

TARTU ÜLIKOOL  
Füüsika-keemiateaduskond  
Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut

LAURA HERM

**PSÜHHOSTIMULANDI JA LOODULIKU SARRUSTAJA MÕJU ROTI  
AJU DOPAMIIN D<sub>2</sub> RETSEPTORITE SIGNAALIÜLEKANDELE**

Bioorgaanilise keemia magistritöö

Juhendajad: professor AGO RINKEN  
professor JAANUS HARRO

Tartu 2006

# SISUKORD

<b>SISUKORD</b> .....	<b>2</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>3</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>5</b>
<b>KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>6</b>
NÄRVISIGNAALI ÜLEKANDE MEHHAANISMID JA VAHENDAJAD.....	6
SIGNAALIÜLEKANNE LÄBI G-VALKUDEGA SEOTUD RETSEPTORITE .....	7
G-VALKUDE ANALÜÜS GTP $\gamma$ S SEOSTUMISE KAUDU .....	9
AJU DOPAMIINERGISET SÜSTEEMID.....	10
SÕLTUVUS- JA HÜVITUSKÄITUMISEGA SEOTUD PROTSESSIDE VAHENDAMINE AJUS .....	12
PSÜHHOSTIMULANDID DOPAMIINERGISETES JA SELLEGA INTERAKTEERUVATES SÜSTEEMIDES .....	15
DOPAMIINERGISET SÜSTEEM SUHKRULAHUSE (LOODUSLIK SARRUSTAJA) TARBIMISEL .....	18
<b>EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	<b>19</b>
MATERJALID .....	19
MEETODID .....	19
<i>Käitumiskatse 1: DSP-4 või/ ja amfetamiini mõju rottide uudistamisaktiivsusele</i> .....	19
<i>Käitumiskatse 2: Kokaiinist tingitud paigaelistuse uurimine</i> .....	20
<i>Käitumiskatse 3: Suhkrulahuse tarbimise uurimine päeval ja öösel</i> .....	20
<i>Koe monoamiinide sisalduse mõõtmine (Käitumiskatse 1 ja 2 puhul)</i> .....	21
<i>D<sub>2</sub>-retseptori poolt stimuleeritud [<sup>35</sup>S]GTP<math>\gamma</math>S sidumine roti aju striatumi ja naalduva tuuma membraanidele: väljatõrjumiskõver GDP-ga</i> .....	21
<i>Dopamiini poolt vahendatud [<sup>35</sup>S]GTP<math>\gamma</math>S sidumise aktivatsioon roti aju striatumi membraanidele: kontsentratsioon-vastus kõver</i> .....	22
<i>Andmetöötlus</i> .....	22
<b>TULEMUSED JA ARUTELU</b> .....	<b>23</b>
[ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S VÄLJATÕRJUMISANALÜÜSI OPTIMEERIMINE JA OLULISTE PARAMEETRITE VALIK .....	23
DSP-4 JA/VÕI AMFETAMIINI MÕJU ROTTIDE KÄITUMISELE NING D <sub>2</sub> RETSEPTOR-G-VALK SIGNAALI ÜLEKANDELE .....	26
<i>Tulemused</i> .....	26
<i>Arutelu</i> .....	27
KOKAIINI MÕJU ROTTIDE KÄITUMISELE NING D <sub>2</sub> RETSEPTOR-G-VALK SIGNAALI ÜLEKANDELE .....	29
<i>Tulemused</i> .....	29
<i>Arutelu</i> .....	31
ROTTIDE SUHKRULAHUSE TARBIMISE SEOS D <sub>2</sub> RETSEPTOR-G-VALK SIGNAALI ÜLEKANDE EFEKTIIVSUSEGA .....	32
<i>Tulemused</i> .....	32
<i>Arutelu</i> .....	33
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	<b>35</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>36</b>
<b>TÄNUAVALDUSED</b> .....	<b>37</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	<b>38</b>
<b>LISAD</b> .....	<b>47</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

7-TM – 7-transmembraansed (retseptorid)  
AC – adenülaadi tsüklaas  
cAMP – tsükliline adenosiin monofosfaat  
ATP – adenosiin trifosfaat  
CCK - koletsüstokiniin  
CPP – tingitud paigaeelistus  
DA - dopamiin  
DAT – dopamiini transporter  
DOPAC - 3,4-dihüdrosüfenüületanaat  
DSP-4 - N-(2-kloroetüül)-N-etüül-2-bromobensüülamiin  
DTT – ditiotreitool  
EDTA - etüleendiamiintetraatsetaat  
GABA -  $\gamma$ -aminovõihape  
GDP – guanosiin difosfaat  
cGMP – tsükliline guanosiin monofosfaat  
GPCR – G-valkudega seotud retseptorid  
GTP – guanosiin trifosfaat  
GTP $\gamma$ S - guanosiin-5'-[ $\gamma$ -tio]-trifosfaat  
HE – *high explorer(s)*  
HEPES - (N-[2-hüdrosüetüül]piperasiin-N'-[2-etaansulfoonhape])  
HPLC – kõrgrõhu vedelikkromatograafia  
HVA – homovanillüülhape  
LC – *locus coeruleus* (sinav ala)  
LE – *low explorer(s)*  
LTP – pikaajaline potentseerimine (*long term potentiation*)  
NA – noradrenaliin  
NAc – naalduv tuum (*nucleus accumbens*)  
NET – noradrenaliini transporter  
PFC - prefrontaalkoor  
PKA – proteiin kinaas A  
PLC – fosfolipaas C  
RAMP – retseptori aktiivsust modifitseerivad valgud

RGS – G-valkude signaali regulaator

mRNA – *messenger* ribonukleinhape

SERT – serotoniini transporter

VTA – ventraalne katendiala

## SISSEJUHATUS

Samuti kui muusika- ja kunstiajalugu on võimalik jaotada perioodideks, on ka teaduse ajaloole iseloomulikud teatud etapid, mida läbides on jõutud teadmiste kogumini, mida tavatsetakse nimetada tänapäeva teaduseks. On olnud antiikne mitmekülgsuse periood, mille üheks parimaks esindajaks võib pidada Aristotelest, on olnud keskaja privilegeerituse ja determineerituse periood, kus teadusetegemine koondus kloostrite valitud seltskonna kätte, on olnud renessansiaegne taasvaimustumine antiikaja mitmekülgsusest (da Vinci!), peale seda aga on mindud üha enam ja kitsama spetsialiseerituse teed. Ometi on tänapäeva teadusele iseloomulik ka püüe erinevate teadusharude suurema integreerituse poole, mille tagajärjel on tekkinud näiteks valdkond nimega neuroteadused (*neuroscience*), mis sisaldab eneses meditsiini, biokeemiast, biofüüsikast, farmakoloogiast, käitumisteadustest, psühholoogiast jms saadud teadmisi.

Taolise integreerimise tagajärjel võib palju paremini näha eri teadusvaldkondade paradigmade nõrkusi ning möödavaatamisi, samas pole paradigmade sobitamine kerge töö. Olenevalt vaatepunktist võib öelda, et õigus on nii käitumisteadlastel, kes ütlevad, et käitumine tingib aju biokeemia, kui ka biokeemikutel, kes ütlevad, et biokeemilised muutused ajus tingivad käitumise. Võib vaid loota, et leidub ka selline vaatepunkt, mis osundab, et õigus on *mõlemal*, ning näiliselt lootusetutest antiteesidest võib sündida viljakas süntees.

Käesolev töö püüabki olla üks paljudest integreerimisele pühendatud uuringutest, võttes vaatluse alla rottide aju sõltuvus- ning tungisüsteemide toimimise nii käitumisteaduslikust kui biokeemilisest aspektist lähtuvalt. Lisaks teadmisele psühhostimulantide toimemehhanismidest võib taolistest uuringutest teha oletusi ka isendite individuaalsete iseärasuste rolli kohta sõltuvuse kujunemisel ning konstrueerida mudeleid mitmesuguste häirete nagu tähelepanuhäirega hüperaktiivsuse sündroomi või depressiooni iseloomustamiseks.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## Närvisignaali ülekande mehhanismid ja vahendajad

Organisme moodustavatele rakkudele on iseloomulik spetsialiseeritus, mis võib väljenduda väikeste ainevahetuse erinevustena eri kudesid moodustavate rakkude vahel, ent erinevused võivad olla ka palju sügavamad. Närvisüsteemi moodustavate närvirakkude (neuronite) põhiline erinevus keharakkudest väljendub nende spetsiifilistes kontaktides üksteisega – sünaptsites -, rakkudest väljaulatuvates jätkedes – aksonites ja dendriitides – ning muidugi omaduses kanda edasi bioelektrilist signaali, mille kaudu saadakse infot välis- ning sisekeskkonnast ja mille vahendusel reageeritakse vastuvõetud stiimulitele. [1,2]

Bioelektrilise signaali edasikandumise aluseks on organismis enim esinevate ionide -  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  - elektrokeemiline gradient. Tänu mitmetele rakumembraanis asuvatele transportervalkudele hoitakse nimetatud ionide kontsentratsioone raku sees ja väljas nii, et seesmisele osale on iseloomulik kõrge kaaliumi-, väike naatriumi- ning üleväike kaltsiumiioonide sisaldus, samal ajal kui rakuvälises ruumis on naatriumiioonide kontsentratsioon kõrge ja kaaliumiioonide kontsentratsioon madal. Selle tulemusel omandab raku seesmine osa välimise osa suhtes negatiivse laengu ning ionide kontsentratsioonide erinevuse. Elektriline signaal kandub edasi üle neuroni jätkede ning keha depolarisatsioonilainena, mis on võimeline edasi kanduma kuni 100 m/s. [1,2]

Ühe närviraku piires on impulss elektriline, neuronitevaheline kommunikatsioon aga leiab aset spetsiifilises tsoonis, mida nimetatakse sünaptsiks (kr. *synapto*, klammerduma). Ülekande võib olla nii elektriline kui keemiline, vahendatud närvivirgatsainete poolt. Edaspidi käsitletaksegi ainult keemilist transmissiooni. Virgatsained, mida hoitakse ühe närviraku või -jätke lõpmetes, vabastatakse elektrilise impulsi jõudes närvilõpmetesse, nad difundeeruvad läbi sünaptilise pilu postsünaptilise membraanini ning interakteeruvad seal neile spetsiifiliste valgumolekulide – retseptoritega. [1,2]

Klassikaline retseptorite klassifikatsioon jagab retseptorid selle järgi, millisele virgatsainele nad reageerivad. Klassifitseerida võib retseptoreid aga ka ülekandetüübi järgi. Sellisel viisil võib eristada neli põhilist retseptoritüüpi: a) ionkanalit moodustavad retseptorid, mis agonisti (vt edaspidi) seostumisel hakkavad läbi laskma mingit kindlat tüüpi ioone (näiteks nikotiinne atsetüülkoliini retseptor, mis laseb läbi  $\text{Na}^+$ -ioone või gamma-aminovõihappe A-tüüpi retseptor, mis laseb läbi  $\text{Cl}^-$  ioone); b) niinimetatud retseptor-ensüümid, millel agonisti seostudes aktiveerub sisemine ensümaatilise osa (nt sisemise

türosiin-kinaasse aktiivsusega retseptorid); c) tuumas geeni transkriptsioonifaktoreid reguleerivad retseptorid, mis kontrollivad geeni transkriptsiooni; d) G-valkudega seotud retseptorid (edaspidi GPCR), mille aktivatsioon vahendatakse rakku peamiselt heterotrimeersete G-valkudega. [1,2]

Signaali ülekandvate molekulide klassifikatsioon võib lähtuda nende molekulide endi omadustest: selle järgi võib eristada sisemisi (organismis olemasolevaid) ja kunstlikke/väliseid farmakoloogilist mõju omavaid ligande, samuti võib sisemiste virgatsainete rühmast alagrupina välja tuua neuromodulaatorid, mis reguleerivad närviülekanne suhteliselt ebaspetsiifiliselt ning ka väljaspool sünaptilise pilu ala. Teine võimalus signaalmolekulide klassifikatsiooniks on neid kategoriseerida nende mõju järgi retseptoritele. Selline klassifikatsioon on läbi farmakoloogia ajaloo läbi teinud suuri muutusi. Algselt käsitleti retseptoreid kui sisse-välja lüliteid infoülekandes ning ligandid võisid siis olla kas sisse- või väljalülitajateks. Tänapäeval aga klassifitseeritakse ligande selle järgi, millist retseptori konformatsiooni nad stabiliseerivad: kas aktiivset (agonistid, annavad signaali üle), mitteaktiivset (pöördagonistid) või neil puudub eelistus (antagonistid, lihtsalt blokeerivad retseptori ja sellega ka signaaliülekanne). [2-5]

Virgatsaine seostumisel retseptorile võib toimuda nõrka kiire signaali ülekande läbi ionkanalite avanemise ja depolarisatsioonilaine edasikandumise. Aeglane signaaliülekanne hõlmab endas mitmeid rakusisesi protsesse, milles osalevad ensüüme ning väiksemaid molekule nimetatakse ka sekundaarseteks virgatsaineteks. Aeglane signaaliülekanne toimub näiteks läbi GPCR-de. [1]

## **Signaaliülekanne läbi G-valkudega seotud retseptorite**

GPCR esindab suurimat rakumembraanis asuvat valkude perekonda, mis on seotud signaali ülekandega. Rohkem kui 1% inimese genoomist kodeerib rohkem kui 1000 erinevat valku, mille ühine omadus on seitse korda membraani läbiv ehk heptahelikaalne struktuur ning seostumine heterotrimeersete G-valkudega. Nad aktiveerivad valgukinaase, ionkanaleid, fosfataase, reguleerivad tsüklilise adenosüüli monofosfaadi (cAMP) või guaniini monofosfaadi (cGMP) hulka jne jne. Rohkem kui 50% praegusel ajal kasutusel olevatest ravimitest on suunatud nimelt GPCR-dele. [6-9]

*G-valgud* (esimesena identifitseeritud ja iseloomustatud Rodbelli ja Gilmani poolt) on oma nime saanud omaduse järgi siduda endaga guaniini nukleotide: guanosüüli di- ja trifosfaati (GDP, GTP). G-valke võib jagada "väikesteks" (monomeersed) ja

heterotrimeerseteks ( $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alaühikutest koosnevateks) valkudeks, millest viimased seostuvadki GPCR-ga.  $\alpha$ -alaühiku järgi jagatakse G-valgud erinevatesse klassidesse nagu  $G_i$ ,  $G_s$ ,  $G_q$ , mis erinevad üksteisest selle poolest, kuidas nad aktiveerivad/inhibeerivad rakusiseseid efektorvalke nagu adenülaadi tsüklaas (AC), fosfolipaaas C jne. Näiteks  $G_i$  valgu  $\alpha$ -alaühik inhibeerib AC, samas kui  $G_s$  valgu  $\alpha$ -alaühik sama ensüümi aktiveerib. On näidatud, et  $\beta\gamma$ -alaühikud võivad aktiveerida lisaks ka ioonkanaleid. [1, 2, 9]

G-valgu  $\alpha$ -alaühiku struktuur koosneb kolmest põhilisest osast: GTPaasne osa (ehk GTP-d hüdrolyüsiv osa), helikaalne osa ja N-terminaalne osa. Puhkeolekus on  $\alpha$ -alaühiku GTPaasse ja helikaalse osa vahelisse pilusse seostunud GDP. Kui GPCR aktiveeritakse, dissotsieerub GDP  $\alpha$ -alaühikult ning asendatakse GTP-ga, mille tulemusel  $\alpha$ -alaühik eraldub  $\beta\gamma$ -alaühikutest ning on seejärel võimeline aktiveerima erinevaid efektoreid (AC jt). Signaali lõpetab GTPaasse osa aktiveerumine ja GTP hüdrolyüsimine GDP-ks. Selline G-valgu aktivatsioonitsükkel (Lisa: Joonis 1) on iseloomulik kõigile G-valgu tüüpidele ning seda kasutatakse, uurimaks GPCR aktivatsiooni ja funktsioneerimist G-valgust lähtuvalt. [6, 8, 9]

Kuigi GPCR mõiste on tihedalt seotud funktsioneerimisega läbi G-valkude, võivad mõned GPCR aktiveerida ilma G-valkude osaluseta ka teisi rakus asuvaid valke, samuti aktiveerivad G-valke ka retseptorid, mis ei kuulu GPCR klassi, näiteks mõned sisemise ensümaatilise aktiivsusega retseptorid. Seetõttu eelistavad mõned autorid mõiste G-valguga seotud retseptorid asemel hoopis 7-transmembraansed (7-TM) retseptorid. Sõltumata nimetamisest kirjeldatakse aga GPCR/7-TM retseptoreid sisemiste ligandide (enamasti agonistid) põhiselt ning klassifitseeritakse suurematesse gruppidesse nagu rodopsiini sarnased, sekretiini retseptori sarnased ja metabotroopsed glutamaadi ning GABA<sub>B</sub> retseptorid. [10-13]

GPCR-seotud signaaliülekanne reguleerimiseks on rakus mitmeid mooduseid. Algsele lihtsalt retseptor-G-valk kompleksi mudelile on lisandunud palju teisi reguleerivaid valke/ensüüme, näiteks  $\beta$ -arrestiinid, G-valgu signaali regulaatorid (RGS), mitmed kinaaside kaskaadidesse kuuluvad vahevalgud, retseptori aktiivsust modifitseerivad valgud (RAMP) jne. Paljud uuringud on samuti näidanud, et GPCR eksisteerivad dimeeride/oligomeeridena, kusjuures tegemist võib olla nii homo- kui heteromerisatsiooniga. See omakorda annab väga suure võimaluse ravimite loomiseks: kui mõne häire ravi ühe retseptori kaudu osutub raskendatuks, võib üritada mõjutada selle retseptoriga seotud signaalikaskaadi mõne teise, huvipakkuva retseptoriga interakteeruva retseptori kaudu. Interaktsioonid võivad avalduda ka mitte ainult membraani tasemel otsese retseptor-retseptor di-/oligomerisatsiooni kaudu, vaid



ka raku sees, näiteks G-valkude tasandil. Tuntud regulatsioonimehhanism on G-valkude lühin- ning pikaajaline desensitisatsioon (näiteks vastusena pidevale ülestimulatsioonile), mille põhjuseks võib olla G-valkude fosforüleerimine. Samuti põhjustab sensitisatsiooni- desensitisatsiooni protsesse retseptorite hulga üle- või alareguleerimine. [11, 14-16]

## **G-valkude analüüs GTP $\gamma$ S seostumise kaudu**

Mõnel juhul on GPCR uurimise eesmärgiks hinnata, kuidas signaal raku kantakse ja mis juhtub raku sees teiseste virgatsainete tasemetega (cAMP jt), iseloomustamaks, milline funktsionaalne vastus järgneb GPCR aktiveerimisele. GDP vahetus GTP-ga ei ole otseselt seotud järgnevate signaaliülekande etappidega, kuid näitab kohe, kas GPCR aktiveerus või mitte ja kas süsteemis G-valkudega on midagi juhtunud (sensitiseerunud, desensitiseerunud, näiteks uurides narkootiliste ainete manustamise järel looma ajus G-valkudega toimuvat). [2, 8]

GDP-GTP vahetus on väga varane etapp signaaliülekandega kaasnevate protsesside kaskaadis, mis on vahendatud GPCR ja G-valkude poolt. Seetõttu on selle etapi detekteeritavaks muutmine olnud väga suur samm farmakoloogia ajaloos. Tänapäeval kasutatakse GDP-GTP vahetuse jälgimiseks G-valgu poolt mittehüdrolüüsivat GTP analoogi guanosiin-5'-O-(3-tio)trifosfaati ehk GTP $\gamma$ S (gamma-hapnik on asendatud väävliga). Radioaktiivseks jälgimiseks kasutatakse radioaktiivse väävliga märgistatud ligandi [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. Mittehüdrolüüsitivuse tingimus tähendab põhimõtteliselt seda, et on võimalik detekteerida, palju GTP  $\alpha$ -alaühikule seostus. [6, 8]

Lisaks juba eespoolmainitud võimalusele uurida GPCR aktivatsiooni ja G-valkudega toimuvat, võib GDP-GTP vahetust uurides iseloomustada aga ka retseptorile seostuva *ligandi* omadusi nagu potentsiaalsus (võime mingil kindlal kontsentratsioonil esile kutsuda teatud suurusega biokeemiline-füsioloogiline efekt [4]), efektiivsus (molekuli võime muuta retseptori konformatsiooni, sellega esile kutsudes biokeemilise-füsioloogilise efekti [4]) jne, kuna see vahetus on retseptori aktiveerimisele vahetult järgnev samm ning pole seetõttu veel amplifitseeritud/moduleeritud järgnevate rakusiseste protsesside poolt. Nii on saavutatud olukord, kus saab iseloomustada retseptorit, ligandi ja samas hinnata ka raku sees toimuva hakkavat, mida tavalise retseptor-ligand interaktsiooni uurimisega teha ei saanud. [4, 8]

Lõppkokkuvõttes võib öelda, et uurides G-valke GTP $\gamma$ S analüüsil saab teha oletusi G-valk-retseptor seostumise, selle tundlikkuse ja sensitisatsiooni-desensitisatsiooni kohta. Sellised andmed koos tulemustega käitumiskatsetest ning *in vivo* ja *ex vivo* mikrodialüüsilt

võimaldavad komplekssemalt analüüsida organismide käitumise ja biokeemia omavahelist modulatsiooni.

Teostades GTP $\gamma$ S analüüsi tavalisel moel, s.t lüüsitud rakkudes või naturaalsel koemembraanidel, on proovist välja pestud sisemised GDP ja GTP. Agonisti mõju amplifitseerimiseks lisatakse proovile täiendavalt GDP, mis surub alla spontaanse GDP dissotsiatsiooni G-valgult ning asendamise [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-ga ning sellega saavutatakse maksimaalne stimuleeritud GTP $\gamma$ S sidumine. Lisatava GDP hulk sõltub konkreetsest süsteemist, ilmselt johtudes G-valgu alatüüpidest ja kontsentratsioonist antud süsteemis. [8]

Mg<sup>2+</sup> ioonid suurendavad nukleotiidide sidumise afiinsust nii retseptori inaktiveeritud kui aktiveeritud olekus, kuid aktiveeritud olekus on Mg<sup>2+</sup> efekt suurem, mistõttu on tulemuseks suurem agonistist tingitud signaal. On leitud, et optimaalne Mg<sup>2+</sup> ionide kontsentratsioon jääb vahemikku 5-10mM. [8]

## **Aju dopamiinergilised süsteemid**

Dopamiin on üks peamisi katehoolamiinidest virgatsaineid ajus. Dopamiinergiline närviülekanne vahendab selliseid olulisi funktsioone nagu lokomotoorne aktiivsus, emotsionaalne käitumine, motivatsiooni- ja sarrustusmehhanismid; perifeerses närvisüsteemis kontrollib südame-veresoonkonna tööd, põhjustab hormoonide vabanemist jne. Dopamiini sünteesitakse aminohape türosiinist (Lisa: Joonis 2) ning dopamiinist endast sünteesitakse edasi veel noradrenaliini ja adrenaliini vastavates närvilõpmetes. Dopamiini lagundavad monoamiini oksüdaasi isovormid ning katehool-O-metüültransferaas, produktideks 3-metoksütüramiin, 3,4-dihüdroksüfenüületanaat (DOPAC) ja homovanillüülhape (HVA) (Lisa: Joonis 2). Lisaks lagundamisele toimub dopamiinergilises sünapsis ka vabanenud dopamiini tagasihaare, kus dopamiin transporditakse tagasi närvilõpmetesse dopamiini transporteri (DAT) abiga. Mitmed häired nagu Parkinsoni tõbi, skisofreenia, sõltuvushäired jpm on otseselt seotud dopamiinisüsteemi düsfunktsioneerimisega. [1, 2, 17]

Dopamiini sisaldavate neuronite komplekse ehk tuumi tähistatakse A8-A15 (Lisa: Joonis 3) ning need paiknevad keskajus (A8-A10), vaheajus (A11-A14) ja eesajus haistesibulas (A15). Sealt lähtuvad mitmed dopamiinergilised närviteed. Antud töö seisukohalt on olulisimad A10 rakkude rühmast ventraalses tegmentaalses alas (VTA) lähtuvad mesolimbilised ning mesokortikaalsed projektsioonid ning A8-A10 lähtuvad mesostriataalsed projektsioonid. [18, 19]

Kõik dopamiini retseptorid kuuluvad GPCR perekonda ning jaotatakse kaheks suuremaks grupiks: D1 ja D2 grupiks. D1 rühma kuuluvad retseptorid – D<sub>1</sub> ja D<sub>5</sub> – aktiveerivad muuhulgas membraanset ensüümi adenülaadi tsüklaas (AC), mis katalüüsib tsüklilise adenosüüni monofosfaadi (cAMP) teket adenosüüni trifosfaadist (ATP). cAMP omakorda aktiveerib proteiin kinaas A (PKA). Selle signaalirajaga on seotud väga paljude funktsioonide (nagu õppimine, sõltuvuse teke jne) vahendamine ja moduleerimine. D1 rühma retseptorid on seotud ka fosfolipaas C (PLC) stimuleerimise ja Ca<sup>2+</sup> mobilisatsiooniga jne. D2 rühma retseptorid – D<sub>2S</sub>, D<sub>2L</sub>, D<sub>3</sub> ja D<sub>4</sub> – inhibeerivad AC ja seega cAMP akumulatsiooni, aktiveerivad mitogeen-aktiveeritud valgukinaaside rada ning sünergistlikult D1 retseptoriga inhibeerivad Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaasi. [1, 12, 17, 20-22]

D<sub>1</sub> retseptoreid leidub ajus kõige rohkem, nende mRNA-d on leitud dorsaalses striatumis (sabatuumas ja koorikutuumas dorsolateraalne osa, edaspidi lihtsalt striatum), ventraalses striatumis (naalduv tuum ehk *nucleus accumbens* ja haisteköbruke), hüpotalamuses ja talamuses. Striataalses alas on D<sub>1</sub> seotud G<sub>olf</sub>-valguga, teistes piirkondades aktiveerib D<sub>1</sub> AC-d enamasti G<sub>s</sub> kaudu. Samas on näidatud aga D<sub>1</sub> retseptorite seostumist ka G<sub>i</sub> perekonna valkudega (G<sub>i</sub>, G<sub>o</sub>). [17, 22-25]

D<sub>2</sub> retseptori kaht isovormi – D<sub>2L</sub> ja D<sub>2S</sub> (lühendused ingliskeelsetest sõnadest *short* ja *long*), mis erinevad teineteisest 29 aminohappe võrra kolmandas intratsellulaarses silmuses – on samuti ajus suhteliselt palju: striatumis, naalduvas tuumas, hüpotalamuses, mustolluses, ajukoos. Striatumis esineb põhiliselt D<sub>2L</sub> isovorm. Mõlema isovormi puhul on näidatud seostumist G<sub>i</sub>, G<sub>o</sub> ja G<sub>z</sub> valkudega. Nii D<sub>1</sub> kui D<sub>2</sub> retseptorid on striatumis lokaliseeritud enamasti GABA-ergilistele neuronitele, samas kui nende koossekspressioon on pigem harv. [17, 22-24, 26]

Teisi D2 grupi kuuluvaid retseptoreid - D<sub>3</sub> ja D<sub>4</sub> retseptoreid – on ajus vähem kui D<sub>2</sub>, kusjuures D<sub>3</sub> leidub näiteks naalduvas tuumas, D<sub>4</sub> on aga põhimikutuumades (striatum, mustollus jt) vähe, rohkem ajukoos, hipokampuses, mandeltuumas ja hüpotalamuses. Lisaks G<sub>i</sub> perekonna valkudele on näidatud seostumist ka G<sub>q</sub>-ga. [17, 22]

D<sub>5</sub> leidub ajus üsna vähe ning on sageli koekspressiooniga koos D<sub>1</sub> retseptoriga näiteks prefrontaalkoores, entorinaalkoores, tsingulaarkoores ja hipokampuses. Seostumist on näidatud G<sub>s</sub> ja G<sub>z</sub> valkudega. [17, 22]

Dopamiini transporteri (DAT) autoradiograafilisel märgistamisel on leitud, et seda valku on enim striatumis, naalduvas tuumas, mustolluses ning mandeltuumas. [27]

## Sõltuvus- ja hüvituskäitumisega seotud protsesside vahendamine ajus

Välised ja sisemised stiimulid, mida meie aju igal hetkel vastu võtab ja töötleb, tingivad mingi organismi vastuse adapteerumaks nimetatud stiimulitega. Kui mingi stiimuli korduval esitamisel organismi biokeemilis-käitumuslik vastus sellele suureneb, nimetatakse stiimulit sarrustavaks. Olds'i ja Milneri eksperiment 1954. aastal tõestas, et ajus eksisteerivad spetsiifilised "tasustustsentrid", mida rotid väga meelsasti ise elektriliselt stimuleerivad. Virgatsainesüsteem, mis elektrilisele enesestimulatsioonile eriti tundlik on, on keskaju ventraalsest tegmentaalsest alast (VTA) lähtuv dopamiinergiline (DA-ergiline) rada, mis projitseerub limbilise süsteemi aladesse, eriti naalduva tuuma piirkonda (NAc), ning prefrontaalsesse ajukoorda (PFC). [28]

50 aastaga, mis nimetatud eksperimendist möödab, on tõestatud väga suure hulga erinevate sarrustajate ühine omadus aktiveerida mesolimbilist DA-ergilist rada ning kutsuda esile DA vabanemine NAc-s. Selliste sarrustajate hulka kuuluvad näiteks toit, magusad asjad, seks jne, aga ka paljud ravimid ja narkootikumid, mis põhjustavad sõltuvust, samuti hüvesid *ennustavad*, hüvitajaga operantse või klassikalise tingimise järgi seostatud stiimulid. [28, 29]

Üks väga olulisi VTA-NAc DA-ergilise raja aktiveerimise modulaatoreid on stiimuli/konteksti *uudsus* [28, 30]. Jaak Panksepp on arvanud emotiivsete närviringete hulka ka süsteemi, mis vahendab uudishimulikkust ja apetiitset (lähenevat, isulevat) käitumist objektide suhtes (SEEKING-süsteem), ning pole üllatus, et selle süsteemi üheks põhiteljeks on VTA-NAc rada ja üheks peamiseks virgatsaineiks dopamiin [31].

DA-ergilised neuronid laenglevad kahel eri viisil: esiteks tavalises, üksik-piik režiimis, ja teiseks faasilises, hooglaenglemise režiimis [32]. Kuigi just hooglaenglemine leiab aset motivatsiooniliselt oluliste (sarrustavate) stiimulite peale [33], on vahe stiimuli ja sellele järgneva hooglaenglemise vahel suhteliselt pikk ning DA-ergiliste neuronite langemine, mis on põhjustatud ühest stiimulist, hakkab moduleerima *vastust järgnevale* stiimulile. Striatumis on selline aeglane DA-ergiline moduleeriv süsteem aga seotud kiirete, kortikostriataalsete glutamaat- ning GABA-ergiliste teedega [34].

Striatum ehk juttkeha (nii dorsaalne kui ventraalne osa) on oluline osa tuumade rühmast nimega põhimikutuumad. Põhiline sisend striatumisse tuleb glutamaatergiliste teede kaudu korteksist ning talamusest ja dopamiinergiliste teede kaudu keskajust (ka VTAs). Põhiosa striataalsetest neuronitest on GABA-ergilised projektsioonineuronid, mis sisaldavad ka substantia P ja dünorfiini. Väljundid lähevad teistesse põhimikutuumadesse, VTA-sse, ka mandeltuuma ja hüpotalamusse. [1, 35,36]

VTA-s on lisaks dopamiinergilistele neuronitele samuti GABA-ergilisi neuroneid. Mõlemad projitseeruvad NAc-sse ja PFC-sse ning neil on ka omavahelisi sünapseid. Lisaks projektsioonialadele vabastatakse dopamiini ka VTA piires ning vabanenud dopamiin on võimeline difundeeruma vabanemiskohast aladesse, kus  $D_1$  ja  $D_2$  retseptorid on lokaliseeritud GABA-ergilistele neuronitele. [29]

Nagu näha, on VTA-striatum omavahel väga mitmeti ühendatud ja lisaks GABA-, glutamaat- ja dopamiinergiliste teede omavahelisele interaktsioonile saab nimetatud piirkond sisendeid teisteltki virgatsainesüsteemidelt, mis omakorda signaliseerimist moduleerivad. Et antud töö raamides on olulisim  $D_2$  retseptorite funktsioon, keskendutaksegi edaspidi nende retseptorite interaktsioonile teiste virgatsainesüsteemidega.

Üks kõige enam tõestamist leidnud  $D_2$  dopamiinergilise süsteemi interaktsioone striatumi alas on interaktsioon *adenosiin*  $A_{2A}$  retseptoritega. Ajus on  $A_{2A}$  retseptorid ekspresseeritud suurel määral samas piirkonnas, kus  $D_2$  retseptoridki: dorsaalses ja ventraalses striatumis [37]. Kasvav hulk uuringutulemusi – radioligandi sidumisest käitumiskatseteni – näitab, et  $D_2$  ja  $A_{2A}$  vahel on antagonistlikud vastasmõjud.  $D_2$  ja  $A_{2A}$  vahel on näidatud retseptor-retseptor heteromerisatsiooni [38, 39], interaktsiooni sekundaarsete virgatsainete tasemel [40] ning samuti antagonismi käitumuslikul tasemel, kus  $A_{2A}$  retseptorite blokeerimine hoiab ära psühhostimulandist tingitud käitumusliku sensitiseerimise tekke [41, 42].

Hästi on näidatud ka dopamiinergilise süsteemi (muuhulgas  $D_2$  retseptorite) interaktsiooni *noradrenergilise* süsteemiga. Mitmed uuringud on näidanud aju suurimast noradrenergiliste neuronite kogumist sinavas alas ehk *locus coeruleus*'es (LC) lähtuvat nii stimuleerivat kui inhiveerivat sisendit VTAsse [43-45]. LC-st lähtuvate neuronite rolliks on oletatud organismi hakkama saamist ning adapteerumist keskkonnamuutustega ning üleüldist ärksust [46]. Intaktne LC-noradrenergiline sisend on vajalik, et saavutada dopamiini normaalne vabanemine mesolimbilises süsteemis [47]. LC projektsioonide kahjustamisel, näiteks selektiivse neurotoksiini N-(2-kloroetüül)-N-etüül-2-bromobensüülamiiniga (DSP-4), mis põhjustab LC-st lähtuvate NA-ergiliste lõpmete degeneratsiooni (kuna NA transporterid alküleeritakse) [48, 49], väheneb dopamiini vabanemine rottide striatumis, NAc-s ja ajukooses ning  $D_2$  retseptorite arv suureneb, samuti GDP afiinsus G-valkudele väheneb, mis viitab retseptor-G-valk ülekande sensitiseerumisele [50, 51].

LC-st lähtuv noradrenergiline sisend mõjutab mesolimbilist dopamiinergilist süsteemi ka kaudselt, läbi prefrontaalse ajukoore. Käitumuslikult tasemel on näidatud, et

noradrenergiliste retseptorite blokeerimisel (prefrontaalses kooses) väheneb dopamiini vabanemine NAc-s ja ka psühhostimulandist tingitud lokomotoorne aktiivsus. [35, 52, 53]

1980ndatel demonstreeriti, et osa DA-ergilisi neuroneid sisaldab ka neuropeptiid koletsüstokiniini (CCK) [54]. CCK osaleb söömise reguleerimises, valutundlikkuses, õppimis- ja mäluprotsessides ning oletatavasti uuendustega kohanemises [55, 56]. Läbi CCK<sub>1</sub> ja CCK<sub>2</sub> retseptorite näib CCK DA-ergilist aktiivsust mõjutavat erinevalt (hõlbustab või inhibeerib vastavalt), mida on näha ka käitumuslikul tasemel [57, 58].

Lisaks on näidatud DA-ergilise süsteemi vastasmõjusid serotonergilise süsteemiga [59], endokannabinoidse süsteemiga [60, 61] ning endopioidse süsteemiga, millistest viimane funktsioneerib samuti põhiliselt läbi G<sub>i</sub> tüüpi G-valkude, nagu D<sub>2</sub> retseptoridki, mistõttu on võimalik, et need kaks süsteemi mõjutavad teineteist intratsellulaarsel, teiseste virgatsainete tasemel NAc neuronites [61].

Nii nagu on saadud üha enam ja enam andmeid VTA ning striataalse ala DA-ergilise süsteemi interaktsioonidest teiste virgatsainetega, on ka mesolimbilise DA-ergilise tee *rolli* kontseptsioon aja jooksul palju muutunud. Lihtsast sarrustuse ja naudingutunde vahendamise hüpoteesist on kasvanud välja palju üldistavamaid teooriaid mesolimbilise dopamiinisüsteemi funktsiooni kohta. Väga palju on seda seostatud assotsiatiivse õppimisega, kus sõltuvust tekitava ainega seotud stiimul assotsieeritakse selle aine poolt tekitatud subjektiivse elamusega ning sõltuvust vaadeldakse selle teooria raames kui dopamiinist vahendatud assotsiatiivse õppimise häiret. Niisiis dopamiinergiliste neuronite aktivatsioon vahendab sarrustavate stiimulitega seotud keskkonnamärkide õppimist ja äratundmist [28, 62, 63]. Seda teooriat toetavad katseandmed, kus sõltuvust tekitava aine ja mingi keskkonnastiimuli seostamine resulteerub raku tasemel sünaptilises plastilisuses, näiteks glutamaadist sõltuvas pikaajalises potentseerimises (LTP) VTA piirkonnas, glutamaat aga teadaolevalt kontrollib keskaju dopamiinergiliste neuronite laenglemist ja funktsiooni [64]. Samas eksisteerib vahe kunstlike (narkootikumid) ning looduslike sarrustajatega assotsieeritud stiimulite õppimises, õieti selle õppimise intensiivsuses/kestuses: kokaiiniga assotsieeritud kontekstuaalsed stiimulid kutsusid ühes uuringus rottidel esile tagasilanguse kokaiini tarbimisse ka aasta pärast, samal ajal kui magusa lahusega seotud samad stiimulid olid efektiivsed vaid kolme kuu jooksul [63, 65].

Ei tohi kahe silma vahele jätta ka *motoorsete* protsesside tähtsust sõltuvuse tekkes. On ju põhimikutuumade ja sealse dopamiini roll suur just motoorsetes protsessides. Seetõttu on oletatud ka, et dopamiini vabanemine naalduvas tuumas on oluline motivatsioonilistes mehhanismides, seostades hüvituse selle kättesaamiseks vajalike motoorsete aktidega [66].

Seda hüpoteesi toetab uuring, kus hiired, kelle organismis ei sünteesita dopamiini, siiski *eelistasid* suhkrulahust (looduslik sarrustaja) veele, st et nende organismi hüvitussüsteem funktsioneeris ligilähedaselt samamoodi kui tavalistel hiirtel, samas kui nad *algatasid* toiduga seotud akte harvemini kui tavalised hiired, mis viitab, et neil olid puudujäägid sihitud tegevuse algatamises (motivatsioonis) [67].

Hoolimata aga sellest, kas dopamiin omab otsest või pigem moduleerivat ja hõlbustavat rolli hüvitusega seotud ajumehhanismides, vallandab enamik looduslike ja sünteetilisi sarrustajaid dopamiini vabanemise naalduvas tuumas, plastilisuse VTA-NAc teljel ja sellega seotud ajupiirkondades ning teatud käitumuslikud efektid, mille põhjalikum uurimine annab kindlasti palju teavet adikttiivsete protsesside vahendamise kohta ajus. [61]

## **Psühhostimulandid dopamiinergilises ja sellega interakteeruvates süsteemides**

Psühhostimulandid on klass aineid, mis põhjustavad erksust, kõrgendatud tähelepanuvõimet ja käitumuslikku aktivatsiooni. Sellised ained on näiteks nikotiin ning kofeiin; kõige tugevama mõjuga aga on grupp aineid, mida üheskoos nimetatakse psühhomotoorseteks stimulantideks – amfetamiin, kokaiin jt sarnase farmakoloogiaga ühendid. [2]

Amfetamiin, keemilise nimega  $\beta$ -fenüülisopropüülamiin (Lisa: Joonis 4) esineb kahe stereoisomeerina: D- ja L- vormina, kusjuures D-amfetamiin on suurema mõjuga kui L-vorm. Kokaiin (Lisa: Joonis 4), tropaani analoog, on kokapõõsa *Erythroxylon coca* lehtedest eraldatav alkaloid, mis sarnaselt amfetamiinile on nõrk alus. Nii amfetamiin kui kokaiin mõjuvad aju katehoolamiinergilises süsteemis sarnaselt, blokeerides nende tagasihaarde närvilõpmetesse, kuid afiinsused erinevatele transporteritele on erinevad, mistõttu nad produtseerivad nii farmakoloogilisel kui isiku subjektiivsel tasemel pisut erinevaid efekte. [2]

Amfetamiin omab enam-vähem võrdset afiinsust dopamiini ja noradrenaliini transporteritele (DAT ja NET vastavalt), samas kui afiinsus serotoniini transporterile (SERT) on umbes 10 korda madalam. Kokaiinil aga on suurim afiinsus SERT-ile, ligikaudu 5 korda väiksem afiinsus DAT-ile ja veel väiksem afiinsus NET-ile. Amfetamiin, lisaks DAT blokeerimisele, käitub sellele transporterile kui valesubstraat, transporditakse tsütoplasmasse ning seal on ta võimeline asendama dopamiini sünaptilistes põiekestes. Sünaptilistes

põiekestest tsütoplasmasse vabanenud dopamiin paneb DAT teistpidi tööle ja seega vabaneb veel enam dopamiini sünaptilisse pilusse. [2, 68, 69]

Kuigi amfetamiin ja kokaiin blokeerivad kõiki kolme põhilist monoamiini transporterit, arvatakse, et just seostumine DAT-iga (ja selle tulemusel DA suur hulk sünaptilises pilus) on see, millel on keskne roll nimetatud psühhostimulantide hüvitavates ja motoorselt aktiveerivates omadustes. [68, 70]

Niisiis on amfetamiini ja kokaiini mõju otseseks tagajärjeks ajus dopamiini suurenenud vabanemine, mis, nagu eelpool mainitud, on korreelaadiks adiktiivsete-motivatsiooniliste mehhanismide aktiveerumisele. Samas esineb selline dopamiini vabanemine NAc-s ka vastusena uudsetele stiimulitele, kusjuures DA vabanemise ulatus sõltub loomade personaalsetest iseärasustest: enam uudishimulikel rottidel on nii basaalne kui uudsest stiimulist aktiveeritud DA vabanemine kõrgem [71]. Seega võib oletada seost DA-ergilise süsteemi funktsioneerimise ja loomade uudistamisaktiivsuse vahel, samuti uudistamisaktiivsuse ja adiktiivsete-motivatsiooniliste mehhanismide vahel. On näidatud, et amfetamiin põhjustab uues keskkonnas uudistamis-/lokomotoorse aktiivsuse tõusu [72], samas loomad, kelle uudistamisaktiivsus on kõrgem, manustavad endale amfetamiini ise palju kergemini kui vähem uudishimulikud loomad [73].

Loomade uudistavat käitumist ning nende personaalseid erinevusi selles on kõige enam mõõdetud, kasutades avarvälja paradigmat, kus loomade käitumist uues kontekstis hinnatakse, mõõtes vahemaad, mida nad läbivad, loendades tagajalgadele tõusmist ning nuhutamist jne ja selle järgi jagades neid uudsusele "kõrge" või "madala reaktiivsusega" isenditeks [74]. Seda paradigmat on modifitseeritud, kasutades niniimetatud vaba-valiku uudiskasti, mis koosneb väikesest, kodukastile sarnanevast kambrit ja sellega ühendatud avatud välja koos tundmatute objektidega. Loomal on niisiis valik – kas jääda väikesesse kambriksse (seotud kõrge ärevuse ja madala motivatsiooniga uudistada) või minna avatud väljale (seotud madala ärevuse ja kõrge motivatsiooniga uudistada), kusjuures avalduva käitumismustri järgi võib loomad jaotada "madalateks" ja "kõrgeteks uudistajateks", milline käitumismuster on neile stabiilselt iseloomulik [75].

Nagu juba eelpool mainitud, saab VTA-NAc dopamiinergiline tee suuri mõjutusi LC-st lähtuva noradrenergilise sisendi kaudu. Selline noradrenergiline modulatsioon on näha ka psühhostimulantidest tingitud efektides, näiteks käitumuslikul tasemel on demonstreeritud noradrenaliini rolli amfetamiinist tingitud lokomotoorsele aktivatsioonile [52, 76], dopamiinergilise süsteemi neurokeemias aga näidatud nii basaalse kui stimuleeritud DA vabanemise vähenemist ja D<sub>2</sub> retseptorite üleregulatsiooni striatumis pärast LC-st lähtuvate



noradrenergiliste projektsioonide denerveerimist toksiin DSP-4-ga [50, 51] ning käitumuslikul tasemel, sõltuvalt loomade personaalsetest erinevustest uudistamisaktiivsuses, muutust adapteerumises keskkonnaga ning amfetamiinist indutseeritud lokomotoorses aktiivsuses [72].

Üks loomadel enim jälgitavaid psühhostimulantide efekte on käitumuslik aktivatsioon, põhjustatuna stimulandi manustamisest. Korduv psühhostimulantide manustamine viib aga nähtuseni, mida kutsutakse käitumuslikuks sensitiseerimiseks, ning mis väljendub suurenenud lokomotoorses vastuses psühhostimulandi doosile. Selline nähtus on omane nii kokaiinile kui amfetamiinile ning aju biokeemilisel tasemel väljendub suurenenud dopamiini transmissioonis, vähemasti kokaiini puhul DAT arvu suurenemises NAc-s, D<sub>2</sub> retseptorite üleregulatsioonis, basaalses adenülaadi tsüklaasi aktiivsuse kasvus (oletatavalt johtuvalt vähenenud G<sub>i</sub> valkude inhibeerivast mõjust sellele) NAc-s, suurenenud glutamaadi ja vähenenud GABA transmissioonis VTA-s, vähenenud DA transmissioonis prefrontaalses korteksis (PFC), kokaiini puhul hõlbustunud glutamaatergilises transmissioonis NAc-s jne [68, 70, 77]. Sellised adaptiivsed muutused leiavad aset ringes, millele on omistatud roll tõlkimaks erinevaid stiimuleid adaptiivseteks käitumuslikeks vastusteks. See ringe hõlmab nii dopamiinergiliste tuumade kogumeid VTA-s kui mustolluses, naalduvat tuuma, korteksi alasid ja striatumit ning põhitransmitteriteks on seal dopamiin, GABA, glutamaat, dünorfiin. See ringe on praktiliselt identne eespool vaadeldud adiktivset ja uudistavat käitumist vahendava ringega, seetõttu võib käitumusliku sensitiseerimise uurimine anda informatsiooni ka sõltuvuse biokeemia kohta. Üleärgastust selles ringes on loetud ka psühhostimulantidest tingitud psühhoosi ja skisofreenia mudeliks. [77]

Võimaluse hinnata ainete sarrustavaid omadusi ning sõltuvuse tekkemehhanisme ja nende seotust kontekstuaalsete stiimulitega annab lisaks käitumusliku sensitiseerimise uurimisele ka tingitud paigaeelistuse (CPP – *conditioned place preference*) paradigma. CPP katses seostatakse üks kahest looma jaoks (loodetavasti) võrdselt neutraalsest keskkonnast mingi sarrustava ainega, näiteks süstitakse kokaiini, teine aga mitte, näiteks süstitakse lihtsalt lahustit. Pärast treeningsessioone antakse loomale võimalus valida, kumba keskkonda ta eelistab. Kokaiin kutsub esile tugeva paigaeelistuse, st loomad viibivad palju enam selles keskkonnas, kus neile kokaiini süstiti, samuti pärast pikema aja möödumist kutsub primaariv kokaiinidoos esile CPP taastumise. [70, 78, 79]

## **Dopamiinergiline süsteem suhkrulahuse (looduslik sarrustaja) tarbimisel**

Nii, nagu loomadel eksisteerivad individuaalsed iseärasused uudistavas käitumises, esinevad taolised iseärasused ka nende tundlikkuses sarrustavate ainete suhtes. Sellist individuaalset seadumust tundlikkuseks sarrustajale saab mõõta näiteks uurides suhkrulahuse tarbimist ja eelistust; mitmed uuringud ongi rotte jaganud “kõrgeteks” ja “madalateks” suhkru tarbijateks” [80, 81]. Sarnaselt kunstlike sõltuvust tekitavate ainetega, põhjustab ka suhkrulahuse tarbimine NAc-s dopamiini vabanemise [82], samuti võib suhkrulahuse tarbimise põhjal ennustada looma valmidust endale ise manustada amfetamiini või kokaiini [81, 83]. Niisiis võiks rottidel suhkrulahuse tarbimiskäitumine olla suhteliselt stabiilne isiksusomadus, mis on seotud ka mitmete neurokeemiliste muutustega ajus, sh D<sub>2</sub> dopamiinergilises süsteemis. Seost D<sub>2</sub> dopamiini retseptoriga on näidatud uuringus, kus D<sub>2</sub> retseptori antagonisti pimosiidi manustamine vähendas suhkrulahuse tarbimist ja eelistamist veele [84]. DAT blokeerimine, kasutades pöördmikrodialüüsi DAT blokaator nomifensiiniga suurendas suhkrulahuse tarbimist, aga mitte vee tarbimist, mis näitab, et DA efekt on sarrustaja-spetsiifiline [82].

Enamik katseid nii kunstlike sarrustajate kui suhkrulahuse tarbimise uurimiseks on tehtud päeval ajal, valges faasis, mis aga pole ööloomade (nagu rotid) puhul aktiivne periood. Dopamiini ja tema metaboliitide tase naalduvas tuumas ja striatumis on rottidel leitud olevat kõrgem nimelt pimedas faasis [85], mistõttu võib oletada, et mõõtmised pimedas faasis toovad enam esile rottide iseloomuliku käitumise, samuti individuaalsete iseärasuste neurokeemia on paremini jälgitav.

## EKSPERIMENTAALNE OSA

### Materjalid

EDTA telliti Merckist; Tris-(hüdrosümetüül)-aminometaan ja NaCl Naxo Ltd.-st; HEPES (N-[2-hüdrosümetüül]piperasiin-N'-[2-etaansulfoonhape]), dopamiin, GDP ning (+)-butaklamool Sigma-Aldrich Co.-st; ditiotreitool (DTT) firmast Reanal; MgCl<sub>2</sub> Acroselt; [<sup>35</sup>S]GTPγS ja stsintsillatsioonikokteil PerkinElmer Life Science Inc.-st; filtrid (GF/B klaasfiiberfiltrid) Whatman Int. Ltd.-st.

Käitumiskatsete juures kasutatavad tähtsamad materjalid on ära toodud vastava meetodi all.

### Meetodid

#### *Käitumiskatse 1: DSP-4 või/ja amfetamiini mõju rottide uudistamisaktiivsusele*

Katse on läbi viidud Tartu Ülikooli Sotsiaalteaduskonna psühhofüsioloogia teadusgrupi liikme Aet Altoa poolt.

Isased Wistari rotid (n=64, kaal 323 – 590 g, Kuopio, Finland) majutati 4-kaupa standardsetesse polüpropüleenpuuridesse ning hoiti 12/12h valgus/pimedus tsüklis. Toit ja jook olid saadaval *ad libitum*. Eksperimendid viidi läbi 13:00 ja 19:00 vahel.

Uudiskasti test viidi läbi, nagu eelnevalt kirjeldatud [75, 86]. Metallist uudiskast koosnes 0.5×1m avarväljast (seinad 40 cm) ning 20x20x20 cm väikesest kambrist, mis oli ukseavaga ühendatud avarväljaga. Avarväli oli jagatud 8 võrdse suurusega ruuduks ning seal oli neli objekti: üks tuttav (toidugraanul) ning 3 tundmatut (pappkarp, klaasist pudel ja puust pulk). Puuri puhastati peale iga looma sealviibimist. Uudistamise test algas roti asetamisega väikesesse kambrisse. Testisessioon kestis 15 minutit, mille käigus mõõdeti 1) latentsiaega avarväljale sisenemisel; 2) avarväljale sisenemise kordi; 3) aega, mis veedeti avarväljal; 4) läbitud ruute; 5) tagajalgadele tõusmist; 6) tundmatute objektide uudistamise kordi ning arvutati lõpuks kõigi uudistamis-/aktiivsuselementide summa. Käitumise järgi uudiskasti testis teisel päeval jagati rotid kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega (HE ja LE vastavalt) isenditeks.

D-amfetamiin (Sigma, St. Louis, MO, USA) manustati rottidele (0.5 mg/kg) intraperitonaalselt 15 min enne testi ning DSP-4 (AstraZeneca, Södertälje, Rootsi) doosis 10 mg/kg 14 päeva enne testisessioone. Rotid jagati gruppideks: 1) HE loomad: a) kontroll (nii

DSP-4 kui amfetamiini manustamise asemel süstiti lahustit), b) ainult DSP-4 töötlus (amfetamiini manustamise ajal süstiti lahustit), c) ainult amfetamiini grupp (DSP-4 töötluse ajal süstiti lahustit), d) DSP-4 töötlus+amfetamiin; 2) analoogselt LE rottide grupid.

Amfetamiini ja DSP-4 mõju uurimise testides kasutati avarvälja paradigmat, s.t. et uudiskastis vahekäik väikesesse kambris oli suletud. Loomad asetati avatud alale 15 minutiks ning loendati kõik eelpoolnimetatud aktid.

9 päeva pärast testide lõpetamist viidi läbi sensitisatsiooni katse: kõik loomad said amfetamiinisüsti 0.5 mg/kg ja nende lokomotoorset aktiivsust mõõdeti avarväljal.

### ***Käitumiskatse 2: Kokaiinist tingitud paigaeelistuse uurimine***

Katse on läbi viidud Tartu Ülikooli Sotsiaalteaduskonna psühhofüsioloogia teadusgrupi liikme Kadri Kõivu poolt.

Isaste Wistari rottide majutustingimused olid samad, mis eelmises katses. Samuti uudiskasti test ja selekteerimine HE ning LE loomadeks viidi läbi sarnaselt.

Kokaiin-HCl (Synopharm GmbH & Co. KG, Saksamaa) lahustati (0.9% NaCl) ning manustati loomadele intraperitonaalselt doosis 15 mg/kg vahetult enne käitumiskatset.

CPP katse viidi läbi 48 rotiga, kes kaalusid eksperimendi algul 250-360g. CPP puur koosnes 2 võrdse suurusega kambrist, ühel olid hallid seinad ja põrand, teisel valged; ruumid olid eraldatud uksega ning ruumide põrand oli jagatud joontega neljaks ruuduks. Nii HE kui LE loomad jagati juhusliku määranguga kontroll- (said lahustit) ja kokaiinigrupiks. Kahel päeval testiti nende loomulikku valikut kambrite vahel ning teise päeva tulemused loeti baastasemeks. Tingimistestis seostati kokaiini süst valge kambriga, kontrollgrupp sai aga lahustisüsti enne valgesse kambrisse sulgemist. Üheksandal katsepäeval lasti loomadel valida, kumba kambrit nad eelistavad (alustati looma panekust valgesse kambris, sest see oli baastaseme poolest vähem eelistatud kamber) ning mõõdeti nende liikumist 15 minuti jooksul. Valges kambris mõõdeti 1) sisenemiste arvu nimetatud kambris, 2) aega, mis seal veedeti, 3) ruute, mis läbiti, 4) tagajalgadele tõusmist ja 5) lokomotoorse indeksina kahe viimase summat. CPP skoor loeti kui vahe aegade vahel, mis veedeti kokaiiniga seotud kambris pärast ja enne tingimise sessiooni.

### ***Käitumiskatse 3: Suhkrulahuse tarbimise uurimine päeval ja öösel***

Katse on läbi viidud Tartu Ülikooli Sotsiaalteaduskonna psühhofüsioloogia teadusgrupi liikme Margus Tõnissaare poolt.

Isased Sprague-Dawley rotid (Scanbur BK AB, Rootsi) kaaluga 373-546 g majutati ühekaupa plastikust puuridesse ning hoiti 12/12h valgus/pimedus tsüklis. Toit ja jook olid saadaval *ad libitum*.

Suhkrulahuse eelistuse test viidi läbi, lubades rottidel valida kahe pudeli sisu vahel: ühes oli 1% suhkrulahus, teises vesi. Pudelite asukohta muudeti testide käigus. Suhkrulahuse ja vee tarbimist 1h jooksul mõõdeti, kaaludes pudeleid enne ja pärast testi. Loomad jagati kaheks grupiks, ühed alustasid eelistustesti pimedas, teised valges tsüklis. Kokku läbisid kummassegi gruppi kuulunud loomad 4 testi valges ja 4 testi pimedas. Suhkrulahuse eelistus arvutati kui tarbitud suhkrulahuse osa kogu manustatud vedelikust.

### ***Koe monoamiinide sisalduse mõõtmine (Käitumiskatse 1 ja 2 puhul)***

Kromatograafilised mõõtmised on teostanud Tartu Ülikooli Sotsiaalteaduskonna psühhofüsioloogia teadusgrupi töötaja Marika Eller.

Monoamiinide (dopamiin, serotoniin) ning nende metaboliitide (DOPAC, HVA, 5-HIAA ehk 5-hüdroküindooläädikhape, serotoniini metaboliit) tase on määratud HPLC-ga, elektrokeemilise detekteerimisega.

Ajukoed homogeniseeriti Bandelin Sonopuls ultrahelihomogenisaatoriga jääkülmas homogeniseerimislahuses (0.1 M perkloorhape, 5 mM naatriumdisulfit ja 0.4 mM EDTA), tsentrifuugiti 17 000xg 10 minutit 4 °C juures ning 10/20 µl supernatanti kromatografeeriti (Lichrospher 60 RP Select B kolonn, 250x3 mm; 5 µm) isokraatilises režiimis 30°C juures, eluendiks 0.05 M naatriumtsitraatpuhver pH-l 3.7, mis sisaldas 0.02 mM EDTA, 1 mM KCl, 1 mM naatriumoktüülsulfonaati ja 5.6% atsetonitriili. Detekteerimine toimus potentsiaalil 0.6V/0.7V (Ag/AgCl võrdluselektroodi suhtes).

### ***D<sub>2</sub>-retseptori poolt stimuleeritud [<sup>35</sup>S]GTPγS sidumine roti aju striatumi ja naalduva tuuma membraanidele: väljatõrjumiskõver GDP-ga***

Pärast käitumiskatseid tapeti rotid dekapitatsiooni teel prof. Jaanus Harro poolt. Ajuosad eraldati, kasutades juhendina Paxinos' e ja Watsoni roti aju atlant. Naalduvad tuumad ja striatumid eraldati nagu kirjeldatud [72].

GTPγS analüüs viidi läbi nagu kirjeldatud [87]. Koed homogeniseeriti 3.5 ml homogeniseerimispuhveris (Tris-HCl, pH=7.4) Bandelin Sonopuls ultrahelihomogenisaatoriga (kolm korda, 10 sekundit/kord) ning tsentrifuugiti 32000 g ja 4°C juures 20 minutit. Supernatant kallati ära ja rehomogeniseeriti membraanid eespoolkirjeldatud viisil. Protseduuri

korral kokku kolm korda. Seejärel homogeniseeriti membraanid kas 90 kordses (striatumid) või 200 kordses (naalduvad tuumad) GTP $\gamma$ S inkubatsioonipuhvril A (20 mM K-HEPES, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH=7.4). Membraanid (500  $\mu$ g striatumi ja 200  $\mu$ g naalduva tuuma kudet katsepunktis) inkubeeriti 0.2 nM [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S ja erineva kontsentratsiooniga GDP-ga (3 mM-1  $\mu$ M) kas dopamiini (1 mM) või butaklamooli (10  $\mu$ M) juuresolekul 90 minutit 30°C juures. Reaktsioon peatati kiire filtreerimisega läbi GF/B klaasfiiberfiltrite ning filtreid pesti lisaks kolm korda jääkülma filtreerimispuhvriga B (20 mM naatriumfosfaat, 100 mM NaCl, pH=7.4). Igale filtrile lisati 4 ml stsintsillatsioonikokteili, lasti üleöö seista ja loendati seostunud radioaktiivsus Wallac RackBeta 1219 vedelikstsintsillatsioonloenduriga.

***Dopamiini poolt vahendatud [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S sidumise aktivatsioon roti aju striatumi membraanidele: kontsentratsioon-vastus kõver***

Roti aju striatumi membraanid olid valmistatud Raili Remmeli poolt inkubatsioonipuhvril A. Membraanid lahjendati GTP $\gamma$ S inkubatsioonipuhvriga A kontsentratsioonile 89 mg kudet katsepunktis ning inkubeeriti 0.2 nM [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, 32  $\mu$ M GDP ja erineva kontsentratsiooniga dopamiiniga (100 mM- 0.1  $\mu$ M) 90 minutit 30°C juures. 1  $\mu$ M lõppkontsentratsiooniga butaklamooli kasutati, määramaks aktiveerimata retseptoritele vastavat [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S sidumist. Reaktsioon peatati kiire filtreerimisega läbi GF/B klaasfiiberfiltrite ning filtreid pesti lisaks kolm korda jääkülma filtreerimispuhvriga B. Igale filtrile lisati 4 ml stsintsillatsioonikokteili, lasti üleöö seista ja loendati radioaktiivsus Wallac RackBeta 1219 vedelikstsintsillatsioonloenduriga.

***Andmetöötlus***

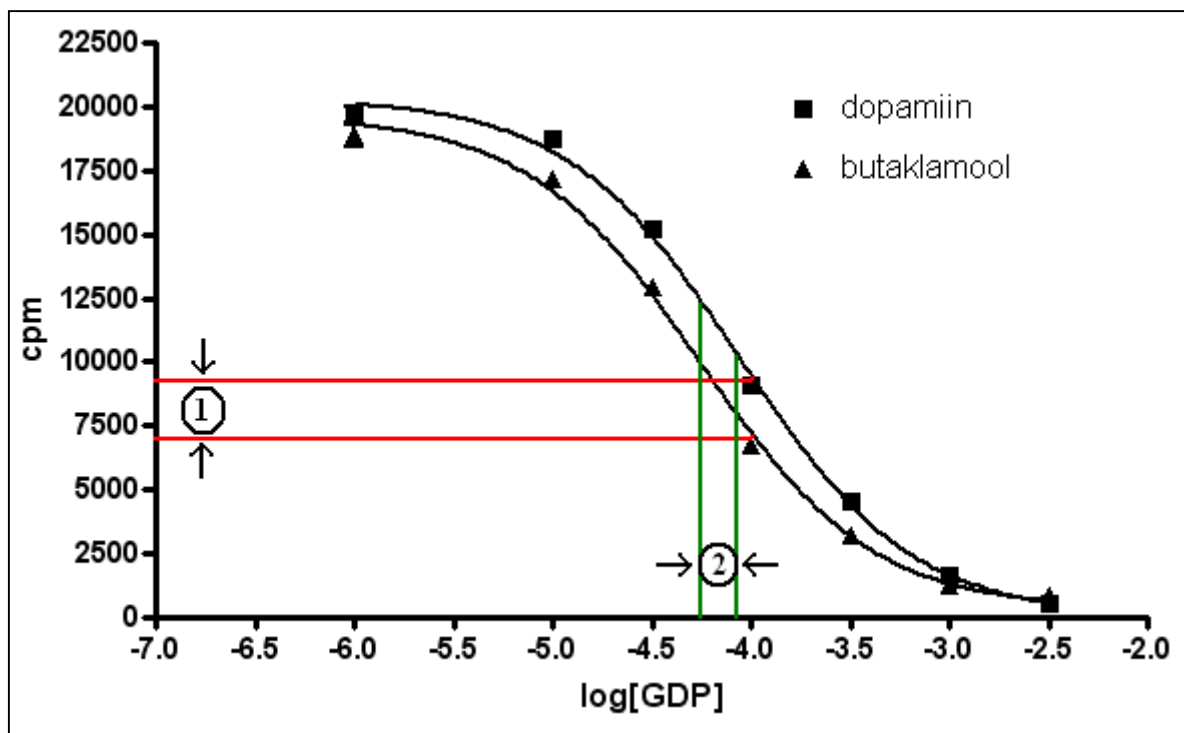
Biokeemiliste sidumisanalüüside andmed töödeldi programmi GraphPad Prism<sup>®</sup> 4.03 (GraphPad Software, Inc.) abil, kasutades mittelineaarsete vähimruutude meetodit. Katsed tehti duplikaatides või triplikaatides, tulemused on esitatud kujul: keskmine  $\pm$  SEM.

Käitumiskatsete ja HPLC analüüside tulemused töödeldi programmiga Statview for Windows (SAS Institute Inc., USA), kasutades ANOVA't (*analysis of variance*). *Post hoc* testid tehti, kasutades Fisher'i PLSD testi.

## TULEMUSED JA ARUTELU

### $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ väljatõrjumisanalüüsi optimeerimine ja oluliste parameetrite valik

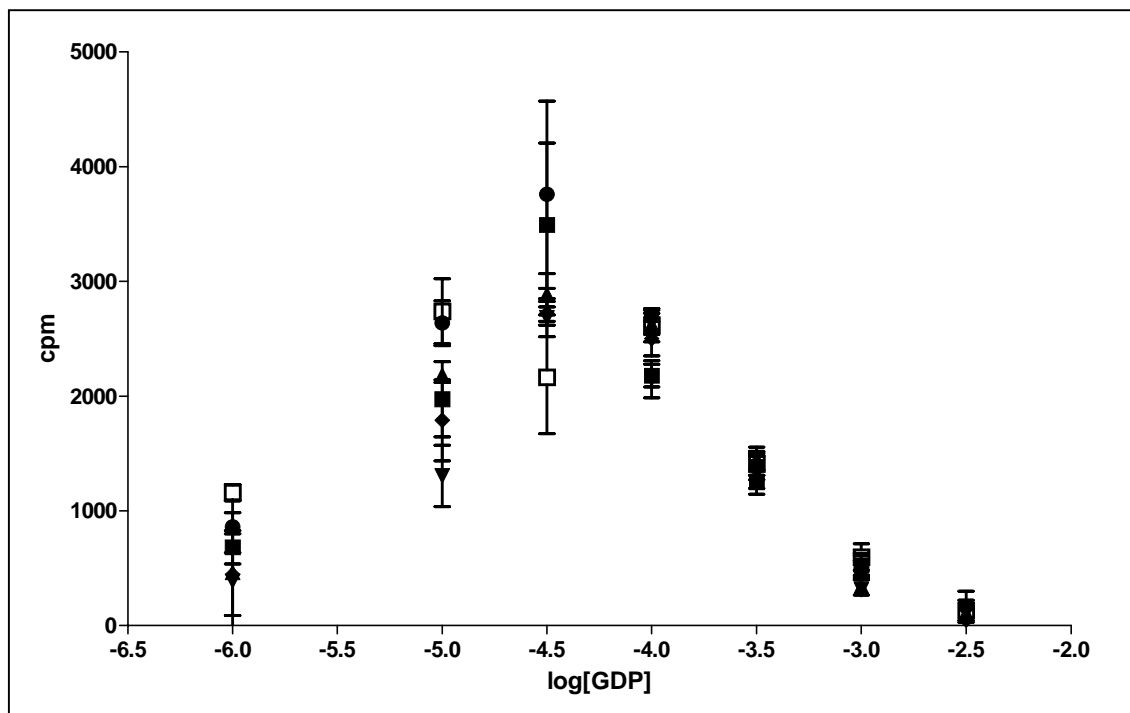
Dopamiini  $D_2$  retseptorite aktiveerimine roti aju striatumis viis GDP afiinsuse vähenemisele, mis  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  väljatõrjumisel GDP-ga väljendus väljatõrjumiskõvera nihkumisena paremale (Joonis 1). See omakorda tähendab, et samal GDP kontsentratsioonil seostus dopamiini kui agonisti juuresolekul G-valgule rohkem  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  kui butaklamooli (antagonisti) juuresolekul. Vahet dopamiini ja butaklamooli juuresolekul G-valgule seostunud  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  määrade vahel on edaspidi lühendatult nimetatud DA efektiks  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumisele. Vahet GDP afiinsuste vahel (korreksemalt  $\log[\text{IC}_{50}]$  vahel) dopamiini ja butaklamooli juuresolekul on nimetatud vastavalt DA efektiks GDP afiinsusele. Nimetatud parameetrid on Joonisel 1 tähistatud vastavalt 1) ja 2)-ga.



Joonis 1. Agonisti juuresolekul aset leidvat GDP afiinsuse muutust iseloomustavad parameetrid: DA efekt  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumisele (1) ning GDP afiinsusele (2).

Varem on meie uurimisrühma poolt näidatud, et retseptorite aktivatsioon ei mõjuta GTP $\gamma$ S enda võimet konkureerida [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-ga G-valgule, mis tähendab, et GTP $\gamma$ S (ega ilmselt siis ka mitte [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S) afiinsus ei sõltu retseptori aktivatsioonist. See on sellise katseformaadi juures, kus kasutatakse [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S väljatõrjumist GDP poolt, hädavajalik tingimus, sest andmeid kus *nii* GDP kui ka [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S afiinsus sõltuks retseptor-G-valk aktivatsioonist, oleks raske analüüsida ning tulemustel puuduks mõtekas sisu.

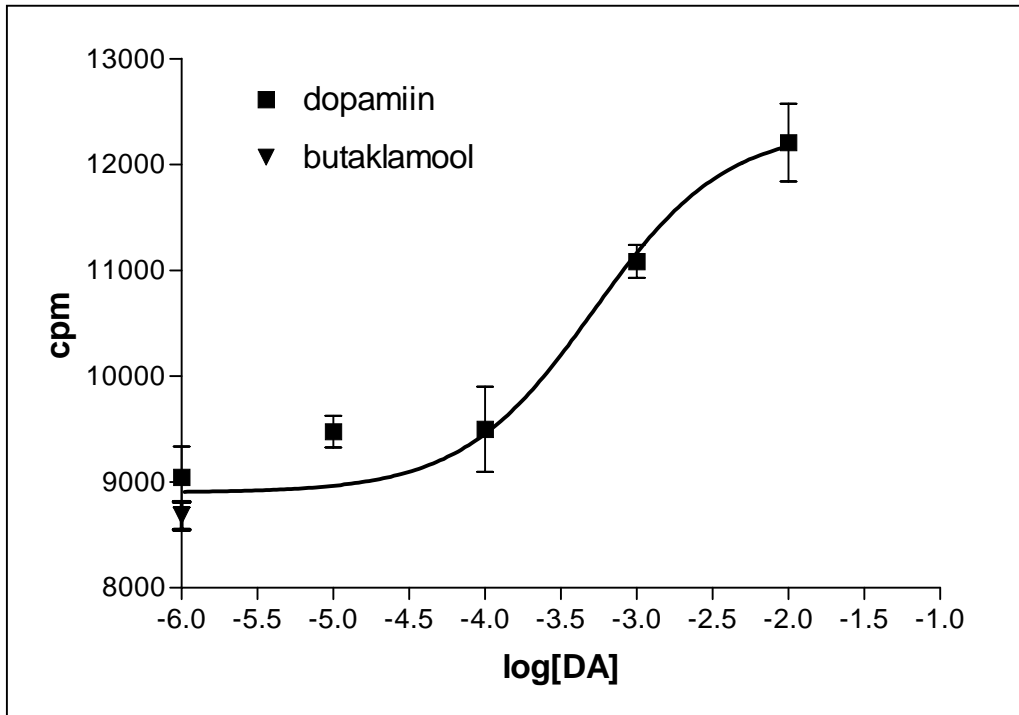
Jooniselt 1 on näha, et DA efekt GDP afiinsusele ja sellega [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S sidumisele sõltub GDP kontsentratsioonist. Mõõdetuist kirjeldamiseks sobivaim vahe dopamiini ja butaklamooli juuresolekul aset leidva [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S sidumise määrade vahel striatumis avaldus reprodutseeruvalt 100  $\mu$ M GDP kontsentratsioonil (Joonis 2). Kuigi mõne roti striatumis oli DA efekt [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S sidumisele suurim 32  $\mu$ M GDP kontsentratsioonil, oli 100  $\mu$ M GDP kontsentratsiooni korral andmed ühtlasemad. Naalduvas tuumas saadi kõige konsistentsem efekt 32  $\mu$ M GDP kontsentratsioonil (graafikut pole toodud).



Joonis 2. Dopamiini mõju [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S sidumisele striatumis erinevatel GDP kontsentratsioonidel 6 erineva roti aju jaoks. Graafik on representatiivne näide striatumis saadud tulemustest.



32  $\mu\text{M}$  GDP juuresolekul kontrolliti roti aju striatumis dopamiini poolt vahendatud [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  sidumise aktivatsiooni ning saadi sigmoidne kontsentratsioon-vastus kõver, kus  $\text{pEC}_{50}$  oli  $3.28 \pm 0.22$ , 1  $\mu\text{M}$  butaklamoolist põhjustatud [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  sidumine jäi baastasemele (Joonis 3). Edaspidisteks [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  väljatõrjumise katseteks GDP-ga leiti 1 mM dopamiini kontsentratsioon [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  sidumise aktiveerijana olevat sobiv.



Joonis 3. Dopamiini poolt aktiveeritud [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  sidumine roti aju striatumi membraanidele.

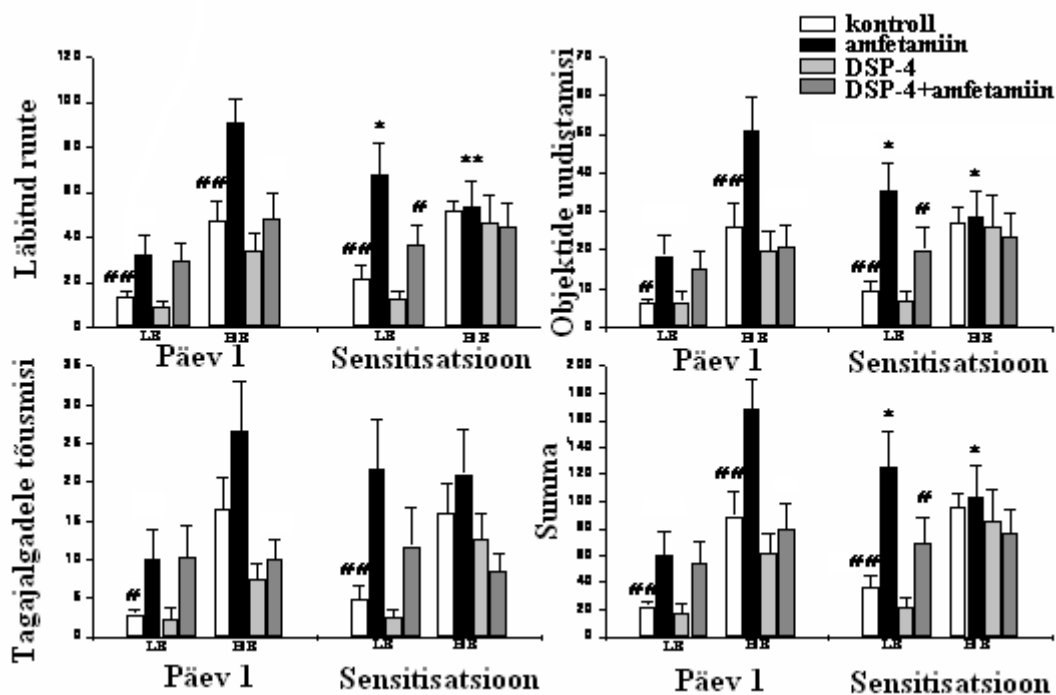
Eespoolarutletu järgi võeti käitumiskatsete juurde tehtud  $\text{D}_2$  retseptor-G-valk signaaliülekanne iseloomustamiseks kasutusele järgmised parameetrid:

1) 1 mM DA efekt [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  sidumisele 100/32  $\mu\text{M}$  GDP juuresolekul ning 2) 1 mM DA efekt GDP afiinsusele. Neid parameetreid kasutati kõikide käitumiskatsete juurde tehtud retseptoroloogiliste katsete tulemuste esitamisel, kusjuures mõningates uuringutes toodi eraldi välja lihtsalt GDP afiinsus 1 mM DA juuresolekul ja 1  $\mu\text{M}$  butaklamooli juuresolekul.

## DSP-4 ja/või amfetamiini mõju rottide käitumisele ning D<sub>2</sub> retseptor-G-alk signaali ülekandele

### Tulemused

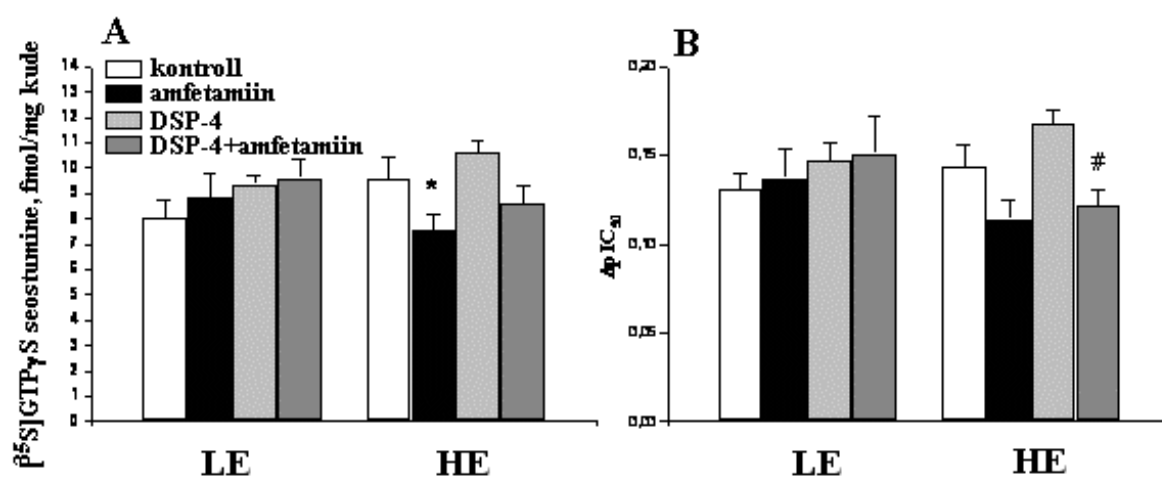
Uudiskasti testis ilmnesid selged erinevused rottide uudistamisaktiivsuse vahel ning baseerudes teise päeva testide tulemusele jagati rotid kõrge ning madala uudistamisaktiivsusega (HE ja LE vastavalt) loomadeks. DSP-4 efekt loomade lokomotoorsele aktiivsusele praktiliselt puudus. Amfetamiin stimuleeris lokomotoorset aktiivsust nii HE kui LE loomadel, kuid LE loomadel oli see efekt täheldatav vaid esimesel katsepäeval ja polnud mõjutatud LC (*locus coeruleus*) osalisest denervatsioonist DSP-4-ga, samas HE rottidel DSP-4 eeltötlus blokeeris amfetamiinist indutseeritud lokomotoorse aktiivsuse tõusu (Joonis 4). Amfetamiinisensitisatsioon tekkis vaid LE grupi loomadel, kellele polnud DSP-4 manustatud.



Joonis 4. Amfetamiini või/ja DSP-4 mõju rottide lokomotoorsele aktiivsusele. \*,\*\* p<0.05, 0.01 vs aktiivsus Päeval 1; #,## p<0.05, 0.01 vs vastav amfetamiini grupp. [88]

DSP-4 töötlus vähendas oluliselt noradrenaliini (NA) sisaldust nii LE kui HE loomade frontaalkoores, vähenes ka DA sisaldus ja HVA ning DOPAC-i sisaldus frontaalkoores. Samuti ilmnis amfetamiini saanud HE loomadel tendents NA vähenemisele frontaalkoores. LE loomadel põhjustas amfetamiin DA taseme tõusu striatumis, kuna aga DOPAC-i sisaldus jäi samaks, langes DOPAC/DA suhe. Üldiselt oli DA sisaldus LE loomade striatumis suurem kui HE loomadel.

100  $\mu$ M GDP kontsentratsioonil ilmnis, et DA efekt [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S sidumisele oli oluliselt väiksem HE amfetamiini grupis, võrrelduna HE kontrolliga ( $p < 0.05$ , Aktiivsus x Amfetamiin interaktsioon). Samuti vähenes DA efekt GDP pIC $_{50}$ -le DSP-4 eeltöödeldud HE loomade grupis, kes said amfetamiini, võrreldas lihtsalt HE DSP-4 grupiga ( $p < 0.05$ , Aktiivsus x Amfetamiin interaktsioon). Üleüldiselt oligi täheldatav, et amfetamiin vähendas just HE loomadel D $_2$ -G-alk omavahelise signaliseerimise efektiivsust, sõltumata sellest, kas võrreldi lahusti/amfetamiin või toksiin/toksiin+amfetamiin gruppe (Joonis 5).



Joonis 5. Amfetamiini või/ja DSP-4 mõju roti aju striatumis D $_2$  retseptor G-alk ülekande tundlikkusele. \*  $p < 0.05$  vs vastav HE kontrollgrupp; #  $p < 0.05$  vs vastav HE+DSP-4 grupp. [88]

### Arutelu

DA-ergilise süsteemi seisukohalt ilmnis ainus oluline erinevus HE ja LE loomade vahel koe monoamiinide tasemel selles, et LE loomadel oli striatumis DA tase kõrgem kui HE loomadel. See aga ei pruugi üldse viidata sellele, nagu oleks DA-ergiline aktiivsus LE loomadel striatumis kõrgem. Vaadates ühe DA põhilise metaboliidi DOPAC-i sisaldust, mis

ei erine HE ja LE loomadel striatumis, võib järeldada, et DOPAC/DA suhe LE loomadel on palju väiksem kui HE loomadel, see omakorda võib signaaliseerida hoopis väiksemast DA-ergilisest aktiivsusest selles piirkonnas. Seetõttu võib ka LE-loomade motoorne vastus amfetamiini manustamisele olla väiksem kui HE loomadel. Samas on näha, et amfetamiinigrupi LE loomadel on striatumis DA tase veelgi tõusnud, see tähendab, et potentsiaalselt vabastatava dopamiini hulk on suurem. Amfetamiin psühhomotoorse stimulantina blokeerib dopamiini transporteri (DAT), mistõttu manustamissessioonide käigus võib adaptiivse mehhanismina tekkida DAT üleregulatsioon, ning kui sessioonile järgneb abstinentsiperiood, mille käigus amfetamiini ei manustata, võib DAT tihedus vastusena sellele langeda, mida on ka näidatud DAT funktsiooni uuringutes kokaiini ja amfetamiini manustamisel [89]. Kui aga sensitiseerimiskatses uuesti manustada amfetamiini, on DAT alaregulatsiooni tõttu tagasihaaratav DA hulk veelgi väiksem ning sünaptilises pilus on kontsentratsioon vastavalt jällegi suurem, milline fenomen võibki selgitada käitumuslikku sensitiseerimist kui kõrgeks tõusnud lokomotoorset vastust pärast abstinentsiperioodi manustatud stimulantidele.

Samas HE loomadel funktsioneerivad need mehhanismid sõltuvalt (arvatavasti) geneetilisest eripärast pisut teisiti ning väljenduvad pigem  $D_2$  dopamiini retseptorite ning nendega seostuvate G-valkude omavahelise signaaliseerimise muutustes. Mis ei välista fakti, et mingid muutused võivad toimuda ka LE loomade  $D_2$ -retseptorite signaaliülekanne reguleerimises, kuid summaarselt jäävad viimased väiksemaks või kompenseeruvad vastandlike protsesside (amfetamiini manustamine-ärajätmise) toimel.

On näha, et HE loomadel toimub amfetamiini manustamisel (sõltumata sellest, kas nad on DSP-4-ga eeltöödeldud või mitte)  $D_2$ -retseptorite ning G-valkude vahelise signaaliseerimise desensitiseerimine, mis väljendub DA efekti vähenemises kas siis  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumisele või GDP afiinsusele. See tähendab, et dopamiini juuresolekul on GDP afiinsuse vähenemine väiksem kui kontrollgrupil, teisisõnu: GDP vahetatakse G-valgu  $\alpha$ -alaühikul GTP vastu välja väiksema intensiivsusega. Kas selle taga võib olla  $D_2$ -retseptorite tiheduse kasv,  $G_i$ -valkude hulga vähenemine (mõningates uuringutes on leitud, et näiteks kokaiini manustamisel  $G_i$  valkude hulk mesolimbilise DA-süsteemi regioonides väheneb [90]) või mõni muu mehhanism, tuleks selgitada edaspidistel uuringutel. Igatahes võib selline vähenenud  $D_2$  retseptorite-G-valkude vaheline tundlikkus selgitada, miks HE loomadel puudus amfetamiinisensitiseerimine. Võib oletada, et kui HE loomadel ka toimuks sarnane muutus DAT tiheduses abstinentsiperioodil kui LE loomadel, siis amfetamiini uuesti

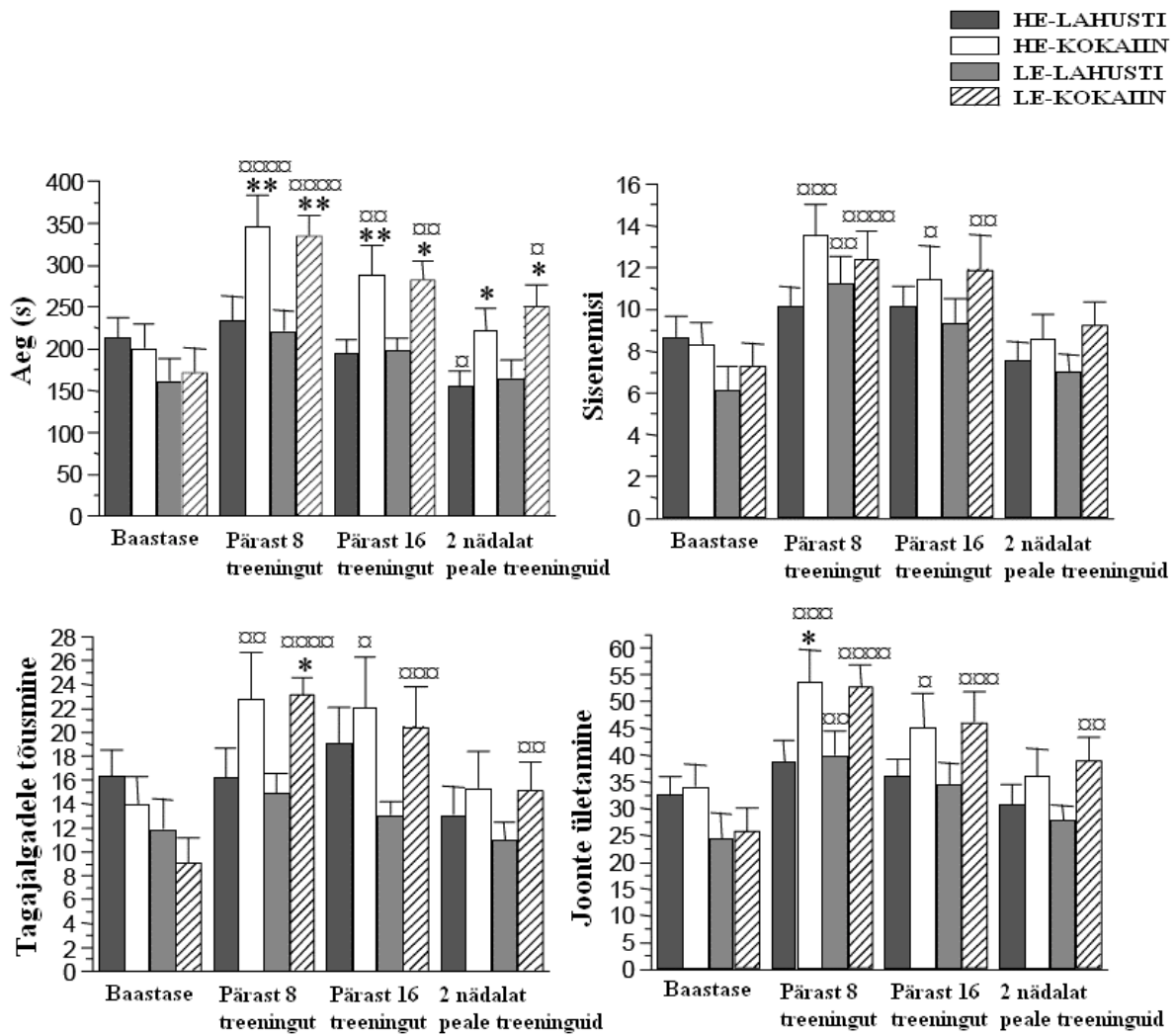
manustamisel oleks DA kontsentratsioon sünaptilises pilus küll suurem seoses vähenenud DAT arvuga, kuid D<sub>2</sub> retseptor-G-alk ülekande desensitiseerumine kompenseeriks selle.

## **Kokaiini mõju rottide käitumisele ning D<sub>2</sub> retseptor-G-alk signaali ülekandele**

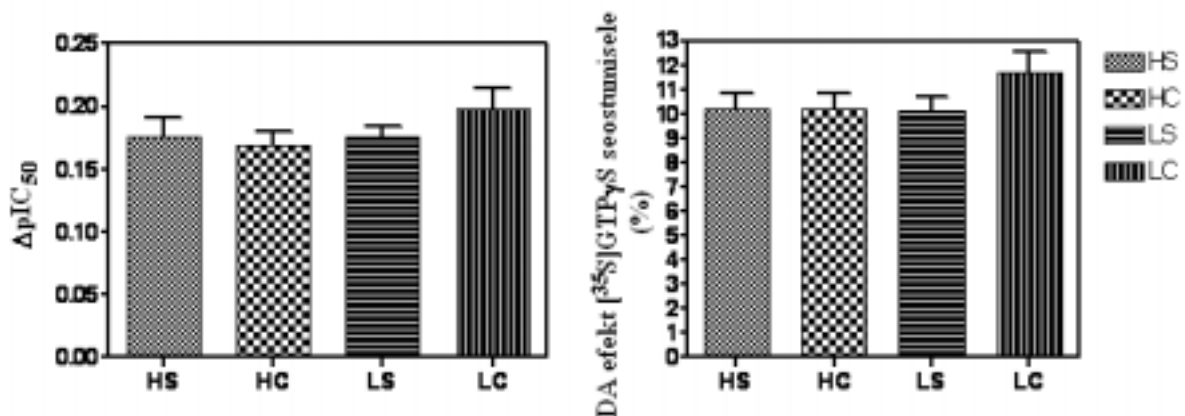
### *Tulemused*

Sarnaselt eelmise uudistava käitumise testiga jagunesid ka selles katses loomad selgelt kõrgelt ja madalalt uudistavateks (HE ja LE), kusjuures lokomotoorne aktiivsus uudiskasti testis teisel päeval oli suhteliselt hea ennustaja sellele, kuidas käitumist loomad CPP puuri valges kambris samuti teisel katsepäeval (valitud baastasemeks), kui neil lasti valida vabalt kambrite (hall ja valge) vahel. Enne kokaiini manutamist polnud HE ja LE loomadel mingit vahet ajas, mis nad veetsid valges kambris, küll aga olid HE loomad testis lokomotoorselt aktiivsemad. Kumbki grupp eelistas halli kambrist valgele. Pärast 8 tingimiskatset kujunes nii HE kui LE loomadel, kellel kokaiinisüst oli seostatud valge kambriga, välja paigaeelistus valge kambri suhtes, mis ei erinenud oma ulatuselt HE ja LE gruppide vahel ning oli mõlema grupi puhul üle baastaseme ning üle kontrollgrupi taseme, võttes aluseks valges kambris veedetud aja. Samuti ilmnes kokaiinigruppide (nii HE kui LE) rottidel tendents olla lokomotoorselt aktiivsemad (Joonis 6). Käitumuslikku sensitiseerumist välja ei kujunenud – ei avarväljal ega valges kambris (joonist pole välja toodud). Samuti ei erinenud DA, DOPAC ning HVA sisaldus kokaiinitöötusega HE ja LE loomadel vastavatest kontrollgrupi loomadest.

Retseptoroloogilistest katsetest ei ilmnunud olulisi erinevusi 1) HE ja LE loomade vahel aktiivsusest lähtudes ning 2) kokaiinigrupi ja kontrollgrupi vahel töötusest lähtudes kummaski eelmise alapunkti all ära toodud parameetris: DA efektis [<sup>35</sup>S]GTPγS sidumisele ja DA efektis GDP afiinsusele (Joonis 7).



Joonis 6. Valges kambris veedetud aeg ja lokomotoorsed karakteristikud. \*,\*\*  $p < 0.05$ ,  $0.01$  vs vastav kontrollgrupp; α, αα, ααα, αααα  $p < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ,  $0.0001$  vs baastase. [91]



Joonis 7. Kokaiini mõju HE ja LE loomade striatumis  $D_2$  retseptor-G-valk interaktsiooni tundlikkusele. HS – HE lahusti loomad; HC – HE kokaiini grupi loomad; LS – LE lahusti loomad; LC – LE kokaiini grupi loomad.

## Arutelu

Võrreldes baastasemega ilmutasid HE grupi loomad ühekordsele kokaiiniannusele vastuseks suuremat lokomotoorset aktiivsust kui LE loomad. Samas aga paigaeelistus kujunes mõlemal grupil välja sarnase magnituudiga ning kummaski grupis puudus käitumuslik sensitiseerimine. On huvitav märkida, et antud juhul puudus ka HE-grupis stimulandist tingitud  $D_2$  retseptor-G-valk *desensitiseerimine*. HE grupi suurem tundlikkus psühhostimulandile sarnaneb eelmises punktis käsitletud käitumiskatse tulemustega, samas erinevalt eelmisest ei kujunenud siin LE-loomad väljakuuluvat käitumuslikku sensitiseerimist. Stimulandi korduv manustamine ei mõjutanud ka DA sisaldust striatumis (nagu amfetamiini korduvmanustamisel juhtus), kui võrrelda LE ja HE loomi. See kõik viitab asjaolule, et erinevused rottide käitumuslikus vastuses erinevatele psühhostimulantidele johtuvad erinevustest DA-ergilise süsteemi funktsioneerimises.

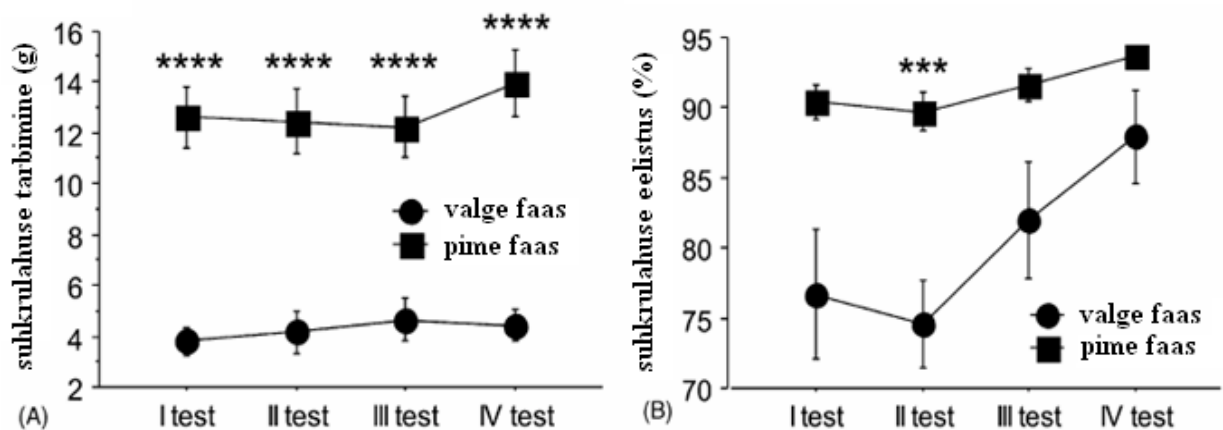
Juba eelnevalt on mainitud, et kokaiin ja amfetamiin erinevad mõneti oma farmakoloogiliselt profiililt. Amfetamiin omab umbes 3 korda kõrgemat afiinsust DATi suhtes kui kokaiin [92], samuti transporditakse ta DAT abiga tsütoplasmasse ning ta võib asendada dopamiini sünaptilistes põiekestes. See omakorda viitab, et amfetamiini mõju dopamiini vabanemisele mesolimbilises DA-ergilises süsteemis on intensiivsem. Selline suurema intensiivsusega dopamiini vabanemine on tegelikult osaliselt näidatud ka käesoleva kahe käitumiskatse juures tehtud *in vivo* mikrodialüüsil, kus amfetamiin põhjustas striatumis mõnevõrra suurema hulga DA vabanemise kui kokaiin, kusjuures amfetamiini manustamisel erinesid HE ja LE loomad DA vabanemise amplituudilt, mis oli kõrgem HE loomadel. Sellise intensiivsema DA "laine" löögi alla satuvad postsünaptilised  $D_1$  ja  $D_2$  retseptorid (ka  $D_3$  ja  $D_4$ , kuid nende ekspressioonitihedus selles piirkonnas on tunduvalt väiksem, eriti  $D_3$  retseptoritel dorsaalse striatumi piirkonnas). Kuna ühekordsel stimulandi manustamisel näitavad HE loomad üles suuremat tundlikkust, võib oletada, et nende DA-ergiline süsteem on samuti tundlikum, mis võib olla vahendatud ka dopamiinergiliste retseptorite signaaliseerimise poolt (kuigi kontrollgruppide puhul ei ilmnenud statistiliselt olulist erinevust HE ja LE loomade vahel DA efekti GDP afiinsusele). Seega vastuseks suuremale DA-ergilisele stimulatsioonile võib adaptiivse mehhanismina retseptor-G-valk ülekande desensitiseeruda. Ilmselt pole kokaiini mõju nii tugev, et taolist desensitiseerimist esile kutsuda. Samuti ei blokeeri kokaiin dopamiini transportereid nii suure afiinsusega (ja ehk ka DAT üle- ning alaregulatsioon pole nii suure ulatusega), seega võib oletada, et eelmise punkti alla välja toodud käitumusliku sensitiseerimise olenevus dopamiini transporteri funktsioonist ei oma siinkohal nii suurt kaalu.

Samas aga võib käitumusliku sensitiseerimise puudumist seletada ka erinevustega kokaiini manustamises, nimelt on näidatud, et kui hiirtele manustada kokaiini *üle päeva* (nagu ka käesolevas uuringus tehtud), vaheldumisi lahustiga, siis kontekstuaalset käitumuslikku sensitiseerimist ei teki, samal ajal kui tingitud vastus (käesolevas uuringus siis paigaeelistus) kujuneb ikka välja [93].

## Rottide suhkrulahuse tarbimise seosed D<sub>2</sub> retseptor-G-valk signaali ülekande efektiivsusega

### Tulemused

Kõigis testides eelistasid rotid suhkrulahust veele, kusjuures valges faasis oli keskmine eelistus 81% ning pimedas faasis 90%. Absoluutne suhkrulahuse tarbimine (grammides) oli pimedas faasis aga oluliselt kõrgem kui valges faasis (Joonis 8). Individuaalsel tasemel oli suhkrulahuse tarbimine väga stabiilne näitaja.

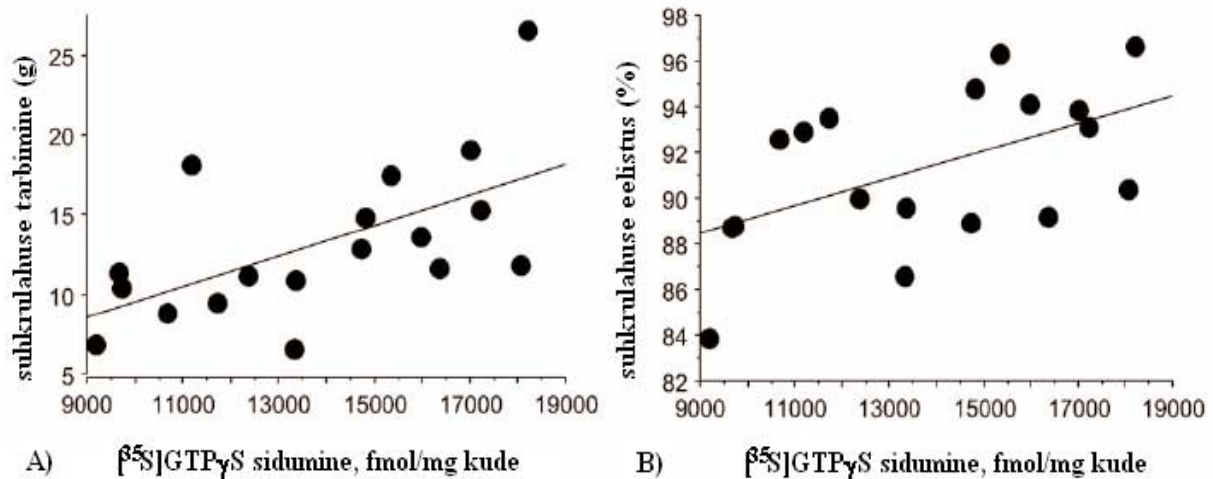


Joonis 8. Suhkrulahuse tarbimine (A) ja eelistus (B) valges ja pimedas faasis. \*\*\*  $p < 0.001$  vs valge faas; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs valge faas. [94]

Naalduvas tuumas ilmnes positiivne korrelatsioon keskmise pimedas faasis tarbitud suhkrulahuse koguse ning GDP afiinsuse ( $IC_{50}$ ) vahel dopamiini poolt aktiveeritud DA retseptor-G-valk kompleksile. Keskmine pimedas faasis tarbitud suhkrulahuse kogus korreleerus sarnaselt ka [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S sidumisega dopamiini poolt aktiveeritud retseptor-G-valk kompleksile 32  $\mu$ M GDP juuresolekul ning viimase näitajaga korreleerus ka keskmine pimedas faasi suhkrulahuse eelistus (Joonis 9). Valges faasis nimetatud korrelatsioonid puudusid ning



kui suhkrulahuse tarbimine arvatati ümber roti kaalu kohta, jäid seosed põhimõtteliselt samaks.



Joonis 9. Korrelatsioon keskmise pimedas faasis tarbitud suhkrulahuse (A) või eelistuse (B) ning dopamiinist tingitud  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  sidumise vahel G-valgule naalduvas tuumas. [94]

### Arutelu

Antud uuring demonstreeris, et suhkrulahuse tarbimine on individuaalselt stabiilne seadumus, mis ilmneb eriti selgelt pimedas faasis ning on iseloomustatud ka retseptoroloogiliste markeritega nagu  $\text{D}_2$  retseptorite signaaliülekanne naalduvas tuumas. On loogiline, et ööloomade individuaalsed iseärasused tulevad eriti selgelt välja nende jaoks aktiivsel – pimedal perioodil. Tuleb aga rõhutada, et suhkrulahuse tarbimine ning eelistus ei pruugi olla käitumuslikult ega retseptoroloogiliselt samad fenomenid. Kui absoluutne suhkrulahuse tarbimine sõltub tõepoolest ainult suhkrulahusest ja isendist, kes seda tarbib, siis suhkrulahuse *eelistus* on esitatud kui tarbitud suhkrulahuse suhe kogu tarbitud vedelikku, mis sisaldab ka vee hulka. Vee tarbimine omakorda on kindlasti mõjutatud mõnevõrra teistest füsioloogilistest teguritest kui suhkrulahuse tarbimine. Niisiis: esiteks stabiilsem käitumusliku seadumuse marker on suhkrulahuse tarbimine ning teiseks võivad erinevused *tarbimise* ja *eelistuse* vahel ilmned ka dopamiini retseptorite biokeemias.

Naalduvas tuumas leiti korrelatsioon suhkrulahuse tarbimise (öösel) ja GDP afiinsuse vahel (kui  $\text{IC}_{50}$  kasvab, siis afiinsus läheb halvemaks, järelikult rohkem suhkrulahust tarbinud isenditel oli DA juuresolekul GDP seostumine G-valgule nõrgem) G-valgu  $\alpha$ -alaühikule

dopamiini juuresolekul, kuid *mitte* butaklamooli juuresolekul. See viitab, et antud korrelatsioon on seotud pigem suurema dopamiinergiliste retseptorite mõjuga G-valgule, mis siis peegeldub suuremas GDP afiinsuse vähenemises. Suuremat dopamiinist tingitud G-valgu aktivatsiooni peegeldab ka positiivne korrelatsioon suhkrulahuse tarbimise ja eelistuse ning dopamiini juuresolekul aset leidva [<sup>35</sup>S]GTPγS seostumise vahel. Niisiis võib oletada, et rohkem suhkrut tarbivatel isenditel on suurema tundlikkusega dopamiinergiline süsteem (ka teiste virgatsainete tasemel), mis sarnaneb mõneti eelmises kahes uuringus esinenud HE loomade suurema dopamiinergilise tundlikkusega stimulantidele. Siiski mõõdeti seal *reaktsiooni* psühhostimulantidele, antud juhul aga omaalgatuslikku *lähenemist* ja *tarbimiskäitumist*.

On usutav, et kõigis kolmes [<sup>35</sup>S]GTPγS seostumise uuringus on mõõdetud eeskätt G<sub>i</sub> tüüpi G-valkude signaali, kuna teiste DA-ergiliste retseptoritega seotud G-valgud (G<sub>s</sub>,G<sub>olf</sub>) omavad võrreldes esimestega palju madalamat signaali, mis sageli ei eristugi G<sub>i</sub>-valkude konstitutsionaalsest aktiivsusest põhjustatud taustamürast [6]. G<sub>i</sub> tüüpi G-valkudega seostuvad eeskätt D2-tüüpi dopamiini retseptorid [17]. Dorsaalses striatumis, mida on uuritud esimese kahe uuringu juures tehtud retseptoroloogilistes katsetes, on dopamiinergiline stimulatsioon, mõõdetuna [<sup>35</sup>S]GTPγS seostumise kaudu, vahendatud eelkõige D<sub>2</sub> retseptorite poolt [87]. Naalduvas tuumas, mis oli objektiks viimases uuringus, on aga rohkem ka D<sub>3</sub> retseptoreid, mistõttu seal võib olla signaal vahendatud mõlema retseptori koostöös. D<sub>4</sub> retseptoreid leidub selles piirkonnas aga vähe [17].

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli uurida erinevate psühhomotoorsete stimulantide (amfetamiin, kokaiin) mõju dopamiin  $D_2$ -ergilisele signaaliülekandele ning loodusliku sarrustaja (suhkrulahus) tarbimise seost antud signaalrajaga, samuti muutusi nimetatud süsteemis *locus coeruleus*'est lähtuvate noradrenergiliste sisendite denerveerimise (toksiin DSP-4-ga) tagajärjel. Aju substraatideks olid striatum ja naalduv tuum.

Iseloomustati  $D_2$  retseptorite interakteerumist G-valkudega, kusjuures selle interaktsiooni tundlikkust iseloomustati GDP afiinsuse (korrektsemalt  $IC_{50}$ ) muutusega G-valgu  $\alpha$ -alaühikule agonisti (dopamiin) juuresolekul võrreldes afiinsusega antagonisti poolt deaktiveeritud retseptor-G-valk kompleksile.

Leiti, et amfetamiin põhjustab kõrge uudistamisaktiivsusega rottidel dorsaalses striatumis  $D_2$  retseptor-G-valk ülekande desensitiseerumise, samas kui kokaiin seda ei tee. Erinevus võib tuleneda amfetamiini ja kokaiini mõneta erinevatest farmakoloogilistest profiilidest, aga ka erinevustest stimulantide manustamise paradigmas.

Samuti ilmnes positiivne korrelatsioon rottide suhkrulahuse tarbimise ning [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S sidumise ja GDP afiinsuse vahel dopamiini poolt aktiveeritud retseptor-G-valk kompleksile naalduvas tuumas.

Tulemused näitavad, et erinevatel sarrustajatel – kunstlikel ning looduslikel – on omadus mõjutada roti aju mesolimbilise DA-ergilise süsteemi komponente, nagu näiteks  $D_2$  retseptorid ning nende signaaliülekanne läbi G-valkude.

## SUMMARY

The aim of this study was to investigate changes in the rat brain mesolimbic dopaminergic signaling after administration of psychomotor stimulants (amphetamine, cocaine) or natural reinforcer (sucrose solution). Influence of noradrenergic input on this dopamine system was also studied, using partial (from *locus coeruleus* originating) noradrenergic denervation with selective neurotoxin DSP-4. Neuroanatomical substrates of brain were striatum and nucleus accumbens.

The interaction of D<sub>2</sub> receptors with G-proteins was characterized by measurement of the influence of receptors activation on the ability of GDP to compete with [<sup>35</sup>S]GTPγS binding to G-protein α-subunits in the membrane preparation. The receptors were activated with the agonist dopamine and blocked with the antagonist butaclamol.

It was found that amphetamine desensitized the D<sub>2</sub> receptor-G-protein coupling in striatums of rats with high exploratory activity, but cocaine did not. These differences may be connected with different pharmacological profiles of amphetamine and cocaine, but also with differences in administration regimes of stimulants.

A clear correlation between sucrose consumption (in dark phase) and [<sup>35</sup>S]GTPγS binding/GDP affinity to dopamine-activated receptor-G-protein complex also appeared in rat nucleus accumbens.

These results together show that different reinforcers (natural and non-natural) have ability to influence the components of rat brain mesolimbic dopaminergic system, for example dopamine D<sub>2</sub> receptor signaling through G-proteins, but the mechanisms of these influences has remained to be found.

## TÄNUAVALDUSED

Kõigepealt tahaksin tänada oma juhendajaid, kellela selle töö valmimine poleks üldse võimalik olnud – Ago Rinckenit ja Jaanus Harrot.

Väga suured ja soojad tänuavaldused lähevad TÜ Orgaanilise ja Bioorgaanilise Keemia Instituudi bioorgaanikutele, eriliselt tahaksin ära mainida Ain Uustaret, kes alati on nõus olnud oma teadmisi biokeemiast ja asjalikke nõuandeid jagama; Raili Remmelit, Reet Reinartit ja Vladimir Stepanovit, kes on samuti olnud kõigiti abiks – nii konkreetsete probleemide lahendamisel kui lihtsalt rõõmsa ja toreda töökeskkonna loomisel.

Ääretult hea meel on koostöö üle TÜ Sotsiaalteaduskonna psühhofüsioloogia teadusgrupiga, suured tänud Aet Alttoale, Kadri Kõivule, Marika Ellerile ja Margus Tõnissaarele, kelle väärtuslikke teadmisi ja nõuandeid selles töös väga palju kasutatud on.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Molinoff, P. B. *Basic Neurochemistry*, 5<sup>th</sup> Ed. New York, Raven Press, 1994.
2. Feldman, R. S., Meyer, J. S., Quenzer, L. F. *Principles of Neuropsychopharmacology*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc., 1997.
3. Kenakin, T. *A Pharmacology Primer*. Elsevier Academic Press, 2004.
4. Kenakin, T. Inverse, protean and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *The FASEB Journal*, 2001, 15, 598-611.
5. Kenakin, T. Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003, 24, 436-354.
6. Milligan, G. Principles: Extending the utility of [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assays. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003, 24, 2, 87-90.
7. Neubig, R. R. Specificity of Receptor-G Protein Coupling: Protein Structure and Cellular Determinants. *Seminars in Neuroscience*, 1998, 9, 189-197.
8. Harrison, C., Traynor, J. R. The [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sciences*, 2003, 74, 489-508.
9. Weng, G., Jordan, J. D., Chen, Y. Structural Basis for the Function of the Heterotrimeric G-Proteins. *Seminars in Neuroscience*, 1998, 9, 175-188.
10. Brzostowski, J., Kimmel, A. R. Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26, 5, 291-297.
11. Kristiansen, K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 2004, 103, 21-80.
12. Alexander, S. P. H., Mathie, A., Peters, J. A. 7 TM Receptors. *British Journal of Pharmacology*, 2004, 141, S5-S60.
13. Humphrey, P. P., Barnard, E. A. International Union of Pharmacology. XIX. The IUPHAR receptor code: a proposal for an alphanumeric classification system. *Pharmacological Reviews*, 1998, 50, 271-277.
14. Rebois, R. V., Allen, B. G., Hébert, T. E. The targetable G protein proteome: where is the next generation of drug targets? *Drug Discovery Today*, 2004, 3, 104-111.
15. Canals, M., Burgueño, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E. I., Mallol, J., Agnati, L., Ferré, S., Bouvier, M., Fuxe, K., Ciruela, F., Lluís, C., Franco, R.

Homodimerization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *Journal of Neurochemistry*, 2004, 88, 726-734.

16. Milligan, G., White, J. H. Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2001, 22, 513-518.

17. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 1998, 78, 189-225.

18. Bjorklund, A., Lindvall, O. *Dopamine-Containing Systems in the CNS*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier Science Publishers, 1984.

19. Swanson, L. W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*, 1982, 9, 321-353.

20. Mahan, L. C., Burch, R. M., Monsma, F. J. Jr., Sibley, D. R. Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca<sup>2+</sup> mobilization in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1990, 87, 2196-2200.

21. Bertorello, A., Hopfield, J., Aperia, A., Greengard, P. Inhibition by dopamine of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in neostriatal neurons through D1 and D2 receptor synergism. *Nature*, 1990, 347, 386-388.

22. Sidhu, A., Niznik, H. B. Coupling of dopamine receptor subtypes to multiple and diverse G proteins. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2000, 18, 669-677.

23. Yung, K. K. L., Bolam, J. P., Smith, A. D., Hersch, S. M., Ciliax, B. J., Levey, A. I. Immunocytochemical localization of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience*, 1995, 65, 709-730.

24. He, L., Di Monte, D. A., Langston, J. W., Quik, M. Autoradiographic analysis of dopamine receptor-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in rat striatum. *Brain Research*, 2000, 885, 133-136.

25. Hervé, D., Le Moine, C., Corvol, J.-C., Belluscio, L., Ledent, C., Fienberg, A. A., Jaber, M., Studler, J.-M., Girault, J.-A. Gαolf Levels Are Regulated by Receptor Usage and Control Dopamine and Adenosine Action in Striatum. *The Journal of Neuroscience*, 2001, 21, 4390-4399.

26. Khan, Z. U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., de la Calle, A., Goldman-Rakic, P. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1998, 95, 7731-7736.

27. Staley, J. K., Basile, M., Flynn, D. D., Mash, D. C. Visualizing Dopamine and Serotonin Transporters in the Human Brain with the Potent Cocaine Analogue [<sup>125</sup>I]RTI-55: In Vitro Binding and Autoradiographic Characterization. *Journal of Neurochemistry*, 1994, 62, 549-556.
28. Spanagel, R., Weiss, F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends in Neurosciences*, 1999, 22, 521-527.
29. Kauer, J. A. Learning Mechanisms in Addiction: Synaptic Plasticity in the Ventral Tegmental Area as a Result of Exposure to Drugs of Abuse. *Annual Review of Physiology*, 2004, 66, 447-475.
30. Rebec, G. V., Grabner, C. P., Johnson, M., Pierce, R. C., Bardo, M. T. Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience*, 1997, 76, 707-714.
31. Panksepp, J. *Affective neuroscience : the foundations of human and animal emotions*. New York, Oxford University Press, 1998.
32. Grace, A. A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction*, 2000, 95, S119-S128.
33. DiChiara, G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioral Brain Research*, 2002, 137, 75-114.
34. Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M. A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V., Lecca, D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 2004, 47, S227-S241.
35. Gerfen, C. R., Wilson, C. J. The basal ganglia. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Integrated Systems of the CNS*. Amsterdam, Elsevier Science, 1996, 371-467.
36. Le Moine, C., Bloch, B. D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor gene expression in rat striatum: Sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *Journal of Comparative Neurology*, 1995, 355, 418-426.
37. Jarvis, M. F., Williams, M. Direct autoradiographic localization of adenosine A<sub>2</sub> receptors in the rat brain using the A<sub>2</sub>-selective agonist, [<sup>3</sup>H]CGS21680. *European Journal of Pharmacology*, 1989, 168, 243-246.
38. Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casadó, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M. E., Mallol, J., Canela, E. I., Zoli, M., Agnati, L. F., Ibáñez, C. F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Fuxe, K. Coaggregation, Cointernalization, and



Codesensitization of Adenosine A<sub>2A</sub> Receptors and Dopamine D<sub>2</sub> Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 18091-18097.

39. Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S. R. Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 46741-46749.

40. Yang, S. N., Dasgupta, S., Lledo, P. M., Vincent, J. D., Fuxe, K. Reduction of dopamine D<sub>2</sub> receptor transduction by activation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in stably A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> (long-form) receptor co-transfected mouse fibroblast cell lines: studies on intracellular calcium levels. *Neuroscience*, 1995, 68, 729-736.

41. Shimazoe, T., Yoshimatsu, A., Kawashimo, A., Watanabe, S. Roles of adenosine A(1) and A(2A) receptors in the expression and development of metamphetamine-induced sensitization. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 388, 249-254.

42. Bastia, E., Xu, Y. H., Scibelli, A. C., Day, Y. J., Linden, J., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A. A crucial role for forebrain adenosine A<sub>2A</sub> receptors on amphetamine sensitization. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30, 891-900.

43. Anden, N.-E., Grabowska, M. Pharmacological evidence for a stimulation of dopamine neurons by noradrenaline neurons in the brain. *European Journal of Pharmacology*, 1976, 39, 275-282.

44. Herve, D., Blanc, G., Glowinski, J., Tassin, J. P. Reduction of dopamine utilization in the prefrontal cortex, but not in the nucleus accumbens after selective destruction of noradrenergic fibers innervating the ventral tegmental area in rat. *Brain Research*, 1982, 237, 510-516.

45. Grenhoff, J., Nisell, M., Ferre, S., Aston-Jones, G., Svensson, T. H. Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *Journal of Neural Transmission. General Section*, 1993, 93, 11-25.

46. Aston-Jones, G., Shipley, M. T., Chouvet, G., Ennis, M., van Bockstaele, E., Pieribone, V., Shiekhhattar, R., Akaoka, H., Drolet, G., Astier, B. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Progress in Brain Research*, 1991, 88, 47-75.

47. Marien, M. R., Colpaert, F. C., Rosenquist, A. C. Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Research Reviews*, 2004, 45, 38-78.

48. Ross, S. B. Long-term effect of N-2-chloroethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride on noradrenergic neurons in the rat brain and heart. *British Journal of Pharmacology*, 1976, 58, 521-527.
49. Fritschy, J.-M., Grzanna, R. Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience*, 1989, 30, 181-197.
50. Häidkind, R., Kivastik, T., Eller, M., Kolts, I., Orelund, L., Harro, J. Denervation of the locus coeruleus projections by treatment with the selective neurotoxin DSP-4 [N(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine] reduces dopamine release potential in the nucleus accumbens shell in conscious rats. *Neuroscience Letters*, 2002, 332, 79-82.
51. Harro, J., Terasmaa, A., Eller, M., Rincken, A. Effect of denervation of the locus coeruleus projections by DSP-4 treatment on [<sup>3</sup>H]-raclopride binding to dopamine D<sub>2</sub> receptors and D<sub>2</sub> receptor-G-protein interaction in the rat striatum. *Brain Research*, 2003, 976, 209-216.
52. Darracq, L., Blanc, G., Glowinski, J., Tassin, J.-P. Importance of the Noradrenaline–Dopamine Coupling in the Locomotor Activating Effects of D-Amphetamine. *The Journal of Neuroscience*, 1998, 18, 2729-2739.
53. Ventura, R., Cabib, S., Alcaro, A., Orsini, C., Puglisi-Allegra, S. Norepinephrine in the Prefrontal Cortex Is Critical for Amphetamine-Induced Reward and Mesoaccumbens Dopamine Release. *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23, 1879-1885.
54. Hokfelt, T., Rehfeld, J. F., Skirboll, L., Ivemark, B., Goldstein, M., Markey, K. Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurones. *Nature*, 1980, 285, 476-478.
55. Crawley, J. N., Corwin, R. L. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, 1994, 15, 731-755.
56. Blacker, D., Broberger, C., Ögren, S.-O., Hökfelt, T. Cholecystokinin B receptor antagonists enhance the locomotor response to the N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine and dizocilpine maleate. *Neuroscience*, 1997, 76, 1057-1067.
57. Crawley, J. N. Cholecystokinin-dopamine interactions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1991, 12, 232-236.
58. Alttoa, A., Harro, J. Effect of CCK<sub>1</sub> and CCK<sub>2</sub> receptor blockade on amphetamine-stimulated exploratory behaviour and sensitization to amphetamine. *European Neuropsychopharmacology*, 2004, 14, 324-331.

59. Zhou, F. M., Liang, Y., Salas, R., Zhang, L., De Biasi, M., Dani, J. S. Corelease of dopamine and serotonin from Striatal Dopamine Terminals. *Neuron*, 2005, 46, 65-74.
60. Melis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., Lutz, B., Marsicano, G., Di Marzo, V., Gessa, G. L., Pistis, M. Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoylglycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*, 2004, 24, 10707-10715.
61. Nestler, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, 2005, 8, 1445-1449.
62. Everitt, B. J., Robbins, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 2005, 8, 1481-1489.
63. Weiss, F. Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005, 5, 9-19.
64. Jones, S., Bonci, A. Synaptic plasticity and drug addiction. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005, 5, 20-25.
65. Ciccocioppo, R., Martin-Fardon, R., Weiss, F. Stimuli associated with a single cocaine experience elicit long-lasting cocaine-seeking. *Nature Neuroscience*, 2004, 7, 495-496.
66. Mogenson, G. J., Jones, D. L., Yim, C. Y. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*, 1980, 14, 69-97.
67. Cannon, C. M., Palmiter, R. D. Reward without Dopamine. *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23, 10827-10831.
68. White, F. J., Kalivas, P. W. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, 1998, 51, 141-153.
69. Sulzer, D., Chen, T.-K., Lau, Y. Y., Kristensen, H., Rayport, S., Ewing, A. Amphetamine Redistributes Dopamine from Synaptic Vesicles to the Cytosol and Promotes Reverse Transport. *The Journal of Neuroscience*, 1995, 15, 4102-4108.
70. Anderson, S. M., Pierce, R. C. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: Implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacology & Therapeutics*, 2005, 106, 389-403.
71. Hooks, M. S., Colvin, A. C., Juncos, J. L., Justice, J. B. Jr. Individual differences in basal and cocaine-stimulated extracellular dopamine in the nucleus accumbens using quantitative microdialysis. *Brain Research*, 1992, 587, 306-312.

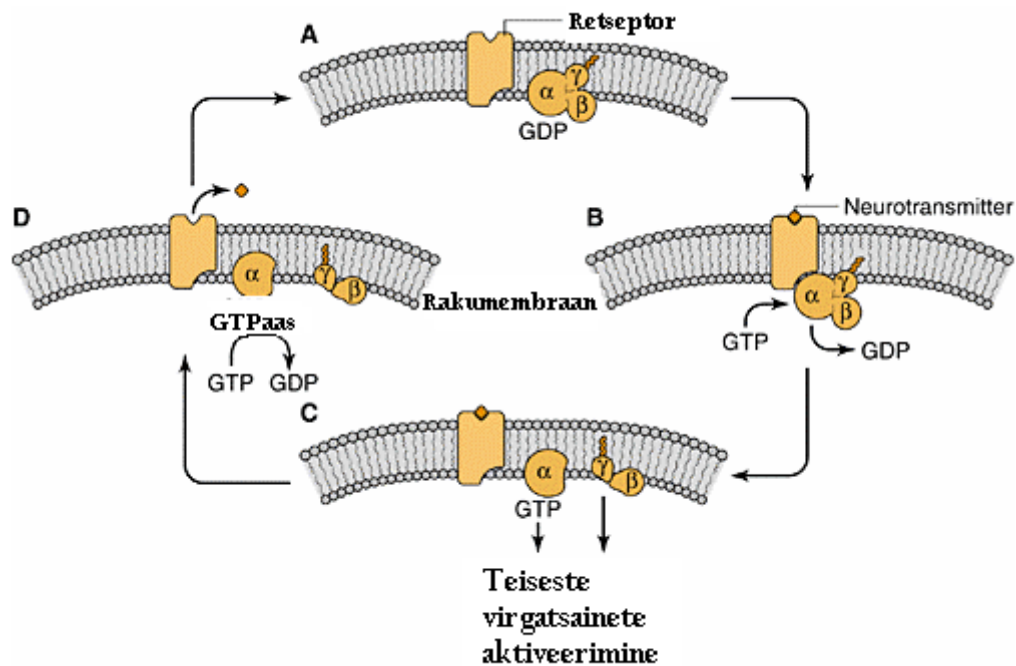
72. Alttoa, A., Kõiv, K., Eller, M., Uustare, A., Rincken, A., Harro, J. Effects of low dose *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine administration on exploratory and amphetamine-induced behavior and dopamine D<sub>2</sub> receptor function in rats with high or low exploratory activity. *Neuroscience*, 2005, 132, 979-990.
73. Piazza, P. V., Deminiere, J. M., Le Moal, M., Simon, H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*, 1989, 245, 1511-1513.
74. Cools, A. R., Gingras, M. A. Nijmegen High and Low Responders to Novelty: A New Tool in the Search After the Neurobiology of Drug Abuse Liability. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1998, 60, 151-159.
75. Harro, J., Oreland, L., Vasar, E., Bradwejn, J. Impaired exploratory behavior after DSP-4 treatment in rats: implications for the increased anxiety after noradrenergic denervation. *European Neuropsychopharmacology*, 1995, 5, 447-455.
76. Vanderschuren, L. J. M. J., Beemster, B., Schoffelmeer, A. N. M. On the role of noradrenaline in psychostimulant-induced psychomotor activity and sensitization. *Psychopharmacology*, 2003, 169, 176-185.
77. Pierce, R. C., Kalivas, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*, 1997, 25, 192-216.
78. Mueller, D., Stewart, J. Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behavioural Brain Research*, 2000, 115, 39-47.
79. Shimosato, K., Ohkuma, S. Simultaneous Monitoring of Conditioned Place Preference and Locomotor Sensitization Following Repeated Administration of Cocaine and methamphetamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2000, 66, 285-292.
80. DeSousa, N. J., Wunderlich, G. R., De Cabo, C., Vaccarino, F. J. Individual differences in sucrose intake predict behavioral reactivity in rodent models of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1998, 60, 841-846.
81. DeSousa, N. J., Bush, D. E., Vaccarino, F. J. Self-administration of intravenous amphetamine is predicted by individual differences in sucrose feeding in rats. *Psychopharmacology*, 2000, 148, 52-58.
82. Hajnal, A., Norgren, R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Research*, 2001, 904, 76-84.
83. Gosnell, B. A. Sucrose intake predicts rate of acquisition of cocaine self-administration. *Psychopharmacology*, 2000, 149, 286-292.

84. Towell, A., Muscat, R., Willner, P. Effects of pimozide on sucrose consumption and preference. *Psychopharmacology*, 1987, 92, 262-264.
85. Castaneda, T. R., de Prado, B. M., Prieto, D., Mora, F. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *Journal of Pineal Research*, 2004, 177-185.
86. Otter, M. H., Matto, V., Sõukand, R., Skrebuhhova, D., Allikmets, L., Harro, J. Characterization of rat exploratory behavior using the exploration box test. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 1997, 19, 683-691.
87. Rincken, A., Finnman, U. B., Fixe, K. Pharmacological characterization of dopamine-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in rat striatal membranes. *Biochemical Pharmacology*, 1999, 57, 155-162.
88. Althoa, A., Eller, M., Herm, L., Rincken, A., Harro, J. Publitseerimata andmed.
89. Kahlig, K. M., Galli, A. Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine, and cocaine. *European Journal of Pharmacology*, 2003, 479, 153-158.
90. Terwilliger, R. Z., Beitner-Johnson, D., Sevarino, K. A., Crain, S.M., Nestler, E. J. A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Research*, 1991, 548, 100– 110.
91. Kõiv, K. Studies on neurochemical regulation of individual differences in exploratory behaviour and the activating and rewarding effects of psychostimulants. Master's thesis. Tartu, 2006.
92. Dar, D. E., Mayo, C., Uhl, G. R. The interaction of methylphenidate and bntropine with the dopamine transporter is different than other substrates and ligands. *Biochemical Pharmacology*, 2005, 70, 461-469.
93. Brabant, C., Tambour, S., Tirelli, E. Quasi-asymptotic development of conditioned hyperactivity induced by intermittent injections of cocaine in C57BL/6J mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2003, 75, 273-280.
94. Tõnissaar, M., Herm, L., Rincken, A., Harro, J. Individual differences in sucrose intake and preference in the rat: circadian variation and association with dopamine D<sub>2</sub> receptor function in striatum and nucleus accumbens. *Neuroscience Letters*, 2006 (saadetud avaldamiseks).

95. Elsworth, J. D., Roth, R. H. Dopamine synthesis, uptake, metabolism and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 1997, 144, 4-9.

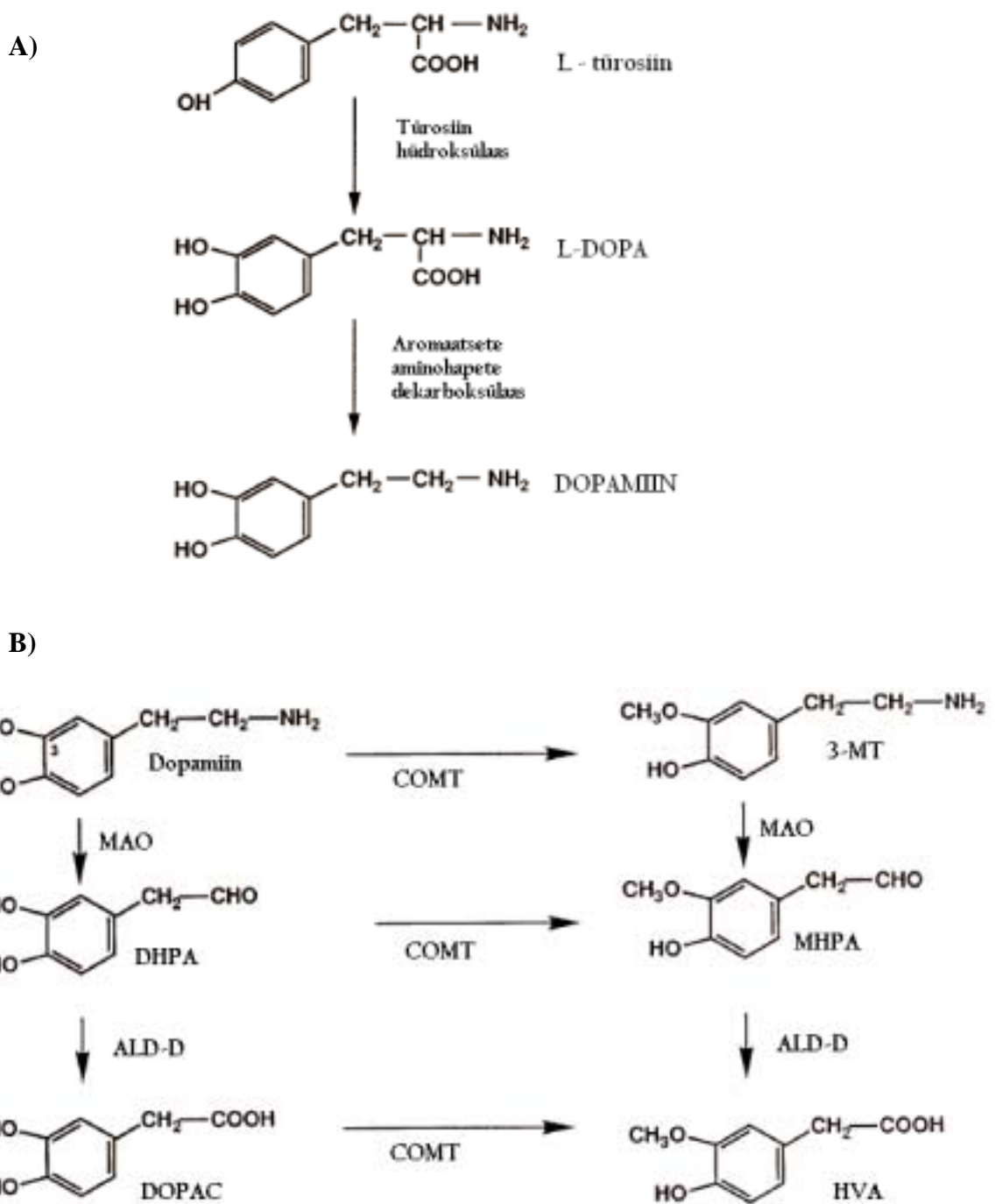
96. Sidhu, A., Laruelle, M., Vernier, P. *Dopamine receptors and transporters: function, imaging, and clinical implication, 2<sup>th</sup> Ed.* New York, Marcel Dekker, Inc., 2002.

**LISAD**

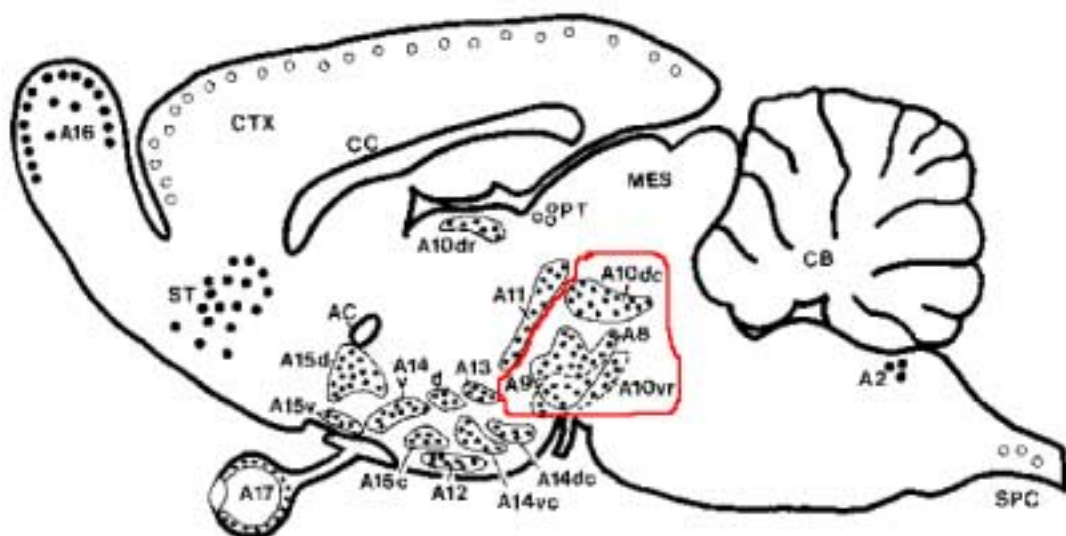


Joonis 1. **G-valgu aktivatsioonitsükkel.** A – retseptor ning heterotrimeerne G-valk puhkeolekus, G-valgu  $\alpha$ -alaühikule on seostunud GDP. B – virgatsaine aktiveerib retseptori, GDP dissotsieerub G-valgult ning asendatakse GTP-ga. C – G-valgu  $\alpha$  ning  $\beta\gamma$ -alaühikud eralduvad üksteisest ning aktiveerivad teiseseid virgatsainete süsteeme. D -  $\alpha$ -alaühiku GTPaasne osa hüdrolyüsib GTP GDP-ks, alaühikud ühinevad heterotrimeeriks ning puhkeolek A taastub. [1]

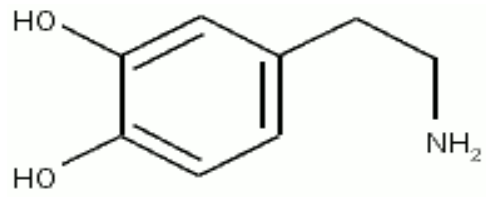




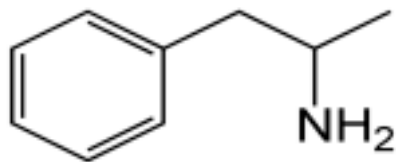
Joonis 2. Dopamiini süntees (A) ja metabolism (B). Lühendid: MAO – monoamiini oksüdaas; COMT – katehool-O-metüültransferaas; ALD-D – aldehüüd dehüdrogenaas; 3-MT- 3-metoksütüramiin, DHPA – 3,4-dihüdroksüfenüülalsetaldehyüd; DOPAC - 3,4-dihüdroksüfenüüläädikhape; MHPA – 3-metoksü-4-hüdroksüfenüülalsetaldehyüd; HVA – homovanillüülhape. (Modifitseeritud [95]-st)



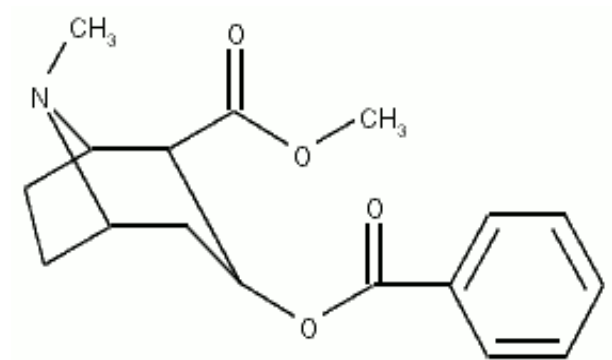
Joonis 3. **Roti aju dopamiinergilised rakurühmad.** Ära on märgitud keskaju olulised A8-A10 tuumad. CTX - korteks; CC – tsingulaarkäär; AC – eesmine komissuur; ST – striatum; MES – keskaju; CB – väikeaju; SPC – selgroog; PT – pretektaalne ala; d,v,dc,dr,vc,vr – dorsaalne, ventraalne, dorsokaudaalne, dorsorostraalne, ventrokaudaalne, ventrorostraalne osa. [96]



Dopamiin



Amfetamiin



Kokaiin

Joonis 4. DATi ligandide struktuurid: dopamiin, amfetamiin ja kokaiin.

