



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. ΠΑΝΤΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΕ ΓΝΩΣΙΑΚΕΣ
ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΕ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΚΑΙ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΣΤΡΩΜΑΣ, MSc
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

Αθήνα, 2016

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥ-
ΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΕΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ
ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ
ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΪΣ ΊΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ
ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝ-
ΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΕΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΞΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ
ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΕΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΪΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΪΣ ΝΟΜΩ
ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ'
ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ
ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ
ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΪΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΠΤΟΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.
ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ
ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ
ΕΣΙΩ, ΕΣΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ
ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟ-
ΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΪΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΪΩΝ,
ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΪΗ Η ΙΔΩ Η
ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΪΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΕΥΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧ-
ΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΪΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟ-
ΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών

Καθηγητής **Π. Σφηκάκης**

- Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή
- 1 Χ. Δάλλα,
Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας,
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
(Επιβλέπουσα)
 - 2 Α. Αντωνίου,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
 - 3 Δ. Σανούδου,
Επίκουρη Καθηγήτρια Δ Παθολογικής
Κλινικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

- Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή
- 1 Κ. Πάντος,
Αν. Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική
Σχολή, ΕΚΠΑ
 - 2 Α. Αντωνίου,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
 - 3 Α. Τσαρμπόπουλος,
Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας,
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
 - 4 Α. Σταματάκης,
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας,
Νοσηλευτική Σχολή, ΕΚΠΑ
 - 5 Χ. Δάλλα,
Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας,
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
 - 6 Δ. Σανούδου,
Επίκουρη Καθηγήτρια Δ Παθολογικής
Κλινικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
 - 7 Α. Κουζούπης,
Επίκουρος Καθηγητής Α Ψυχιατρικής
Κλινικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΒΑΘΜΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:
ΑΡΙΣΤΑ

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

Νικόλαος Παστρομάς, MSc, Κτηνίατρος

Γεννήθηκα στην Αθήνα το 1977 και αποφοίτησα από το 1ο Λύκειο Νίκαιας το 1995. Ολοκλήρωσα τις προπτυχιακές σπουδές μου στο Πανεπιστήμιο Federico II της Νάπολης Ιταλίας, από όπου έλαβα το Πτυχίο Κτηνιατρικής το 2004. Υπηρέτησα την στρατιωτική θητεία μου στους Νομούς Δωδεκανήσου και Αττικής το 2004-2005. Εργάστηκα με συμβάσεις ορισμένου χρόνου στις νομαρχίες Λακωνίας, Ηλείου και Αιτωλοακαρνανίας από το 2005 έως το 2008. Ολοκλήρωσα τις Μεταπτυχιακές σπουδές στο Τμήμα Αγροτικής Οικονομίας και Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με Αντικείμενο: «Πιστοποίηση Αγροτικών Προϊόντων Ποιότητας» το 2008. Έκτοτε απασχολήθηκα ως ελεύθερος επαγγελματίας Κτηνίατρος (παροχή κτηνιατρικών υπηρεσιών και εκπόνηση μελετών) έως το 2010. Από το 2010 έως σήμερα απασχολούμε στον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό - «Δήμητρα» (πρώην Οργανισμός Πιστοποίησης Ελληνικών Γεωργικών Προϊόντων – AGROCERT) με ειδικότητα Κτηνίατρο, στη Διεύθυνση Πιστοποίησης και Προδιαγραφών. Παράλληλα συμμετείχα ως μέλος και Υπεύθυνος κτηνίατρος της ομάδας Ψυχοφαρμακολογίας του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής σε ένα έργο «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ-Πράξη II», Περιφερειακό Επιχειρησιακό Πρόγραμμα (Π.Ε.Π.) Αττικής, 09ΣΥΝ-21-1003, Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας, Υπουργείο Παιδείας Δια Βίου Μάθησης και Θρησκευμάτων. Μέχρι την συγγραφή της παρούσας διατριβής έχω συμμετάσχει σε 2 επιστημονικές δημοσιεύσεις και σε 6 ελληνικά και διεθνή συνέδρια.

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή

1. N. Kokras, N. Pastromas, T. H. Porto, V. Kafetzopoulos, T. Mavridis and C. Dalla. (2014) Acute but not sustained aromatase inhibition displays antidepressant properties, *International Journal of Psychopharmacology*, 17(8):1307-13.
2. N. Pastromas*, N. Kokras*, D. Papassava, C. de Bournonville, C. A. Cornil and C. Dalla. (2016) Sustained aromatase inhibition in rats: behavioral and neurochemical effects in both sexes, in preparation (* equal first authorship).

Περίληψεις σε διεθνή και ελληνικά συνέδρια που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή

1. Dalla, C, Kokras, N, Pastromas, N, Kafetzopoulos, V, Garba, MH and Papadopoulou-Daifoti, Z: "Estrogens derived from the gonads and the brain mediate behavioral responses during a test of antidepressant response" in 7th Panhellenic Congress of Pharmacology, Thessaloniki, Greece. Hippocatia, 2012: 16: (Supplement 1): 9.
2. C. Dalla, N. Kokras, N. Pastromas, V. Kafetzopoulos, E. Tzouveka, C. A. Cornil, J. Balthazart and Z. Papadopoulou-Daifoti "Sex differences in the forced swim test of antidepressant activity: effects of gonadal- and brain- derived estrogens", Society for Neuroscience Annual meeting, New Orleans, USA, 2012.
3. N. Pastromas, C. Dalla, V. Kafetzopoulos, N. Kokras, E. Tzouveka, J. Balthazart, C. A. Cornil and Z. Papadopoulou-Daifoti "Sex differences in emotional

responses: effects of gonadal- and brain- derived estrogens”, Hellenic Society for Neuroscience meeting “Neuroscience Days, 2012.

4. C. Dalla, N. Kokras, N. Pastromas, V. Kafetzopoulos, J. Balthazart, C. A. Cornil and Z. Papadopoulou-Daifoti “Blockade of neuroestrogens enhances depressive behavior of female, but not male rats in the forced swim test” 7th International meetings of Steroids and Nervous System, Torino, Italy, 2013.
5. Χ. Δάλλα, Ν. Κόκρας, Β. Καφετζόπουλος, Θ. Μαυρίδης, Ν. Παστρομάς, Ε. Τζουβέκα, Δ. Παπασάβα, Ζ. Παπαδοπούλου – Νταϊφώτη. Διαφορές του φύλου σε ζωικά πρότυπα κατάθλιψης. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κολλεγίου Εκπαίδευσης, Έρευνας, Πρόληψης και Θεραπείας Ψυχιατρικών Διαταραχών, 11-13 Οκτωβρίου 2013, Αθήνα.
6. C. Dalla, N. Pastromas and N. Kokras “Sustained aromatase inhibition: brain effects in both sexes”, 28th ECNP meeting, Amsterdam 2015, *ECNP fellowship award to C. Dalla*.

Συντομογραφίες

5-HIAA	5-Υδροξυ-Ινδολοξικό Οξύ
5-HT	Σεροτονίνη, 5-Υδροξυ-Τρυπταμίνη
5-HTT	Μεταφορέας Σεροτονίνης
ACTH	Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος Ορμόνη
ANCOVA	Ανάλυση Συμεταβλητότητας
ANOVA	Ανάλυση Μεταβλητότητας
AVPR1b	Υποδοχέας Αργινίνης-Βαζοπρεσίνης, Υπότυπος 1b
CRH	Παράγοντας Έκλυσης της Κορτικοτροπίνης
CRHR1	Υποδοχέας Κορτικοτροπίνης, Υπότυπος 1
DA	Ντοπαμίνη
DOPAC	2-Διϋδροξυ-Φαινυλοξικό Οξύ
ED	Ηλεκτροχημικός Ανιχνευτής
ERα - ERβ	Πυρηνικοί Υποδοχείς
FSL	Στέλεχος Επίμυων Flinders Sensitive
FST	Δοκιμασία Εξαναγκασμένη Κολύμβησης
GH	Αυξητική Ορμόνη, Σωματοτροπίνη
GR	Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών
HPA	Άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (ΥΥΕ) ς
HPG	Άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Γονάδων (ΥΥΓ)
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
LTP	Μακροχρόνια Συναπτική Ενδυνάμωση
GABA	γ - αμινοβουτυρικό οξύ
GnRH	Γοναδοτροπίνη
NMDA	N-Μέθυλ-D-Ασπαρτικό
3α-HSD	3α-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση
11β-HSD	11β-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση
3β-HSD	3β-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση
17β- HSD	17β-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση
P+E	Πρόοιστρος + Οίστρος
PTSD	Μετατραυματική διαταραχή
RIA	Ραδιοανοσολογική Δοκιμασία
SD	Στέλεχος Επίμυων Sprague-Dawley
SSRI	Εκλεκτικοί Αναστολέας Επαναπόσληψης της Σεροτονίνης
TBS	Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris
TCA	Τρικυκλικό Αντικαταθλιπτικό
VEH	Εικονικό φάρμακο, Έκδοχο
MAOI	Αναστολέας της Μονοαμινοξειδάσης
NA	Νοραδρεναλίνη

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εντάσσεται και αποτελεί συνέχεια της πολύχρονης και εξαιρετικά ενδιαφέρουσας ερευνητικής δραστηριότητας της ομάδας Νευροψυχοφαρμακολογίας του Εργ. Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, αρχικά υπό την καθοδήγηση της αείμνηστης Καθ. Ζ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη και στη συνέχεια υπό την επίβλεψη της Επ. Καθ. Χ. Δάλλα. Επί σειρά ετών πολυάριθμες δημοσιεύσεις και διδακτορικές διατριβές έχουν αναδείξει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον του Εργ. Φαρμακολογίας για τις διαφορές των δύο φύλων στο στρες, στην εμφάνιση διαταραχών της διάθεσης και του άγχους, όπως επίσης και στις διαφορές των δύο φύλων στη θεραπευτική απάντηση. Με την παρούσα διατριβή μελετάται περαιτέρω ο ρόλος των ορμονών του φύλου, με έμφαση στα νευρο-οιστρογόνα (νευροστεροειδή), τα οποία εμπίπτουν στα ερευνητικά ενδιαφέροντα της Επ. Καθ. Χ. Δάλλα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την αείμνηστη Καθ. Ζ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη, η οποία με καλωσόρισε στο Εργ. Φαρμακολογίας και μου εμπιστεύθηκε το παρόν θέμα διατριβής. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα. Χριστίνα Δάλλα που μου έκανε τη τιμή να είναι η επιβλέπουσα της διατριβής μου και η οποία με βοήθησε με την καθοριστική συμβολή της σε όλα τα στάδια σχεδιασμού, εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Αν. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα. Α. Αντωνίου και την Επίκουρη Καθ. Παθολογίας κα Δ. Σανούδου οι οποίες συμμετείχαν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή της παρούσας διατριβής, καθώς και τον Καθ. κ. Ν. Σιταρά, τον Αν. Καθηγητή κ. Α. Τσαρμπόπουλο, τον Αν. Καθ. κ. Α. Σταματάκη και τον Επ. Καθ. κ. Α. Κουζούπη, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της ομάδας Νευροψυχοφαρμακολογίας του Εργ. Φαρμακολογίας που συμμετείχαν και βοήθησαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών. Ειδικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Νικόλαο Κόκρα για την καθοριστική συμβολή του στην ανάλυση των αποτελεσμάτων και συγγραφή των επιστημονικών δημοσιεύσεων. Επίσης, τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Βασίλειο Καφετζόπουλο και ιδιαίτερα την κα Δέσποινα Παπασάβα που με βοήθησαν καθοριστικά στις πειραματικές διαδικασίες. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και συμπαράσταση που παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Αθήνα, Οκτώβριος 2016

Ν. Παστρομάς

Περιεχόμενα

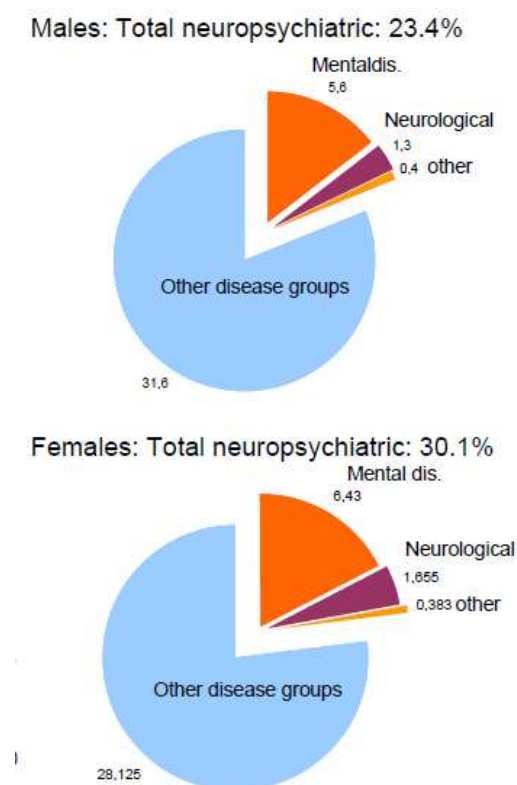
1	<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</u>	<u>12</u>
1.1	Διαφορές του φύλου στην κατάθλιψη	12
1.2	Επίδραση των ορμονών του φύλου στην κατάθλιψη	14
1.3	Στεροειδογένεση	14
1.4	Αναστολείς αρωματάσης	16
1.5	Αλληλεπίδραση οιστρογόνων με αντικαταθλιπτική θεραπεία	19
1.6	Δράσεις οιστρογόνων κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου	21
1.7	Δράσεις οιστρογόνων στον ενήλικο εγκέφαλο	24
1.8	Δράσεις οιστρογόνων και υποδοχέων τους σε νευρωνικά κυκλώματα	28
1.9	Διαφυλικές διαφορές σε πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης	33
1.10	Δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης	35
1.11	Η εξαναγκασμένη κολύμβηση ως στρεσογόνο παράγοντας: διαφορές του φύλου	40
1.12	Διαφορές του φύλου σε άλλα πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης	43
1.13	Συμπεράσματα: διαφυλικές διαφορές σε πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης	50
1.14	Διαφορές του φύλου σε πειραματικά πρότυπα άγχους	53
1.15	Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου: διαφορές του φύλου	53
1.16	Διαφορές του φύλου σε άλλες δοκιμασίες άγχους	54
1.17	Συμπεράσματα για διαφορές του φύλου σε πειραματικά πρότυπα	59
2	<u>ΣΚΟΠΟΣ</u>	<u>61</u>
3	<u>ΜΕΘΟΔΟΣ</u>	<u>63</u>
3.1	Πειράματα 1 και 2: Οξεία και χρόνια αναστολή της αρωματάσης σε συνδυασμό με χορήγηση φλουοξετίνης	63
3.2	Ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA) μέτρησης επιπέδων οιστραδιόλης, προγεστερόνης και τεστοστερόνης	67
3.3	Προσδιορισμός κύκλου του οίστρου	68
3.4	Πείραμα 3. Αναστολή του ενζύμου της αρωματάσης με χρόνια χορήγηση λετροζόλης	68
3.5.1	Χορήγηση αναστολέα της αρωματάσης	69
3.5.2	Συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου	70
3.5.3	Εξαναγκασμένη κολύμβηση	71
3.5.4	Νευροχημική ανάλυση	72
3.5.5	Νευροχημική ανάλυση αμινοξέων	74
3.5.6	Δραστηριότητα της αρωματάσης	76
3.5.7	Προσδιορισμός κορτικοστερόνης	76
1.1	Στατιστική επεξεργασία	78
4	<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	<u>79</u>
4.1	Πείραμα 1	79

4.1.1	Ανάλυση συμπεριφοράς	79
4.1.2	Ορμονικές αναλύσεις.....	81
4.1.3	Σχέση μεταξύ δεικτών συμπεριφοράς και ορμονικών δεικτών	82
4.2	Πείραμα 2.....	84
4.2.1	Ανάλυση συμπεριφοράς	84
4.2.2	Ορμονικές αναλύσεις.....	86
4.2.3	Σχέση μεταξύ δεικτών συμπεριφοράς και ορμονικών δεικτών	86
4.3	Πείραμα 3.....	88
4.3.1	Ανάλυση συμπεριφοράς	88
4.3.1.1	Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου	88
4.3.1.2	Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST).....	90
4.4	Πείραμα 3. Βιοχημικές και ορμονικές αναλύσεις	93
4.4.1	Δραστηριότητα της αρωματάσης.....	93
4.4.2	Επίπεδα τεστοστερόνης	93
4.4.3	Επίπεδα κορτικοστερόνης.....	94
4.5	Πείραμα 3. Νευροχημικές αναλύσεις.....	96
4.5.1	Σεροτονινεργική δραστηριότητα στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο.....	96
4.5.2	Κατεχολαμίνες στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο	97
4.5.3	Επίπεδα αμινοξέων στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο	99
5	<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</u>	<u>107</u>
5.1	Οξεία και χρόνια αναστολή της αρωματάσης σε θηλυκούς επίμυες.....	107
5.2	Πείραμα 3. Επιδράσεις οιστρογόνων προερχόμενων από τον εγκέφαλο και τις γονάδες σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες	110
5.2.1	Διαφορές του φύλου στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου.....	113
5.2.2	Διαφορές του φύλου στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης.....	114
5.2.3	Διαφορές του φύλου και η επίδραση του στρες στη δραστηριότητα της αρωματάσης	115
5.2.4	Διαφορές του φύλου και επίδραση του στρες στη νευροχημεία	117
5.3	Συμπεράσματα	119
6	<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</u>	<u>121</u>
7	<u>SUMMARY.....</u>	<u>124</u>
8	<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u>	<u>126</u>

1 Εισαγωγή

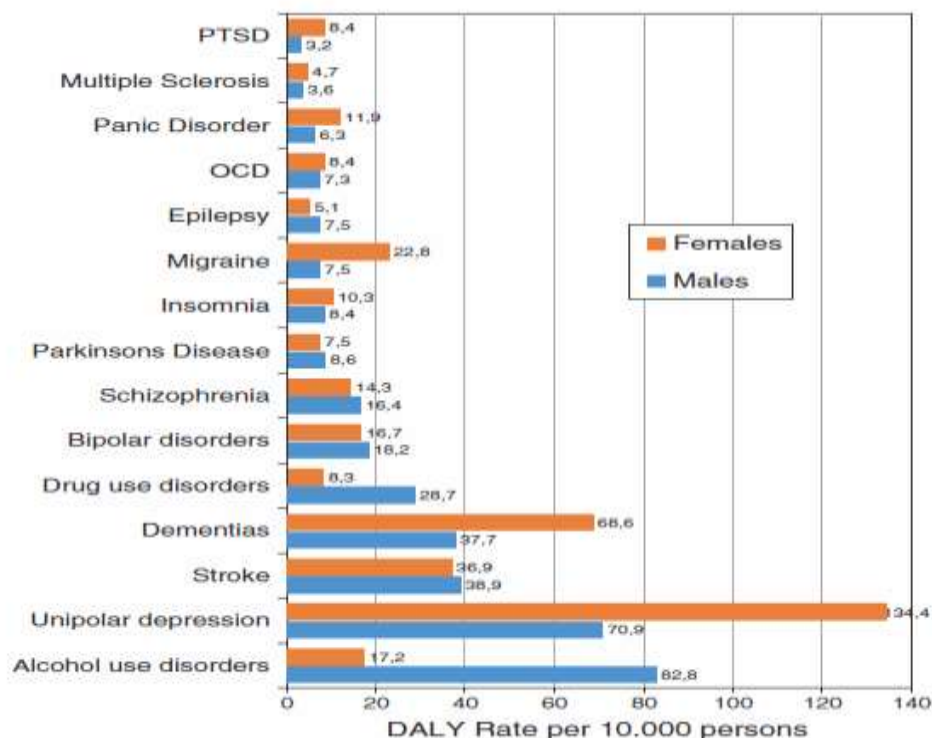
1.1 Διαφορές του φύλου στην κατάθλιψη

Η συνολική επιβάρυνση για τις νευροψυχιατρικές διαταραχές στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει πρόσφατα υπολογιστεί ως 30,1% στις γυναίκες και 23,4% στους άνδρες (Wittchen et al., 2011) (Σχήμα 1). Πολλές από τις διαταραχές αυτές χαρακτηρίζονται από σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στην επίπτωση, στη συμπτωματολογία και στην απόκριση στη φαρμακοθεραπεία. Συγκεκριμένα, οι γυναίκες είναι πιο επιρρεπείς σε σχέση με τους άνδρες στην εμφάνιση άνοιας, διαταραχής πανικού, διαταραχών του άγχους, μετα-τραυματικής διαταραχής (PTSD) και κατάθλιψης (Kessler, 2007, Wittchen et al., 2011, Pitychoutis et al., 2012, Altemus et al., 2014). Απεναντίας, ο αλκοολισμός είναι συχνότερος στους άνδρες (Wittchen et al., 2011). Ωστόσο, μόνο κατά τη δεκαετία του 1990 τα αμερικανικά National Institute of Health και ο Food and Drug Administration των ΗΠΑ, και αργότερα η Ευρωπαϊκή Ένωση συνέστησαν και θέσπισαν σχετικούς νόμους για την ένταξη των γυναικών σε κλινικές μελέτες για την έρευνα νέων φαρμάκων (Merkatz et al., 1993).



Σχήμα 1: Συνολική επιβάρυνση για τις νευροψυχιατρικές διαταραχές στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε άνδρες και γυναίκες σύμφωνα με δεδομένα του 2010 (Wittchen et al., 2011).

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στην κατάθλιψη είναι γνωστό ότι εμφανίζεται με διπλή συχνότητα στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, και ότι οι γυναίκες παρουσιάζουν διαφορετική βαρύτητα συμπτωμάτων (Wittchen et al., 2011) (Σχήμα 2). Στην κατάθλιψη ο ασθενής παρουσιάζει δυσκολίες στη συγκέντρωση, διαταραχές της όρεξης, του ύπνου και της σεξουαλικής δραστηριότητας, ενώ συχνές εκδηλώσεις της νόσου αποτελούν οι αυτοκαταστροφικές τάσεις. Τα ανωτέρω έχουν ως συνέπεια την «αναπηρία» και ανικανότητα του πάσχοντος να λειτουργήσει κοινωνικά, να εργασθεί, να δραστηριοποιηθεί και τελικά να επιβιώσει (Wong and Licinio, 2001). Ειδικά, οι γυναίκες που πάσχουν από κατάθλιψη εμφανίζουν μεγαλύτερο αριθμό αποπειρών αυτοκτονίας, μεγαλύτερη σωματοποίηση, ευερεθιστότητα, και εμφανίζουν συχνότερα διαταραχές όρεξης και βάρους (Frank et al., 1988, Marcus et al., 2005, Marcus et al., 2008). Στην πραγματικότητα, αν και η μελαγχολική κατάθλιψη εμφανίζεται εξίσου και στα δύο φύλα, η αγχώδης και η άτυπη κατάθλιψη είναι πιο συχνή στις γυναίκες. Επίσης, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι οι γυναίκες ανταποκρίνονται καλύτερα στους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI) σε σχέση με τους άνδρες, αλλά καμία σχετική οδηγία δεν έχει περάσει στην κλινική πράξη (Kornstein et al., 2000a, Joyce et al., 2003).



Σχήμα 2: Διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών στην εμφάνιση νευροψυχιατρικών διαταραχών σύμφωνα με δεδομένα του 2010 για την Ευρωπαϊκή Ένωση (Wittchen et al., 2011).

1.2 Επίδραση των ορμονών του φύλου στην κατάθλιψη

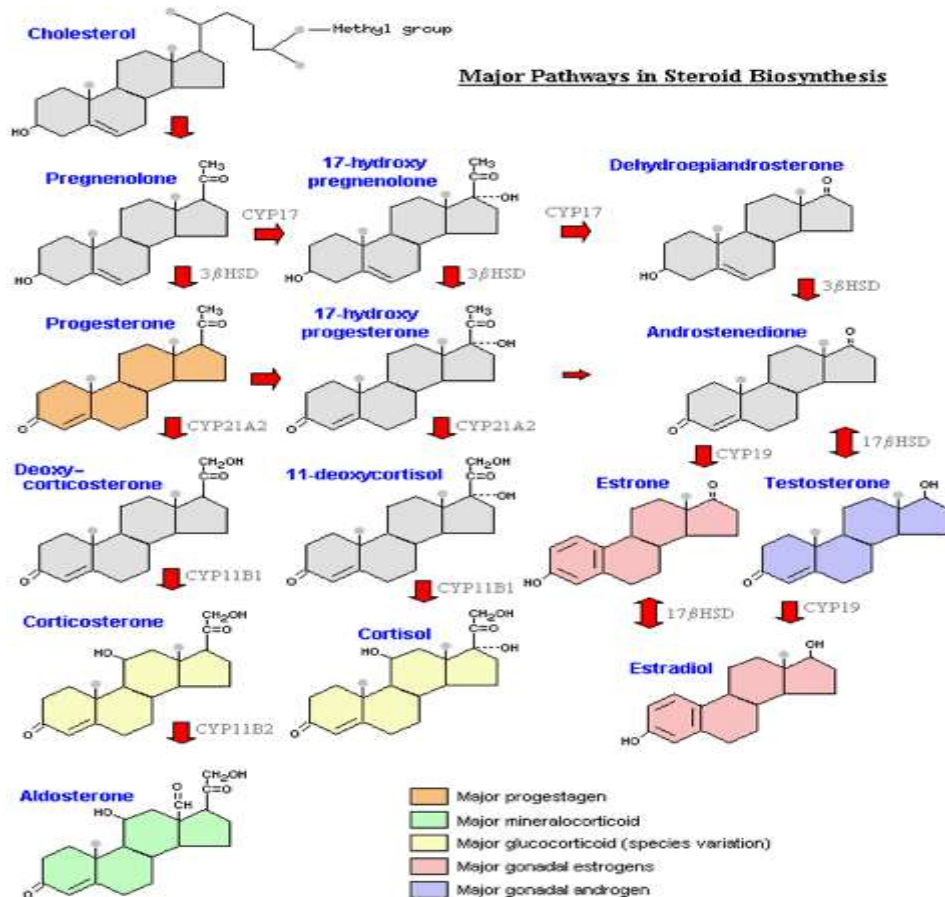
Εκτός από τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της κατάθλιψης στις γυναίκες, οι γυναίκες έχουν επίσης μικρότερη ηλικία έναρξης της νόσου και χειρότερη ποιότητα ζωής σε σχέση με τους άνδρες. Η διαφορά του φύλου στην κατάθλιψη εμφανίζεται κατά την εφηβεία, εξακολουθεί να υφίσταται κατά την αναπαραγωγική ηλικία και μειώνεται μόνο μετά την εμμηνόπαυση (Deecher et al., 2008). Οι γυναίκες παρουσιάζουν επίσης διαταραχές της διάθεσης που σχετίζονται με τις ορμόνες του φύλου (πχ. προ-εμμηνορρυσιακή δυσφορική διαταραχή, κατάθλιψη εγκυμοσύνης και επιλόχειος κατάθλιψη) (Kornstein et al., 2000b, Deecher et al., 2008). Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι τα οιστρογόνα επηρεάζουν τα καταθλιπτικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένου την ευερεθιστότητα, την αϋπνία και την όρεξη (Kornstein et al., 2000b, Marcus et al., 2005). Άρα, οι διακυμάνσεις των επιπέδων των οιστρογόνων κατά την διάρκεια του έμμηνου κύκλου, την εγκυμοσύνη, την κύηση/γαλουχία και την εμμηνόπαυση φαίνεται ότι συμβάλλουν στις διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ των δυο φύλων στην κατάθλιψη (Kornstein et al., 2000b, Deecher et al., 2008).

1.3 Στεροειδογένεση

Τα ένζυμα της σύνθεσης των στεροειδών ανήκουν στην οικογένεια των οξειδασών του κυτοχρώματος P450. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 αποτελούνται από περίπου 500 αμινοξέα και περιέχουν μία ομάδα αίμης. Ονομάζονται P450, επειδή όλα απορροφούν το φως στα 450 nm. Αν και τα περισσότερα ένζυμα P450 του ήπατος μπορούν να μεταβολίσουν πολλαπλά υποστρώματα, τα P450 ένζυμα στεροειδογένεσης περιορίζονται ειδικά σε κάποιο υπόστρωμα. Έξι διαφορετικά P450 ένζυμα εμπλέκονται στη στεροειδογένεση (Σχήμα 3). Τα ένζυμα της στεροειδογένεσης διακρίνονται σε δύο ομάδες: α. τα κυτοχρωμικά ένζυμα P450_{sc}, P450_{c17}, P450_{c11b}, P450_{c11AS}, P450_{arom}, και β. τα μη κυτοχρωμικά ένζυμα 5α-αναγωγή, 3α-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση (3α-HSD), 11β-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση (11β-HSD), 3β-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση (3β-HSD), 17β-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση (17β-HSD).

Τα ένζυμα της στεροειδογένεσης βρίσκονται στους περιφερειακούς στεροειδογενείς αδένες και στον εγκέφαλο, ενώ συγκεκριμένα εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια ή στα μικροσώματα. Τα κυτοχρωμικά ένζυμα ειδικεύονται στο μεταβολισμό των

στεροειδών ορμονών. Ανάγουν το ατμοσφαιρικό οξυγόνο με ηλεκτρόνια προερχόμενα από το NADPH με τη δράση ειδικών συμπαραγόντων, της αναγωγάσης της αδρενοδοξίνης και της αδρενοδοξίνης για τα μιτοχονδριακά P450s και της P450-αναγωγάσης και του κυτοχρώματος b5 για τα μικροσωμάτια P450s (Baulieu and Robel, 1990).

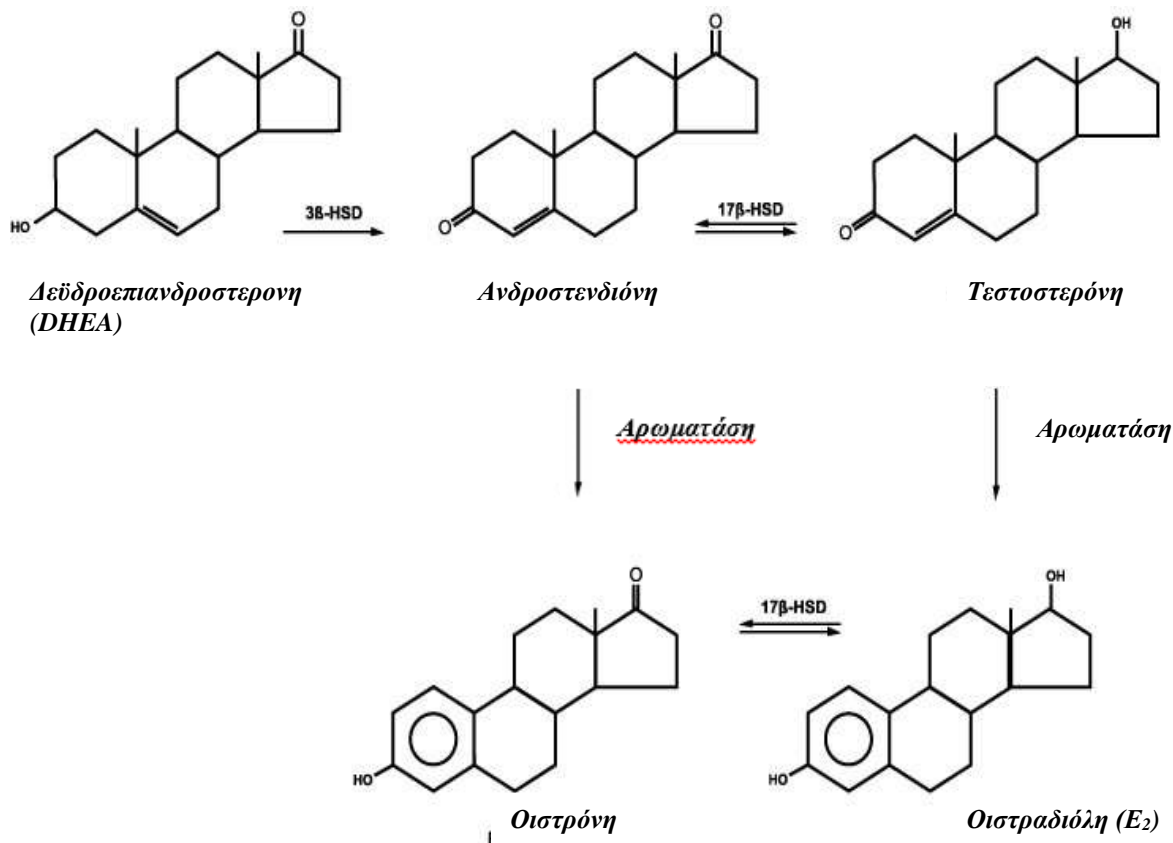


Σχήμα 3: Μονοπάτι βιοσύνθεσης στεροειδών ορμονών από τη χοληστερόλη (Mellon et al., 2001).

Όλα τα στεροειδή συντίθενται από το πρόδρομο μόριο της χοληστερόλης (Σχήμα 3). Το πρώτο βήμα στη σύνθεση των στεροειδών ορμονών είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη και η αντίδραση αυτή ρυθμίζεται από το μιτοχονδριακό ένζυμο P450 scc. Το ένζυμο P450c17, που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των επινεφριδίων, στις γονάδες και στον εγκέφαλο εμβρύων, καταλύει τόσο τις ιδιότητες της 17 α -υδροξυλάσης όσο και της 17, 20 λυάσης. Το ένζυμο P450c21, που βρέθηκε στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καταλύει την 21-υδροξυλίωση των γλυκοκορτικοειδών και των μεταλλοκορτικοειδών. Στις ωοθήκες, και πιο συγκεκριμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το ένζυμο P450ar9 (αρωματάση)

καταλύει την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Επιπλέον, η βιοσύνθεση της 1,25 (OH)₂ βιταμίνης D, απαιτεί μια σειρά από μιτοχονδριακά ένζυμα του κυτοχρώματος P450.

Τα φυσικά οιστρογόνα έχουν το δακτύλιο των στεροειδών που αποτελείται από 18 άνθρακες και περιέχουν ένα φαινολικό δακτύλιο A, δηλαδή έναν αρωματικό δακτύλιο που φέρει υδροξυλομάδα στη θέση 3, ο οποίος φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντικός για τη βιολογική τους δράση (Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Μεταβολισμός ανδρογόνων σε οιστρογόνα από το ένζυμο της αρωματάσης

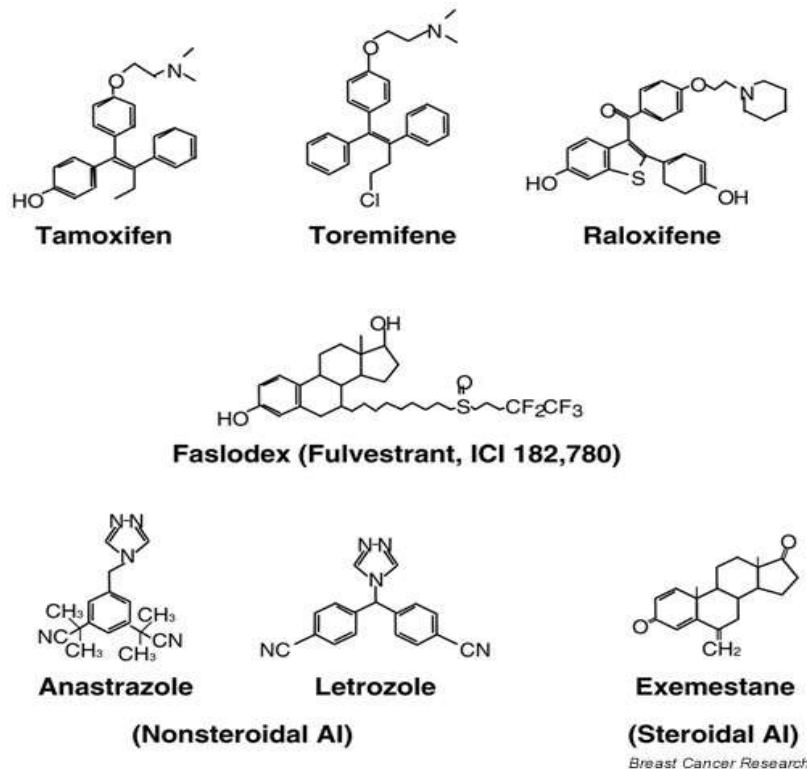
1.4 Αναστολείς αρωματάσης

Οι αναστολείς της αρωματάσης (λετροζόλη, αναστροζόλη, εξαμεστάνη), χρησιμοποιούνται ευρέως για την αναστολή της τοπικής σύνθεσης οιστρογόνων σε ορμονοεξαρτώμενους όγκους (κυρίως του μαστού και του καρκίνου του προστάτη), καθώς και για άλλα θέματα στη γυναικολογία και στην παιδιατρική (Santen et al., 2009). Η ευρεία χρήση τους έγκειται στο γεγονός ότι το 80% των περιπτώσεων

καρκίνου του μαστού στις γυναίκες, είναι εξαρτώμενο από τα οιστρογόνα (Cazzaniga and Bonanni, 2012). Μέχρι πρόσφατα η πιο συνηθισμένη επικουρική ορμονοθεραπεία σε αυτές τις περιπτώσεις ήταν η χρήση της ταμοξιφένης, ωστόσο κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η χρήση των αναστολέων της αρωματάσης ως κύρια θεραπεία είχε καλύτερα αποτελέσματα, αναφορικά με τα ποσοστά ελεύθερου νόσου επιβίωσης (Coombes et al., 2007, Burstein et al., 2010).

Η αναστραζόλη, η λετροζόλη και η εξαμεστάνη είναι τρίτης γενιάς αναστολείς της αρωματάσης και έχουν ως κύριο σκοπό τους, τη δραστική μείωση των κυκλοφορούντων οιστρογόνων μέσω της αναστολής μετατροπής της ανδροστενδιόνης σε οιστρόνη και οιστραδιόλη (Σχήμα 5).

Η αναστολή της σύνθεσης οιστρογόνων έχει συσχετιστεί με ψυχιατρικές και γνωσιακές ανεπιθύμητες ενέργειες ιδιαίτερα σε ασθενείς με ιστορικό ψυχικής ασθένειας ή γνωσιακών διαταραχών (Jenkins et al., 2008, Henry et al., 2011, Phillips et al., 2011). Ωστόσο, δεν υπάρχει σαφής απάντηση για το κατά πόσο η ορμονοθεραπεία επιβαρύνει τον ασθενή. Η έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο δυσκολεύεται ακόμα περισσότερο από το γεγονός ότι στις περισσότερες μελέτες εμφανίζονται μειωμένες επιδόσεις των γυναικών με καρκίνο στις νευροψυχολογικές δοκιμασίες, ανεξάρτητα από τη χορήγηση ορμονοθεραπείας (Ahles et al., 2008). Σε κάθε περίπτωση η επίπτωση της κατάθλιψης, του άγχους και η μείωση των ανώτερων γνωσιακών λειτουργιών φαίνεται να αυξάνονται (Goodwin, 1997, Austin et al., 2001), μειώνοντας τη συμμόρφωση του ασθενούς στην ογκολογική αγωγή και υποβαθμίζοντας τη συνολική ποιότητα της ζωής του (Breckenridge et al., 2012, Takei et al., 2012).



Σχήμα 5. Αναστολείς αρωματάσης

Σχετικά με άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες των αναστολέων της αρωματάσης, όπως είναι η κόπωση, η ανορεξία και η κεφαλαλγία χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για να εξακριβωθεί κατά πόσο σχετίζονται με την κατάθλιψη. Αντιθέτως, οι εξάψεις και οι αρθραλγίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με υψηλά ποσοστά αϋπνίας σε ασθενείς που τους χορηγήθηκαν αναστολείς της αρωματάσης (Desai et al., 2013).

Ευρήματα από μια άλλη μεγάλη μελέτη, έδειξαν ότι ασθενείς που τους χορηγήθηκε ταμοξιφένη και αναστολείς της αρωματάσης, εμφάνισαν κατάθλιψη, άγχος και αϋπνία (Coombes et al., 2007). Συγκεκριμένα σε δείγμα 2338 ασθενών που έλαβαν ταμοξιφένη, εμφάνισαν 4,8% αγχώδη διαταραχή, 8,8% κατάθλιψη και 16,8 αϋπνία, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για την εξαμεστάνη σε δείγμα 2320 ασθενών ήταν: 6%, 9,8% και 19,6%. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή δεν υπήρξε λεπτομερής ψυχιατρική αξιολόγηση πριν και μετά την έναρξη της αγωγής, έτσι ώστε να εξαχθούν αναλυτικότερα συμπεράσματα ως προς την επίδραση των αναστολέων της αρωματάσης στον ψυχισμό των ασθενών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι υπάρχουν και κάποιες μεμονωμένες βιβλιογραφικές αναφορές που περιγράφουν συμπτώματα μανίας ως βραχυπρόθεσμο και προσωρινό εύρημα που ακολουθεί τη χορήγηση αναστολέων της αρωματάσης (Goodwin, 2006).

Άρα, ενώ ορισμένες ανεπιθύμητες ενέργειες των αναστολέων της αρωματάσης έχουν ήδη περιγραφεί και τεκμηριωθεί, η δυναμική τους επίδραση στις διαταραχές της διάθεσης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς (Saini et al., 2009).

1.5 Αλληλεπίδραση οιστρογόνων με αντικαταθλιπτική θεραπεία

Τα αντικαταθλιπτικά αλληλεπιδρούν με τις στεροειδείς ορμόνες, τόσο σε φαρμακοκινητικό, όσο και σε φαρμακοδυναμικό επίπεδο (Bigos et al., 2009, Kokras et al., 2011). Τα ευρήματα αυτά έχουν ιδιαίτερη σημασία επειδή οι άνδρες και οι γυναίκες διαφέρουν στα επίπεδα των ορμονών του φύλου και άρα θα μπορούσε να επηρεαστεί η απόκριση στην αντικαταθλιπτική θεραπεία. Επιπλέον, οι γυναίκες εκτίθενται σε ορμονικές διακυμάνσεις, όπως κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, την κύηση/γαλουχία και την εμμηνόπαυση. Για παράδειγμα, η εμφάνιση των διαταραχών της διάθεσης είναι μεγαλύτερη όταν συμβαίνουν αλλαγές στα επίπεδα οιστρογόνων (π.χ. πριν την έμμηνο ρύση, μετά τον τοκετό, και περιεμμηνόπαυσιακά) (Halbreich and Kahn, 2001).

Ιδιαίτερα, κατά τη διάρκεια της φάσης της περιεμμηνόπαυσης (δηλαδή κατά τη μετάβαση των γυναικών στην εμμηνόπαυση), υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καταθλιπτικών διαταραχών, είτε ως υποτροπή ή ως πρώτο επεισόδιο (2,5 φορές) (Freeman et al., 2006; Frey et al., 2008). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ανταπόκριση στη θεραπεία με εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs) είναι μικρότερη στις γυναίκες με χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων, κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης (Thase et al., 2005; Pinto-Meza et al., 2006; Pae et al., 2009).

Επιπλέον, ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι οι προ-εμμηνόπαυσιακές γυναίκες εμφανίζουν πιο ευνοϊκή απόκριση στα SSRI αντικαταθλιπτικά σε σχέση με τα τρικυκλικά (Kornstein and McEnany, 2000). Συγκεκριμένα, οι νεότερες (<44 ετών), αλλά όχι μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες, είχαν καλύτερη απόκριση στη φλουοξετίνη από ότι στη μαπροτροπιλίνη σε σχέση με τους άνδρες (Martenyi et al., 2001). Οι νεότερες γυναίκες αποκρίθηκαν επίσης καλύτερα στη φλουβοξαμίνη σε σχέση με γυναίκες ή άνδρες στην τρίτη ηλικία (Naito et al., 2007).

Επίσης, μεγάλος αριθμός γυναικών και μικρότερος αριθμός ανδρών λαμβάνουν εξωγενώς ορμόνες, όπως τα από του στόματος αντισυλληπτικά, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, θεραπεία ορμονών θυρεοειδούς κ.λ.π. Αυτές και άλλες αλληλεπιδράσεις των ορμονών με τα αντικαταθλιπτικά θα πρέπει να ληφθούν υπόψη

στην αντικαταθλιπτική θεραπεία. Ορμονικές θεραπείες έχουν επίσης μελετηθεί ως αντικαταθλιπτική θεραπεία, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με κλασικά αντικαταθλιπτικά. Ειδικότερα, όσον αφορά στην περιεμμηνόπαυσιακή περίοδο, τα οιστρογόνα επηρεάζουν την εμφάνιση των διαταραχών της διάθεσης (Soares and Frey, 2010a;2010b).

Η αντικαταθλιπτική δράση των οιστρογόνων υποστηρίζεται επίσης από έναν αριθμό προκλινικών δεδομένων τα οποία δείχνουν ότι οι αντικαταθλιπτικού τύπου δράσεις των οιστρογονικών ουσιών εξαρτώνται από τις φαρμακολογικές ιδιότητες και από τη δόση της ουσίας, κατά τη διάρκεια της θεραπείας και το χρόνο της χορήγησης μετά την ωοθηκεκτομή (Estrada-Camarena et al., 2010). Αυτή η οιστρογονική δράση πιθανόν προκαλείται μέσω δράσεων στο σεροτονινεργικό σύστημα (υποδοχείς, ένζυμα και τους μεταφορείς), καθώς και σε παραμέτρους νευροπλαστικότητας (Estrada-Camarena et al., 2010; Osterlund, 2010).

Είναι σημαντικό ότι τα περισσότερα από τα ευεργετικά αποτελέσματα των οιστρογόνων επί της διάθεσης και των διαταραχών της διάθεσης φαίνεται να λαμβάνουν χώρα μέσω του β υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ). Άρα, εκλεκτικά μόρια για αυτόν τον υποδοχέα μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικά και ασφαλή για τη θεραπεία των διαταραχών της διάθεσης (Harris, 2007).

Από φαρμακοκινητικής απόψεως, οι φάσεις του έμμηνου κύκλου ή η κύηση μπορεί να αλλάξουν την ισορροπία του νερού, η οποία θα μπορούσε με τη σειρά του, να αλλάξει την κατανομή της αντικαταθλιπτικής ουσίας και να οδηγήσει σε ενισχυμένες ανεπιθύμητες ενέργειες, εάν ο όγκος του νερού μειωθεί. Από την άλλη πλευρά, αν αυξηθεί ο όγκος του νερού θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπο-θεραπευτικά επίπεδα του αντικαταθλιπτικού φαρμάκου (Kokras et al., 2011).

Επίσης, ο μεταβολισμός των αντικαταθλιπτικών μπορεί να επηρεαστεί από τις ορμόνες του φύλου. Για παράδειγμα, υπάρχουν ενδείξεις για ελαφρώς υψηλότερη δραστηριότητα του CYP2A6 στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, και η έκφραση αυτού του ισοενζύμου ανταποκρίνεται στα οιστρογόνα (Higashi et al., 2007, Sinues et al., 2008).

Διαφορές μεταξύ των φύλων στα CYP ένζυμα, έχουν επίσης παρατηρηθεί σε ανθρώπους (Veldhuis and Bowers, 2003). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα περισσότερα αντικαταθλιπτικά φάρμακα μεταβολίζονται από αυτά τα ένζυμα, οι διαφορές του φύλου σε αυτά θα μπορούσαν να αποτελούν σημαντικό παράγοντα, για τον οποίο

παρόλο που χορηγείται η ίδια δόση, οι γυναίκες εκτίθενται σε υψηλότερα επίπεδα αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε σχέση με τους άνδρες (Kokras et al., 2011).

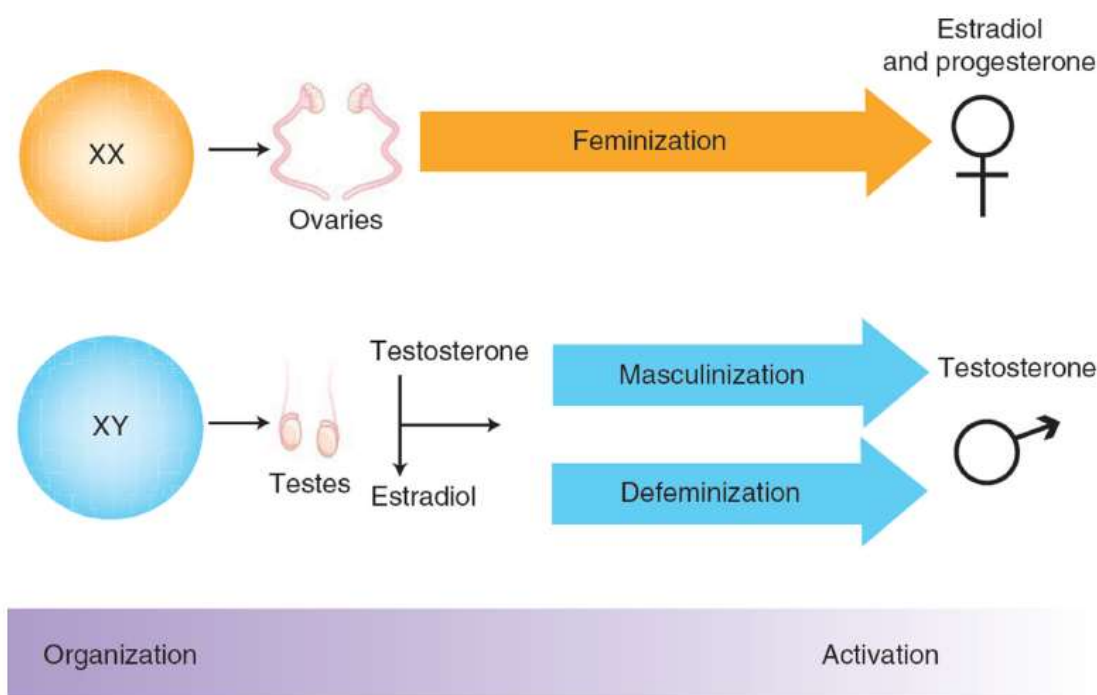
Συμπερασματικά, οι ορμονικές αλληλεπιδράσεις με τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα είναι περίπλοκες και απαιτούνται περισσότερες προσεκτικά σχεδιασμένες μελέτες τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο, προκειμένου να αναπτυχθούν κατάλληλες κατευθυντήριες γραμμές για τη θεραπεία των διαταραχών της διάθεσης σε διάφορες ορμονικές καταστάσεις.

1.6 Δράσεις οιστρογόνων κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου

Τα οιστρογόνα στα οποία συμπεριλαμβάνεται η οιστραδιόλη είναι κλασικές στεροειδείς ορμόνες που συντίθενται και εκκρίνονται κυρίως από τις ωοθήκες στις γυναίκες και από τους όρχεις στους άνδρες. Η σεξουαλική διαφοροποίηση του εγκεφάλου εξαρτάται από τη δράση της τεστοστερόνης και λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων περιόδων της ανάπτυξης κάθε θηλαστικού (Nelson, 2000). Στους επίμυες η περίοδος αυτή έχει ιδιαίτερα μελετηθεί και θεωρείται ότι αρχίζει την ημέρα 14 της προγεννητικής περιόδου και ολοκληρώνεται την ημέρα 10 μετά τη γέννηση. Στους αρσενικούς επίμυες, παρατηρείται προγεννητικά μια μεγάλη αύξηση της τεστοστερόνης τις ημέρες 18 και 19 και ακόμα μία μεγάλη αύξηση αμέσως μετά τη γέννηση. Στη συνέχεια, 6 ώρες μετά τη γέννηση η τεστοστερόνη των αρσενικών επιμύων μειώνεται, αλλά διατηρείται υψηλή σε σχέση με τους θηλυκούς επίμυες μέχρι την 10η ημέρα. Μετά την 10η ημέρα τα επίπεδα της τεστοστερόνης μειώνονται πολύ και διατηρούνται χαμηλά μέχρι την περίοδο της εφηβείας. Τα υψηλά επίπεδα της τεστοστερόνης στους αρσενικούς επίμυες, κατά τις φάσεις της ανάπτυξης, δρουν στον εγκέφαλο και προκαλούν την αρρενοποίηση του (Σχήμα 6) (McCarthy and Arnold, 2011). Δηλαδή, διαφοροποιούν τα νευρωνικά συστήματα, τα οποία ελέγχουν την έκκριση των γοναδοτροφινών και τη σεξουαλική συμπεριφορά του αρσενικού επίμυος κατά την ενήλικη ζωή του. Αντιθέτως, η ανάπτυξη του θηλυκού εγκεφάλου λαμβάνει χώρα με την απουσία τεστοστερόνης και οδηγεί στην ανάπτυξη των νευρωνικών συστημάτων που είναι απαραίτητα για την εμφάνιση του κύκλου του οίστρου και της θηλυκής σεξουαλικής συμπεριφοράς κατά την ενήλικη ζωή (McCarthy and Arnold, 2011).

Είναι αξιοσημείωτο, ότι οι νευροενδοκρινολόγοι θεωρούν ότι ο εγκέφαλος είναι «θηλυκός» και μετατρέπεται σε «αρσενικό» λόγω της επίδρασης της τεστοστερόνης

κατά την κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης του. Η άποψη αυτή προέκυψε αρχικά από το εύρημα ότι η αφαίρεση των γονάδων σε θηλυκά έμβρυα κουνελιών και σε νεογέννητους θηλυκούς επίμυες δεν επηρέασε τη διαμόρφωση του θηλυκού εγκεφάλου (περιγραφή στο (Nelson, 2000)).



Σχήμα 6. Η επίδραση των ορμονών του φύλου στην ανάπτυξη του αρσενικού και θηλυκού εγκεφάλου (McCarthy and Arnold, 2011)

Ως στεροειδογόνο όργανο, ο εγκέφαλος περιέχει όλα τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την *de novo* σύνθεση νευροστεροειδών από τη χοληστερόλη (Baulieu and Robel, 1990). Μεταξύ αυτών, το ένζυμο της αρωματάσης είναι το μόνο με περιοριστικό ρόλο στη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Όπως προαναφέρθηκε, το ένζυμο της αρωματάσης ανήκει στο σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450 και είναι το μοναδικό ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Έχει βρεθεί σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου πλακούντα, τα κύτταρα Sertoli και Leydig, το δέρμα και τον λιπώδη ιστό κ.α. Αξιοσημείωτο είναι ότι έχει βρεθεί στον εγκεφαλικό ιστό όλων των θηλαστικών που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, όπως είναι ο άνθρωπος, ο πίθηκος, τα ινδικά χοιρίδια, οι νυφίτσες, οι μύες, οι επίμυες και άλλα σπονδυλωτά. Φυλογενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι το ένζυμο αρωματάση

διατηρεί σε όλα τα είδη την ικανότητά του μετατροπής των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (Lephart, 1996).

Οι Naftolin et al. έδειξαν ότι οι νευροενδοκρινικοί ιστοί του ΚΝΣ περιέχουν το ένζυμο αρωματάση για τη μετατροπή ή αλλιώς «αρωματοποίηση» των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (Naftolin et al., 1975). Έκτοτε εκτεταμένες μελέτες έδειξαν ότι πολλές από τις δράσεις της τεστοστερόνης κατά τη διαφοροποίηση του αρσενικού εγκεφάλου λαμβάνουν χώρα λόγω της τοπικής μετατροπής της σε οιστραδιόλη και διατυπώθηκε η «υπόθεση της αρωματάσης». Παραδείγματα αποδείξεων για την ισχύ αυτής της θεωρίας αποτελούν τα ευρήματα ότι ανδρογόνα τα οποία έχουν τη δυνατότητα μετατροπής σε οιστρογόνα (π.χ. Δ⁴- ανδροστενδιόνη) μιμούνται τις δράσεις της τεστοστερόνης για την αρρενοποίηση του εγκεφάλου όταν χορηγούνται σε νεογέννητους θηλυκούς επίμυες (McDonald and Doughty, 1974), ενώ ανδρογόνα που δεν αρωματοποιούνται, όπως η διϋδροτεστοστερόνη, δεν έχουν αυτή την ικανότητα (van der Schoot, 1980). Επίσης, η προχορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων των οιστρογόνων αποτρέπει τις αρρενοποιητικές δράσεις της εξωγενώς χορηγούμενης τεστοστερόνης σε θηλυκούς νεογέννητους επίμυες (McDonald and Doughty, 1972). Αξιοσημείωτο είναι επίσης, ότι η δραστηριότητα της αρωματάσης είναι ιδιαίτερα αυξημένη στην προοπτική περιοχή του υποθαλάμου του αρσενικού εγκεφάλου κατά τις κρίσιμες ημέρες της ανάπτυξής του (Beyer et al., 1993, Bakker et al., 2004, McCarthy and Arnold, 2011).

Άρα, σύμφωνα με την υπόθεση της αρωματάσης, το ένζυμο αυτό δρα ως ρυθμιστής του ΚΝΣ λόγω της τοπικής και ελεγχόμενης παραγωγής οιστρογόνων από ανδρογόνα. Με τον τρόπο αυτό τα ανδρογόνα (μέσω μετατροπής σε οιστρογόνα) δρουν στα κύτταρα στόχους, συμβάλουν στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων κατά την κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης, ρυθμίζουν την οργάνωση του ΚΝΣ και επηρεάζουν την αναπαραγωγική συμπεριφορά (Lephart, 1996).

Οι δράσεις αυτές των οιστρογόνων κατά την κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης του εγκεφάλου ονομάζονται δράσεις «οργάνωσης» και έχουν περιγραφεί κυρίως σε εγκεφαλικές περιοχές που ελέγχουν την έκκριση των ορμονών του φύλου και την αναπαραγωγική διαδικασία, όπως είναι η προοπτική και η μέση βασική περιοχή του υποθαλάμου και η υπόφυση (Morris et al., 2004). Δράσεις οργάνωσης της οιστραδιόλης έχουν ωστόσο περιγραφεί και σε περιοχές του εγκεφάλου που δεν συνδέονται με το αναπαραγωγικό σύστημα, όπως είναι ο ιππόκαμπος, ο νεοφλοιός, ο

φλοιός της παρεγκεφαλίδας και ο νωτιαίος μυελός (MacLusky et al., 1987, Lewis et al., 1995, McEwen et al., 1997).

Αντιθέτως, όσον αφορά στο θηλυκό εγκέφαλο, όπως προαναφέρθηκε, μέχρι πρόσφατα θεωρούταν ότι ο θηλυκός εγκέφαλος αναπτύσσεται ελλείπει ορμονών, εφόσον δεν υπάρχει παραγωγή υψηλών επιπέδων τεστοστερόνης από τους όρχεις τα οποία θα μπορούσαν να εισέλθουν στον εγκέφαλο και να προκαλέσουν την αρρενοποίησή του. Ωστόσο, οι θηλυκοί επίμυες, εκτίθενται στα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων που παράγονται από τις ωοθήκες της μητέρας τα οποία θα μπορούσαν να εισέλθουν ως λιποδιαλυτά μόρια από το φραγμό αίματος-πλακούντα και να δράσουν στους υποδοχείς του εγκεφάλου. Για την αποφυγή αυτού του φαινομένου οι επίμυες παράγουν κατά την εμβρυϊκή περίοδο και λίγο μετά τη γέννηση τους μεγάλες ποσότητες της ορμόνης άλφα-φετοπρωτεΐνης, η οποία προσδένει τα οιστρογόνα και δεν επιτρέπει την είσοδο τους στον εγκέφαλο (Nelson, 2000). Η πρωτεΐνη αυτή ανευρίσκεται και στους θηλυκούς και στους αρσενικούς επίμυες και δεν συνδέεται με τα ανδρογόνα.

Ορισμένα ευρήματα όμως δείχνουν ότι κάποιες ποσότητες οιστρογόνων μπορεί να μη συνδέονται με την άλφα-φετοπρωτεΐνη, να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και συνεπώς να συμβάλουν στην ανάπτυξη του θηλυκού εγκεφάλου και τη διαμόρφωση της συμπεριφοράς των θηλυκών τρωκτικών (Toran-Allerand, 1976, Mack et al., 1993, Bakker et al., 2002). Επίσης, είναι πιθανόν τα οιστρογόνα να επηρεάζουν την ανάπτυξη του θηλυκού εγκεφάλου, λόγω τοπικής παραγωγής τους από ανδρογόνα σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου του θηλυκού επίμυος.

1.7 Δράσεις οιστρογόνων στον ενήλικο εγκέφαλο

Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι και άλλα όργανα όπως το ήπαρ, τα οστά και κυρίως ο εγκέφαλος παράγουν οιστρογόνα τοπικά στον ενήλικο οργανισμό (Santen et al., 2009). Είναι αξιοσημείωτο ότι σε αρσενικούς ενήλικες επίμυες η συγκέντρωση των οιστρογόνων στον ιππόκαμπο είναι έξι φορές μεγαλύτερη από τα επίπεδα του πλάσματος (Hojo et al., 2004). Ο ιππόκαμπος είναι γνωστό ότι κατέχει κεντρικό ρόλο στα νευρωνικά κυκλώματα που σχετίζονται με τη γνωσιακή λειτουργία, το άγχος και τις συναισθηματικές διαταραχές (Small et al., 2011). Παρόλα αυτά, ο λειτουργικός

ρόλος της τοπικής σύνθεσης *de novo*, των οιστρογόνων στον ενήλικο αρσενικό και το θηλυκό εγκέφαλο χρήζει περαιτέρω μελέτης (Baulieu and Robel, 1990).

Τα μέχρι τώρα ευρήματα δείχνουν ότι τα οιστρογόνα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση στο στρες και στη ρύθμιση του συναισθήματος. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι σε θηλυκούς μύες παρατεταμένη στέρηση των ορμονών των ωοθηκών, αύξησε την καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά, ειδικά μετά από έκθεση σε στρεσογόνες εμπειρίες (Lagunas et al., 2010). Εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων εμφανίζει αντικαταθλιπτικές δράσεις σε θηλυκούς επίμυες και ενισχύει την επίδραση των SSRI αντικαταθλιπτικών (Estrada-Camarena et al., 2010). Τα οιστρογόνα φαίνεται να έχουν αντικαταθλιπτικές δράσεις και σε αρσενικούς επίμυες (Martinez-Mota et al., 2008). Τέλος, κλινικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι η θεραπεία με οιστρογόνα κατά τη διάρκεια της περί –εμμηνόπαυσης στις γυναίκες ανακουφίζει τα συμπτώματα της κατάθλιψης (Soares, 2008).

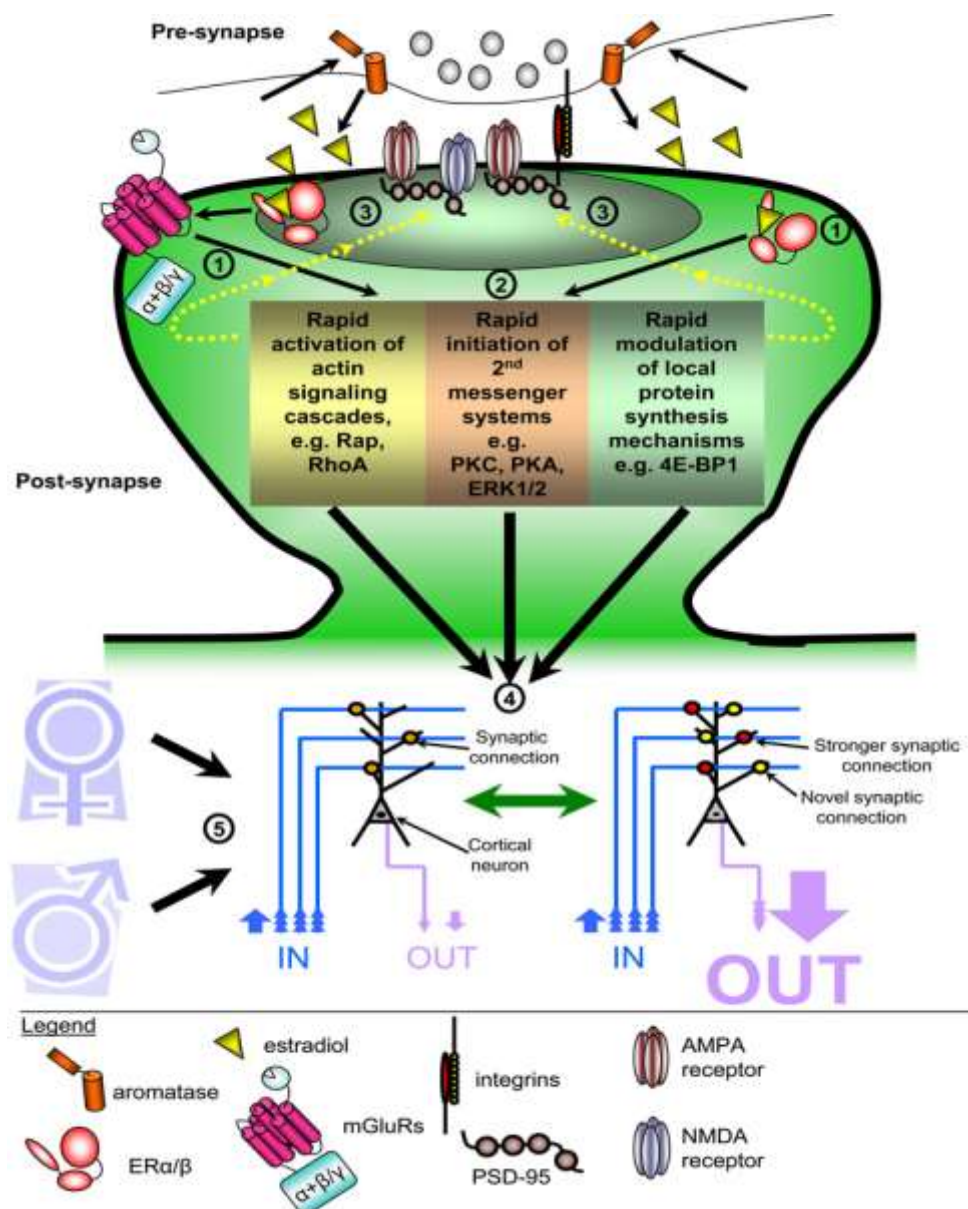
Όπως προαναφέρθηκε, η ανακάλυψη νευροστεροειδών έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση άλλων μηχανισμών δράσης των οιστρογόνων, οι οποίοι είναι ταχείς- μη γονιδιακοί και περιλαμβάνουν ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών καταρρακτών σηματοδότησης και τοπικής σύνθεσης πρωτεϊνών (Srivastava et al., 2011). Ταχεία σηματοδότηση από τα οιστρογόνα έχει εντοπιστεί σε όλο το ΚΝΣ συμπεριλαμβανομένου και του ιππόκαμπου, όπου αυτές οι δράσεις είναι καλά τεκμηριωμένες. Τέτοια σηματοδότηση αποτελεί η ταχεία ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της PKC, IP3, και η τοπική σύνθεση πρωτεϊνών. Αυτή η τοπική σύνθεση πρωτεϊνών αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο για τη μακράς διάρκειας συναπτική πλαστικότητα του ιππόκαμπου και μπορεί να μεταβάλλει τη δομή των δενδριτών και των συνάψεων (Srivastava et al., 2011). Επίσης είναι ενδιαφέρον, ότι στα θηλυκά η τοπική σύνθεση οιστρογόνων στον ιππόκαμπο είναι συγχρονισμένη με τον κύκλο των ωοθηκών μέσω της ορμόνης απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης (GnRH) (Fester et al., 2011). Αυτός ο συγχρονισμός θα μπορούσε να εξηγήσει περαιτέρω την αύξηση των ακάνθων από τα περιφερικά οιστρογόνα κατά την διάρκεια του πρόοιστρου σε θηλυκούς επίμυες (Leuner and Shors, 2012).

Επιπροσθέτως, *in vitro* μελέτες με τον αναστολέα της αρωματάσης, λετροζόλη, έχουν δείξει ότι η αναστολή της τοπικής σύνθεσης οιστρογόνων στον ιππόκαμπο μειώνει τον αριθμό των συνάψεων καθώς και τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων (Fester et al., 2011). Η θεραπεία με λετροζόλη σε θηλυκούς μύες

με ωθηκεκτομή μειώνει τις συνάψεις, καθώς και τους NMDA υποδοχείς στον ιππόκαμπο (Zhou et al., 2010). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ρύθμιση της συναπτικά εντοπισμένης αρωματάσης είναι ένας μηχανισμός για την ελεγχόμενη παραγωγή και απελευθέρωση της οιστραδιόλης από τις προσυναπτικές απολήξεις (Remage-Healey et al., 2011, Saldanha et al., 2011). (Σχήμα 7).

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ως νευρορρυθμιστές τα οιστρογόνα εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική, νευροτροφική και νευροπροστατευτική δράση, εφόσον προάγουν την ικανότητα επιβίωσης των νευρικών κυττάρων, τη συναπτική πλαστικότητα και αποτρέπουν την εκφύλιση των νευρώνων (Garcia-Segura et al., 2001). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα οιστρογόνα κατέχουν σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο της νευρογένεσης, διότι διεγείρουν την παραγωγή νέων κοκκιωδών κυττάρων στον ιππόκαμπο των θηλυκών ενήλικων επιμύων (Gould et al., 2000). Η αφαίρεση των οιστρογόνων λόγω ωθηκεκτομής προκαλεί τη μείωση του πολλαπλασιασμού των πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων, φαινόμενο το οποίο αποτρέπεται με εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων. Επίσης, κατά τη φάση του πρόοιστρου, που τα επίπεδα οιστρογόνων είναι υψηλά, ο αριθμός των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου των θηλυκών επιμύων είναι ιδιαίτερα υψηλός σε σχέση με τη φάση του δίοιστρου που τα επίπεδα οιστρογόνων είναι ιδιαίτερα χαμηλά (Tanapat et al., 1999). Είναι αξιοσημείωτο ότι η διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον ιππόκαμπο από την οιστραδιόλη, λαμβάνει χώρα μέσω σεροτονινεργικών μηχανισμών, εφόσον έχει δειχθεί ότι σε θηλυκούς επίμυες που είχαν υποστεί ωθηκεκτομή και αναστολή της σύνθεσης της σεροτονίνης (5-HT) με π-χλωροφαινυλαλανίνη, η χορήγηση της πρόδρομου ουσίας της 5-HT, 5-υδροξυτριπτοφάνη επανάφερε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που μείωσε η ωθηκεκτομή, ενώ η χορήγηση οιστραδιόλης σε επίμυες με ανεσταλμένη τη σύνθεση 5-HT δεν είχε ανάλογο αποτέλεσμα (Banasr et al., 2001). Τέλος, είναι πιθανόν ότι οι νευροπροστατευτικές δράσεις των οιστρογόνων ειδικά στην περιοχή του ιππόκαμπου εμπλέκουν το νευροτροφικό παράγοντα BDNF, εφόσον έχουν παρόμοιες δράσεις στην αύξηση του αριθμού των συνάψεων, στο φαινόμενο της νευρογένεσης στον ιππόκαμπο και στις διεργασίες της μνήμης (Scharfman and Macluskay, 2005). Άλλωστε, ένα μεγάλο μέρος των δράσεων τους προέρχεται από την ενεργοποίηση των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων, μέσω των MAPK και ERK κινασών (Scharfman and Macluskay, 2005).

Η νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων έχει προταθεί ότι λαμβάνει χώρα και μέσω μη γενομικών μηχανισμών (McEwen, 1991), δηλαδή μέσω ταχείας αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες (π.χ. υποδοχείς) της μεμβράνης (Mermelstein et al., 1996, Valverde et al., 1999) ή του κυτταροπλάσματος (Improta-Brears et al., 1999, Abraham et al., 2003). Τέτοιες δράσεις έχουν περιγραφεί σε καλλιέργειες ιππόκαμπου, όπου η οιστραδιόλη προστατεύει τους νευρώνες από την τοξικότητα από διέγερση, μέσω άμεσης αναστολής του NMDA υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης (Weaver et al., 1997).



Σχήμα 7: Πιθανοί ταχείς μεταφραστικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια των οιστρογόνων σε νευρώνες ιπποκάμπου (Srivastava et al., 2013).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι σε βλάβες του εγκεφάλου και σε εγκεφαλική ισχαιμία αυξάνεται η έκφραση της αρωματάσης και ανευρίσκεται ακόμα και σε αστροκύτταρα που δεν την εκφράζουν υπό φυσιολογικές συνθήκες (Garcia-Segura et al., 1999a, Garcia-Segura et al., 1999b).

Συμπερασματικά, έχει προταθεί ότι τα νευροοιστρογόνα είναι υπεύθυνα για τη μικρορρύθμιση των νευρωνικών κυκλωμάτων σε αρσενικά και θηλυκά, ενεργοποιώντας την ταχεία σηματοδότηση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μακροχρόνια επίδραση στις συνάψεις με ένα φύλο-εξαρτώμενο τρόπο (Srivastava et al., 2011).

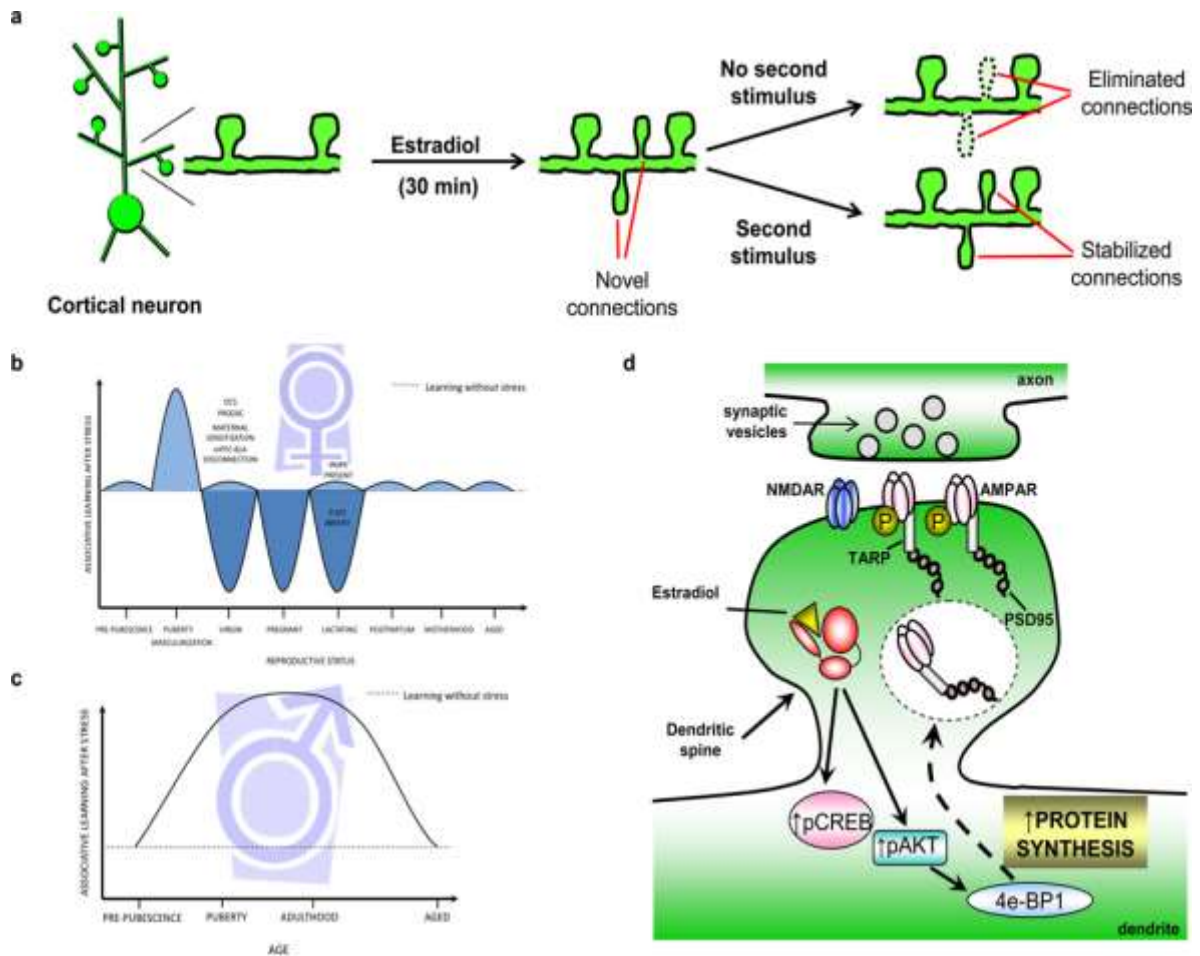
1.8 Δράσεις οιστρογόνων και υποδοχέων τους σε νευρωνικά κυκλώματα

Οι δράσεις οργάνωσης των οιστρογόνων κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου προκαλούν τη διαφοροποίηση και «προγραμματισμό» των νευρωνικών συστημάτων του εγκεφάλου. Συνεπώς, τα νευρωνικά συστήματα του εγκεφάλου είναι «προγραμματισμένα» με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε αυτά να αντιδρούν στα ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα με φύλο-εξαρτώμενο τρόπο (Cohen-Bendahan et al., 2005). Όπως προαναφέρθηκε, οι δράσεις των ορμονών του φύλου στον εγκέφαλο κατά την ενήλικη ζωή, ονομάζονται δράσεις «ενεργοποίησης». Μέσω των δράσεων ενεργοποίησης, οι ορμόνες του φύλου επηρεάζουν (ενεργοποιούν) την εμφάνιση αναπαραγωγικών και μη αναπαραγωγικών συμπεριφορών κατά την ενήλικη ζωή.

Η μεταβολή των νευρωνικών κυκλωμάτων είναι σημαντική για την επεξεργασία και αποθήκευση πληροφοριών στον εγκέφαλο. Η εν λόγω μικρορρύθμιση, η οποία πραγματοποιείται μέσω αλλαγών στη συναπτική λειτουργία και στη δομή, θεωρείται ότι είναι ένας βασικός κυτταρικός προσδιοριστής της μνήμης και της μάθησης, της συμπεριφοράς και της γνωσιακής λειτουργίας (Chklovskii, 2004, Chklovskii et al., 2004). Επίσης, πολλαπλοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων, το περιβάλλον και τα εξωγενή σήματα συμβάλουν στην τροποποίηση των νευρωνικών κυκλωμάτων. Άλλωστε, νευροεκφυλιστικές και ψυχικές διαταραχές, έχουν συσχετιστεί με ανωμαλίες των νευρωνικών κυκλωμάτων (Fiala et al., 2002, Hoogenraad and Akhmanova, 2010, Penzes et al., 2011). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η στόχευση μηχανισμών που ελέγχουν την αναδιαμόρφωση των νευρωνικών κυκλωμάτων μπορεί να συμβάλλει στη θεραπεία νευροψυχιατρικών διαταραχών.

Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα επηρεάζουν πολλαπλές φυσιολογικές διεργασίες του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της γνωσιακής λειτουργίας και της συμπεριφοράς (Brinton, 2009, McEuen et al., 2009, Macbeth and Luine, 2010). Επίσης, τα οιστρογόνα επηρεάζουν την κινητικότητα των επίμυων μέσω δράσεων ενεργοποίησης σε περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο κερκοφόρος πυρήνας, ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος, η μέλανα ουσία, η κοιλιακή καλυπτρική περιοχή, A9 and A10 και ντοπαμινεργικοί νευρώνες στο μεσεγκέφαλο (Joyce et al., 1984, Thompson and Moss, 1997, McEwen and Alves, 1999). Τέλος, επηρεάζουν τη ρύθμιση του συναισθήματος μέσω των πολλαπλών δράσεων τους στον εγκέφαλο και πιθανώς ειδικότερα μέσω του σεροτονινεργικού συστήματος του πυρήνα της ραφής στο εγκεφαλικό στέλεχος (Fink et al., 1998, Sumner et al., 1999), (Σχήμα 8).

Όσον αφορά στους υποδοχείς των οιστρογόνων, έχουν αναγνωρισθεί και κλωνοποιηθεί δύο πυρηνικοί υποδοχείς των οιστρογόνων οι ERα και οι ERβ (McEwen and Alves, 1999). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν την ίδια ικανότητα πρόσδεσης της 17β-οιστραδιόλης, ενώ εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια για άλλα φυσικά και συνθετικά οιστρογόνα (Sun et al., 1999). Η κύρια κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων είναι στον υποθάλαμο, ωστόσο αυτοί ανευρίσκονται και σε πολλές άλλες περιοχές του ΚΝΣ, όπως είναι ο πρόσθιος και ο αισθητικός φλοιός, ο υπόκαμπος, η αμυγδαλή, η παρεγκεφαλίδα, το ραβδωτό σώμα και η ραφή (McEwen and Alves, 1999). Στις περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου οι ERα και ERβ φαίνεται να συνεντοπίζονται, αλλά η πιο λεπτομερειακή μελέτη της κατανομής τους δείχνει ότι οι ERβ βρίσκονται κυρίως σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη μνήμη, όπως ο υπόκαμπος, ο θάλαμος, ο πρόσθιος και ρινικός φλοιός, καθώς και σε περιοχές που σχετίζονται με τη συμπεριφορά κινήτρου, όπως ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος και η κοιλιακή καλυπτρική περιοχή. Αξιοσημείωτο είναι επίσης, ότι οι ERβ βρίσκονται σε αφθονία και στον πυρήνα της ραφής που ελέγχει την έκλυση της σεροτονίνης. Αντιθέτως, οι ERα φαίνεται να ρυθμίζουν τις αναπαραγωγικές διαδικασίες, αν και βρίσκονται και σε μεγάλη αφθονία στην αμυγδαλή που κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του συναισθήματος (McEwen and Alves, 1999).

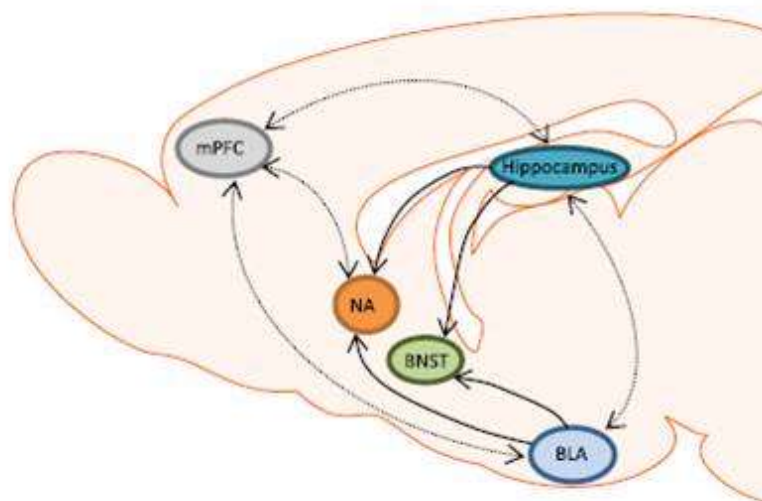


Σχήμα 8. Προτεινόμενοι ρόλοι των οιστρογόνων στον εγκέφαλο (Srivastava et al., 2011).

Διαφορές του φύλου έχουν περιγραφεί σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης (Dalla et al., 2011). Το κύκλωμα που αποτελείται από τον προμετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο, φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο στην εμφάνιση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης, καθώς και στην αντικαταθλιπτική απόκριση (Drevets et al., 2008) (Σχήμα 9). Συγκεκριμένα ο προμετωπιαίος φλοιός εμπλέκεται σε σύνθετες λειτουργίες, όπως η επεξεργασία των ερεθισμάτων, ο έλεγχος του στρες, η μνήμη εργασίας, η χρονική οργάνωση της συμπεριφοράς και τη συμπεριφοράς ευελιξίας (Cerqueira et al., 2007). Ο ιππόκαμπος είναι απαραίτητος για την αντιμετώπιση του στρες και ορισμένων διεργασιών της μάθησης και της μνήμης (Dalla et al., 2009b, Small et al., 2011). Είναι αξιοσημείωτο, ότι ο ιππόκαμπος εμπλέκεται σε μείωση της συνειρμικής μάθησης σε θηλυκούς επίμυες και αύξηση σε αρσενικούς επίμυες, μετά από έκθεση σε οξύ στρες (Bangasser and Shors, 2007). Αυτό το είδος συνειρμικής μάθησης έχει συνδεθεί με την πυκνότητα

των ακάνθων (spines) στον ιππόκαμπο, ενώ το οξύ στρες μειώνει την πυκνότητα των ακάνθων στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου σε θηλυκούς επίμυες και την ενισχύει σε αρσενικούς με ένα NMDA-εξαρτώμενο τρόπο (Dalla et al., 2009b, Leuner and Shors, 2012). Ομοίως, άλλα πειράματα έχουν δείξει ότι η νευρογένεση σε αρσενικούς επίμυες, η οποία αξιολογείται από τα επίπεδα του νέου πολλαπλασιασμού κυττάρων στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου, μειώνεται σε αρσενικούς επίμυες που εκτέθηκαν σε μη ελεγχόμενο στρες, αλλά όχι σε θηλυκούς (Shors et al., 2007).

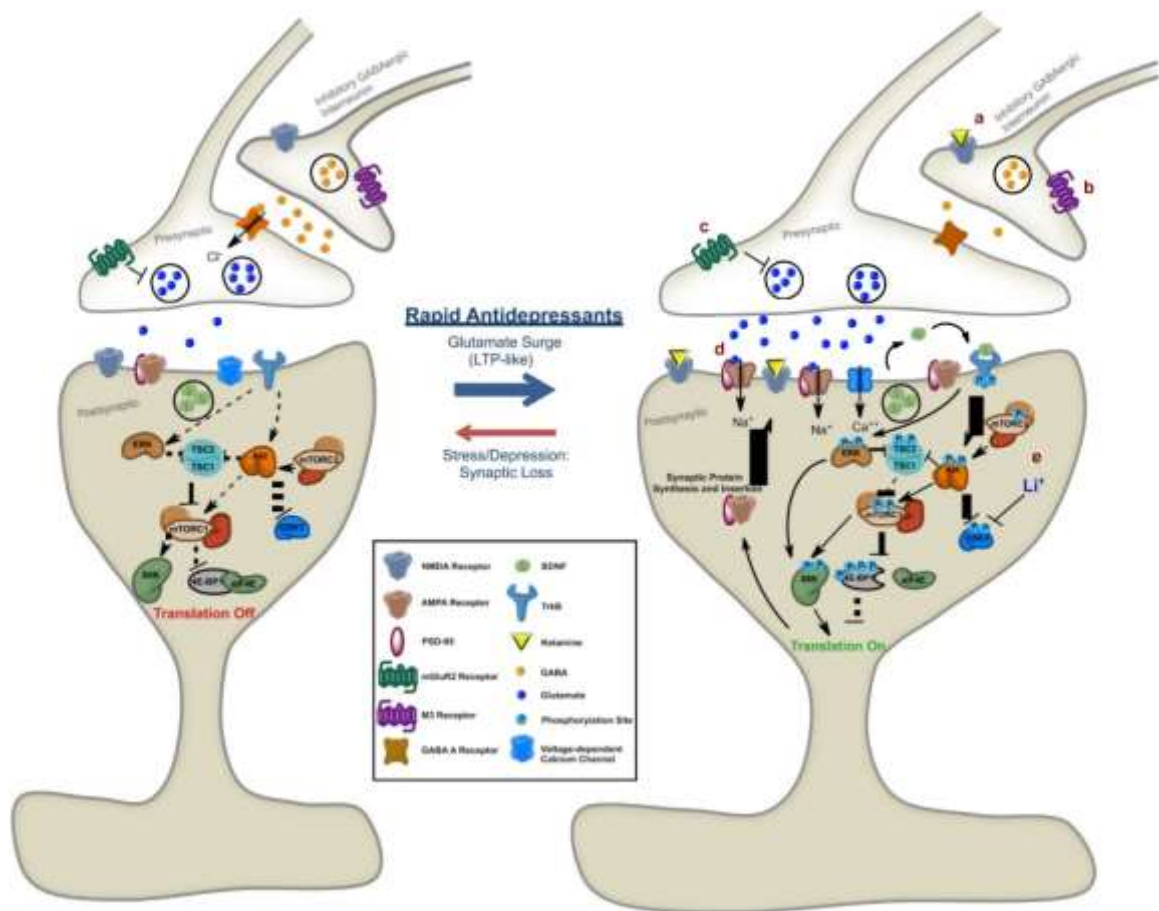
Όσον αφορά στη σεροτονίνη (5-HT), έχει βρεθεί ότι το χρόνιο ήπιο στρες (CMS), μειώνει τη σεροτονινεργική δραστηριότητα του ιππόκαμπου σε θηλυκούς επίμυες, αλλά όχι σε αρσενικούς (Dalla et al., 2005a). Επίσης, το χρόνιο ήπιο στρες, επέφερε αλλαγές εξαρτώμενες από το φύλο στην έκφραση του mRNA των υποδοχέων 5-HT στον ιππόκαμπο και στο φλοιό (Pitychoutis et al., 2012).



Σχημα 9. Νευρωνικά κυκλώματα που εμπλέκονται στις διαταραχές της διάθεσης

Η 5-HT θεωρείται ότι είναι ένας νευρορρυθμιστής που εμπλέκεται σε αργές νευρωνικές αποκρίσεις. Από την άλλη πλευρά, ένας άλλος νευροδιαβιβαστής, το γλουταμικό οξύ φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο στην κατάθλιψη και στην αντικαταθλιπτική δράση. Το γλουταμικό οξύ προκαλεί ταχεία διέγερση των νευρώνων μέσω ιοντοτροπικών υποδοχέων, όπως AMPA και NMDA, με αποτέλεσμα την ταχεία ενδοκυτταρική σηματοδότηση (Duman and Voleti, 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι οι ανταγωνιστές του γλουταμικού οξέος προκαλούν ταχέως (μέσα σε 2 ώρες)

αντικαταθλιπτικές δράσεις μέσω ενεργοποίησης της ταχείας οδού σηματοδότησης που διεγείρουν τοπική μετάφραση πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης των τοπικών συναπτικών πρωτεϊνών (Duman and Voleti, 2012) (Σχήμα 10). Επίσης διαφορές του φύλου έχουν παρατηρηθεί και στην απόκριση του συστήματος του γλουταματεργικού οξέος σε μοντέλα κατάθλιψης, αλλά οι μελέτες είναι περιορισμένες (Kokras et al., 2009b, Pitychoutis et al., 2011).



Σχήμα 10. Σηματοδοτικά μονοπάτια ταχείας αντικαταθλιπτικής δράσης όπως έχουν μελετηθεί με τροποποιητές του γλουταματεργικού συστήματος π.χ. ανταγωνιστές NMDA (πηγή (Dwyer and Duman, 2013).

1.9 Διαφυλικές διαφορές σε πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης

Στη βασική έρευνα χρησιμοποιούνται ευρέως ζωικά μοντέλα για τη μελέτη της νευροβιολογίας των ψυχιατρικών διαταραχών και για την εύρεση νέων στόχων φαρμάκων (Neumann et al., 2011, Stephens et al., 2013). Ωστόσο, στις προκλινικές φαρμακολογικές μελέτες χρησιμοποιούνται κυρίως αρσενικά πειραματόζωα και τα πειραματικά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί επί το πλείστο σε αρσενικά ζώα (Beery and Zucker, 2011). Συνήθως θεωρείται ότι η συμπεριφορά των θηλυκών είναι παρόμοια με τη συμπεριφορά των αρσενικών, αλλά περισσότερο μεταβλητή. Ως εκ τούτου, συχνά τα θηλυκά ζώα δεν περιλαμβάνονται στις πειραματικές μελέτες, γιατί οι ερευνητές ανησυχούν ότι ο κύκλος του οίστρου μπορεί να μεταβάλλει τα αναμενόμενα αποτελέσματα (Becker et al., 2005). Επιπρόσθετα, δεν είναι γνωστό σε ποιο σημείο της εξελικτικής ιστορίας προέκυψαν οι διαφορές του φύλου που καθιστούν τα θηλυκά περισσότερο ή λιγότερο ευάλωτα σε ορισμένες ψυχικές διαταραχές (Cryan and Mombereau, 2004). Ως εκ τούτου, παραμένει ανοικτό προς συζήτηση, το κατά πόσο τα τρωκτικά είναι πράγματι ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη των διαφορών του φύλου στην ψυχιατρική. Παρόλα αυτά, η ανάγκη για να συμπεριληφθούν, και τα δύο φύλα σε πειραματικές φαρμακολογικές μελέτες έχει τονισθεί επανειλημμένα (Hughes, 2007). Έχει υποστηριχθεί ότι η χρήση και των δύο φύλων, θα ενισχύσει την εγκυρότητα των ζωικών μοντέλων και θα συμβάλλει στην πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία των ψυχιατρικών διαταραχών σε κάθε φύλο. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η έρευνα σχετικά με τα νέα ψυχοτρόπα μόρια θα πρέπει να λάβει υπόψη τις πιθανές διαφορές μεταξύ των φύλων, έτσι ώστε να μην χαθούν σημαντικές πληροφορίες και ανακαλύψεις (Dalla et al., 2010b, Wald and Wu, 2010). Σήμερα, όλο και περισσότερες πειραματικές μελέτες περιλαμβάνουν και τα δύο φύλα με αποτέλεσμα την ανακάλυψη πολλαπλών διαφορών του φύλου στα μοντέλα των ψυχιατρικών διαταραχών και στην απόκριση στα φάρμακα.

Η ανάπτυξη ενός ιδανικού πειραματικού προτύπου εξομοίωσης σε πειραματόζωα μιας ανθρώπινης ασθένειας, όπως αυτή της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής, αποτελεί στόχο δύσκολο έως ακατόρθωτο (Willner, 1995, Palanza, 2001).

Ωστόσο, έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες να δημιουργηθούν έγκυρα μοντέλα κατάθλιψης ή τουλάχιστον να εξομοιωθούν κάποια βασικά συμπτώματα της νόσου (Nestler et al., 2002). Τα σύγχρονα πειραματικά μοντέλα στοχεύουν στη μίμηση ή αναπαραγωγή ενός συμπτώματος ή μερικών στην καλύτερη περίπτωση από τα κύρια

συμπτώματα της κατάθλιψης (π.χ. απελπισία, ανηδονία) καθώς το σύνδρομο της κατάθλιψης που παρατηρείται στους ανθρώπους δεν μπορεί να παρατηρηθεί ή να εξομοιωθεί συνολικά σε πειραματόζωα.

Με αυτό τον τρόπο τα πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης χρησιμοποιούνται ευρέως για να μελετηθεί η νευροβιολογία της κατάθλιψης και ο μηχανισμός δράσης γνωστών αλλά και υποψήφιων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Τα περισσότερα πρότυπα κατάθλιψης βασίζονται στην έκθεση στο στρες είτε κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου είτε κατά την ενήλικη ζωή των πειραματόζωων. Ακόμη, μπορούν να βασίζονται σε γενετικούς χειρισμούς ή σε εκλεκτική αναπαραγωγή πειραματόζωων. Πράγματι, φαρμακολογικοί, περιβαλλοντικοί και γενετικοί χειρισμοί, καθώς και χειρισμοί που συμπεριλαμβάνουν εγκεφαλικές βλάβες έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη μεταβολή της συμπεριφοράς των πειραματόζωων με τέτοιο τρόπο, ώστε να συνδεθεί με «καταθλιπτική» ή «αντικαταθλιπτική» συμπεριφορά (Cryan and Mombereau, 2004). Τα περισσότερα μοντέλα κατάθλιψης όμως, έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες ή σε διαδικασίες που προκαλούν αποστροφή ή αποφυγή (Porsolt, 1979, Papp et al., 1991, Nestler et al., 2002). Συγκεκριμένα τα μοντέλα αυτά βασίζονται σε συμπεριφορικές αποκρίσεις των πειραματόζωων σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα που εξελίσσονται σε μικρότερη ή μεγαλύτερη χρονική διάρκεια.

Κάθε ένα από αυτά τα πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης μπορεί να αξιολογηθεί με βάση τρία γενικότερα παραδεκτά κριτήρια: φαινομενική (face), θεωρητική/δομική (construct) και προβλεπτική (predictive) αξία (Willner, 1995, Wong and Licinio, 2004).

Η φαινομενική αξία (face validity) του μοντέλου εξετάζει πόσο επιτυχημένα το μοντέλο μιμείται ένα ή περισσότερα συμπτώματα της κατάθλιψης που παρατηρείται στους ανθρώπους. Πειραματικά μοντέλα όπως το χρόνιο ήπιο στρες θεωρείται ότι έχουν υψηλότερη φαινομενική αξία (αφού προσομοιάζει την ανηδονία) ενώ άλλα, όπως η δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης θεωρείται ότι έχουν χαμηλότερη φαινομενική αξία.

Η θεωρητική αξία (construct validity) ενός μοντέλου, εξετάζει κατά πόσο το προτεινόμενο μοντέλο κατάθλιψης ακολουθεί μια αποδεκτή θεωρία για την παθοφυσιολογία της κατάθλιψης, για τους μηχανισμούς πρόκλησης της νόσου ή για το εγγενές υπόστρωμα της νόσου. Στα μοντέλα κατάθλιψης η θεωρητική λογική είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί, διότι δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί οι μηχανισμοί

πρόκλησης της νόσου και η ακριβής παθοφυσιολογία της. Παρόλα αυτά, η θεωρητική αξία ενός μοντέλου αξιολογείται με βάση το κατά πόσο ενσωματώνει κάποια από τις προταθείσες θεωρίες για την παθοφυσιολογία της κατάθλιψης.

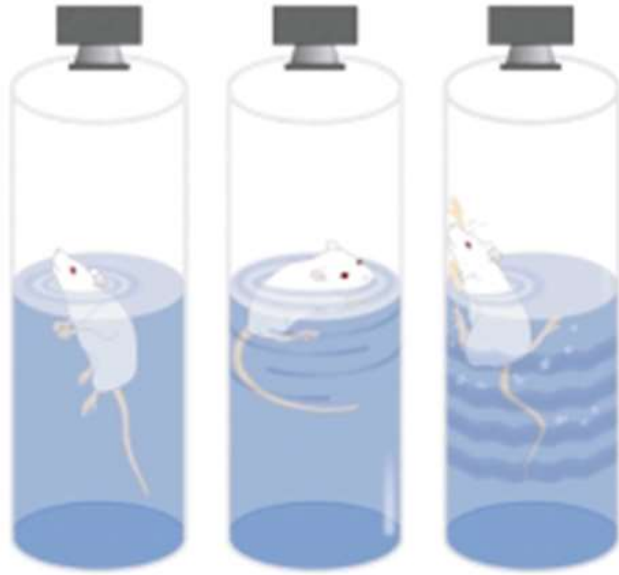
Η προβλεπτική αξία (predictive validity) τέλος ενός μοντέλου αναφέρεται στο κατά πόσο με τη χρήση αυτού του μοντέλου, επιβεβαιώνεται η αναστροφή των μιμούμενων συμπτωμάτων κατόπιν αγωγής με αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Είναι πολύ σημαντικό με τη χρήση ενός μοντέλου κατάθλιψης να διακρίνονται πραγματικά οι ουσίες με κλινική αντικαταθλιπτική δράση και να μη δίνονται «ψευδώς θετικά» αποτελέσματα. Με βάση τα παραπάνω, τα ζωικά μοντέλα κατάθλιψης βασίζονται συνήθως στην αναπαραγωγή ενός ή μερικών καταθλιπτικών συμπτωμάτων (π.χ. απελπισία, ανηδονία). Μερικά από τα πιο δημοφιλή μοντέλα είναι το μοντέλο της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), το μοντέλο μαθημένης ανυπαρξίας βοήθειας και το μοντέλο χρόνιου ήπιου στρες (CMS). Επιπροσθέτως, έχουν προταθεί διάφορα γενετικά μοντέλα κατάθλιψης (Dalla et al., 2010a).

1.10 Δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης

Το μοντέλο αυτό βασίζεται στην παρατήρηση ότι επίμυες οι οποίοι τοποθετούνται σε έναν κύλινδρο με νερό από τον οποίο δεν μπορούν να διαφύγουν, αρχικά εκτελούν κινήσεις διαφυγής (κολύμβηση) και τελικά αναπτύσσουν συμπεριφορά απελπισίας, δηλαδή «ακινησία/ επίπλευση» (Porsolt, 1979). Όταν οι ίδιοι επίμυες τοποθετηθούν στον κύλινδρο 24 ώρες μετά, αναπτύσσουν αυτή τη συμπεριφορά πολύ πιο γρήγορα. Η συμπεριφορά «ακινησίας» θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει είτε την αποτυχία διαφυγής (συμπεριφορά απελπισίας), είτε την ανάπτυξη παθητικών συμπεριφορών, σε αντίθεση με τις ενεργητικές συμπεριφορές που αποτελούν ένδειξη αντιμετώπισης της στρεσογόνου κατάστασης (Porsolt, 1979, Cryan et al., 2005). Σε αντίθεση με τους επίμυες, για λόγους που δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, μία δοκιμασία κολύμβησης είναι αρκετή για τους μύες, έτσι ώστε να εγκατασταθεί η συμπεριφορά «ακινησίας». Θεωρητικά θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι το μοντέλο της εξαναγκασμένης κολύμβησης σε μύες και επίμυες «προσομοιώνει» το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της απελπισίας/ ανυπαρξίας βοήθειας που απαντάται στην ενδογενή κατάθλιψη. Τα κλασσικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα, όταν δίνονται μεταξύ των δύο δοκιμασιών κολύμβησης σε επίμυες ή πριν τη μοναδική δοκιμασία κολύμβησης σε μύες αναστέλλουν τη συμπεριφορά απελπισίας, αυξάνοντας το χρόνο κολύμβησης. Νέες

ουσίες που δίνουν θετικά αποτελέσματα στο συγκεκριμένο μοντέλο παρέχουν τις αρχικές ενδείξεις για μια εν δυνάμει αντικαταθλιπτική δράση (Porsolt et al., 1978, Cryan et al., 2002). Η δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης χρησιμοποιείται ευρύτατα για την έρευνα και την μελέτη της απάντησης των πειραματόζωων σε γνωστά αλλά και σε νέα υπονήφια αντικαταθλιπτικά. Σε αυτό το μοντέλο, τα πειραματόζωα εξαναγκάζονται να κολυπήσουν σε ένα κύλινδρο γεμάτο νερό για δύο συνεδρίες σε δύο συνεχόμενες ημέρες. Κατά τη διάρκεια της πρώτης συνεδρίας, η οποία διαρκεί 15 λεπτά, τα πειραματόζωα αρχικά προσπαθούν να διαφύγουν υιοθετώντας ενεργητικές συμπεριφορές αναρρίχησης (climbing) ή κολύμβησης (swimming). Ωστόσο, ήδη από την πρώτη συνεδρία αλλά κυρίως κατά τη διάρκεια της δεύτερης συνεδρίας, η οποία διαρκεί 5 λεπτά, τα πειραματόζωα υιοθετούν μια χαρακτηριστική παθητική συμπεριφορά ακινησίας (immobility, floating) (Σχήμα 11). Αυτή η συμπεριφορά, που συνίσταται μόνο σε εκείνες τις κινήσεις από μέρους του πειραματόζωου που είναι απαραίτητες για να επιπλεύσει, θεωρείται ότι είναι δηλωτική απελπισίας και είναι ιδιαίτερα σημαντικό ότι αναστρέφεται από τη χρόνια ή υπό-οξεία χορήγηση αντικαταθλιπτικών (Porsolt et al., 1978, Cryan et al., 2005).

Το μοντέλο αυτό είναι εύκολο και σύντομο στη χρήση και έχει μεγάλη προβλεπτική ισχύ. Υπάρχουν όμως, αμφιβολίες για την ερμηνεία της συμπεριφοράς «ακινησίας», ως αποτυχία αντιμετώπισης της στρεσογόνου διαδικασίας. Έχει προταθεί η άποψη ότι η συμπεριφορά «ακινησίας» μπορεί να αντανakλά μια στρατηγική «προσαρμογής», η οποία επιτρέπει στο πειραματόζωο να διατηρεί την ενέργεια του και να επιβιώνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Thierry et al., 1984, Borsini and Meli, 1988).



Σχήμα 11: Μοντέλο Εξαναγκασμένης Κολύμβησης

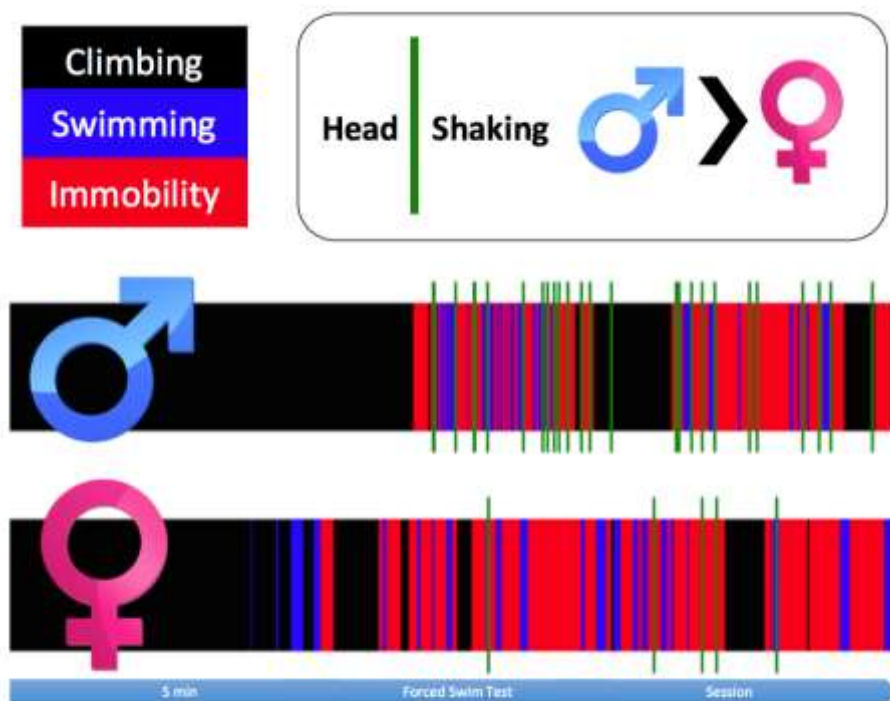
Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου εξαναγκασμένης κολύμβησης και των τριών βασικών συμπεριφορικών παραμέτρων που αξιολογούνται: της ακινησίας, της κολύμβησης και της αναρρίχησης (Cryan et al., 2002).

Επίσης, ένα μεγάλο πρόβλημα στο κλασσικό μοντέλο εξαναγκασμένης κολύμβησης είναι ότι δεν ανιχνεύει με αξιοπιστία τα αντικαταθλιπτικά δεύτερης γενιάς, όπως είναι τα SSRI. Για το λόγο αυτό έγιναν ορισμένες βελτιώσεις στο μοντέλο, όπως αύξηση του βάθους του νερού και αναλυτική καταμέτρηση των επιμέρους ενεργητικών συμπεριφορών, όπως «σκαρφάλωμα», οριζόντια «κολύμβηση» και «ακινησία» (Cryan et al., 2002). Το βελτιωμένο αυτό μοντέλο έχει το πλεονέκτημα ότι διακρίνει τα κατεχολαμινεργικά από τα σεροτονινεργικά αντικαταθλιπτικά. Συγκεκριμένα, οι ουσίες που δρουν με κατεχολαμινεργικό μηχανισμό μειώνουν την «ακινησία», αυξάνοντας τη συμπεριφορά «σκαρφάλωματος», ενώ τα SSRI μειώνουν τη συμπεριφορά «ακινησίας», αυξάνοντας την «κολύμβηση» (Detke et al., 1995, Kelliher et al., 2003). Ένα άλλο πρόβλημα του μοντέλου εξαναγκασμένης κολύμβησης, το οποίο ισχύει και για άλλα μοντέλα κατάθλιψης, είναι ότι η συμπεριφορά «ακινησίας» μειώνεται μετά από οξεία χορήγηση αντικαταθλιπτικών, ενώ στην κλινική πράξη είναι απαραίτητη η χρόνια χορήγηση αντικαταθλιπτικών για τη βελτίωση της διάθεσης. Παρόλα αυτά, έχειδειχθεί ότι δόσεις αντικαταθλιπτικών ουσιών οι οποίες δεν είναι αποτελεσματικές μετά από οξεία χορήγηση στο μοντέλο της εξαναγκασμένης κολύμβησης, είναι αποτελεσματικές όταν δίνονται χρονίως (Kelliher et al., 2003).

Το πειραματικό πρότυπο της εξαναγκασμένης κολύμβησης αποτελεί επίσης ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη του νευροβιολογικού και γενετικού υποστρώματος της απάντησης στο στρες και της αντικαταθλιπτικής θεραπείας (Porsolt, 1979, 2000). Μέχρι πρόσφατα οι περισσότερες μελέτες είχαν στραφεί στις συμπεριφορικές αποκρίσεις σε αυτό το μοντέλο, αλλά πρόσφατα άρχισαν να μελετώνται σε αρσενικούς επίμυες και οι προκαλούμενες νευροχημικές μεταβολές (Connor et al., 1997, Kirby and Lucki, 1997). Οι μελέτες σε θηλυκούς επίμυες, αν και περιορισμένες δείχνουν ότι τα θηλυκά πειραματόζωα έχουν διαφορετική αντίδραση από ότι τα αρσενικά στο μοντέλο της εξαναγκασμένης κολύμβησης και συγκεκριμένα τα θηλυκά πειραματόζωα εμφανίζουν μικρότερη διάρκεια συμπεριφοράς «ακινήσις/επίπλευσης» και υψηλότερη διάρκεια ενεργητικών συμπεριφορών (Palanza, 2001). Οι φάσεις του κύκλου δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη συμπεριφορά των θηλυκών επίμυων στο μοντέλο της εξαναγκασμένης κολύμβησης, αλλά η αντικαταθλιπτική δράση της ιμιπραμίνης είναι πιο εμφανής στις φάσεις του οίστρου και του πρόοιστρου (Barros and Ferigolo, 1998). Επιπροσθέτως, χορήγηση οιστρογόνων σε επίμυες που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή μειώνει τον χρόνο «ακινήσις» (Okada et al., 1997, Rachman et al., 1998, Estrada-Camarena et al., 2003).

Οι διαφορές του φύλου που παρατηρήθηκαν στην εξαναγκασμένη κολύμβηση, αλλά και η κατεύθυνση αυτών των διαφορών, διαφέρει μεταξύ των μελετών. Στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, έχει δειχθεί επανειλημμένα ότι οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ακινήσις κατά τη διάρκεια της δεύτερης δοκιμασίας της εξαναγκασμένης κολύμβησης, σε σχέση με τους αρσενικούς επίμυες και αυτό είναι ενδεικτικό αυξημένης καταθλιπτικής συμπεριφοράς στους θηλυκούς επίμυες (Drossopoulou et al., 2004, Dalla et al., 2008a, Pitychoutis et al., 2009b, Pitychoutis et al., 2011, Kokras et al., 2012). Ωστόσο, άλλες μελέτες δείχνουν αντίθετα αποτελέσματα όσον αφορά στα επίπεδα της ακινήσις (Alonso et al., 1991, Barros and Ferigolo, 1998, Brotto et al., 2000, Brummelte et al., 2006, Martinez-Mota et al., 2011) ή δεν βρίσκουν διαφορές του φύλου (Poltyrev et al., 2005, Andrade et al., 2007, Alves et al., 2008). Επίσης, μια άλλη συμπεριφορά στην οποία εμφανίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης είναι η συχνότητα των τιναγμάτων της κεφαλής. Οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζουν χαμηλότερη συχνότητα σε σχέση με τους αρσενικούς

επίμυες (Barros and Ferigolo, 1998, Drossopoulou et al., 2004, Kokras et al., 2009a) (Σχήμα 12).



Σχήμα 12: Η συμπεριφορά «τινάγματος κεφαλής» (με πράσινες γραμμές) στη δεύτερη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης είναι υψηλότερη στους αρσενικούς επίμυες σε σχέση με τους θηλυκούς. Επίσης, στο σχήμα φαίνεται η διάρκεια των συμπεριφορών αναρρίχησης (με μαύρο χρώμα), κολύμβησης (με μπλε χρώμα) και ακινησίας (με κόκκινο χρώμα), όπως καταγράφονται στο πρόγραμμα kinoscope από εκπαιδευμένους ερευνητές (Kokras et al., 2016).

Πιθανότατα, οι λόγοι για τις διαφορές στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης είναι οι διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται στα διάφορα εργαστήρια (π.χ. διαφορές στις διαστάσεις της δεξαμενής, τη θερμοκρασία, το βάθος του νερού, τον αριθμό των συνεδριών κλπ.). Αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με τη χρήση τυποποιημένων έγκυρων πρωτοκόλλων για την εξαναγκασμένη κολύμβηση που έχουν ήδη περιγραφεί για αρσενικά τρωκτικά (Slattery and Cryan, 2012). Όσον αφορά στον κύκλο του οίστρου, οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η φάση του κύκλου του οίστρου δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη βασική συμπεριφορική απόκριση των θηλυκών στη δοκιμασία της

εξαναγκασμένης κολύμβησης (Alonso et al., 1991, Bravo and Maswood, 2006, Jans et al., 2007, Tonelli et al., 2008, Andrade et al., 2010, Craft et al., 2010, Allen et al., 2012, Kokras et al., 2012, Flores-Serrano et al., 2013). Ωστόσο, ο κύκλος του οίστρου θα μπορούσε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντικαταθλιπτική απόκριση, αλλά οι μελέτες με τη χρήση αντικαταθλιπτικών σε ανέπαφους θηλυκούς επίμυες κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων του κύκλου είναι περιορισμένες (Marvan et al., 1996, Barros and Ferigolo, 1998, Contreras et al., 1998, Consoli et al., 2005, Allen et al., 2012, Dalla et al., 2012, Flores-Serrano et al., 2013). Για παράδειγμα, η χορήγηση της σερτραλίνης (SSRI) σε χαμηλή δόση (10 mg/kg) σε θηλυκούς επίμυες κατά τη μετάβαση από το δίοιστρο σε πρόοιστρο δεν εμφανίζει αντικαταθλιπτική δράση. Ωστόσο, μία υψηλότερη δόση (40 mg/kg) εμφανίζει αντικαταθλιπτική δράση σε όλες τις φάσεις του κύκλου (Kokras et al., 2015a). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των αντικαταθλιπτικών στη μείωση της ακινησίας και στην ενίσχυση της ενεργητικής συμπεριφοράς σε αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα εξαρτάται από την ουσία και το επιλεγμένο σχήμα δόσολογίας (Barros and Ferigolo, 1998, Contreras et al., 1998, Consoli et al., 2005, West and Weiss, 2005, Kokras et al., 2009a, Pitychoutis et al., 2011, Allen et al., 2012, Dalla et al., 2012, Flores-Serrano et al., 2013). Για παράδειγμα, στην εξαναγκασμένη κολύμβηση η σερτραλίνη ενισχύει τη διάρκεια της συμπεριφοράς κολύμβησης και στα δύο φύλα (Kokras et al., 2015a), και αυτό έχει συνδεθεί με αλλαγές στη σεροτονινεργική δραστηριότητα (Detke et al., 1995, Detke and Lucki, 1996, Mikail et al., 2012). Αντιθέτως, η χορήγηση εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης νοραδρεναλίνης, αυξάνει τη νοραδρενεργική δραστηριότητα και τη διάρκεια αναρρίχησης στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (Detke et al., 1995).

1.11 Η εξαναγκασμένη κολύμβηση ως στρεσογόνος παράγοντας: διαφορές του φύλου

Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η εξαναγκασμένη κολύμβηση περιλαμβάνει την έκθεση σε έναν οξύ και ισχυρό παράγοντα στρες. Η απάντηση κάθε οργανισμού στο οξύ στρες περιλαμβάνει κυρίως την ενεργοποίηση δύο συστημάτων: αυτό που περιλαμβάνει τον υπομέλαινα τόπο (locus coeruleus, LC) και το σύστημα της νορεπινεφρίνης και δεύτερον το σύστημα του υποθάλαμο - υποφύσιο - επινεφριδιακού άξονα (YYE). Το πρώτο σύστημα ευθύνεται για την άμεση και ακαριαία απάντηση στο στρες και η

μορφολογία του υπομέλανα τόπου είναι γνωστό ότι παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό καθώς στα θηλυκά πειραματόζωα παρουσιάζει μεγαλύτερο όγκο και αριθμό νευρώνων από ότι στα αρσενικά (Pinos et al., 2001). Επίσης, η νευρωνική του δραστηριότητα ανταποκρίνεται περισσότερο σε συγκεκριμένα στρεσογόνα ερεθίσματα στα θηλυκά από ότι στα αρσενικά πειραματόζωα και αυτό πιθανόν να ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα της ορμόνης της απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (Corticotropin-Releasing Hormone, CRH) (Curtis et al., 2006).

Από την άλλη πλευρά, η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα φαίνεται να ευθύνεται για την βραδύτερη απάντηση στο στρες. Ενεργοποιείται εντός λεπτών από το στρεσογόνο ερέθισμα και ξεκινά από την απελευθέρωση της CRH και της αργινίνης βαζοπρεσσίνης (AVP) από τον υποθάλαμο (DeBold et al., 1984) και συνεχίζει με την απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) από την υπόφυση. Μια τέτοια ακολουθία γεγονότων οδηγεί τελικά στην απελευθέρωση από τον επινεφριδιακό φλοιό προς τη συστηματική κυκλοφορία γλυκοκορτικοειδών όπως η κορτικοστερόνη στους επίμυες και η κορτιζόλη στους ανθρώπους. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα εκκρινόμενα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την περαιτέρω έκκριση ACTH μέσω παλίνδρομης αναστολής, επιτρέποντας έτσι τον τερματισμό της απάντησης στο στρες και κατ' αυτόν τον τρόπο συμβάλλοντας στην διατήρηση της ομοιόστασης (Heinrichs and Koob, 2004). Η παλίνδρομη αυτή ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω της δράσης των γλυκοκορτικοειδών στους υποδοχείς κορτικοστεροειδών (GR και MR) που βρίσκονται σε αφθονία στο μεταιχμιακό σύστημα, ιδιαίτερα στον υποθάλαμο και τον ιπόκαμπο.

Σημαντικός αριθμός εργασιών έχει αναδείξει τον ενδεχόμενα κεντρικό ρόλο που παίζει στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης η νεύρο-ενδοκρινική απάντηση στο στρες. Άλλωστε η πιθανολογούμενη εμπλοκή των περιφερικών γλυκοκορτικοειδών και των υποδοχέων που εμπλέκονται στο σύστημα της νεύρο-ενδοκρινικής απάντησης στο στρες έχει ανασκοπηθεί από πολλούς συγγραφείς και συχνά αναφέρεται ως η νεύρο-ενδοκρινική θεωρία της κατάθλιψης (Tsigos and Chrousos, 2002).

Είναι πολύ ενδιαφέρον όμως ότι όπως και η κατάθλιψη, έτσι και η νεύρο-ενδοκρινική απάντηση στο στρες παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των φύλων. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση των GR/MR υποδοχέων διαφοροποιείται ανάλογα με το φύλο (Karandrea et al., 2000, 2002). Διαφορές μεταξύ των φύλων είναι επίσης εμφανείς σε άλλες πτυχές της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα: οι θηλυκοί επίμυες έχουν υψηλότερα επίπεδα κορτικοστερόνης σε ηρεμία και παρουσιάζουν

μεγαλύτερες ημερήσιες μεταβολές τόσο στην ACTH όσο και στην κορτικοστερόνη σε σχέση με τα αρσενικά (Kitay, 1961, Handa et al., 1994). Επίσης, συγκριτικά με τους αρσενικούς, οι θηλυκοί επίμυες έχουν υψηλότερα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών μετά από οξεία και επαναλαμβανόμενη έκθεση σε στρες και αυτό φαίνεται να εξαρτάται από τις κυκλοφορούσες ορμόνες του φύλου (Galea et al., 1997, Kimura et al., 2003, Seale et al., 2004a, Seale et al., 2004b).

Η παρατεταμένη ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα, όπως στην περίπτωση της επαναλαμβανόμενης ή χρόνιας έκθεσης σε στρες, μπορεί να οδηγήσει σε εξάντληση του συστήματος απάντησης στο στρες και να σταματήσει την επιστροφή σε συνθήκες ομοιόστασης. Σε αυτή την κατάσταση, το στρες συχνά έχει επιβλαβείς επιδράσεις στην ακεραιότητα και τη λειτουργία του εγκεφάλου. Αυτές οι επιδράσεις περιλαμβάνουν μεταβολές στη δραστηριότητα των μονοαμινεργικών συστημάτων, στον ανασχεδιασμό των δενδριτών και των συνάψεων στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό, καθώς και σε επίπεδο νευρογένεσης στον ιππόκαμπο του ενηλίκου εγκεφάλου (Galea et al., 1997, McEwen, 2002, Shors et al., 2007, Dalla and Shors, 2009). Σε πολλές περιπτώσεις, οι μεταβολές αυτές έχουν συνδεθεί με συμπεριφορικές διαταραχές, όπως καταθλιπτικόμορφη συμπτωματολογία και ελλείμματα μάθησης και μνήμης (Kitraki et al., 2004, Bekris et al., 2005, Bowman, 2005, Dalla et al., 2005a, Shors, 2006, Dalla et al., 2008a).

Όπως αναφέρθηκε, ο ΥΥΕ άξονας ενεργοποιείται και στα δύο φύλα μετά από οξεία ή βραχυχρόνια έκθεση σε στρες. Για παράδειγμα, όταν αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα εκτίθενται σε δύο συνεδρίες στρες κολύμβησης σε δύο διαδοχικές ημέρες (forced swim test, FST), τα επίπεδα κορτικοστερόνης αυξάνονται και στα δύο φύλα (Drossopoulou et al., 2004). Σε συμπεριφορικό επίπεδο, και τα δύο φύλα αυξάνουν τα επίπεδα ακινησίας τους κατά τη διάρκεια της δεύτερης συνεδρίας, αλλά όπως προαναφέρθηκε, τα θηλυκά παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα από τα αρσενικά, κάτι που είναι ενδεικτικό αυξημένης απόγνωσης και καταθλιπτικόμορφης συμπτωματολογίας (Drossopoulou et al., 2004, Dalla et al., 2008a, Pitychoutis et al., 2009b).

Αναλόγως, στη δοκιμασία κολύμβησης σε ανοικτό χώρο, η οποία είναι ένα παρόμοιο ζωικό μοντέλο με το FST, οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζονται περισσότερο ευάλωτοι στο στρες κολύμβησης από τους αρσενικούς (Sun and Alkon, 2006). Κατά τη διάρκεια του FST, οι θηλυκοί επίμυες, επίσης παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα συμπεριφοράς τινάγματος της κεφαλής από τους αρσενικούς και αυτό έχει συνδεθεί

με διαφορές του φύλου στη μετασυναπτική δραστηριότητα των σεροτονινεργικών 5-HT_{2A} υποδοχέων (Darmani, 1996, Matuszewich and Yamamoto, 2003, Drossopoulou et al., 2004).

Σε νευροχημικό επίπεδο, στο μοντέλο εξαναγκασμένης κολύμβησης παρατηρείται μείωση της σεροτονινεργικής δραστηριότητας στον ιππόκαμπο και στον υποθάλαμο των θηλυκών πειραματόζωων ενώ αντίθετα η σεροτονινεργική δραστηριότητα αυξάνεται στον υποθάλαμο των αρσενικών. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα mRNA των 5-HT_{1A} υποδοχέων στον υποθάλαμο ανευρίσκονται μειωμένα στα θηλυκά πειραματόζωα ενώ αντίθετα τα επίπεδα mRNA των 5-HT_{1A} στον ιππόκαμπο των αρσενικών πειραματόζωων ανευρίσκονται αυξημένα (Drossopoulou et al., 2004).

Σχετικά με την ντοπαμινεργική δραστηριότητα, αυτή βρίσκεται επίσης αυξημένη στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό των αρσενικών πειραματόζωων κατά τη διάρκεια του μοντέλου εξαναγκασμένης κολύμβησης, ενώ ανάλογες μεταβολές δεν φαίνεται να παρατηρούνται στα θηλυκά πειραματόζωα (Dalla et al., 2008a). Και στα δύο φύλα, υπάρχει μια τάση για αύξηση των επιπέδων mRNA του GR 24 ώρες μετά τη δεύτερη συνεδρία εξαναγκασμένης κολύμβησης (Drossopoulou et al., 2004). Παρόλα αυτά, μετά από μακρύτερες περιόδους επαναλαμβανόμενης έκθεσης σε εξαναγκασμένη κολύμβηση, δεν ανιχνεύθηκαν μεταβολές στα επίπεδα mRNA του GR ή MR στο θηλυκό ιππόκαμπο και υποθάλαμο, ενώ στα αρσενικά υπάρχει μια ρύθμιση προς τα κάτω του mRNA του GR στον ιππόκαμπο (Karandrea et al., 2002).

Συνολικά, φαίνεται ότι οι αρσενικοί επίμυες έχουν μια προσαρμοστική απάντηση στο στρες κολύμβησης παρουσιάζοντας αυξημένα επίπεδα κορτικοστερόνης και αύξησης της μονοαμινεργικής δραστηριότητας. Από την άλλη πλευρά, οι θηλυκοί επίμυες φαίνεται να είναι περισσότερο ευάλωτοι στο στρες κολύμβησης από τους αρσενικούς και αυτό εκφράζεται από αυξημένα επίπεδα απόγνωσης και ελαττωμένη σεροτονινεργική δραστηριότητα στον ιππόκαμπο και στον υποθάλαμο.

1.12 Διαφορές του φύλου σε άλλα πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης

Το μοντέλο της μαθημένης ανυπαρξίας βοήθειας είναι ένα από τα παλαιότερα μοντέλα προσομοίωσης της κατάθλιψης και του άγχους (Seligman et al., 1975, Maier, 1984). Σε αυτό το μοντέλο, τα πειραματόζωα εκτίθενται, είτε σε ελεγχόμενο είτε σε μη ελεγχόμενο στρες, όπως επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος (σοκ) στην ουρά ή στο πόδι. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, οι θηλυκοί αρουραίοι διαφεύγουν το σοκ ταχύτερα

από τους αρσενικούς επίμυες και η εξαφάνιση της συμπεριφοράς αποφυγής εμφανίζεται αργότερα στους θηλυκούς σε σχέση με τους αρσενικούς επίμυες (van Haaren et al., 1990, Heinsbroek et al., 1991, Shors et al., 2007, Dalla et al., 2008a, Dalla and Shors, 2009). Σε σχέση με τον κύκλο του οίστρου, έχει δειχθεί ότι η συμπεριφορά αποφυγής/διαφυγής του σοκ διευκολύνεται κατά τη φάση του πρόοιστρου (Sfikakis et al., 1978). Αντιθέτως, η συμπεριφορά αποφυγής φαίνεται να διευκολύνεται στο δίοιστρο 2, να μειώνεται στον πρόοιστρο και να παρουσιάζει περαιτέρω μείωση στον οίστρο και στο δίοιστρο 1 (Diaz-Veliz et al., 1989). Προκειμένου να εκτιμηθεί η συμπεριφορά μαθημένης ανυπαρξίας βοήθειας, τα πειραματόζωα στη συνέχεια υποβάλλονται σε πιο σύνθετες δοκιμασίες, όπου θα πρέπει να πατήσουν ένα μοχλό ή να περάσουν μέσα από μια πόρτα αρκετές φορές, έτσι ώστε να διαφύγουν το σοκ (Hunziker and Dos Santos, 2007). Στη δοκιμασία αυτή, κανένα από τα αρσενικά πειραματόζωα που έχουν προηγουμένως εκτεθεί σε μη ελεγχόμενο στρες, δεν έμαθε να διαφεύγει το σοκ, και αυτό έχει προσομοιωθεί με καταθλιπτικά συμπτώματα (Seligman et al., 1975, Maier, 1984). Αντιθέτως, οι περισσότεροι θηλυκοί επίμυες, έμαθαν αμέσως να διαφεύγουν το σοκ και ως εκ τούτου δεν εμφανίζουν τη «μαθημένη ανυπαρξία βοήθειας» που παρατηρήθηκε στους αρσενικούς επίμυες (Shors et al., 2007, Dalla et al., 2008a, Padilla et al., 2009). Το εύρημα αυτό πιθανότατα σχετίζεται με διαφορές του φύλου στην αντίδραση στο σοκ (Beatty and Beatty, 1970, Scouten et al., 1975, Steenbergen et al., 1990, van Haaren et al., 1990, Shors et al., 2007, Dalla et al., 2008a).

Είναι πιθανόν ότι οι θηλυκοί επίμυες θα μπορούσαν να εμφανίσουν τη συμπεριφορά της «μαθημένης ανυπαρξίας βοήθειας», αν η δοκιμασία γινόταν πιο δύσκολη, όπως για παράδειγμα αν το πειραματόζωο έπρεπε να περάσει μέσα από ένα παράθυρο αντί για πόρτα, προκειμένου να τερματίσει το σοκ (Hunziker and Dos Santos, 2007). Όσον αφορά στην επίδραση του κύκλου του οίστρου σε αυτή τη συμπεριφορά, οι Jenkins et al. βρήκαν ότι σε θηλυκούς επίμυες στη φάση του δίοιστρου απαιτείται περισσότερος χρόνος για να διαφύγουν το σοκ σε σχέση με τη φάση του οίστρου σε θηλυκούς επίμυες (Jenkins et al., 2001). Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν αναφέρει ότι δεν υπάρχει καμία επίδραση του κύκλου του οίστρου στη συμπεριφορά της «μαθημένης ανυπαρξίας βοήθειας» (Setnik et al., 2004, Dalla et al., 2008a).

Το μοντέλο του χρόνιου ήπιου στρες (CMS) είναι ένα άλλο έγκυρο μοντέλο κατάθλιψης, το οποίο βασίζεται στην εφαρμογή ήπιων στρεσογόνων παραγόντων

(στέρηση τροφής και νερού, αλλαγές στα φώτα, λευκός θόρυβος, αλλαγές μεταξύ των συντρόφων του κλωβού, κ.λπ.) που εναλλάσσονται για μια περίοδο 4-7 εβδομάδων (Willner et al., 1987, Willner, 1997, 2005). Σε αυτό το πειραματικό πρότυπο τα πειραματόζωα εκπαιδεύονται να πίνουν ένα εύγευστο διάλυμα σουκρόζης. Μετά από μερικές εβδομάδες έκθεσης στο στρες παρουσιάζουν μείωση της πρόσληψης σουκρόζης και μείωση της προτίμησης πρόσληψης σουκρόζης σε σχέση με το νερό. Αυτό το φαινόμενο προσομοιάζει το καταθλιπτικό σύμπτωμα της ανηδονίας (απώλεια απόλαυσης για ηδονικά ερεθίσματα). Στο μοντέλο αυτό εμφανίζονται και άλλες διαταραχές που προσομοιάζονται με συμπτώματα της κατάθλιψης, όπως είναι η μειωμένη σεξουαλική συμπεριφορά και η αυτοπεριποίηση, αλλαγές στην αρχιτεκτονική του ύπνου και της κινητικής δραστηριότητας, αυξάνοντας την εγκυρότητα του μοντέλου (Willner, 1997, 2005). Μετά από το χρόνιο ήπιο στρες, εμφανίζεται και στα δύο φύλα μείωση στην πρόσληψη σουκρόζης, όταν αυτό αξιολογείται με δοκιμασίες της 1 ώρας μια φορά την εβδομάδα. Ωστόσο, το εύρημα αυτό είναι πιο ισχυρό σε αρσενικούς επίμυες, σε σύγκριση με θηλυκούς επίμυες (Dalla et al., 2005b, Grippo et al., 2005, Dalla et al., 2008a, Kamper et al., 2009), (Πίνακας 1). Είναι πιθανό ότι η πρόσληψη σουκρόζης στη δοκιμασία της μίας ώρας δεν είναι κατάλληλος δείκτης συμπεριφοράς για τους θηλυκούς επίμυες, επειδή οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζουν τάση να πίνουν περισσότερο σουκρόζη σε σχέση με τους αρσενικούς επίμυες και εμφανίζουν ακανόνιστη αύξηση της κατανάλωσής της (Dalla et al., 2005b). Ωστόσο, όταν η πρόσληψη σουκρόζης εκτιμάται κατά τη διάρκεια μίας περιόδου 24ωρών παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της κατανάλωσης σουκρόζης σε θηλυκούς επίμυες, αλλά όχι σε αρσενικούς που υποβλήθηκαν σε χρόνιο ήπιο στρες (Konkle et al., 2003). Συνεπώς, σε μία πρόσφατη μελέτη, η προτίμηση σουκρόζης αξιολογήθηκε για 24 ώρες και βρέθηκε να είναι μειωμένη και στα δύο φύλα, αλλά η μείωση αυτή ήταν εντονότερη στους θηλυκούς επίμυες. Θεραπεία με το αντικαταθλιπτικό βενλαφαξίνη αύξησε την πρόσληψη σουκρόζης, αλλά δεν εξάλειψε τις διαφορές του φύλου (Xing et al., 2013). Μια άλλη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες με τη δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης έχει περιγραφεί πρόσφατα και συνδυάζει τη μέτρηση προτίμησης γλυκών τροφίμων από τους επίμυες με υπερηχητική φωνητική ηχογράφηση. Θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες που εκτίθενται σε χρόνιο ήπιο στρες, παρουσίασαν σημαντική μείωση της προτίμησης σε αυτή τη δοκιμασία (Mateus-Pinheiro et al., 2014). Κατά το παρελθόν, η ανηδονία εκτιμήθηκε επίσης με διέγερση εγκεφαλικών περιοχών, με την εμφύτευση

ηλεκτροδίων στην κοιλιακή καλυπτική περιοχή, αλλά δεν υπήρξε καμία επίδραση του χρόνιου ήπιου στρες και στα δύο φύλα (Baker et al., 2006). Το χρόνιο ήπιο στρες είχε επίσης επιπτώσεις στην εξερευνητική συμπεριφορά, με τους θηλυκούς επίμυες να εμφανίζουν μειωμένη εξερευνητικότητα και συνολική κινητική δραστηριότητα σε σχέση με τους αρσενικούς επίμυες στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου (Dalla et al., 2005b, Xing et al., 2013). Σε μια άλλη μελέτη, το χρόνιο ήπιο στρες σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες δεν επέφερε διαφορές στην κινητικότητα, ενώ οι αρσενικοί επίμυες έδειξαν αυξημένα επίπεδα άγχους (Duncko et al., 2001). Ο κύκλος του οίστρου σε θηλυκούς επίμυες δεν μπορεί να ληφθεί υπόψη στο παρόν πειραματικό πρότυπο, διότι το χρόνιο ήπιο στρες είναι ένα χρόνιο μοντέλο και άρα οι θηλυκοί επίμυες εκτέθηκαν σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες κατά τη διάρκεια όλων των φάσεων του κύκλου. Επιπλέον, ο κύκλος του οίστρου των θηλυκών επίμυων που εκτίθενται σε χρόνιο ήπιο στρες διαταράσσεται σε υψηλό ποσοστό πειραματόζωων και άρα δεν μπορεί να μελετηθεί σε αυτό το μοντέλο (Dalla et al., 2005b, Baker and Bielajew, 2007)

Μοντέλα κατάθλιψης	Κύριοι συμπεριφορικοί παράμετροι	Ευαισθησία Αρσενικών/Θηλυκών πειραματόζωων	Ισχύς των ερευνητικών ευρημάτων
Δοκιμασία Εξαναγκασμένης Κολύμβησης	Ακινησία (FST)	Αντικρουόμενα ευρήματα	****
Μαθημένη ανυπαρξία βοήθειας	Συμπεριφορά διαφυγής	Αρσενικά > Θηλυκά	***
Χρόνιο ήπιο στρες	Προτίμηση στη σουκρόζη	Αντικρουόμενα ευρήματα	***
Επίμυες Flinder (FSL)	Ακινησία (FST)	Εξαρτώμενο από τις συμπεριφορικές παραμέτρους	*
5-HTT επίμυες	Ακινησία / Προτίμηση στη σουκρόζη	Δεν υπάρχουν διαφορές	**
5-HT1A διαγονιδιακοί μύες	Ακινησία / Προτίμηση στη σουκρόζη	Αρσενικά > Θηλυκά	**
5-HT1A υπερέκφρασης μύες	Ακινησία (FST)	Αρσενικά > Θηλυκά	*
5-HT1B διαγονιδιακοί μύες	Ακινησία (FST)	Αρσενικά > Θηλυκά	*
5-HT3 διαγονιδιακοί μύες	Ακινησία (FST)	Θηλυκά > Αρσενικά	*
BDNF διαγονιδιακοί μύες	Ακινησία (FST)	Θηλυκά > Αρσενικά	**
FBGRKO διαγονιδιακοί μύες	Ακινησία (FST)	Αρσενικά > Θηλυκά	*
Ουροκορτίνη -2 διαγονιδιακοί μύες	Ακινησία (FST)	Αρσενικά > Θηλυκά	*

Πίνακας 1: Διαφυλικές διαφορές σε πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης

Επιπλέον, υπάρχουν μοντέλα κατάθλιψης τα οποία βασίζονται στην επιλεκτική αναπαραγωγή ή/και γενετικών τροποποιήσεων. Ένα μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως είναι οι Flinders (FSL) επίμυες, οι οποίοι προέρχονται από επίμυες Sprague-Dawley επιλεκτικά εκτρεφόμενοι για χολινεργική υπερευαισθησία (Overstreet et al., 1979, Overstreet and Wegener, 2013). Το μοντέλο των FSL επιμύων εμφανίζει σημαντική ισχύ διότι το χολινεργικό σύστημα εμπλέκεται στις διαταραχές της διάθεσης (Janowsky and Overstreet, 1990). Οι FSL επίμυες εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα των καταθλιπτικών συμπτωμάτων τα οποία αναστρέφονται μετά από χρόνια αντικαταθλιπτική θεραπεία (Overstreet et al., 2005). Έχουν παρατηρηθεί διαφορές των φύλων σε FSL επίμυες, με τους αρσενικούς επίμυες να εμφανίζονται λιγότερο κινητικοί και με υψηλότερα επίπεδα άγχους στις δοκιμασίες του ανοιχτού πεδίου και στον υπερυψωμένο λαβύρινθο σε σχήμα σταυρού, σε σχέση με τους Sprague-Dawley, ενώ δεν εμφανίζονται διαφορές σε θηλυκούς επίμυες. Θεραπεία με το SSRI σιταλοπράμη προκαλεί μείωση των επιπέδων άγχους και στα δύο φύλα (Kokras et al., 2011). Στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης οι αρσενικοί και θηλυκοί FSL επίμυες εμφανίζουν αυξημένη καταθλιπτική συμπτωματολογία, αλλά σε διαφορετικές συμπεριφορικές παραμέτρους. Συγκεκριμένα, οι FSL αρσενικοί επίμυες εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ακινησίας, ενώ οι θηλυκοί επίμυες παρουσιάζουν μειωμένο λανθάνων χρόνο εμφάνισης ακινησίας. Τα ελλείμματα της συμπεριφοράς αναστράφηκαν από τη θεραπεία με αντικαταθλιπτικά και στα δύο φύλα με ένα φυλο-εξαρτώμενο τρόπο (Kokras et al., 2009a).

Ένα άλλο γενετικό μοντέλο κατάθλιψης αποτελούν οι μεταλλαγμένοι επίμυες που στερούνται τον μεταφορέα της 5-HT (5-HTT - / - επίμυες) (Homborg et al., 2007). Αυτοί οι επίμυες παρουσιάζουν αυξημένη καταθλιπτική συμπεριφορά, όπως αυξημένη ακινησία στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης και μειωμένη προτίμηση σουκρόζης (Olivier et al., 2008). Ωστόσο, δεν παρατηρείται καμία σημαντική διαφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών 5-HTT -/- επιμύων σε δοκιμασίες κατάθλιψης (Olivier et al., 2008). Επιπροσθέτως, διάφορα γονίδια υποδοχέων της 5-HT αποτελούν στόχο για τη δημιουργία μοντέλων κατάθλιψης και διερεύνησης της αντικαταθλιπτικής δράσης νέων ουσιών. Διαγονιδιακοί αρσενικοί και θηλυκοί μύες που στερούνται τους 5-HT1A υποδοχείς (Alexander et al., 2013) εμφανίζουν μειωμένη ακινησία στην εξαναγκασμένη κολύμβηση, αλλά μόνο οι θηλυκοί μύες εμφανίζουν αυξημένη προτίμηση για σουκρόζη (Jones and Lucki, 2005, Castagne et al., 2011). Αρσενικοί μύες που υπερεκφράζουν ειδικούς μετα-συναπτικούς υποδοχείς

5-HT1A επίσης επιδεικνύουν μειωμένη καταθλιπτική συμπεριφορά, αλλά αυτό δεν έχει παρατηρηθεί στους θηλυκούς μύες. Είναι ενδιαφέρον ότι η αντικαταθλιπτική θεραπεία μειώνει την ακινησία και στα δύο φύλα (Gunther et al., 2011). Αντιθέτως, θηλυκοί μύες που στερούνται 5-HT1B υποδοχείς εμφανίζουν μειωμένη καταθλιπτική συμπεριφορά, ενώ οι αρσενικοί μύες δεν εμφανίζουν διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου των wild type μυών. Όπως αναμενόταν, η αντικαταθλιπτική θεραπεία μειώνει την ακινησία σε αρσενικούς και θηλυκούς διαγονιδιακούς 5-HT1B μύες (Jones and Lucki, 2005). Τέλος, θηλυκοί, αλλά όχι αρσενικοί 5-HT3 μύες παρουσιάζουν καταθλιπτική συμπεριφορά με αυξημένη ακινησία και μειωμένα επίπεδα κολύμβησης κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας της εξαναγκασμένης κολύμβησης (Bhatnagar et al., 2004).

Σχετικά με ένα άλλο σύστημα, ο προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας (BDNF) έχει επίσης εμπλακεί στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης. Οι διαγονιδιακοί BDNF μύες, χρησιμοποιούνται ως μοντέλο κατάθλιψης και παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φύλων. Οι αρσενικοί μύες εμφανίζουν αυξημένη κινητικότητα, αλλά κανονικά επίπεδα καταθλιπτικής συμπεριφοράς (Monteggia et al., 2007). Αντιθέτως, οι θηλυκοί μύες εμφανίζουν καταθλιπτική συμπεριφορά με αυξημένη ακινησία στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης και μειωμένη προτίμηση σουκρόζης, κυρίως μετά από χρόνια έκθεση σε στρες (Monteggia et al., 2007, Autry et al., 2009). Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι και στα δύο φύλα των διαγονιδιακών BDNF μυών, το αντικαταθλιπτικό δεσιπραμίνη δεν άσκησε αντικαταθλιπτική δράση στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης. Το εύρημα αυτό υπογραμμίζει τη σημασία του BDNF στην αντικαταθλιπτική θεραπεία και για τα δύο φύλα (Monteggia et al., 2007). Τέλος, έχει δειχθεί προσφάτως ότι αρσενικοί μύες στους οποίους λείπει ο προσθεγκεφαλικός NR3C1 υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών II (Alexander et al., 2013) (FBGRKO) εμφανίζουν αυξημένη καταθλιπτική συμπεριφορά στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης και στη δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης, ενώ το φαινόμενο αυτό δεν εμφανίζεται στους θηλυκούς μύες (Solomon et al., 2012). Τέλος, θηλυκοί, αλλά όχι αρσενικοί μύες που στερούνται ουροκοροτίνη 2, η οποία αποτελεί μέρος της οικογένειας πεπτιδίων του παράγοντα της απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRF), δείχνουν μείωση των επιπέδων της ακινησίας στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης και της αιώρησης από την ουρά (Chen et al., 2006).

Με βάση τις μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Πίνακας 1) είναι προφανές ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές του φύλου στα μοντέλα της κατάθλιψης. Αυτά εμφανίζονται μερικές φορές υπό βασικές συνθήκες ή μετά από έκθεση σε στρες ή ουσίες (Dalla et al., 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πειραματικές συνθήκες και οι συμπεριφορικοί παράμετροι στην απάντηση στη θεραπεία συχνά διαφέρουν μεταξύ των δύο φύλων. Άρα, τα πειραματικά μοντέλα θα πρέπει να είναι ρυθμισμένα με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να είναι αξιόπιστα τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά πειραματόζωα. Τέλος, τα γενετικά μοντέλα μπορεί να συμβάλουν στη διαλεύκανση του ρόλου συγκεκριμένων γονιδίων ή συστημάτων σχετικά με την εμφάνιση των διαφορών του φύλου, το οποίο θα μπορούσε τελικά να οδηγήσει σε θεραπευτικούς στόχους με βάση το φύλο (Valentino et al., 2013).

1.13 Συμπεράσματα: διαφυλικές διαφορές σε πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι όλα τα μοντέλα κατάθλιψης έχουν αναπτυχθεί με τη χρήση αρσενικών πειραματόζωων. Μόνο αργότερα, σε δεύτερο χρόνο, εφαρμόστηκαν και αξιολογήθηκαν αυτά τα πειραματικά μοντέλα και στα αντίστοιχα θηλυκά πειραματόζωα. Κατά συνέπεια, υπάρχει ο δυνητικός κίνδυνος κάποια εξ' αυτών των πειραματικών μοντέλων να μην είναι συνολικά κατάλληλα για θηλυκά πειραματόζωα ή οι συμπεριφορικοί δείκτες που αξιολογούνται να χρειάζονται προσαρμογή όταν εμπλέκονται θηλυκά πειραματόζωα.

Σε κάθε περίπτωση, σημαντικές συμπεριφορικές, νευροχημικές, ενδοκρινικές και γενικότερα νευροβιολογικές διαφορές μεταξύ των φύλων έχουν παρατηρηθεί στα περισσότερα μοντέλα κατάθλιψης τόσο από το Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών όσο και από άλλους (Palanza, 2001, Drossopoulou et al., 2004, Dalla et al., 2005a, Dalla et al., 2008a, Pitychoutis et al., 2009a). Μερικές από τις διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν στις αρχικές διαφορές μεταξύ των φύλων προ της εφαρμογής ενός παράγοντα στρες και κάποιες άλλες προκύπτουν μόνο μετά από χειρισμούς, είτε αυτοί οι χειρισμοί αφορούν την έκθεση σε στρες είτε τη χορήγηση φαρμάκων. Η μελέτη αυτών των διαφορών παρέχει σε κάθε περίπτωση σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το πώς τα αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα (και κατ' επέκταση οι άνδρες και οι γυναίκες) αντιδρούν διαφορετικά στο στρες, το οποίο

ενοχοποιείται για την εμφάνιση κατάθλιψης και πως απαντούν διαφορετικά στη χορήγηση αντικαταθλιπτικής αγωγής.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κάθε ένα από τα προαναφερθέντα πειραματικά μοντέλα έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του, τα οποία πρέπει να αναγνωρίζονται έτσι ώστε τα μοντέλα αυτά να χρησιμοποιούνται σωστά στη μελέτη της κατάθλιψης και πιο συγκεκριμένα των διαφορών των φύλου τόσο στην κατάθλιψη όσο και στην απάντηση στα αντικαταθλιπτικά (Bekris et al., 2005, Dalla et al., 2005a).

Δεν πρέπει να παραγνωρίζεται ότι με τον περιορισμό της έρευνας σχετικά με την κατάθλιψη και τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα μόνο στα αρσενικά πειραματόζωα διατρέχουμε τον κίνδυνο να οδηγηθούμε σε ανακριβή συμπεράσματα ή να χάσουμε σημαντικά αποτελέσματα τα οποία αφορούν τα θηλυκά πειραματόζωα και κατ' επέκταση τις γυναίκες. Είναι πιθανότατο ότι οι συνεχείς δράσεις των οιστρογόνων στον εγκέφαλο, όπως συχνά λέγεται «από τη μήτρα μέχρι το θάνατο», επηρεάζουν τη λειτουργία του σεροτονινεργικού συστήματος επί το πλείστον, αλλά ενδεχόμενα, και άλλων νευροδιαβιβαστικών συστημάτων, με τρόπο που τελικώς διαφοροποιεί τη λειτουργία των νευροδιαβιβαστικών συστημάτων μεταξύ αντρών και γυναικών. Αυτός ο μηχανισμός αποτελεί πιθανός ένα σημαντικό παράγοντα για την αυξημένη ευαλωτότητα των γυναικών σε στρεσογόνους παράγοντες, οδηγεί πιθανώς στην υιοθέτηση διαφορετικής στρατηγικής αντιμετώπισης του στρες και διαφορετική απάντηση στα αντικαταθλιπτικά φάρμακα μεταξύ ανδρών και γυναικών.

Τέλος, είναι ενδιαφέρον ότι σε όλα τα μελετώμενα πειραματικά μοντέλα, η σεροτονινεργική νευροχημική απάντηση στο στρες δείχνει πρώτον να επηρεάζεται σημαντικά τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά και δεύτερον δείχνει να συνεισφέρει σε σημαντικό βαθμό στην εξαρτώμενη από το φύλο διαφορετική συμπεριφορική απάντηση. Ο εξασθενημένος σεροτονινεργικός τόνος, που πιθανολογείται ότι υπάρχει και στην κατάθλιψη στους ανθρώπους, είναι ενδεχόμενο να οφείλεται σε μια αλλαγή στην έκφραση των σεροτονινεργικών υποδοχέων, όπως των 5-HT_{1A} και 5-HT_{2A/C} και σε μια αύξηση στην επαναπρόσληψη και στον ενδοκυττάριο μεταβολισμό της σεροτονίνης (Pineyro and Blier, 1999).

Συνολικά, φαίνεται ότι το είδος και η διάρκεια του στρεσογόνου παράγοντα, καθώς και οι συμπεριφορικές παράμετροι που μετράμε, επηρεάζουν την εμφάνιση και την κατεύθυνση των διαφορών μεταξύ των φύλων στην απόκριση τους στο στρες. Η καταθλιπτικόμορφη συμπτωματολογία επίσης εκφράζεται διαφορετικά μεταξύ των δύο φύλων, ανάλογα με το μοντέλο. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι

συμπεριφορικές μεταβολές μπορεί να συνδεθούν με ανωμαλίες στον ενδοφαινότυπο, όπως σε ορμονικούς, νευροχημικούς, ανοσολογικούς δείκτες και δείκτες νευροπλαστικότητας. Συγκεκριμένα, ο ΥΥΕ άξονας ενεργοποιείται και στα δύο φύλα μετά από έκθεση σε στρες, αλλά κάποιες παράμετροι διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο φύλων υποδεικνύοντας τη σημασία του στην εμφάνιση διαταραχών που σχετίζονται με το στρες, όπως η κατάθλιψη.

Περαιτέρω, πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την απαντητικότητα των πειραματόζων σε μοντέλα κατάθλιψης (Anisman and Matheson, 2005). Τέτοιοι παράγοντες είναι το περιβάλλον και ο τρόπος διαβίωσης των πειραματόζων, καθώς και εξατομικευμένα χαρακτηριστικά που προκαλούν διακύμανση στη συμπεριφορά (Palanza, 2001, Kokras and Dalla, 2014, Kokras et al., 2015a). Ένας άλλος καθοριστικός παράγοντας είναι το φύλο. Παρόλο που είναι γνωστή η μεγαλύτερη εμφάνιση συναισθηματικών διαταραχών στις γυναίκες, η χρήση των θηλυκών πειραματόζων είναι περιορισμένη. Ο κυριότερος λόγος είναι ότι λόγω του κύκλου του οίστρου και συνεπώς της εναλλαγής των ορμονών του φύλου στα θηλυκά πειραματόζωα καθίσταται πιο περίπλοκη η μελέτη συμπεριφορικών και βιοχημικών παραμέτρων στους θηλυκούς επίμυες. Ωστόσο, θηλυκά πειραματόζωα έχουν χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες μελέτες και έχουν δείξει διαφυλικές διαφορές στην απαντητικότητα τόσο στο στρες όσο και στην «καταθλιπτικόμορφη» συμπτωματολογία (Palanza, 2001, Dalla et al., 2008a, Kokras and Dalla, 2014, Kokras et al., 2015a). Επίσης, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε συμπεριφορικές, νευροχημικές και ενδοκρινολογικές μεταβολές τις συμπεριφοράς των θηλυκών επιμύων ανάλογα με τη φάση του κύκλου (Sfikakis et al., 2002, Grippo et al., 2005) και μετά από ωθηκεκτομή (Karandrea et al., 2000, 2002, Bowman et al., 2003), έτσι ώστε να εκτιμηθεί ο ρόλος των ορμονών του φύλου σε πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δεν έχουν δώσει σαφείς εξηγήσεις για το ρόλο του φύλου στην κατάθλιψη, εφόσον οι μετρήσεις κάθε μελέτης είναι περιορισμένες και συχνά υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Palanza, 2001, Dalla et al., 2010b, Kokras and Dalla, 2014).

Επίσης, στη χρήση θηλυκών πειραματόζων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι μπορεί να εμφανίζουν διαφορετική απαντητικότητα σε κάποια πειραματικά πρότυπα κατάθλιψης, τα οποία έχουν αναπτυχθεί σε αρσενικά πειραματόζωα, λόγω διαφορετικών επιπέδων σε ορισμένες συμπεριφορικές παραμέτρους.

Επιπλέον, οι διαφορές μεταξύ των φύλων διαμεσολαβούνται από ένα πολύπλοκο τρόπο μέσω των επιδράσεων των ορμονών των γονάδων κατά την ανάπτυξη του

εγκεφάλου (δράσεις οργάνωσης), κατά την ήβη και την ενήλικη ζωή (δράσεις ενεργοποίησης). Τέλος, μπορεί να υποθεθεί ότι ορισμένα μοντέλα στρες ενδέχεται να οδηγήσουν σε μείωση της σεροτονινεργικής δραστηριότητας στον ιππόκαμπο των θηλυκών επίμυων, που με τη σειρά της μπορεί να συνδεθεί με μειωμένη νευροπλαστικότητα που σχετίζεται με γνωσιακές διαταραχές και καταθλιπτικόμορφη συμπτωματολογία. Παρόλα αυτά, χρειάζονται περισσότερες μελέτες εστιασμένες σε ζωικά μοντέλα με εγκυρότητα στα θηλυκά, για να αξιολογηθεί αυτή η υπόθεση.

1.14 Διαφορές του φύλου σε πειραματικά πρότυπα άγχους

Οι περισσότερες διαταραχές του άγχους, συμπεριλαμβανομένης της διαταραχής πανικού, της αγοραφοβίας, της κοινωνικής φοβίας, της διαταραχής γενικευμένου άγχους και των ειδικών φοβιών, είναι δύο φορές πιο συχνές στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (Wittchen et al., 2011). Αρκετά πειραματικά μοντέλα σε τρωκτικά έχουν συμβάλει στη μελέτη της νευροβιολογίας του φόβου και του άγχους, καθώς και στη φαρμακολογία των αγχολυτικών φαρμάκων (Cryan and Sweeney, 2011). Ορισμένες από αυτές τις δοκιμασίες προκαλούν σύγκρουση μεταξύ της τάσης του μυός για εξερεύνηση και το ένστικτο της αποφυγής δυνητικά επικίνδυνων καταστάσεων, όπως είναι ο έντονος φωτισμός ή το ανοιχτό πεδίο. Άλλες δοκιμασίες άγχους μπορεί να προκαλέσουν φοβική αντίδραση μέσω ενός αρνητικού γεγονότος (Graham et al., 2011). Είναι ενδιαφέρον ότι στα περισσότερα μοντέλα άγχους, οι θηλυκοί μύες παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα άγχους σε σχέση με τους αρσενικούς μύες (Johnston and File, 1991, Donner and Lowry, 2013).

1.15 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου: διαφορές του φύλου

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου συνίσταται στην τοποθέτηση ενός πειραματοζώου σε ένα άγνωστο περιβάλλον, περικυκλωμένο με τοιχώματα. Με τον τρόπο αυτό παρατηρούνται διάφορα πρότυπα συμπεριφοράς, όπως η τάση των τρωκτικών να παραμείνουν στην περιφέρεια του κλωβού χωρίς να εισέλθουν στο κέντρο (αυτή η συμπεριφορά ονομάζεται θιγμόταξη και συχνά ερμηνεύεται ως αγχώδης συμπεριφορά), καθώς και τα επίπεδα της απόδευσης και της σύρησης (Bourin et al., 2007). Τα πειραματόζωα υποβάλλονται χωριστά στη δοκιμασία, αλλά πάντα τοποθετούνται στην ίδια θέση. Μείωση του λόγου του χρόνου που παρέμεινε το

πειραματόζωο στο κέντρο του κλωβού προς το χρόνο που παρέμεινε στην περιφέρεια του κλωβού έχουν συσχετισθεί με υψηλά επίπεδα άγχους.

Ορισμένα εργαστήρια χρησιμοποιούν τη δοκιμασία αυτή για τον προσδιορισμό της κινητικότητας, ενώ άλλα εργαστήρια χρησιμοποιούν αυτή τη δοκιμασία για μέτρηση των επιπέδων άγχους. Σε πειράματα που περιλαμβάνουν τρωκτικά, οι παρατηρητές δεν μετρούν τις επιδράσεις των θεραπειών στην εξερεύνηση, αλλά την αντίδραση σε ένα στρεσογόνο γεγονός. Ως εκ τούτου, τα αγχολυτικά φάρμακα δεν αυξάνουν από μόνες τους την εξερεύνηση στο ανοιχτό πεδίο, αλλά μειώνουν το στρες που προκαλείται από τη συμπεριφορά εξερεύνησης.

Το μοντέλο του ανοιχτού πεδίου μπορεί να είναι ένα μοντέλο άγχους για τρωκτικά, ευαίσθητο στις αγχολυτικές επιδράσεις των αγωνιστών των υποδοχέων του GABA και του 5-HT_{1A}, αλλά όχι στις επιδράσεις άλλων ουσιών που εμφανίζουν αγχολυτικές ιδιότητες. Ένα άλλο κύριο πρόβλημα σχετικά με αυτό το μοντέλο είναι η έλλειψη τυποποίησης μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων. Μερικά εργαστήρια χρησιμοποιούν τετράγωνο σχήμα κλωβού και άλλα κυκλικό, ενώ μερικά χρησιμοποιούν διαφανείς κλωβούς και άλλα αδιαφανείς.

Ειδικότερα, στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου, οι θηλυκοί μύες εμφανίζουν λιγότερο άγχος σε σχέση με τους αρσενικούς μύες κατά τον υπολογισμό της θιγμόταξης και της αποφυγής του φωτισμένου χώρου (Zimmerberg and Farley, 1993, Ramos et al., 1998, Roman and Arborelius, 2009, An et al., 2011). Είναι ενδιαφέρον ότι οι θηλυκοί μύες στον πρόοιστρο, εμφανίζουν λιγότερο άγχος σε σχέση με τους αρσενικούς μύες (Frye et al., 2000). Επιπλέον, στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου και με τη χρήση τροχών στους κλωβούς, οι θηλυκοί μύες εμφανίζονται επανειλημμένως περισσότερο κινητικοί σε σχέση με τους αρσενικούς (Dawson et al., 1975, Beatty and Fessler, 1976, Slob et al., 1981, Hyde and Jerussi, 1983).

1.16 Διαφορές του φύλου σε άλλες δοκιμασίες άγχους

Στη δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού, η οποία είναι μία ευρέως διαδεδομένη δοκιμασία άγχους, οι θηλυκοί μύες εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα άγχους, όπως υποδεικνύεται από την αυξημένη έκθεσή τους στους ανοιχτούς/εκτεθειμένους βραχίονες του λαβυρίνθου (Imhof et al., 1993, Rodgers and Cole, 1993, Frye et al., 2000, Ramos et al., 2002, Estanislau and Morato, 2006, Walf et al., 2008). Επιπλέον, οι θηλυκοί μύες στο δίοιστρο εμφανίζουν περισσότερο άγχος

σε σχέση με θηλυκούς μύες σε άλλες φάσεις του κύκλου του οίστρου και με τους αρσενικούς μύες (Marcondes et al., 2001, Dominguez et al., 2003). Προς στήριξη αυτού του ευρήματος, ο Walf και οι συνεργάτες του, έδειξαν ότι θηλυκοί μύες σε αναπαραγωγική ηλικία εμφάνισαν λιγότερο άγχος σε σχέση με γηραιούς μύες (Walf et al., 2009). Ομοίως, στο λαβύρινθο σχήματος T, οι θηλυκοί μύες εμφάνισαν λιγότερο άγχος σε σχέση με τους αρσενικούς (Almeida et al., 1996, Ramos et al., 2002) και οι θηλυκοί μύες σε δίοιστρο είχαν περισσότερο άγχος από τους αρσενικούς (Gouveia et al., 2004). Το ίδιο αποτέλεσμα αναφέρθηκε και σε θηλυκά σε δίοιστρο, τα οποία εμφάνισαν περισσότερο άγχος στη δοκιμασία «novelty suppressed feeding» (Mora et al., 1996). Στη δοκιμασία "holeboard", οι θηλυκοί μύες πέρασαν λιγότερο χρόνο κοντά στα τοιχώματα του κλωβού, περισσότερο χρόνο στο κέντρο, και ήταν πιο κινητικοί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τους αρσενικούς μύες (Adamec et al., 2006). Στη δοκιμασία φωτεινού/σκοτεινού κλωβού, οι θηλυκοί μύες εμφάνισαν μεγαλύτερο λανθάνων χρόνο για να εισέλθουν στο σκοτεινό θάλαμο, γεγονός που υποδηλώνει μειωμένα επίπεδα άγχους σε σχέση με τους αρσενικούς μύες (Voikar et al., 2001, Adamec et al., 2006, Reimer et al., 2012). Επίσης, όταν εκτιμώνται οι υπερηχητικοί ήχοι, οι αρσενικοί μύες εμφανίζονται ως πιο ανήσυχοι (Naito and Tonoue, 1987, Hahn et al., 1998).

Όσον αφορά στην αγχολυτική δράση της διαζεπάμης, οι Νομικός και Σπυράκη το 1988 ανέφεραν ότι στη δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού, το αγχολυτικό αποτέλεσμα της διαζεπάμης ήταν εμφανές στη φάση του οίστρου και του δίοιστρου 1 σε θηλυκούς επίμυες, αλλά όχι στη φάση του δίοιστρου 2 και του πρόοιστρου (Nomikos and Spyraiki, 1988).

Επιπλέον, σε μελέτες παθητικής αποφυγής, οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζονται λιγότερο ανήσυχοι. Στη δοκιμασία αυτή, τα πειραματόζωα λαμβάνουν ένα ελαφρύ ηλεκτροσόκ στο πόδι στο ένα από τα δύο διαμερίσματα του κλωβού που γίνεται η δοκιμασία και καταγράφεται ο λανθάνων χρόνος αποφυγής του σοκ. Τα θηλυκά ποντίκια εισάγονται στο διαμέρισμα και λαμβάνουν το σοκ πιο γρήγορα σε σχέση με τα αρσενικά ποντίκια (van Haaren et al., 1990). Επίσης, η διατήρηση της παθητικής αποφυγής συμπεριφοράς είναι υψηλότερη σε θηλυκά ποντίκια στο δίοιστρο, ενώ αναστέλλεται στον οίστρο και στον πρόοιστρο του κύκλου του οίστρου (Mora et al., 1996). Οι διαφυλικές διαφορές στη συμπεριφορά αποφυγής έχουν αποδοθεί στο γεγονός ότι τα θηλυκά ποντίκια ανταποκρίνονται στο σοκ με περισσότερο ενεργητική συμπεριφορά, σε σχέση με τα αρσενικά ποντίκια, τα οποία αντιδρούν κυρίως με πάγωμα (Beatty and

Beatty, 1970, Kirk and Blampied, 1985, Steenbergen et al., 1990, van Haaren et al., 1990, Dalla et al., 2008a, Dalla and Shors, 2009). Σε γενικές γραμμές, οι αρσενικοί και οι θηλυκοί επίμυες φαίνεται να αναπτύσσουν διαφορετικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση αρνητικών ερεθισμάτων, όπως το ηλεκτροσόκ. Διαφορές φύλου έχουν επίσης αναφερθεί στην αντίσταση στο ηλεκτρικό ρεύμα, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει την αντίδραση στην έκθεση στο ηλεκτροσόκ (Levine and Broadhurst, 1963, Beatty and Beatty, 1970, van Haaren et al., 1990). Διαφορές του φύλου στο στρες μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση στο ηλεκτροσόκ (Beatty and Fessler, 1977, Romero et al., 1987, Vendruscolo et al., 2004, Aloisi and Bonifazi, 2006). Κατά τη σύγκριση αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, τα θέματα αυτά θα μπορούσαν να αποφευχθούν με τη μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας και παρατηρώντας άλλες συμπεριφορές κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο ηλεκτροσόκ, όπως τα άλματα και η φώνηση.

Όπως είναι προφανές από τις δοκιμασίες που παρουσιάστηκαν παραπάνω, ένας παράγοντας πιθανής σύγχυσης σε πολλές δοκιμασίες άγχους είναι η κινητικότητα και η ορθή διάκριση της από το άγχος. Τα θηλυκά ποντίκια είναι γενικά πιο κινητικά στις δοκιμασίες του ανοιχτού πεδίου και στις δοκιμασίες άγχους. Στην πραγματικότητα, η συμμετοχή των θηλυκών τρωκτικών σε δοκιμασίες άγχους, συχνά αποδεικνύεται προβληματική (Imhof et al., 1993) και κάποιες δοκιμασίες συμπεριφοράς δεν έχουν τη δυνατότητα να διακρίνουν μεταξύ άγχους και καταστάσεων διέγερσης (Fernandes et al., 1999, Doremus et al., 2006). Με δεδομένο ότι η κινητικότητα είναι η κυριότερη συμπεριφορά, στις περισσότερες δοκιμασίες σύγκρουσης (π.χ. φως/σκοτάδι, υπερυψωμένος λαβύρινθος σε σχήμα σταυρού, κλπ.), η διάκριση μεταξύ κινητικότητας και άγχους μπορεί μερικές φορές να είναι αδύνατη.

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι οι θηλυκοί επίμυες είναι περισσότερο κινητικοί σε σχέση με τους αρσενικούς (Valle and Gorzalka, 1980, Kelly et al., 1999, Brotto et al., 2000, Romero and Chen, 2004, Dalla et al., 2005a), πιθανώς λόγω της επίδρασης των ορμονών του φύλου και της αντιμετώπισης των θηλυκών σε δοκιμασίες σύγκρουσης (Palanza, 2001, Lightfoot, 2008).

Στην πραγματικότητα, σε δοκιμασίες που εξαρτώνται λιγότερο από την κινητικότητα, όπως η Vogel τιμωρία στο πόσιμο νερό και η δοκιμασία της κοινωνικής αλληλεπίδρασης, οι αρσενικοί επίμυες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα άγχους σε σχέση με τους θηλυκούς επίμυες (Johnston and File, 1991, Walf et al., 2009). Αντιθέτως στη δοκιμασία της κοινωνικής αλληλεπίδρασης, οι θηλυκοί επίμυες

αντιδρούν λιγότερο σε σχέση με τους αρσενικούς επίμυες, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζονται πιο αγχώδεις σε αυτή τη δοκιμασία (Johnston and File, 1991, Reeb and Tang, 2005, Stack et al., 2010, Viviani et al., 2012). Από την άλλη πλευρά σε μύες έχει αναφερθεί το αντίθετο (An et al., 2011), ενώ σε άλλες μελέτες τα αποτελέσματα ήταν ασαφή (Johnston and File, 1991). Και πάλι, η δοκιμασία της κοινωνικής αλληλεπίδρασης φαίνεται να επηρεάζεται από τις ορμόνες του φύλου. Για παράδειγμα, οι θηλυκοί επίμυες Long Evans, στον πρόοιστρο εμφανίζουν περισσότερη κοινωνική αλληλεπίδραση, σε σχέση με θηλυκούς επίμυες σε άλλες φάσεις του κύκλου του οίστρου και με αρσενικούς επίμυες (Frye et al., 2000). Είναι ενδιαφέρον ότι, οι θηλυκοί επίμυες Sprague-Dawley στον πρόοιστρο δείχνουν λιγότερη κοινωνική αλληλεπίδραση, και ως εκ τούτου εμφανίζονται περισσότερο ανήσυχοι, σε σχέση με θηλυκούς επίμυες στο δίοιστρο και με αρσενικούς επίμυες (Stack et al., 2010) (Blanchard et al., 1991), υποδηλώνοντας ότι το στέλεχος του τρωκτικού μπορεί επίσης να είναι ένας παράγοντας σύγχυσης, όταν μελετώνται οι διαφορές του φύλου στο άγχος.

Άλλο παράδειγμα άγχους, στο οποίο οι θηλυκοί επίμυες δείχνουν ενισχυμένη απάντηση και έτσι εμφανίζονται περισσότερο ανήσυχοι, σε σύγκριση με τους αρσενικούς, είναι η δοκιμασία ενισχυμένου ξαφνιάσματος από φως. Σε αυτή την πειραματική ομάδα οι επίμυες εκτίθενται σε έντονο φως για 5-20 λεπτά, και αργότερα παρατηρείται βελτιωμένη ακουστική αντανάκλαστική απόκριση (Walker and Davis, 1997, Toufexis et al., 2005, Toufexis, 2007). Εκτός από τα μοντέλα που προσομοιώνουν το επαγόμενο άγχος, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η κατάσταση χρόνιου άγχους. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί στο πειραματικό πρότυπο του αποχωρισμού από τη μητέρα που φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο τους αρσενικούς από τους θηλυκούς απογόνους (Wigger and Neumann, 1999, Romeo et al., 2005, Viveros et al., 2009). Άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της κύησης προκαλούν διαφορές του φύλου σε διαφορετικό βαθμό, ανάλογα με τον στρεσογόνο παράγοντα. Για παράδειγμα το στρες ακινητοποίησης στις μητέρες, αυξάνει το άγχος στο ανοιχτό πεδίο στους θηλυκούς απογόνους (Bowman et al., 2004). Μετά την εφαρμογή χρόνιου ήπιου στρες, οι αρσενικοί επίμυες εμφανίζουν περιορισμένη εξερευνητικότητα σε ένα ανοικτό πεδίο, ενώ οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζουν αυξημένη εξερευνητικότητα (Ter Horst et al., 2009). Χρησιμοποιώντας το πειραματικό πρότυπο του χρόνιου στρες σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες, οι Ter Horst et al. (2009) πρότειναν ότι οι αρσενικοί επίμυες υιοθετούν κυρίως τη

συμπεριφορά της «πάλης ή φυγής», ενώ οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζουν άλλες συμπεριφορές, οι οποίες σχετίζονται με τη συναναστροφή (Taylor et al., 2000).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν επίσης πειραματικά πρότυπα ζώων που εμφανίζουν άγχος με ή χωρίς συνυπάρχουσα κατάθλιψη, εκ γενετής, κατόπιν επιλεκτικής αναπαραγωγής (Wegener et al., 2012). Ένα παράδειγμα επιλεκτικής αναπαραγωγής σε επίμυες Wistar, σχετίζεται με τη συμπεριφορά στον υπερυψωμένο λαβύρινθο σε σχήμα σταυρού και έχει οδηγήσει σε επίμυες με υψηλά (HBV) και χαμηλά (LAB) επίπεδα άγχους. Όμως, η διαφορά του φύλου σε αυτό το μοντέλο είναι ακόμα ασαφής. Επίσης, επιλεκτική αναπαραγωγή των Wistar επίμυων Κιότο (WKY), για περισσότερη ακινησία στο μοντέλο της εξαναγκασμένης κολύμβησης οδήγησε σε αρσενικούς επίμυες που παρουσιάζουν χαμηλή συμπεριφορά άγχους από νωρίς στην εφηβεία και σε θηλυκούς επίμυες που εκφράζουν υψηλά επίπεδα κατάθλιψης και άγχους, αλλά μόνο μετά την εφηβεία (Mehta et al., 2013).

Διάφορα γενετικά μοντέλα χρησιμοποιούνται επίσης για τη διαλεύκανση της νευροβιολογίας του άγχους και της αντιμετώπισής του. Πολλά γενετικά μοντέλα εμπλέκονται τόσο στην κατάθλιψη, όσο και στο άγχος, και όπως περιγράφεται παραπάνω παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές του φύλου. Στα περισσότερα γενετικά μοντέλα, οι αρσενικοί επίμυες εμφανίζονται περισσότερο ανήσυχτοι σε σχέση με τους θηλυκούς επίμυες. Πράγματι, οι αρσενικοί, αλλά όχι οι θηλυκοί 5-HTT $-/-$ επίμυες, εμφανίζουν αυξημένο άγχος στη δοκιμασία καταστολής σίτισης και στη διαταραχή εξάλειψης φόβου, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ευαισθησία σε αρνητικά ερεθίσματα (Olivier et al., 2008, Kalueff et al., 2010). Ομοίως, αρσενικοί μύες διαγονιδιακοί για τους υποδοχείς της σεροτονίνης 5-HT₃ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα άγχους κατά τη δοκιμασία αμυντικής απόσυρσης, ενώ στους θηλυκούς επίμυες παρατηρούνται αντίθετα αποτελέσματα (Bhatnagar et al., 2004). Επίσης, αρσενικοί διπλοί διαγονιδιακοί μύες για BDNF και 5-HTT εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα άγχους στη δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου σε σχήμα σταυρού, ενώ δεν υπάρχει διαφορά σε θηλυκούς μύες (Ren-Patterson et al., 2006). Επιπλέον, θηλυκοί διπλοί διαγονιδιακοί μύες για CRF1 / CRF2 εμφανίζουν λιγότερο άγχος σε σχέση με αρσενικούς και με wild type θηλυκούς μύες (Bale et al., 2002). Θηλυκοί διαγονιδιακοί μύες με ανεπάρκεια COMT εμφανίζονται περισσότερο ανήσυχτοι στη δοκιμασία φωτεινού/σκοτεινού κλωβού, ενώ οι αρσενικοί μύες εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά με τους wild type μύες (Gogos et al., 1998).

Συνοπτικά, τα πειραματικά πρότυπα άγχους σε τρωκτικά εμφανίζουν υψηλού βαθμού προβλεπτική ισχύ για αγχολυτικές θεραπείες, αλλά δεν προσομοιώνουν κατ' ανάγκη και τη θηλυκή ευπάθεια που εμφανίζεται στους ανθρώπους. Διαφυλικές διαφορές στην κινητικότητα, που προκαλείται εν μέρει από ορμόνες του φύλου, διαμορφώνουν σε μεγάλο βαθμό το άγχος που σχετίζεται με συμπεριφορικά αποτελέσματα σε δοκιμασίες άγχους που εξαρτώνται κυρίως από την κινητικότητα. Επιπλέον, οι διαφορές στις στρατηγικές αντιμετώπισης μεταξύ αρσενικών και θηλυκών τρωκτικών (Taylor et al., 2000, Dalla et al., 2010b) μπορεί να παρεμβαίνουν σημαντικά στην άμεση σύγκριση των δεικτών συμπεριφοράς του άγχους μεταξύ των δύο φύλων. Ως αποτέλεσμα, τα θηλυκά τρωκτικά εμφανίζονται λιγότερο ανήσυχα σε πολλές δοκιμασίες, και επιπλέον, στη φάση του δίοιστρου τα θηλυκά παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα άγχους, σε σύγκριση με άλλες φάσεις του κύκλου. Σε περιπτώσεις που οι δοκιμασίες άγχους εξαρτώνται λιγότερο από την κινητικότητα, η δοκιμασία θεωρείται περισσότερο κατάλληλη για τη μελέτη των διαφορών του φύλου. Σε γενικές γραμμές, κρίνεται απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία δοκιμασίες και να αξιολογηθεί το άγχος που σχετίζεται με τα αποτελέσματα της συμπεριφοράς χρησιμοποιώντας τεχνικές, όπως το κύριο συστατικό ανάλυσης, z-σκορ υπολογισμού ή ANCOVA με την κινητικότητα ως συν-μεταβλητή. Χρησιμοποιώντας μια παρόμοια ανάλυση οι File et al. έδειξαν ότι η αρσενική συμπεριφορά οδηγείται από το άγχος, ενώ η θηλυκή από την κινητικότητα (File, 2001). Άρα, θα πρέπει να δοθεί προσοχή, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να μην συγκαλύπτονται από συμπεριφορές άσχετες από το άγχος ή από την φυσιολογία του ζώου και να αντιμετωπιστούν σωστά, έτσι ώστε να ποσοτικοποιηθούν δυναμικά οι διαφορές φύλου σε μοντέλα τρωκτικών άγχους.

1.17 Συμπεράσματα για διαφορές του φύλου σε πειραματικά πρότυπα

Συνολικά, είναι ξεκάθαρο ότι όλα τα μοντέλα στρες έχουν πλεονεκτήματα και περιορισμούς που πρέπει να αναγνωριστούν με σκοπό να τα χρησιμοποιήσουμε αποτελεσματικά στη διερεύνηση των διαταραχών της διάθεσης. Ο περιορισμός της έρευνας της κατάθλιψης στα αρσενικά ζώα μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή ευρήματα ή να αποκρύψει σημαντικά αποτελέσματα που βρίσκουν εφαρμογή μόνο σε γυναίκες. Είναι πιθανό ότι οι δράσεις των οιστρογόνων στον εγκέφαλο «από τη μήτρα μέχρι τον θάνατο» μπορεί να επηρεάζουν τον εγκέφαλο με ένα φυλετικά διμορφικό τρόπο. Αυτό

μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ευαλωτότητα σε στρεσογόνα ερεθίσματα, διαφορετικές στρατηγικές αντιμετώπισης και διαφοροποιημένη ανταπόκριση στα αντικαταθλιπτικά φάρμακα στις γυναίκες.

2 Σκοπός

Οι αναστολείς της αρωματάσης, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση των οιστρογονοεξαρτώμενων καρκίνων, έχουν συσχετιστεί με ψυχικές διαταραχές, που ποικίλουν από τη μανία έως την κατάθλιψη. Η αρωματάση είναι το ρυθμιστικό ένζυμο, το οποίο καταλύει τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Εντοπίζεται κυρίως στις ωοθήκες των γυναικών, στους όρχεις των ανδρών, όπως επίσης και στον πλακούντα και στα επινεφρίδια. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι άλλα όργανα, όπως το ήπαρ, τα οστά και ο εγκέφαλος μπορούν να παράγουν τοπικά οιστρογόνα. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα συνιστούν ότι τα προερχόμενα από τον εγκέφαλο οιστρογόνα είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση των νευρικών κυκλωμάτων στο θηλυκό και αρσενικό εγκέφαλο. Παρόλα αυτά, οι προκλινικές έρευνες πάνω στο ρόλο των οιστρογόνων στην κατάθλιψη και, ειδικότερα, στο ρόλο των παραγόμενων από τον εγκέφαλο οιστρογόνων στα θηλυκά και τα αρσενικά, απουσιάζουν από την επιστημονική βιβλιογραφία. Συνεπώς, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσουμε αν η μείωση της σύνθεσης οιστρογόνων μετά από αναστολή της αρωματάσης επηρεάζει την εκδήλωση της καταθλιπτικής συμπτωματολογίας και τους υποκείμενους εγκεφαλικούς και ορμονικούς μηχανισμούς στους επίμυες.

Στην πρώτη πειραματική διαδικασία μελετήθηκε το κατά πόσο η χορήγηση του αναστολέα της αρωματάσης, λετροζόλη, προκαλεί καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά σε θηλυκούς επίμυες με φυσιολογική ορμονική λειτουργία. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST) μελετήθηκε η επίδραση της οξείας (1 mg/kg, τρεις ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις σε 24 ώρες) και της χρόνιας (7 ημέρες) χορήγησης λετροζόλης. Χορηγήθηκε επίσης η αντικαταθλιπτική ουσία φλουοξετίνη ως φάρμακο αναφοράς. Επιπροσθέτως αναλύθηκαν τα επίπεδα τεστοστερόνης και προγεστερόνης στον ορό του αίματος των πειραματόζων με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου τους στην επίδραση της λετροζόλης.

Στη δεύτερη πειραματική διαδικασία εκτιμήθηκαν τα αποτελέσματα της χρόνιας αγωγής με λετροζόλη σε θηλυκούς επίμυες και μελετήθηκε το ενδεχόμενο της διαφοροποίησης της δράσης της λετροζόλης σε ωοθηκεκτομηθέντες θηλυκούς επίμυες. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν όλες οι πειραματικές διαδικασίες σε αρσενικούς επίμυες, έτσι ώστε να εκτιμηθούν οι διαφυλικές διαφορές. Ειδικότερα, διερευνήθηκαν οι συμπεριφορικές και νευροχημικές επιδράσεις της αναστολής της

αρωματάσης σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες εικονικώς χειρουργημένους ή γοναδεκτομηθέντες. Τρεις εβδομάδες αργότερα, οι επίμυες έλαβαν χρόνια αγωγή με τον αναστολέα της αρωματάσης, λετροζόλη (1 mg/kg, μία φορά ενδοπεριτοναϊκά, καθημερινά για μία εβδομάδα) ή με έκδοχο και υποβλήθησαν στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου και στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST). Η δραστηριότητα της αρωματάσης υπολογίστηκε στον υποθάλαμο, ενώ η τεστοστερόνη και η κορτικοστερόνη στον ορό του αίματος όλων των επίμυων. Επίσης, αναλύθηκαν τα επίπεδα των μονοαμινών (νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη σεροτονίνη και των μεταβολιτών τους) και των αμινοξέων (GABA, γλουταμικό, γλουταμίνη, ταυρίνη, αλανίνη και ιστιδίνη) στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό.

3 Μέθοδος

3.1 Πειράματα 1 και 2: Οξεία και χρόνια αναστολή της αρωματάσης σε συνδυασμό με χορήγηση φλουοξετίνης

Πείραμα 1.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί επίμυες Sprague Dawley, ηλικίας 3 μηνών κατά την έναρξη του πειράματος (N=58). Τα πειραματόζωα στεγάζονταν υπό ελεγχόμενες συνθήκες φωτός / σκότους 12:12 (φώτα ανοιχτά στις 08:00 π.μ.) και σε θερμοκρασία (22 ± 2 C), σε κλωβούς, και με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες έγιναν προσπάθειες να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν και η ταλαιπωρία τους, σύμφωνα με το θεσμικό κανονισμό και την οδηγία EE2010/63.3.

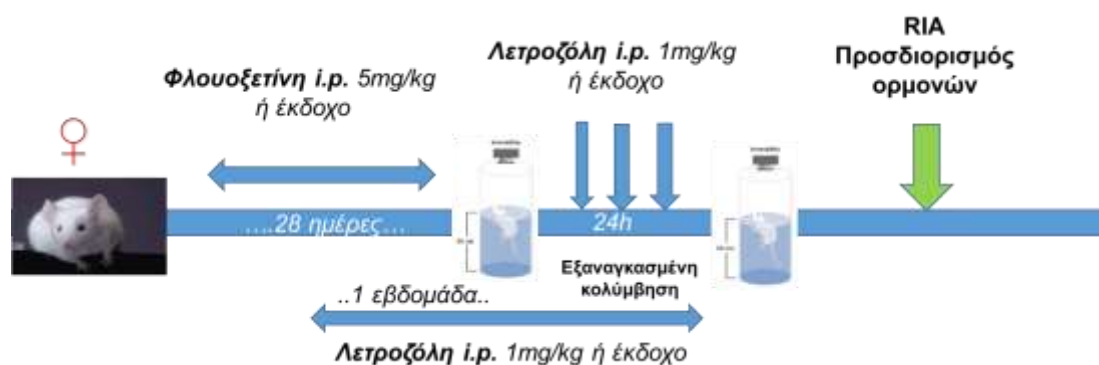
Σε 40 θηλυκά πειραματόζωα χορηγήθηκε είτε φυσιολογικός ορός (Εκδοχο Α) είτε 5mg/kg του αντικαταθλιπτικού φαρμάκου φλουοξετίνη i.p. (Eli Lilly Hellas) για 28 ημέρες (N=20 ανά ομάδα). Την 27η ημέρα του πειράματος όλα τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), για 15 λεπτά. Συγκεκριμένα, την ημέρα της πειραματικής διαδικασίας στις 9:00, τα πειραματόζωα με τους κλωβούς τους μεταφέρονταν σε ξεχωριστό δωμάτιο, όπου παρέμειναν για μία ώρα πριν την έναρξη των δοκιμασιών. Μετά από μία ώρα, τα πειραματόζωα τοποθετούνταν το κάθε ένα ξεχωριστά σε μια κυλινδρική δεξαμενή διαστάσεων 50 εκ. ύψους και 20 εκ. διαμέτρου (Σχήμα 2). Η δεξαμενή ήταν γεμάτη με νερό θερμοκρασίας 24 ± 1 °C και ανανεωνόταν μετά από κάθε συνεδρία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Το βάθος του νερού ρυθμιζόταν σε ένα τέτοιο ύψος που δεν επέτρεπε στα ζώα να αγγίξουν τον πυθμένα της δεξαμενής με τα οπίσθια πόδια τους ή την ουρά τους, όπως στο παρελθόν (Kokras et al., 2012, Kokras et al., 2015a). Στη συνέχεια το κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν σε χωριστό κλωβό, στέγνωσε με ζεστό αέρα.

Έπειτα αφού στέγνωσαν και πριν επιστρέψουν στους κλωβούς τους, τους χορηγήθηκε i.p. 1mg/kg λετροζόλη (Novartis Pharma AG, Ελβετία) ή έκδοχο, το οποίο αποτελείτο από φυσιολογικό με 5% Tween 80 και 5% αιθανόλη (Εκδοχο Β). Η χορήγηση της λετροζόλης ή του εκδόχου Β έλαβε χώρα σε (N=10), πειραματόζωα από κάθε ομάδα εκδόχου Α ή φλουοξετίνης (Πίνακας 2). Στη συνέχεια χορηγήθηκε 1mg/kg λετροζόλης ή εκδόχου Β, 19 και 23 ώρες μετά την πρώτη χορήγηση αντίστοιχα. Μία

ώρα μετά την τρίτη χορήγηση και 24 ώρες μετά την πρώτη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε δεύτερη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης διάρκειας 5 λεπτών, όπως στο παρελθόν (Mikail et al., 2012) και όπως φαίνεται στο Σχήμα 13. Η χορήγηση των ουσιών σε 3 δόσεις μεταξύ των δύο δοκιμασιών εξαναγκασμένης κολύμβησης αποτελεί σπάνια διαδικασία στη βιβλιογραφία και είναι επαρκής για την εμφάνιση αντικαταθλιπτικού αποτελέσματος (Detke et al., 1995, Sell et al., 2008, Mikail et al., 2012).

Πίνακας 2.

ΘΗΛΥΚΑ		
	Λετροζόλη	Έκδοχο Β
Έκδοχο Α	10	10
Φλουοξετίνη	10	10

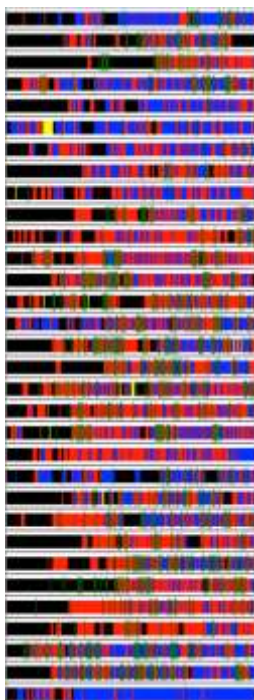
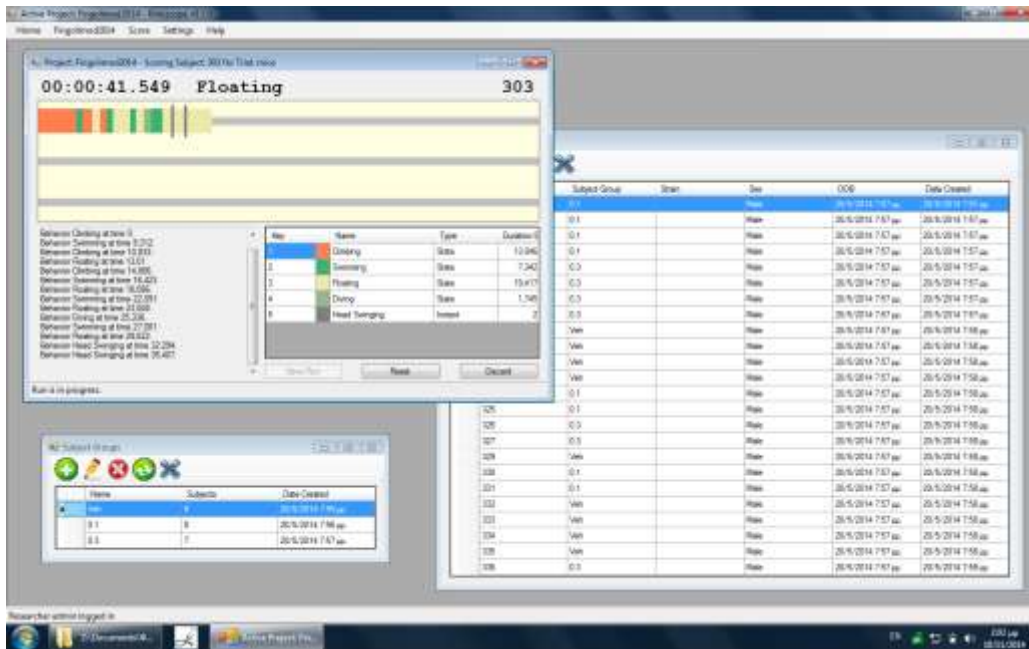


Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας 1 (επάνω μέρος) και 2 (κάτω μέρος).

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης δοκιμασίας κολύμβησης καταγράφηκαν η ακινησία, η κολύμβηση, η αναρρίχηση και η συχνότητα τινάγματος κεφαλιού, όπως περιγράφεται στο Πείραμα 1, με τη βοήθεια του προγράμματος Kinoscope.

Οι πεντάλεπτες δοκιμασίες της εξαναγκασμένης κολύμβησης μαγνητοσκοπήθηκαν με οπτική κάμερα και τα βίντεο των δοκιμασιών αξιολογήθηκαν χειροκίνητα με τη χρήση του προγράμματος Kinoscope, το οποίο έχει αναπτυχθεί για αυτό τον σκοπό στο Εργ.

Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ (Σχήμα 14). Κατά την αξιολόγηση της συμπεριφοράς του κάθε πειραματοζώου ο παρατηρητής δεν γνώριζε σε ποια ομάδα άνηκε το κάθε πειραματόζωο.



Σχήμα 14: Απεικόνιση από το πρόγραμμα Kinoscope, όπου φαίνεται η καταγραφή της ακινησίας (floating) κατά την πεντάλεπτη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε διαφορετική συμπεριφορά (Εργ. Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ).

Με το kinoscope, καταγράφηκε και υπολογίσθηκε η συνολική διάρκεια (σε δευτερόλεπτα) των παρακάτω συμπεριφορών κατά τη διάρκεια της δεύτερης εξαναγκασμένης κολύμβησης:

- Συμπεριφορά ακινησίας: Ως συμπεριφορά ακινησίας αξιολογείται η συμπεριφορά των πειραματόζωων όταν δεν αγωνίζονται για να δραπετεύσουν και εκτελούν μόνο τις απαραίτητες κινήσεις, έτσι ώστε να επιπλέουν και να εξασφαλίζουν την κεφαλή τους έξω από το νερό.
- Συμπεριφορά κολύμβησης: Ως συμπεριφορά κολύμβησης αξιολογείται η συμπεριφορά κατά την οποία τα πειραματόζωα κολυμπούν ενεργά διαγράφοντας κύκλους στην περιφέρεια του κυλίνδρου.
- Συμπεριφορά αναρρίχησης: Ως συμπεριφορά αναρρίχησης αξιολογείται η συμπεριφορά κατά την οποία τα πειραματόζωα προσπαθούν να αναρριχηθούν στα τοιχώματα του κυλίνδρου.

Επίσης, καταγράφηκε η συχνότητα του τινάγματος της κεφαλής. Έχει καταδειχθεί προηγουμένως ότι οι παραπάνω αναφερθείσες παράμετροι, δηλαδή η ακινησία, η κολύμβηση και η αναρρίχηση, είναι ευαίσθητες στην αντικαταθλιπτική αγωγή (Detke et al., 1995).

Αμέσως μετά το τέλος της δεύτερης δοκιμασίας FST, τα πειραματόζωα θανατώθηκαν και το αίμα τους συλλέχθηκε για τον προσδιορισμό ορμονών, οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και προγεστερόνης όπως περιγράφεται παρακάτω.

Πείραμα 2.

Σε άλλα θηλυκά πειραματόζωα (N=46) χορηγήθηκε έκδοχο Α (ορός, N=24) ή φλουοξετίνη 5mg/kg (N=22), για 28 ημέρες i.p. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας εβδομάδας του πειράματος, μία φορά την ημέρα, τα πειραματόζωα έλαβαν μαζί με τη φλουοξετίνη είτε το έκδοχο Β (N=12 από το γκρουπ του εκδόχου Α και N=10 από το γκρουπ της φλουοξετίνης), είτε λετροζόλη 1mg/kg, i.p. (N=12 από το γκρουπ του εκδόχου Α και N=12 από το γκρουπ της φλουοξετίνης), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3.

ΘΗΛΥΚΑ		
	Λετροζόλη	Έκδοχο Β
Έκδοχο Α	12	12
Φλουοξετίνη	12	10

Κατά την 27^η ημέρα χορήγησης της φλουοξετίνης και την 6^η ημέρα χορήγησης της λετροζόλης, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στην πρώτη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης και την επόμενη ημέρα (28^η φλουοξετίνης και 7^η λετροζόλης) υποβλήθηκαν στη δεύτερη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω και φαίνεται στο Σχήμα 12. Κατά τη δεύτερη πεντάλεπτη δοκιμασία κολύμβησης έγινε η καταγραφή των συμπεριφορών κολύμβησης, ακινησία, αναρρίχηση και τινάγματος κεφαλής με το πρόγραμμα *Kinoscope*, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω στο Πείραμα 1.

Αμέσως μετά τη δεύτερη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό και συλλέχθηκε αίμα για τον προσδιορισμό ορμονών. Στον ορό του αίματος προσδιορίστηκαν, οι ορμόνες οιστραδιόλη, προγεστερόνη και τεστοστερόνη με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων kit RIA (Siemens Coat-A-Count για τη συνολική τεστοστερόνη, προγεστερόνη και οιστραδιόλης), όπως περιγράφεται παρακάτω. Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας συλλέχθηκαν κολπικά επιχρίσματα, όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.2 Ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA) μέτρησης επιπέδων οιστραδιόλης, προγεστερόνης και τεστοστερόνης

Κατά τη θυσία των πειραματόζωων συλλέχθηκε αίμα από τον τράχηλο σε φιαλίδια με ηπαρίνη. Στη συνέχεια το αίμα φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C και συλλέχθηκε το πλάσμα (υπερκεείμενο), το οποίο φυλάχτηκε στους -20°C μέχρι την ανάλυσή του. Οι ορμόνες οιστραδιόλη, προγεστερόνη και τεστοστερόνη προσδιορίστηκαν σε όλα τα δείγματα με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA), (Kokras et al., 2015a). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα kit RIA (Siemens Coat-A-Count για ολική τεστοστερόνη και Double Antibody για οιστραδιόλη), (Kokras et al., 2015a). Τα όρια ανίχνευσης ήταν 0.4ng / ml και 1.4pg / ml αντίστοιχα.

3.3 Προσδιορισμός κύκλου του οίστρου

Επί 7 ημέρες (5 ημέρες πριν και κατά τη διάρκεια της εξαναγκασμένης κολύμβησης) λαμβάνονταν κοιλικά επιχρίσματα από τους θηλυκούς επίμυες, κάθε πρωί, έτσι ώστε να προσδιορισθούν οι φάσεις του κύκλου, όπως στο παρελθόν (Dalla et al., 2009a). Το κοιλικό επίχρισμα λαμβανόταν με μπατονέτα αφού πρώτα είχε βυθιστεί σε φυσιολογικό ορό. Στη συνέχεια το υλικό απλωνόταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφηνόταν να στεγνώσει. Τα επιχρίσματα τοποθετήθηκαν σε 95% αιθανόλη για 5 λεπτά, μετά βυθίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού νατρίου και μετά τοποθετήθηκαν σε 1% ρυθμιστικού διαλύματος τολουιδίνης για 15-20 λεπτά. Αφού έλαβε χώρα η χρώση με το Toluidine Blue οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα επιχρίσματα βυθίζονταν σε 70% αιθανόλη και στη συνέχεια τοποθετούνται σε 95% αιθανόλης για 5 λεπτά. Τέλος, γινόταν η παρατήρηση των επιχρισμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο και προσδιοριζόταν η φάση του κύκλου (Sfikakis et al., 1998).

Η φυσιολογική διάρκεια του κύκλου στους θηλυκούς επίμυες είναι 4-5 ημερών και οι φάσεις εναλλάσσονται με την εξής σειρά: πρόοιστρος, οίστρος, δίοιστρος I και δίοιστρος II. Ο προσδιορισμός του πρόοιστρου γίνεται με την παρατήρηση εμπύρηνων κυττάρων σε συσσωματώματα και έλλειψη λευκών, του οίστρου γίνεται με την παρατήρηση πλακωδών κυττάρων (χωρίς πυρήνα) σε βόλακες, του δίοιστρου I με την παρατήρηση εμπύρηνων κυττάρων και λίγων λευκών και του δίοιστρου II με την παρατήρηση κυττάρων λευκών.

3.4 Πείραμα 3. Αναστολή του ενζύμου της αρωματάσης με χρόνια χορήγηση λετροζόλης

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί (N=48) και αρσενικοί (N=51) επίμυες Wistar, οι οποίοι προέρχονταν από το Ινστιτούτο Pasteur. Τα πειραματόζωα ηλικίας 2,5 μηνών παρέμειναν για εγκλιματισμό τουλάχιστον 15 ημέρες στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Οι θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες διαβίωναν σε ειδικό δωμάτιο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (22 ± 2 °C) και σταθερό κυκλικό φωτισμό (12 h φως και 12 h σκοτάδι, με έναρξη της φωτεινής περιόδου στις 08:00 π.μ.). Οι επίμυες διαβίωναν σε ομάδες των 3 πειραματόζωων ανά κλωβό, ο οποίος ήταν κατασκευασμένος από πλεξιγκλάς και είχε διαστάσεις

60*36*19 cm. Όλοι οι επίμυες είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και ζωοτροφή εμπορίου. Τρεις εβδομάδες πριν την έναρξη της χορήγησης λετροζόλης ή εκδόχου οι επίμυες υποβλήθηκαν σε γοναδεκτομή ή σε εικονική εγχείρηση. Για την προ-αναισθησία ενέθηκε ξυλαζίνη σε δοσολογία 100 mg/kg και μετά από 10 λεπτά ενέθηκε κεταμίνη σε δοσολογία 10 mg/kg για να επέλθει ολική αναισθησία. Εν συνεχεία έγιναν χειρουργικές τομές και αφαίρεση των γονάδων (ωοθήκες για τα θηλυκά και όρχεις για τα αρσενικά) ή εικονική εγχείρηση, όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν (Dalla et al., 2008b). Μετά την ανάνηψη οι επίμυες μεταφέρθηκαν στους κλωβούς τους για ανάρρωση.

3.5.1 Χορήγηση αναστολέα της αρωματάσης

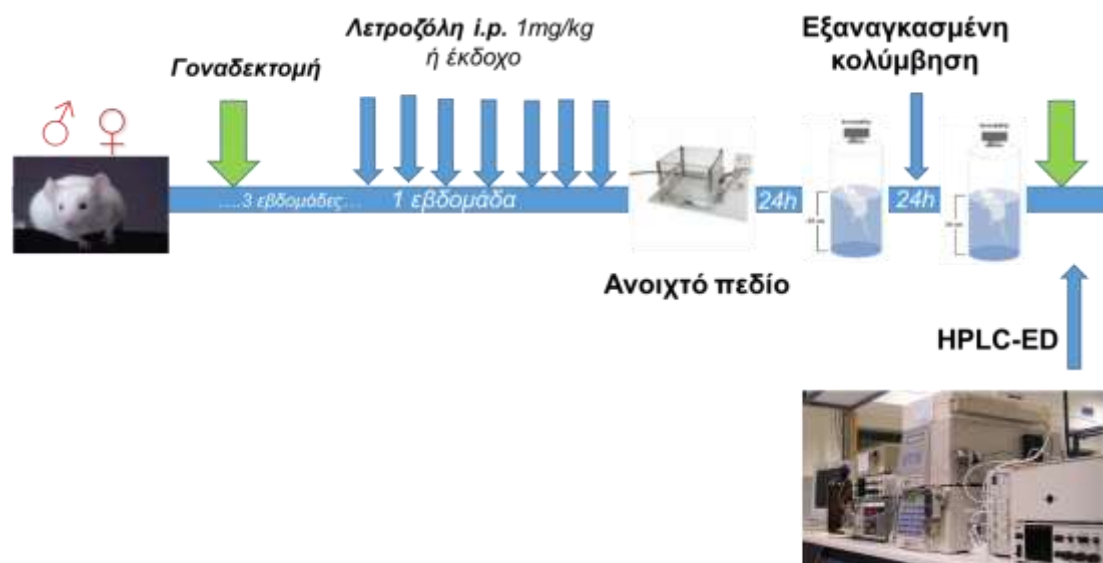
Τρεις εβδομάδες μετά την εγχείρηση, σε όλα τα πειραματόζωα γινόταν μια ένεση καθημερινά, το πρωί, για 8 ημέρες είτε με λετροζόλη (Novartis Pharma AG, Ελβετία) (1mg/kg ενδοπεριτοναϊκά), είτε με έκδοχο (αλατούχο διάλυμα ορού με 5% Tween 80 και 5% αιθανόλη). Για την παρασκευή του διαλύματος λετροζόλης (0,5mg/ml) η ουσία διαλύοταν με τη βοήθεια υπερήχων σε 5% Tween 80 και 5% αιθανόλη και στη συνέχεια προστίθενται ο φυσιολογικός ορός (Kafali et al., 2004, Aydin et al., 2008). Συνεπώς, δημιουργήθηκαν οι παρακάτω ομάδες (Πίνακες 4 και 5). Η σειρά της πειραματικής διαδικασίας φαίνεται στο Σχήμα 15.

Πίνακας 4

ΑΡΣΕΝΙΚΑ		
	Λετροζόλη	Έκδοχο
Εικονική επέμβαση	12	13
Γοναδεκτομή	13	13

Πίνακας 5

ΘΗΛΥΚΑ		
	Λετροζόλη	Έκδοχο
Εικονική επέμβαση	12	11
Γοναδεκτομή	13	12



Σχήμα 15: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας

3.5.2 Συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου

Τέσσερις εβδομάδες μετά τη γοναδεκτομή ή την εικονική εγχείρηση (7 ημέρες μετά τη χορήγηση λετροζόλης ή έκδοχου), μελετήθηκε η συμπεριφορά όλων των πειραματόζων στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου. Συγκεκριμένα τα πειραματόζωα μεταφέρθηκαν με τους κλωβούς τους στο δωμάτιο συμπεριφοράς μία ώρα πριν την έναρξη της δοκιμασίας. Στη συνέχεια κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν χωριστά σε κάθε συσκευή ανοιχτού πεδίου, που αποτελείται από έναν παραλληλόγραμμο διάφανο κλωβό από plexiglas (Med Associates Inc. ,St Albans, VT) με διαστάσεις 40 x 40 x 40 cm και που διαθέτει ένα αισθητηριακό πλέγμα υπέρυθρων ακτινών. Το πλέγμα αυτό, βρίσκεται τοποθετημένο 2.5εκ. πάνω από το εδαφιαίο επίπεδο και ανά 2.5εκ. κατά μήκος της περιμέτρου. Κατά μήκος κάθε πλευράς υπάρχουν 16 υπέρυθροι αισθητήρες για να ανιχνεύουν την οριζόντια κινητικότητα ενώ 16 εκ από το εδαφιαίο επίπεδο βρίσκονται τοποθετημένοι 16 αισθητήρες για να ανιχνεύουν τις κατακόρυφες κινήσεις του πειραματόζωου. Το αισθητηριακό αυτό σύστημα είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου ειδικό πρόγραμμα (Activity monitor version 5, Med Associates) καταγράφει και αναλύει την κινητικότητα του πειραματόζωου για 5 λεπτά.

Στο τέλος των 5 λεπτών, το πρόγραμμα υπολογίζει τη διάρκεια της κάθε συμπεριφοράς που καταγράφηκε, όπως έχει περιγραφεί (Kokras et al., 2012). Η παραπάνω μέθοδος αποτελεί μία αυτοματοποιημένη μέθοδο για την προσέγγιση της κινητικής δραστηριότητας.

Ο κλωβός καθαριζόταν μετά το τέλος της δοκιμασίας για κάθε πειραματόζωο με διάλυμα αιθανόλης 70%.

Οι συμπεριφορές που καταγράφηκαν είναι οι εξής:

α. Οριζόντια κινητικότητα (moving): το πειραματόζωο περπατάει ή τρέχει ή μένει ακίνητο.

β. Κάθετη κινητικότητα (rearing): το πειραματόζωο ανασηκώνεται κάθετα με τα δύο πίσω του πόδια στο πάτωμα του κλωβού και με τα δύο μπροστινά του πόδια στο τοίχωμα του κλωβού ή χωρίς να αγγίζει κανένα σημείο του κλωβού και οσμίζεται τον αέρα.

Τέλος, καταγράφεται η συνολική απόσταση που διένυσε το πειραματόζωο και ο χρόνος που το πειραματόζωο παρέμεινε στο κέντρο του κλωβού, η οποία είναι ενδεικτική των επιπέδων άγχους (Kokras et al., 2012).

3.5.3 Εξαναγκασμένη κολύμβηση

Στη συνέχεια τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανά φύλο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 12. Η μία ομάδα από κάθε φύλο αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και η άλλη υποβλήθηκε σε δύο δοκιμασίες κολύμβησης 15 και 5 λεπτών, με τη μεσολάβηση ενός 24ώρου μεταξύ πρώτης και δεύτερης δοκιμασίας (Slattery and Cryan, 2012), όπως περιγράφεται στο Πείραμα 1. Τα μισά πειραματόζωα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, διότι η εξαναγκασμένη κολύμβηση είναι μία στρεσογόνο διαδικασίας, η οποία έχει βρεθεί στο παρελθόν ότι επηρεάζει τα επίπεδα των μονοαμινών στον εγκέφαλο (Drossopoulou et al., 2004, Dalla et al., 2008a, Mikail et al., 2012).

Την πρώτη ημέρα που τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, οι ενέσεις της λετροζόλης ή του εκδόχου έλαβαν χώρα αμέσως μετά το πέρας της δοκιμασίας. 24 ώρες μετά την πρώτη δοκιμασία κολύμβησης τα πειραματόζωα επανατοποθετούνταν διαδοχικά στον κύλινδρο με την ίδια σειρά, όπως και την προηγούμενη ημέρα και αφήνονταν επί 5 λεπτά. Αμέσως μετά τη δεύτερη συνεδρία της εξαναγκασμένης κολύμβησης τα πειραματόζωα θυσιάζονταν με ταχύ αποκεφαλισμό.

3.5.4 Νευροχημική ανάλυση

Οι επίμυες, οι οποίοι είχαν λάβει λετροζόλη ή έκδοχο (4 ομάδες αρσενικών και 4 ομάδες θηλυκών, N=7 ανά ομάδα) θανατώθηκαν αμέσως μετά τη δεύτερη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης και 24 ώρες μετά την τελευταία ένεση. Μετά τον ακαριαίο αποκεφαλισμό, οι εγκέφαλοι τους αφαιρέθηκαν άμεσα και ο προμετωπιαίος φλοιός και ο ιππόκαμπος απομονώθηκαν πάνω σε πάγο. Αυτές οι εγκεφαλικές περιοχές έχουν συνδεθεί με την παθοφυσιολογία της κατάθλιψης (Cerqueira et al., 2007, Drevets et al., 2008, Bessa et al., 2009).

Οι ιστοί που απομονώθηκαν εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε προ-ζυγισμένα σωληνάρια και ζυγίστηκαν. Ακολούθως ομογενοποιήθηκαν και καταστράφηκαν οι πρωτεϊνικές αλυσίδες με τη χρήση υπερήχων και με τη διάλυση των ιστών σε 500 μ L διαλύματος υπερχλωρικού οξέος 0.2 N (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) που περιείχε 7.9 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ και 1.3 mM Na_2EDTA , τα οποία αγοράστηκαν από την Riedel-de Haën AG (Seelze, Germany). Το προκύπτον ομογενοποιημένο δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι να αναλυθεί. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εντός ενός μηνός από την αποθήκευσή τους, καθώς προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα των μονοαμινών παραμένουν σταθερά για μια τέτοια χρονική περίοδο.

Οι αναλυτικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας αντλία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Pharmacia-LKB 2248 μαζί με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή BAS LC4B, όπως έχει περιγραφεί (Drossopoulou et al., 2004, Dalla et al., 2005a, Dalla et al., 2008a, Kokras et al., 2009a, Mikail et al., 2012). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε διάταξη χρωματογραφίας με σύζευξη ιόντων (Ion pair chromatography) ανάστροφης φάσης σε όλες τις αναλύσεις σεροτονίνης (5-HT) και του μεταβολίτη της, 5-υδροξυ-ινδολεϊκού οξέος (5-HIAA), της νοραδρεναλίνης (NA), της ντοπαμίνης (DA) και των μεταβολιτών της 2-Διϋδροξυ-Φαινυλοξείκο Οξύ (DOPAC) και ομοβανιλλικού οξέος (HVA). Η παρασκευή της κινητής φάσης γινόταν καθημερινά και ακολουθούσε απαέρωση και διήθησή της με τη χρήση αντλίας κενού. Η πολική κινητή φάση αποτελούνταν από ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, με pH 3.0, που περιείχε 300 mg/L 5-οκτυλθειϊκού άλατος νατρίου (Merck) ως το αντιδραστήριο ζεύγους ιόντων και 20 mg/L Na_2EDTA . Ακόμη, προστέθηκε οργανικός διαλύτης (ακετονιτρίλιο, Merck KgaA, Darmstadt, Γερμανία) σε συγκέντρωση 7-10% ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος

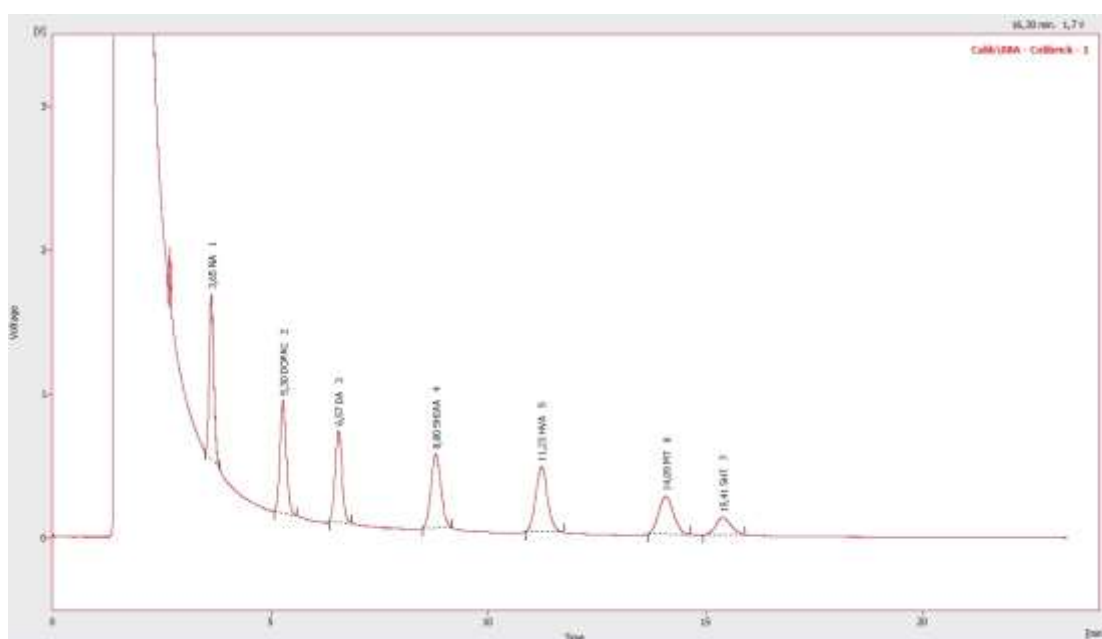
χρωματογραφικός διαχωρισμός. Ως στατική μη πολική φάση χρησιμοποιήθηκαν στήλες Aquasil C18, 150x2.1 mm, 5 μm (Thermo Electron Corporation, Chesire, UK). Τα πρότυπα διαλύματα αναφοράς παρασκευάζονταν καθημερινά σε διάλυμα υπερχλωρικού οξέος 0.2 N που περιείχε 7.9 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ και 1.3 mM Na_2EDTA και η ευαισθησία των μετρήσεων δοκιμαζόταν πάντα χρησιμοποιώντας αυτά τα εξωτερικά πρότυπα διαλύματα. Μετά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, τα διαλύματα αναφοράς και τα δείγματα προς ανάλυση εισέρχονταν στον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή σταθερού δυναμικού, ο οποίος θεωρείται ως ο πλέον ευαίσθητος για την ανάλυση των βιογενών αμίνων που οξειδώνονται σε τιμές δυναμικού μεταξύ 200-900mV. Πράγματι, κατά την οξείδωση πρότυπων διαλυμάτων και δειγμάτων σε δυναμικό 800mV δημιουργείται ρεύμα ηλεκτρονίων και αυτό το επαγόμενο ρεύμα είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας, σύμφωνα με τις αρχές του Coulomb. Για τις αναλύσεις σε αυτό το πείραμα το ηλεκτρόδιο εργασίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν υαλώδους άνθρακα (glassy carbon) και το ηλεκτρόδιο αναφοράς ήταν Ag/AgCl.



Σχήμα 16: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών.

Τα δείγματα τελικώς ποσοτικοποιήθηκαν συγκρίνοντας την περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) για κάθε ουσία του δείγματος με την αντίστοιχη των εξωτερικών πρότυπων διαλυμάτων αναφοράς, καθώς στα τελευταία είναι γνωστή εκ των προτέρων

η συγκέντρωση της υπό ανάλυση ουσίας. Η διαδικασία διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας ένα συμβατό με Η/Υ λογισμικό πακέτο HPLC (Chromatography Station for Windows ver.17 Data Apex Ltd). Το όριο ανίχνευσης ήταν 1 pg/27μL (όγκος HPLC injection loop). Επιπροσθέτως της μέτρησης των ιστικών επιπέδων 5-HT, 5-HIAA, NA, DOPAC, HVA, και DA υπολογίστηκε επίσης, ξεχωριστά για κάθε χρωματογράφημα, ο ρυθμός ανακύκλησης της σεροτονίνης και της ντοπαμίνης, ως το πηλίκο 5-HIAA/5-HT, DOPAC/DA και HVA/DA αντίστοιχα. Οι δείκτες αυτοί εκφράζουν την σεροτονινεργική και ντοπαμινεργική δραστηριότητα καλύτερα από τα ιστικά επίπεδα, αφού αντανακλά την απελευθέρωση σεροτονίνης (5-HT), ντοπαμίνης (DA) ή/και τη μεταβολική δραστηριότητα, όπως έχει εκτενώς περιγραφή προηγούμενα σε εργασίες του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών (Bessinis et al., 2013, Novais et al., 2013).



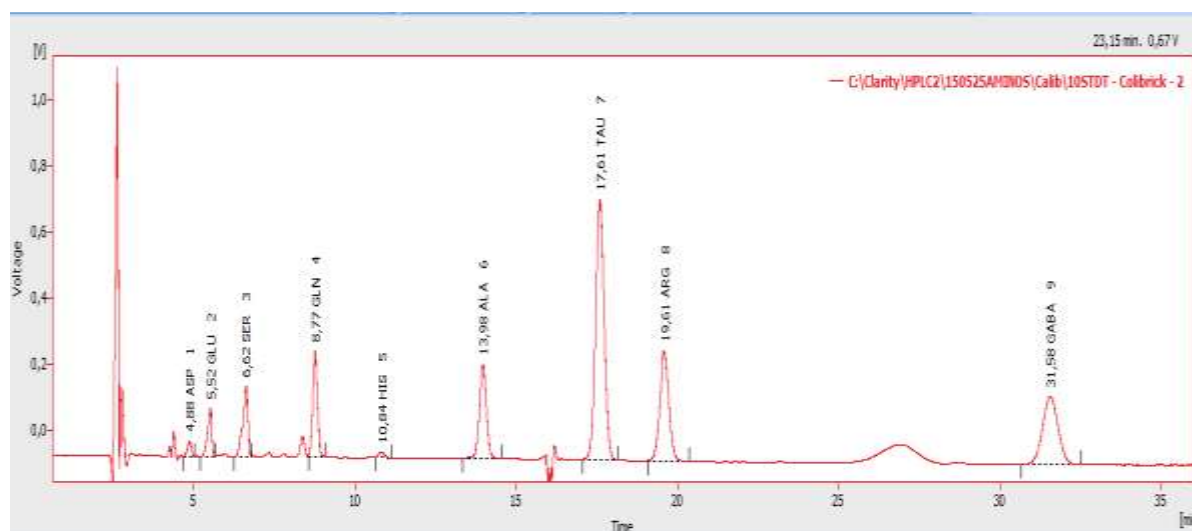
Σχήμα 17: Προσδιορισμός Βιογενών Αμινών

Απεικόνιση ενός χρωματογραφήματος όπου διακρίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στη νοραδρεναλίνη (NA), στη DOPAC, στην ντοπαμίνη (DA), στο 5-HIAA, στο HVA και στη σεροτονίνη (5-HT) (χρωματογράφημα αναφοράς – calibration standard).

3.5.5 Νευροχημική ανάλυση αμινοξέων

Οι αναλυτικές μετρήσεις για τα αμινοξέα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας αντλία υγρής χρωματογραφίας GBC LC1150 (GBC Inc, Braeside, Αυστραλία)

υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ένα LC4C BAS (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) ηλεκτροχημικό ανιχνευτή και παραγοντοποιητή προστήλης. Το ηλεκτρόδιο εργασίας ήταν υαλώδης άνθρακας, το ηλεκτρόδιο αναφοράς ήταν Ag / AgCl και οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Hypersil Gold AQ, 150 mm × 2,1 χιλιοστά, 5 μm (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Η τάση του ηλεκτροδίου εργασίας ορίστηκε στα + 800mV στον αμπερομετρικό ανιχνευτή LC4C και ο ρυθμός ροής της αντλίας LC1150 HPLC ορίστηκε σε 0,2 mL/min. Η κινητή φάση αποτελούνταν από ακετονιτριλίο (Chem-Lab, Βέλγιο): 100 mM μονονατρίου-φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (4:96), με pH 5.5, που περιείχε 0.5 mM Na₂EDTA (Applichem, Germany). Τα δείγματα αρχικά αραιώθηκαν 1:100 με ddH₂O, στη συνέχεια αραιώθηκαν περαιτέρω 1:1 με 0,1 M Borax ρυθμιστικό διάλυμα (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), pH 10.4 κατόπιν προστέθηκε ο-φθαλαλδεΐδη (Sigma-Aldrich) και αφέθηκε να αντιδράσει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά πριν από την ένεση του δείγματος. Η ποσοτικοποίηση του γλουταμικού, της γλουταμίνης, της ταυρίνης, της ιστιδίνης, της αλανίνης, του ασπαρτικού και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) έγινε με σύγκριση της περιοχής κάτω από την καμπύλη με σημείο αναφοράς εξωτερικά πρότυπα χρησιμοποιώντας το λογισμικό HPLC (Clarity, Data-Apex, Czech Republic) (Kokras et al., 2009b).



Σχήμα 18: Απεικόνιση ενός χρωματογραφήματος αναφοράς όπου διακρίνονται οι κορυφές των αναλυόμενων αμινοξέων.

3.5.6 Δραστηριότητα της αρωματάσης

Κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης των εγκεφαλικών περιοχών, απομονώθηκε επίσης ο υποθάλαμος, ο οποίος φυλάχθηκε στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την ανάλυση της δραστηριότητας της αρωματάσης. Η δοκιμασία έλαβε χώρα στο συνεργαζόμενο εργαστήριο της Dr. Charlotte Cornil στο Πανεπιστήμιο της Λιέγης στο Βέλγιο, όπου εστάληκαν τα δείγματα σε ξηρό πάγο. Η δραστηριότητα της αρωματάσης προσδιορίστηκε από την παραγωγή του τριτιωμένου νερού που προκύπτει από τη μετατροπή της $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ -ανδροστενοδιόνης σε οιστρόνη, όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν (Roselli et al., 1985, de Bournonville et al., 2013). Εν συντομία, τα δείγματα από τον υποθάλαμο ομογενοποιήθηκαν και δείγματα (100 μL) του ομογενοποιηματος εις τριπλούν που περιείχαν περίπου 1 mg ιστού προστέθηκαν σε 50 μl των 100nM $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ -ανδροστενοδιόνης και 10mL ρυθμιστικού διαλύματος με ή χωρίς τελεστές. Για την έναρξη της δοκιμασίας, προστέθηκαν 40 mL NADPH. Η αντίδραση διεκόπη με τη ψύξη των δειγμάτων και προσθήκη 0,4 ml παγωμένου 10% τριχλωροοξικού οξέος που περιείχε 2% ενεργό άνθρακα. Μετά από φυγοκέντρηση τα υπερκείμενα προστέθηκαν σε μικρές στήλες με ανταλλαγή κατιόντων AG ρητίνης Dowex 50W-X4, μεγέθους 100-200. Οι στήλες στη συνέχεια εκλούσθηκαν και τα λύματα συλλέχθηκαν σε φιαλίδια σπινθηρισμού και τελικά προστέθηκαν σε αυτά 10 ml Ecoscint A. Τα φιαλίδια μετρήθηκαν σε έναν αναλυτή Packard Tri-Carb 1600 TR υγρού σπινθηρισμού. Η δραστηριότητα του ενζύμου εκφράζεται σε fmol h⁻¹ mg νωπού βάρους ιστού⁻¹.

3.5.7 Προσδιορισμός κορτικοστερόνης

Η κορτικοστερόνη προσδιορίστηκε με τυπική μέθοδο RIA (MP Biomedicals, Costa Mesa, CA), όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν (Kokras et al., 2012). Οι συντελεστές διακύμανσης για τη δια- και ενδο-δοκιμασία ήταν και οι δυο 8%. Η μέθοδος βασίζεται στον έμμεσο προσδιορισμό της ποσότητας μορίων αντιγόνου (ορμόνη κορτικοστερόνη) σε κάθε δείγμα, προσδιορίζοντας την ποσότητα αντιγόνου επισημασμένου με ¹²⁵I (ραδιενεργή κορτικοστερόνη προστιθέμενη εξωτερικά), η οποία έχει προσδεθεί σε περιορισμένη ποσότητα του ειδικού αντισώματος. Η ποσότητα της κορτικοστερόνης, η οποία έχει προσδεθεί στο αντίσωμα διαχωρίζεται ως ίζημα και στη συνέχεια μετράτε η **ακτινοβολία γ** που εκπέμπει το σύμπλοκο [επισημασμένης κορτικοστερόνης –αντισώματος] σε γ -κάμερα.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων της κορτικοστερόνης των δειγμάτων, αρχικά δημιουργείται μία **πρότυπη καμπύλη** από τη μέτρηση της ραδιενέργειας (γ-ακτινοβολία) διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων κορτικοστερόνης. Τα πρότυπα διαλύματα του kit περιλαμβάνουν συγκεντρώσεις 0, 25, 50, 100, 250, 500 και 1000 ng/mL κορτικοστερόνης. Τα προς ανάλυση δείγματα αραιώνονται πριν χρησιμοποιηθούν ως εξής: παραλαμβάνονται 5 μL ορού από κάθε δείγμα και προστίθενται σε 695 μL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Ακολουθεί προσθήκη 300 μL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο περιέχεται στο kit (Steroid diluent). Κατά τη διαδικασία προσδιορισμού, προστίθενται 100μL **κορτικοστερόνης ^{125}I** από το kit και 100μL **αντισώματος κορτικοστερόνης** τόσο στα πρότυπα δείγματα όσο και στα άγνωστα δείγματα. Το διάλυμα της κορτικοστερόνης ^{125}I που χρησιμοποιείται, έχει δημιουργηθεί το ίδιο πρωί με αραιώση της κορτικοστερόνης ^{125}I του kit σε Steroid diluent, έτσι ώστε τα 100 μL του τελικού διαλύματος (Total) να δίνουν στη γ-κάμερα περίπου 2300 cpm (κρούσεις ανά λεπτό). Μετά την προσθήκη της κορτικοστερόνης ^{125}I και του αντισώματος κορτικοστερόνης τα διαλύματα ανακατεύονται καλά και επωάζονται επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να λάβει χώρα η πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Μετά την επώαση προστίθενται 250 μL διαλύματος κατακρήμνισης (αποτελείται από πολυαιθυλενο-γλυκόλη (PEG) και γ-σφαιρίνες, αιγός έναντι ορού κονίκλου σε ρυθμιστικό διάλυμα) στα πρότυπα διαλύματα και στα δείγματα, γίνεται καλό ανακάτεμα και φυγοκέντρωση στις 3000 rpm (1000 g) για 15 λεπτά στους 4°C σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, για την παραλαβή του ιζήματος, το οποίο περιέχει τα σύμπλοκα [κορτικοστερόνης ^{125}I -αντισώματος και κορτικοστερόνης-αντισώματος]. Το υπερκείμενο αποχύνεται και στο ίζημα μετράται η ακτινοβολία σε γ-κάμερα συνδεδεμένη με Η/Υ. Το ειδικό πρόγραμμα του Η/Υ δημιουργεί την πρότυπη καμπύλη από τις κρούσεις του κάθε προτύπου διαλύματος σε σχέση με τη γνωστή συγκέντρωση κορτικοστερόνης του σε ng/mL. Για τον υπολογισμό των ειδικών κρούσεων, οι οποίες προκύπτουν από το σύμπλοκο κορτικοστερόνης ^{125}I – αντισώματος, το πρόγραμμα αφαιρεί τις κρούσεις ενός διαλύματος στο οποίο δεν έχουμε προσθέσει αντιγόνο και αντίσωμα κορτικοστερόνης (non-specific binding). Με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης, το πρόγραμμα του Η/Υ υπολογίζει τη **συγκέντρωση της κορτικοστερόνης στο κάθε δείγμα σε ng/mL**, ανάλογα με τις κρούσεις που έχει δώσει το κάθε ένα από αυτά στη γ-κάμερα.

1.1 Στατιστική επεξεργασία

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSSV21 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL, USA) χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA).

Για το πείραμα 1, χρησιμοποιήθηκε αμφίδρομη ANOVA, με ανεξάρτητες μεταβλητές τη χορήγηση φλουοξετίνης (έκδοχο Α, ή 5mg/kg) και τη χορήγηση λετροζόλης (έκδοχο Β ή 1mg/kg).

Για το πείραμα 2, χρησιμοποιήσαμε μονόδρομη ANOVA με έκδοχο Α+Β έναντι λετροζόλης και έναντι λετροζόλης + φλουοξετίνης ως τρίτου επιπέδου ανεξάρτητη μεταβλητή. Και στα δύο πειράματα οι στατιστικά σημαντικές επιδράσεις και τα αποτελέσματα διερευνήθηκαν με post-hoc δοκιμασίες, χρησιμοποιώντας τον τύπο της διόρθωσης λάθους κατά Bonferonni.

Για κάθε πείραμα έγιναν συσχετίσεις μεταξύ της συμπεριφοράς και των ορμονών χρησιμοποιώντας αρχικά μονοπαραγοντική γραμμή παλινδρόμησης. Αυτό ακολουθήθηκε από ένα πλήρες πολυμεταβλητό μοντέλο, το οποίο περιλαμβάνει χορηγήσεις και ορμόνες.

Στο πείραμα 3, τα αποτελέσματα συμπεριφοράς αναλύθηκαν με τριπλή ανάλυση μεταβλητών (ANOVA) με το φύλο (αρσενικό: θηλυκό), τη θεραπεία (έκδοχο: χορήγηση λετροζόλης) και τη χειρουργική επέμβαση (μάρτυρες: γοναδεκτομή) ως ανεξάρτητους παράγοντες. Τα επίπεδα των ορμονών στον ορό του αίματος, καθώς και τα επίπεδα μονοαμινών και αμινοξέων στους ιστούς αναλύθηκαν με τετραπλή ανάλυση μεταβλητών ANOVA, με πρόσθετη την ανεξάρτητη μεταβλητή του στρες (μάρτυρες: υποβολή στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης). Στις σημαντικές αλληλεπιδράσεις ή στις κύριες επιδράσεις, εν τη απουσία στατιστικά σημαντικών αλληλεπιδράσεων, πραγματοποιήθηκαν post-hoc αναλύσεις διορθωμένες κατά συγκρίσεις ζευγών Bonferoni.

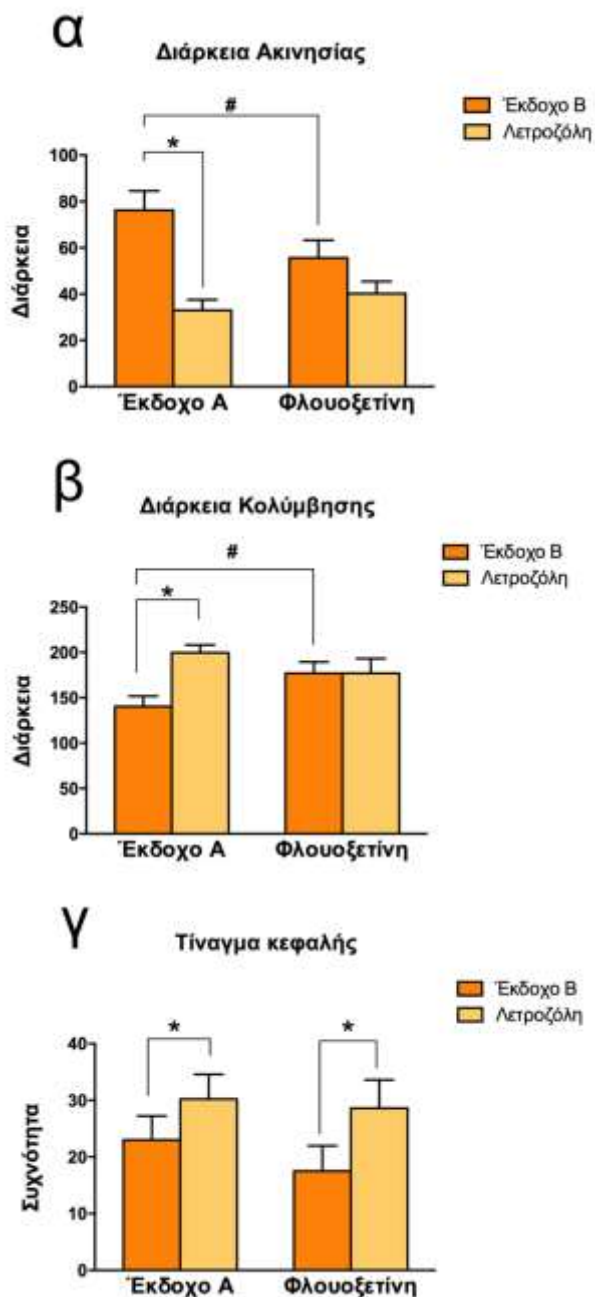
Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0.05$ και η στατιστική τάση ως $p < 0.1$. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι με \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου (SEM).

4 Αποτελέσματα

4.1 Πείραμα 1.

4.1.1 Ανάλυση συμπεριφοράς

Για τη στατιστική μελέτη της διάρκειας ακινησίας χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (two-way ANOVA), η οποία έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ λετροζόλης και φλουοξετίνης ($F_{1,36} = 4.350$ $p=0.044$). Οι συγκρίσεις που ακολούθησαν έδειξαν ότι στους επίμυες στους οποίους προηγήθηκε η χορήγηση φυσιολογικού ορού και σε αυτούς στους οποίους προηγήθηκε η χορήγηση φλουοξετίνης και λετροζόλης παρατηρήθηκε μείωση της διάρκειας της ακινησίας ($p<0.001$; $p=0.035$, αντίστοιχα) (Γράφημα 1α). Η βραχεία χορήγηση λετροζόλης δεν ανέστρεψε την προκαλούμενη από τη χορήγηση φλουοξετίνης μείωση στα επίπεδα ακινησίας. Ομοίως, αναφορικά με τη διάρκεια κολύμβησης, παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση λετροζόλης και φλουοξετίνης ($F_{1,36} = 5.659$ $p=0.23$). Οι μετέπειτα αναλύσεις έδειξαν ότι η βραχεία χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε σημαντική αύξηση της διάρκειας κολύμβησης στους επίμυες που είχαν λάβει προηγουμένως έκδοχο ($p=0.002$) (Γράφημα 1β). Η χρόνια χορήγηση φλουοξετίνης επίσης ενίσχυσε τη διάρκεια κολύμβησης των αρουραίων ($p=0.045$). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διάρκεια αναρρίχησης. Ωστόσο, η λετροζόλη είχε την τάση να αυξάνει στατιστικώς σημαντικά τη συχνότητα τινάγματος κεφαλής ($F_{1,36}=4.069$ $p=0.051$) (Γράφημα 1γ).



Γράφημα 1: Στα παραπάνω γραφήματα απεικονίζεται, η διάρκεια ακινήσις (α) κολύμβησης (β) και η συχνότητα τιναγμάτων κεφαλής (γ) κατά τη διάρκεια των 5 λεπτών της δεύτερης δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST) μετά από 28 ημέρες χορήγησης φυσιολογικού ορού ή φλουοξετίνης (5mg/kg) σε συνδυασμό με 3 χορηγήσεις εκδόχου Β ή λετροζόλης. Σημειώνεται η μείωση της ακινήσις και η αύξηση της διάρκειας κολύμβησης μετά από 3 χορηγήσεις λετροζόλης, η οποία είναι παρόμοια με την αντικαταθλιπτική δράση των 3 ενέσεων φλουοξετίνης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει τη στατιστικά σημαντική επίδραση της λετροζόλης και το σύμβολο της δίεσης (#) την

αντίστοιχη της φλουοξετίνης, όπως φάνηκε από τις συγκρίσεις *post-hoc*. $N=10$ /ομάδα, μέσοι όροι \pm τυπικά σφάλματα.

4.1.2 Ορμονικές αναλύσεις

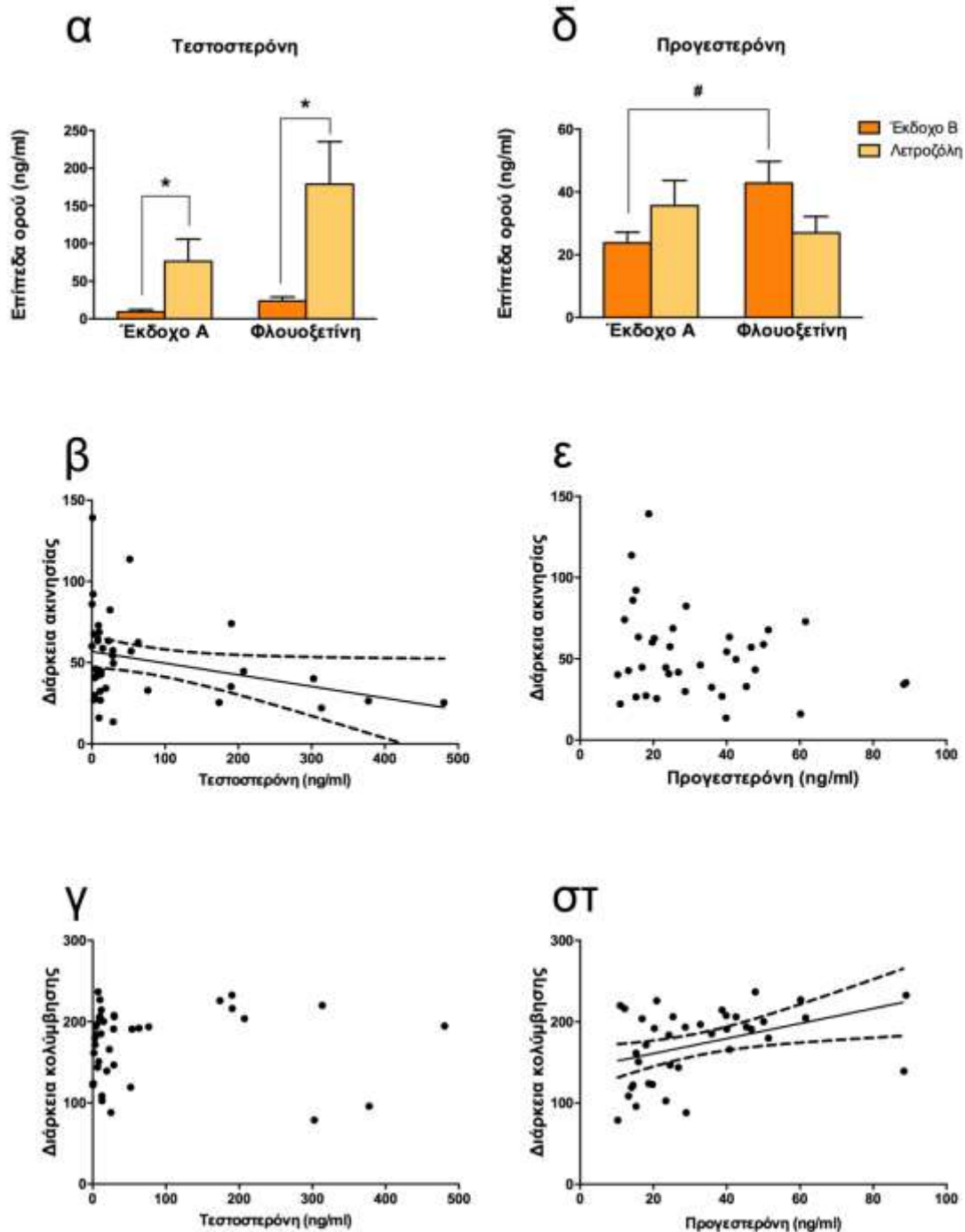
Όπως ήταν αναμενόμενο, σε αντίθεση με τα θηλυκά της ομάδας μαρτύρων, τα θηλυκά τα οποία έλαβαν τρεις ενέσεις λετροζόλης εντός 24 ωρών (βραχεία αγωγή), εμφάνισαν επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό του αίματος ή κοντά ή κάτω από το αντίστοιχο όριο ανίχνευσης. Τα κοιλικά επιχρίσματα έδειξαν φυσιολογικό κύκλο σε όλα τα θηλυκά.

Ως αποτέλεσμα της αναστολής της αρωματάσης, τα επίπεδα τεστοστερόνης ήταν σημαντικά αυξημένα (κύρια επίδραση: $F_{1,35} = 11.939$ $p=0.01$) σε όλους τους αρουραίους στους οποίους έγινε χορήγηση λετροζόλης, αφού είχε προηγηθεί η χορήγηση φυσιολογικού ορού (έκδοχο Α) ή φλουοξετίνης ($p=0.033$; $p=0.001$, αντίστοιχα) (Γράφημα 2α). Είναι αξιοσημείωτο ότι παρατηρήθηκε οριακά στατιστικά σημαντική κύρια επίδραση της φλουοξετίνης στα επίπεδα τεστοστερόνης ($p=0.078$). Ειδικότερα, η φλουοξετίνη προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα τεστοστερόνης στην ομάδα που έλαβε το έκδοχο Β και σε αρουραίους στους οποίους έγινε χορήγηση λετροζόλης, όπως έδειξαν οι δοκιμές που ακολούθησαν ($p=0.033$; $p=0.001$, αντίστοιχα).

Όσον αφορά στην προγεστερόνη, η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση λετροζόλης και φλουοξετίνης ($F_{1,35} = 5.126$ $p=0.03$). Οι περαιτέρω δοκιμές έδειξαν ότι στους αρουραίους στους οποίους προηγήθηκε χορήγηση φυσιολογικού ορού (έκδοχου Α), η βραχεία χορήγηση λετροζόλης δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα προγεστερόνης. Στους αρουραίους στους οποίους προηγήθηκε χορήγηση φλουοξετίνης, η χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε μόνο οριακή μείωση της προγεστερόνης ($p=0.076$). Αντίθετα, στους αρουραίους στους οποίους προηγήθηκε χορήγηση φυσιολογικού ορού (έκδοχου Α), η φλουοξετίνη προκάλεσε αύξηση της προγεστερόνης ($p=0.030$), ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στους αρουραίους στους οποίους έγινε ένεση λετροζόλης (Γράφημα 2δ).

4.1.3 Σχέση μεταξύ δεικτών συμπεριφοράς και ορμονικών δεικτών

Οι μονοπαραγοντικές γραμμικές αναλύσεις παλινδρόμησης έδειξαν ότι τα επίπεδα τεστοστερόνης συσχετίζονται με την ακινησία ($F_{1,38}=4.250$ $p=0.046$) (Γράφημα 2β), ενώ η προγεστερόνη με τη διάρκεια κολύμβησης (Γράφημα 2στ). Η χρήση του πολυπαραγοντικού μοντέλου παλινδρόμησης στο οποίο συμπεριελήφθησαν ως δείκτες όλες οι αγωγές (φλουοξετίνη, λετροζόλη) και οι ορμόνες (οιστραδιόλη, τεστοστερόνη, προγεστερόνη) ερμήνευσε σημαντικά 48% της διακύμανσης της ακινησίας ($F_{5,34}=6.379$ $p<0.001$) και 31% της διακύμανσης της διάρκειας κολύμβησης ($F_{5,34}=3.042$ $p=0.022$). Η λετροζόλη και η οιστραδιόλη ανεδείχθησαν ως οι ισχυρότεροι δείκτες στο μοντέλο παλινδρόμησης που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της ακινησίας ($p=0.003$ και $p=0.035$, αντίστοιχα), ενώ η συμβολή της προγεστερόνης στο μοντέλο ήταν αμελητέα ($p=0.098$). Αντιθέτως, σε ό,τι αφορά στην κολύμβηση, οι ισχυρότεροι δείκτες παλινδρόμησης ήταν η λετροζόλη και η προγεστερόνη ($p=0.016$ και $p=0.014$, αντίστοιχα). Το ίδιο πολυπαραγοντικό μοντέλο παλινδρόμησης δεν ερμήνευσε ένα σημαντικό ποσοστό της διακύμανσης της διάρκειας αναρρίχησης και της συχνότητας τινάγματος κεφαλής. Αξίζει να σημειωθεί ότι το τινάγμα κεφαλής φάνηκε να έχει οριακές, μη σημαντικές συσχετίσεις στο πολυπαραγοντικό μοντέλο με τη χορήγηση φλουοξετίνης και οιστραδιόλης ($p=0.081$ και $p=0.070$, αντίστοιχα).



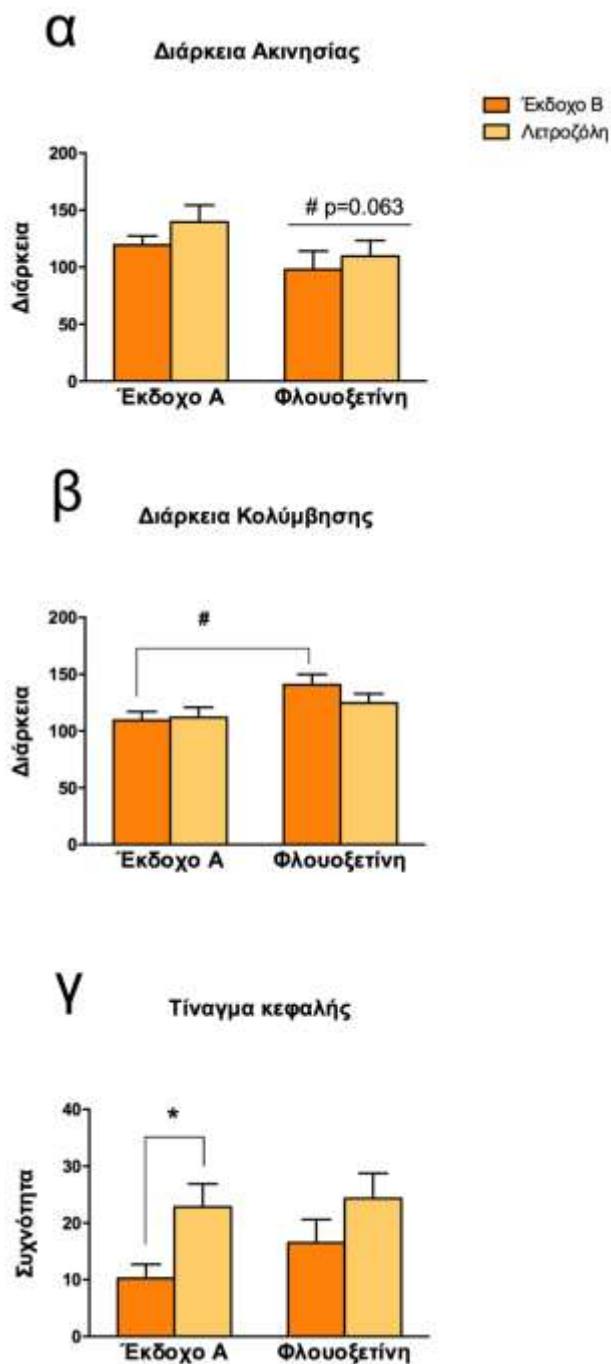
Γράφημα 2: Στα παραπάνω γραφήματα απεικονίζονται τα επίπεδα τεστοστερόνης στον ορό του αίματος (α) και η μονοπαραγοντική γραμμική παλινδρόμηση των επιπέδων της τεστοστερόνης στον ορό του αίματος σε σχέση με την ακινησία (β), και τη διάρκεια κολύμβησης (γ). Επίσης απεικονίζονται τα επίπεδα της προγεστερόνης (δ) και η μονοπαραγοντική γραμμική παλινδρόμηση των επιπέδων της προγεστερόνης στον ορό του αίματος σε σχέση με την ακινησία (ε) και την κολύμβηση (στ) μετά από 28 ημέρες

χορήγησης φυσιολογικού ορού ή φλουοξετίνης (5mg/kg) ως προκαταρκτική αγωγή και 3 χορηγήσεις είτε με έκδοχο B είτε με λετροζόλη. Σημειώνεται, ότι η τεστοστερόνη συσχετίστηκε σημαντικά με την διάρκεια ακινησίας, αλλά όχι με την διάρκεια κολύμβησης. Αντιστρόφως, η προγεστερόνη δεν συσχετίστηκε με την διάρκεια ακινησίας στο μοντέλο μονοπαραγοντικής γραμμικής παλινδρόμησης, αλλά με την διάρκεια κολύμβησης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει τη στατιστικά σημαντική επίδραση της λετροζόλης και το σύμβολο της δίεσης (#) την αντίστοιχη της φλουοξετίνης, όπως καταδεικνύεται από την κατάλληλη *post-hoc* δοκιμή. N=10/ομάδα, μέσοι όροι ± τυπικά σφάλματα.

4.2 Πείραμα 2

4.2.1 Ανάλυση συμπεριφοράς

Η δοκιμασία μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (two-way ANOVA), η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική μελέτη της ακινησίας, καθώς και της διάρκειας κολύμβησης και αναρρίχησης, δεν έδειξε σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φλουοξετίνης και λετροζόλης. Η ανάλυση έδειξε μία οριακά, μη στατιστικά σημαντική κύρια επίδραση της φλουοξετίνης ($F_{1,42}=3.658$ $p=0.063$), με δεδομένο ότι η φλουοξετίνη έτεινε να μειώσει τη διάρκεια ακινησίας (Γράφημα 3α). Όπως ήταν αναμενόμενο, η φλουοξετίνη προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της διάρκειας κολύμβησης ($F_{1,42}=6.634$ $p=0.014$), ενώ οι συγκρίσεις κατά ζεύγη με τη δοκιμασία Bonferroni έδειξαν ότι αυτό το αποτέλεσμα ήταν στατιστικά σημαντικό μόνο στους αρουραίους που έλαβαν το έκδοχο B ($p=0.015$) και όχι στους αρουραίους στους οποίους έγινε χορήγηση λετροζόλης (Γράφημα 3β). Η διαρκής αναστολή της αρωματάσης δεν είχε επίδραση στη συμπεριφορά των αρουραίων, με εξαίρεση μία στατιστικά σημαντική κύρια επίδραση στο τίναγμα της κεφαλής ($F_{1,42}=7.038$ $p=0.011$). Μετέπειτα δοκιμασίες έδειξαν ότι μόνο οι αρουραίοι που έλαβαν το έκδοχο A, και όχι αυτοί στους οποίους προηγήθηκε χορήγηση φλουοξετίνης, εμφάνισαν πιο πολλά τινάγματα κεφαλής μετά από επαναλαμβανόμενες ενέσεις λετροζόλης ($p=0.023$) (Γράφημα 3γ).



Γραφημα 3: Στα παραπάνω γραφήματα απεικονίζεται, η διάρκεια ακινήσιος (α), κολύμβησης (β) και η συχνότητα τιναγμάτων κεφαλής (γ) κατά την διάρκεια των 5 λεπτών της δεύτερης δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST) μετά από προκαταρκτική αγωγή για 28 ημέρες με έκδοχο Α (φυσιολογικός ορός) ή φλουοξετίνης (5mg/kg) και 7 καθημερινές χορηγήσεις είτε με έκδοχο Β ή λετροζόλης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει τη στατιστικά σημαντική επίδραση της λετροζόλης και το σύμβολο της δίεσης (#) την αντίστοιχη της φλουοξετίνης, όπως φαίνεται από την διπλή ανάλυση

ANOVA και την κατάλληλη post-hoc δοκιμασία.. N=10-12/ομάδα, μέσοι όροι ± τυπικά σφάλματα.

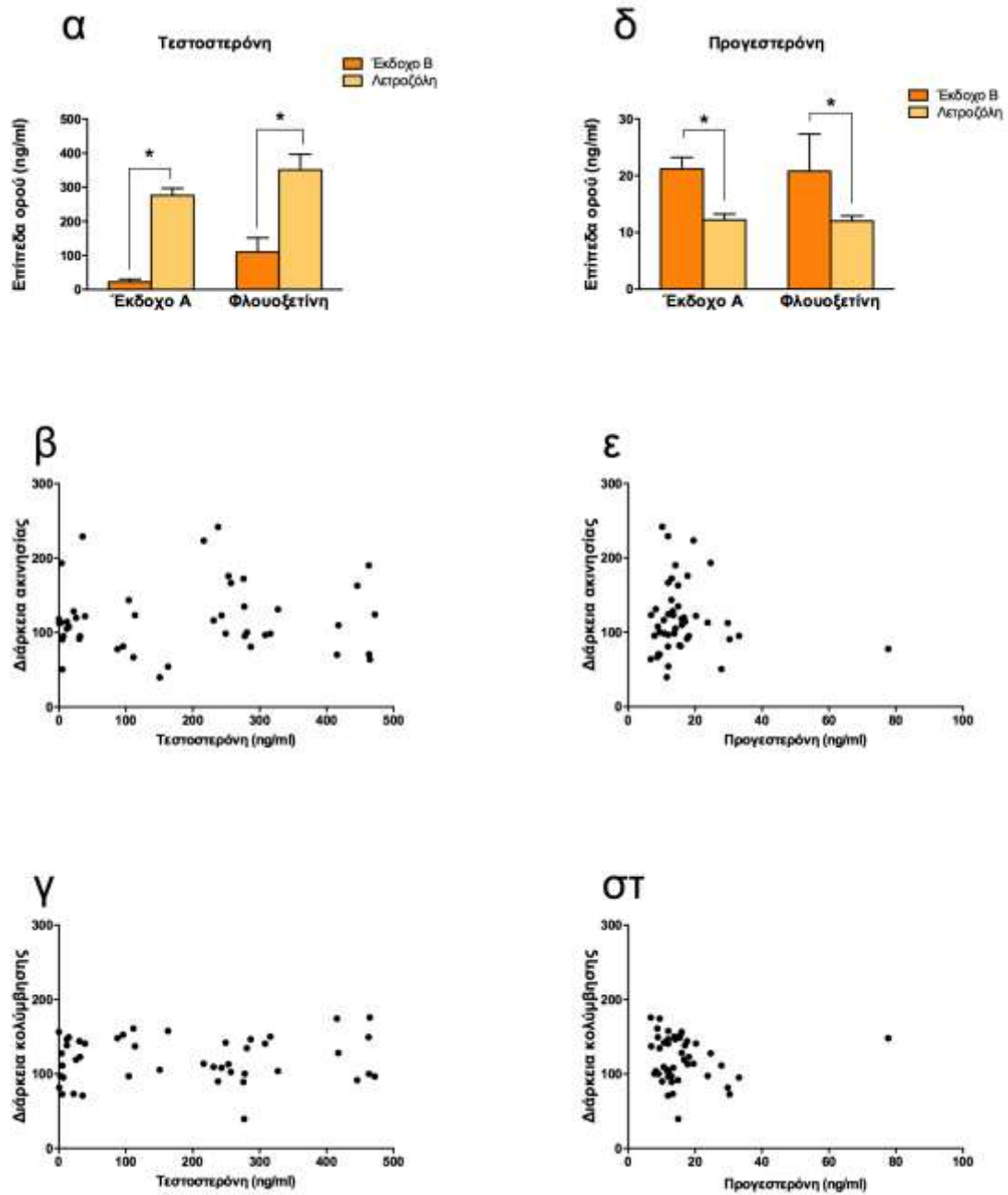
4.2.2 Ορμονικές αναλύσεις

Όλοι οι αρουραίοι που υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενες ενέσεις λετροζόλης για μία εβδομάδα, παρουσίασαν διαταραχή στον κύκλο του οίστρου και τα επίπεδα των οιστρογόνων τους ήταν κοντά ή κάτω από το ανιχνεύσιμο όριο, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στους αρουραίους που δεν έλαβαν το Β.

Τα επίπεδα τεστοστερόνης ήταν σημαντικά αυξημένα μετά την επαναλαμβανόμενη χορήγηση λετροζόλης ($F_{1,42}=58.363$ $p<0.001$). Μετέπειτα δοκιμασίες έδειξαν ότι η λετροζόλη μεμονωμένη ή σε συνδυασμό με προηγούμενη χορήγηση φλουοξετίνης προκάλεσε σημαντική αύξηση της τεστοστερόνης ($p<0.001$ και στις δύο αγωγές) (Γράφημα 4α). Είναι αξιοσημείωτο ότι και η φλουοξετίνη επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα τεστοστερόνης ($F_{1,42} =6.283$ $p=0.016$) και οι ακόλουθες κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν ότι η φλουοξετίνη, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με λετροζόλη, έτεινε να αυξήσει την προγεστερόνη (Γράφημα 4δ). Σε ό,τι αφορά στην προγεστερόνη, η διαρκής αναστολή της αρωματάσης προκάλεσε σημαντική μείωση ($F_{1,42} =8.092$ $p=0.007$). Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν ότι η λετροζόλη, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με φλουοξετίνη, προκάλεσε μείωση της προγεστερόνης ($p=0.043$ και $p=0.058$, αντίστοιχα) (Γράφημα 4δ).

4.2.3 Σχέση μεταξύ δεικτών συμπεριφοράς και ορμονικών δεικτών

Μοντέλα συσχέτισης και γραμμικής παλινδρόμησης έδειξαν ότι κανείς από τους δείκτες συμπεριφοράς που ελέγχθηκαν δεν επηρεάζεται από τις ορμόνες στη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη, με εξαίρεση τη συχνότητα τινάγματος κεφαλής, που εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα προγεστερόνης στον ορό του αίματος ($r=-0.298$ $p=0.045$ $n=46$) και θετική με τα επίπεδα τεστοστερόνης ($r =0.339$ $p=0.021$ $n= 46$) (Γράφημα 4).



Γράφημα 4: Σε αυτά τα γραφήματα απεικονίζονται τα επίπεδα της τεστοστερόνης στον ορό του αίματος (α) και η μονοπαραγοντική γραμμική παλινδρόμηση των επιπέδων της τεστοστερόνης στον ορό του αίματος σε σχέση με την ακινησία (β) και τη διάρκεια κολύμβησης (γ). Επίσης απεικονίζεται η προγεστερόνη (δ) και η μονοπαραγοντική γραμμική παλινδρόμηση των επιπέδων της προγεστερόνης στον ορό του αίματος σε σχέση με την ακινησία (ε) και την κολύμβηση (στ) μετά από 28 ημέρες χορήγησης εκδόχου Α ή φλουοξετίνης (5mg/kg) ως προκαταρκτική αγωγή και 7 χορηγήσεις έκδοχου

Β ή λετροζόλης. Ο αστερίσκος () υποδηλώνει την στατιστικά σημαντική επίδραση της λετροζόλης, όπως καταδεικνύεται από την διπλή ανάλυση ANOVA και την κατάλληλη post-hoc δοκιμασία. N=10-12/ομάδα, μέσοι όροι ±τυπικά σφάλματα*

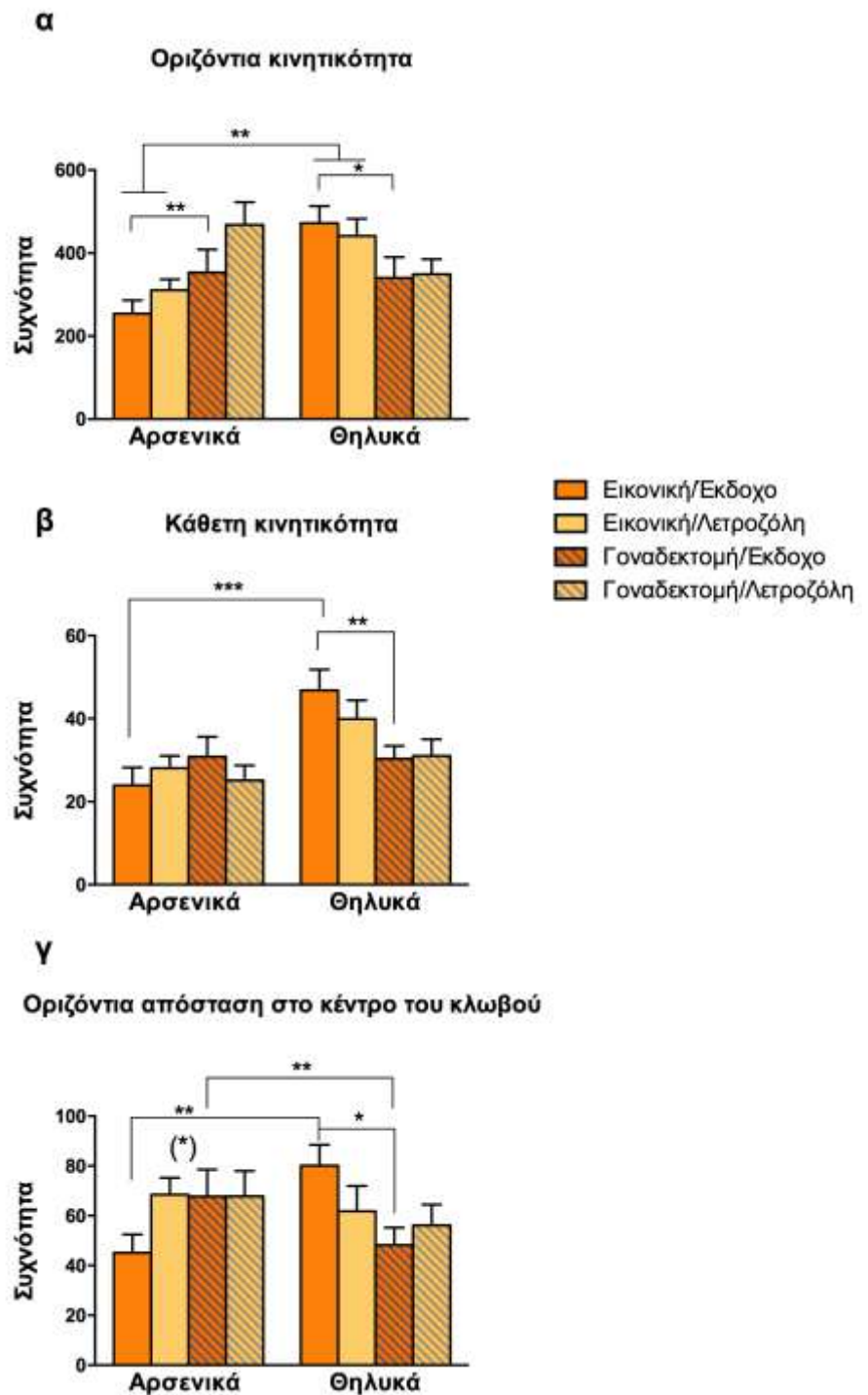
4.3 Πείραμα 3

4.3.1 Ανάλυση συμπεριφοράς

4.3.1.1 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου

Τα θηλυκά πειραματόζωα φάνηκαν πιο κινητικά και εξερευνητικά σε σχέση με τα αρσενικά, ανεξάρτητα από τη χορήγηση εκδόχου ή λετροζόλης, όπως έδειξαν οι μετρήσεις οριζόντιας ($p < 0.001$) και κάθετης ($p < 0.001$) κινητικότητας στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η αφαίρεση των γονάδων εξουδετέρωσε αυτή τη διαφορά φύλου τόσο στην οριζόντια όσο και στην κάθετη κινητικότητα (αλληλεπίδραση φύλου και χειρουργικής επέμβασης [$F_{(1,89)} = 14.123$; $p < 0.001$] και [$F_{(1,89)} = 5.723$; $p = 0.019$], αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, ο ευνουχισμός στα αρσενικά ενίσχυσε την οριζόντια κινητικότητα ($p = 0.002$), ενώ η ωοθηκεκτομή μείωσε την οριζόντια ($p = 0.031$) και την κάθετη ($p = 0.005$) κινητικότητα στα θηλυκά πειραματόζωα (Γράφημα 5α και β). Η αναστολή της σύνθεσης οιστρογόνων μετά από τη χορήγηση λετροζόλης δεν είχε καμία επίδραση στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου στα θηλυκά που δεν υποβλήθηκαν σε γοναδεκτομή, καθώς και σε πειραματόζωα τα οποία υποβλήθηκαν σε γοναδεκτομή ($p > 0.05$).

Τα αρσενικά στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο έτειναν να έχουν χαμηλότερες εισόδους στο κέντρο του ανοιχτού πεδίου σε σχέση με τα θηλυκά ($p = 0.017$) και η ωοθηκεκτομή ανέστρεψε αυτή τη διαφορά φύλου (αλληλεπίδραση φύλου και χειρουργικής επέμβασης [$F_{(1,89)} = 5.066$; $p = 0.027$]). Πιο συγκεκριμένα, τα θηλυκά που υποβλήθηκαν στη χορήγηση εκδόχου μετά από ωοθηκεκτομή έτειναν να έχουν λιγότερες εισόδους στο κέντρο του ανοιχτού πεδίου σε σχέση με τα θηλυκά που δεν υποβλήθηκαν σε γοναδεκτομή ($p = 0.072$). Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα αρσενικά πειραματόζωα (Γράφημα 5γ). Η λετροζόλη έτεινε να αυξήσει την είσοδο στο κέντρο του ανοιχτού πεδίου στα αρσενικά που δεν υποβλήθηκαν σε γοναδεκτομή, σε σύγκριση με τα αρσενικά στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο (αλληλεπίδραση φύλου και χειρουργικής επέμβασης [$F_{(1,89)} = 3.45$; $p = 0.067$] και post-hoc $p = 0.05$).



Γράφημα 5: Σε αυτά τα γραφήματα απεικονίζεται, η οριζόντια (α) και η κάθετη (β) κινητικότητα, όπως επίσης και η συχνότητα εισόδων στο κέντρο (γ), κατά την διάρκεια των 10 λεπτών στην δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου. Τα ζώα είτε χειρουργήθηκαν εικονικά, είτε υποβλήθηκαν σε ορχεκτομή, είτε σε ωθηκεκτομή. Τρεις εβδομάδες μετά την χειρουργική επέμβαση, οι επίμυες υποβλήθηκαν σε ενδοπεριτοναϊκή ένεση είτε με

έκδοχο, είτε με λετροζόλη (1 mg/kg) καθημερινά για μία εβδομάδα και, κατόπιν αυτού, υποβλήθηκαν στις δοκιμασίες συμπεριφοράς. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές κύριες επιδράσεις ή επακόλουθες *post-hoc* συγκρίσεις. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει τη στατιστικά σημαντική τάση $p < 0.1$, * υποδηλώνει τη στατιστική σημαντικότητα $p < 0.05$, ** υποδηλώνουν $p < 0.01$ και *** υποδηλώνουν $p < 0.001$, όπως αναφέρεται παραπάνω. Τα γραφήματα απεικονίζουν μέσους όρους με \pm τυπικά σφάλματα.

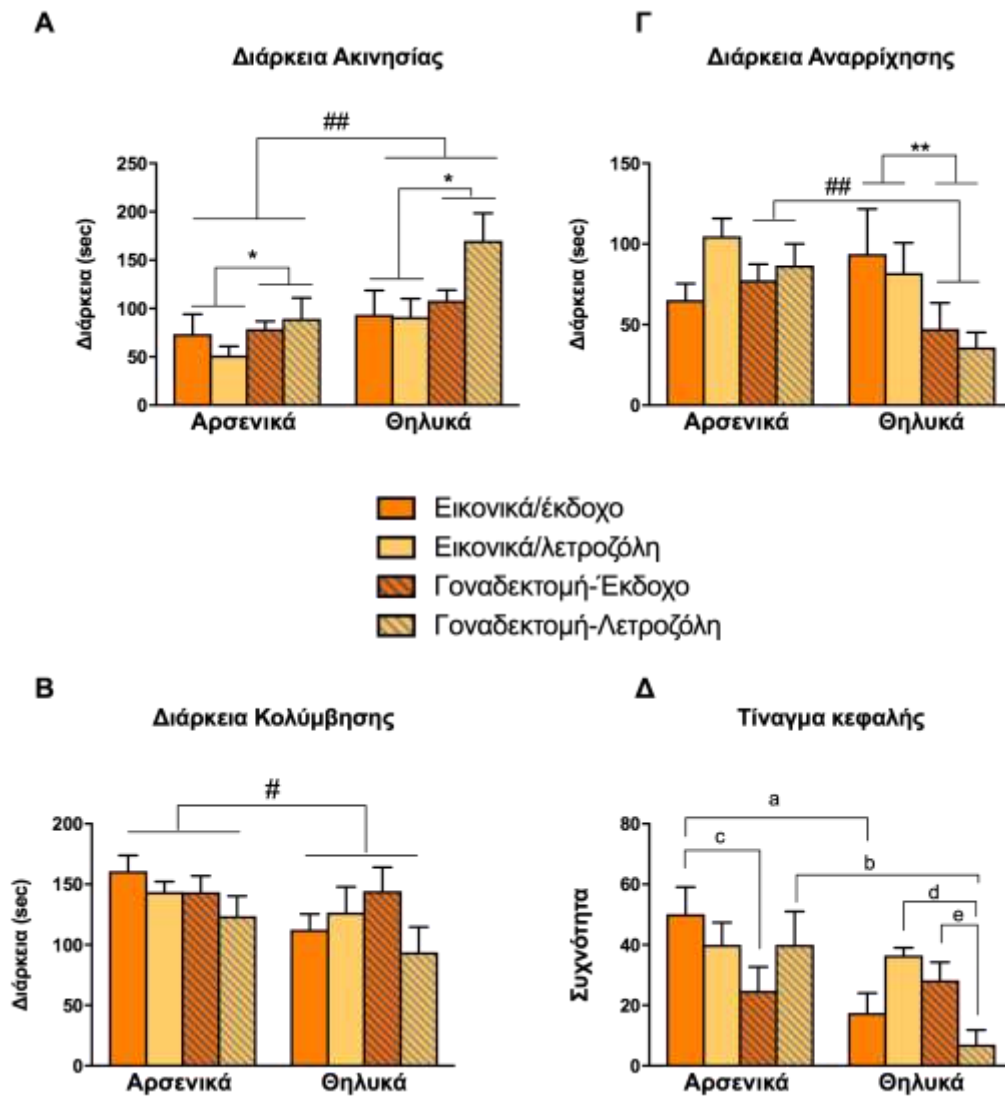
4.3.1.2 Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST)

Στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, τα θηλυκά επέδειξαν υψηλότερη διάρκεια ακινησίας και χαμηλότερα επίπεδα κολύμβησης σε σχέση με τα αρσενικά (κύρια επίδραση φύλου: $[F_{(1,41)}=7.667 \ p=0.008]$ και $[F_{(1,41)}=4.055 \ p=0.051]$, αντίστοιχα) (Γράφημα 6α και β). Όσον αφορά στα επίπεδα ακινησίας, υπήρχε επίσης μία κύρια επίδραση της χειρουργικής επέμβασης $[F_{(1,41)}=6.589 \ p=0.014]$. Τα θηλυκά μετά από ωθηκεκτομή και τα ευνουχισμένα αρσενικά στα οποία χορηγήθηκε λετροζόλη επέδειξαν υψηλότερη διάρκεια ακινησίας σε σχέση με τα θηλυκά και τα αρσενικά που δεν υποβλήθηκαν σε γοναδεκτομή ($p=0.004$).

Σε ό,τι αφορά στη διάρκεια αναρρίχησης, τα θηλυκά επέδειξαν γενικά χαμηλότερη διάρκεια αναρρίχησης σε σχέση με τα αρσενικά (αλληλεπίδραση φύλου με εγχείρηση $[F_{(1,41)}=4.105 \ p=0.049]$). Η ωθηκεκτομή και ο ευνουχισμός μείωσαν τη διάρκεια αναρρίχησης στα θηλυκά πειραματόζωα, ανεξαρτήτως χορήγησης λετροζόλης ή όχι (Γράφημα 6γ).

Σε ό,τι αφορά στη συχνότητα τινάγματος της κεφαλής, στα θηλυκά που δεν υποβλήθηκαν σε γοναδεκτομή και τους χορηγήθηκε έκδοχο, ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με τα αρσενικά που δεν υποβλήθηκαν σε γοναδεκτομή και τους χορηγήθηκε έκδοχο ($p=0.011$). Αντιθέτως, ο ευνουχισμός, προκάλεσε μείωση της συχνότητας τινάγματος κεφαλής στα αρσενικά που τους χορηγήθηκε έκδοχο ($p=0.035$) και εξουδετέρωσε τη διαφορά φύλου. Η χορήγηση λετροζόλης δεν είχε καμία επίδραση στα αρσενικά, ανεξάρτητα από το αν προηγήθηκε χειρουργική επέμβαση ή όχι. Αντιθέτως, στα θηλυκά πειραματόζωα είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση αντίθετων

δράσεων σε αυτά δεν υποβλήθησαν σε ωθηκεκτομή και στα ωθηκεκτομηθέντα ζώα (αλληλεπίδραση φύλου, χειρουργικής επέμβασης και αγωγής [$F_{(1,41)}=11.581$ $p=0.001$]). Οι θηλυκοί αρουραίοι οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε ωθηκεκτομή και στους οποίους χορηγήθηκε λετροζόλη εμφάνισαν μικρότερη συχνότητα τινάγματος κεφαλής σε σχέση με τους αρουραίους που δεν υποβλήθησαν σε γοναδεκτομή και τους χορηγήθηκε λετροζόλη ($p=0.001$). Η χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε μείωση της συχνότητας τινάγματος κεφαλής στα ωθηκεκτομηθέντα θηλυκά ($p=0.008$). Ως αποτέλεσμα, η διαφορά του φύλου, δηλαδή η υψηλότερη συχνότητα τινάγματος κεφαλής που παρατηρήθηκε στα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά, επανεμφανίστηκε στους γοναδεκτομηθέντες αρουραίους στους οποίους είχε χορηγηθεί λετροζόλη ($p=0.001$) (Γράφημα 6δ).



Γράφημα 6: Σε αυτά τα γραφήματα απεικονίζεται, η διάρκεια σε δευτερόλεπτα της ακινησίας (α), της αναρρίχησης (γ), της κολύμβησης (β), καθώς και η συχνότητα των τιναγμάτων της κεφαλής (δ), των αρσενικών και θηλυκών επίμυων, κατά την διάρκεια των 5 λεπτών της δεύτερης δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης. Τα ζώα είτε χειρουργήθηκαν εικονικά, είτε υποβλήθηκαν σε ορχεκτομή είτε σε ωθηκεκτομή. Τρεις εβδομάδες μετά την χειρουργική επέμβαση, οι επίμυες έλαβαν ενδοπεριτοναϊκή ένεση, είτε με έκδοχο, είτε με λετροζόλη (1 mg/kg) καθημερινά για μία εβδομάδα και κατόπιν αυτού υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες συμπεριφοράς. Οι αστερίσκοι, τα γράμματα και η δίεση υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές κύριες επιδράσεις ή επακόλουθες post-hoc συγκρίσεις. Τα γραφήματα απεικονίζουν μέσους όρους \pm τυπικά σφάλματα.

4.4 Πείραμα 3. Βιοχημικές και ορμονικές αναλύσεις

4.4.1 Δραστηριότητα της αρωματάσης

Η στατιστική ανάλυση έδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ φύλου, αγωγής και στρες [$F_{(1,78)}=6.138$ $p=0.015$] και αλληλεπίδραση μεταξύ φύλου και χειρουργικής επέμβασης [$F_{(1,78)}=6.460$ $p=0.013$] στη δραστηριότητα της αρωματάσης στον υποθάλαμο. *Post-hoc* συγκρίσεις επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι η λετροζόλη αναστέλλει την αρωματάση στον εγκέφαλο, εφόσον η χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε δραστική μείωση της δραστηριότητας της αρωματάσης στον υποθάλαμο σε όλες τις ομάδες αρσενικών στα οποία χορηγήθηκε λετροζόλη ($p<0.001$) και τάση μείωσης σε όλες τις ομάδες θηλυκών στα οποία χορηγήθηκε λετροζόλη ($p=0.06$). Είναι αξιοσημείωτο ότι η δραστηριότητα της αρωματάσης στον υποθάλαμο ήταν πολύ υψηλότερη στα αρσενικά-μάρτυρες τα οποία υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς γοναδεκτομή και στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα θηλυκά ($p<0.001$). Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι η έκθεση στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (στρες), προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου της αρωματάσης στα αρσενικά τα οποία υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς γοναδεκτομή και στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο, σε σύγκριση με τα αρσενικά-μάρτυρες ($p<0.001$) (Γράφημα 7α).

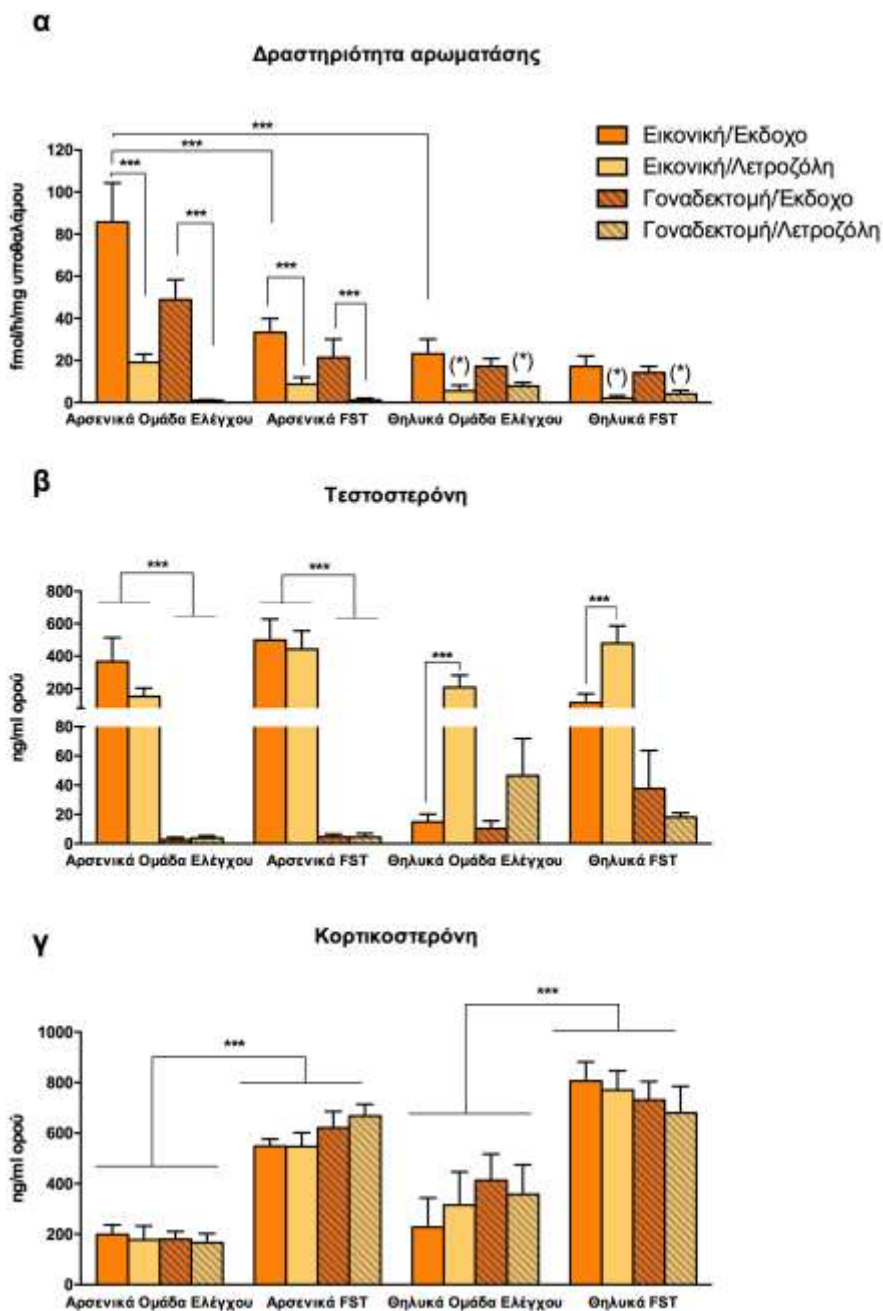
4.4.2 Επίπεδα τεστοστερόνης

Η ανάλυση έδειξε αλληλεπίδραση φύλου, χειρουργικής επέμβασης και αγωγής [$F_{(1,80)}=8.59$; $p=0.004$], καθώς και αλληλεπίδραση στρες και χειρουργικής επέμβασης [$F_{(1,80)}=8.997$; $p=0.004$] στα επίπεδα τεστοστερόνης στον ορό του αίματος. Οι *post-hoc* συγκρίσεις έδειξαν ότι οι αρσενικοί αρουραίοι, οι οποίοι υποβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς γοναδεκτομή και στους οποίους είχε χορηγηθεί έκδοχο είχαν πολύ υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης σε σχέση με τους αντίστοιχους θηλυκούς ($p<0.001$). Όπως ήταν αναμενόμενο, ο ευνουχισμός προκάλεσε μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης σε όλα τα αρσενικά ($p<0.001$, για όλες τις ομάδες αρσενικών). Είναι, επίσης, σημαντικό ότι τα επίπεδα τεστοστερόνης αυξήθηκαν δραστικά σε θηλυκούς αρουραίους, οι οποίοι υποβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς γοναδεκτομή και στους οποίους χορηγήθηκε λετροζόλη, σε σύγκριση με αυτούς στους οποίους

χορηγήθηκε έκδοχο ($p < 0.001$), ανεξάρτητα από την έκθεση στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης ή όχι (Γράφημα 7β).

4.4.3 Επίπεδα κορτικοστερόνης

Το στρες της εξαναγκασμένης κολύμβησης ενίσχυσε τα επίπεδα κορτικοστερόνης και στα δύο φύλα, ανεξαρτήτως αγωγής ή χειρουργικής επέμβασης [συνολική επίδραση στρες: $F_{(1,83)}=116.924$ $p < 0.001$ και $p < 0.001$, για όλες τις *post-hoc* συγκρίσεις]. Η αλληλεπίδραση φύλου, χειρουργικής επέμβασης και στρες [$F_{(1,83)}=4.000$ $p=0.049$] προέκυψε από το γεγονός ότι τα ευνοχισμένα αρσενικά μάρτυρες είχαν χαμηλότερα επίπεδα κορτικοστερόνης από τα ωθηκεκτομηθέντα θηλυκά μάρτυρες ($p=0.006$), ανεξάρτητα από τη χορήγηση λετροζόλης ή όχι. Επίσης, τα αρσενικά, τα οποία υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς γοναδεκτομή και στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης είχαν χαμηλότερα επίπεδα κορτικοστερόνης, σε σύγκριση με τα θηλυκά, τα οποία υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς γοναδεκτομή και στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης ($p=0.002$), ανεξάρτητα από τη χορήγηση λετροζόλης ή όχι (Γράφημα 7γ).



Γράφημα 7: Σε αυτά τα γραφήματα απεικονίζεται, η δραστηριότητα της αρωματάσης (α) στον υποθάλαμο (fmol/h/mg), καθώς και τα επίπεδα στον ορό του αίματος (ng/ml) της τεστοστερόνης (β) και της κορτικοστερόνης (γ), αρσενικών και θηλυκών επίμων μαρτύρων ή επίμων που θανατώθηκαν αμέσως μετά την δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST). Τα ζώα είτε χειρουργήθηκαν εικονικά, είτε υποβλήθηκαν σε ορχεκτομή, είτε σε ωθηεκτομή. Τρεις εβδομάδες μετά την χειρουργική επέμβαση, οι επίμνες έλαβαν ενδοπεριτοναϊκή ένεση είτε με έκδοχο είτε με λετροζόλη (1 mg/kg) καθημερινά για 8 ημέρες. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά

σημαντικές κύριες επιδράσεις ή επακόλουθες *post-hoc* συγκρίσεις. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την στατιστικά σημαντική τάση $p < 0.1$ και *** υποδηλώνουν $p < 0.001$, όπως αναλύεται στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Τα γραφήματα απεικονίζουν μέσους όρους με \pm τυπικά σφάλματα.

4.5 Πείραμα 3. Νευροχημικές αναλύσεις

4.5.1 Σεροτονινεργική δραστηριότητα στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο

Στον προμετωπιαίο φλοιό, τα επίπεδα 5-HT ήταν γενικά υψηλότερα στα θηλυκά από ό,τι στα αρσενικά πειραματόζωα [κύρια επίδραση φύλου: $F_{(1,75)}=19.800$ $p < 0.001$], ενώ η χειρουργική επέμβαση και το στρες δεν άσκησαν καμία επίδραση στα εν λόγω επίπεδα (Γράφημα 8α).

Ωστόσο, σχετικά με τα επίπεδα 5-HIAA, του μεταβολίτη της 5-HT, υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση χορήγησης λετροζόλης και στρες [$F_{(1,71)}=4.103$ $p=0.049$], κύρια επίδραση της εγχείρησης [$F_{(1,71)}=9.922$ $p=0.002$] και αλληλεπίδραση του φύλου με το στρες [$F_{(1,71)}=6.451$ $p=0.013$]. *Post-hoc* αναλύσεις έδειξαν ότι ο ευνουχισμός στα αρσενικά και η ωοθηκεκτομή στα θηλυκά ενίσχυσαν τα επίπεδα 5-HIAA μόνο στους επίμυες που υπεβλήθησαν στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (*FST*) ($p=0.001$), ανεξάρτητα από τη χορήγηση λετροζόλης ή όχι. Επιπρόσθετα, η δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης ενίσχυσε τα επίπεδα 5-HIAA σε όλους τους αρσενικούς επίμυες ($p=0.001$), αλλά όχι στα θηλυκά. Τελικά, οι θηλυκοί μάρτυρες είχαν συνολικά υψηλότερα επίπεδα 5-HIAA, σε σύγκριση με τους αρσενικούς αρουραίους μάρτυρες, ανεξάρτητα με την υποβολή σε γοναδεκτομή ή όχι ($p=0.047$) (Γράφημα 8β).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε γενική επίδραση του στρες στο λόγο 5-HIAA/5-HT στον προμετωπιαίο φλοιό [$F_{(1,71)}=6.539$ $p=0.013$], καθώς και αλληλεπίδραση φύλου και εγχείρηση [$F_{(1,71)}=4.670$ $p=0.034$].

Σχετικά με τα επίπεδα 5-HT στον ιππόκαμπο, παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση φύλου και χειρουργικής επέμβασης [$F_{(1,79)}=12.060$ $p=0.001$], καθώς και επίδραση του στρες [$F_{(1,79)}=5.479$ $p=0.022$]. Οι *Post-hoc* αναλύσεις έδειξαν ότι ο ευνουχισμός προκάλεσε μείωση των επιπέδων 5-HT στον ιππόκαμπο των αρσενικών επίμυων μαρτύρων και αυτών που υποβλήθησαν στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης ($p < 0.001$),

ανεξάρτητα από την χορήγηση λετροζόλης ή όχι. Η έκθεση σε στρες προκάλεσε μείωση των επιπέδων 5-HT στον υπόκαμπο αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων τα οποία είχαν υποβληθεί σε γοναδεκτομή και στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο και λετροζόλη ($p=0.005$). Τέλος, τα ωοθηκεκτομηθέντα θηλυκά μάρτυρες είχαν υψηλότερα επίπεδα 5-HT σε σύγκριση με τα ευνουχισμένα αρσενικά μάρτυρες ($p<0.001$) (Γράφημα 8β).

Επιπλέον, η χορήγηση λετροζόλης αύξησε τον ρυθμό ανακύκλωσης της 5-HT, 5-HIAA/5-HT στον υπόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων μαρτύρων, σε σύγκριση με αυτούς στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (αλληλεπίδραση αγωγής και στρες [$F_{(1,64)}=5.599$ $p=0.021$] και *post-hoc*: $p=0.027$). Η υποβολή στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης αύξησε το λόγο 5-HIAA/5-HT στους αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο ($p=0.007$), αλλά αυτή η επίδραση ήταν πιο εμφανής στα αρσενικά ($p=0.021$)).

4.5.2 Κατεχολαμίνες στον προμετωπιαίο φλοιό και στον υπόκαμπο

Η χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε μείωση των επιπέδων NA στον προμετωπιαίο φλοιό και στον υπόκαμπο των πειραματοζώων σε όλες τις ομάδες, ανεξάρτητα από την υποβολή σε γοναδεκτομή ή στρες [κύριες επιδράσεις αγωγής: $F_{(1,74)}=4.392$ $p=0.040$ και $F_{(1,79)}=8.023$ $p=0.006$, για τον προμετωπιαίο φλοιό και τον υπόκαμπο, αντίστοιχα]. Στον υπόκαμπο, υπήρξε επίσης μία τάση μείωσης των επιπέδων NA λόγω της γοναδεκτομής, σε όλες τις ομάδες ζώων [κύρια επίδραση χειρουργικής επέμβασης: $F_{(1,79)}=3.836$ $p=0.054$].

Σχετικά με την ντοπαμινεργική δραστηριότητα στον προμετωπιαίο φλοιό, η χορήγηση λετροζόλης δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα DA και HVA ή στο ρυθμό ανακύκλωσης της HVA/DA. Ωστόσο, η χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε μείωση των επιπέδων DOPAC σε όλες τις ομάδες πειραματοζώων [κύρια επίδραση αγωγής: $F_{(1,71)}=9.294$ $p=0.003$], ανεξάρτητα από το φύλο, τη γοναδεκτομή και την υποβολή στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (Γράφημα 9γ). Ως αποτέλεσμα, ο ρυθμός ανακύκλωσης της DOPAC/DA μειώθηκε από τη χορήγηση λετροζόλης σε όλες τις ομάδες πειραματοζώων (κύρια επίδραση αγωγής: $F_{(1,69)}=8.097$ $p=0.006$), ανεξάρτητα από το φύλο, τη γοναδεκτομή και την υποβολή στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης.

Επιπρόσθετα, τα επίπεδα DA, αυξήθηκαν από τη γοναδεκτομή [κύρια επίδραση χειρουργικής επέμβασης: $F_{(1,71)}=7.163$ $p=0.009$], ενώ τα επίπεδα HVA και DOPAC δεν επηρεάστηκαν. Κατά συνέπεια, η γοναδεκτομή προκάλεσε μείωση του λόγου DOPAC/DA (κύρια επίδραση χειρουργικής επέμβασης: [$F_{(1,69)}=8.920$ $p=0.004$]) και τάση μείωσης της αναλογίας HVA/DA (χειρουργική επέμβαση [$F_{(1,71)}=3.438$ $p=0.068$]). Η υποβολή στην στρεσογόνο διαδικασία της δοκιμασίας της εξαναγκασμένης κολύμβησης ενίσχυσε τα επίπεδα DA και DOPAC στον προμετωπιαίο φλοιό (κύριες επιδράσεις στρες: [$F_{(1,71)}=5.493$ $p=0.022$] και $F_{(1,71)}=4.852$ $p=0.031$], αντίστοιχα), ενώ το DOPAC/DA δεν επηρεάστηκε από το στρες. Ωστόσο, η ανατροπή του λόγου HVA/DA μειώθηκε από την έκθεση στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης [κύρια επίδραση στρες: $F_{(1,71)}=4.944$ $p=0.029$]. Επίσης, οι θηλυκοί επίμυες είχαν γενικά υψηλότερα επίπεδα DA στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τους αρσενικούς (κύρια επίδραση φύλου: [$F_{(1,71)}=14.058$ $p<0.001$]). Ως αποτέλεσμα, τα DOPAC/DA και HVA/DA ήταν συνολικά χαμηλότερα στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά (κύριες επιδράσεις φύλου: [$F_{(1,69)}=13.661$ $p<0.001$ και $F_{(1,71)}=8.952$ $p=0.04$], για το DOPAC/DA και HVA/DA, αντίστοιχα).

Στον υπόκαμπο, παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση αγωγής και στρες [$F_{(1,76)}=5.155$ $p=0.026$] στα επίπεδα DA. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι η λετροζόλη ενίσχυσε τα επίπεδα DA σε όλους τους αρσενικούς και θηλυκούς μάρτυρες ($p=0.04$). Επιπλέον, το στρες ενίσχυσε τα επίπεδα DA μόνο στους αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο ($p=0.05$), ανεξάρτητα από την διενεργηθείσα χειρουργική επέμβαση. Σε σχέση με τα επίπεδα DOPAC στον υπόκαμπο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση χειρουργικής επέμβασης και φύλου [$F_{(1,80)}=9,869$ $p=0.002$]. Η *post-hoc* ανάλυση έδειξε ότι ο ευνουχισμός προκάλεσε μείωση των επιπέδων HVA στον υπόκαμπο των αρσενικών στα οποία χορηγήθηκε έκδοχο και λετροζόλη ($p<0.001$), ανεξάρτητα από την υποβολή στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης ή όχι. Επιπλέον, οι θηλυκοί αρουραίοι μάρτυρες είχαν χαμηλότερα επίπεδα HVA από ότι οι αρσενικοί μάρτυρες ($p=0.004$), ανεξάρτητα από την αγωγή.

Σε ό,τι αφορά τα HVA/DA και DOPAC/DA, παρατηρήθηκαν αλληλεπιδράσεις αγωγής και στρες [$F_{(1,76)}=5.492$ $p=0.022$ και $F_{(1,76)}=5.235$ $p=0.025$, αντίστοιχα]. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε μείωση των HVA/DA σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους μάρτυρες ($p=0.038$), ανεξάρτητα από την

διενεργηθείσα χειρουργική επέμβαση, ενώ σχετικά με το DOPAC/DA στον υπόκαμπο, οι *post-hoc* συγκρίσεις δεν έδειξαν στατιστική σημαντικότητα.

4.5.3 Επίπεδα αμινοξέων στον προμετωπιαίο φλοιό και στον υπόκαμπο

Οι θηλυκοί επίμυες είχαν υψηλότερα επίπεδα γλουταμικού οξέος, γλουταμίνης και GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τους αρσενικούς, ανεξάρτητα από τη γοναδεκτομή, την αγωγή ή την έκθεση σε στρες (κύρια επίδραση φύλου για το γλουταμικό οξύ: $[F_{(1,81)}=5.096 \text{ } p=0.027]$, για τη γλουταμίνη: $[F_{(1,81)}=4.046 \text{ } p=0.048]$ και για το GABA: $[F_{(1,81)}=6.391 \text{ } p=0.013]$).

Η ίδια διαφορά φύλου στον προμετωπιαίο φλοιό έτεινε να είναι σημαντική για τα επίπεδα αλανίνης και ταυρίνης (κύριες επιδράσεις φύλου στον προμετωπιαίο φλοιό: $[F_{(1,81)}=3.536 \text{ } p=0.064]$; $[F_{(1,81)}=3.456 \text{ } p=0.067]$, για την αλανίνη και την ταυρίνη, αντίστοιχα). Στα επίπεδα της ιστιδίνης δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Σχετικά με τα επίπεδα γλουταμικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό, παρατηρήθηκε τάση αλληλεπίδρασης φύλου, χειρουργικής επέμβασης και αγωγής $[F_{(1,81)}=2.852 \text{ } p=0.95]$ και η *post-hoc* ανάλυση έδειξε ότι τα ευνουχισμένα αρσενικά στα οποία χορηγήθηκε λετροζόλη είχαν χαμηλότερα επίπεδα γλουταμικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τα αρσενικά τα οποία υποβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς γοναδεκτομή και στα οποία χορηγήθηκε λετροζόλη ($p=0.05$).

Σχετικά με τα επίπεδα γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό, υπήρξε επίσης μία τάση αλληλεπίδρασης χειρουργικής επέμβασης και υποβολής σε στρες $[F_{(1,81)}=2.807 \text{ } p=0.098]$, καθώς οι επίμυες μετά από γοναδεκτομή οι οποίοι υποβλήθησαν στην δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης είχαν χαμηλότερα επίπεδα γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό σε σύγκριση με αυτούς, οι οποίοι υποβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς γοναδεκτομή και στην δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, ανεξάρτητα από τη χορήγηση λετροζόλης ή εκδόχου. Αυτή η επίδραση ήταν περισσότερο εμφανής σε θηλυκούς αρουραίους ($p=0.01$). Σχετικά με τα επίπεδα αλανίνης στον προμετωπιαίο φλοιό, υπήρξε επίσης τάση αλληλεπίδρασης φύλου και χειρουργικής επέμβασης $[F_{(1,81)}=3.185 \text{ } p=0.078]$ και η *post-hoc* ανάλυση έδειξε ότι τα ωοθηκεκτομηθέντα θηλυκά είχαν υψηλότερα επίπεδα αλανίνης στον προμετωπιαίο

φλοιό σε σχέση με τα ευνουχισμένα αρσενικά, ανεξάρτητα από την αγωγή ή την υποβολή σε στρες ($p=0.01$).

Στον ιππόκαμπο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα γλουταμικού οξέος, γλουταμίνης, αλανίνης, ιστιδίνης και ταυρίνης. Ωστόσο, σε ό,τι αφορά στα επίπεδα GABA, υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση χειρουργικής επέμβασης και υποβολής σε στρες [$F_{(1,82)}=5.682$ $p=0.019$], καθώς και μία τάση αλληλεπίδρασης φύλου και αγωγής [$F_{(1,82)}=3.726$ $p=0.057$]. Η *post-hoc* ανάλυση έδειξε ότι ο ευνουχισμός στους αρσενικούς μάρτυρες και η ωοθηκεκτομή στους θηλυκούς μάρτυρες ενίσχυσε τα επίπεδα GABA στον ιππόκαμπο ($p=0.025$), ανεξάρτητα από τη χορήγηση λετροζόλης ή όχι (Γράφημα 11στ). Αυτή η επίδραση δεν ήταν εμφανής στους επίμυες, οι οποίοι υποβλήθηκαν στην στρεσογόνο δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης και, κατά συνέπεια, τα στρεσοσαρισμένα αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα, τα οποία υποβλήθησαν σε γοναδεκτομή, είχαν χαμηλότερα επίπεδα GABA στον ιππόκαμπο τους από ότι οι αντίστοιχοι μάρτυρες.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

		Εικονική εγχείρηση			Γοναδεκτομή	
	Φύλο	Στρας	Έκδοχο	Λετροζόλη	Έκδοχο	Λετροζόλη
5-HT	Αρσενικά	Control	0,333±0,065 ^a	0,174±0,067 ^a	0,296±0,054 ^a	0,285±0,071 ^a
		FST	0,311±0,029 ^a	0,345±0,068 ^a	0,410±0,065 ^a	0,279±0,076 ^a
	Θηλυκά	Control	0,433±0,096 ^a	0,337±0,082 ^a	0,533±0,092 ^a	0,537±0,059 ^a
		FST	0,455±0,058 ^a	0,491±0,116 ^a	0,424±0,056 ^a	0,499±0,054 ^a
5-HIAA	Αρσενικά	Control	0,010±0,002 ^{c, d, e}	0,003±0,001 ^{c, d, e}	0,009±0,001 ^{c, d, e}	0,012±0,003 ^{c, d, e}
		FST	0,010±0,002 ^{b, c, d}	0,013±0,003 ^{b, c, d}	0,019±0,004 ^{b, c, d}	0,029±0,008 ^{b, c, d}
	Θηλυκά	Control	0,017±0,007 ^{c, e}	0,010±0,002 ^{c, e}	0,015±0,003 ^{c, e}	0,013±0,001 ^{c, e}
		FST	0,012±0,002 ^{b, c}	0,013±0,001 ^{b, c}	0,019±0,005 ^{b, c}	0,016±0,003 ^{b, c}
5-HIAA/HT	Αρσενικά	Control	0,033±0,004 ^{f, g}	0,021±0,003 ^{f, g}	0,033±0,004 ^{f, g, h}	0,043±0,011 ^{f, g, h}
		FST	0,037±0,008 ^{f, g}	0,037±0,004 ^{f, g}	0,045±0,004 ^{f, g, h}	0,090±0,035 ^{f, g, h}
	Θηλυκά	Control	0,035±0,007 ^f	0,032±0,007 ^f	0,028±0,004 ^{f, h}	0,025±0,002 ^{f, h}
		FST	0,027±0,004 ^f	0,034±0,002 ^f	0,040±0,006 ^{f, h}	0,031±0,004 ^{f, h}

Σεροτονινεργική λειτουργία στον πρόσθιο φλοιό

	Φύλο	Στρες	Εικονικά		Γοναδεκτομή	
			Έκδοχο	Λετροζόλη	Έκδοχο	Λετροζόλη
5-HT	Αρσενικά	Control	0,754±0,086 ^b	0,682±0,050 ^b	0,574±0,118 ^{b, c}	0,456±0,080 ^{b, c}
		FST	0,661±0,065 ^{a, b}	0,623±0,094 ^{a, b}	0,421±0,010 ^{a, b, c}	0,357±0,029 ^{a, b, c}
	Θηλυκά	Control	0,568±0,103	0,628±0,097	0,709±0,123 ^c	0,914±0,104 ^c
		FST	0,619±0,088 ^a	0,626±0,092 ^a	0,573±0,086 ^{a, c}	0,570±0,066 ^{a, c}
5-HIAA	Αρσενικά	Control	0,005±0,002	0,006±0,002	0,004±0,001	0,006±0,002
		FST	0,007±0,002	0,010±0,004	0,009±0,002	0,009±0,003
	Θηλυκά	Control	0,005±0,001	0,009±0,003	0,004±0,001	0,012±0,002
		FST	0,008±0,003	0,008±0,003	0,007±0,002	0,005±0,001
5-HIAA/HT	Αρσενικά	Control	0,007±0,001 ^{d, e}	0,010±0,003 ^d	0,008±0,002 ^{d, e}	0,013±0,002 ^d
		FST	0,010±0,002 ^e	0,014±0,005	0,021±0,004 ^e	0,016±0,001
	θηλυκά	Control	0,009±0,001 ^{d, e}	0,015±0,003 ^d	0,007±0,002 ^{d, e}	0,014±0,003 ^d
		FST	0,013±0,006 ^e	0,011±0,003	0,013±0,004 ^e	0,008±0,001

Σεροτονινεργική λειτουργία στον υπόκαμπο

		Εικονικά			Γοναδεκτομή	
	Φύλο	Στρες	Έκδοχο	Λετροζόλη	Έκδοχο	Λετροζόλη
NA	Αρσενικά	Control	0,203±0,007 ^a	0,110±0,034 ^a	0,151±0,023 ^a	0,172±0,032 ^a
		FST	0,205±0,024 ^a	0,171±0,028 ^a	0,251±0,048 ^a	0,166±0,027 ^a
	Θηλυκά	Control	0,217±0,048 ^a	0,155±0,018 ^a	0,231±0,051 ^a	0,198±0,008 ^a
		FST	0,185±0,012 ^a	0,188±0,016 ^a	0,195±0,021 ^a	0,216±0,029 ^a
DA	Αρσενικά	Control	0,019±0,004 ^{b,c,d}	0,009±0,003 ^{b,c,d}	0,020±0,004 ^{b,c,d}	0,015±0,005 ^{b,c,d}
		FST	0,022±0,003 ^{b,c,d}	0,018±0,004 ^{b,c,d}	0,039±0,006 ^{b,c,d}	0,025±0,013 ^{b,c,d}
	Θηλυκά	Control	0,026±0,008 ^{b,c,d}	0,029±0,007 ^{b,c,d}	0,036±0,008 ^{b,c,d}	0,030±0,002 ^{b,c,d}
		FST	0,031±0,003 ^{b,c,d}	0,027±0,002 ^{b,c,d}	0,040±0,008 ^{b,c,d}	0,041±0,008 ^{b,c,d}
DOPAC	Αρσενικά	Control	0,029±0,004 ^{e,f}	0,011±0,001 ^{e,f}	0,020±0,004 ^{e,f}	0,013±0,003 ^{e,f}
		FST	0,035±0,006 ^{e,f}	0,023±0,006 ^{e,f}	0,033±0,006 ^{e,f}	0,020±0,008 ^{e,f}
	Θηλυκά	Control	0,027±0,008 ^{e,f}	0,022±0,004 ^{e,f}	0,035±0,008 ^{e,f}	0,020±0,002 ^{e,f}
		FST	0,028±0,003 ^{e,f}	0,034±0,011 ^{e,f}	0,034±0,007 ^{e,f}	0,024±0,005 ^{e,f}
HVA	Αρσενικά	Control	1,292±0,149	0,880±0,341	0,901±0,154	1,026±0,165
		FST	1,434±0,201	1,216±0,161	1,419±0,432	1,017±0,239
	Θηλυκά	Control	1,342±0,325	1,033±0,134	1,558±0,366	1,534±0,172
		FST	1,308±0,216	1,463±0,233	1,318±0,162	1,305±0,162
HVA/DA	Αρσενικά	Control	87,31±25,00 ^{g,h,j}	93,44±22,40 ^{g,h,j}	52,93±10,04 ^{g,h,j}	88,31±25,73 ^{g,h,j}
		FST	70,76±8,65 ^{g,h,j}	65,96±9,02 ^{g,h,j}	36,24±8,53 ^{g,h,j}	56,00±14,18 ^{g,h,j}
	Θηλυκά	Control	57,52±7,58 ^{g,h,j}	42,96±10,64 ^{g,h,j}	54,00±15,78 ^{g,h,j}	52,69±8,79 ^{g,h,j}
		FST	46,27±10,96 ^{g,h,j}	54,49±9,05 ^{g,h,j}	36,16±3,44 ^{g,h,j}	37,32±6,11 ^{g,h,j}
DOPAC/DA	Αρσενικά	Control	1,584±0,302 ^{k,l,m}	1,308±0,240 ^{k,l,m}	1,112±0,151 ^{k,l,m}	1,017±0,182 ^{k,l,m}
		FST	1,628±0,205 ^{k,l,m}	0,965±0,063 ^{k,l,m}	0,970±0,159 ^{k,l,m}	0,934±0,180 ^{k,l,m}
	Θηλυκά	Control	1,133±0,220 ^{k,l,m}	0,864±0,203 ^{k,l,m}	1,028±0,117 ^{k,l,m}	0,689±0,091 ^{k,l,m}
		FST	0,913±0,109 ^{k,l,m}	0,879±0,105 ^{k,l,m}	0,858±0,065 ^{k,l,m}	0,625±0,122 ^{k,l,m}

Κατεχολαμίνες στον πρόσθιο φλοιό

	Φύλο	Στρες	Εικονικά		Γοναδεκτομή	
			Έκδοχο	Λετροζόλη	Έκδοχο	Λετροζόλη
NA	Αρσενικά	Control	0,327±0,034 ^a	0,261±0,021 ^a	0,268±0,026 ^a	0,272±0,026 ^a
		FST	0,333±0,031 ^a	0,261±0,018 ^a	0,260±0,032 ^a	0,241±0,026 ^a
	Θηλυκά	Control	0,281±0,018 ^a	0,263±0,012 ^a	0,242±0,024 ^a	0,246±0,011 ^a
		FST	0,295±0,023 ^a	0,244±0,026 ^a	0,304±0,040 ^a	0,231±0,017 ^a
DA	Αρσενικά	Control	0,030±0,009 ^{b, c}	0,037±0,006 ^b	0,020±0,006 ^{b, c}	0,026±0,007 ^b
		FST	0,038±0,009 ^c	0,040±0,013	0,036±0,010 ^c	0,028±0,007
	Θηλυκά	Control	0,022±0,007 ^{b, c}	0,044±0,011 ^b	0,030±0,007 ^{b, c}	0,062±0,014 ^b
		FST	0,046±0,018 ^c	0,041±0,018	0,046±0,014 ^c	0,023±0,004
DOPAC	Αρσενικά	Control	0,040±0,004	0,042±0,006	0,045±0,009	0,059±0,013
		FST	0,044±0,006	0,053±0,012	0,062±0,024	0,056±0,013
	Θηλυκά	Control	0,035±0,003	0,038±0,005	0,028±0,011	0,046±0,002
		FST	0,045±0,013	0,037±0,007	0,053±0,015	0,044±0,013
HVA	Αρσενικά	Control	1,140±0,149 ^{d, e}	1,111±0,206 ^{d, e}	0,651±0,063 ^d	0,768±0,186 ^d
		FST	1,242±0,206 ^{d, e}	1,176±0,200 ^{d, e}	0,677±0,135 ^d	0,838±0,179 ^d
	Θηλυκά	Control	0,873±0,097 ^e	0,861±0,128 ^e	0,890±0,080	0,818±0,095
		FST	0,886±0,140 ^e	0,757±0,068 ^e	0,965±0,212	0,924±0,147
HVA/D A	Αρσενικά	Control	63,11±26,71 ^{f, g}	37,55±11,57 ^f	43,18±12,10 ^{f, g}	34,68±6,735 ^f
		FST	42,84±9,828 ^g	64,21±34,45	25,43±8,061 ^g	34,46±5,831
	Θηλυκά	Control	74,73±37,42 ^{f, g}	21,86±3,204 ^f	31,20±3,507 ^{f, g}	18,36±5,247 ^f
		FST	33,03±11,59 ^g	36,19±12,56	26,22±5,811 ^g	47,37±15,16
DOPAC/ DA	Αρσενικά	Control	2,055±0,759 ^h	1,214±0,142 ^h	2,484±0,642 ^h	2,524±0,754 ^h
		FST	1,385±0,187 ^h	2,169±0,914 ^h	1,743±0,294 ^h	2,344±0,582 ^h
	Θηλυκά	Control	2,649±1,038 ^h	0,976±0,149 ^h	1,142±0,418 ^h	1,057±0,313 ^h
		FST	1,263±0,316 ^h	1,597±0,553 ^h	1,270±0,200 ^h	2,067±0,547 ^h

Κατεχολαμίνες στον ιππόκαμπο

	Φύλο	Στρες	Εικονικά		Γοναδεκτομή	
			Έκδοχο	Λετροζόλη	Έκδοχο	Λετροζόλη
GLUTAMATE	Αρσενικά	Control	4420±529	5156±1085	4302±493 ^c	3677±562 ^c
		FST	4391±350 ^b	4524±371 ^b	4507±699	3940±465
	Θηλυκά	Control	4547±1117 ^a	4227±1151 ^a	5823±1122 ^c	5520±765 ^c
		FST	6829±1059 ^{a, b}	5622±748 ^{a, b}	4505±540	5385±617
GLUTAMINE	Αρσενικά	Control	1146±125	1305±256	1077±137 ^g	966±136 ^g
		FST	1246±153 ^f	1065±62 ^f	1203±186	1077±151
	Θηλυκά	Control	1327±279	976±258	1377±250 ^g	1577±140 ^g
		FST	1770±283 ^{d, c, f}	1646±248 ^{d, c, f}	1218±155 ^d	1177±132 ^d
GABA	Αρσενικά	Control	485±65 ^{h, j}	382±63 ^{h, j}	448±48 ^h	484±81 ^h
		FST	522±54 ^{h, j}	504±59 ^{h, j}	545±55 ^h	460±63 ^h
	Θηλυκά	Control	536±114 ^{h, j}	466±104 ^{h, j}	631±103 ^h	747±78 ^h
		FST	685±118 ^{h, j}	709±101 ^{h, j}	539±84 ^h	679±71 ^h
ALANINE	Αρσενικά	Control	220±24 ^k	172±28 ^k	176±17 ^k	181±26 ^k
		FST	236±37 ^k	214±28 ^k	227±26 ^k	216±32 ^k
	Θηλυκά	Control	233±30 ^k	202±36 ^k	285±55 ^k	308±49 ^k
		FST	284±34 ^k	282±34 ^k	270±37 ^k	276±25 ^k
TAURINE	Αρσενικά	Control	1190±139 ^{l, m}	1176±200 ^{l, m}	1137±89 ^l	977±181 ^l
		FST	1334±201 ^{l, m}	1258±106 ^{l, m}	1147±172 ^l	1133±145 ^l
	Θηλυκά	Control	1179±178 ^{l, m}	1028±223 ^{l, m}	1583±352 ^l	1669±213 ^l
		FST	1761±302 ^{l, m}	1548±205 ^{l, m}	1264±196 ^l	1494±111 ^l
HISTIDINE	Αρσενικά	Control	103±6	97±11	93±14	88±11
		FST	94±21	92±24	89±21	74±11
	Θηλυκά	Control	77±9	101±27	105±15	106±20
		FST	119±19	90±27	87±19	86±16

Αμινοξέα στον φλοιό

	Φύλο	Στρες	Εικονικά		Γοναδεκτομή	
			Έκδοχο	Λετροζόλη	Έκδοχο	Λετροζόλη
GLUTAMATE	Αρσενικά	Control	5618±874	4534±536 ^a	5921±908	5576±1172 ^a
		FST	6488±406	4228±529 ^a	4645±421	5277±565 ^a
	Θηλυκά	Control	5781±372	5512±440 ^a	5186±685	5713±372 ^a
		FST	5239±740	6219±1631 ^a	4926±293	6562±675
GLUTAMINE	Αρσενικά	Control	1895±308	1717±384	2260±457	2007±605
		FST	2098±160	1509±272	1650±234	1499±118
	Θηλυκά	Control	1767±235	1456±124	2004±545	2222±291
		FST	1829±242	1939±449	1691±187	2077±297
GABA	Αρσενικά	Control	822±100 ^b	813±180 ^b	1059±132 ^b	874±183 ^b
		FST	1006±94 ^c	871±272 ^c	822±154 ^c	628±59 ^c
	Θηλυκά	Control	773±93 ^b	673±63 ^b	894±234 ^b	1332±231 ^b
		FST	779±139 ^c	961±227 ^c	724±99 ^c	952±139 ^c
ALANINE	Αρσενικά	Control	288±28	249±37	257±42	298±72
		FST	280±27	227±22	225±36	234±13
	Θηλυκά	Control	269±29	259±24	274±52	319±50
		FST	290±42	342±88	296±23	358±84
TAURINE	Αρσενικά	Control	1454±237	1571±293	1726±297	1732±373
		FST	1717±203	1513±346	1863±475	1369±149
	Θηλυκά	Control	1494±211	1468±99	1740±343	1807±340
		FST	1580±205	1668±382	1514±89	1900±265
HISTIDINE	Αρσενικά	Control	133±12	128±35	135±27	154±27
		FST	127±7	108±16	87±11	124±39
	Θηλυκά	Control	111±7	107±11	115±20	129±24
		FST	107±16	94±23	110±8	123±22

Αμινοξέα στον ιππόκαμπο

5 Συζήτηση

5.1 Οξεία και χρόνια αναστολή της αρωματάσης σε θηλυκούς επίμυες

Τα ανωτέρω ευρήματα δείχνουν ότι η βραχεία αναστολή του ενζύμου της αρωματάσης εμφανίζει αντικαταθλιπτική δράση στους θηλυκούς επίμυες χωρίς ωθηκεκτομή στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης. Αντιθέτως, η χρόνια αναστολή του ενζύμου της αρωματάσης για μία εβδομάδα δεν επιφέρει κάποιο αποτέλεσμα. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στο μέλλον σε γυναίκες που υποβάλλονται σε θεραπεία με αναστολείς της αρωματάσης, ιδιαίτερα πριν την εμμηνόπαυση, αλλά και στη μελέτη του ρόλου των ορμονών του φύλου στην κατάθλιψη και στην αντικαταθλιπτική θεραπεία.

Ειδικότερα, η βραχεία διάρκεια χορήγησης λετροζόλης, επηρεάζει τη διάρκεια της κολύμβησης και όχι της αναρρίχησης στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (Forced Swim Test, FST), όπως άλλωστε ισχύει και για τη φλουοξετίνη και όλους τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, SSRIs) (Detke et al., 1995). Με δεδομένο ότι η διάρκεια κολύμβησης στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης έχει συνδεθεί με αλλαγές στο σεροτονινεργικό σύστημα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η βραχεία χορήγηση λετροζόλης επηρεάζει κυρίως το εν λόγω σύστημα. Σε συμφωνία με τις αντικαταθλιπτικές ιδιότητες της βραχείας χορήγησης με λετροζόλη, υπάρχουν αναφορές περιστατικών μανίας και εναλλαγών της διάθεσης κατά την έναρξη της θεραπείας με αναστολείς της αρωματάσης σε γυναίκες (Goodwin, 2006, Rocha-Cadman et al., 2012). Από την άλλη, η χορήγηση λετροζόλης για μία εβδομάδα δεν παρουσίασε καμία προοπτική αντικαταθλιπτικής δράσης, εφόσον δεν επηρέασε τη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της εξαναγκασμένης κολύμβησης. Η έλλειψη επίδρασης της λετροζόλης στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης έχει αναφερθεί επίσης σε χορήγηση λετροζόλης για 21 ημέρες σε μύες που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή (Meng et al., 2011).

Έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι τα οιστρογόνα εμφανίζουν αντικαταθλιπτικές ιδιότητες και άρα η μείωση των επιπέδων οιστρογόνων, ως απόρροια της αναστολής της αρωματάσης, θα έπρεπε υποθετικά να προκαλέσει καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά (Estrada-Camarena et al., 2003, Estrada-Camarena et al., 2010). Παρά το γεγονός ότι η διάρκεια της θεραπείας στους επίμυες δεν αντικατοπτρίζει πλήρως την αντίστοιχη στους ανθρώπους, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν την παρουσία

μίας χρονο-εξαρτώμενης, διφασικής επίδρασης της αναστολής της αρωματάσης. Προς την ίδια κατεύθυνση είναι και τα ευρήματα προηγούμενων μελετών σύμφωνα με τα οποία ενήλικοι θηλυκοί μύες από τους οποίους είχε εκ γενετής εξαλειφθεί το γονίδιο της αρωματάσης CYP19A1, εκδήλωσαν καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά στην εξαναγκασμένη κολύμβηση (Dalla et al., 2004). Επιπρόσθετα, σε άλλες μελέτες η αναστολή της αρωματάσης ήταν επιβλαβής στη μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση δυναμικού (LTP) και στην πυκνότητα των ακάνθων στον ιππόκαμπο. Τα ευρήματα αυτά φαίνεται ότι εξαρτώνται από τη διάρκεια χορήγησης της λετροζόλης (Zhou et al., 2010, Vierk et al., 2012). Συνεπώς, μπορεί να υποστηριχθεί ότι η αναστολή της αρωματάσης αρχικά βελτιώνει τη διάθεση, στη συνέχεια το φαινόμενο υποχωρεί και τελικά (μετά το μεσοδιάστημα μίας έως τριών εβδομάδων), σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες μελέτες, μπορεί να επέλθει μία «προ-καταθλιπτική» κατάσταση σε θηλυκούς επίμυες. Αν και αυτή η υπόθεση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα πειραματική διαδικασία καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η διάρκεια της αγωγής στην επίδραση της λετροζόλης στον εγκέφαλο και στη συμπεριφορά.

Μία πιθανή εξήγηση για την εντυπωσιακή αντικαταθλιπτική δράση της λετροζόλης στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσαν να είναι οι ενδοκρινολογικές μεταβολές που επιφέρει ως συνέπεια της αναστολής της αρωματάσης. Είναι γνωστό ότι η εξωγενής χορήγηση τεστοστερόνης εμφανίζει αντικαταθλιπτική δράση στην εξαναγκασμένη κολύμβηση (Frye and Wolf, 2009), ενώ η λετροζόλη αυξάνει σημαντικά την τεστοστερόνη, όπως παρατηρήθηκε σε όλα τα πειράματα. Ωστόσο, η χρόνια αναστολή της αρωματάσης προκαλεί πιο έντονη αύξηση της τεστοστερόνης σε σχέση με τη βραχύτερη αναστολή, χωρίς όμως να παρατηρούνται αντικαταθλιπτικές δράσεις. Επιπλέον, ενώ η τεστοστερόνη συσχετίζεται με τη διάρκεια της ακινησίας στο πείραμα με τη βραχεία αναστολή, η πολυπαραγοντική παλινδρόμηση δεν επιβεβαιώνει το ρόλο της τεστοστερόνης. Η στατιστική ανάλυση δείχνει ότι η αντικαταθλιπτική δράση αποδίδεται στη λετροζόλη και, αφενός στη μείωση των οιστρογόνων αναφορικά με την ακινησία και αφετέρου στην προγεστερόνη, αναφορικά με την κολύμβηση. Κατά συνέπεια, μπορεί να υποθεθεί ότι μία ταχεία μείωση των οιστρογόνων, με ταυτόχρονη ταχεία αύξηση της τεστοστερόνης και της προγεστερόνης, μπορεί να προκαλέσει αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα. Η διατήρηση αυτής της ενδοκρινολογικής προσαρμογής, όπως στο πείραμα της χρόνιας χορήγησης, ενεργοποιεί άλλους αντιρροπιστικούς μηχανισμούς και φαίνεται ότι η προγεστερόνη σταθεροποιείται σε

χαμηλότερα επίπεδα. Καθώς η μείωση της προγεστερόνης επιφέρει καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (Li et al., 2012), μπορεί να θεωρηθεί ότι, μετά από χρόνια αγωγή με λετροζόλη, η παρατεταμένη μείωση της προγεστερόνης εξουδετερώνει τη μείωση των οιστρογόνων και την αύξηση της τεστοστερόνης, με συνέπεια το αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα της λετροζόλης να μην είναι πλέον εμφανές. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη δεν στοιχειοθετεί αιτιολογική σχέση μεταξύ ορμονών και συμπεριφοράς, ενώ πιθανός εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες, όπως υποδηλώνει το γεγονός ότι η εφαρμογή πολυπαραγοντικής παλινδρόμησης στο πείραμα 2, δεν ερμήνευσε σημαντικό ποσοστό της διακύμανσης. Αν και η εν λόγω υπόθεση παρέχει βάσιμες ερμηνείες, είναι επιτακτική, η περαιτέρω διερεύνηση αυτών των αλληλεπιδράσεων σε επόμενες μελέτες. Επιπλέον, ενώ η εξαναγκασμένη κολύμβηση χρησιμοποιείται ευρέως ως εργαλείο διερεύνησης για την παρακολούθηση αντικαταθλιπτικών ιδιοτήτων (Porsolt, 1979, Cryan et al., 2005), η χρήση μοντέλων χρόνιου στρες στο μέλλον πιθανώς να είναι πιο διαφωτιστική. Στην παρούσα μελέτη, η δοσολογία της λετροζόλης δεν δικαιολογεί την παρατηρούμενη διαφορά μεταξύ της βραχείας και της χρόνιας αναστολής της αρωματάσης, καθώς η χρησιμοποιούμενη δόση ήταν υψηλή και αναστέλλει πλήρως το ένζυμο της αρωματάσης (Kafali et al., 2004, Aydin et al., 2008). Τα παραπάνω επαληθεύονται από άλλα ευρήματα της παρούσας διατριβής, όπου η δραστηριότητα της αρωματάσης ανεστάλη πλήρως με αυτήν τη δόση. Σχετικά με τη φλουοξετίνη, προηγούμενες μελέτες σε θηλυκούς επίμυες έχουν δείξει ότι η χρόνια χορήγησή της στη χαμηλή δόση των 5 mg/kg μπορεί να μην έχει δράση, μπορεί να προκαλέσει αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα ή να έχει μικρού βαθμού επίδραση (Mitic et al., 2013). Πέρα από αυτό το γνωστό ζήτημα σχετικά με τα SSRIs, στο παρόν πείραμα με χρόνια χορήγηση, η λετροζόλη δεν εμφανίζει αντικαταθλιπτικές ιδιότητες και, επιπλέον, δεν ενισχύει τη χαμηλή δόση της φλουοξετίνης, έτσι ώστε να επιφέρει αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα, όταν η λετροζόλη και η φλουοξετίνη χορηγούνται συγχρόνως. Τέλος, η βραχεία χορήγηση λετροζόλης ενισχύει τη συχνότητα του τινάγματος της κεφαλής, ενώ η φλουοξετίνη δεν έχει κανένα αποτέλεσμα. Επίσης, στο δεύτερο πείραμα, η συχνότητα του τινάγματος της κεφαλής συσχετίζεται στατιστικά με την προγεστερόνη και την τεστοστερόνη. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν περαιτέρω τη σχέση του τινάγματος της κεφαλής στην εξαναγκασμένη κολύμβηση με τις ορμόνες των γονάδων (Kokras et al., 2016). Ευρήματα προηγούμενων μελετών της ομάδας Ψυχοφαρμακολογίας έχουν δείξει ότι στην εξαναγκασμένη κολύμβηση τα

θηλυκά τινάζουν το κεφάλι τους λιγότερο από ό,τι τα αρσενικά, ενώ η συχνότητα αυτή αυξάνεται κατά τον οίστρο/πρόοιστρο (Drossopoulou et al., 2004, Kokras et al., 2009a, Kokras et al., 2012). Το τίναγμα της κεφαλής συνδέεται με τη δραστηριότητα του υποδοχέα 5-HT₂ στη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου και πιθανόν αυτή η συμπεριφορά στην εξαναγκασμένη κολύμβηση, να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη της επίδρασης των ορμονών των γονάδων στο σεροτονινεργικό σύστημα (Kokras et al., 2016).

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης μέχρι εδώ συμπερασματικά υποδεικνύουν ότι όταν συνιστάται η θεραπεία με αναστολείς της αρωματάσης σε γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση, θα πρέπει να δίνεται προσοχή στα πιθανά ψυχοτρόπα αποτελέσματα των εν λόγω αναστολέων. Παρομοίως, η διάρκεια της θεραπείας με αναστολείς της αρωματάσης φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στις διαταραχές της διάθεσης. Επίσης εγείρεται το ενδιαφέρον ερώτημα της πιθανής χρήσης αναστολέων της αρωματάσης σε συνδυασμό με αντικαταθλιπτικά φάρμακα σε βραχείας διάρκειας δοσολογικά σχήματα με σκοπό την αύξηση του αντικαταθλιπτικού αποτελέσματος. Άρα, η θεραπεία με αναστολείς της αρωματάσης θα μπορούσε να αποτελέσει μία παροδική, σύντομη και επικουρική στρατηγική αντιμετώπισης της εμμένουσας κατάθλιψης.

5.2 Πείραμα 3. Επιδράσεις οιστρογόνων προερχόμενων από τον εγκέφαλο και τις γονάδες σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες.

Καθώς η χορήγηση λετροζόλης οδήγησε στην αναστολή του ενζύμου της αρωματάσης στον εγκέφαλο, τα ευρήματα επίμυες που έλαβαν λετροζόλη και στους οποίους απουσιάζει η έκκριση ορμονών από τις γονάδες, θα μπορούσε να αποδοθεί στην αναστολή της σύνθεσης οιστρογόνων στον εγκέφαλο και στα δύο φύλα. Εναλλακτικά, αυτές οι επιδράσεις θα μπορούσαν να αποδοθούν σε οιστρογόνα προερχόμενα από άλλους ιστούς, όπως τα επινεφρίδια, που πιθανώς επίσης αναστέλλονται από τη συστηματική χορήγηση λετροζόλης στην παρούσα μελέτη. Προηγούμενες παρατηρήσεις της ομάδας Ψυχοφαρμακολογίας, που αφορούν στα αυξημένα επίπεδα ακινησίας σε ArKO (διαγονιδιακά) ωθηκεκτομηθέντες θηλυκούς μύες, σε σύγκριση με τους αντίστοιχα ωθηκεκτομηθέντες μύες άγριου τύπου (wild type) (Dalla et al., 2004).

Επιπλέον, καθώς η καταθλιπτική συμπεριφορά στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (επίπεδα ακινησίας) έχει συσχετιστεί με αλλαγές στη σεροτονίνη, ειδικά

στον προμετωπιαίο φλοιό των αρσενικών επιμύων (Mikail et al., 2012), οι παρούσες επιδράσεις στη συμπεριφορά θα μπορούσαν να συνδεθούν με σχετικές σεροτονινεργικές αλλαγές στον προμετωπιαίο φλοιό.

Επιπλέον, η χρόνια χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης 5-HIAA/5-HT και μείωση του ντοπαμινεργικού ρυθμού ανακύκλωσης HVA/DA στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επιμύων, οι οποίοι δεν είχαν εκτεθεί στην στρεσογόνο διαδικασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης, σε σύγκριση με τους επίμυες μάρτυρες, ανεξάρτητα από την υποβολή σε γοναδεκτομή ή όχι. Είναι αξιοσημείωτο ότι εφόσον η λετροζόλη έχει δράση και στους εικονικά χειρουργημένους επίμυες μάρτυρες και στους γοναδεκτομηθέντες επίμυες, οι δράσεις της λετροζόλης δεν μπορούν να αποδοθούν στις ορμόνες του φύλου που προέρχονται από την περιφέρεια και άρα θα μπορούσαν να αποδοθούν στην τοπική αναστολή παραγωγής οιστρογόνων σε άλλους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο. Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, οι ωθηκεκτομηθέντες ArKO μύες εκδήλωσαν, επίσης, αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης (5-HT) στον ιππόκαμπο, σε σύγκριση με μύες άγριου τύπου. Επίσης, οι συμπεριφορικές και οι νευροχημικές αλλοιώσεις στους διαγονιδιακά (ArKO) θηλυκούς μύες δεν αντιστράφησαν από τα εξωγενώς χορηγούμενα οιστρογόνα κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής (Dalla et al., 2004). Είναι αξιοσημείωτο ότι στους διαγονιδιακούς (ArKO) μύες, απουσιάζει η παραγωγή οιστρογόνων τόσο από τις γονάδες, όσο και η τοπική *de novo* παραγωγή, από την ανάπτυξη του εγκεφάλου έως την ενηλικίωση. Συνεπώς, όταν η εξωγενώς χορήγηση οιστρογόνων σε φυσιολογικές δόσεις σε ενήλικους μύες άγριου τύπου δεν έχει καμία επίδραση στα συμπεριφορικά και νευροχημικά ευρήματα, οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν είτε σε δράσεις των οιστρογόνων κατά την ανάπτυξη του θηλυκού εγκεφάλου, είτε στην έλλειψη της τοπικής *de novo* σύνθεσης οιστρογόνων στον ενήλικο εγκέφαλο (Bakker et al., 2004). Τα παρόντα ευρήματα με τον αναστολέα της αρωματάσης λετροζόλη στρέφονται προς την δεύτερη κατεύθυνση, συνιστώντας, όπως προαναφέρθηκε, ότι η χρόνια αναστολή της σύνθεσης οιστρογόνων στον ενήλικο εγκέφαλο ενισχύει την καταθλιπτική συμπεριφορά και προκαλεί μονοαμινεργικές αλλοιώσεις στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι προαναφερθείσες επιδράσεις της λετροζόλης, στην παρούσα μελέτη, δεν είναι εμφανείς στους επίμυες που έχουν υποστεί στρες, υποδεικνύει ότι η υποβολή σε στρες επηρεάζει τις δράσεις των οιστρογόνων που παράγονται τοπικά στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό.

Περαιτέρω, η χορήγηση λετροζόλης επέφερε συνολικά μείωση των επιπέδων νοραδρεναλίνης (NA) στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό όλων των επίμυων, ανεξάρτητα από την υποβολή σε γοναδεκτομή ή σε στρες. Σε μια άλλη μελέτη, 6 εβδομάδες χορήγησης λετροζόλης σε θηλυκούς επίμυες προκάλεσε αφενός μείωση στα επίπεδα NA στον ιππόκαμπο εικονικά χειρουργημένων επίμυων και αφετέρου αύξηση στα αντίστοιχα επίπεδα στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό γοναδεκτομηθέντων επίμυων (Aydin et al., 2008). Ειδικότερα, στον προμετωπιαίο φλοιό, η χρόνια χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε μείωση του ρυθμού ανακύκλωσης της ντοπαμίνης (DOPAC/DA) σε όλες τις ομάδες, γεγονός το οποίο υποδεικνύει μεταβολή της δραστηριότητας του φλοιού (Dalla et al., 2008a). Τέλος, η χορήγηση λετροζόλης έτεινε να προκαλέσει μείωση των επιπέδων του γλουταμικού οξέως στον προμετωπιαίο φλοιό ορχεκτομηθέντων αρσενικών, σε σύγκριση με τους εικονικά χειρουργημένους επίμυες μάρτυρες, υποδηλώνοντας την ύπαρξη πιθανής επίδρασης της τοπικής παραγωγής οιστρογόνων στον εγκέφαλο στη ρύθμιση των επιπέδων του γλουταμικού οξέως. Ωστόσο, αυτή η επίδραση δεν ήταν εμφανής στα θηλυκά πειραματόζωα.

Τα προερχόμενα από τον εγκέφαλο οιστρογόνα έχουν εμπλακεί και στο παρελθόν στη διαμόρφωση του γλουταματεργικού συστήματος (π.χ. υποδοχείς NMDA), οι περισσότερες όμως μελέτες εστιάζουν στον ιππόκαμπο (Zhou et al., 2010, Srivastava et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση λετροζόλης σε ωοθηκεκτομηθέντες ενήλικους θηλυκούς μύες έχει βρεθεί ότι προκαλεί μείωση της πυκνότητας των ακάνθων στον ιππόκαμπο (Zhou et al., 2010). Η πυκνότητα των ακάνθων στον ιππόκαμπο, όπως και η διαμόρφωση των συνάψεων στον εγκέφαλο των θηλυκών είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από το στρες και την αντικαταθλιπτική θεραπεία (Hajszan et al., 2005, Dalla et al., 2009b). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι δείχθηκε πρόσφατα ότι η τοπική έγχυση οιστραδιόλης στον ιππόκαμπο θηλυκών μυών προκάλεσε ραγδαία αύξηση της πυκνότητας των ακάνθων στη CA1 περιοχή του ιππόκαμπου και του προμετωπιαίου φλοιού (Tuscher et al., 2016). Συνεπώς, τα παρόντα ευρήματα σχετικά με τη συμπεριφορά και τις νευροχημικές διεργασίες στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό θα μπορούσαν να συνδεθούν με άλλες επιδράσεις της λετροζόλης σε δείκτες νευροπλαστικότητας (Fester et al., 2011, Vierk et al., 2012). Άλλα ενδιαφέροντα ευρήματα της παρούσας πειραματικής διαδικασίας περιλαμβάνουν διαφορές φύλου στη συμπεριφορά και στη νευροχημεία, καθώς και

επιδράσεις της γοναδεκτομής και της έκθεσης σε στρες, τα οποία συζητούνται παρακάτω.

5.2.1 Διαφορές του φύλου στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου

Οι θηλυκοί εικονικά χειρουργημένοι επίμυες μάρτυρες εμφάνισαν συνολικά υψηλότερη κινητικότητα σε σχέση με τους αρσενικούς, όπως έχει αναφερθεί επανειλημμένα και στο παρελθόν (Velly and Cardo, 1977, Kelly et al., 1999, Brotto et al., 2000, Romero and Chen, 2004, Dalla et al., 2005a). Αυτή η διαφορά του φύλου αποδίδεται στις δράσεις ενεργοποίησης των ορμονών του φύλου, καθώς η ωοθηκτομή στα θηλυκά προκάλεσε μείωση στην κινητικότητα, ενώ η ορχεκτομή στα αρσενικά αύξησε. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η διαφορά του φύλου στην οριζόντια κινητικότητα των επίμυων στο ανοιχτό πεδίο προέρχεται κυρίως από τη δράση της τεστοστερόνης. Επίσης, η αναστολή της αρωματάσης δεν επηρέασε τα επίπεδα κινητικότητας στους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες. Το εν λόγω εύρημα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι αρσενικοί και θηλυκοί διαγονιδιακοί (ArKO) μύες εκδήλωσαν φυσιολογικά επίπεδα κινητικότητας στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου (Dalla et al., 2004, 2005b). Σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη, η χορήγηση του αναστολέα της αρωματάσης, φαντροζόλη, σε αρσενικούς ορχεκτομηθέντες επίμυες, επίσης δεν επηρέασε τα επίπεδα κινητικότητας στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου (Carrier et al., 2015).

Σε ό,τι αφορά στη συχνότητα εισόδου στο κέντρο του ανοιχτού πεδίου, παρατηρήθηκε υψηλότερη στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά και αυτή η διαφορά του φύλου εξουδετερώθηκε με την ωοθηκτομή. Οι περισσότερες εισοδοί στο κέντρο είναι ενδεικτικές των χαμηλότερων επιπέδων άγχους, αλλά η διαφορά του φύλου στην κινητικότητα μπορεί να επηρεάσει αυτή τη συμπεριφορική παράμετρο (Kokras and Dalla, 2014). Στα αρσενικά, η λετροζόλη, η οποία αναστέλλει την παραγωγή οιστρογόνων, τείνει να ενισχύει τις εισόδους στο κέντρο, όπως συμβαίνει και με την ορχεκτομή. Συνεπώς, είναι πιθανό στα αρσενικά, τα επίπεδα άγχους να επηρεάζονται από τα επίπεδα οιστρογόνων τα οποία προκύπτουν από το μεταβολισμό της τεστοστερόνης. Στα θηλυκά, η λετροζόλη δεν είχε κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, ωστόσο, πιθανώς όλες οι γοναδοτρόπες ορμόνες επηρεάζουν τις εισόδους στο κέντρο και τη κινητικότητα στο ανοιχτό πεδίο, όπως έχει αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες (Simpson and Kelly, 2012, Kokras and Dalla, 2014).

5.2.2 Διαφορές του φύλου στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης

Οι θηλυκοί επίμυες εμφάνισαν συνολικά υψηλότερα επίπεδα ακινησίας και χαμηλότερα επίπεδα διάρκειας κολύμβησης σε σχέση τους αρσενικούς, όπως έχει επανειλημμένα δειχθεί σε παλαιότερες μελέτες της ομάδας Ψυχοφαρμακολογίας (Drossopoulou et al., 2004, Dalla et al., 2008a, Pitychoutis et al., 2009b, Pitychoutis et al., 2011, Kokras et al., 2012). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί επίσης αντικρουόμενα ευρήματα (ανασκόπηση: Kokras et al., 2015b). Αυτές οι διαφορές δεν μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές του φύλου στα επίπεδα των κορτικοστεροειδών (υψηλότερα επίπεδα στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά), καθώς σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες που υποβλήθηκαν σε επινεφριδεκτομή και στους οποίους χορηγήθηκαν εξωγενώς οι ίδιες δόσεις κορτικοστεροειδών, οι διαφορές του φύλου στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST) δεν απαλείφθηκαν (Kokras et al., 2012).

Τα παρόντα ευρήματα είναι σε συμφωνία με τους (Bonilla-Jaime et al., 2010), οι οποίοι έδειξαν ότι η ορχεκτομή προκάλεσε αύξηση των επιπέδων ακινησίας και μείωση της κολύμβησης και της αναρρίχησης. Η αναστολή της αρωματάσης στους εικονικά χειρουργημένους αρσενικούς μάρτυρες με λητροζόλη δεν επηρέασε τη συμπεριφορά στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης και τα επίπεδα της τεστοστερόνης στην κυκλοφορία του αίματος. Το ίδιο εύρημα έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν σε ενήλικους αρσενικούς επίμυες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αναστολέα της αρωματάσης, φορμεστάνη (Martinez-Mota et al., 2008). Επίσης, οι αρσενικοί διαγονιδιακοί μύες για το ένζυμο της αρωματάσης εμφάνισαν φυσιολογικά επίπεδα συμπεριφοράς στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης σε σύγκριση με τους αρσενικούς μύες άγριου τύπου (Dalla et al., 2005b). Ωστόσο, όπως έχει ήδη συζητηθεί, στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση λητροζόλης σε ενήλικους επίμυες που είχαν υποστεί ορχεκτομή προκάλεσε αύξηση της διάρκειας της ακινησίας, σε σύγκριση με τους εικονικά χειρουργημένους επίμυες μάρτυρες.

Από την άλλη πλευρά, η ωθηκεκτομή προκάλεσε μείωση της διάρκειας αναρρίχησης στα θηλυκά και η δράση αυτή πιθανώς σχετίζεται με τη μείωση της προγεστερόνης (Molina-Hernandez and Tellez-Alcantara, 2001, Kokras et al., 2015b). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ωθηκεκτομή ενήλικων θηλυκών επίμυων προκάλεσε αύξηση της διάρκειας ακινησίας στην εξαναγκασμένη κολύμβηση. Το εύρημα αυτό όμως είναι

συνήθως εμφανές αμέσως ή μία εβδομάδα μετά την ωοθηκεκτομή (Estrada-Camarena et al., 2011, Koss et al., 2012). Όπως και στα αρσενικά, στην παρούσα μελέτη, η περαιτέρω μείωση της τοπικής παραγωγής οιστρογόνων με λετροζόλη στα θηλυκά προκάλεσε αύξηση της διάρκειας ακινησίας σε ωοθηκεκτομηθέντες θηλυκούς επίμυες, με αποτέλεσμα την αύξηση της καταθλιπτικόμορφης συμπεριφοράς.

Μία συμπεριφορική παράμετρος στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), η οποία επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις ορμόνες του φύλου είναι η συχνότητα των τιναγμάτων της κεφαλής. Οι θηλυκοί επίμυες εμφανίζουν χαμηλότερη συχνότητα τιναγμάτων κεφαλής από τους αρσενικούς, όπως έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Drossopoulou et al., 2004, Kokras et al., 2009a, Kokras et al., 2014, Kokras et al., 2015b). Όπως έδειξε και το πρώτο πείραμα της παρούσας διατριβής, όπου τα τινάγματα της κεφαλής συσχετίστηκαν στατιστικά με τα επίπεδα τεστοστερόνης στον ορό του αίματος (Kokras et al., 2014), στην παρούσα μελέτη τα τινάγματα της κεφαλής φαίνεται ότι συσχετίζονται και εξαρτώνται κυρίως από την τεστοστερόνη (Kokras 2016). Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι η ορχεκτομή προκάλεσε μείωση των τιναγμάτων κεφαλής στα αρσενικά, ενώ η χορήγηση της λετροζόλης, η οποία αναστέλλει την παραγωγή οιστρογόνων, δεν είχε καμία επίδραση. Επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Kokras et al., 2014), στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση λετροζόλης σε θηλυκούς επίμυες χωρίς ωοθηκεκτομή, προκάλεσε ενίσχυση των επιπέδων της τεστοστερόνης στον ορό του αίματος και έτεινε να αυξήσει τη συχνότητα των τιναγμάτων της κεφαλής (Kokras et al., 2014). Ένα επίσης ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι η συχνότητα τιναγμάτων της κεφαλής σε ωοθηκεκτομηθέντα θηλυκά μειώνεται από τη χορήγηση λετροζόλης, υποδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο της τοπικής παραγωγής οιστρογόνων στον εγκέφαλο στην εκδήλωση αυτής της συμπεριφοράς μόνο στα θηλυκά.

5.2.3 Διαφορές του φύλου και η επίδραση του στρες στη δραστηριότητα της αρωματάσης

Όπως ήταν αναμενόμενο, η χρόνια χορήγηση της λετροζόλης προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας της αρωματάσης στον υποθάλαμο αρσενικών και θηλυκών επίμυων, επιβεβαιώνοντας την αναστολή της παραγωγής οιστρογόνων στον εγκέφαλο. Πιθανότατα η αναστολή της αρωματάσης λαμβάνει επίσης χώρα στον υπόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό όπου βρίσκεται το ένζυμο, αλλά για τεχνικούς λόγους η

μέτρηση της δραστηριότητας της αρωματάσης σε αυτές τις περιοχές του εγκεφάλου δεν ήταν αξιόπιστη, πιθανώς λόγω των πολύ χαμηλών επιπέδων του ενζύμου σε αυτές τις περιοχές (Roselli et al., 1984). Από όσο γνωρίζουμε, η παρούσα μελέτη είναι μία από τις ελάχιστες στις οποίες έχει εκτιμηθεί η δραστηριότητα του ενζύμου της αρωματάσης στον εγκέφαλο ενήλικων αρσενικών και θηλυκών επίμυων μετά από χορήγηση ενός αναστολέα της αρωματάσης. Η αναστολή ήταν πιο εμφανής στα αρσενικά, καθώς η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν πολύ χαμηλότερη στους θηλυκούς σε σχέση με τους αρσενικούς επίμυες. Διαφορές του φύλου σε ότι αφορά στη δραστηριότητα της αρωματάσης έχουν αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Roselli et al., 1984, Roselli and Resko, 1997, Balthazart et al., 2011). Η ορχεκτομή στα ενήλικα αρσενικά προκάλεσε αξιοσημείωτη μείωση στα επίπεδα τεστοστερόνης στον ορό του αίματος, ωστόσο δεν επέφερε στατιστικά σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα της αρωματάσης. Στο παρελθόν, έχει δείχθει ότι η ορχεκτομή προκαλεί μείωση της δραστηριότητας της αρωματάσης μία εβδομάδα μετά τη χειρουργική επέμβαση και ότι τα επίπεδα ανδρογόνων στην κυκλοφορία του αίματος επηρεάζουν έντονα την αναστολή της αρωματάσης (Roselli et al., 1984). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, η δραστηριότητα της αρωματάσης στον υποθάλαμο δεν επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από την ορχεκτομή, πιθανώς λόγω του πολύπλοκου στατιστικού μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η υποβολή στη στρεσογόνο διαδικασία της κολύμβησης, προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας της αρωματάσης μόνο στον υποθάλαμο των αρσενικών επίμυων και όχι των θηλυκών. Άρα, είναι πιθανό ότι το στρες αποτελεί ρυθμιστή της παραγωγής οιστρογόνων στον εγκέφαλο, ο οποίος θα μπορούσε να συμβάλλει στις διαφορές του φύλου στην απόκριση στο στρες (Dalla et al., 2011). Η διαφορά του φύλου φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητη από την προκαλούμενη από το στρες αύξηση των κορτικοστεροειδών της κυκλοφορίας του αίματος, η οποία λαμβάνει χώρα και στα δύο φύλα. Η επίδραση της βραχείας διάρκειας υποβολής σε στρες στη δραστηριότητα της αρωματάσης στον υποθάλαμο έχουν δείχθει στο παρελθόν και σε ορτύκια, όπου το στρες προκαλεί ραγδαία αύξηση της δραστηριότητας της αρωματάσης τόσο στα αρσενικά, όσο και στα θηλυκά (Dickens et al., 2011). Συνδυάζοντας τα ανωτέρω στοιχεία, προκύπτει ότι η αρωματάση θα μπορούσε να αποτελεί έναν παράγοντα διαμόρφωσης της ανταπόκρισης στο στρες σε νευρωνικό επίπεδο, η οποία θα μπορούσε αντιρροπιακά να συμβάλλει στην ομαλή ρύθμιση των νευρωνικών κυκλωμάτων από νευροοιστρογόνα με έναν φυλο-εξαρτώμενο τρόπο

(Srivastava et al., 2011). Για την περαιτέρω διερεύνηση αυτού του θέματος χρειάζονται πιο εξειδικευμένες μελέτες.

5.2.4 Διαφορές του φύλου και επίδραση του στρες στη νευροχημεία

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι τα επίπεδα 5-HT ήταν συνολικά υψηλότερα στον προμετωπιαίο φλοιό των θηλυκών σε σχέση με τα αρσενικά, ενώ στον ιππόκαμπο αυτή η επίδραση ήταν εμφανής μόνο στα γοναδεκτομηθέντα ζώα. Στο παρελθόν, έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός ανακύκλισης της 5-HT (5-HIAA/5-HT) στον ιππόκαμπο θηλυκών επίμυων ήταν υψηλότερος σε σχέση με τα αρσενικά (Drossopoulou et al., 2004). Επίσης, στην παρούσα μελέτη, η υποβολή στη στρεσογόνο διαδικασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης, προκάλεσε αύξηση των επιπέδων του μεταβολίτη της 5-HT, 5-HIAA, στον προμετωπιαίο φλοιό, με αποτέλεσμα αύξηση του ρυθμού ανακύκλισης 5-HIAA/5-HT στον ιππόκαμπο. Το εύρημα αυτό μπορεί να ερμηνευτεί ως αυξημένη απελευθέρωση και μεταβολισμό της 5-HT και συνεπώς αυξημένη σεροτονινεργική δραστηριότητα ως απόκριση στο στρες. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν εμφανές μόνο στους αρσενικούς επίμυες, οι οποίοι στην παρούσα μελέτη θανατώθηκαν αμέσως μετά την υποβολή στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης. Στο παρελθόν, όταν οι επίμυες θανατώνονταν 20 λεπτά μετά την υποβολή στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης, δεν υπήρχε καμία επίδραση στους αρσενικούς επίμυες, αλλά αύξηση του ρυθμού ανακύκλισης της 5-HT, 5-HIAA/5-HT στον ιππόκαμπο των θηλυκών επίμυων (Drossopoulou et al., 2004). Συνολικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε συνδυασμό με παλαιότερα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ανταπόκριση του σεροτονινεργικού συστήματος στο οξύ στρες διαφέρει ανάλογα με το φύλο (Drossopoulou et al., 2004, Dalla et al., 2005a, Dalla et al., 2011).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα ωθηκεκτομηθέντα θηλυκά που υποβλήθησαν στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης είχαν χαμηλότερα επίπεδα 5-HT στον ιππόκαμπο σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων, πιθανώς υποδηλώνοντας ότι τα θηλυκά είναι πιο ευάλωτα στο στρες όταν στερούνται τις ορμόνες του φύλου. Ωστόσο, στους επίμυες μάρτυρες, η ωθηκεκτομή δεν είχε καμία εξέχουσα επίδραση στο σεροτονινεργικό σύστημα, πιθανώς διότι τα θηλυκά θανατώθηκαν έναν μήνα μετά τη χειρουργική επέμβαση. Επιπλέον, η ορχεκτομή επέφερε μείωση στα επίπεδα της 5-HT στον ιππόκαμπο αρσενικών επίμυων, δίνοντας έμφαση στο ρόλο των ανδρογόνων και

των μεταβολιτών τους στη διαμόρφωση της σεροτονινεργικής λειτουργίας. Κατά αναλογία, έχειδειχθεί ότι η τεστοστερόνη ασκεί αντικαταθλιπτική δράση και έχει θεαματικά αποτελέσματα στη διαμόρφωση της διάθεσης, πιθανώς ως συνέπεια της ρύθμισης του σεροτονινεργικού συστήματος (Herrera-Perez et al., 2013, McHenry et al., 2014).

Όσον αφορά στις κατεχολαμίνες, οι θηλυκοί επίμυες είχαν συνολικά υψηλότερα επίπεδα DA στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τους αρσενικούς, ως συνέπεια των χαμηλότερων ρυθμών ανακύκλωσης DOPAC/DA και HVA/DA. Η γοναδεκτομή προκάλεσε αύξηση των επιπέδων DA και μείωση των DOPAC/DA στον προμετωπιαίο φλοιό και στα δύο φύλα, ανεξάρτητα από την υποβολή σε στρες ή όχι. Στον υπόκαμπο τα επίπεδα του μεταβολίτη της DA, HVA, ήταν χαμηλότερα στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά, όπως έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Dalla et al., 2008a). Η ορχεκτομή στα αρσενικά προκάλεσε μείωση των επιπέδων HVA και συνεπώς εξουδετέρωσε τη διαφορά του φύλου. Η έκθεση στην στρεσογόνο δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης προκάλεσε αύξηση των επιπέδων DA και DOPAC στον προμετωπιαίο φλοιό και στα δύο φύλα. Είναι αξιοσημείωτο ότι η απόκριση του ντοπαμινεργικού συστήματος στο βραχυχρόνιο στρες έχει ήδη περιγραφεί κυρίως σε αρσενικά πειραματόζωα, και θεωρείται μηχανισμός προσαρμογής στο στρες (Horger and Roth, 1996). Στο παρελθόν η ομάδα Ψυχοφαρμακολογίας έχει δείξει ότι, όταν οι επίμυες θανατώθηκαν 20 λεπτά μετά την υποβολή στη δεύτερη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης δεν υπήρξε καμία επίδραση του στρες στα θηλυκά, αλλά υπήρχε αύξηση των HVA/DA στον προμετωπιαίο φλοιό και στον υπόκαμπο αρσενικών επιμύων (Dalla et al., 2008a). Στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση λετροζόλης, επίσης αύξησε τα επίπεδα DA και μείωσε τον ρυθμό ανακύκλωσης HVA/DA στον υπόκαμπο των εικονικά χειρουργημένων θηλυκών και αρσενικών μαρτύρων. Σε συμφωνία με το ανωτέρω εύρημα, οι ArKO θηλυκοί μύες, εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα DA στον υπόκαμπο τους και αυτό αναστράφηκε από τη χορήγηση οιστραδιόλης κατά την ενηλικίωση (Dalla et al., 2004). Συνολικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν επίδραση των οιστρογόνων στη ρύθμιση της ντοπαμινεργικής λειτουργίας, γεγονός που δείχνει ενδιαφέρουσες διαφορές του φύλου που επηρεάζονται από τα επίπεδα των ορμονών του φύλου και από την υποβολή σε στρες.

Σχετικά με τα επίπεδα αμινοξέων, οι ενήλικοι θηλυκοί επίμυες είχαν συνολικά υψηλότερα επίπεδα γλουταμικού οξέος, γλουταμίνη, GABA, ταυρίνης και αλανίνης

στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τους αρσενικούς. Οι διαφορές του φύλου στο γκαμπαεργικό σύστημα έχουν αναφερθεί και στο παρελθόν (McCarthy et al., 2002). Επίσης, σχετικά με τα επίπεδα του γλυταμικού οξέος, η παρούσα διαφορά του φύλου έχει παρατηρηθεί και σε παλαιότερες μελέτες της ομάδας Ψυχοφαρμακολογίας στον προμετωπιαίο φλοιό επιμύων της σειράς Flinders Sensitive Line (Kokras et al., 2009b). Ωστόσο, η παρούσα διατριβή αναφέρει για πρώτη φορά τη διαφορά του φύλου στα επίπεδα άλλων αμινοξέων στο φλοιό επιμύων. Αντιθέτως, καμία διαφορά του φύλου δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη στον ιππόκαμπο. Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση της γοναδεκτομής στην αύξηση των επιπέδων GABA στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επιμύων, οι οποίοι δεν υποβλήθηκαν σε στρες, το οποίο πιθανώς να έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας του ιππόκαμπου σε αυτούς τους επίμυες. Συνολικά, στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται ενδιαφέρουσες διαφορές του φύλου στα επίπεδα αμινοξέων στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό του εγκεφάλου που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην απόκριση στο στρες και στις συναισθηματικές διαταραχές (Belzung et al., 2015).

5.3 Συμπεράσματα

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης εμπλέκουν για πρώτη φορά το ρόλο της τοπικής παραγωγής οιστρογόνων στον εγκέφαλο στη συμπτωματολογία της κατάθλιψης, όπως επίσης και στη μονοαμινεργική και γλουταματεργική δραστηριότητα. Είναι αξιοσημείωτο ότι, παρά το γεγονός ότι οι επιδράσεις της λητροζόλης στη συμπεριφορά γοναδεκτομηθέντων ζώων δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τον παράγοντα φύλο. Τα εν λόγω ευρήματα, σε συνδυασμό με άλλες διαφορές του φύλου με ή χωρίς στρες, που έχουν αναφερθεί στην παρούσα διατριβή, θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη διερεύνηση των διαφορών του φύλου στον εγκέφαλο που αποτελεί ένα ολοένα αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας στις νευροεπιστήμες (McCarthy, 2016).

Από κλινική απόψεως, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, καθώς και άλλες σχετικές μελέτες, θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη φαρμακοεπαγρύπνηση σχετικά με τους αναστολείς της αρωματάσης (όπως η λητροζόλη ή η αναστροζόλη), οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως για την αναστολή της τοπικής σύνθεσης οιστρογόνων σε ορμονοεξαρτώμενους όγκους (κυρίως σε καρκίνους του μαστού ή του προστάτη), καθώς και σε άλλους τομείς της γυναικολογίας και της παιδιατρικής (αν και εκτός ένδειξης) (Santen et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αναστολή της αρωματάσης,

ανάλογα με τη διάρκεια χορήγησης, έχει ήδη συσχετισθεί με ψυχοτρόπες και γνωσιακές ανεπιθύμητες ενέργειες, ιδιαίτερα σε ασθενείς με ιστορικό ψυχικών ασθενειών ή γνωσιακών ελλείψεων (Goodwin, 2006, Jenkins et al., 2008, Henry et al., 2011, Phillips et al., 2011). Με δεδομένο ότι καρκινοπαθείς ασθενείς με μεγάλο προσδόκιμο ζωής, έχουν υψηλές πιθανότητες να εμφανίσουν κατάθλιψη, η οποία επιδεινώνει περαιτέρω την ποιότητα της ζωής τους, είναι εξαιρετικά σημαντικό να αποσαφηνιστεί, αν η επικουρική ενδοκρινική αγωγή με αναστολείς της αρωματάσης συμβάλει περαιτέρω στην εμφάνιση συμπτωμάτων κατάθλιψης (Saini et al., 2009). Η ανάγκη αυτής της διερεύνησης είναι επιτακτική κυρίως για τις γυναίκες, οι οποίες έχουν διπλάσιες πιθανότητες να εμφανίσουν κατάθλιψη σε σχέση με τους άνδρες (Marcus et al., 2005, Dalla et al., 2010a).

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν κυρίως ότι οι αλλαγές της συμπεριφοράς στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), που επιφέρουν οι αναστολείς της αρωματάσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη διάρκεια χορήγησης. Τα συμπεριφορικά ευρήματα μπορούν περαιτέρω να συσχετιστούν με σεροτονινεργικές και ντοπαμινεργικές αλλαγές σε περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην κατάθλιψη. Είναι σημαντικό πως τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την ανάπτυξη συναισθηματικών διαταραχών σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση οι οποίες λαμβάνουν αγωγή με αναστολείς της αρωματάσης, καθώς και σε αυτές οι οποίες λαμβάνουν αγωγή με αναστολείς της αρωματάσης προ εμμηνόπαυσης. Τέλος, η παρούσα διατριβή συμβάλλει στην ερμηνεία του ρόλου των ορμονών των γονάδων στην εκδήλωση συμπτωμάτων κατάθλιψης και στην αντικαταθλιπτική δράση.

6 Περίληψη

Οι αναστολείς της αρωματάσης, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση των οιστρογονοεξαρτώμενων καρκίνων, έχουν συσχετιστεί με ψυχικές διαταραχές, που ποικίλουν από τη μανία έως την κατάθλιψη. Η αρωματάση είναι το ρυθμιστικό ένζυμο, το οποίο καταλύει τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Εντοπίζεται κυρίως στις ωοθήκες των γυναικών, στους όρχεις των ανδρών, όπως επίσης και στον πλακούντα και στα επινεφρίδια. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι άλλα όργανα, όπως το ήπαρ, τα οστά και ο εγκέφαλος μπορούν να παράγουν τοπικά οιστρογόνα. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα συνιστούν ότι τα προερχόμενα από τον εγκέφαλο οιστρογόνα είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση των νευρικών κυκλωμάτων στο θηλυκό και αρσενικό εγκέφαλο. Παρόλα αυτά, οι προκλινικές έρευνες πάνω στο ρόλο των οιστρογόνων στην κατάθλιψη και, ειδικότερα, στο ρόλο των παραγόμενων από τον εγκέφαλο οιστρογόνων στα θηλυκά και στα αρσενικά, απουσιάζουν από την επιστημονική βιβλιογραφία. Συνεπώς, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν η μείωση της σύνθεσης οιστρογόνων μετά από αναστολή της αρωματάσης επηρεάζει την εκδήλωση της καταθλιπτικής συμπτωματολογίας και τους υποκείμενους εγκεφαλικούς και ορμονικούς μηχανισμούς στους επίμυες.

Στην πρώτη πειραματική διαδικασία μελετήθηκε αν η αγωγή με τον αναστολέα της αρωματάσης λετροζόλη, επηρεάζει την καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά σε θηλυκούς επίμυες με φυσιολογική ορμονική λειτουργία. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST) μελετήθηκε η επίδραση της οξείας (1 mg/kg, τρεις ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις σε 24 ώρες) και της χρόνιας (για 7 ημέρες) χορήγησης λετροζόλης. Χορηγήθηκε επίσης η αντικαταθλιπτική ουσία φλουοξετίνη ως φάρμακο αναφοράς. Επιπροσθέτως αναλύθηκαν τα επίπεδα τεστοστερόνης και προγεστερόνης στον ορό του αίματος των πειραματόζων. Είναι αξιοσημείωτο ότι η οξεία αναστολή της αρωματάσης προκάλεσε μείωση της διάρκειας ακινησίας στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), υποδηλώνοντας την αντικαταθλιπτική της δράση. Αντιθέτως, η χρόνια αναστολή της αρωματάσης δεν είχε αντικαταθλιπτική δράση. Η άνοδος των επιπέδων τεστοστερόνης συσχετίστηκε με τη μείωση της καταθλιπτικόμορφης συμπεριφοράς στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST) μετά την οξεία αγωγή με λετροζόλη, ενώ είναι

αξιοσημείωτο ότι η προγεστερόνη ήταν η αιτία της αύξησης της συμπεριφοράς κολύμβησης στους θηλυκούς επίμυες με φυσιολογική ορμονική λειτουργία.

Στη δεύτερη πειραματική διαδικασία εκτιμήθηκαν τα αποτελέσματα της χρόνιας αγωγής με λετροζόλη σε θηλυκούς επίμυες και μελετήθηκε το ενδεχόμενο της διαφοροποίησης της δράσης της λετροζόλης σε ωθηκεκτομηθέντες θηλυκούς επίμυες. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν όλες οι πειραματικές διαδικασίες σε αρσενικούς επίμυες, έτσι ώστε να εκτιμηθούν οι διαφυλικές διαφορές. Ειδικότερα, διερευνήθηκαν οι συμπεριφορικές και νευροχημικές επιδράσεις της αναστολής της αρωματάσης σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες εικονικώς χειρουργημένους ή γοναδεκτομηθέντες. Τρεις εβδομάδες αργότερα, οι επίμυες έλαβαν χρόνια αγωγή με τον αναστολέα της αρωματάσης, λετροζόλη (1 mg/kg, μία φορά ενδοπεριτοναϊκά, καθημερινά για μία εβδομάδα) ή με έκδοχο και υποβλήθησαν στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου και στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST). Η δραστηριότητα της αρωματάσης υπολογίστηκε στον υποθάλαμο, ενώ η τεστοστερόνη και η κορτικοστερόνη στον ορό του αίματος όλων των επίμυων. Επίσης, αναλύθηκαν τα επίπεδα των μονοαμινών (νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη σεροτονίνη και των μεταβολιτών τους) και των αμινοξέων (GABA, γλουταμίνη, ταυρίνη, αλανίνη και ιστιδίνη) στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό.

Η χορήγηση λετροζόλης προκάλεσε αναστολή του ενζύμου της αρωματάσης στον εγκέφαλο, εφόσον η δραστηριότητα της αρωματάσης στον υποθάλαμο μειώθηκε στους επίμυες, οι οποίοι υποβλήθησαν σε αγωγή με λετροζόλη. Επίσης, τα επίπεδα τεστοστερόνης αυξήθηκαν σημαντικά στους επίμυες, οι οποίοι υποβλήθησαν σε αγωγή με λετροζόλη και σε εικονική γοναδεκτομή (μάρτυρες). Η υποβολή στη στρεσογόνο διαδικασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης προκάλεσε αύξηση των επιπέδων κορτικοστερόνης σε όλες τις ομάδες. Στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου, τα θηλυκά ήταν συνολικά πιο δραστήρια και εξερευνητικά από τα αρσενικά, η γοναδεκτομή, όμως, εξομάλυνε αυτή τη διαφορά του φύλου. Η αναστολή της αρωματάσης δεν είχε καμία επίδραση στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου. Στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), τα θηλυκά εκδήλωσαν συνολικά υψηλότερη διάρκεια ακινησίας και χαμηλότερη διάρκεια κολύμβησης σε σχέση με τα αρσενικά.

Η αναστολή της αρωματάσης προκάλεσε μείωση των επιπέδων νοραδρεναλίνης και των ρυθμών ανακύκλωσης της ντοπαμίνης στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες, ανεξάρτητα από την γοναδεκτομή. Άλλες

διαφυλικές διαφορές, όπως επίσης και αλλαγές λόγω στρες εξαιτίας της υποβολής στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), ήταν επίσης εμφανείς στον ιππόκαμπο και τον προμετωπιαίο φλοιό. Σχετικά με τα επίπεδα αμινοξέων, η λετροζόλη δεν είχε σημαντικές δράσεις, ενώ ενδιαφέρουσες διαφυλικές διαφορές παρατηρήθηκαν στον προμετωπιαίο φλοιό.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν κυρίως ότι οι αλλαγές της συμπεριφοράς στη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), που επιφέρουν οι αναστολές της αρωματάσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη διάρκεια χορήγησης. Τα συμπεριφορικά ευρήματα μπορούν περαιτέρω να συσχετιστούν με σεροτονινεργικές και ντοπαμινεργικές αλλαγές σε περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην κατάθλιψη. Είναι σημαντικό πως τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την ανάπτυξη συναισθηματικών διαταραχών σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση οι οποίες λαμβάνουν αγωγή με αναστολές της αρωματάσης, καθώς και σε αυτές οι οποίες λαμβάνουν αγωγή με αναστολές της αρωματάσης προ εμμηνόπαυσης. Τέλος, η παρούσα διατριβή συμβάλλει στην ερμηνεία του ρόλου των ορμονών των γονάδων στην εκδήλωση συμπτωμάτων κατάθλιψης και στην αντικαταθλιπτική δράση.

7 Summary

Aromatase inhibitors, which are widely used in the clinic for the treatment of estrogen-dependent cancers, have been associated with psychiatric effects ranging from mania to depression. Aromatase is the rate-limiting enzyme that catalyzes the conversion of androgens to estrogens. It is mainly located in the ovaries in women, in the testes in men, as well as in the placenta and adrenals. However, it has been shown that other organs, such as the liver, bones, and importantly the brain can produce estrogens locally. Emerging evidence suggests that brain-derived estrogens are responsible for the fine-tuning of neuronal circuits in males and females. However, preclinical studies investigating the role of estrogens in depression and especially the role of brain-derived estrogens in males and females were missing from the scientific literature. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether decreased estrogen synthesis following aromatase inhibition influences depressive symptomatology and underlying brain and hormonal mechanisms in rats.

In the first experiment, we investigated whether treatment with the aromatase inhibitor letrozole leads to a depressive-like behavioral response in cycling female rats. Using the Forced Swim Test (FST) of antidepressant activity we estimated the effect of acute (1 mg/kg, i.p., 3 injections in 24 hours) and sustained (7 days) letrozole administration. The antidepressant fluoxetine was also administered, as a positive control. Testosterone and progesterone levels were assayed in the serum of all animals. Surprisingly, acute aromatase inhibition decreased immobility duration in the FST, indicating its antidepressant potential. Instead, sustained aromatase inhibition did not show such antidepressant potential. Testosterone elevation associated with the decreased depressive behavior in the FST following acute letrozole treatment, but interestingly progesterone explained the increased swimming behavior in cycling female rats.

In a second experiment, we followed up the effects of chronic letrozole treatment on female animals and investigated whether such effects would be differentiated in ovariectomized female rats that lack gonadal-derived hormones. Furthermore, we performed all experiments at the same time in male rats, in order to investigate sex differences. In particular, we investigated the behavioral and neurochemical effects of aromatase inhibition on male and female sham-operated or gonadectomized adult rats. Three weeks later, rats received a chronic treatment of the aromatase inhibitor letrozole

(1 mg/kg, i.p., once daily for one week) or vehicle and they were subjected to the open field and forced swim test (FST). Aromatase activity was determined in the hypothalamus and testosterone and corticosterone were assayed in the blood serum of all rats. The hippocampus and prefrontal cortex were analyzed for monoamine (noradrenaline, dopamine, serotonin and metabolites) and amino acids (GABA, glutamate, glycine, taurine alanine and histidine) levels.

Letrozole treatment inhibited the aromatase enzyme in the brain, since aromatase activity in the hypothalamus was decreased in letrozole-treated rats. Also, testosterone levels were markedly enhanced in letrozole-treated, sham-operated females. FST exposure enhanced corticosterone levels in all groups. In the open field test, females were overall more active and explorative than males, whereas gonadectomy eliminated this sex difference. Aromatase inhibition had no effect in the open field test. In the FST, females exhibited overall higher immobility and lower swimming duration than males. Aromatase inhibition decreased noradrenaline levels and dopaminergic ratios in the hippocampus and PFC of male and female rats, irrespectively of gonadectomy. Other sex differences, as well as stress effects, due to FST exposure, were also apparent in the hippocampus and the prefrontal cortex. Regarding amino acids levels, letrozole had no major effects, but interesting sex differences were observed in the prefrontal cortex.

The present findings mainly show that behavioral effects of aromatase inhibitors in the FST are heavily dependent on the duration of treatment. Behavioral findings could be further associated with serotonergic and dopaminergic changes in brain regions involved in depression. Importantly, the present data could be linked with the development of affective disorders in post-menopausal women treated with aromatase inhibitors and may have implications for women treated with aromatase inhibitors before menopause. Finally, they contribute to the elucidation of the role of gonadal hormones in the expression of depressive symptoms and antidepressant response.

8 Βιβλιογραφία

- Abraham IM, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE (2003) Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J Neurosci* 23:5771-5777.
- Adamec R, Burton P, Blundell J, Murphy DL, Holmes A (2006) Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice. *Behavioural brain research* 170:126-140.
- Ahles TA, Saykin AJ, McDonald BC, Furstenberg CT, Cole BF, Hanscom BS, Mulrooney TJ, Schwartz GN, Kaufman PA (2008) Cognitive function in breast cancer patients prior to adjuvant treatment. *Breast cancer research and treatment* 110:143-152.
- Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, Peters JA, Harmor AJ, Collaborators C (2013) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. *British journal of pharmacology* 170:1459-1581.
- Allen PJ, D'Anci KE, Kanarek RB, Renshaw PF (2012) Sex-specific antidepressant effects of dietary creatine with and without sub-acute fluoxetine in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 101:588-601.
- Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR (1996) Prenatal protein malnutrition affects avoidance but not escape behavior in the elevated T-maze test. *Physiol Behav* 60:191-195.
- Aloisi AM, Bonifazi M (2006) Sex hormones, central nervous system and pain. *Hormones and behavior* 50:1-7.
- Alonso SJ, Castellano MA, Afonso D, Rodriguez M (1991) Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. *Physiol Behav* 49:69-72.
- Altemus M, Sarvaiya N, Neill Epperson C (2014) Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Front Neuroendocrinol* 35:320-330.
- Alves CJ, Magalhaes A, Summavielle T, Melo P, De Sousa L, Tavares MA, Monteiro PR (2008) Hormonal, neurochemical, and behavioral response to a forced swim test in adolescent rats throughout cocaine withdrawal. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1139:366-373.
- An XL, Zou JX, Wu RY, Yang Y, Tai FD, Zeng SY, Jia R, Zhang X, Liu EQ, Broders H (2011) Strain and sex differences in anxiety-like and social behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 60:111-123.
- Andrade S, Silveira SL, Arbo BD, Batista BA, Gomez R, Barros HM, Ribeiro MF (2010) Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. *Physiol Behav* 99:687-690.
- Andrade S, Silveira SL, Gomez R, Barros HM, Ribeiro MF (2007) Gender differences of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone in rats submitted to the forced swimming test. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 31:613-621.
- Anisman H, Matheson K (2005) Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 29:525-546.
- Austin MP, Mitchell P, Goodwin GM (2001) Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 178:200-206.
- Autry AE, Adachi M, Cheng P, Monteggia LM (2009) Gender-specific impact of brain-derived neurotrophic factor signaling on stress-induced depression-like behavior. *Biological psychiatry* 66:84-90.
- Aydin M, Yilmaz B, Alcin E, Nedzvetsky VS, Sahin Z, Tuzcu M (2008) Effects of letrozole on hippocampal and cortical catecholaminergic neurotransmitter levels, neural cell adhesion molecule expression and spatial learning and memory in female rats. *Neuroscience* 151:186-194.
- Baker S, Bielajew C (2007) Influence of housing on the consequences of chronic mild stress in female rats. *Stress* 10:283-293.
- Baker SL, Kentner AC, Konkle AT, Santa-Maria Barbagallo L, Bielajew C (2006) Behavioral and physiological effects of chronic mild stress in female rats. *Physiol Behav* 87:314-322.
- Bakker J, Baillien M, Honda S, Harada N, Balthazart J (2004) Relationships between aromatase activity in the brain and gonads and behavioural deficits in homozygous and heterozygous aromatase knockout mice. *J Neuroendocrinol* 16:483-490.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2002) The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 22:9104-9112.
- Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2002) Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress

- response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:193-199.
- Balthazart J, Charlier TD, Cornil CA, Dickens MJ, Harada N, Konkle AT, Voigt C, Ball GF (2011) Sex differences in brain aromatase activity: genomic and non-genomic controls. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2:34.
- Banasr M, Hery M, Brezun JM, Daszuta A (2001) Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 14:1417-1424.
- Bangasser DA, Shors TJ (2007) The hippocampus is necessary for enhancements and impairments of learning following stress. *Nat Neurosci* 10:1401-1403.
- Barros HM, Ferigolo M (1998) Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. *Neurosci Biobehav Rev* 23:279-286.
- Baulieu EE, Robel P (1990) Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:395-403.
- Beatty WW, Beatty PA (1970) Hormonal determinants of sex differences in avoidance behavior and reactivity to electric shock in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 73:446-455.
- Beatty WW, Fessler RG (1976) Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiol Behav* 16:413-417.
- Beatty WW, Fessler RG (1977) Gonadectomy and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiol Behav* 19:1-6.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E (2005) Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology* 146:1650-1673.
- Beery AK, Zucker I (2011) Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35:565-572.
- Bekris S, Antoniou K, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z (2005) Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behavioural brain research* 161:45-59.
- Belzung C, Willner P, Philippot P (2015) Depression: from psychopathology to pathophysiology. *Curr Opin Neurobiol* 30:24-30.
- Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N (2009) The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry* 14:764-773, 739.
- Bessinis DP, Dalla C, Kokras N, Pitychoutis PM, Papadopoulou-Daifoti Z (2013) Sex-dependent neurochemical effects of environmental enrichment in the visual system. *Neuroscience* 254:130-140.
- Beyer C, Wozniak A, Hutchison JB (1993) Sex-specific aromatization of testosterone in mouse hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 58:673-681.
- Bhatnagar S, Nowak N, Babich L, Bok L (2004) Deletion of the 5-HT₃ receptor differentially affects behavior of males and females in the Porsolt forced swim and defensive withdrawal tests. *Behavioural brain research* 153:527-535.
- Bigos KL, Pollock BG, Stankevich BA, Bies RR (2009) Sex differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antidepressants: an updated review. *Gend Med* 6:522-543.
- Blanchard DC, Shepherd JK, De Padua Carobrez A, Blanchard RJ (1991) Sex effects in defensive behavior: baseline differences and drug interactions. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 15:461-468.
- Bonilla-Jaime H, Limon-Morales O, Arteaga-Silva M, Hernandez-Gonzalez M, Guadarrama-Cruz G, Alarcon-Aguilar F, Vazquez-Palacios G (2010) Orchiectomy modifies the antidepressant-like response of nicotine in the forced swimming test. *Physiol Behav* 101:456-461.
- Borsini F, Meli A (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* 94:147-160.
- Bourin M, Petit-Demouliere B, Dhonnchadha BN, Hascoet M (2007) Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & clinical pharmacology* 21:567-574.
- Bowman RE (2005) Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan. *J Neuroendocrinol* 17:526-535.
- Bowman RE, Beck KD, Luine VN (2003) Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav* 43:48-59.
- Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN (2004) Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology* 145:3778-3787.

- Bravo G, Maswood S (2006) Acute treatment with 5-HT₃ receptor antagonist, tropisetron, reduces immobility in intact female rats exposed to the forced swim test. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 85:362-368.
- Breckenridge LM, Bruns GL, Todd BL, Feuerstein M (2012) Cognitive limitations associated with tamoxifen and aromatase inhibitors in employed breast cancer survivors. *Psycho-oncology* 21:43-53.
- Brinton RD (2009) Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. *Trends in pharmacological sciences* 30:212-222.
- Brotto LA, Barr AM, Gorzalka BB (2000) Sex differences in forced-swim and open-field test behaviours after chronic administration of melatonin. *Eur J Pharmacol* 402:87-93.
- Brummelte S, Pawluski JL, Galea LA (2006) High post-partum levels of corticosterone given to dams influence postnatal hippocampal cell proliferation and behavior of offspring: A model of post-partum stress and possible depression. *Hormones and behavior* 50:370-382.
- Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Malin J, Mamounas EP, Rowden D, Solky AJ, Sowers MR, Stearns V, Winer EP, Somerfield MR, Griggs JJ, American Society of Clinical O (2010) American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28:3784-3796.
- Carrier N, Saland SK, Duclot F, He H, Mercer R, Kabbaj M (2015) The Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Testosterone and Estrogen in Gonadectomized Male Rats. *Biol Psychiatry* 78:259-269.
- Castagne V, Moser P, Roux S, Porsolt RD (2011) Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit 8 10A*.
- Cazzaniga M, Bonanni B (2012) Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012:985620.
- Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N (2007) The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27:2781-2787.
- Chen A, Zorrilla E, Smith S, Rousso D, Levy C, Vaughan J, Donaldson C, Roberts A, Lee KF, Vale W (2006) Urocortin 2-deficient mice exhibit gender-specific alterations in circadian hypothalamus-pituitary-adrenal axis and depressive-like behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:5500-5510.
- Chklovskii DB (2004) Synaptic connectivity and neuronal morphology: two sides of the same coin. *Neuron* 43:609-617.
- Chklovskii DB, Mel BW, Svoboda K (2004) Cortical rewiring and information storage. *Nature* 431:782-788.
- Cohen-Bendahan CC, Van de Beek C, Berenbaum S, A. (2005) Prenatal sex hormone effects on child and adult sex-typed behavior: methods and findings. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1.
- Connor TJ, Kelly JP, Leonard BE (1997) Forced swim test-induced neurochemical endocrine, and immune changes in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 58:961-967.
- Consoli D, Fedotova J, Micale V, Saproinov NS, Drago F (2005) Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test). *Eur J Pharmacol* 520:100-107.
- Contreras CM, Martinez-Mota L, Saavedra M (1998) Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 22:1121-1128.
- Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones SE, Jassem J, Van de Velde CJ, Delozier T, Alvarez I, Del Mastro L, Ortmann O, Diedrich K, Coates AS, Bajetta E, Holmberg SB, Dodwell D, Mickiewicz E, Andersen J, Lonning PE, Cocconi G, Forbes J, Castiglione M, Stuart N, Stewart A, Fallowfield LJ, Bertelli G, Hall E, Bogle RG, Carpentieri M, Colajori E, Subar M, Ireland E, Bliss JM, Intergroup Exemestane S (2007) Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet* 369:559-570.
- Craft RM, Kostick ML, Rogers JA, White CL, Tsutsui KT (2010) Forced swim test behavior in postpartum rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 96:402-412.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238-245.
- Cryan JF, Mombereau C (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular psychiatry* 9:326-357.

- Cryan JF, Sweeney FF (2011) The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *British journal of pharmacology* 164:1129-1161.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I (2005) Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29:547-569.
- Curtis AL, Bethea T, Valentino RJ (2006) Sexually dimorphic responses of the brain norepinephrine system to stress and corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology* 31:544-554.
- Dalla C, Antoniou K, Drossopoulou G, Xagoraris M, Kokras N, Sfikakis A, Papadopoulou-Daifoti Z (2005a) Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience* 135:703-714.
- Dalla C, Antoniou K, Kokras N, Drossopoulou G, Papathanasiou G, Bekris S, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z (2008a) Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. *Physiol Behav* 93:595-605.
- Dalla C, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker J (2004) Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit depressive-like symptomatology. *Eur J Neurosci* 20:217-228.
- Dalla C, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z, Balthazart J, Bakker J (2005b) Male aromatase-knockout mice exhibit normal levels of activity, anxiety and "depressive-like" symptomatology. *Behav Brain Res* 163:186-193.
- Dalla C, Edgecomb C, Whetstone AS, Shors TJ (2008b) Females do not express learned helplessness like males do. *Neuropsychopharmacology* 33:1559-1569.
- Dalla C, Kokras N, Pastromas N, Kafetzopoulos V, Tzouveka E, Balthazart J, C.A. C, Z. P-D (2012) Sex differences in the forced swim test of antidepressant activity: effects of gonadal- and brain-derived estrogens Society for Neuroscience meeting.
- Dalla C, Papachristos EB, Whetstone AS, Shors TJ (2009a) Female rats learn trace memories better than male rats and consequently retain a greater proportion of new neurons in their hippocampi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2927-2932.
- Dalla C, Pitychoutis PM, Kokras N, Papadopoulou-Daifoti Z (2010a) Sex Differences in Animal Models of Depression and Antidepressant Response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
- Dalla C, Pitychoutis PM, Kokras N, Papadopoulou-Daifoti Z (2010b) Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 106:226-233.
- Dalla C, Pitychoutis PM, Kokras N, Papadopoulou-Daifoti Z (2011) Sex differences in response to stress and expression of depressive-like behaviours in the rat. *Curr Top Behav Neurosci* 8:97-118.
- Dalla C, Shors TJ (2009) Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. *Physiol Behav* 97:229-238.
- Dalla C, Whetstone AS, Hodes GE, Shors TJ (2009b) Stressful experience has opposite effects on dendritic spines in the hippocampus of cycling versus masculinized females. *Neurosci Lett* 449:52-56.
- Darmani NA (1996) Differential potentiation of L-tryptophan-induced head-twitch response in mice by cocaine and sertraline. *Life Sci* 59:1109-1119.
- Dawson JL, Cheung YM, Lau RT (1975) Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. *Biol Psychol* 3:213-229.
- de Bournonville C, Dickens MJ, Ball GF, Balthazart J, Cornil CA (2013) Dynamic changes in brain aromatase activity following sexual interactions in males: where, when and why? *Psychoneuroendocrinology* 38:789-799.
- DeBold CR, Sheldon WR, DeCherney GS, Jackson RV, Alexander AN, Vale W, Rivier J, Orth DN (1984) Arginine vasopressin potentiates adrenocorticotropin release induced by ovine corticotropin-releasing factor. *The Journal of clinical investigation* 73:533-538.
- Deecher D, Andree TH, Sloan D, Schechter LE (2008) From menarche to menopause: exploring the underlying biology of depression in women experiencing hormonal changes. *Psychoneuroendocrinology* 33:3-17.
- Desai K, Mao JJ, Su I, Demichele A, Li Q, Xie SX, Gehrman PR (2013) Prevalence and risk factors for insomnia among breast cancer patients on aromatase inhibitors. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 21:43-51.
- Detke MJ, Lucki I (1996) Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavioural brain research* 73:43-46.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121:66-72.

- Diaz-Veliz G, Soto V, Dussaubat N, Mora S (1989) Influence of the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement upon the acquisition of conditioned avoidance responses in rats. *Physiol Behav* 46:397-401.
- Dickens MJ, Cornil CA, Balthazart J (2011) Acute stress differentially affects aromatase activity in specific brain nuclei of adult male and female quail. *Endocrinology* 152:4242-4251.
- Dominguez R, Cruz-Morales SE, Carvalho MC, Xavier M, Brandao ML (2003) Sex differences in serotonergic activity in dorsal and median raphe nucleus. *Physiol Behav* 80:203-210.
- Donner NC, Lowry CA (2013) Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 465:601-626.
- Doremus TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2006) Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 83:570-577.
- Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* 213:93-118.
- Drossopoulou G, Antoniou K, Kitraki E, Papathanasiou G, Papalexi E, Dalla C, Papadopoulou-Daifoti Z (2004) Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience* 126:849-857.
- Duman RS, Voleti B (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci* 35:47-56.
- Duncko R, Kiss A, Skultetyova I, Rusnak M, Jezova D (2001) Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in response to chronic mild stress rise in male but not in female rats while tyrosine hydroxylase mRNA levels decrease in both sexes. *Psychoneuroendocrinology* 26:77-89.
- Dwyer JM, Duman RS (2013) Activation of mammalian target of rapamycin and synaptogenesis: role in the actions of rapid-acting antidepressants. *Biological psychiatry* 73:1189-1198.
- Estanislau C, Morato S (2006) Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 24:255-262.
- Estrada-Camarena E, Fernandez-Guasti A, Lopez-Rubalcava C (2003) Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28:830-838.
- Estrada-Camarena E, Lopez-Rubalcava C, Hernandez-Aragon A, Mejia-Mauries S, Picazo O (2011) Long-term ovariectomy modulates the antidepressant-like action of estrogens, but not of antidepressants. *J Psychopharmacol* 25:1365-1377.
- Estrada-Camarena E, Lopez-Rubalcava C, Vega-Rivera N, Recamier-Carballo S, Fernandez-Guasti A (2010) Antidepressant effects of estrogens: a basic approximation. *Behav Pharmacol* 21:451-464.
- Fernandes C, Gonzalez MI, Wilson CA, File SE (1999) Factor analysis shows that female rat behaviour is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 64:731-738.
- Fester L, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2011) Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell Tissue Res* 345:285-294.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain research Brain research reviews* 39:29-54.
- File SE (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural brain research* 125:151-157.
- Fink G, Sumner BE, McQueen JK, Wilson H, Rosie R (1998) Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:764-775.
- Flores-Serrano AG, Vila-Luna ML, Alvarez-Cervera FJ, Heredia-Lopez FJ, Gongora-Alfaro JL, Pineda JC (2013) Clinical doses of citalopram or reboxetine differentially modulate passive and active behaviors of female Wistar rats with high or low immobility time in the forced swimming test. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 110:89-97.
- Frank E, Carpenter LL, Kupfer DJ (1988) Sex differences in recurrent depression: are there any that are significant? *Am J Psychiatry* 145:41-45.
- Frye CA, Petralia SM, Rhodes ME (2000) Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 67:587-596.
- Frye CA, Walf AA (2009) Depression-like behavior of aged male and female mice is ameliorated with administration of testosterone or its metabolites. *Physiol Behav* 97:266-269.

- Galea LA, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS (1997) Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience* 81:689-697.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29-60.
- Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA (1999a) Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 40:574-584.
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB (1999b) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89:567-578.
- Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M, Ogawa S, Pfaff D, Karayiorgou M (1998) Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9991-9996.
- Goodwin GM (1997) Neuropsychological and neuroimaging evidence for the involvement of the frontal lobes in depression. *Journal of psychopharmacology* 11:115-122.
- Goodwin GM (2006) Aromatase inhibitors and bipolar mood disorder: a case report. *Bipolar Disord* 8:516-518.
- Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N (2000) Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry* 48:715-720.
- Gouveia A, Jr., dos Santos UD, Felisbino FE, de Afonseca TL, Antunes G, Morato S (2004) Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. *Behav Processes* 67:167-171.
- Graham BM, Langton JM, Richardson R (2011) Pharmacological enhancement of fear reduction: preclinical models. *British journal of pharmacology* 164:1230-1247.
- Grippo AJ, Sullivan NR, Damjanoska KJ, Crane JW, Carrasco GA, Shi J, Chen Z, Garcia F, Muma NA, Van de Kar LD (2005) Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 179:769-780.
- Gunther L, Rothe J, Rex A, Voigt JP, Millan MJ, Fink H, Bert B (2011) 5-HT(1A)-receptor over-expressing mice: genotype and sex dependent responses to antidepressants in the forced swim-test. *Neuropharmacology* 61:433-441.
- Hahn ME, Karkowski L, Weinreb L, Henry A, Schanz N, Hahn EM (1998) Genetic and developmental influences on infant mouse ultrasonic calling. II. Developmental patterns in the calls of mice 2-12 days of age. *Behavior genetics* 28:315-325.
- Hajszan T, MacLusky NJ, Leranth C (2005) Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 21:1299-1303.
- Halbreich U, Kahn LS (2001) Role of estrogen in the aetiology and treatment of mood disorders. *CNS Drugs* 15:797-817.
- Handa RJ, Nunley KM, Lorens SA, Louie JP, McGivern RF, Bollnow MR (1994) Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol Behav* 55:117-124.
- Harris HA (2007) Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Molecular endocrinology* 21:1-13.
- Heinrichs SC, Koob GF (2004) Corticotropin-releasing factor in brain: a role in activation, arousal, and affect regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 311:427-440.
- Heinsbroek RP, Van Haaren F, Van de Poll NE, Steenbergen HL (1991) Sex differences in the behavioral consequences of inescapable footshocks depend on time since shock. *Physiol Behav* 49:1257-1263.
- Henry NL, Banerjee M, Wicha M, Van Poznak C, Smerage JB, Schott AF, Griggs JJ, Hayes DF (2011) Pilot study of duloxetine for treatment of aromatase inhibitor-associated musculoskeletal symptoms. *Cancer* 117:5469-5475.
- Herrera-Perez JJ, Fernandez-Guasti A, Martinez-Mota L (2013) Brain SERT Expression of Male Rats Is Reduced by Aging and Increased by Testosterone Restitution. *Neurosci J* 2013:201909.
- Higashi E, Fukami T, Itoh M, Kyo S, Inoue M, Yokoi T, Nakajima M (2007) Human CYP2A6 is induced by estrogen via estrogen receptor. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35:1935-1941.
- Hoyo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes

- estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:865-870.
- Homberg JR, Olivier JD, Smits BM, Mul JD, Mudde J, Verheul M, Nieuwenhuizen OF, Cools AR, Ronken E, Cremers T, Schoffelmeer AN, Ellenbroek BA, Cuppen E (2007) Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience* 146:1662-1676.
- Hoogenraad CC, Akhmanova A (2010) Dendritic spine plasticity: new regulatory roles of dynamic microtubules. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 16:650-661.
- Horger BA, Roth RH (1996) The role of mesoprefrontal dopamine neurons in stress. *Crit Rev Neurobiol* 10:395-418.
- Hughes RN (2007) Sex does matter: comments on the prevalence of male-only investigations of drug effects on rodent behaviour. *Behav Pharmacol* 18:583-589.
- Hunziker MH, Dos Santos CV (2007) Learned helplessness: effects of response requirement and interval between treatment and testing. *Behav Processes* 76:183-191.
- Hyde JF, Jerussi TP (1983) Sexual dimorphism in rats with respect to locomotor activity and circling behavior. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 18:725-729.
- Imhof JT, Coelho ZM, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP (1993) Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behavioural brain research* 56:177-180.
- Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4686-4691.
- Janowsky DS, Overstreet DH (1990) Cholinergic dysfunction in depression. *Pharmacol Toxicol* 66 Suppl 3:100-111.
- Jans LA, Lieben CK, Blokland A (2007) Influence of sex and estrous cycle on the effects of acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture in adult Wistar rats. *Neuroscience* 147:304-317.
- Jenkins JA, Williams P, Kramer GL, Davis LL, Petty F (2001) The influence of gender and the estrous cycle on learned helplessness in the rat. *Biol Psychol* 58:147-158.
- Jenkins VA, Ambrosine LM, Atkins L, Cuzick J, Howell A, Fallowfield LJ (2008) Effects of anastrozole on cognitive performance in postmenopausal women: a randomised, double-blind chemoprevention trial (IBIS II). *Lancet Oncol* 9:953-961.
- Johnston AL, File SE (1991) Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav* 49:245-250.
- Jones MD, Lucki I (2005) Sex differences in the regulation of serotonergic transmission and behavior in 5-HT receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30:1039-1047.
- Joyce JN, Montero E, Van Hartesveldt C (1984) Dopamine-mediated behaviors: characteristics of modulation by estrogen. *Pharmacol Biochem Behav* 21:791-800.
- Joyce PR, Mulder RT, Luty SE, McKenzie JM, Rae AM (2003) A differential response to nortriptyline and fluoxetine in melancholic depression: the importance of age and gender. *Acta psychiatrica Scandinavica* 108:20-23.
- Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N (2004) Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res* 35:103-108.
- Kalueff AV, Olivier JD, Nonkes LJ, Homberg JR (2010) Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 34:373-386.
- Kamper EF, Chatzigeorgiou A, Tsimpoukidi O, Kamper M, Dalla C, Pitychoutis PM, Papadopoulou-Daifoti Z (2009) Sex differences in oxidant/antioxidant balance under a chronic mild stress regime. *Physiol Behav* 98:215-222.
- Karandrea D, Kittas C, Kitraki E (2000) Contribution of sex and cellular context in the regulation of brain corticosteroid receptors following restraint stress. *Neuroendocrinology* 71:343-353.
- Karandrea D, Kittas C, Kitraki E (2002) Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology* 75:217-226.
- Kelliher P, Kelly JP, Leonard BE, Sanchez C (2003) Effects of acute and chronic administration of selective monoamine re-uptake inhibitors in the rat forced swim test. *Psychoneuroendocrinology* 28:332-347.
- Kelly SJ, Ostrowski NL, Wilson MA (1999) Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases. *Pharmacol Biochem Behav* 64:655-664.

- Kessler RC (2007) The global burden of anxiety and mood disorders: putting the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) findings into perspective. *The Journal of clinical psychiatry* 68 Suppl 2:10-19.
- Kimura M, Sudhir K, Jones M, Simpson E, Jefferis AM, Chin-Dusting JP (2003) Impaired acetylcholine-induced release of nitric oxide in the aorta of male aromatase-knockout mice: regulation of nitric oxide production by endogenous sex hormones in males. *Circ Res* 93:1267-1271.
- Kirby LG, Lucki I (1997) Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282:967-976.
- Kirk RC, Blampied NM (1985) Activity during Inescapable shock and subsequent escape avoidance learning: Female and male rats compared. *New Zealand Journal of Psychology* 14:9-14.
- Kitay JI (1961) Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology* 68:818-824.
- Kitraki E, Kremmyda O, Youlatos D, Alexis M, Kittas C (2004) Spatial performance and corticosteroid receptor status in the 21-day restraint stress paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018:323-327.
- Kokras N, Antoniou K, Dalla C, Bekris S, Xagoraris M, Ovestreet DH, Papadopoulou-Daifoti Z (2009a) Sex-related differential response to clomipramine treatment in a rat model of depression. *Journal of psychopharmacology* 23:945-956.
- Kokras N, Antoniou K, Mikail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C (2015a) Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology*.
- Kokras N, Antoniou K, Mikail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C (2015b) Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology* 99:408-421.
- Kokras N, Antoniou K, Polissidis A, Papadopoulou-Daifoti Z (2009b) Antidepressants induce regionally discrete, sex-dependent changes in brain's glutamate content. *Neurosci Lett* 464:98-102.
- Kokras N, Dalla C (2014) Sex differences in animal models of psychiatric disorders. *British journal of pharmacology* 171:4595-4619.
- Kokras N, Dalla C, Papadopoulou-Daifoti Z (2011) Sex differences in pharmacokinetics of antidepressants. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 7:213-226.
- Kokras N, Dalla C, Sideris AC, Dendi A, Mikail HG, Antoniou K, Papadopoulou-Daifoti Z (2012) Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. *Neuropharmacology* 62:436-445.
- Kokras N, Pastromas N, Porto TH, Kafetzopoulos V, Mavridis T, Dalla C (2014) Acute but not sustained aromatase inhibition displays antidepressant properties. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:1307-1313.
- Kokras N, Polissidis A, Antoniou K, Dalla C (2016) Head shaking in the forced swim test: A robust but unexplored sex difference. *Pharmacol Biochem Behav*.
- Konkle AT, Baker SL, Kentner AC, Barbagallo LS, Merali Z, Bielajew C (2003) Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. *Brain research* 992:227-238.
- Kornstein SG, McEnany G (2000) Enhancing pharmacologic effects in the treatment of depression in women. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 11:18-27.
- Kornstein SG, Schatzberg AF, Thase ME, Yonkers KA, McCullough JP, Keitner GI, Gelenberg AJ, Davis SM, Harrison WM, Keller MB (2000a) Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. *Am J Psychiatry* 157:1445-1452.
- Kornstein SG, Schatzberg AF, Thase ME, Yonkers KA, McCullough JP, Keitner GI, Gelenberg AJ, Ryan CE, Hess AL, Harrison W, Davis SM, Keller MB (2000b) Gender differences in chronic major and double depression. *J Affect Disord* 60:1-11.
- Koss WA, Einat H, Schloesser RJ, Manji HK, Rubinow DR (2012) Estrogen effects on the forced swim test differ in two outbred rat strains. *Physiol Behav* 106:81-86.
- Lagunas N, Calmarza-Font I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM (2010) Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. *Horm Behav* 58:786-791.
- Lephart ED (1996) A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain research Brain research reviews* 22:1-26.
- Leuner B, Shors TJ (2012) Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience*.
- Levine S, Broadhurst PL (1963) Genetic and ontogenetic determinants of adult behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 56:423-428.

- Lewis C, McEwen BS, Frankfurt M (1995) Estrogen-induction of dendritic spines in ventromedial hypothalamus and hippocampus: effects of neonatal aromatase blockade and adult GDX. *Brain Res Dev Brain Res* 87:91-95.
- Li Y, Pehrson AL, Budac DP, Sanchez C, Gulinello M (2012) A rodent model of premenstrual dysphoria: progesterone withdrawal induces depression-like behavior that is differentially sensitive to classes of antidepressants. *Behav Brain Res* 234:238-247.
- Lightfoot JT (2008) Sex hormones' regulation of rodent physical activity: a review. *International journal of biological sciences* 4:126-132.
- Macbeth AH, Luine VN (2010) Changes in anxiety and cognition due to reproductive experience: a review of data from rodent and human mothers. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 34:452-467.
- Mack CM, Fitch RH, Cowell PE, Schrott LM, Denenberg VH (1993) Ovarian estrogen acts to feminize the female rat's corpus callosum. *Brain Res Dev Brain Res* 71:115-119.
- MacLusky NJ, Clark AS, Naftolin F, Goldman-Rakic PS (1987) Estrogen formation in the mammalian brain: possible role of aromatase in sexual differentiation of the hippocampus and neocortex. *Steroids* 50:459-474.
- Maier SF (1984) Learned helplessness and animal models of depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 8:435-446.
- Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC (2001) Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav* 74:435-440.
- Marcus SM, Kerber KB, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg A, Balasubramani GK, Ritz L, Kornstein S, Young EA, Trivedi MH (2008) Sex differences in depression symptoms in treatment-seeking adults: confirmatory analyses from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study. *Compr Psychiatry* 49:238-246.
- Marcus SM, Young EA, Kerber KB, Kornstein S, Farabaugh AH, Mitchell J, Wisniewski SR, Balasubramani GK, Trivedi MH, Rush AJ (2005) Gender differences in depression: findings from the STAR*D study. *J Affect Disord* 87:141-150.
- Martenyi F, Dossenbach M, Mraz K, Metcalfe S (2001) Gender differences in the efficacy of fluoxetine and maprotiline in depressed patients: a double-blind trial of antidepressants with serotonergic or norepinephrinergic reuptake inhibition profile. *Eur Neuropsychopharmacol* 11:227-232.
- Martinez-Mota L, Cruz-Martinez JJ, Marquez-Baltazar S, Fernandez-Guasti A (2008) Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 88:332-340.
- Martinez-Mota L, Ulloa RE, Herrera-Perez J, Chavira R, Fernandez-Guasti A (2011) Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Physiol Behav* 104:900-905.
- Marvan ML, Chavez-Chavez L, Santana S (1996) Clomipramine modifies fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. *Archives of medical research* 27:83-86.
- Mateus-Pinheiro A, Patricio P, Alves ND, Machado-Santos AR, Morais M, Bessa JM, Sousa N, Pinto L (2014) The Sweet Drive Test: refining phenotypic characterization of anhedonic behavior in rodents. *Frontiers in behavioral neuroscience* 8:74.
- Matuszewich L, Yamamoto BK (2003) Long-lasting effects of chronic stress on DOI-induced hyperthermia in male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 169:169-175.
- McCarthy MM (2016) Multifaceted origins of sex differences in the brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371.
- McCarthy MM, Arnold AP (2011) Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci* 14:677-683.
- McCarthy MM, Auger AP, Perrot-Sinal TS (2002) Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *Trends Neurosci* 25:307-312.
- McDonald PG, Doughty C (1972) Inhibition of androgen-sterilization in the female rat by administration of an antioestrogen. *J Endocrinol* 55:455-456.
- McDonald PG, Doughty C (1974) Effect of neonatal administration of different androgens in the female rat: correlation between aromatization and the induction of sterilization. *J Endocrinol* 61:95-103.
- McEuen JG, Semsar KA, Lim MA, Bale TL (2009) Influence of sex and corticotropin-releasing factor pathways as determinants in serotonin sensitivity. *Endocrinology* 150:3709-3716.
- McEwen BS (1991) Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* 12:141-147.

- McEwen BS (2002) Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of aging* 23:921-939.
- McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20:279-307.
- McEwen BS, Alves SE, Bulloch K, Weiland NG (1997) Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 48:S8-15.
- McHenry J, Carrier N, Hull E, Kabbaj M (2014) Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone. *Front Neuroendocrinol* 35:42-57.
- Mehta NS, Wang L, Redei EE (2013) Sex differences in depressive, anxious behaviors and hippocampal transcript levels in a genetic rat model. *Genes, brain, and behavior*.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA (2001) Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37:3-12.
- Meng F-T, Ni R-J, Zhang Z, Zhao J, Liu Y-J, Zhou J-N (2011) Inhibition of oestrogen biosynthesis induces mild anxiety in C57BL/6J ovariectomized female mice. *Neuroscience bulletin* 27:241-250.
- Merkatz RB, Temple R, Subel S, Feiden K, Kessler DA (1993) Women in clinical trials of new drugs. A change in Food and Drug Administration policy. The Working Group on Women in Clinical Trials. *The New England journal of medicine* 329:292-296.
- Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ (1996) Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci* 16:595-604.
- Mikail HG, Dalla C, Kokras N, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z (2012) Sertraline behavioral response associates closer and dose-dependently with cortical rather than hippocampal serotonergic activity in the rat forced swim stress. *Physiology & behavior* 107:201-206.
- Mitic M, Simic I, Djordjevic J, Radojic MB, Adzic M (2013) Gender-specific effects of fluoxetine on hippocampal glucocorticoid receptor phosphorylation and behavior in chronically stressed rats. *Neuropharmacology* 70:100-111.
- Molina-Hernandez M, Tellez-Alcantara NP (2001) Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. *Psychoneuroendocrinology* 26:479-491.
- Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobald D, Malkovska I, Nef S, Parada LF, Nestler EJ (2007) Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biological psychiatry* 61:187-197.
- Mora S, Dussaubat N, Diaz-Veliz G (1996) Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21:609-620.
- Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM (2004) Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat Neurosci* 7:1034-1039.
- Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M, White RJ, Takaoka Y, Wolin L (1975) The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res* 31:295-319.
- Naito H, Tonoue T (1987) Sex difference in ultrasound distress call by rat pups. *Behavioural brain research* 25:13-21.
- Naito S, Sato K, Yoshida K, Higuchi H, Takahashi H, Kamata M, Ito K, Ohkubo T, Shimizu T (2007) Gender differences in the clinical effects of fluvoxamine and milnacipran in Japanese major depressive patients. *Psychiatry and clinical neurosciences* 61:421-427.
- Nelson RJ (2000) Sex Determination and Differentiation. In: *An Introduction to Behavioral Endocrinology*, Second Edition Chapter 3.
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S (2002) Preclinical models: status of basic research in depression. *Biological psychiatry* 52:503-528.
- Neumann ID, Wegener G, Homberg JR, Cohen H, Slattery DA, Zohar J, Olivier JD, Mathe AA (2011) Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35:1357-1375.
- Nomikos GG, Spyraiki C (1988) Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. *Neuropharmacology* 27:691-696.
- Novais A, Ferreira AC, Marques F, Pego JM, Cerqueira JJ, David-Pereira A, Campos FL, Dalla C, Kokras N, Sousa N, Palha JA, Sousa JC (2013) Neudesin is involved in anxiety behavior: structural and neurochemical correlates. *Frontiers in behavioral neuroscience* 7:119.
- Okada M, Hayashi N, Kometani M, Nakao K, Inukai T (1997) Influences of ovariectomy and continuous replacement of 17beta-estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. *Japanese journal of pharmacology* 73:93-96.

- Olivier JD, Van Der Hart MG, Van Swelm RP, Dederen PJ, Homberg JR, Cremers T, Deen PM, Cuppen E, Cools AR, Ellenbroek BA (2008) A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. *Neuroscience* 152:573-584.
- Overstreet DH, Friedman E, Mathe AA, Yadid G (2005) The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29:739-759.
- Overstreet DH, Russell RW, Helps SC, Messenger M (1979) Selective breeding for sensitivity to the anticholinesterase DFP. *Psychopharmacology (Berl)* 65:15-20.
- Overstreet DH, Wegener G (2013) The flinders sensitive line rat model of depression--25 years and still producing. *Pharmacological reviews* 65:143-155.
- Padilla E, Barrett D, Shumake J, Gonzalez-Lima F (2009) Strain, sex, and open-field behavior: factors underlying the genetic susceptibility to helplessness. *Behavioural brain research* 201:257-264.
- Palanza P (2001) Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neuroscience and biobehavioral reviews* 25:219-233.
- Papp M, Willner P, Muscat R (1991) An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology* 104:255-259.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 14:285-293.
- Phillips KA, Ribic K, Fisher R (2011) Do aromatase inhibitors have adverse effects on cognitive function? *Breast Cancer Res* 13:203.
- Pineyro G, Blier P (1999) Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* 51:533-591.
- Pinos H, Collado P, Rodriguez-Zafra M, Rodriguez C, Segovia S, Guillamon A (2001) The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res Bull* 56:73-78.
- Pitychoutis PM, Dalla C, Sideris AC, Tsonis PA, Papadopoulou-Daifoti Z (2012) 5-HT(1A), 5-HT(2A), and 5-HT(2C) receptor mRNA modulation by antidepressant treatment in the chronic mild stress model of depression: sex differences exposed. *Neuroscience* 210:152-167.
- Pitychoutis PM, Griva E, Ioannou K, Tsitsilonis OE, Papadopoulou-Daifoti Z (2009a) Chronic antidepressant treatment exerts sexually dimorphic immunomodulatory effects in an experimental model of major depression: do females lack an advantage? *Int J Neuropsychopharmacol* 1-7.
- Pitychoutis PM, Nakamura K, Tsonis PA, Papadopoulou-Daifoti Z (2009b) Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. *Neuroscience* 159:1216-1232.
- Pitychoutis PM, Pallis EG, Mikail HG, Papadopoulou-Daifoti Z (2011) Individual differences in novelty-seeking predict differential responses to chronic antidepressant treatment through sex- and phenotype-dependent neurochemical signatures. *Behav Brain Res* 223:154-168.
- Poltyrev T, Gorodetsky E, Bejar C, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M (2005) Effect of chronic treatment with ladostigil (TV-3326) on anxiogenic and depressive-like behaviour and on activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male and female prenatally stressed rats. *Psychopharmacology (Berl)* 181:118-125.
- Porsolt RD (1979) Animal model of depression. *Biomedicine* 30:139-140.
- Porsolt RD (2000) Animal models of depression: utility for transgenic research. *Reviews in the neurosciences* 11:53-58.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379-391.
- Rachman IM, Unerstall JR, Pfaff DW, Cohen RS (1998) Estrogen alters behavior and forebrain c-fos expression in ovariectomized rats subjected to the forced swim test. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13941-13946.
- Ramos A, Kangarski AL, Basso PF, Da Silva Santos JE, Assreuy J, Vendruscolo LF, Takahashi RN (2002) Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. *Behavioural brain research* 129:113-123.
- Ramos A, Mellerin Y, Mormede P, Chaouloff F (1998) A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behavioural brain research* 96:195-205.
- Reeb BC, Tang AC (2005) Sex difference in temporal patterns of social interaction and its dependence upon neonatal novelty exposure. *Behavioural brain research* 158:359-365.
- Reimer AE, de Oliveira AR, Brandao ML (2012) Glutamatergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray matter modulate the expression of conditioned freezing and fear-potentiated startle. *Neuroscience* 219:72-81.

- Remage-Healey L, Saldanha CJ, Schlinger BA (2011) Estradiol synthesis and action at the synapse: evidence for "synaptocrine" signaling. *Frontiers in endocrinology* 2:28.
- Ren-Patterson RF, Cochran LW, Holmes A, Lesch KP, Lu B, Murphy DL (2006) Gender-dependent modulation of brain monoamines and anxiety-like behaviors in mice with genetic serotonin transporter and BDNF deficiencies. *Cell Mol Neurobiol* 26:755-780.
- Rocha-Cadman X, Massie MJ, Du Hamel K (2012) Aromatase inhibitors and mood disturbances. *Palliative and Supportive Care* 10:225.
- Rodgers RJ, Cole JC (1993) Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol Behav* 54:729-736.
- Roman E, Arborelius L (2009) Male but not female Wistar rats show increased anxiety-like behaviour in response to bright light in the defensive withdrawal test. *Behavioural brain research* 202:303-307.
- Romeo RD, McCarthy JB, Wang A, Milner TA, McEwen BS (2005) Sex differences in hippocampal estradiol-induced N-methyl-D-aspartic acid binding and ultrastructural localization of estrogen receptor-alpha. *Neuroendocrinology* 81:391-399.
- Romero MT, Kepler KL, Cooper ML, Komisaruk BR, Bodnar RJ (1987) Modulation of gender-specific effects upon swim analgesia in gonadectomized rats. *Physiol Behav* 40:39-45.
- Romero RD, Chen WJ (2004) Gender-related response in open-field activity following developmental nicotine exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 78:675-681.
- Roselli CE, Ellinwood WE, Resko JA (1984) Regulation of brain aromatase activity in rats. *Endocrinology* 114:192-200.
- Roselli CE, Horton LE, Resko JA (1985) Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117:2471-2477.
- Roselli CE, Resko JA (1997) Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61:365-374.
- Saini A, Ostacoli L, Gorzegno G, Picci RL, Dogliotti L, Furlan PM, Berruti A (2009) Risk of depressive events in long-term surviving patients affected by hormone-related cancer according to time after diagnosis. *J Clin Oncol* 27:e91-92; author reply e93-94.
- Saldanha CJ, Remage-Healey L, Schlinger BA (2011) Synaptocrine signaling: steroid synthesis and action at the synapse. *Endocrine reviews* 32:532-549.
- Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A (2009) History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr Rev* 30:343-375.
- Scharfman HE, Maclusky NJ (2005) Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue? *Trends Neurosci* 28:79-85.
- Scouten CW, Groteleuschen LK, Beatty WW (1975) Androgens and the organization of sex differences in active avoidance behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88:264-270.
- Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Bate E, Lightman SL, Ingram CD, Jessop DS, Harbuz MS (2004a) Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 16:516-524.
- Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS, Lightman SL (2004b) Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J Neuroendocrinol* 16:989-998.
- Seligman ME, Rosellini RA, Kozak MJ (1975) Learned helplessness in the rat: time course, immunization, and reversibility. *J Comp Physiol Psychol* 88:542-547.
- Sell SL, Craft RM, Seitz PK, Stutz SJ, Cunningham KA, Thomas ML (2008) Estradiol-sertraline synergy in ovariectomized rats. *Psychoneuroendocrinology* 33:1051-1060.
- Setnik B, de Souza FG, d'Almeida V, Nobrega JN (2004) Increased homocysteine levels associated with sex and stress in the learned helplessness model of depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 77:155-161.
- Sfikakis A, Papadopoulou-Daifotis Z, Bikas N (2002) Inverse relationship of hippocampal serotonin to avoidance behavior, serotonergic activation by emotional stress differentiated by estrous cycle and surgical stress. *Behavioural brain research* 128:41-52.
- Sfikakis A, Papadopoulou-Daifotis Z, Sfikaki M, Messari J (1998) Monoaminergic dysregulation on diestrus-2 and estrus through high emotional reactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 60:285-291.
- Sfikakis A, Spyraiki C, Sitaras N, Varonos D (1978) Implication of the estrous cycle on conditioned avoidance behavior in the rat. *Physiol Behav* 21:441-446.
- Shors TJ (2006) Stressful experience and learning across the lifespan. *Annu Rev Psychol* 57:55-85.

- Shors TJ, Mathew J, Sisti HM, Edgecomb C, Beckoff S, Dalla C (2007) Neurogenesis and helplessness are mediated by controllability in males but not in females. *Biol Psychiatry* 62:487-495.
- Simpson J, Kelly JP (2012) An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. *Behav Brain Res* 229:289-300.
- Sinues B, Fanlo A, Mayayo E, Carcas C, Vicente J, Arenaz I, Cebollada A (2008) CYP2A6 activity in a healthy Spanish population: effect of age, sex, smoking, and oral contraceptives. *Human & experimental toxicology* 27:367-372.
- Slattery DA, Cryan JF (2012) Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 7:1009-1014.
- Slob AK, Bogers H, van Stolk MA (1981) Effects of gonadectomy and exogenous gonadal steroids on sex differences in open field behaviour of adult rats. *Behavioural brain research* 2:347-362.
- Small SA, Schobel SA, Buxton RB, Witter MP, Barnes CA (2011) A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci* 12:585-601.
- Soares CN (2008) Depression during the menopausal transition: window of vulnerability or continuum of risk? *Menopause* 15:207-209.
- Solomon MB, Furay AR, Jones K, Packard AE, Packard BA, Wulsin AC, Herman JP (2012) Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females. *Neuroscience* 203:135-143.
- Srivastava DP, Waters EM, Mermelstein PG, Kramar EA, Shors TJ, Liu F (2011) Rapid estrogen signaling in the brain: implications for the fine-tuning of neuronal circuitry. *J Neurosci* 31:16056-16063.
- Srivastava DP, Woolfrey KM, Penzes P (2013) Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. *Pharmacol Rev* 65:1318-1350.
- Stack A, Carrier N, Dietz D, Hollis F, Sorenson J, Kabbaj M (2010) Sex differences in social interaction in rats: role of the immediate-early gene *zif268*. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 35:570-580.
- Steenbergen HL, Heinsbroek RP, Van Hest A, Van de Poll NE (1990) Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav* 48:571-576.
- Stephens DN, Crombag HS, Duka T (2013) The challenge of studying parallel behaviors in humans and animal models. *Current topics in behavioral neurosciences* 13:611-645.
- Sumner BE, Grant KE, Rosie R, Hegele-Hartung C, Fritzscheier KH, Fink G (1999) Effects of tamoxifen on serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine(2A) receptor binding sites and mRNA levels in the brain of ovariectomized rats with or without acute estradiol replacement. *Brain Res Mol Brain Res* 73:119-128.
- Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (1999) Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-alpha or estrogen receptor-beta. *Endocrinology* 140:800-804.
- Sun MK, Alkon DL (2006) Differential gender-related vulnerability to depression induction and converging antidepressant responses in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 316:926-932.
- Takei H, Ohsumi S, Shimosuma K, Takehara M, Suemasu K, Ohashi Y, Hozumi Y (2012) Health-related quality of life, psychological distress, and adverse events in postmenopausal women with breast cancer who receive tamoxifen, exemestane, or anastrozole as adjuvant endocrine therapy: National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer 04 (N-SAS BC 04). *Breast cancer research and treatment* 133:227-236.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792-5801.
- Taylor SE, Klein LC, Lewis BP, Gruenewald TL, Gurung RA, Updegraff JA (2000) Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev* 107:411-429.
- Ter Horst GJ, Wichmann R, Gerrits M, Westenbroek C, Lin Y (2009) Sex differences in stress responses: focus on ovarian hormones. *Physiol Behav* 97:239-249.
- Thierry B, Steru L, Chermat R, Simon P (1984) Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behavioral and neural biology* 41:180-189.
- Thompson TL, Moss RL (1997) Modulation of mesolimbic dopaminergic activity over the rat estrous cycle. *Neurosci Lett* 229:145-148.
- Tonelli LH, Holmes A, Postolache TT (2008) Intranasal immune challenge induces sex-dependent depressive-like behavior and cytokine expression in the brain. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33:1038-1048.

- Toran-Allerand CD (1976) Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res* 106:407-412.
- Toufexis D (2007) Region- and sex-specific modulation of anxiety behaviours in the rat. *J Neuroendocrinol* 19:461-473.
- Toufexis D, Davis C, Hammond A, Davis M (2005) Sex differences in hormonal modulation of anxiety measured with light-enhanced startle: possible role for arginine vasopressin in the male. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:9010-9016.
- Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53:865-871.
- Tuscher JJ, Luine V, Frankfurt M, Frick KM (2016) Estradiol-Mediated Spine Changes in the Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex of Ovariectomized Female Mice Depend on ERK and mTOR Activation in the Dorsal Hippocampus. *J Neurosci* 36:1483-1489.
- Valentino RJ, Van Bockstaele E, Bangasser D (2013) Sex-specific cell signaling: the corticotropin-releasing factor receptor model. *Trends Pharmacol Sci* 34:437-444.
- Valle FP, Gorzalka BB (1980) Open-field sex differences prior to puberty in rats. *Bulletin of the Psychonomic Society*.
- Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R (1999) Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285:1929-1931.
- van der Schoot P (1980) Effects of dihydrotestosterone and oestradiol on sexual differentiation in male rats. *J Endocrinol* 84:397-407.
- van Haaren F, van Hest A, Heinsbroek RP (1990) Behavioral differences between male and female rats: effects of gonadal hormones on learning and memory. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 14:23-33.
- Velley L, Cardo B (1977) A long-term effect of an early stimulation of the lateral hypothalamus on the acquisition and extinction of a food reinforced operant conditioning in the rat. *Neurosci Lett* 5:221-226.
- Vendruscolo LF, Pamplona FA, Takahashi RN (2004) Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. *Brain research* 1030:277-283.
- Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wilkars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S (2012) Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *The Journal of Neuroscience* 32:8116-8126.
- Viveros MP, Llorente R, Lopez-Gallardo M, Suarez J, Bermudez-Silva F, De la Fuente M, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Segura LM (2009) Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S217-226.
- Viviani D, Haegler P, Strasser DS, Steiner MA (2012) Sex comparison on long-lasting behavioral and physiological disturbances induced by single shock experience in rats. *Physiol Behav* 107:243-251.
- Voikar V, Koks S, Vasar E, Rauvala H (2001) Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 72:271-281.
- Wald C, Wu C (2010) Biomedical research. Of mice and women: the bias in animal models. *Science* 327:1571-1572.
- Walf AA, Koonce CJ, Frye CA (2008) Estradiol or diarylpropionitrile decrease anxiety-like behavior of wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice. *Behavioral neuroscience* 122:974-981.
- Walf AA, Paris JJ, Frye CA (2009) Nociceptive and anxiety-like behavior in reproductively competent and reproductively senescent middle-aged rats. *Gender medicine* 6 Suppl 2:235-246.
- Walker DL, Davis M (1997) Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. *Biological psychiatry* 42:461-471.
- Weaver CE, Jr., Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH (1997) 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res* 761:338-341.
- Wegener G, Mathe AA, Neumann ID (2012) Selectively bred rodents as models of depression and anxiety. *Current topics in behavioral neurosciences* 12:139-187.
- West CH, Weiss JM (2005) A selective test for antidepressant treatments using rats bred for stress-induced reduction of motor activity in the swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 182:9-23.
- Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66:293-302.
- Willner P (1995) Animal models of depression: validity and applications. *Adv Biochem Psychopharmacol* 49:19-41.

- Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134:319-329.
- Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90-110.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93:358-364.
- Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jonsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen HC (2011) The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 21:655-679.
- Wong ML, Licinio J (2001) Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* 2:343-351.
- Wong ML, Licinio J (2004) From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat Rev Drug Discov* 3:136-151.
- Xing Y, He J, Hou J, Lin F, Tian J, Kurihara H (2013) Gender differences in CMS and the effects of antidepressant venlafaxine in rats. *Neurochemistry international* 63:570-575.
- Zhou L, Fester L, von Blittersdorff B, Hassu B, Nogens H, Prange-Kiel J, Jarry H, Wegscheider K, Rune GM (2010) Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice. *Endocrinology* 151:1153-1160.
- Zimmerberg B, Farley MJ (1993) Sex differences in anxiety behavior in rats: Role of gonadal hormones. *Physiol Behav* 54:1119-1124.