

Tartu Ülikool
sotsiaalteaduste valdkond
psühholoogia instituut

Helen Kruusi

**ROTTIDE UUDISTAMISAKTIIVSUSE MÕJUTAMINE NEUROTROFIINI GDNF
ABIL - MUUTUSED 5-HT RAKUVÄLISES TASEMES.**

Uurimistöö

Juhendajad: Karita Laagus, PhD
Margus Kanarik, PhD
prof. Jaanus Harro, MD, PhD

Läbiv pealkiri: neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

Tartu 2020

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

Rottide uudistamisaktiivsuse mõjutamine neurotrofiini GDNF abil - muutused 5-HT
rakuvälises tasemes

Kokkuvõte

Serotoniini taset on seostatud erinevate meeleoluhäirete, ka ärevuse ja depressiooni tekkega. Neurotrofiin GDNF on andnud tulemusi madala uudistamisaktiivsusega loomade uudistamiskäitumise muutmisel. Käesolev töö uurib GDNF geenivektori mõju baas- ja stimuleeritud 5-HT tasemetele erineva uudistamisaktiivsusega rottide näitel. Rottide (n=21) ekstratsellulaarsed 5-HT tasemed eraldati mikrodialüüsi proovidest kõrgrõhkvedelikkromatograafia (HPLC) abil. Tulemustest selgus, et amfetamiin ei mõjutanud 5-HT tasemeid oluliselt, kuid KCl mõjutas. HE-rottidel olid üldiselt kõrgemad ekstratsellulaarsed 5-HT tasemed, mis võisid tuleneda peamiselt HE/GDNF loomadest. Oluliseks osutus korduvmõõtmiste, geenivektori ja uudistamisaktiivsuse interaktsioon KCl stimuleerimisel. Kokkuvõttes selged tulemused puuduvad, kuid on mõned esialgsed tulemused, mida edasi uurida.

Märksõnad: neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivisuus

Affecting rat exploratory activity by neurotrophin GDNF – changes in extracellular 5-HT levels

Abstract

Serotonin levels are associated with different mood disorders, including anxiety and depression. Neurotrophin GDNF has shown promising results with changing exploratory activity levels of low exploratory activity animals. This paper examines the impact of GDNF on base and stimulated levels of 5-HT on different exploratory activity rats. The extracellular 5-HT levels of the rats (n = 21) were separated from microdialysis samples by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed effect on 5-HT levels with KCl but not with amphetamine stimulation. High activity (HE) rats had overall higher 5-HT levels, which might have been caused by HE/GDNF rats. There was a significant interaction between repeated measures, gene vector and exploratory activity. In conclusion there are no clear results, but some initial results to explore further.

Keywords: neurotrophin GDNF, serotonin and exploratory activity

1. Sissejuhatus

1.1. HE- ja LE rotid

Käitumine uudes keskkonnas on mõjutatud vastuoluliste motivaatorite hirmu ja uudishimu poolt (Harro, 1993). Et uurida uudes keskkonnas erinevaid käitumuslikke tegureid, on üha enam kasutama hakatud uudistamisaktiivsuse põhjal kahte gruppi jaotatud rotte: HE- (kõrge aktiivsusega) ja LE-rotid (madala aktiivsusega). Rotid jaotatakse kahte gruppi uudiskasti testi põhjal. Uudiskast (*exploration box*) on metallist kast, mis koosneb suurest avatud alast ning väiksest ühest küljest avatud kinnisemast kambrist. Avatud ala on jaotatud kaheksaks võrdse suurusega ruuduks ning nendele on paigutatud 4 objekti: kolm võõrast ning üks tuttav (Mällo et al, 2007). Testis mõõdetakse avatud alale nelja käpaga astumise latentsust, avatud alale sisenemiste, joone ületamiste, tagajalgadele tõusmise ning kolme võõra objekti uudistamiste arvu, lisaks ka avatud alal veedetud aega (Mällo et al, 2007).

Uudsetele stiimulitele reageerimise individuaalsed erinevused on seotud mitmete neurokeemiliste teguritega, näiteks suurema esilekutsutud dopamiini vabanemisega *nucleus accumbens* ja madalama serotoniini kontsentratsiooniga mediaalses prefrontaalses ajukoos kõrge uudistamisaktiivsusega rottidel (Altoa et al, 2005). On ka leitud, et kõrge uudistamisaktiivsusega rottidel on kõrgemad ekstratsellulaarsed dopamiinitasemed juttkehas nii baastasemel kui ka amfetamiini manustamisel (Mällo et al, 2007). Erinevusi on leitud 5-HT-ergilises süsteemis frontaalses ajukoos ja hipokampuses HE- ja LE-rottide vahel. Mõlemad piirkonnad mängivad teadaolevalt suurt rolli inimeste afektiivsetes seisundites ja on meeleoluhäirete ravimite sihtmärkideks. Baastasemel oli 5-HT vabanemine prefrontaalses ajukoos ja hipokampuses sarnane LE- ja HE-rottidel. Peale tsitalopraami infusiooni oli ekstratsellulaarse serotoniini tase LE-rottidel suurem prefrontaalses ajukoos ja väiksem hipokampuses. Tundub, et suurenenud serotoniini tagasihaare prefrontaalse koore alades võib areneda just kõrge ärevustasemega katseloomades, et vähendada aversiivsete stiimulite käitumuslikke tagajärgi. (Mällo et al, 2008).

1.2. Serotoniin

Serotoniin ehk 5-hüdroksütrüptamiin ehk 5-HT on monoamiinne neurotransmitter. Serotoniin interakteerub vähemalt 14 erineva retseptori alatüübiga erinevates ajuosades ning osaleb

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

seeläbi mitmes füsioloogilises ja psühholoogilises protsessis, kaasa arvatud isu, emotsioonide, tsirkadiaansete rütmide ja kognitsiooni reguleerimisel (Žmudzka, Sałaciak, Sapa, Pytka, 2018).

Fülogeneetiliselt on serotonergiline süsteem üks vanemaid transmitterite süsteeme ajus. Algselt võeti serotonergiline süsteem uurimise alla useoses akuutse depressiooni sündroomiga (Mann, 1999). 5-HT süsteemi võib jaotada kaheks alasüsteemiks: rostraalne ehk peapoolne, kus rakukehad asetsevad keskajus ja rostraalses ponsis ning kaudaalne, kus rakukehad asetsevad piklikajus (Törk, 1990). 5-HT süsteem koosneb morfoloogiliselt mitmekülgetest neuronitest, mille rakukehad asetsevad ajutüve *raphetuumadel* (raphe nuclei) ja osadel retikulaarformatsiooni aladel ning kesknärvisüsteemis (Törk, 1990). *Raphetuumadeks* nimetatakse keskmise suurusega tuumade klastrit ajutüves, millel on 5HT1 retseptorid. Rakukehades on serotoniini sünteesiv ensüüm trüptofaan hüdroksülaas (TPH), mida on palju seostatud ka erinevate psüühiliste häirete, eriti depressiooni ja suitsidaalse käitumisega (Zill jt, 2004). On ka leitud, et muutused TPH2 mRNA ekspressioonis võivad esindada potentsiaalseid mehhanisme, läbi mille negatiivsed varajase ea kogemused ja stressirikad kogemused täiskasvanueas võivad üksteist mõjutada ning tekitada suuremat haavatavust stressiga seotud psüühilistele haigustele (Gardner jt, 2009).

Serotoniini olulise rolli tõttu emotsioonide ja teiste psühholoogiliste ning füsioloogiliste protsesside reguleerimisel on uuritud palju serotoniini seost ärevushäirete ja depressiooniga. Serotonergilised, noradrenergilised ja mõningal määral ka dopaminergilised süsteemid reguleerivad ja moduleerivad samu käitumuslikke dimensioone, mis on seotud nii depressiooni kui ärevusega (Morilak ja Frazer, 2004). On leitud, et eesajukoore ja hipokampuse serotonergiline süsteem mängib olulist rolli inimeste afektiivse seisundi reguleerimisel ning on oluliseks sihtmärgiks meeleoluhäirete ravis. (Mällo jt, 2008) Enamus serotoniini retseptorite alatüüpe osalevad depressiivsuse ja ärevusega seotud protsessides (Žmudzka, Sałaciak, Sapa, Pytka, 2018) Hippokampuse serotonergiline süsteem vahendab ka anksiogeenset vastust. Selle tõttu on serotonergiline süsteem oluline sihtmärk depressiooni ja ärevuse ravis (Mällo jt, 2008).

1.3. GDNF

GDNF ehk gliiarakust saadud neurotroofiline faktor on väike valk, mis kuulub transformeeriva kasvufaktor- β superperekonda. GDNF saadi algselt roti glioomi gliia rakuliini lahuse

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

puhastamisel kui embrüosse keskaju dopamiini neuronite troofiline faktor (Airaksinen ja Saarma, 2002).

Kuna GDNF kaitseb keskaju dopamiinergilisi neuroneid hävimise eest Parkinsoni tõve loomudelites, on tekkinud lootus, et GDNF võib olla abiks erinevate neurodegeneratiivsete haiguste ravis. (Ibáñez & Andressoo, 2017). Seni on aga teada, et GDNF on vajalik mitmekülgsete neuronaalsete populatsioonide ellujäämisel ja diferentseerumisel närvisüsteemi arengul ning et see kontrollib dendriidide struktuuri ja hilisemas eas loodud graanulrakkude tihedust. GDNF läbi GFR α 1 retseptori on vajalik nende integreerimiseks eelnevalt eksisteerivatesse ringettesse. (Bonafina jt, 2019).

GDNF-i kasutamist on katsetatud antidepressiivse efekti saavutamiseks depressiivsele käitumisele kalduvatel hiirtel. Näiteks vähendas GDNF tsentraalne administratsioon märkimisväärselt depressiivsele käitumisele kalduvate hiirte kataleptilist liikumatust ning tekitas anksiolüütilise efekti tõstetud plusspuuri katses ja hele-tume kasti testis. GDNF-i manustamine muutis depressiivsusele kalduvate hiirte serotonergilise süsteemi juhtivate geenide avaldumist märkimisväärselt. Näiteks suurenes depressioonile tundlike rottidel TPH-2 ja 5-HT1A retseptorite geeniekspressioon keskajus ning 5-HT2A retseptori avaldumine hippokampuses ning vähenes 5-HT1A ja 5-HT2A retseptorite geeniekspressioon hippokampuses. TPH-2, 5-HT1A ega 5-HT2A retseptorite mRNA tasemed aga mitte-depressiivsetel hiirtel ei muutunud. (Naumenko jt, 2013). Leitud on ka, et kroonilise ettearvamatu stressiga kokku puutunud rotid käitusid depressioonile omaselt ning oluliselt oli vähenenud GDNF-i avaldumine hippokampuses (Liu jt, 2012). Antidepressantide krooniline ravi aitas taastada käitumuslikud puudujäägid ja suurendada GDNF tasemeid. Ehk GDNF võib olla potentsiaalne sihtmärk antidepressantide väljatöötamisel (Hiasaoka jt, 2008; Liu jt, 2012).

Kuigi GDNF-i mõju on palju uuritud seoses dopamiinergilise süsteemiga, on saadud tulemusi ka serotonergilise süsteemi ja GDNF-i interaktsiooni uurimisel. GDNF seondub aju serotonergilise süsteemiga läbi autoregulatsiooni tagasiside mehhanismide. GDNF stimuleerib 5-HT neuronite kasvu ja mõjutab serotonergilise süsteemi oluliste geenide, ka TPH-2-ga seotud avaldumist. Serotoniin aga vastupidiselt mõjutab geenide avaldumist, mis on seotud GDNF-i kontrollimisega. (Popova, Ilchibaeva ja Naumenko, 2017). Lisaks on leitud, et GDNF võib mängida olulist rolli sünnitusjärgselt dopamiini sünteesi reguleerimisel, mis omakorda mõjutab serotoniini sünteesi (Beck jt, 1996). Uuritud on ka GDNF-i kaitsvaid omadusi ning on leitud,

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

et kui dopamiini striataalsete tasemete vähenemise eest metaamfetamiini manustamisel kaitseb GDNF üsna hästi, siis 5-HT tasemed on ainult minimaalselt kaitstud (Cass, 1996).

Kokkuvõttes võib öelda, et uudistamiskäitumine on seotud depressiooni ja ärevuse mudeliga ning GDNF on andnud tulemusi väheuudistavate loomade uudistamiskäitumise aktiivsemaks muutmises (Naumenko jt, 2013). Kuna serotonergilist süsteemi peetakse oluliseks sihtmärgiks depressiooni ja ärevuse ravis (Mällo jt, 2008) ning GDNF on näidanud potentsiaali antidepressantide väljatöötamisel (Hiasaoka jt, 2008; Liu jt, 2012), on oluline põhjalikult uurida GDNF-i mõju erineva uudistamisaktiivsusega rottide serotonergilisele süsteemile.

1.4. Eesmärk ja uurimisküsimused

Töö eesmärk on mõõta kõrge ja madala uudistamiskäitumisega rottide ajus rakkudevahelises ruumis olevat serotoniini hulka ning neurotroof GDNF avaldumisel stimuleeritud ja stimuleerimata 5-HT tasemeid.

Uurimisküsimused:

1. Millised erinevused on HE- ja LE-rottide baas- ja KCl-i ning amfetamiiniga stimuleeritud tasemetel?
2. Milline mõju on neurotrofiinil GDNF HE- ja LE-rottide 5-HT tasemele (nii baas- kui stimuleeritud tasemel).

Töö autori ülesandeks oli valitud teemast hea ülevaate saamine läbi kirjanduse läbitöötamise, selle alusel uurimisküsimuste püstitamine, laboris eelnevalt kogutud mikrodialüüsi proovidest serotoniini eraldamine ja mõõtmine, saadud andmete analüüsimine ning nende tõlgendamine.

2. Meetod

2.1. Katseloomad

Katsete läbiviimisel kasutatakse Wistar liini rotte, kelle puhul on HE- ja LE-rottide erinevus oluliselt märgatavam kui Sprague–Dawley rottidel (Mällo et al, 2007). Katsete tulemusena koguti 22 roti proovid, kuid arvutused tehti 21 roti proovide põhjal, sest looma nr 13 serotoniini tasemed olid umbes 100x teistest kõrgemad, ehk võib oletada, et mikrodialüüsi protsessis oli läinud midagi valesti. 21-st rotist kuulusid 12 (8 LE-, 4 HE-rotti) GDNF vektoriga gruppi ehk katsegruppi ja 9 (6 LE-, 3 HE- rotti) GFP vektoriga gruppi ehk kontrollgruppi. Lisaks ei võeta arvesse ühte GFP/LE katselooma amfetamiini süstimise tulemuste arvutamisel, vaid ainult KCl tulemuste arvutamisel, sest proovid 16-18 olid puudulikud. Ühe GFP/HE looma 13. proovi tulemust ega ühe GFP/LE looma 15. proovi tulemust ei võeta arvutustel arvesse, sest nende proovide tulemused olid teistest umbes 10x kõrgemad ning seega ka olulised erandid (*outlier* testis $P < 0.01$). Eeldatavasti oli tegemist veaga kas mikrodialüüsi või HPLC protsessis.

2.2. Katseprotseduur

Kõik rotid jaotatakse gruppidesse uudiskasti testi abil. Uudiskasti test eraldab püsivalt madalama uudistamisaktiivsusega rotid (LE-rotid) kõrgema uudistamisaktiivsusega rottidest (HE-rotid). Uudiskasti testi kirjelduse leiab sissejuhatast.

Esmalt viiakse GDNF-i geen viirus-vektoriga (AAV2) ajju ning siis lastakse 2 nädalat geenil avalduda. Peale seda viiakse läbi mikrodialüüs. Mikrodialüüs on minimaalselt invasiivne proovide saamise tehnika rakuvälise vedeliku analüüsimiseks. Mikrodialüüsi sond opereeritakse antud katses rottide dorsaalsesse striatumisse ehk juttkehasse. Sond kinnitatakse kolju külge roostevabast terasest kruvide ning hambatsemendiga. Rottidele antakse umbes 24 tundi, et operatsioonist taastuda ning seejärel läbivad nad mikrodialüüsi protseduuri, kus proove kogutakse 15-minutiliste vahedega. Kuuenda ja seitsmenda proovi ajal manustati katseloomadele KCl-I läbi sondi 50 mM ning 14.-15. proovi ajal amfetamiini kõhuõõnesiseses süstiga 0,5mg/kg. Kokku võeti 22 proovi.

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

2.3. Mõõtmised

Serotoniini kogus proovides määratakse ära kõrgrõhvedelikkromatograafia (HPLC) abil kasutades elektrokeemilist detekteerimist. HPLC on kromatograafiline meetod, mis lahutab proovis leiduvad molekulid ning võimaldab neid analüüsida nii kvantitatiivselt kui ka kvalitatiivselt. Kromatograafia eraldab molekulid teatud füüsikaliste omaduste põhjal: lahustuvus vees, lahustuvus orgaanilistes ainetes, laeng ja suurus (Bird, 1989).

2.4. Statistiline analüüs

Andmeanalüüsiks kasutan statistikaprogrammi JASP. Analüüsid viiakse ajaliste ja mahuliste piirangute tõttu läbi korduvmõõtmise ANOVA-ga, kus sfäärilisuse puudumise tõttu on kasutatud Greenhouse-Geisseri korrigeerimise ja post hoc testidel Holmi korrigeerimise.

Saadud andmete põhjal arvutatakse serotoniini baastasemed 21 roti 3.-5. proovi põhjal (kokku 63 proovi). KCl-iga stimuleeritud tasemed arvutatakse 6. – 13. proovi põhjal (kokku 167 proovi) ning amfetamiiniga stimuleeritud tasemed arvutatakse 14. – 22. proovi põhjal (kokku 181 proovi) 1. – 2. proovi arvutustel ei kasutata, sest tegemist on kalibreerimisperioodiga. Rottide jagunemist gruppidesse kirjeldatud lõigus “2.1. Katseloomad”

2.5. Eetika

Eetikakomisjoni luba on antud seda uurimistööd hõlmavale suuremale uuringule.

3. Tulemused

3.1. 5-HT ekstratsellulaarsed baas- ja stimuleeritud tasemed agregeeritud andmetel gruppide lõikes.

Korduvmõõtmiste ANOVA tulemusel (korduvmõõtmised(proovid 3-22)*HELE) on leitav statistiline olulisus absoluutväärtuste proovide lõikes, $F(4, 64) = 2,868$, $p = 0,030$, $\omega^2 = 0,032$. Post hoc statistiliselt olulisi tulemusi ei avaldanud. HELE ja korduvmõõtmiste interaktsioon kõikide proovide lõikes statistiliselt oluliseks ei ostunud ning puudus ka gruppidevaheline olulisus. Küll aga olid HE-loomade baastasemed LE-loomade baastasemetest märgatavalt kõrgemad ning kõrgem tase püsis läbivalt terve katse jooksul, kuid statistilist olulisust polnud (vt tabel 1). Olulised interaktsioonid puudusid ka baastasemest vabanemise andmete puhul. Baastasemest vabanemise andmed kirjeldavad absoluutväärtuse protsenti baastasemest.

Tabel 1. 5-HT keskmiste baas- ja stimuleeritud tasemete vahel HELE grupi lõikes statistiline olulisus puudub.

5-HT	HELE	Mean (fmol/ 25µl)	SD	N
baastase	HE	4.056	1.942	7
	LE	2.903	1.296	13
KCl süst (proovid 6-7)	HE	4.502	1.125	7
	LE	3.470	1.209	13
KCL mõju (proovid 8-13)	HE	4.731	1.346	7
	LE	3.211	1.457	13
amfetamiini süst (proovid 14-15)	HE	3.657	1.267	7
	LE	2.757	1.068	13
amfetamiini mõju (proovid 16-22)	HE	3.720	1.458	7
	LE	3.017	1.401	13

Korduvmõõtmiste ANOVA (korduvmõõtmised (proovid 3-22)*vektor) tulemusel võib öelda, esineb statistiline olulisus absoluutväärtuste proovide lõikes $F(4, 72) = 2,725$, $p = 0,036$, $\omega^2 = 0,024$. Post hoc statistiliselt olulisi seoseid ei näita. Puuduvad statistiliselt olulised seosed korduvmõõtmiste ja vektorgrupi vahel ning vektorgrupi siseselt. Tabelist on märgatavad GDNF grupi 5-HT mõnevõrra madalamad tasemed terve katse vältel, kuid statistiline olulisus

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

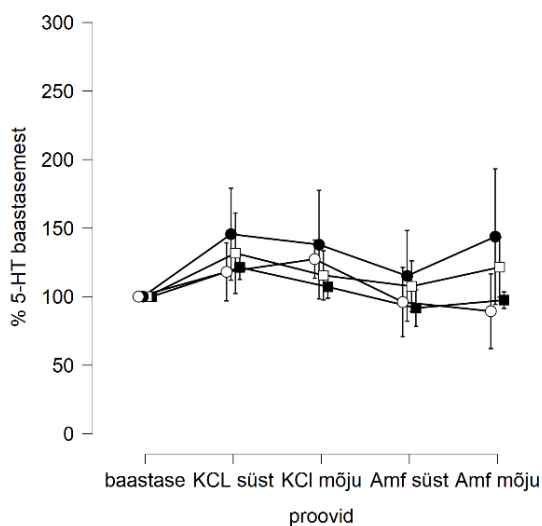
puudub (vt tabel 2). Baastasemest vabanemise andmetes statistiliselt olulised interaktsioonid ja peamõjud puuduvad.

Tabel 2. 5-HT keskmised baas- ja stimuleeritud tasemed vektorgrupi lõikes - statistiline olulisus vektorgruppide lõikes puudub.

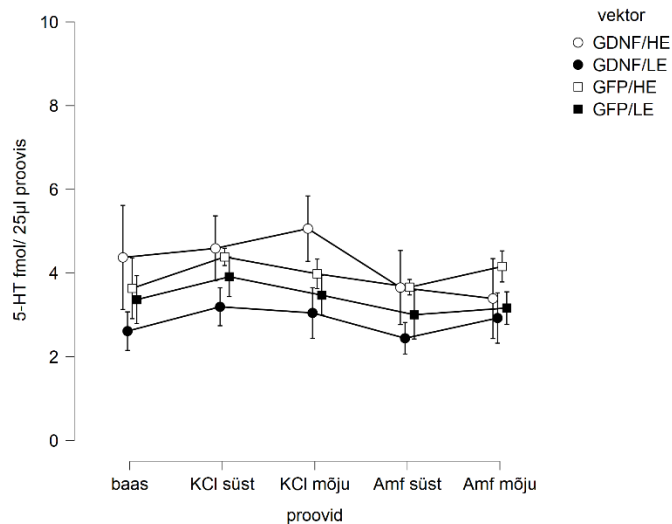
5-HT	vektor	Mean (fmol/ 25µl)	SD	N
baastase	GDNF	3.199	1.875	12
	GFP	3.467	1.185	8
KCl süst (proovid 6-7)	GDNF	3.659	1.475	12
	GFP	4.089	0.858	8
KCL mõju (proovid 8-13)	GDNF	3.719	1.874	12
	GFP	3.778	1.082	8
amfetamiini süst (proovid 14-15)	GDNF	2.846	1.393	12
	GFP	3.411	0.769	8
Amfetamiini mõju (proovid 16-22)	GDNF	3.081	1.701	12
	GFP	3.537	0.903	8

Kordumõõtmiste ANOVA (kordumõõtmised (proovid 3-22)*vektor*HELE) tulemusel võib öelda, et esineb statistiline olulisus absoluutväärtuste proovide lõikes $F(4, 64) = 2,868$, $p = 0,030$, $\omega^2 = 0,032$. Post hoc statistiliselt olulisi seoseid ei näita. Puuduvad statistiliselt olulised seosed kordumõõtmiste ja gruppide vahel. Baastasemest vabanemise andmetes statistiliselt olulised interaktsioonid puuduvad. Absoluutväärtuste puhul on joonisel näha tendentsi HE-loomade kõrgemates tasemes ning LE-loomade madalamates tasemetes ning umbes kahekordset vahe GDNF/HE ja GDNF/LE loomade tulemuste vahel. (vt joonised 1 ja 2).

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus



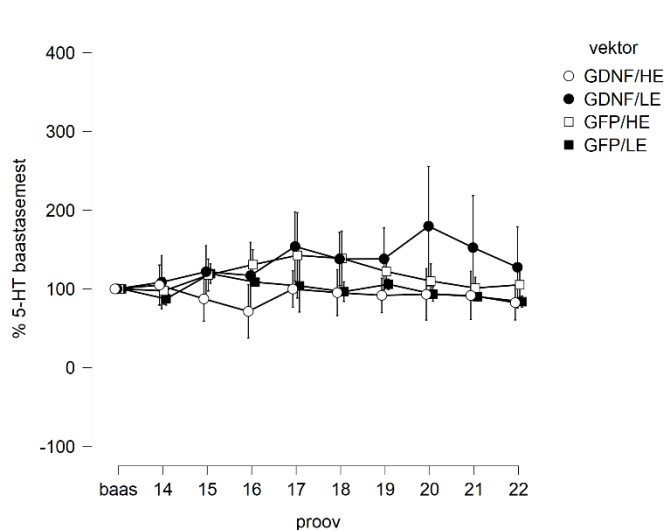
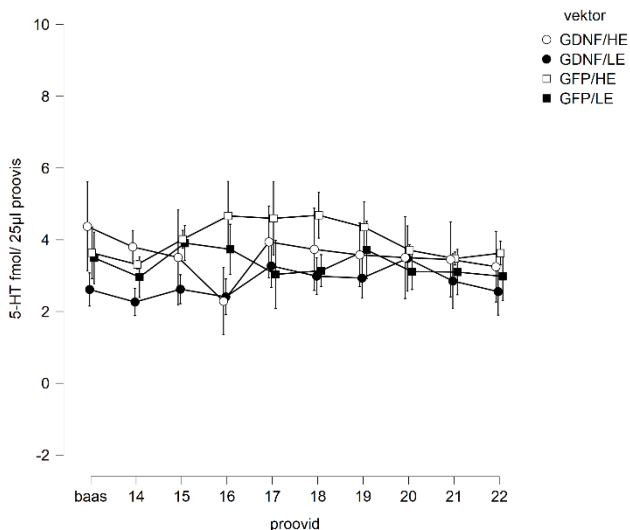
Joonis 1. GDNF ja HELE mõju 5-HT vabanemisele baastasemest



Joonis 2. GDNF ja HELE mõju 5-HT absoluutväärtustele

3.2. Amfetamiini mõju 5-HT ekstratsellulaarsetele baas- ja stimuleeritud tasemetele

Kordumõõtmiste ANOVA analüüsi tulemusel (nii kordumõõtmised*HELE*vektor, kordumõõtmised*HELE kui kordumõõtmised*vektor puhul) võib öelda, et amfetamiinil gruppide lõikes nii tavaandmete kui vabanemine baastasemest andmetega statistiliselt oluline mõju serotoniini tasemetele puudub (vt joonised 3 ja 4).



isele

3.3. KCL mõju 5-HT ekstratsellulaarsete baas- ja stimuleeritud tasemetele.

3.3.1. Uudistamisaktiivsuse mõju 5-HT ekstratsellulaarsetele tasemetele

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

Korduvmõõtmiste ANOVA tulemustest absoluutväärtustel ((proovid 6-13 + baastase)*HELE) selgus, et KCl mõju 5-HT tasemetele on proovide lõikes statistiliselt oluline, $F(94,811, 142,846) = 11,947$, $p < .001$, $\omega^2 = 0,167$. Sttistiliselt oluline tõus baastaseme suhtes ilmnes 8. ($p < .001$) ja 9. ($p < .001$) proovi ajal ning statistiliselt oluline langus 7. proovi suhtes ilmnes 11. ($p = 0,04$), 12. ($p = 0,009$) ja 13. ($p = 0,001$) proovi ajal.

Korduvmõõtmiste ANOVA tulemustest baastasemest vabanemisel (proovide 6-13 BT*HELE faktor) selgus, et koduvmõõtmiste vahel on statistiliselt oluline seos, $F(7, 126) = 10,170$, $p < .001$, $\omega^2 = 0,088$. 6. proovi suhtes oli 8. proovis statistiliselt oluline tõus ($p < .001$) ning 8. proovi suhtes statistiliselt oluline langus 10., 11., 12., ja 13. proovi ajal ($p < .001$).

Kordusmõõtmiste ja HELE interaktsioon ega HELE gruppidevaheline efekt statistiliselt oluline ei olnud (nii absoluutväärtuste kui baastasemest vabanemise andmete puhul).

3.3.2. GDNF mõju 5-HT ekstratsellulaarsetele tasemetele

Korduvmõõtmiste ANOVA tulemustest absoluutväärtustel ((proovid 6-13 + baastase)*vektor) selgus, et KCl mõju 5-HT tasemetele on proovide lõikes statistiliselt oluline, $F(4,049, 72,886) = 12,782$, $p < .001$, $\omega^2 = 0,156$. Sttistiliselt oluline tõus baastaseme suhtes ilmnes baastasemest 8. ($p < .001$) ja 9. ($p = 0,003$) proovi ajal ning statistiliselt oluline langus 7. proovi suhtes 11. ($p = 0,004$), 12. ($p < .001$) ja 13. ($p < .001$) proovi ajal.

Baastasemest vabanemise andmetega ilmnes statistiline olulisus proovide lõikes, $F(7, 126) = 11,902$, $p < .001$, $\omega^2 = 0,102$. Sttistiliselt oluline tõus baastaseme suhtes ilmnes 6. proovi suhtes 8. proovi ajal ($p < .001$) ning statistiliselt oluline langus 7. proovi suhtes 10. ($p = 0,022$), 11. ($p = 0,003$), 12. ($p = 0,002$) ja 13. ($p < .001$) proovi ajal.

Statistiliselt olulisi interaktsioone vektorgrupi ja korduvmõõtmiste vahel ega gruppidevaheliselt ei olnud absoluutväärtuste ega baastasemest vabanemise andmete puhul.

3.3.3. Uudistamisaktiivsuse ja GDNF mõju 5-HT ekstratsellulaarsetele tasemetele

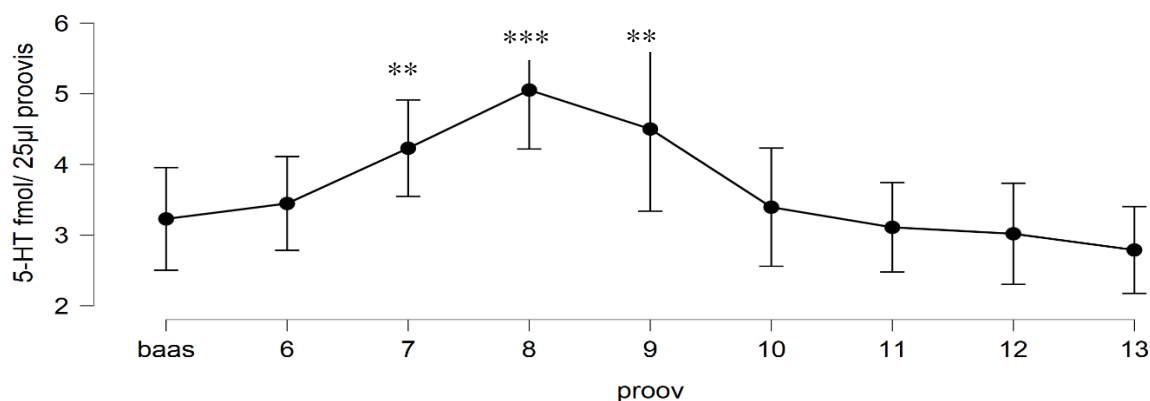
Korduvmõõtmiste ANOVA tulemusena ((proovid 6-13 + baastase)*HELE*vektor) absoluutväärtustest selgus, et KCl mõju 5-HT-le on proovide lõikes statistiliselt oluline, $F(4,221, 67,5) = 12,885$, $p < .001$, $\omega^2 = 0,184$. Sttistiliselt oluline tõus baastaseme suhtes ilmnes seitsmenda, kaheksanda ja üheksanda proovi ajal (vt joonis 5). Statistiliselt oluline langus ilmnes 7. proovi suhtes 11. ($p = 0,005$), 12. ($p < .001$) ja 13. ($p < .001$) proovi ajal.

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

HELE ja vektori gruppidevahelised mõjud ei ole üle kõigi väärtuste statistiliselt olulised.

Vabanemine baastasemest andmete korduvmõõtmiste ANOVA-st selgus, et KCl mõju 5-HT baastasemest vabanemisele on proovide lõikes statistiliselt oluline, $F(7, 112) = 10,554$, $p < .001$, $\omega^2 = 0,095$. Statistiliselt oluline tõus 6. proovi suhtes ilmnes 8. proovi ajal ($p < .001$). Statistiliselt oluline langus 8. proovi suhtes ilmnes 10., 11., 12., ja 13. proovi ajal ($p < .001$).

HELE ja vektori gruppidevahelised mõjud ei ole vabanemine baastasemest andmete puhul üle kõigi väärtuste statistiliselt olulised.

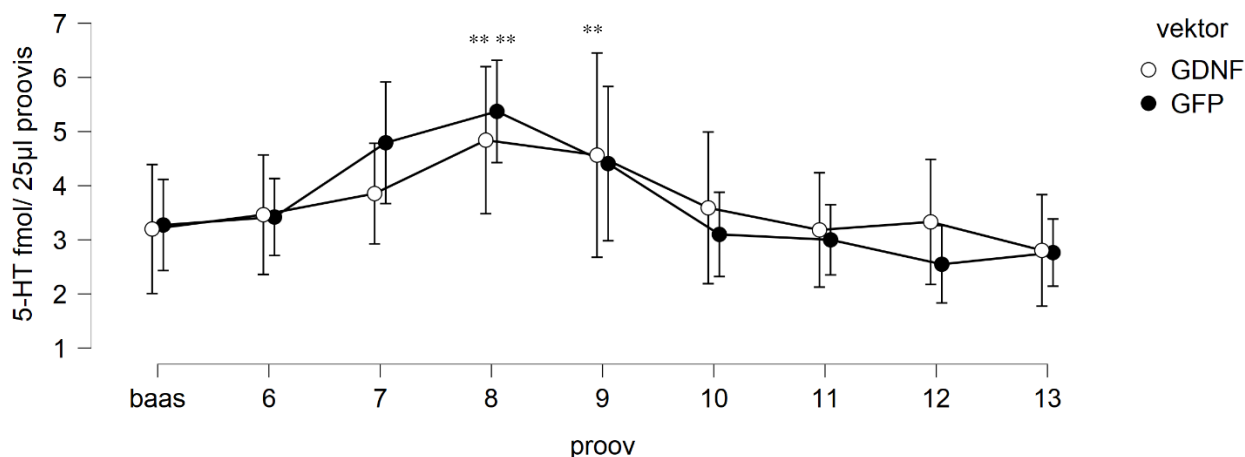


Joonis 1. KCl mõju 5-HT tasmele proovide lõikes absoluutväärtustest. Statistiliselt oluline tõus baastaseme suhtes. ** $p < .01$, * $p < .001$**

Korduvmõõtmiste ja vektori vahel on absoluutväärtuste puhul üle tavapärase lävendi väike statistiline olulisus ja efekt, $F(4,221, 67,5) = 2,119$, $p = 0,084$, $\omega^2 = 0,021$. Statistiliselt oluline tõus baastaseme suhtes ilmnes GDNF grupil 8. ($p = 0,008$) ja 9. ($p = 0,009$) proovi ajal ning kontrollgrupil 8. proovi ajal ($p = 0,001$). (vt joonis 4). Statistiliselt oluline langus toimus kontrollgrupil 7. proovi suhtes 10. ($p = 0,045$), 11. ($p = 0,030$), 12. ($p < .001$) ja 13. ($p = 0,009$) proovi ajal.

Vabanemine baastasemest andmete puhul statistiline olulisus puudub korduvmõõtmiste ja vektori vahel

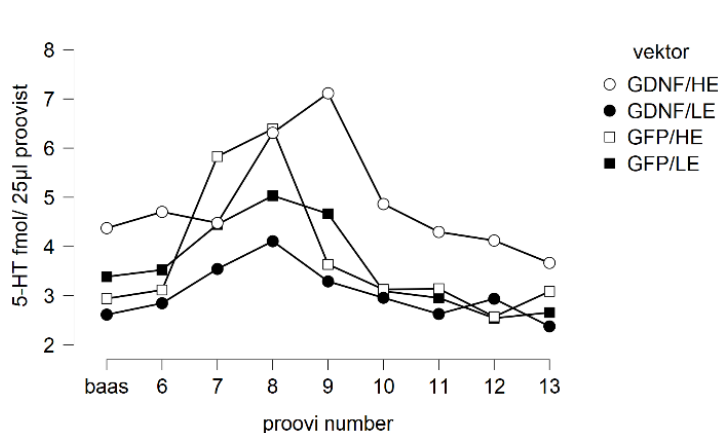
neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus



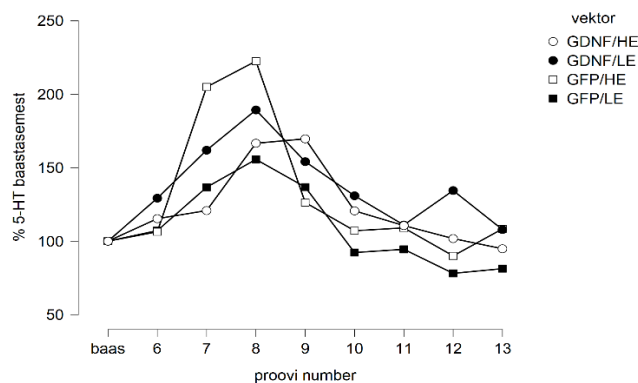
Joonis 2. KCl mõju 5-HT tasemele baastaseme suhtes vastavalt geenivektorile. Statistiliselt oluline tõus baastaseme suhtes, ** $p < .01$

Kordumõõtmiste, HELE ja vektori vahel oli absoluutväärtuste puhul leitav väike statistiline olulisus ning keskmine efekti suurus, $F(4,221, 67,5) = 2,240$, $p = 0,07$, $\omega^2 = 0,023$. Statistiliselt oluline 5-HT taseme langus oli nähtav LE, GFP 8. ja 12. ($p = 0,009$) ning 8. ja 13. ($p = 0,02$) proovi vahel ning HE, GDNF 9. ja 11. ($p = 0,033$), 12. ($p = 0,012$) ning 13. ($p < .001$) proovi vahel. GDNF/HE kõige kõrgem punkt oli 9. proovi ajal, kus 5-HT tase oli 7,12 fmol/25µl. Teiste gruppide tasemed on 9. punktis GDNF/LE = 3,29 fmol/25µl, GFP/HE = 3,64 fmol/25µl ja GFP/LE = 4,67 fmol/25µl. GDNF/LE kõige madalam punkt oli 13. proovi ajal, kus 5-HT väärtus langes baastasemest isegi madalamale ning GFP/LE kõige madalam punkt on samuti 13. punkti ajal, kus 5-HT tase on 2,66 fmol/25µl. GFP/HE kõige kõrgem punkt oli 8. Proovi ajal, kus 5-HT tase oli 6,39 fmol/25µl.

Vabanemine baastasemest andmete puhul statistilist olulisust ei esinenud kordumõõtmiste, HELE ja vektori puhul.



Joonis 7. KCl mõju 5-HT vabanemisele vastavalt geenivektorile ja HELE grupile



Joonis 8. KCl mõju 5-HT vabanemisele baastasemest vastavalt geenivektorile ja HELE grupile statistiliselt oluliselt ei esinenud.

4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli uurida neurotrofiin GDNF mõju ekstatsellulaarsetele 5-HT baas- ja stimuleeritud tasemetele erineva uudistamiskäitumisega rottidel.

Tulemustest selgus, et Amfetamiini stimulatsioon ei tekitanud 5-HT tasemetes ei statistiliselt olulist tõusu ega erinevust gruppides. Sarnasele tulemusele jõudsid ka Kankaanpää, Meririnne, Lillsunde ja Seppälä (1998). Nimelt ei mõjutanud amfetamiin 5-HT tasemeid naalduvas tuumas, vaid hoopis DA tasemeid. Amfetamiini mõju 5-HT tasemetele võib uurida hoopis näiteks peale antidepressantide manustamist, nagu näitasid O'Leary, Kõiv, Raudkivi ja Harro (2016). Amfetamiini mõju 5-HT-le võis olla olematu, sest amfetamiin on eelkõige dopamiini transporteri sihtmärk.

KCl stimulatsioonil oli 5-HT tasemetele statistiliselt oluline mõju. Seda tulemust toetab ka kirjandus. Näiteks tõusis serotoniini tase Bickerdike, Wright ja Marsden (1993) poolt läbi viidud katses peale KCl manustamist märkimisväärselt sotsiaalselt kasvatatud loomades võrreldes isolatsioonis kasvatatud loomadega.

Tulemustest selgus ka, et HE-rottidel olid üldiselt absoluutväärtustes tendents kõrgemaks ekstratsellulaarseks 5-HT tasemeks kui LE-rottidel, kuid statistiliselt oluliseks see ei osutunud. Nelja grupi kaupa vaadates tundub, et see võib tuleneda peamiselt HE/GDNF loomadest, kellel on ligi 2x kõrgemad tasemed võrreldes GFP/HE loomadega. 8. proovi KCl stimulatsiooni ajal tasemed korraks ühtlustuvad (vt tabel 1 ja joonis 7). Erinevused ekstratsellulaarses tasemes kipuvad tavaliselt avalduma alles stimulatsiooni mõjul, näiteks amfetamiiniga stimuleerides (O'Leary, Kõiv, Raudkivi ja Harro, 2016) või tsitalopraamiga stimuleerides (Mällo jt, 2008). Stimuleerimata olekus baastasemetel olulisi erinevusi pole kirjeldatud ning käitumist võib pidada tavapäraseks.

Piiripealselt statistiliselt oluliseks osutus korduvmõõtmiste, geenivektori ja uudistamisaktiivsuse interaktsioon KCl mõju puhul, mis andis keskmise efekti suuruse, kuid oli ilma post hoc erinevusteta. GDNF/HE kõige kõrgem punkt oli 9. proovi ajal, kus 5-HT tase oli 7,12 fmol/25µl ning GFP/LE kõige madalam punkt oli 13. punkti ajal, kus 5-HT tase oli absoluutväärtuselt 2,66 fmol/25µl.

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

Töö üldiseks puuduseks võib lugeda katseloomade väikest hulka valimis ja katsegruppides, seega tuleb tulemuste tõlgendamisse suhtuda ettevaatlikult ning raporteeritud statistilised olulisused olid pigem piiripealsed. Edaspidi tuleks katset korrata kindlasti suurema valimiga.

Kokkuvõttes selged tulemused puuduvad selle osas, milline mõju on neurotrofiinil GDNF serotoniini tasemetele või millised erinevused on HE- ja LE- rottide baas ja stimuleeritud tasemetel, kuid esialgsed tulemused annavad aimdust, kuidas antud teemat edasi uurida.

5. Kasutatud kirjandus

- Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(5), 383–394. <https://doi.org/10.1038/nrn812>
- Altoa, A., Kõiv, K., Eller, M., Uustare, A., Rincken, A., & Harro, J. (2005). Effects of low dose N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine administration on exploratory and amphetamine-induced behavior and dopamine D2 receptor function in rats with high or low exploratory activity. *Neuroscience*, 132(4), 979-990. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.038
- Beck, K., Irwin, I., Valverde, J., Brennan, T., Langston, J. and Hefti, F. (1996). GDNF Induces a Dystonia-like State in Neonatal Rats and Stimulates Dopamine and Serotonin Synthesis. *Neuron*, 16(3), pp.665-673.
- Bickerdike, M. J., Wright, I. K., & Marsden, C. A. (1993). Social isolation attenuates rat forebrain 5-HT release induced by KCl stimulation and exposure to a novel environment. *Behavioural Pharmacology*, 4(3), 231–236.
- Bird, I. (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ*, 299(6702), pp.783-787.
- Bonafina, A., Trincherio, M., Ríos, A., Bekinschtein, P., Schinder, A., Paratcha, G. and Ledda, F. (2019). GDNF and GFR α 1 Are Required for Proper Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons. *Cell Reports*, 29(13), pp.4308-4319.e4.
- Cass, W. (1996). GDNF Selectively Protects Dopamine Neurons over Serotonin Neurons Against the Neurotoxic Effects of Methamphetamine. *The Journal of Neuroscience*, 16(24), pp.8132-8139.
- Gardner, K., Hale, M., Oldfield, S., Lightman, S., Plotsky, P. and Lowry, C. (2009). Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 163(4), pp.991-1001.
- Harro J. (1993). *Measurement of exploratory behaviour in rodents*. (pp 359–377). In: Conn RA, editor. *Methods in neurosciences*, 14. San Diego: Academic Press, Inc.
- Hisaoka, K., Nishida, A., Koda, T., Miyata, M., Zensho, H., Morinobu, S., Ohta, M. and Yamawaki, S. (2008). Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 79(1), pp.25-34.

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivisuus

- Ibáñez, C., & Andressoo, J. (2017). Biology of GDNF and its receptors — Relevance for disorders of the central nervous system. *Neurobiology Of Disease*, 97, 80-89. doi: 10.1016/j.nbd.2016.01.021
- Kankaanpää, A., Meririnne, E., Lillsunde, P. and Seppälä, T. (1998). The Acute Effects of Amphetamine Derivatives on Extracellular Serotonin and Dopamine Levels in Rat Nucleus Accumbens. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(4), pp.1003-1009.
- Liu, Q., Zhu, H., Li, B., Wang, Y., Yu, J. and Wu, G. (2012). Chronic clomipramine treatment restores hippocampal expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression. *Journal of Affective Disorders*, 141(2-3), pp.367-372.
- Mällo, T., Altoa, A., Kõiv, K., Tõnissaar, M., Eller, M., & Harro, J. (2007). Rats with persistently low or high exploratory activity: Behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behavioural Brain Research*, 177(2), 269-281. doi: 10.1016/j.bbr.2006.11.022
- Mällo, T., Kõiv, K., Koppel, I., Raudkivi, K., Uustare, A., & Rincken, A. et al. (2008). Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. *Brain Research*, 1194, 110-117. doi: 10.1016/j.brainres.2007.11.041
- Mann, J. (1999). Role of the Serotonergic System in the Pathogenesis of Major Depression and Suicidal Behavior. *Neuropsychopharmacology*, 21(2), pp.99S-105S.
- Morilak, D. and Frazer, A. (2004). Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 7(2), pp.193-218.
- Naumenko, V., Bazovkina, D., Semenova, A., Tsybko, A., Il'chibaeva, T., Kondaurova, E., & Popova, N. (2013). Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in mouse strains genetically predisposed to behavioral disorders. *Journal Of Neuroscience Research*, 91(12), 1628-1638. doi: 10.1002/jnr.23286
- O'Leary, A., Kõiv, K., Raudkivi, K. and Harro, J. (2016). Antidepressants differentially affect striatal amphetamine-stimulated dopamine and serotonin release in rats with high and low novelty-oriented behaviour. *Pharmacological Research*, 113, pp.739-746.
- Popova, N., Ilchibaeva, T. and Naumenko, V. (2017). Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain. *Biochemistry (Moscow)*, 82(3), pp.308-317.
- Törk I. (1990): Anatomy of the serotonergic system. *Ann NY Acad Sci* 600: 9–35

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

- Zill, P., Baghai, T., Zwanzger, P., Schüle, C., Eser, D., Rupprecht, R., Möller, H., Bondy, B. and Ackenheil, M. (2004). SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Molecular Psychiatry*, 9(11), pp.1030-1036.
- Żmudzka, E., Sałaciak, K., Sapa, J. and Pytka, K. (2018). Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. *Life Sciences*, 210, pp.106-124.

neurotrofiin GDNF, serotoniin ja uudistamisaktiivsus

Käesolevaga kinnitan, et olen korrekselt viidanud kõigile oma töös kasutatud teiste autorite poolt loodud kirjalikele töödele, lausetele, mõtetele, ideedele või andmetele. Olen nõus oma töö avaldamisega Tartu Ülikooli digitaalarhiivis DSpace. /Helen Kruusi/