ροπινιρόλη δεν επηρέασε τον συνολικό αριθμό των στάσεων επιμήκυνσης σώματος ούτε το συνολικό αριθμό στάσεων βύθισης κεφαλής, ενδείξεις εξερευνητικής συμπεριφοράς. Το γεγονός ότι τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει την εξερευνητική συμπεριφορά, ενώ τα δεδομένα της μελέτης της κινητικής δραστηριότητας υποδείκνυαν μείωση του αριθμού των ανασηκώσεων και άρα της εξερευνητικής συμπεριφοράς, εικάζουμε ότι σχετίζονται με παρεμβαίνουσες μεταβλητές όπως η εξοικείωση των πειραματόζων με τις συσκευές και τη δοκιμασία. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του αριθμού των ανασηκώσεων αναδείχθηκε σε εξοικειωμένα με τους κλωβούς πειραματόζωα ενώ αντίθετα στη μελέτη του υπερυψωμένου λαβυρίνθου τα ζώα εισέρχονταν στο λαβύρινθο για πρώτη φορά.

Αντίθετα, το ποσοστό των προστατευμένων στάσεων επιμήκυνσης σώματος (αυτών που πραγματοποιήθηκαν από το κέντρο ή τους κλειστούς βραχίονες) βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένο με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει αγχολυτικές δράσεις και συνάδει με τον αυξημένο χρόνο παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες και το μειωμένο χρόνο παραμονής στους κλειστούς βραχίονες.

Τέλος, το ποσοστό των προστατευμένων στάσεων βύθισης κεφαλής βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένο στα 10mg/kg ροπινιρόλης, άλλη μια ένδειξη αγχολυτικών επιδράσεων της ροπινιρόλης αλλά και μια ένδειξη επηρεασμού της διαδικασίας λήψης αποφάσεων. Η μείωση του ποσοστού των προστατευμένων βυθίσεων κεφαλής, ενδεχομένως σχετίζεται με αυξημένη παρορμητικότητα των πειραματόζων επαγόμενη από ροπινιρόλη.

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ξεκάθαρη αγχολυτική δράση της ροπινιρόλης όπως αναδεικνύεται από ποικίλες αντικειμενικές και εθολογικές παραμέτρους που εξετάσαμε. Αντιθέτως, η εξερευνητική συμπεριφορά των πειραματόζων δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη δράση του φαρμάκου. Τα ευρήματά μας στηρίζουν ακόμα ενδεχόμενες αλλαγές στη διαδικασία λήψης αποφάσεων έπειτα από μεγάλες δόσεις φαρμάκου.

#### **A14. Αντικαταθλιπτικές Δράσεις**

Στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης η ροπινιρόλη μείωσε δόσο-εξαρτώμενα την ακινησία (παθητική συμπεριφορά) των πειραματόζωων, επιδεικνύοντας αντικαταθλιπτικές δράσεις. Το εύρημα αυτό είναι συνεπές με προγενέστερες μελέτες (Dhir & Kulkarni, 2007; Millan et al., 2004; Millan et al., 2000; Rogers et al., 2000).

Επιπροσθέτως, η έρευνά μας είναι η πρώτη που υποδεικνύει ότι η ροπινιρόλη εκτός του ότι μειώνει την παθητική συμπεριφορά, αυξάνει και τις πιο ενεργητικές συμπεριφορές. Η μείζων ενεργητική συμπεριφορά της αναρρίχησης φαίνεται ότι αυξάνεται μόνο σε μεγάλες δόσεις (10mg/kg). Καθώς η αύξηση της συμπεριφοράς αναρρίχησης έχει συσχετιστεί με αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης (Page et al., 1999; Rénéric & Lucki, 1998) το εύρημα αυτό θα μπορούσε να αποτελεί το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ντοπαμινεργικού και νοραδρενεργικού συστήματος.

Αντίθετα, με τη συμπεριφορά αναρρίχησης, η κολυμβητική συμπεριφορά, φαίνεται ότι επηρεάζεται τόσο από τη μεγάλη όσο και από τη μεσαία δόση ροπινιρόλης. Η κολυμβητική συμπεριφορά έχει συσχετιστεί με το σεροτονινεργικό σύστημα (Page et al., 1999; Rénéric & Lucki, 1998) γεγονός που πιθανότατα υποδεικνύει αλληλεπίδραση σεροτονινεργικού και ντοπαμινεργικού συστήματος ακόμα και σε μεσαίες δόσεις ροπινιρόλης. Το εύρημα αυτό συμφωνεί και με το αγχολυτικό προφίλ της ροπινιρόλης στις αντίστοιχες δόσεις, όπου και εκεί το σεροτονινεργικό σύστημα παίζει μείζονα ρόλο.

#### **A15. Γνωστικές λειτουργίες**

Η ροπινιρόλη δεν επηρέασε σημαντικά την συνολική ακρίβεια πραγματοποίησης της δοκιμασίας αναφορικά με την χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας. Το εύρημα αυτό αποτελεί ενδεχομένως μια πρώτη ένδειξη ότι δεν επηρεάζει σημαντικά τις συγκεκριμένες γνωστικές πτυχές της συμπεριφοράς. Αν και το ντοπαμινεργικό σύστημα εμπλέκεται σε διεργασίες μάθησης και μνήμης υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν μεγαλύτερη εμπλοκή των D<sub>1</sub> υποδοχέων (Xing et al., 2010).

Αντίθετα, φαίνεται ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης της δοκιμασίας αυξάνεται σημαντικά, εύρημα στατιστικά σημαντικό για τη δόση των 10mg/kg. Η αύξηση του χρόνου ολοκλήρωσης της δοκιμασίας δεν εξηγείται από παρεμπόδιση της κινητικής δραστηριότητας καθώς όχι μόνο δεν βρέθηκε μείωση της κινητικής δραστηριότητας στη δόση αυτή αλλά αντίθετα παρατηρήθηκε τάση αύξησης στο αντίστοιχο πείραμα μέτρησης της κινητικής δραστηριότητας. Στο αντίστοιχο τμήμα των αποτελεσμάτων (βλ. ΣΧΗΜΑ ΑΠ7) παρουσιάζεται η μέτρηση της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας ανά 5 λεπτά (όσο διαρκεί η κάθε δοκιμή στον ακτινωτό λαβύρινθο) στο διάστημα 0-15λεπτά μετά την έναρξη μέτρησης της κινητικότητας -με σημείο 0 τα 15 λεπτά μετά τη χορήγηση του φαρμάκου- αντίστοιχο με το διάστημα πραγματοποίησης και των 3 δοκιμών της κάθε μέτρησης στον ακτινωτό λαβύρινθο. Μάλιστα, οι συνθήκες μέτρησης της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας και αυτές της πραγματοποίησης των πειραμάτων του ακτινωτού λαβυρίνθου μπορούν να κριθούν ανάλογες καθώς τόσο τα ζώα της κινητικότητας όσο και τα ζώα του λαβυρίνθου ήταν εξοικειωμένα με τους αντίστοιχους-ες κλωβούς/συσκευές.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στη δόση των 10mg/kg, 2 ζώα παρότι εισήλθαν επιτυχώς στους βραχίονες στόχους δεν έφαγαν τους σβώλους τροφής αν και ήταν αποστερημένα τροφής πριν την πραγματοποίηση της δοκιμασίας. Η συμπεριφορά αυτή υποδεικνύει ότι αν και η χωρική μνήμη αναφοράς δεν έχει παρεμποδιστεί, άλλες δράσεις του φαρμάκου είναι εμπλεκόμενες. Πιο συγκεκριμένα, εικάζουμε ότι εμπλέκονται ενδεχόμενες ανορεξιογόνοι δράσεις της ροπινιρόλης. Έτσι, η αύξηση του χρόνου ολοκλήρωσης της δοκιμασίας πιθανότατα σχετίζεται με αλλαγές στην κινητοποίηση των πειραματόζωων καθώς αλλάζει το συναισθηματικό σθένος του «ενισχυτή». Καθώς το νοραδρενεργικό και το σεροτονινεργικό σύστημα επηρεάζουν την όρεξη, η ανορεξιογόνος δράση της ροπινιρόλης πιθανότατα οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις των συστημάτων αυτών με το ντοπαμινεργικό σύστημα. Το εύρημα αυτό συνάδει και με την αύξηση της αναρρίχησης και της κολύμβησης μόνο στη συγκεκριμένη δόση στο πείραμα της εξαναγκασμένης κολύμβησης που όπως αναφέρθηκε πρωτίστως ενδεχομένως σχετίζεται με αλληλεπιδράσεις των αντίστοιχων νευροδιαβιβαστικών συστημάτων.

Αντίθετα, η τάση αύξησης του χρόνου ολοκλήρωσης στις μικρότερες δόσεις δεν συνδέεται με ανορεξιογόνους δράσεις και αλλαγές στην κινητοποίηση. Στις μικρές δόσεις παρατηρείται μόνο τάση αύξησης του χρόνου ολοκλήρωσης της δοκιμασίας και η τάση αυτή είναι ανάλογη με την τάση για υποκινητικότητα που



παρατηρήσαμε στα πειράματα μέτρησης της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας και κατ' επέκταση μπορεί να σχετίζεται με αυτή.

Αναφορικά με τη χωρική μνήμη εργασίας, φαίνεται ότι τόσο ο αριθμός λαθών μνήμης εργασίας όσο και το % ποσοστό των λαθών αυτών δεν επηρεάζονται σημαντικά από τη ροπινιρόλη αν και παρατηρείται μια τάση παρεμπόδισης της μνήμης εργασίας στη μικρή δόση ροπινιρόλης. Τα δεδομένα μας συνάδουν με νευροψυχολογικά δεδομένα όπου ο αγωνιστής των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων πραμιπεξόλη δεν επηρέασε την χωρική μνήμη αναφοράς (Morein-Zamir et al., 2010).

Αντίθετα, αναφορικά με τη μνήμη αναφοράς η ροπινιρόλη τείνει να βελτιώσει τη χωρική μνήμη αναφοράς όπως φαίνεται από τη μείωση των λαθών μνήμης αναφοράς καθώς και του % ποσοστού των λαθών μνήμης αναφοράς αν και οι δράσεις αυτές δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές. Παρόλα αυτά, τα ευρήματα αυτά είναι ιδιαίτερος σημαντικά για ένα κλινικώς χρησιμοποιούμενο φάρμακο καθώς αν μη τι άλλο απορρίπτουν το ενδεχόμενο παρεμπόδισης της χωρικής μνήμης αναφοράς.

Εν κατακλείδι, ευρήματά μας στηρίζουν την υπόθεση ότι γνωστικές λειτουργίες όπως η χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας παραμένουν ανεπηρέαστες από τη ροπινιρόλη.

### **Σύνοψη συμπεριφορικών δεδομένων**

Συμπερασματικά, χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο εύρος δόσεων, σκιαγραφήσαμε το συμπεριφορικό προφίλ της ροπινιρόλης ως ενός φαρμάκου που αφήνει ουσιαστικά ανεπηρέαστη την κινητική δραστηριότητα των πειραματόζων και παρουσιάζει μόνο τάσεις για υποκινητικότητα σε μικρές και μεσαίες δόσεις και τάσεις για υπερκινητικότητα σε μεγάλες δόσεις.

Στη μεσαία δόση που χρησιμοποιήσαμε (1mg/kg), η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει την ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού ενώ αντίθετα ασκεί αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές δράσεις μέσω ενδεχόμενης αλληλεπίδρασης ντοπαμινεργικού και σεροτονινεργικού συστήματος και ενδεχομένως χωρίς να επηρεάζει το νοραδρενεργικό σύστημα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι επιδεικνύει μια τάση βελτίωσης της μακρόχρονης χωρικής μνήμης αναφοράς όπως αποτυπώθηκε στο πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου, δράση η οποία όμως δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική.

Στη μεγάλη δόση που χρησιμοποιήσαμε (10mg/kg) η ροπινιρόλη φαίνεται να έχει μια ενδιαφέρουσα δράση. Σύμφωνα με τα πειράματα του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού, ο ουδός του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού μειώνεται επιδεικνύοντας μια δράση ανάλογη- αν και ηπιότερη- από αυτή των ψυχοδιεγερτικών στηρίζοντας τις ενισχυτικές ιδιότητες του φαρμάκου. Στη δόση αυτή το φάρμακο ασκεί ξεκάθαρη αγχολυτική και αντικαταθλιπτική δράση επηρεάζοντας ενδεχομένως άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον συμπεριφορικό προφίλ του φαρμάκου καθώς φαίνεται ότι η ροπινιρόλη επηρεάζει περισσότερο συναισθηματικές πτυχές της συμπεριφοράς εμπλέκοντας ενδεχόμενες αλληλεπιδράσεις ντοπαμινεργικού, νοραδρενεργικού και σεροτονινεργικού συστήματος και λιγότερο γνωσιακές πτυχές της συμπεριφοράς και την κίνηση αφήνοντας ενδεχομένως το χολινεργικό σύστημα ανεπηρέαστο.

## **B.Μοριακά ευρήματα**

### **BI. Επιδράσεις σε ενδοκυττάρια μονοπάτια διαβίβασης σήματος**

#### **BI1. Επιδράσεις στο ενδοκυττάριο μονοπάτι του κυκλικού AMP**

Η ροπινιρόλη δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη λειτουργία του μονοπατιού του κυκλικού AMP όπως φαίνεται από τη δραστηριότητα της PKA μελετώντας τη φωσφορυλίωση της GluR1 υπομονάδας, των AMPA υποδοχέων, στη Ser<sup>845</sup> (p-Ser<sup>845</sup>-GluR1) ούτε στο κοιλιακό ραβδωτό ούτε στον προμετωπιαίο φλοιό. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι παρουσίασε μόνο μια αρκετά μεγάλη τάση μείωσης της p-Ser<sup>845</sup>-GluR1 στο κοιλιακό ραβδωτό αλλά όχι στον προμετωπιαίο φλοιό. Το γεγονός αυτό εξηγείται από τον σημαντικά μεγάλο αριθμό D<sub>3</sub> υποδοχέων σε περιοχές του κοιλιακού ραβδωτού. Τα ευρήματα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι η ροπινιρόλη δεν ασκεί τις δράσεις της αποκλειστικά μέσω του μονοπατιού του κυκλικού AMP στο χρονικό σημείο που μελετήσαμε και που είναι αντίστοιχο με αυτό της πραγματοποίησης των περισσότερων συμπεριφορικών πειραμάτων.

Επιπλέον, η ροπινιρόλη δε φαίνεται να δρα ως ισχυρός αγωνιστής των D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> υποδοχέων. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειώσουμε ότι η μελέτη της δραστηριότητας της

PKA έγινε σε χρονικό σημείο λίγο μετά το peak της δραστηριότητας του μονοπατιού αυτού όπου είναι περίπου τα 15 λεπτά, αφήνοντας ανοιχτό το ενδεχόμενο ύπαρξης μεγαλύτερης φωσφορυλίωσης σε προγενέστερο στάδιο. Θα πρέπει βέβαια να τονίσουμε ότι επιλέξαμε τον χρόνο αυτό ως τον πλέον κατάλληλο για να μπορέσουμε να μελετήσουμε τις δράσεις της ροπινιρόλης όχι μόνο στο μονοπάτι αυτό αλλά και στο δεύτερο ντοπαμινεργικό μονοπάτι, αυτό των Akt/GSK-3β, σε ένα χρονικό σημείο ανάλογο με αυτό των συμπεριφορικών μας πειραμάτων. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειώσουμε το μικρό αριθμό υποκειμένων που χρησιμοποιήσαμε (4-6 ζώα ανά ομάδα) καθώς και την όχι μικρή διακύμανση μεταξύ των υποκειμένων μειώνοντας έτσι την πιθανότητα εύρεσης στατιστικά σημαντικών διαφορών.

Αντίθετα, με τα ευρήματά μας ο αγωνιστής των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουινπιρόλη μειώνει σημαντικά την p-Ser<sup>845</sup>-GluR1 στο ραβδωτό, δράση που οδηγεί σε εξασθένηση της γλουταμινεργικής απόκρισης στο ραβδωτό (Hakansson et al., 2006). Με βάση τα δεδομένα αυτά, η κουινπιρόλη φαίνεται να είναι ισχυρότερος αγωνιστής για την οικογένεια D<sub>2</sub> υποδοχέων, σε σχέση με τη ροπινιρόλη. Ωστόσο, η κουινπιρόλη, παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τους D<sub>2</sub> και όχι για τους D<sub>3</sub> υποδοχείς, αντίθετα από την ροπινιρόλη. Επιπλέον, η ροπινιρόλη, παρουσιάζει τάση μείωσης της p-Ser<sup>845</sup>-GluR1 στο κοιλιακό ραβδωτό στη δόση των 10mg/kg, δηλαδή μια μεγάλη δόση όπου πλέον έχουμε και δράσεις μέσω D<sub>2</sub> και όχι μόνο D<sub>3</sub> υποδοχέων.

Συμπερασματικά, η ροπινιρόλη επέδειξε μια τάση μείωσης της σηματοδότησης μέσω PKA στο κοιλιακό ραβδωτό 20 λεπτά μετά τη χορήγησή της. Πιστεύουμε ότι μελλοντικές μελέτες θα έπρεπε να στοχεύσουν στη μελέτη των επιδράσεων της ροπινιρόλης στο μονοπάτι της PKA, 10 και 15 λεπτά μετά τη χορήγησή της με σκοπό να εξεταστούν οι δράσεις της σε χρονικό σημείο όπου παρατηρείται η μέγιστη ενεργοποίηση του μονοπατιού του κυκλικού AMP.

## **BI2. Επιδράσεις στο ενδοκυττάριο μονοπάτι των Akt/GSK-3β**

Η ροπινιρόλη δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα του μονοπατιού των Akt/GSK-3β όπως υποδεικνύεται από τη μελέτη της φωσφορυλίωσης της GSK-3β στη Ser<sup>9</sup> (p- Ser<sup>9</sup>-GSK-3β), φωσφορυλίωση η οποία αναστέλλει τη δραστηριότητά του ενζύμου, 20 λεπτά μετά τη χορήγησή της. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι ήδη στο χρονικό διάστημα αυτό παρατηρείται έντονη τάση μείωσης της φωσφορυλίωσης της GSK-3β (p- Ser<sup>9</sup>-GSK-3β) ιδίως στο κοιλιακό ραβδωτό αλλά και μια μικρότερη τάση στον προμετωπιαίο φλοιό.

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού ξεκινάει περίπου 5 λεπτά μετά τη χορήγηση ενός ντοπαμινεργικού φαρμάκου, ενώ 20 λεπτά μετά τη χορήγησή του αρχίζει να παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη ενεργοποίηση. Μολαταύτα, το peak της ενεργοποίησης του μονοπατιού αυτού παρατηρείται 60-100 λεπτά μετά τη χορήγηση ντοπαμινεργικών φαρμάκων. Έτσι, καθώς οι δράσεις της ροπινιρόλης ήταν εμφανείς ήδη από τα 20 λεπτά, αν και όχι στατιστικά σημαντικές, πιστεύουμε ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε μετέπειτα χρονικό σημείο. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη δεν στόχευε στο να αναδείξει γενικότερες επιδράσεις της ροπινιρόλης στα δύο ντοπαμινεργικά ενδοκυττάρια μονοπάτια, αλλά μας ενδιέφερε η μελέτη των επιδράσεών της σε χρονικό σημείο αντίστοιχο με αυτό της πραγματοποίησης των συμπεριφορικών μας πειραμάτων. Μελλοντικές μελέτες θα έπρεπε να εστιάσουν στο χρονικό σημείο όπου παρατηρείται το peak της ενεργοποίησης του μονοπατιού αυτού με σκοπό την ανάδειξη των επιδράσεων της ροπινιρόλης στο μονοπάτι των Akt/GSK-3β.

Εν κατακλείδι, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι το μονοπάτι των Akt/GSK-3β ενεργοποιείται σε χρονικό σημείο ανάλογο με αυτό της πραγματοποίησης των συμπεριφορικών μας πειραμάτων αν και η δράση αυτή δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Γνωρίζοντας ότι η μέγιστη ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού πραγματοποιείται σε μετέπειτα χρονικό σημείο πιστεύουμε ότι μελλοντικές μελέτες θα έπρεπε να μελετήσουν τη δραστηριότητα του μονοπατιού των Akt/GSK-3β περίπου μία ώρα μετά τη χορήγηση ροπινιρόλης.

### **BI3. Επιδράσεις στο ενδοκυττάριο μονοπάτι των MAPK**

Η ροπινιρόλη φαίνεται ότι δεν επηρέασε σημαντικά τη λειτουργία του ενδοκυττάριου μονοπατιού των MAPK κινασών σε καμία από τις υπό μελέτη περιοχές (προμετωπιαίος φλοιός, κοιλιακό ραβδωτό) όπως υποδεικνύεται από τις μελέτες φωσφορυλίωσης που πραγματοποιήσαμε. Η φωσφορυλίωση των 44-MAPK και 42-MAPK (ERK1 και ERK2) δεν φαίνεται να διαφοροποιείται, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του μονοπατιού αυτού που εμπλέκεται στην πλαστικότητα του εγκεφάλου.

Προγενέστερες μελέτες σε τομές εγκεφάλου έδειξαν ότι η κουνιπιρόλη επάγει την δραστηριότητα των MAPK κινασών. Η δράση αυτή φαίνεται ότι αναστέλλεται με την προ-χορήγηση του D<sub>2</sub> ανταγωνιστή ετικλοπρίδη υποδεικνύοντας ότι η επαγωγή της δραστηριότητας των MAPK διαμεσολαβείται από τους D<sub>2</sub> υποδοχείς (Yan et al., 1999). Σε γενικές έχει δειχθεί ότι αγωνιστές της οικογένειας D<sub>2</sub> υποδοχέων επάγουν τη φωσφορυλίωση των MAPK κινασών (Chiba et al., 2010; Zapata et al., 2007). Υπάρχουν παρόλα αυτά και αναφορές που υποστηρίζουν ότι και οι D<sub>3</sub> υποδοχείς επάγουν την ενεργοποίηση των MAPK (Ahlgren-Beckendorf & Levant, 2004).

Καθώς τα ευρήματα της μελέτης μας είναι αρνητικά, θα πρέπει να σημειώσουμε και πάλι κάποιες ενδεχόμενες παρεμβαίνουσες μεταβλητές. Καταρχήν η φωσφορυλίωση των ενζύμων των ενδοκυττάρων μονοπατιών διαβίβασης σήματος είναι ταχεία. Σε γενικές γραμμές η φωσφορυλίωση θα πρέπει να μετράται 10-20 λεπτά μετά τη χορήγηση ενός φαρμάκου ενώ 30 λεπτά μετά δεν υπάρχουν πλέον ανιχνεύσιμες αλλαγές σε επίπεδο φωσφορυλίωσης. Στην παρούσα μελέτη μελετήσαμε τη φωσφορυλίωση των MAPK κινασών 20 λεπτά μετά τη χορήγηση ροπινιρόλης. Τα δεδομένα μας δεν μπορούν να αποκλείσουν ρύθμιση του μονοπατιού αυτού σε προγενέστερο κυρίως χωρίς να αποκλείεται ρύθμιση και σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο έπειτα από τη χορήγηση του φαρμάκου, ιδιαιτέρως λαμβάνοντας υπόψη τη δυναμική φύση του φαινομένου. Τόσο οι κινάσες που φωσφορυλιώνουν όσο και οι φωσφατάσες που οδηγούν σε απο-φωσφορυλίωση δρουν ταχύτατα μεταβάλλοντας ραγδαία τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η φωσφορυλίωση των MAPK μετρήθηκε στο χρονικό σημείο που πραγματοποιήθηκαν οι περισσότερες συμπεριφορικές δοκιμασίες και όπου παρατηρήθηκαν οι αντικαταθλιπτικές και αγχολυτικές δράσεις του φαρμάκου.

Για το λόγο αυτό συμπεραίνουμε ότι οι αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές δράσεις του φαρμάκου είναι ανεξάρτητες της δραστηριότητας του ενδοκυττάριου μονοπατιού των MAPK κινασών.

## **ΒΙΙ. Επιδράσεις στην έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων**

### **ΒΙΙ1. Επιδράσεις στο mRNA του *c-fos***

Η ροπινιρόλη δεν επηρέασε σημαντικά την έκφραση του mRNA του *c-fos* στο ραχιαίο ραβδωτό παρόλο που παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης στη δόση του 1mg/kg. Αντίθετα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του mRNA του *c-fos* στον προμετωπιαίο φλοιό μόνο στη μεγάλη δόση (10mg/kg). Τα ευρήματά μας συμφωνούν με προγενέστερες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες ο εκλεκτικός αγωνιστής των D<sub>3</sub> υποδοχέων 7-OH-DPAT επάγει την έκφραση του *c-fos* στον προμετωπιαίο φλοιό μόνο σε μεγάλες δόσεις, ενώ σε μικρές δόσεις οδηγεί σε μικρή μείωση στην περιοχή του ραβδωτού (Ishibashi et al., 2001). Επιπροσθέτως, και ο εκλεκτικός αγωνιστής των D<sub>3</sub> υποδοχέων cis-8-OH-PBZI έχει δείχθει ότι αυξάνει την έκφραση του *c-fos* στον προμετωπιαίο φλοιό (Scheideler et al., 1997). Η υπο-χρόνια χορήγηση του αγωνιστή των D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> υποδοχέων κουινπιρόλη έχει δείχθει ότι αυξάνει την έκφραση του *c-fos* εκλεκτικά στον προμετωπιαίο φλοιό αλλά όχι στο ραβδωτό ή τον ιππόκαμπο (De Carolis et al., 2010).

Εν κατακλείδι, τα ευρήματά μας είναι συνεπή με ευρήματα στην υπάρχουσα βιβλιογραφία και στηρίζουν την υπόθεση ότι οι αγωνιστές των D<sub>3</sub> υποδοχέων επάγουν την έκφραση του *c-fos* στον προμετωπιαίο φλοιό αλλά όχι στο ραχιαίο ραβδωτό.

### **ΒΙΙ2. Επιδράσεις στο mRNA του *arc***

Η ροπινιρόλη μείωσε το mRNA του *arc* στο ραχιαίο ραβδωτό δράση που βρέθηκε στατιστικά σημαντική μόνο στη δόση του 1mg/kg. Καθώς η έκφραση του *arc* επάγεται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού του κυκλικού AMP/PKA/CREB έχει δείχθει ότι τόσο η διέγερση των D<sub>1</sub> υποδοχέων (Moro et al., 2007) όσο και η αναστολή των D<sub>2</sub> υποδοχέων (Bruins Slot et al., 2009; Wirtshafter & Sheppard, 2003;

Dassesse et al., 1999) οδηγεί σε αύξηση του mRNA του *arc*. Έτσι, η μείωση του mRNA του *arc* ενδεχομένως σχετίζεται με την αναστολή του μονοπατιού του κυκλικού AMP στο ραχιαίο ραβδωτό.

Αντίθετα, το mRNA του *arc* στον προμετωπιαίο φλοιό δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση ροπινιρόλης. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει τη συναπτική πλαστικότητα στον προμετωπιαίο φλοιό.

Συμπερασματικά, η ροπινιρόλη μείωσε εκλεκτικά το mRNA του *arc* στο ραχιαίο ραβδωτό αλλά όχι στον προμετωπιαίο φλοιό. Η προς τα κάτω ρύθμιση του *arc* ενδεχομένως σχετίζεται με αναστολή του μονοπατιού του κυκλικού AMP/PKA/CREB.

### **Σύνοψη μοριακών δεδομένων**

Η ροπινιρόλη επέδειξε μεγάλη τάση αναστολής τόσο του μονοπατιού του κυκλικού AMP/PKA/CREB όσο και του μονοπατιού των Akt/GSK-3β στο κοιλιακό ραβδωτό, παρόλο που οι δράσεις αυτές δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές. Το γεγονός ότι οι ανασταλτικές δράσεις ήταν αρκετά εκλεκτικές για το κοιλιακό ραβδωτό και όχι στον προμετωπιαίο φλοιό, σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση των D<sub>3</sub> υποδοχέων στην εν λόγω περιοχή. Φαίνεται λοιπόν ότι οι δράσεις της ροπινιρόλης σχετίζονται με ήπια δοσο-εξαρτώμενη ρύθμιση των δύο ντοπαμινεργικών μονοπατιών κυρίως στο κοιλιακό ραβδωτό. Ωστόσο, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι τα συμπεράσματα αυτά αναφέρονται σε ένα φαινόμενο που εξελίσσεται ταχέως και ο χρόνος στο οποίο το μελετήσαμε ήταν ανάλογος με το χρόνο των συμπεριφορικών πειραμάτων και όχι με το χρόνο της μέγιστης ενεργοποίησης του εκάστοτε μονοπατιού.

Αντίθετα από την ήπια ρύθμιση των δύο ντοπαμινεργικών μονοπατιών, η δραστηριότητα του μονοπατιού των MAPK βρέθηκε ανεπηρέαστη 20 λεπτά μετά τη χορήγηση ροπινιρόλης τόσο στο κοιλιακό ραβδωτό όσο και στον προμετωπιαίο φλοιό. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η ροπινιρόλη δεν επάγει πλαστικότητα σχετιζόμενη με το μονοπάτι των MAPK. Επιπλέον, τα δεδομένα αυτά στηρίζονται και από το γεγονός ότι δε βρήκαμε καμία αλλαγή στο mRNA του *arc* στον προμετωπιαίο φλοιό, η έκφραση του οποίου σχετίζεται ισχυρά με υποκείμενη λειτουργική και δομική πλαστικότητα. Ωστόσο, τα δεδομένα μας στηρίζουν μείωση

στο mRNA του *arc* στο ραχιαίο ραβδωτό στη δόση του 1mg/kg. Η μείωση αυτή πιστεύουμε ότι σχετίζεται με αναστολή του μονοπατιού του κυκλικού AMP/PKA/CREB.

Τέλος, αναφορικά με την έκφραση του mRNA του *c-fos* τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι ενώ η έκφρασή του δεν μεταβάλλεται στο ραχιαίο ραβδωτό, αυξάνεται εκλεκτικά στον προμετωπιαίο φλοιό στη δόση των 10mg/kg. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με δεδομένα από χορηγήσεις και άλλων D<sub>3</sub> αγωνιστών.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι η ροπινιρόλη ασκεί ήπια δοσο-εξαρτώμενη αναστολή των δυο ντοπαμινεργικών μονοπατιών στο κοιλιακό ραβδωτό χωρίς να επηρεάζει τη δραστηριότητα του μονοπατιού των MAPK. Φαίνεται ότι αυξάνει το mRNA του *c-fos* εκλεκτικά στον προμετωπιαίο φλοιό στη δόση των 10mg/kg, ενώ μειώνει το mRNA του *arc* στο ραχιαίο ραβδωτό.

## Γ. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η ροπινιρόλη ασκεί αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές επιδράσεις ενώ παρουσιάζει ενισχυτικές δράσεις στο πρότυπο του ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού μόνο σε μεγάλες δόσεις. Οι δράσεις αυτές παρατηρούνται σε ένα εύρος δόσεων που δεν επηρεάζουν την αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα ή γνωστικές λειτουργίες όπως η χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας. Το φάρμακο δε φαίνεται να δρα ως ισχυρός ντοπαμινεργικός αγωνιστής καθώς δεν επηρεάζει σημαντικά την ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος των μονοπατιών του κυκλικού AMP και των Akt/GSK-3β, καθώς και των MAPK, τουλάχιστον σε χρονικό σημείο αντίστοιχο με αυτό της πραγματοποίησης των συμπεριφορικών πειραμάτων. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι επηρεάζει την έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων επάγοντας την έκφραση του *c-fos* στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού και μειώνοντας την έκφραση του *arc* εκλεκτικά στο ραχιαίο ραβδωτό.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας υποδεικνύουν ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει σημαντικά την κινητική δραστηριότητα. Επιπλέον, τα ευρήματα των μοριακών μελετών υποδεικνύουν ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει την έκφραση του *c-fos* στο ραχιαίο ραβδωτό, μια περιοχή άμεσα σχετιζόμενη με την κίνηση. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με προγενέστερες μελέτες που υποδεικνύουν ότι οι αγωνιστές των D<sub>3</sub> υποδοχέων δεν επηρεάζουν



σημαντικά την κινητική δραστηριότητα (Moffett et al., 2010; Dhir & Kulkarni, 2007) και δεν επάγουν την έκφραση του *c-fos* στο ραχιαίο ραβδωτό (De Carolis et al., 2010). Ωστόσο, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν μείωση του mRNA του *arc* στο ραχιαίο ραβδωτό στη δόση του 1mg/kg όπου παρουσιάστηκε και τάση μείωσης της κινητικής δραστηριότητας.

Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι η ροπινιρόλη έχει ενισχυτικές ιδιότητες σε μεγάλες μόνο δόσεις και ενδεχομένως οι δράσεις αυτές σχετίζονται με συνεργική ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος μέσω των δύο ντοπαμινεργικών μονοπατιών στο κοιλιακό ραβδωτό. Αντίθετα, η ενισχυτική δράση της ροπινιρόλης είναι ανεξάρτητη του ενδοκυττάριου μονοπατιού των MAPK κινασών.

Το κύκλωμα ανταμοιβής του εγκεφάλου αναφέρεται κατά βάση σε ντοπαμινεργικά κυτταρικά σώματα στο κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο που προβάλλουν τους νευράξονές τους στον επικλινή πυρήνα και τον προμετωπιαίο φλοιό. Ερεθίσματα που έχουν ενισχυτική δράση έχουν συσχετιστεί με αυξημένη απελευθέρωση ντοπαμίνης στις περιοχές αυτές (Ranaldi et al., 2010) γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της μετασυναπτικής νευρωνικής δραστηριότητας. Παρόλα αυτά, η αυξημένη έκφραση του *c-fos* στον προμετωπιαίο φλοιό μόνο στη μεγάλη δόση ενδεχομένως συσχετίζεται με τις ενισχυτικές ιδιότητες του φαρμάκου καθώς ο προμετωπιαίος φλοιός αποτελεί μια από τις κομβικές περιοχές του νευρωνικού κυκλώματος ανταμοιβής.

Η αυξημένη δραστηριότητα του προμετωπιαίου φλοιού ενδεχομένως σχετίζεται και με άλλες συμπεριφορές. Σε ασθενείς με διαταραχές του συναισθήματος έχουν βρεθεί ανατομικές ανωμαλίες στον προμετωπιαίο φλοιό (Drevets et al., 1997). Καθώς ο προμετωπιαίος φλοιός φαίνεται ότι εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης, εικάζουμε ότι η αυξημένη έκφραση του *c-fos* μπορεί να σχετίζεται και με τις αντικαταθλιπτικές δράσεις της ροπινιρόλης. Θα πρέπει φυσικά να σημειώσουμε ότι ενώ οι αντικαταθλιπτικές δράσεις της ροπινιρόλης παρατηρήθηκαν τόσο στο 1 όσο και στα 10mg/kg, η αύξηση της έκφρασης του *c-fos* παρατηρήθηκε μόνο στη μεγάλη δόση. Καθώς και τα άμεσα πρώιμα γονίδια επάγονται ταχύτατα και παροδικά δε θα πρέπει να αποκλείσουμε αλλαγές στην έκφραση σε διαφορετικό χρονικό σημείο.

Η νευροτροφική υπόθεση των συναισθηματικών διαταραχών υποστηρίζει ότι το στρες οδηγεί σε νευρωνική ατροφία και θάνατο καθώς και μειωμένη νευρογένεση κυρίως σε μεταιχμιακές περιοχές (κατά βάση στον υπόκαμπο) και τα

αντικαταθλιπτικά διεγείρουν τη δραστηριότητα ενδοκυττάρων μονοπατιών που επάγουν την νευρωνική επιβίωση (Popoli et al., 2002). Τόσο η κατάθλιψη όσο και το στρες έχουν συσχετιστεί με νευρωνική ατροφία και αναδιοργάνωση των δενδριτών στην περιοχή του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού (Sairanen et al., 2007; Cook & Wellman, 2004; Popoli et al., 2002). Έτσι φαίνεται ότι η δραστηριότητα του προμετωπιαίου φλοιού και η υποκείμενη πλαστικότητα εμπλέκεται στην κατάθλιψη αλλά και στο στρες. Παρόλα αυτά, οι αντικαταθλιπτικές ιδιότητες της ροπινιρόλης δεν σχετίζονται με το εμπλεκόμενο στην πλαστικότητα μονοπάτι των MAPK κινασών ή την έκφραση του *arc*. Τα δεδομένα μας σε καμία περίπτωση δε θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως κατάρριψη της υπόθεσης της πλαστικότητας. Πέραν των ζητημάτων που θέσαμε πρωτίστως αναφορικά με τη μελέτη της δραστηριότητας των MAPK ή της έκφρασης των πρώιμων άμεσων γονιδίων, η πλαστικότητα του εγκεφάλου θα μπορούσε να διαμεσολαβείται μέσω άλλων κινασών, όπως για παράδειγμα της GSK-3β, η οποία ρυθμίζεται από το δεύτερο ντοπαμινεργικό, D<sub>2</sub> εξαρτώμενο μονοπάτι που ως γνωστόν εμπλέκεται στη συναπτική πλαστικότητα.

Φυσικά, κυρίαρχη υπόθεση για στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης αποτελεί η μονοαμινεργική υπόθεση, η οποία υποστηρίζει ότι η κατάθλιψη είναι το αποτέλεσμα ελλειμμάτων στη νευροδιαβίβαση των βιογενών αμινών και συγκεκριμένα της σεροτονίνης, νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης (Migueluez et al., 2010; Popoli et al., 2002). Η ντοπαμίνη δεν έχει εμπλακεί μόνο στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης αλλά και στις δράσεις των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, ενώ έχουν αναπτυχθεί και τριπλοί αναστολείς επαναπρόσληψης βιογενών αμινών (σεροτονίνης, νοραδρεναλίνης, ντοπαμίνης) (Migueluez et al., 2010).

Επιπλέον, φαίνεται ότι τα συστήματα αυτά αλληλεπιδρούν. Ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι νευροεκφυλισμός της μελαινοραβδωτής ντοπαμινεργικής οδού οδηγεί σε αλλαγές στη δραστηριότητα των νοραδρενεργικών νευρώνων του υπομέλανα τόπου χωρίς όμως να επηρεάζονται τα βασικά επίπεδα δραστηριότητας των σεροτονινεργικών νευρώνων των πυρήνων της ραφής. Επιπροσθέτως, φαίνεται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση της δραστηριότητας των νοραδρενεργικών και σεροτονινεργικών νευρώνων στον φυσιολογικό εγκέφαλο. Τέλος, η ευαισθησία των νοραδρενεργικών και σεροτονινεργικών νευρώνων στα αντικαταθλιπτικά αλλάζει έπειτα από νευροεκφυλισμό της μελαινοραβδωτής ντοπαμινεργικής οδού (Migueluez et al., 2010). Τα δεδομένα αυτά, στηρίζουν την

υπόθεση της αλληλεπίδρασης του ντοπαμινεργικού, νοραδρενεργικού και σεροτονινεργικού συστήματος.

Τα δεδομένα μας στηρίζουν την υπόθεση ενδεχόμενης αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστημάτων αυτών, καθώς η ροπινιρόλη που δρα ως αγωνιστής των D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> υποδοχέων επηρέασε και τις ενεργητικές συμπεριφορές στο πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης οι οποίες όπως έχει επισημανθεί έχουν συσχετιστεί με σεροτονινεργική και νοραδρενεργική δραστηριότητα.

Καθώς τα δεδομένα των πειραμάτων της εξαναγκασμένης κολύμβησης υποστηρίζουν την υπόθεση της αλληλεπίδρασης των συστημάτων δε θα πρέπει να μας εκπλήσσουν οι αγχολυτικές δράσεις του φαρμάκου. Τα ευρήματά μας συμβάλλουν στην υπόθεση της άμεσης ή έμμεσης εμπλοκής της ντοπαμίνης στις αγχολυτικές δράσεις φαρμάκων και συνάδει με τα όλο και αυξανόμενα δεδομένα που στηρίζουν την εμπλοκή της ντοπαμίνης στην παθοφυσιολογία των αγχωδών διαταραχών (Leggio et al., 2010). Τόσο η αλληλεπίδραση του ντοπαμινεργικού συστήματος με το νοραδρενεργικό σύστημα γενικότερα, όσο και η αυξημένη δραστηριότητα του προμετωπιαίου φλοιού (όπως υποδεικνύεται από την αύξηση στην έκφραση του *c-fos*) ειδικότερα ενδεχομένως οδηγούν σε αλλαγές στη δραστηριότητα του συστήματος Υποθάλαμος-Υπόφυση-Φλοιός επινεφριδίων καθώς και σε αλλαγές στην έκκριση νοραδρεναλίνης.

Θα πρέπει τέλος να αναφέρουμε ότι οι αλλαγές στη δραστηριότητα του προμετωπιαίου φλοιού δεν θα πρέπει να συσχετίζονται με τις συμπεριφορές γνωστικού περιεχομένου που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Καθώς αναφερόμαστε σε χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας η άμεσα εμπλεκόμενη περιοχή είναι η περιοχή του ιππόκαμπου. Παρόλα αυτά, καθώς δεν βρέθηκαν συμπεριφορικές αλλαγές στο πρότυπο του ακτινωτού λαβυρίνθου δε θεωρήθηκε μείζονος σημασίας η μελέτη των μοριακών επιδράσεων της ροπινιρόλης στον ιππόκαμπο.

Σε κάθε περίπτωση, η ρύθμιση των δύο ενδοκυττάρων ντοπαμινεργικών μονοπατιών στο κοιλιακό ραβδωτό έμμεσα ή άμεσα σχετίζεται με τις συναισθηματικές πτυχές της συμπεριφοράς που μελετήσαμε και για το λόγο αυτό θεωρούμε ότι η ροπινιρόλη ασκεί τις ενισχυτικές, αντικαταθλιπτικές και αγχολυτικές της δράσεις ασκώντας ήπια ρύθμιση στα δύο ενδοκυττάρια ντοπαμινεργικά μονοπάτια στο κοιλιακό ραβδωτό.

Συμπερασματικά, η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει την κινητική δραστηριότητα εξοικειωμένων πειραματόζων και δεν φαίνεται να επάγει την έκφραση του πρώιμου άμεσου γονιδίου *c-fos* στην περιοχή του ραβδωτού, ενώ αντίθετα μειώνει την έκφραση του *arc* στη δόση του 1mg/kg όπου παρατηρήσαμε τάση μείωσης της κινητικής δραστηριότητας. Τα ευρήματά μας στηρίζουν την εμπλοκή των D<sub>3</sub> υποδοχέων σε συναισθηματικές πτυχές της συμπεριφοράς στηρίζοντας την «ντοπαμινεργική υπόθεση των συναισθηματικών διαταραχών». Οι αγωνιστές των D<sub>3</sub> υποδοχέων φαίνεται ότι επιδεικνύουν αντικαταθλιπτικές, αγχολυτικές και ενισχυτικές δράσεις που ενδεχομένως ρυθμίζονται από τη λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού. Ωστόσο η ροπινιρόλη άσκησε ήπια αναστολή στα ενδοκυττάρια μονοπάτια του κυκλικού AMP και των Akt/GSK-3β σε χρονικό σημείο ανάλογο με αυτό της πραγματοποίησης των συμπεριφορικών μας πειραμάτων, ενώ η δράση αυτή φαίνεται να ήταν εκλεκτική για το κοιλιακό ραβδωτό. Επιπλέον, τα ευρήματά μας υποστηρίζουν ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει τη χωρική μνήμη εργασίας και αναφοράς, λειτουργίες σχετιζόμενες με τη λειτουργία του ιπποκάμπου.

Εν κατακλείδι, τα ευρήματά μας στηρίζουν τη χρήση των ντοπαμινεργικών αγωνιστών ως αντικαταθλιπτικών και αγχολυτικών θεραπευτικών αγωγών με χαμηλή πιθανότητα ανάπτυξης κινητικών ή γνωστικών ανεπιθύμητων ενεργειών.

## VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ροπινιρόλη είναι ένας εκλεκτικός αγωνιστής των D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> υποδοχέων που χρησιμοποιείται κλινικά στη θεραπεία της νόσου Parkinson. Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη ποικίλων συμπεριφορικών και μοριακών συνιστωσών της δράσης της ροπινιρόλης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήσαμε τις δράσεις της ροπινιρόλης στην κινητική δραστηριότητα, στην ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού, στην αγχώδη συμπεριφορά, την καταθλιπτικό-μορφη συμπεριφορά καθώς και στη χωρική μνήμη αναφοράς και εργασίας. Αναφορικά με τις μοριακές επιδράσεις της ροπινιρόλης εξετάσαμε το ενδεχόμενο να δρα ως «μεροληπτικό» πρόσδεμα (biased ligand) σε ένα από τα δύο ντοπαμινεργικά μονοπάτια και ποιες είναι η επιδράσεις της στα μονοπάτια αυτά. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε μελέτες ανοσοαποτύπωσης για τη μελέτη της δραστηριότητας της PKA μελετώντας την φωσφορυλίωση της υπομονάδας GluR1 στη Ser<sup>845</sup>, μια θέση φωσφορυλίωσης εκλεκτικά εξαρτώμενη από την PKA, καθώς και τη δραστηριότητα της GSK-3β μελετώντας τη φωσφορυλίωσή της στη Ser<sup>9</sup>. Επιπροσθέτως, μελετήσαμε τη δράση της ροπινιρόλης στην πλαστικότητα του εγκεφάλου πραγματοποιώντας επιπρόσθετες μελέτες φωσφορυλίωσης και μελετώντας την ενδοκυττάρια διαβίβαση σήματος στο μονοπάτι των MAPK κινασών. Τέλος, μελετήσαμε την επίδραση της ροπινιρόλης στην έκφραση πρώιμων άμεσων γονιδίων όπως το *c-fos* και η *arc*.

Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει σημαντικά την κινητική δραστηριότητα εξοικειωμένων πειραματόζωων, ενώ μόνο σε μεγάλες δόσεις αυξάνει την ενίσχυση του εγκεφαλικού ερεθισμού. Στη δόση του 1mg/kg η ροπινιρόλη ασκεί αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές δράσεις ενδεχομένως μέσω αλληλεπίδρασης με το σεροτονινεργικό σύστημα. Στη δόση των 10mg/kg ασκεί αντίστοιχες δράσεις αλλά επιπροσθέτως της πιθανής αλληλεπίδρασης με το σεροτονινεργικό σύστημα εικάζουμε και αλληλεπίδραση και με νοραδρενεργικό σύστημα. Τέλος, στις δόσεις αυτές η ροπινιρόλη παρουσιάζει μια τάση βελτίωσης της ανάκλησης χωρικών μνημών αναφοράς, τάση όμως που δε βρέθηκε σημαντική, ενώ ταυτόχρονα αφήνει και τη χωρική μνήμη εργασίας ανεπηρέαστη.

Τα μοριακά ευρήματά μας έδειξαν ότι η ροπινιρόλη δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τη δραστηριότητα των μονοπατιών της PKA, GSK-3β και MAPK τουλάχιστον στο χρονικό σημείο που μελετήθηκε στην παρούσα μελέτη. Παρόλα

αυτά, παρουσιάζει τάση μείωσης της φώσφο-Ser<sup>845</sup>-GluR1 S845 καθώς και της φώσφο-Ser<sup>9</sup>-GSK-3β υποδεικνύοντας ότι πιθανώς δρα ασκώντας ασθενείς δράσεις και στα δύο ντοπαμινεργικά μονοπάτια στο κοιλιακό ραβδωτό. Επιπλέον, η ροπινιρόλη αύξησε την έκφραση του *c-fos* εκλεκτικά στον προμετωπιαίο φλοιό στη δόση των 10mg/kg, ενώ μείωσε την έκφραση της *arc* στο ραχιαίο ραβδωτό, δράση που βρέθηκε στατιστικά σημαντική στη δόση του 1mg/kg.

Τα δεδομένα μας στηρίζουν την υπόθεση ότι η ροπινιρόλη ασκεί τις αντικαταθλιπτικές, αγχολυτικές και ενισχυτικές επιδράσεις της ασκώντας ήπια ρύθμιση στα δυο ντοπαμινεργικά μονοπάτια στο κοιλιακό ραβδωτό. Επιπροσθέτως, η δραστηριότητα του πρόμετωπιαίου φλοιού φαίνεται ότι ρυθμίζει αυτές τις συμπεριφορές ρυθμίζοντας ενδεχομένως και άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα συμπεριλαμβανομένου του σεροτονινεργικού και νοραδρενεργικού. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη στηρίζει την εμπλοκή των D<sub>3</sub> υποδοχέων σε συναισθηματικές πτυχές της συμπεριφοράς και στηρίζει τη «ντοπαμινεργική υπόθεση των συναισθηματικών διαταραχών».

## VI. ABSTRACT

Ropinirole is a selective D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> receptor agonist clinically used in the treatment of Parkinson Disease. The aim of the present study was to examine the multiple behavioural and molecular aspects of ropinirole's effects. Specifically, we investigated the effects of ropinirole on locomotor activity, brain stimulation reward, anxiety-related behavior, depressive-like behaviour and spatial reference and working memory. Considering the molecular studies, we examined whether ropinirole can act as a «biased» ligand in one of the two dopaminergic intracellular signaling pathways as well as the effects of ropinirole on both pathways. To assess these hypotheses, we performed immunoblotting to evaluate PKA's activity by measuring the phosphorylation on GluR1 subunit on Ser<sup>845</sup>, a specific PKA phosphorylation site as well as GSK-3β activation by evaluating the phosphorylation of GSK-3β on Ser<sup>9</sup> residue. In addition, we investigated the effects of ropinirole on brain's general plasticity utilizing phosphorylation studies to study intracellular signaling of MAPK kinase pathway. Furthermore, we measured the effects of ropinirole on Immediate Early Genes (IEGs) expression including *c-fos* and *arc*.

Our data indicate that ropinirole does not affect locomotor activity while it increased the reinforcing efficacy of brain stimulation only in the highest dose. In the

dose of 1mg/kg, ropinirole demonstrated anxiolytic and antidepressive-like effects, possibly by interacting with the serotonergic system. In the dose of 10mg/kg, ropinirole demonstrated the same profile but in addition to the possible interaction with the serotonergic system, we speculate an interaction with the noradrenergic system. Finally, in both doses, ropinirole improved spatial reference memory, although this effect did not reach statistical significance. In contrast, ropinirole did not affect spatial working memory performance.

The molecular findings of our study indicate that ropinirole did not affect the intracellular signaling pathways of PKA, GSK-3 $\beta$  and MAPK. However, ropinirole demonstrated a tendency to decrease p-Ser<sup>845</sup>-GluR1 so as p-Ser<sup>9</sup>-GSK-3 $\beta$  in the ventral striatum, indicating that it exerts mild effects on both dopaminergic intracellular signaling pathways. In addition, ropinirole induced the expression of *c-fos* mRNA in the prefrontal cortex, in the dose of 10mg/kg, while decreased the expression of *arc* mRNA in the dorsal striatum in the dose of 1mg/kg.

Our data demonstrate that ropinirole exerts antidepressant, anxiolytic and reinforcing properties via mild regulation of both dopaminergic signaling pathways in the ventral striatum. In addition, prefrontal cortex activation is related to these effects and possibly also regulates other neurotransmitter systems including the serotonergic and the noradrenergic. To conclude, the present study supports the involvement of D<sub>3</sub> receptors on emotional processes and supports the “dopaminergic hypothesis of affective disorders”.



## VII. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Κοινωφελές Ίδρυμα Υποτροφιών Αλέξανδρος Ωνάσης από το οποίο έλαβα υποτροφία για το ακαδημαϊκό έτος 2009-2010, καθώς και την επιτροπή απονομής υποτροφιών Μανασάκη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, η οποία με τίμησε με υποτροφία το ακαδημαϊκό έτος 2008-2009.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Dr. Per Svenningsson, επιβλέποντα καθηγητή μου στο Karolinska Institute, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στην ερευνητική του ομάδα καθώς και για τα όλα τα μέσα που μου παρείχε. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον επιβλέποντα καθηγητή μου από το Πανεπιστήμιο Κρήτης κ. Γιώργο Παναγή, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοψυχολογίας, για την πολύ καλή επίβλεψη και συνεργασία. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γιώργο Νομικό, επιστημονικό συνεργάτη μας, για τα πολλά ερεθίσματα που μου έχει δώσει. Ευχαριστώ την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Nicoletta Schintu για τη συνεργασία μας κατά την παραμονή μου στο Karolinska Institute καθώς και για τη συμβολή της στην πραγματοποίηση των πειραμάτων της in situ υβριδοποίησης.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή μου: κ. Κυριακή Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κ. Ανδρέα Καστελλάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ψυχοφυσιολογίας και κ. Παναγιώτη Μπίτσιο, Επίκουρο Καθηγητή Ψυχιατρικής καθώς μπήκαν στη διαδικασία να μελετήσουν και να κρίνουν την πτυχιακή μου εργασία.

Ευχαριστώ επίσης την κ. Εύη Κορτσιδάκη και την κ. Ελίνα Βαλούρδου που πάντα συνέβαλαν ώστε να διευθετηθούν όλα τα ουσιαστικά και πρακτικά ζητήματα για την υλοποίηση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Μιχάλη και Νίκη Μαυρικάκη, καθώς και τα αδέλφια μου Αγαπητό και Βασιλική για την αγάπη και την υποστήριξή τους!



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahlgren-Beckendorf, J. & Levant, B. (2004). Signaling mechanisms of the D<sub>3</sub> dopamine receptor. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 24, 117-30.
- Alonso, R., Gnanadicom, H., Fréchin, N., Fournier, M., Le Fur, G. & Soubrié, P. (1999). Blockade of neurotensin receptors suppresses the dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> synergism on immediate early gene expression in the rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 11, 967-74.
- Amico, F., Spowart-Manning, L., Anwyl, R. & Rowan, M. (2007). Performance- and task-dependent effects of the dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> receptor agonist SKF 38393 on learning and memory in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 577, 71-77.
- Banerjee, P., Aston, J., Khundakar, A. & Zetterstro, T. (2009). Differential regulation of psychostimulant-induced gene expression of brain derived neurotrophic factor and the immediate-early gene *arc* in the juvenile and adult brain. *European Journal of Neuroscience*, 29, 465–476.
- Barrett, S., Bell, R., Watson, D. & King, D. (2004). Effects of amisulpride, risperidone and chlorpromazine on auditory and visual latent inhibition, prepulse inhibition, executive function and eye movements in healthy volunteers. *Journal of Psychopharmacology*, 18, 156-72.
- Basso, A., Gallagher, K., Bratcher, N., Brioni, J., Moreland, R., Hsieh, G., Drescher, K., Fox, G., Decker, M. & Rueter, L. (2005) Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor-, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. *Neuropsychopharmacology*, 30, 1257–1268
- Beaulieu, J., Gainetdinov, R. & Caron, M. (2007). The Akt–GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28, 166-172.
- Beaulieu, J., Gainetdinov, R. & Caron, M. (2009). Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 49, 327-347.
- Benaliouad, F., Kapur, S., Natesan, S. & Rompré, P. (2009). Effects of the dopamine stabilizer, OSU-6162, on brain stimulation reward and on quinpirole-induced changes in reward and locomotion. *European Neuropsychopharmacology*, 19, 416-30.

- Blokland, A., Honig, W. & Prickaerts, J. (1998). Effects of haloperidol and d-amphetamine on working and reference memory performance in a spatial cone field task. *Behavioural Pharmacology*, 9, 429-436.
- Bonuccelli, U., Del Dotto, P. & Rascol, O. (2009). Role of dopamine receptor agonists in the treatment of early Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders*. 4, 44-53.
- Bramham, C., Alme, M., Bittins, M., Kuipers, S., Nair, R., Pai, B., Panja, D., Schubert, M., Soule, J., Tiron, A. & Wibrand, K. (2010). The Arc of synaptic memory. *Experimental Brain Research*, 200, 125-40.
- Bramham, C., Worley, P., Moore, M. & Guzowski, J. (2008). The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *Journal of Neuroscience*, 28, 11760-11767.
- Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Garcia, M., Pagès, C., Hipskind, R. & Caboche, J. (2002). Dopamine Induces a PI3-Kinase-Independent Activation of Akt in Striatal Neurons: A New Route to cAMP Response Element-Binding Protein Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, 22, 8911-8921.
- Brocco, M., Dekeyne, A., Papp, M. & Millan, M.J. (2006). Antidepressant-like properties of the anti-Parkinson agent, piribedil, in rodents: mediation by dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Behavioural Pharmacology*, 17, 559-72.
- Bruins Slot, E., Lestienne, F., Grevoz-Barret, C., Newman-Tancredi, A. & Cussac, D. (2009). F15063, a potential antipsychotic with dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptor antagonist and 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist properties: Influence on immediate-early gene expression in rat prefrontal cortex and striatum. *European Journal of Pharmacology* 620, 27–35.
- Bushnell, P. & Levin, E. (1993). Effects of dopaminergic drugs on working and reference memory in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 45, 765-776.
- Carr, K., Yamamoto, N., Omura, M., Cabeza de Vaca, S. & Krahne, L. (2002). Effects of the D(3) dopamine receptor antagonist, U99194A, on brain stimulation and d-amphetamine reward, motor activity, and c-fos expression in ad libitum fed and food-restricted rats. *Psychopharmacology*, 163, 76-84.
- Carta, A., Frau, L., Pinna, A., Pontis, S., Simola, N., Schintu, N. & Morelli, M. (2008). Behavioral and Biochemical Correlates of the Dyskinetic Potential of Dopaminergic Agonists in the 6-OHDA Lesioned Rat. *Synapse*, 62, 524–533.

- Cassano, P., Lattanzi, L., Fava, M., Navari, S., Battistini, G., Abelli, M. & Cassano, G. (2005). Ropinirole in treatment-resistant depression: a 16-week pilot study. *Canadian Journal of Psychiatry*, *50*, 357–360.
- Catapano, L. & Manji, H. (2008). Kinases as drug targets in the treatment of bipolar disorder. *Drug Discovery Today*, *13*, 295-303.
- Chang, W., Geyer, M., Buell, M., Weber, M. & Swerdlow, N. (2010). The effects of pramipexole on prepulse inhibition and locomotor activity in C57BL/6J mice. *Behavioural Pharmacology*, *21*, 135-43.
- Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Shin Yoon, H., & Kunugi, H. (2010). Cabergoline, a dopamine receptor agonist, has an antidepressant-like property and enhances brain-derived neurotrophic factor signaling. *Psychopharmacology*, *211*, 291–301.
- Choi, E., Jeong, D., Park, K. & Baik, J. (1999). G protein-mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Biochemistry and Biophysical Research Communication*, *256*, 33-40.
- Cook, S. & Wellman, C. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurobiology*, *60*, 236-48.
- Cook, D. & Wirtshafter, D. (1998). Quinpirole attenuates striatal c-fos induction by serotonergic, opioid and muscarinic receptor agonists. *European Journal of Pharmacology*, *349*, 41–47.
- Cole, D. & Di Figlia, M. (1994). Reserpine increases Fos activity in the rat basal ganglia via a quinpirole-sensitive mechanism. *Neuroscience*, *60*, 115-23.
- Corrigan, M., Denahan, A., Wright, C. & Ragual, R. (2000). Comparison of pramipexole, fluoxetine, and placebo in patients with major depression. *Depression and Anxiety* *11*, 58–65.
- Costa, A., Peppe, A., Dell'Agnello, G., Caltagirone, C. & Carlesimo, G. (2009). Dopamine and cognitive functioning in de novo subjects with Parkinson's disease: effects of pramipexole and pergolide on working memory. *Neuropsychologia*, *47*, 1374-81.
- Cussac, D., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V. & Millan, M. (1999). Human dopamine D<sub>3</sub> receptors mediate Mitogen-Activated Protein Kinase activation via a phosphatidylinositol 3-kinase and an atypical Protein Kinase C-dependent mechanism. *Molecular Pharmacology*, *56*, 1025–1030.

- D'Aquila, P., Canu, S., Sardella, M., Spanu, C., Serra, G. & Franconi, F. (2010). Dopamine is involved in the antidepressant-like effect of allopregnanolone in the forced swimming test in female rats. *Behavioural Pharmacology*, *21*, 21-8.
- Dassesse, D., Vanderwinden, J., Goldberg, I., Vanderhaeghen, J. & Schiffmann, S. (1999). Caffeine-mediated induction of *c-fos*, *zif-268* and *arc* expression through A<sub>1</sub> receptors in the striatum: different interactions with the dopaminergic system. *European Journal of Neuroscience*, *11*, 3101-14.
- Dauer, W. & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, *39*, 889-909.
- De Carolis, L., Stasi, M., Serlupi-Crescenzi, O., Borsini, F. & Nencini, P. (2010). The effects of clozapine on quinpirole-induced non-regulatory drinking and prepulse inhibition disruption in rats. *Psychopharmacology*, *212*, 105-115.
- Dhir, A. & Kulkarni, S. (2004). Involvement of dopamine (DA)/serotonin (5-HT)/sigma (sigma) receptor modulation in mediating the antidepressant action of ropinirole hydrochloride, a D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> dopamine receptor agonist. *Brain Research Bulletin* *74*, 58-65.
- Drake, M. (2008).  $\beta$ -arrestin-biased agonism at the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *283*, 5669-5676.
- Drevets, W., Price, J. & Simpson, J. (1997). Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature*, *386*, 824-827.
- Eden, R., Costall, B., Domeney, A., Gerrard, P., Harvey, C., Kelly, M., Naylor, R., Owen, D. & Wright, A. (1991). Preclinical pharmacology of ropinirole (SK&F 101468-A) a novel dopamine D<sub>2</sub> agonist. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, *38*, 147-54.
- Erichsen, D., Ferri, R. & Gozal, D. (2010). Ropinirole in restless legs syndrome and periodic limb movement disorder. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *6*, 173-82.
- Fink-Jensen, A., Nielsen, E., Hansen, L. & Scheideler, M. (1998). Behavioral and neurochemical effects of the preferential dopamine D<sub>3</sub> receptor agonist cis-8-OH-PBZI. *European Journal of Pharmacology*, *342*, 153-61.
- Flagstad, P., Arnt, J. & Olsen, C. (2006). Classical as well as novel antipsychotic drugs increase self-stimulation threshold in the rat-similar mechanism of action? *European Journal of Pharmacology*, *544*, 69-76.

- Freyberg, Z., Ferrando, S. & Javitch, J. (2010). Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action. *American Journal of Psychiatry*, *167*, 388-396.
- Fujishiro, H., Umegaki, H., Suzuki, Y., Oohara-Kurotani, S., Yamaguchi, Y. & Iguchi, A. (2005). Dopamine D<sub>2</sub> receptor plays a role in memory function: implications of dopamine-acetylcholine interaction in the ventral hippocampus. *Psychopharmacology*, *182*, 253-61.
- Graham, D., Hoppenot, R., Hendryx, A. & Self, D. (2007). Differential ability of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor agonists to induce and modulate expression and reinstatement of cocaine place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, *191*, 719-30.
- Gilliss, B., Malanga, C., Pieper, J. & Carlezon, W. (2002). Cocaine and SKF-82958 potentiate brain stimulation reward in Swiss-Webster mice. *Psychopharmacology*, *163*, 238-248.
- Girault, J., Valjent, E., Caboche, J. & Herve, D. (2007). ERK2: a logical and gate critical for drug-induced plasticity? *Current Opinion in Pharmacology*, *7*, 77-85.
- Hakansson, K., Galdi, S., Hendrick, J., Snyder, G., Greengard, P. & Fisone, G. (2006). Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor by dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Journal of Neurochemistry*, *96*, 482-488.
- Hatcher, J. & Hagan, J. (1998). The effects of dopamine D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> receptor agonists on intracranial self-stimulation in the rat. *Psychopharmacology*, *140*, 405-410.
- Hoefer, M., Voskarian, S., Koob, G. & Pulvirenti, L. (2006). Effects of terguride, ropinirole, and acetyl-L-carnitine on methamphetamine withdrawal in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, *83*, 403-9.
- Ishibashi, T., Wakabayashi, J. & Ohno, Y. (2002). 7-Hydroxy-N,N'-di-n-propyl-2-aminotetraline, a Preferential Dopamine D<sub>3</sub> Agonist, Induces c-fos mRNA Expression in the Rat Cerebellum. *Japanese Journal of Pharmacology*, *84*, 309 – 315.
- Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T. (2004). Βασικές αρχές Νευροεπιστημών (Βασιλόπουλος, Δ. & Σολδάτος, Κ.). *Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα*.
- Katzenschlager, R., Head, J., Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., Evans, A. & Lees, A. (2008). Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology*, *71*, 474-480.

- Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., Lees, A. (2003). Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *Cochrane Database Systematic Reviews*, CD003735.
- Kay, C., Harper, D. & Hunt, M. (2010). Differential effects of MDMA and scopolamine on working versus reference memory in the radial arm maze task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93, 151–156.
- Keefe, K. & Gerfen, C. (2000). D<sub>1</sub>–D<sub>2</sub> dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience*, 66, 903-913.
- Kitagawa, K., Kitamura, Y., Miyazaki, T., Miyaoka, J., Kawasaki, H., Asanuma, M., Sendo, T. & Gomita, Y. (2009). Effects of pramipexole on the duration of immobility during the forced swim test in normal and ACTH-treated rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 380, 59-66.
- Kling-Petersen, T., Ljung, E., Wollter, L. & Svensson, K. (1995). Effects of dopamine D<sub>3</sub> preferring compounds on conditioned place preference and intracranial self-stimulation in the rat. *Journal of Neural Transmission*, 101, 27-39.
- Kovacs, K., Csejtei, M. & Laszlovszky, I. (2001). Double activity imaging reveals distinct cellular targets of haloperidol, clozapine and dopamine D<sub>3</sub> receptor selective RGH-1756. *Neuropharmacology*, 40, 383–393.
- LaHoste, G., Yu, J. & Marshall, J. (1993). Striatal Fos expression is indicative of dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> synergism and receptor supersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7451-7455.
- Lattanzi, L., Dell'Osso, L., Cassano, P., Pini, S., Rucci, P., Houck, P., Gemignani, A., Battistini, G., Bassi, A., Abelli, M. & Cassano, G. (2002) Pramipexole in treatment-resistant depression: a 16-week naturalistic study. *Bipolar Disorder*, 4, 307–314.
- Leggio, G., Micale, V., Le Foll, B., Mazzola, C., Nobrega, J. & Drago, F. (2010). Dopamine D<sub>3</sub> receptor knock-out mice exhibit increased behavioral sensitivity to the anxiolytic drug diazepam. *European Neuropsychopharmacology*, in press.
- Levin, E. (1988). Scopolamine interactions with D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> antagonists on radial-arm maze performance in rats. *Behavioural and Neural Biology*, 50, 240-245.

- Levin, E. & Bowman, R. (1986). Effects of the dopamine D-2 receptor agonist, LY 171555, on radial arm maze performance in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 25, 1117-1119.
- Levin, E., Briggs, S., Christopher, N. & Auman, J. (1994). Working memory performance and cholinergic effects in the ventral tegmental area and substantia nigra. *Brain Research*, 657, 165-170.
- Levin, E., McGurk, S. Rose, J. & Butcher, L. (1990). Cholinergic-dopaminergic interactions in cognitive performance. *Behavioural and Neural Biology*, 84, 271-299.
- Levin, E. & Rose, J. (1995). Acute and chronic nicotinic interactions with dopamine systems and working memory performance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 757, 245-52.
- Lledó, A. (2000). Dopamine agonists: the treatment for Parkinson's disease in the XXI century? *Parkinsonism and Related Disorders*, 7, 51-58.
- Li, S., Collins, G., Paul, N., Grundt, P., Newman, A., Xu, M., Grandy, D., Woods, J. & Katz, J. (2010). Yawning and locomotor behavior induced by dopamine receptor agonists in mice and rats. *Behavioural Pharmacology*, 21, 171-81.
- Limousin, P., Krack, P., Pollak, P., Bennazzouz, A., Ardouin, C., Hoffmann, D. & Benabid, A. (1998). Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 339, 1105-1111.
- Luciana, M., Collins, P. & Depue, R. (1998). Opposing roles for dopamine and serotonin in the modulation of human spatial working memory functions. *Cerebral Cortex*, 8, 218-26.
- Luciana, M., Hanson, K. & Whitley, C. (2004). A preliminary report on dopamine system reactivity in PKU: acute effects of haloperidol on neuropsychological, physiological, and neuroendocrine functions. *Psychopharmacology (Berl.)*, 175, 18-25.
- Luo, Y., Kokkonen, G., Wang, X., Neve, K. & Roth, G. (1998). D2 dopamine receptors stimulate mitogenesis through pertussis toxin-sensitive G proteins and Ras-involved ERK and SAP/JNK pathways in rat C6-D2L glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, 71, 980-990.

- Maj, J., Rogóz, Z., Skuza, G. & Kołodziejczyk, K. (1997). Antidepressant effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *Journal of Neural Transmission*, *104*, 525-33.
- Martin, J. & Magistretti, P. (1998). Regulation of gene expression by neurotransmitters in the central nervous system. *European Neurology*, *39*, 129-34.
- Matheson, A. & Spencer, C. (2000). Ropinirole: a review of its use in the management of Parkinson's disease. *Drugs*, *60*, 115-37.
- Mavrikaki, M., Nomikos, G.G. & Panagis, G. (2009). Effects of mood stabilizers on brain reward processes in rats: Studies using the intracranial self-stimulation paradigm. *European Neuropsychopharmacology*, *19*, 205-214.
- Mavrikaki, M., Nomikos, G.G. & Panagis, G. (2010). Efficacy of the atypical antipsychotic aripiprazole in *d*-amphetamine-based preclinical models of mania. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *13*, 541-548.
- Mehta, M., Hinton, E., Montgomery, A., Bantick, R. & Grasby, P. (2005). Sulpiride and mnemonic function: effects of a dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist on working memory, emotional memory and long-term memory in healthy volunteers. *Journal of Psychopharmacology*, *18*, 29-38.
- Mehta, M., Swainson, R., Ogilvie, A., Sahakian, J. & Robbins, T. (2001). Improved short-term spatial memory but impaired reversal learning following the dopamine D<sub>2</sub> agonist bromocriptine in human volunteers. *Psychopharmacology (Berl.)*, *159*, 10-20.
- McGurk, S., Levin, E. & Butcher, L. (1992). Dopaminergic drugs reverse the impairment of radial-arm maze performance caused by lesions involving the cholinergic medial pathway. *Neuroscience*, *50*, 129-135.
- Migueluez, C., Grandoso, L. & Ugedo, L. (2010). Locus coeruleus and dorsal raphe neuron activity and response to acute antidepressant administration in a rat model of Parkinson's disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *in press*.
- Millan, M.J., Brocco, M., Papp, M., Serres, F., La Rochelle, C., Sharp, T., Peglion, J. & Dekeyne, A. (2004). S32504, a novel naphthoxazine agonist at dopamine D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> receptors: III. Actions in models of potential antidepressive and anxiolytic activity in comparison with ropinirole. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* *309*, 936-50.



- Millan, M.J., Girandon, S., Monneyron, S. & Dekeyne, A. (2000). Discriminative stimulus properties of the dopamine D<sub>3</sub> receptor agonists, PD128,907 and 7-OH-DPAT: a comparative characterization with novel ligands at D<sub>3</sub> versus D<sub>2</sub> receptors. *Neuropharmacology*, *39*, 586-598.
- Miller, J. (1990). Induction of *c-fos* mRNA Expression in Rat Striatum by Neuroleptic Drugs. *Journal of Neurochemistry*, *10*, 4159-4171.
- Moffett, M., Song, J. & Kuhar, M. (2010). CART peptide inhibits locomotor activity induced by simultaneous stimulation of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, but not by stimulation of individual dopamine receptors. *Synapse*, *Ahead of print*.
- Molteni, R., Calabrese, F., Maj, P., Olivier, J., Racagni, G., Ellenbroek, B., & Riva, M. (2009). Altered expression and modulation of activity-regulated cytoskeletal associated protein (Arc) in serotonin transporter knockout rats. *European Neuropsychopharmacology*, *19*, 898-904.
- Morein-Zamir, S., Craig, K., Ersche, K., Abbott, S., Muller, U., Fineberg, N., Bullmore, E., Sahakian, B., Robbins, T. (2004). Impaired visuospatial associative memory and attention in obsessive compulsive disorder but no evidence for differential dopaminergic modulation. *Psychopharmacology (Berl.)*, *Ahead of print*.
- Moro, H., Sato, H., Ida, I., Oshima, A., Sakurai, N., Shihara, N., Horikawa, Y. & Mikuni, M. (2007). Effects of SKF-38393, a dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist on expression of amphetamine-induced behavioral sensitization and expression of immediate early gene arc in prefrontal cortex of rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, *87*, 56-64.
- Morris, B., Newman-Tancredi, A., Audinot, V., Simpson, C. & Millan, M. (2000). Activation of dopamine D<sub>3</sub> receptors induces *c-fos* expression in primary cultures of rat striatal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *59*, 740-749.
- Muzzio, I., Kentros, C. & Kandel, E. (2009). What is remember? Role of attention on the encoding and retrieval of hippocampal representations. *Journal of Physiology*, *587*, 2837-2854.
- Nestler, E. Hyman, S. & Malenka, R. (2008). *Molecular Neuropharmacology*. McGraw-Hill Companies.
- Nakajima, S. (1989). Subtypes of dopamine receptors involved in the mechanism of reinforcement. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *13*, 123-128.

- Nakajima, S. & Baker, J. (1989). Effects of D<sub>2</sub> dopamine receptor blockade with raclopride on intracranial self-stimulation and food-reinforced operant behaviour. *Psychopharmacology*, *98*, 330-333.
- Navarro, J., Luna, G., Garcia, F. & Pedraza, C. (2003). Effects of L-741,741, a selective dopamine antagonist, on anxiety tested in elevated plus-maze in mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, *25*, 45-47.
- Nordheim Alme, M., Wibrand, K., Dagestad, G. & Bramham, C. (2007). Chronic fluoxetine treatment induces brain region-specific upregulation of genes associated with BDNF-induced Long-Term Potentiation. *Neural Plasticity*, *2007*, 1-9.
- Ons, S., Rotllant, D., Marin-Blasco, I. & Armario, A. (2010). Immediate-early gene response to repeated immobilization: Fos protein and *arc* mRNA levels appear to be less sensitive than *c-fos* mRNA to adaptation. *European Journal of Neuroscience*, *31*, 2043–2052.
- Page, M., Detke, M., Dalvi, A., Kirby, L. & Lucki, I. (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology*, *147*, 162-167.
- Packard, M. & White, N. (1993). Memory facilitation produced by dopamine agonists: role of receptor subtype and mnemonic requirements. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *33*, 511-518.
- Παναγής, Γ. (1998). Βιοψυχολογία της ενίσχυσης και του εθισμού. *Ψυχολογία*, *5*, 71-83.
- Παναγής, Γ. (2002). Βιοψυχολογία της ενίσχυσης: Μελέτες ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού και ο ρόλος της ντοπαμίνης, *Ψυχολογία*, *9*, 92-115.
- Panagis, G., Nisell, M., Nomikos, G.G., Chergui, K. & Svensson, T. (1996). Nicotine injections into the ventral tegmental area increase locomotion and Fos-like immunoreactivity in the nucleus accumbens of the rat. *Brain Research*, *730*, 133-142.
- Panagis, G., Nomikos, G.G., Miliaressis, E., Chergui, K., Kastellakis, A., Svensson, T. & Spyraiki, C. (1997). Ventral pallidum self-stimulation induces stimulus dependent increase in c-fos expression in reward-related brain regions. *Neuroscience*, *77*, 175-186.

- Panagis, G. & Spyraiki, C. (1996). Neuropharmacological evidence for the role of dopamine in ventral pallidum self-stimulation. *Psychopharmacology (Berl.)*, *123*, 280-288.
- Παπαδάκη, Θ. (1998). Υβριδισμός in situ: η συμβολή της μεθόδου στη μελέτη των λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής*, *12*, 4-12.
- Parkinson, J. (1817). An essay on the shaking palsy. *Sherwood, Neely & Jones, London*.
- Pei, Q., Lewis, L., Sprakes, M., Jones, E., Grahame-Smith, D. & Zetterstrom, T. (2000). Serotonergic regulation of mRNA expression of arc, an immediate early genes selectively localized at neuronal dendrites. *Neuropharmacology* *39*, 463-470.
- Popoli, M., Gennarelli, M. & Racagni, G. (2002). Modulation of synaptic plasticity by stress and antidepressants. *Bipolar Disorder*, *4*, 166-82.
- Porsolt, R., Anton, G., Blavet, N. & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, *47*, 379-391.
- Pugsley, T., Davis, M., Akunne, H., MacKenzie, R., Shih, Y., Damsma, G., Wikstrom, H., Whetzel, S., Georgic, L. & Cooke, L. (1995). Neurochemical and functional characterization of the preferentially selective dopamine D<sub>3</sub> agonist PD 128907. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *275*, 1355-66.
- Rénéric, J. & Lucki, I. (1998). Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology*, *136*, 190-197.
- Robertson, H., Paul, M., Moratalla, R. & Graybiel, A. (1991). Expression of the immediate early gene *c-fos* in basal ganglia: induction by dopaminergic drugs. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, *18*, 380-3.
- Rodgers, R., Johnson, N., Champion, A. & Mills, S. (1996). Modulation of plus-maze behaviour in mice by the preferential D<sub>3</sub>-receptor agonist 7-OH-DPAT. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, *54*, 79-84.
- Rodgers, R., Nikulina, E. & Cole, J. (1994). Dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, *49*, 985-995.

- Rogers, D., Costall, B., Domeney, A., Gerrard, P., Greener, M., Kelly, M., Hagan, J. & Hunter, A. (2000). Anxiolytic profile of ropinirole in the rat, mouse and common marmoset. *Psychopharmacology*, *151*, 91–97.
- Rogóż, Z., Skuza, G. & Kłodzińska, A. (2004). Anxiolytic- and antidepressant-like effects of 7-OH-DPAT, preferential dopamine D<sub>3</sub> receptor agonist, in rats. *Polish Journal of Pharmacology*, *56*, 519-26.
- Sairanen, M., O’Leary, O., Knuutila, J., & Castren, E. (2007). Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience*, *144*, 368-374.
- Scheideler, M., Martin, J., Hohlweg, R., Rasmussen, J., Nærum, L., Ludvigsen, T., Larsen, P., Korsgaard, N., Crider, A., Ghosh, D., Cruse, S. & Fink-Jensen, A. (1997). The preferential dopamine D<sub>3</sub> receptor agonist cis-8-OH-PBZI induces limbic Fos expression in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, *339*, 261-270.
- Shiflett, M., Martini, R., Mauna, J., Foster, R., Peet, E. & Thiels, E. (2008). Cue-Elicited Reward-Seeking Requires Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in the Nucleus Accumbens, *Journal of Neuroscience*, *28*, 1434-1443.
- Simpson, C., & Morris, B. (1995). Induction of *c-fos* and *zif/268* gene expression in rat striatal neurons, following stimulation of D<sub>1</sub>-like dopamine receptors, involves protein kinase A and protein kinase C. *Neuroscience*, *68*, 97-106.
- Siuciak, J. & Fujiwara, R. (2004). The activity of pramipexole in the mouse forced swim test is mediated by D<sub>2</sub> rather than D<sub>3</sub> receptors. *Psychopharmacology (Berl.)*, *175*, 163-9.
- Skold, K., Svensson, M., Norrman, M., Sjogren, B., Svenningsson, P. & Andrun, P. (2007). The significance of biochemical and molecular sample integrity in brain proteomics and peptidomics: Stathmin 2-20 and peptides as sample quality indicators. *Proteomics*, *7*, 4445–4456.
- Southam, E., Lloyd, A., Jennings, C., Cluderay, J., Cilia, J., Gartlon, J. & Jones, D. (2007). Effect of the selective dopamine D<sub>3</sub> receptor antagonist SB-277011-A on regional c-Fos-like expression in rat forebrain. *Brain Research*, *1149*, 50-57.

- Svenningsson, P., Nomikos, G.G. & Fredholm, B. (1995). Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *Journal of Neuroscience*, *15*, 7612-7624.
- Taba, H., Wu, S., Foote, K., Hass, C., Fernandez, H., Malaty, I., Rodriguez, R., Dai, Y., Zeilman, P., Jacobson, C. & Okun, M. (2010). A closer look at unilateral versus bilateral deep brain stimulation: results of the National Institutes of Health COMPARE cohort. *Journal of Neurosurgery*, *Ahead of print*.
- Tadaiesky, M., Dombrowski, A., Figueiredo, C., Cargin-Ferreira, E., Da Cunha, C. & Takahashi, N. (2008). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, *156*, 830-840.
- Tissingh, G., Bergmans, P., Booij, J., Winogrodzka, A., Royen, E., Stoof, J. & Wolters, E. (1998). Drug-naïve patients with Parkinson's disease in Hoehn and Yahr stages I and II show bilateral decrease in striatal dopamine transporters as revealed by [123I]beta-CIT SPECT. *Journal of Neurology*, *245*, 14-20.
- Tran, A., Tamura, R., Uwano, T., Kobayashi, T., Katsuki, M. & Ono, T. (2005). Dopamine D<sub>1</sub> receptors involved in locomotor activity and accumbens neural responses to prediction of reward associated with place, *PNAS*, *102*, 2117-2122.
- Victor, M. & Ropper, A. (Βασιλόπουλος) (2003). Νευρολογία I, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα.
- Violle, N., Balandras, F., Le Roux, Y., Desor, D. & Schroeder, H. (2009). Variations in illumination, closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, *203*, 35-42.
- White, N., Packard, M. & Seamans, J. (1993). Memory enhancement by post-training peripheral administration of low doses of dopamine agonists: possible autoreceptor effect. *Behavioral and Neural Biology*, *59*, 230-41.
- Wilkerson, A. & Levin, E. (1999). Ventral hippocampal dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> systems and spatial working memory in rats. *Neuroscience*, *89*, 743-749.
- Wirtshafter, D. & Osborn, C. (2005). The atypical dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist SKF 83959 induces striatal Fos expression in rats. *European Journal of Pharmacology*, *528*, 88-94.

- Wirtshafter, D. & Sheppard, A. (2003). Role of dopamine D<sub>2</sub> receptors in the striatal immediate early gene response to amphetamine in reserpinized rats. *Brain Research Bulletin*, *62*, 77–83.
- Wu, R., Chen, R. & Chiueh, C. (2000). Effect of MAO-B inhibitors on MPP<sup>+</sup> toxicity in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *899*, 255-261.
- Xing, B., Kong, H., Meng, X., Wei, S., Xu, M. & Li, S. (2010). Dopamine D<sub>1</sub> but not the D<sub>3</sub> receptor is critical for spatial learning and related signaling in the hippocampus. *Neuroscience*, *169*, 1511–1519.
- Yan, Z., Feng, J., Fienberg, A., & Greengard, P. (1999). D<sub>2</sub> dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, *96*, 11607-12.
- Zachariou, V., Sgambato-Faure, V., Sasaki, T., Svenningsson, P., Berton, O., Fienberg, A., Nairn, A., Greengard, P. & Nestler, E. (1996). Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine 34 is Required for Cocaine Action. *Neuropsychopharmacology*, *31*, 555-562.
- Zapata, A. Kivell, B., Han, Y., Javitch, J., Bolan, E., Kuraguntla, D., Jaligam, V., Oz, M., Jayanthi, L., Samuvel, D., Ramamoorthy, S. & Shippenberg, T. (2007). Regulation of dopamine transporter function and cell surface expression by D<sub>3</sub> dopamine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *49*, 35842–35854.
- Zarrindast, M., Mahboobi, S., Sadat-Shirazi, M. & Ahmadi, S. (2010). Anxiolytic-like effect induced by the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonist, arachydonilcyclopropylamide (ACPA), in the rat amygdala is mediated through the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopaminergic systems. *Journal of Psychopharmacology*, *Ahead of print*.
- Zidar, D., Violin, J., Whalen, E. & Lefkowitz, R. (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *PNAS*, *106*, 9649-9654.
- Zhang, J. & Xu, M. (2006). Opposite regulation of cocaine-induced intracellular signaling and gene expression by dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>3</sub> receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1074*, 1-12.

