



Mgr Kinga Kamińska

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Interakcja wybranych leków przeciwdepresyjnych z L-DOPA w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona

Promotor: Elżbieta Lorenc-Koci

Streszczenie

Choroba Parkinsona (PD) jest jednym z najczęściej występujących schorzeń neurodegeneracyjnych w populacji ludzkiej. Rozwój PD związany jest ze stopniowym upośledzeniem wielu układów neuroprzekaźników, w tym szlaków dopaminergicznych z części zbitęj istoty czarnej (SNc) i brzuszno-pole nakrywki (VTA) oraz wstępujących szlaków noradrenergicznych z miejsca sinawego (LC) i serotoninergetycznych z jąder szwu (RN). W obrazie klinicznym, pojawienie się charakterystycznych objawów ruchowych, takich jak akineza i sztywność mięśniowa, wynika głównie z utraty neuronów dopaminergicznych w SNc, co skutkuje dramatycznym spadkiem stężenia dopaminy (DA) w prążkowie (STR) i istocie czarnej (SN). Oprócz upośledzenia ruchowego, we wszystkich stadiach tej choroby powszechnie występują liczne objawy nie-motoryczne, które bardzo wyraźnie obniżają jakość życia pacjentów z PD. Zaburzenia nie-motoryczne obejmują szereg objawów neuropsychiatrycznych (np. depresja, lęk, apatia, psychoza), dysfunkcje układu autonomicznego, problemy ze snem oraz inne dolegliwości. Przez długie lata PD była uważana za zaburzenie wyłącznie ruchowe, jednak heterogeny charakter neurodegeneracji i znacząca przewaga objawów nie-motorycznych pozwala obecnie sklasyfikować ją jako zaburzenie wieloukładowe, dlatego też strategie terapeutyczne tej choroby powinny być nakierowane zarówno na poprawę funkcji motorycznych, jak i nie-motorycznych.

Jednym z najczęściej obserwowanych symptomów nie-motorycznych, negatywnie wpływających na jakość życia pacjentów z PD jest depresja, która często pozostaje nierozpoznana, a w konsekwencji nie jest leczona. Rozpoznanie depresji towarzyszącej PD jest trudne, ponieważ jeden z jej objawów jakim jest opóźnienie psychoruchowe może wynikać z deficytów motorycznych, a dodatkowo diagnozę utrudnia wpływ leków przeciwparkinsonowskich na motorykę i nastrój. Patofizjologia depresji towarzyszącej PD jest



niejasna, niemniej jednak coraz więcej dowodów sugeruje, że jest ona wtórna do zmian neuroanatomicznych spowodowanych postępującym procesem neurodegeneracyjnym, a nie reakcją na stres psychospołeczny i niepełnosprawność.

Najbardziej skutecznym i stosowanym na szeroką skalę lekiem przeciwparkinsonowskim jest prekursor dopaminy – 3,4-dihydroksyfenylo-L-alanina (L-DOPA). Terapeutyczne działanie L-DOPA polega na poprawie zaburzeń ruchowych, głównie poprzez osłabianie akinezy i sztywności mięśniowej, ale bez większego wpływu na drżenie. Długotrwałe stosowanie L-DOPA nie osłabia jednak objawów depresji pojawiających się w tej chorobie, co więcej, samo w sobie może powodować pojawienie się objawów depresyjnych. Dlatego też, stosowanie leków przeciwdepresyjnych jest wysoce zalecane w leczeniu depresji zarówno w przedobjawowej, jak i w objawowej fazie choroby, gdy pacjenci otrzymują leki przeciwparkinsonowskie, głównie L-DOPA. Do powszechnie używanych leków w terapii depresji w PD należą klasyczne trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TCA), selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI), inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (SNRI), inhibitory monoaminoooksydazy (MAOI) oraz agoniści receptorów dopaminowych.

Wybór pomiędzy TCA i SSRI w terapii depresji w PD jest przedmiotem dyskusji, chociaż w badaniach stwierdzono podobną skuteczność obu tych grup leków przeciwdepresyjnych w łagodzeniu depresji towarzyszącej PD. Pomimo szerokiego stosowania leków przeciwdepresyjnych w leczeniu depresji związanej z PD ich rola w modulacji behawioralnych i neurochemicznych markerów indukowanych przez L-DOPA jest słabo zbadana. Aby odzwierciedlić zarówno motoryczne, jak i nie-motoryczne objawy PD w warunkach doświadczalnych, konieczne było opracowanie odpowiedniego zwierzęcego modelu tej choroby.

Dlatego pierwszym celem naszych badań było opracowanie eksperymentalnego modelu zaawansowanej PD ze współistniejącym deficytem motorycznym i zachowaniem przypominającym depresję. Drugim celem pracy było zbadanie w tym modelu interakcji dwóch leków przeciwdepresyjnych o różnym profilu farmakologicznym, amitryptyliny (AMI) i dezypraminy (DEZ), podawanych samodzielnie lub w połączeniu z L-DOPA, na parametry motoryczne (rotacje kontralateralne) i biochemiczne (stężenia monoamin) w wybranych strukturach mózgu szczura oraz na wiązania radioligandów do transporterów monoamin: dopaminy (DAT), noradrenaliny (NET), serotoniny (SERT) w tych strukturach. W celu



opracowania doświadczalnego modelu zaawansowanej PD, w którym stopień degeneracji 3 głównych systemów monoaminergicznych w strukturach motorycznych (STR, SN) i limbicznych (korze przedczołowej, fCTX; hipokampie, HIP) mózgu szczura odzwierciedla zarówno stan ich uszkodzenia obserwowany u pacjentów cierpiących na tę chorobę, jak i współwystępowanie zaburzeń motorycznych i zachowań przypominających depresję, zastosowano klasyczną neurotoksynę – 6-hydroksydopaminę (6-OHDA). Toksyna ta specyficznie uszkadza neurony dopaminergiczne i noradrenergiczne oraz ich zakończenia po bezpośrednim dostrukturalnym podaniu do mózgu. Aby uniemożliwić wnikanie tej toksyny do neuronów noradrenergicznych, konieczne jest podawanie jej w osłonie substancji blokujących NET (np. DEZ). W celu znalezienia optymalnej dawki 6-OHDA, która doprowadzi zarówno do znacznego obniżenia tkankowych stężeń dopaminy (DA), noradrenaliny (NA) i serotoniny (5-HT) w motorycznych i limbicznych strukturach mózgu szczura korespondujących z zaawansowanym stadium PD, jak i wywoła anhedonię mierzoną preferencją spożycia sacharozy, toksynę tą podawano jednostronnie do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (MFB) w trzech dawkach (8, 12, 16 $\mu\text{g}/4\mu\text{l}$) z osłoną lub bez osłony DEZ. Zaobserwowano, że najwyższa dawka 6-OHDA zmniejszała preferencję spożycia 3% roztworu sacharozy zarówno u zwierząt z osłoną, jak i bez osłony DEZ. Wszystkie zastosowane dawki 6-OHDA radykalnie obniżyły tkankowe stężenie DA w badanych strukturach mózgu po stronie uszkodzonej (ipsilateralnej). Stężenie NA było znacznie silniej obniżone w STR, HIP i fCTX po stronie uszkodzonej u zwierząt którym 6-OHDA podawano bez osłony DEZ, niż u zwierząt u których tę toksynę podawano w osłonie DEZ. W SN zwierząt, którym 6-OHDA podawano bez osłony DEZ stwierdzono tylko niewielkie spadki tkankowego stężenia NA po stronie ipsilateralnej, natomiast u szczurów u których podanie 6-OHDA do MFB zostało poprzedzone podaniem DEZ, spadki te były nieznacznie większe i występowały po obu stronach tej struktury. Wyższe dawki 6-OHDA obniżały stężenie 5-HT po stronie uszkodzonej w STR, HIP i fCTX, ale nie w SN, tylko u zwierząt bez osłony DEZ. Podsumowując wyniki pierwszej części badań dotyczące opracowanego modelu, należy stwierdzić, że podanie najwyższej dawki 6-OHDA bez osłony DEZ wywołało zmiany neurochemiczne i behawioralne przypominające zaawansowaną PD ze współistniejącą depresją, dlatego też model ten wykorzystano do dalszych badań interakcji leków.

W drugiej części rozprawy, w której badano wpływ AMI lub DEZ, podawanych chronicznie, oddzielnie lub łącznie z L-DOPA na zachowanie rotacyjne, wykazano,



że wielokrotne podania samych leków przeciwdepresyjnych nie indukowało rotacji kontralateralnych, natomiast wielokrotne podania samej L-DOPA lub łączne podania AMI z L-DOPA lub DEZ z L-DOPA znacząco zwiększały liczbę tych rotacji. W przypadku łącznych podań AMI i L-DOPA liczba rotacji kontralateralnych była istotnie wyższa, niż po podaniu samej L-DOPA. Natomiast po łącznych podaniach DEZ i L-DOPA, chociaż obserwowano wzrostowy trend w liczbie rotacji kontralateralnych w porównaniu do efektu L-DOPA, to różnica między badanymi grupami nie osiągnęła poziomu statystycznej istotności. Skojarzone podanie AMI z L-DOPA znacząco podniosło tkankowe stężenie DA w uszkodzonym STR i SN, jak również po obu stronach HIP i fCTX, w porównaniu z efektem działania samej L-DOPA. Natomiast łączne chroniczne podanie DEZ z L-DOPA w równym stopniu jak sama L-DOPA podnosiło stężenie DA w ipsilateralnym STR i SN oraz po obu stronach HIP. Jedynie w ipsilateralnej fCTX poziom DA po łącznych podaniach DEZ z L-DOPA, był wyższy niż po podaniach samej L-DOPA. Łączne podanie AMI z L-DOPA znacząco podnosiło stężenie NA w ipsilateralnej SN, natomiast łączne podanie DEZ z L-DOPA znacząco zwiększało stężenie NA po obu stronach STR. Modulowanie stężenia 5-HT przez badane leki jest szczególnie skomplikowane we wszystkich badanych strukturach po stronie ipsilateralnej, gdyż w skutek uszkodzenia projekcji dopaminergicznych unerwiających te struktury, L-DOPA jest przekształcana do DA w zakończeniach serotonergicznych, które w STR, HIP i fCTX uległy uszkodzeniu w około 50% po podaniu 6-OHDA w dawce 16 µg/ 4µl do MFB. W naszym modelu jedynie projekcje serotonergiczne unerwiające SN nie zostały uszkodzone w wyniku podania 6-OHDA do MFB. Po łącznym podaniu AMI + L-DOPA nie obserwowano istotnych zmian w stężeniach 5-HT po obu stronach badanych struktur motorycznych. Z kolei po łącznym podaniu DEZ + L-DOPA nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniu 5-HT w ipsilateralnym STR, natomiast po stronie kontralateralnej STR oraz w SN po obu stronach obserwowano wzrost stężenia tego neuroprzekaźnika. W badanych strukturach limbicznych, czyli HIP i fCTX, L-DOPA obniżała stężenie 5-HT po stronie ipsilateralnej, a efekt ten był odwracany w obecności AMI. W HIP negatywny efekt L-DOPA na stężenie 5-HT był również odwracany przez DEZ.

Badania autoradiograficzne pokazały, że uszkodzenie projekcji dopaminergicznych i noradrenergicznych unerwiających STR wywołane jednostronnym podaniem 6-OHDA do MFB drastycznie obniżyło poziom wiązania znakowanych ligandów do DAT i NET, ale nie miało wpływu na poziom wiązania SERT w ipsilateralnym STR. W kontralateralnym STR



widoczny był kompensacyjny wzrost wiązania DAT i SERT, natomiast poziom wiązania NET nie różnił się w sposób statystycznie istotny od poziomu tego wiązania w grupie kontrolnej. Z kolei w ipsilateralnej SN, w skutek degeneracji neuronów dopaminowych obserwowano spadek wiązania DAT, natomiast poziom wiązania NET i SERT znacząco wzrastał po obu stronach tej struktury. Kompensacyjny wzrost wiązania SERT obserwowano także w HIP i fCTX po stronie kontralateralnej. W strukturach limbicznych poziom wiązania NET analizowano tylko w fCTX. Przeprowadzona analiza wykazała, że w następstwie jednostronnego uszkodzenia projekcji noradrenergicznych unerwiającej fCTX po stronie kontralateralnej doszło do kompensacyjnego wzrostu wiązania NET. Chroniczne podania samej AMI lub w połączeniu z L-DOPA, istotnie obniżały poziom wiązania SERT we wszystkich badanych strukturach zarówno po stronie ipsilateralnej jak i kontralateralnej, w przeciwieństwie do L-DOPA, która nie miała wpływu na poziom tego wiązania. Wychwyt zwrotny DA pochodzącej z L-DOPA w pozbawionym unerwienia dopaminergicznego STR i SN odbywa się głównie za pośrednictwem SERT i w niewielkim stopniu przez NET. Stąd też, obniżenie poziomu wiązania SERT w obu tych strukturach po łącznym podaniu AMI i L-DOPA może oznaczać znacznie większy wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia DA, niż po podaniu samej L-DOPA. Jedynie w odnerwionej dopaminergicznie SN, obniżenie wiązania NET może być również czynnikiem zwiększającym poziom zewnątrzkomórkowej DA. W kontekście behawioralnym powyżej przedstawione dane oznaczają większą poprawę funkcji motorycznych po łącznym podaniu AMI i L-DOPA, niż po podaniu samej L-DOPA.

Podsumowując, wyniki niniejszych badań wykazały, że jednostronna pojedyncza infuzja 6-OHDA w dawce 16 µg/4 µl do MFB szczura spowodowała behawioralne, biochemiczne i funkcjonalne zmiany przypominające zaawansowane stadium PD z współistniejącą depresją. Wyniki badań jednoznacznie wskazują, że znacznie silniejsze działanie łącznego podania AMI z L-DOPA, niż samej L-DOPA na poprawę funkcji motorycznych jest efektem złożonym i wynika zarówno z obniżenia poziomu wiązania SERT i NET, jak i z właściwości AMI jako agonisty postsynaptycznych receptorów DA D₁. Nieznacznie słabsze działanie łącznego podania DEZ i L-DOPA na poprawę funkcji motorycznych wskazuje, że hamowanie wyłącznie aktywności NET w STR i SN nie ma istotnego wpływu na zewnątrzkomórkowe stężenie DA pochodzącej z L-DOPA w tych strukturach. Analiza porównawcza modulującego wpływu łącznych podań AMI i L-DOPA lub DEZ i L-DOPA na tkankowe stężenia monoamin w strukturach limbicznych po stronie



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

ipsilateralnej wydaje się wskazywać, że w późnym stadium choroby skuteczność skojarzonej terapii w poprawie zdrowia psychicznego pacjentów może być raczej niewielka. Z drugiej strony, ta sama analiza przeprowadzona w tych strukturach po stronie kontralateralnej, sugeruje że w przypadku mniej zaawansowanego procesu zwyrodnieniowego, takie skojarzone leczenie może poprawić równowagę między badanymi monoaminami, co może mieć pozytywny wpływ zarówno na stan psychiczny, jak i poprawę funkcji motorycznych pacjentów z PD.

Summary

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases in the human population. Its development is associated with a gradual impairment of many neurotransmitter systems, including dopaminergic pathways from the substantia nigra pars compacta (SNc) and ventral tegmental area (VTA), ascending noradrenergic pathways from the locus coeruleus (LC) and serotonergic pathways from the raphe nuclei (RN). In the clinical picture, the appearance of characteristic motor symptoms, such as akinesia and muscle rigidity, is mainly due to the loss of dopaminergic neurons in the SNc, which results in a dramatic decrease in dopamine (DA) concentration in the striatum (STR) and substantia nigra (SN). However, in addition to motor impairment, numerous non-motor symptoms are common at all stages of the disease, which distinctly reduce the quality of life of patients with PD. Non-motor disorders include a range of neuropsychiatric symptoms (e.g., depression, anxiety, apathy, psychosis), autonomic dysfunction, sleep problems, and other ailments. Although PD has long been considered a purely motor disorder, the heterogeneous nature of neurodegeneration and the significant predominance of non-motor symptoms now allow it to be classified as a multi-system disorder. Therefore, therapeutic strategies should be aimed at improving both motor and non-motor functions.

One of the most frequently observed non-motor symptoms, negatively affecting the quality of life of patients with PD, namely depression, often remains undiagnosed and therefore, is left untreated. The diagnosis of depression accompanying PD is difficult because one of its symptoms, psychomotor retardation, may result from motor deficits, and in addition the diagnosis is hindered by the effect of antiparkinsonian drugs on motor skills and mood. The pathophysiology of depression associated with PD is unclear, but a growing body of evidence suggests that it is secondary to neuroanatomical changes caused by progressive neurodegenerative processes rather than a response to psychosocial stress and disability.

The most effective and widely used antiparkinsonian drug is the dopamine precursor - 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA). The therapeutic effect of L-DOPA consists in improving the movement disorders, mainly by reducing akinesia and muscle rigidity, but without much effect on tremor. However, long-term use of L-DOPA does not reduce the symptoms of depression occurring in this disease; moreover, it may itself cause the appearance of depressive symptoms. Therefore, an application of antidepressants is highly recommended for the treatment of depression both in the pre-symptomatic and symptomatic phases of the

disease, when patients are given antiparkinsonian drugs, mainly L-DOPA. Commonly used drugs in the treatment of depression in PD include classic tricyclic antidepressants (TCAs), selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs), monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) and dopamine receptor agonists.

The choice between TCAs and SSRIs in the treatment of depression in PD is a matter of debate, although studies have shown similar efficacy of both groups of antidepressants in relieving depression associated with PD. However, despite the widespread use of antidepressants in the treatment of depression associated with PD, their role in the modulation of behavioral and neurochemical markers induced by L-DOPA is poorly understood. In order to reflect both the motor and non-motor symptoms of PD in experimental conditions, it was necessary to develop an appropriate animal model of the disease.

Therefore, the first goal of our research was to develop an experimental model of advanced PD with coexisting motor deficits and depressive-like behavior. The second aim of this study was to use this model to investigate the interaction of two antidepressants with different pharmacological profiles: amitriptyline (AMI) and desipramine (DES), administered alone or in combination with L-DOPA, on motor behavior (contralateral rotations) and biochemical markers (monoamine concentrations) in the selected structures of the rat brain, as well as on the binding of radioligands to monoamine transporters, i.e., to the dopamine (DAT), norepinephrine (NET) and serotonin (SERT) transporters in these structures. The model of advanced PD was developed by using the classic neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA), in order to show that the degree of degeneration of the 3 main monoaminergic systems in the motor (STR, SN) and limbic structures (prefrontal cortex, fCTX; hippocampus, HIP) of the rat brain reflects both the state of their damage observed in patients suffering from this disease as well as the coexistence of motor disorders and depressive-like behaviors. This toxin specifically damages dopaminergic and noradrenergic neurons and their terminals when administered directly intrastructurally to the brain. In order to prevent the entry of this toxin into noradrenergic neurons, it is necessary to administer it simultaneously shielding the neurons with NET-blocking substances (e.g., DES). To find the optimal dose of 6-OHDA, which will lead to a significant reduction in the tissue concentrations of dopamine (DA), noradrenaline (NA) and serotonin (5-HT) in the motor and limbic structures of the rat brain and will induce anhedonia as measured by the preference for sucrose consumption, this toxin was administered unilaterally into the medial forebrain bundle (MFB) in three doses (8,



12, 16 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$) with or without a DES shield. The results of these studies showed that only the highest dose of 6-OHDA reduced the preference for consumption of a 3% sucrose solution in both DES-shielded and non-shielded animals. All applied doses of 6-OHDA radically reduced tissue concentrations of DA in the examined brain structures on the lesioned (ipsilateral) side. NA concentration was significantly lower on the ipsilateral side of the STR, HIP, and fCTX in animals without the DES shield than in animals in which this toxin was administered with the DES shield. In the SN of animals in which 6-OHDA was administered without the DES shield, only small decreases in the tissue concentration of NA were observed on the ipsilateral side, while in rats in which the administration of DES preceded the administration of 6-OHDA to the MFB, these decreases were slightly greater and occurred on both sides of this structure. Higher doses of 6-OHDA reduced 5-HT concentration on the lesioned side in the STR, HIP, and fCTX, but not in the SN, only in animals without the DES shield. Summing up the results of the first part of the research referring to the developed model, it should be stated that the administration of the highest dose of 6-OHDA without the DES shield induced neurochemical and behavioral changes reminiscent of advanced PD with comorbid depression; therefore, this model was used for further studies on drug interactions.

In the second part of the dissertation, which describes an examination of the effect of AMI or DES, administered chronically, alone or in combination with L-DOPA, on rotational behavior, it was shown that repeated administrations of antidepressants alone did not induce contralateral rotations, while repeated administrations of L-DOPA alone or combined administrations of AMI with L-DOPA or DES with L-DOPA significantly increased the number of these rotations. In the case of combined administration of AMI and L-DOPA, the number of contralateral rotations was significantly higher than after the administration of L-DOPA alone. However, after the combined administration of DES and L-DOPA, although an upward trend in the number of contralateral rotations was observed when compared to the effect of L-DOPA alone, the difference between the studied groups did not reach the level of statistical significance. The combined administration of AMI with L-DOPA significantly increased the tissue concentration of DA in the ipsilateral STR and SN, as well as on both sides of HIP and fCTX, compared to the effect of L-DOPA alone. However, the combined chronic administration of DES with L-DOPA increased the concentration of DA in the ipsilateral STR and SN and on both sides of the HIP to a similar extent as L-DOPA alone. Only in the ipsilateral



fCTX the level of DA after the combined administration of DES with L-DOPA was significantly higher than after administration of L-DOPA alone. The combined administration of AMI with L-DOPA significantly increased the concentration of NA in the ipsilateral SN, while the combined administration of DES with L-DOPA significantly increased the concentration of NA on both sides of the STR. As for the modulation of 5-HT concentration by the tested drugs, it was particularly complicated in all the studied structures on the ipsilateral side, because as a result of damage to the dopaminergic projections innervating these structures, L-DOPA is converted to DA in the serotonergic terminals, which in the STR, HIP and fCTX were also damaged by about 50% after administration of 16 µg/4 µl 6-OHDA into the MFB. In our model, only the serotonergic projections innervating the SN were not damaged by 6-OHDA administered into the MFB. After the combined administration of AMI + L-DOPA, no significant changes in 5-HT concentrations were observed on either side of motor structures. On the other hand, after the combined administration of DES + L-DOPA, no significant changes in the concentration of 5-HT were found in the ipsilateral STR, but a significant increase in the concentration of this neurotransmitter was observed in the SN on both sides and in the contralateral STR. In the examined limbic structures, i.e., the HIP and fCTX, L-DOPA decreased the concentration of 5-HT on the ipsilateral side, and this effect was reversed in the presence of AMI. In the HIP, the negative effect of L-DOPA on 5-HT concentration was also reversed by DES.

Autoradiographic studies showed that lesions of dopaminergic and noradrenergic projections innervating the STR caused by unilateral administration of 6-OHDA into the MFB, drastically reduced the levels of radioligand binding to DAT and NET, but had no effect on the level of SERT binding in the ipsilateral STR. In the contralateral STR, a compensatory increase in DAT and SERT binding was visible, while the level of NET binding did not differ significantly from the level of this binding in the control group. On the other hand, in the ipsilateral SN, due to the degeneration of dopamine neurons, a decrease in DAT binding was observed, while the level of NET and SERT binding significantly increased on both sides of this structure. A compensatory increase in SERT binding was also observed in the HIP and fCTX on the contralateral side. In limbic structures, the level of NET binding was only analyzed in the fCTX. Autographic analysis showed that following a unilateral lesion of the noradrenergic projection innervating fCTX, a compensatory increase in NET binding occurred on the contralateral side. Chronic administration of AMI alone



or in combination with L-DOPA, significantly decreased the level of SERT binding in all examined structures, both on the ipsilateral and contralateral sides, in contrast to L-DOPA, which had no significant effect on the level of this binding. The reuptake of L-DOPA-derived DA in the DA-denervated STR and SN is mainly mediated by SERT and to a minor extent by NET. Therefore, a decrease in the level of SERT binding in these structures after the combined administration of AMI and L-DOPA may implicate a much greater increase in the extracellular concentration of DA than after the administration of L-DOPA alone. Only in the DA-denervated SN, the reduction of NET binding may also be a factor increase the level of extracellular DA. In the behavioral context, the data presented above indicate a greater improvement in motor function after the combined administration of AMI and L-DOPA than after the administration of L-DOPA alone.

In summary, the results of this study showed that a unilateral single infusion of 6-OHDA at a dose of 16 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$ into the rat MFB resulted in behavioral, biochemical, and functional changes resembling advanced-stage PD with concomitant depression. The results of these studies unequivocally indicate that the much stronger pro-motor effect of the combined administration of AMI with L-DOPA than L-DOPA alone is a complex effect and results both from the reduction in the level of SERT and NET binding as well as from the properties of AMI, i.e., its agonistic activity towards the postsynaptic DA D_1 receptors. The slightly weaker pro-motor effect of the combined administration of DES and L-DOPA indicates that inhibition of only NET activity in the STR and SN has no significant effect on the extracellular concentration of L-DOPA-derived DA in these structures. A comparative analysis of the modulating effects of combined administration of AMI and L-DOPA or DES and L-DOPA on tissue monoamine concentrations in the ipsilateral limbic structures seems to indicate that in the late stage of the disease, the effectiveness of combined therapy in improving the mental health of patients may be rather low. On the other hand, the same analysis carried out in these structures on the contralateral side suggests that in the case of less advanced degenerative processes, such combined treatment may improve the balance between the studied monoamines, which may have a positive effect on both the mental state and the improvement of the motor functions of patients with PD.