

Tartu Ülikool
Sotsiaal- ja haridusteaduskond
Psühholoogia Instituut

Jaanus Lahe

**GALANIINI RETSEPTOR 2 (GALR2) SPETSIIFILISTE AGONISTIDE
TESTIMINE DEPRESSIOONI LOOMKATSEMUDELITEL**

Magistritöö

Juhendaja: Kaido Kurrikoff

Kaasjuhendajad: Jaanus Harro, Indrek Saar

Läbiv pealkiri: Galaniini seotus depressiooniga

Tartu 2013

SISUKORD

1. KOKKUVÕTE.....	3
2. ABSTRACT.....	3
3. SISSEJUHATUS.....	5
4. TEOREETILINE TAUST.....	7
4.1. Galaniin.....	7
4.1.2. Galaniini retseptorite alatüübid.....	7
4.1.3. Galaniini retseptori alatüüpide vahendatud mõju.....	8
4.2. Depressioon.....	9
4.2.1. Neuropeptiidid ja depressioon.....	10
4.2.2. Galaniin ja depressioon.....	12
4.3. Depressiooni loomkatsemudelid.....	14
4.3.1. Depressioonimudelite analüüs.....	16
5. MEETOD.....	18
5.1. Sotsiaalne lüüasaamine.....	18
5.2. Katseloomad ja uuringuravim.....	20
6. TULEMUSED.....	21
6.1. Tulemused1.....	21
6.2. Sotsiaalse lüüsaamise tulemused.....	26
7. ARUTELU JA JÄRELDUSED.....	28
8. KASUTATUD ALLIKAD.....	30

KOKKUVÕTE

Galaniin on 29 aminohappe pikkune neuropeptiid, mis avastati 30 aastat tagasi Stockholmis, Karolinska Instituudis Viktor Muti ja tema kolleegide poolt. Galaniin osaleb kolme retseptori alatüübi vahendusel mitmetes bioloogiliste ja psühhoogiliste funktsioonide ja seisundite, sealhulgas depressiooni regulatsioonis, mis teeb galaniinist atraktiivse farmakoloogilise märklaua ja uurimisobjekti neuroteadustes.

Käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgiks oli testida GalR2 spetsiifiliste agonistide toimet depressiooni loomkatsemudelil. Nende GalR2 ligandide agonistlik toime, afiinsus ja selektiivsus GalR2-le oli juba varem testitud *in vitro*, kuid käesoleva töö eesmärk on testida aine toimet *in vivo*. GalR2 agonisti J18 testimiseks *in vivo* kasutati sotsiaalse lüüasaamise mudelit, kuid mudeli töölesaamisega esines mõningaid probleeme ja standardsel antidepressandil puudus ootuspärane efekt. Teine töö eesmärk kujunes töö käigus: analüüsida probleemide võimalikke põhjuseid ning ühtlasi käsitleda depressioonimudelite üldiseid probleeme.

Kokkuvõtvalt võib koos eelnevate tulemustega väita, et antidepressiivse efekti puudumine nii standardsel antidepressandil kui ka uuringuravimil tähendab seda, et sotsiaalse lüüasaamise loomumudelit ei õnnestunud korralikult tööle saada. Seega ei saa me sotsiaalse lüüsaamise katse tulemuste põhjal uut informatsiooni galaniini toime kohta.

ABSTRACT

Testing the effect of new galanin 2-receptor (GALR2) specific agonists in animal depression models.

Galanin is a 29 amino acids long neuropeptide, that was discovered 30 years ago at the Karolinska Institute in Stockholm by Viktor Mutt and his colleagues. By means of action on three receptors, galanin participates in the regulation of several biological and psychological functions, including depression. This makes galanin system an attractive pharmacological target and a research object in neurosciences.

The main objective of this research was to design, create and thereafter test the presence or absence of a depression-related effect of GalR2-specific agonists in an adequate animal model. The agonistic effect, affinity and selectivity to GalR2 of these GalR2 ligands has already been tested in vitro, but the purpose of this thesis was to test the effect of the substance in vivo. In order to test the GalR2 agonist J18 in vivo, the social defeat model was used, but implementation of the model in our laboratory turned out to be problematic as the standard antidepressant failed to reveal the expected effect. The second purpose of the thesis was to analyse the possible reasons behind these problems, and also to discuss some general issues with depression models.

Based on previous results we can propose that the absence of an antidepressant effect of the research drug, the chemically modified galanin analogue J18, may have been related to the fact that social defeat animal model failed.

SISSEJUHATUS

Praeguses farmakoloogilises depressiooniravis domineerivad monoamiinide vahendatud närviülekandele suunatud ühendid. Nendega kaasnevad ebasoovitavad reaktsioonid ja kõrvalmõjud ning tõsiasi, et rohkem kui pooltel patsientidel ei teki pärast antidepressantidega ravimist täielikku paranemist, on algatanud intensiivse uuringu leidmaks uudset terapeutilist lähenemist depressiooniravis (Crisafulli et al., 2011). Viimase 30 aasta jooksul on ravimiarendus suurt tähelepanu pööranud neuropeptiididele. Tänu neuropeptiidide ja nende retseptorite piiratud paiknemisele kesknärvisüsteemis, eeldatakse neuropeptiidiretseptorite ligandidel olevat vähem kõrvalnähte kui klassikalistel virgatsainetel. Juba 1991. aastal kirjeldati olulist interaktsiooni galaniini ja serotoniini (5-HT) ning noradrenaliini süsteemide vahel ning pakuti välja ka galaniinimehhanismide mõju depressioonile (Fuxe et al., 1991). Alates neuropeptiidide lokaliseerimisega aju piirkondades, mis vahendavad ärevuse ja stressiga seotud käitumuslikke funktsioone, on neuropeptiidid muutunud atraktiivseteks terapeutilisteks sihtmärkideks. Seetõttu on käesolev uurimisteema innovatiivne ning võib luua uusi võimalusi ravimite valmistamiseks, eriti kui õnnestub saada süsteemselt aktiivseid aineid. Sageli kolokaliseeruvad neuropeptiidid klassikaliste neurotransmitteritega ja omavad nn moduleerivat toimet (Fuxe et al., 2008).

Esmaste antidepressiivse toime seiretestidega oleme näidanud neuropeptiid galaniinil antidepressiivset efekti (Saar et al., 2013). Pärast esmaseid seireteste on vaja näidata ravimi efekti mõnes konstruktvaliidsusega depressioonimudelil. Käesolev töö põhineb GalR2 spetsiifiliste agonistide testimisel sotsiaalse lüüasaamise (social defeat) mudelis. Uuritavaks objektiks on aju-vere barjääri läbiva GalR2 spetsiifilise uue ligandi toime depressioonimudelil. Selle GalR2 ligandi agonistlik toime, afiinsus ja selektiivsus GalR2-le on juba varem testitud *in vitro*, kuid eesmärk on testida aine toimet *in vivo*, kasutades depressioonimudelit. Töös üritan analüüsida ka esilekerkinud probleemide põhjuseid ning ühtlasi käsitleda depressioonimudelite üldiseid probleeme.

Töö oli osaks suuremast projektist, mille käigus disainiti uut tüüpi peptiidseid (peptiidisarnased) GalR2 agonistid, mis omaksid süsteemset aktiivsust (läbivad aju-vere barjääri). Tööle eelnes mahukas keemia-alane projekt koos suure hulga läbiviidud töödega

(Saar, 2013). Annan siinkohal lühida ülevaate keemilise disaini kolmest eraldiseisvast strateegiast. Süsteemse aktiivsuse tugevdamiseks modifitseeriti (lisati stearüül, lisati mittenaturaalsed aminohapped ja katioonne domeen) keemiliselt olemasolevaid potentseid GalR2 peptiidseid agoniste, mis on oma olemuselt galaniini analoogid. Stearüül on rasvhape, mille lisamine molekulile teeb aine rohkem hüdrofoobseks. Teisisõnu on rasvhappe jäägi lisamine potentsiaalne meetod, mis võiks suurendada ravimi võimalust läbida aju-veri barjääri (Bulaj et al., 2008). Eesmärk oli suurendada lipofiilsust, suurendada resistentsust ensümaatilisele lagundamisele, ja peamine siht oli seejuures molekuli bioloogilise efekti säilimine. Tehtud biodistributsiooni katsed võimaldasid hinnata kasutatud keemiliste strateegiate paikapidavust ja liikuda edasi depressiooni mudelites testimisele. Töö käigus testiti sünteesitud GalR2 agonistide toimet kroonilisel manustamisel (i.p.) depressiooni loomudelil. Võrdluseks kasutati standardravimina imipramiini (meetodi kontrollimiseks) ja füsioloogilist lahust, mis ei tohi efekti anda.

Teine töö eesmärk kujunes välja töö käigus: anda ülevaade olemasolevate depressioonimudelite tugevustest ja nõrkustest. See oli tingitud asjaolust, et magistritöö raames ja magistriõppe käigus viisin läbi katseid mitme erineva depressiooni loomkatsemudeliga ning seejuures puutusin kokku mudelite tugevate ja nõrkade külgedega. Hoolimata asjakohasuse küsitavusest ja madalast ennustavast valiidsusest, on loomkatsed olnud üliolulise tähtsusega uute kliiniliselt efektiivsete ravimite avastamises (McArthur & Borsini, 2006). Depressioonimudelite ja kaasaegse depressiooniravi kitsaskohad on eelkõige põhjustatud haiguse heterogeensusest: sümptomid avalduvad nii füsioloogilisel, käitumuslikul kui ka psühholoogilisel tasandil, mis teeb selle modelleerimise keeruliseks (Cryan et al., 2005).

Autori panus käesolevasse töösse oli põhjalik temaatilise teadusliku kirjandusega tutvumine, katsete planeerimine ja – läbiviimine ning tulemuste analüüs. Töö autor omandas uusi teadmisi sotsiaalse lüüsaamise mudelist ning depressiooni esmastest skriinimise testidest ja depressioonimehhanismide toimimisest üldiselt.

TEOREETILINE TAUST

Galaniin

Kui uurida inimese haigusi närvisüsteemi tasandil, siis olulisteks uurimisobjektideks on neuropeptiidid. Neuropeptiidid, eriti galaniin, on "indutseeritavad" (Lu et al., 2005) – aktiveeritavad mingi keskkonna-muutuse või äärmusiku protsessi (näiteks haiguse) poolt. See annab lootust suurendada meditsiinilise sekkumise selektiivsust neuropeptiidsüsteemi kaudu. Galaniin on laialt esindatud neuropeptiid, mis asub kesk- ja perifeerses närvisüsteemis, endokriinsüsteemis ja mitmetes muudes organites. Galaniini avastas 1983. aastal Eesti päritolu biokeemik Viktor Mutt koos kolleegidega Stockholmi Karolinska Instituudis. Galaniini perekonda kuuluvad galaniin, GMAP (galanin message associated peptide), GALP (galanin-like peptide) ja alariin (Lundström et al., 2005). Galaniini leidub kõige rohkem ventraalses eesajus, mandelkehas ja hüpotaalamuses, kuid ka taalamuses, ventraalses hippokampuses, locus coeruleuses, piklikajus, keskajus, basaalses eesajus, seljaajus ja gliia rakkudes. Lisaks leidub galaniini ka mitmetes perifeersetes rakkudes, eelkõige silelihasrakkudes ja soolestikus (Merchenthaler et al., 2009). Galaniini peptiidide perekonda on uuritud juba umbes 30 aastat ning uurimistulemusi on kajastatud umbes 3000-s publikatsioonis.

Galaniini retseptorite alatüübid

Galaniini bioloogilisi efekte vahendatakse kolme retseptori alatüübi aktivatsiooni kaudu. Nendeks alatüüpideks on GalR1, GalR2 ja GalR3, millel kõigil on kõrge afiinsus galaniini suhtes (Runesson et al., 2009). Galaniini retseptorite alatüübid erinevad üksteisest asukoha, terapeutilise eesmärgi, füsioloogiliste funktsioonide ning rolli poolest patoloogilistes protsessides. Kõigil kolmel retseptori alatüübil on mõnevõrra erinevad asukohad, millest saab eeldada, et erinevad retseptorid on seotud erinevate käitumiste ja häiretega. GalR1 retseptoreid leidub ajus kõige rohkem (ajukoores, limbilises ja basaalses eesajus, hippokampuses, hüpotaalamuses, keskajus ja ajusillas) ja see vahendab muuhulgas ajus ja seedesüsteemis galaniini toime pärssimist neurotransmitteritele ja hormoonide vabastamisele (Waters & Krause, 2000). GalR2 retseptorite kõrgeimad tasemed ajus on hüpotaalamuses ja mandelkehas, kuid ühtlasi on see laialt levinud ka perifeersetes kudedes: südames, kõhus, emakas, munasarjades, eesnäärmes ja mujal. GalR2 retseptor vahendab neuriitide kasvu ja soodustab neuronite eluvõimelisust (Mahoney et al., 2003). GalR3 retseptorid on laialt levinud perifeersetes kudedes: süda, maks, neerud, munandites ja mujal (Kolakowski et al., 1998).

GalR3 retseptoreid leidub ajus võrdlemisi vähe: need on esindatud hüpotaalamuse paraventrikulaarsetes tuumades ja locus coeruleuses (Kolakowski et al., 1998). Galaniini mõju sõltub manustamise kohast (Kuteeva, 2007). Senised uurimustulemused on näidanud, et erinevad galaniini retseptori alatüübid on seotud erinevate süsteemidega: näiteks toitumisega on seotud peamiselt GalR1 alatüüp hüpotaalamuses; õppimise ja mälu on seotud GalR1 ja GalR2 alatüübid hippokampuses; ärevuse ja meeleoluhäiretega on seotud GalR1, GalR2 ja GalR3 dorsaalses raphe tuumas, hüpotaalamuses, locus coeruleuses ja mandelkehas.

GalR1 aktivatsioon on seotud ärevuse ja depressiooniga, vähendab akuutset valu, suurendab toidu- ja vähendab vee tarbimist. GalR2 aktivatsioon on samuti seotud depressiooni ja ärevusega, seejuures arvatakse olevat antidepressiivse toimega (Holmes et al, 2003). GalR2 agonist vähendab rakusurma (Shi et al., 1997). GalR3 on kõige vähem uuritud retseptor, kuid selle aktivatsiooni korral on täheldatud prodepressiivset toimet ning alkoholi tarbimise suurenemist (Kuteeva et al., 2008).

Galaniini retseptori alatüüpide vahendatud mõju

Nagu juba eespool lühidalt mainitud, on täheldatud GalR alltüüpide seotust erinevate haiguste ja patoloogiliste seisunditega, nagu näiteks Alzheimeri tõbi, meeleoluhäired, ärevus, alkoholisõltuvus, metaboolsed haigused, valu ja kasvaja (Mitsukawa et al., 2008). Arvestades, et galaniini retseptori ligandidega saab loomkatsemudelites haiguse kulgu mõjutada, saab potentsiaalselt loetletud haiguste raviks kasutada GalR alatüüpide spetsiifilisi ligande (Mitsukawa et al., 2008).

Alzheimeri tõbe iseloomustab progressiivne koliinergiliste ja galaniinergiliste neuronite degeneratsioon. Galaniin suudab pärssida atsetüülkoliini vabanemist (Fisone et al., 1987). Lisaks sellele esineb galaniin koos noradrenaliini ja serotoniiniga ja avaldub hippokampuses (Mitsukawa et al., 2008).

Galaniini manustamine (tsentraalselt) rottidele on näidanud soorituse halvenemist mitmetes mäluülesannetes: emotsionaalne mälu, ruumiline mälu ja töömälu (Kuteeva, 2007).

Juba 1980-te lõpul avastati, et galaniin ja vasopressiin koeksisteerivad hüpotaalamuses ja vihjati, et galaniin võib mängida rolli vedeliku tarbimise regulatsioonis. On täheldatud, et galaniin pidurdab vasopressiini vabanemist. Uurimused on kinnitanud, et galaniin pidurdab vedeliku tarbimist, kuid seda üksnes olukordades, kus toimub veekaotus (Kuteeva, 2007).

Samuti on leitud inimgeneetika uuringutest ja loomade käitumise katsetest, et galaniini toime mandelkehas ja mujal on seotud sõltuvuskäitumisega, sealhulgas alkoholisõltuvusega. Sellest tulenevalt võib galaniini retseptorite antagonistide, eriti GalR3, arendus olla tähtis sõltuvushäirete

ravis (Mitsukawa et al., 2008). Üheks alkoholismi komponendiks on muudatus süsteemides, mis soodustavad ülemäärast alkoholi tarbimist. See bioloogiliselt põhjendatud teooria tähendab, et hüpotaalamuse peptiidid (nagu galaniin), mis on seotud toitumisega, võivad seotud olla ka alkoholismiga. Galaniin on potentsiaalne glükoos-indutseeritava insuliini erituse pärssijaks pankreasest. Galaniini tasemed hüpotaalamuses on positiivselt korreleeritud tarbitud rasvahulgaga (Mitsukawa et al., 2008). Uuringud on näidanud, et galaniini süstimine hüpotaalamuse kolmandasse vatsakesse suurendab alkoholi tarbimist tagades suurema energiatarbimise. Kui arvestada keerulist toitumise regulatsiooni ja ülimalt olulisi psühho-sotsiaalseid faktoreid, mis soodustavad inimesel alkoholismi teket ja arengut, siis tuleb tõdeda, et galaniini roll antud häire puhul võib vaid selle mehhanismi kaudu olla suhteliselt limiteeritud (Kuteeva, 2007).

Lisaks on täheldatud ka GALP-i märkimisväärset mõju toitumisele (Lawrence et al., 2002). GALP on endogeenselt esinev galaniinisarnane peptiid, mis omab sarnaselt galaniiniga toimet galaniini retseptoritele.

Galaniin esineb koos sensoorses ja seljaaju interneuronites, mis mängivad väravav rolli valu signaliseerimise protsessis. Galaniinil on kahefaasiline vastus mitmetes valumudelites: väiksemad annused galaniini tugevdavad valusignaale ning suuremad annused suruvad alla.

Galaniini ja galaniini retseptoreid on avastatud ka mitmetest endokriinsetest kasvajatest, näiteks pankrease, hüpotaalamuse ja hüpofüüsi kasvajatest. Kliinilised andmed pankrease kasvajate ravi kohta näitavad, et somatostatiini retseptori agonistidele oktreotiidile ja serotoniinile võib nüüd lisada ka galaniini (Mitsukawa et al., 2008).

Depressioon

Meeleolahäired, sealhulgas depressioon ja bipolaarne häire, kuuluvad kõige laialt levinumate psüühiliste haiguste hulka. Välja on pakutud, et umbes 10% läänemaaailma meestest ja 20% naistest kannatavad oma eluajal depressiivse episoodi all. RHK-10 põhjal on sügava depressiooni põhisümptomiteks alanenud meeleolu, huvi ja elurõõmu kadumine ja energia vähenemine. Lisasümptomiteks on tähelepanu ja kontsentratsioonivõime alanemine, alanenud enesehinnang ja eneseusaldus, süü- ja väärtusetusetunne, trööstita ja pessimistlik suhtumine tulevikku, häiritud uni, isu alanemine ja enesekahjustuse- või suitsiidimõtted või -teod (RHK-10). Depressioonipatsientidel on kõrgeenenud suitsiidioht ning väga sügava depressiooni korral on 15% surmajuhtumite põhjuseks suitsiid. 60% inimestest, kes sooritavad enesetapu, on kannatanud depressiooni või mõne muu meeleolahäire all (Clark et al., 2009). Lisaks sellele on depressioon oluliseks riskiteguriks kardiovaskulaarsete haiguste arengus ning müokardi infarktist põhjustatud surma juures

(Musselmann et al., 1998).

Depressiooni etioloogias on siiani palju ebaselget, kuid see hõlmab geneetilisi ja sotsiaalseid faktoreid ning traumeerivaid sündmusi. Ehkki mitmed meeleoluhäirete väljakujunemisega seotud faktorid on identifitseeritud, on teadmised meeleoluhäiretest siiski piiratud, sest kliiniliselt on haigused väga heterogeensed. Kontrastina mõnele neurodegeneratiivsetele haigustele (näiteks Huntingtoni tõbi või Parkinsoni tõbi), kus saab vaadelda konkreetset ajuregiooni, saab depressiooni põhjustatud ebanormaalsusi näha mitmes piirkonnas: väikeaju koor, hippokampus, amügdala, hüpotaalamus ja ajutüvi (Kuteeva, 2007).

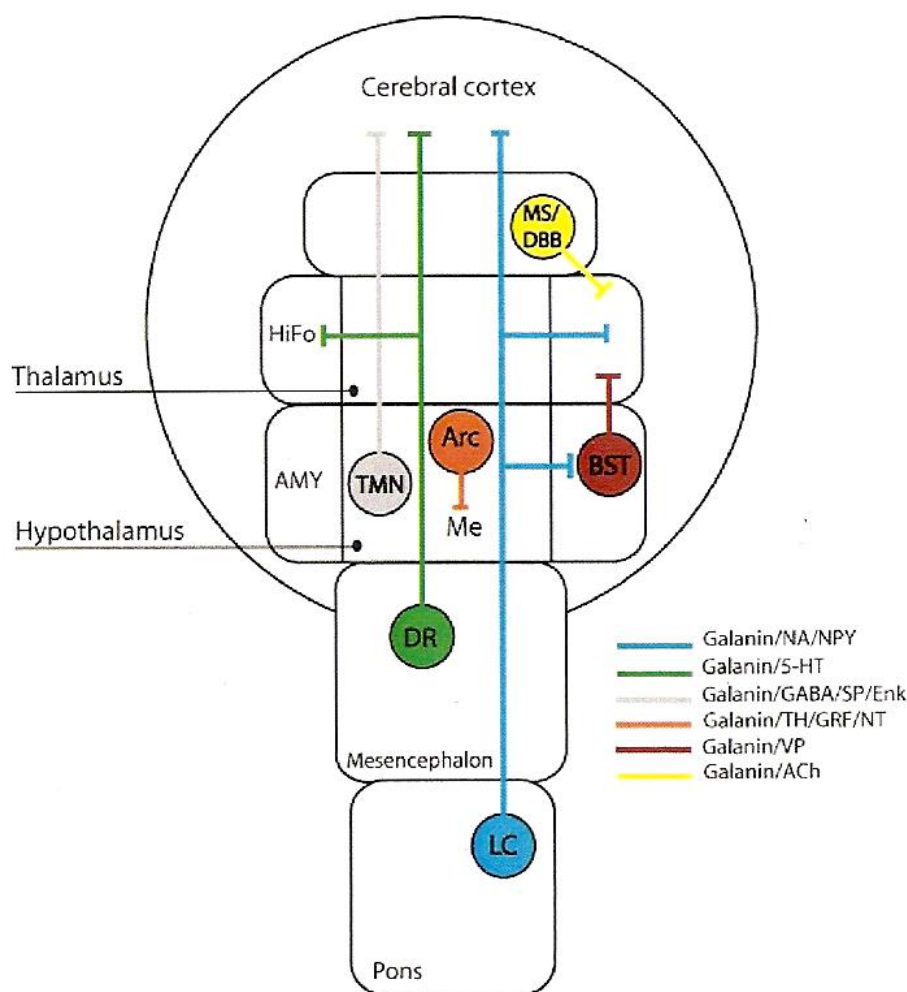
„Monoamiinergiline teooria“ on meeleoluhäirete uurimisvaldkonnas olnud domineeriv alates sellest, kui avastati, et monoamiini oksüdaasi pidurdajad ja tritsüklilised antidepressandid omavad depressiooniravis toimet. Nii noradrenaliini (NA) kui seorotoniini (5HT) neurokeemia muutub depressiooni käigus. Sellega on seotud neuronaalne aktiivsus, neurotransmitteri vabanemine ja pre-ning postsünaptilised retseptorid. Ehkki on olemas selge tõestus, et NA ja 5HT neuroülekanded muutuvad depressiooni korral, on andmeid, et monoamiinide süsteemid on kontaktis ja omavad ühendusi teiste neurobioloogiliste süsteemidega ning need pole depressiooni primaarsed põhjustajad (Kuteeva et al., 2008).

Praeguses farmakoloogilises depressiooniravis domineerivad monoamiinergilisele närviülekandele suunatud ühendid. Selliste antidepressantide kasutamine põhjustab 30-40% patsientidele ebasoovitavate reaktsioonide ja kõrvalmõjusid: limiteeritud vastuse määr, antidepressandi toimet mehhanismidega seotud kõrvalmõjud (Kuteeva et al., 2008). Lisaks eelmainitule on palju patsiente, kes ei vasta esialgsele ravile või kui vastavad, on terapeutiliselt efektiivsusel liiga suur viivitus ning rohkem esineb osalist- kui täielikku paranemist (Cryan & Mombereau., 2004). Uuringud närilistega on näidanud, et pikaajaline antidepressantide kasutamine muudab intratsellulaarseid signaalseerimise mehhanisme, põhjustab muutusi monoamiinergilistes retseptorites ning transkriptsiooni faktorid suurendavad hippokampuse neurogeneesi. Säärane limiteeritus on algatanud intensiivsed uuringud leidmaks uudseid terapeutilisi lähenemisviise depressiooni ravimiseks (Kuteeva et al., 2008). Kaasaegsed ravimiotsingute strateegiad keskenduvad mitmetele neuromodulaatoritele, mille alla kuuluvad ka neuropeptiidid ja nende retseptorid.

Neuropeptiidid ja depressioon

Neuropeptiidid on seotud mitmete kesk-ja perifeerse närvisüsteemi füsioloogiliste ja psühholoogiliste protsessidega: toitumisregulatsioon, õppimine ja mälu, valu, ärevuselaadsed

seisundid, neuroendokriinne kontroll ja kardiovaskulaarne regulatsioon. Alates neuropeptiidide lokaliseerimisest aju piirkondades, mis on seotud ärevuse ja stressiga, on neuropeptiidid muutunud atraktiivseteks terapeutilisteks sihtmärkideks. Sageli kolokaliseeruvad neuropeptiidid klassikaliste neurotransmitteritega ja omavad nn moduleerivat toimet. Kontrastina klassikalistele väikese-molekulilistele neurotransmitteritele, mis vahendavad kiiret sünaptilist närviülekannet, on neuropeptiidid pigem neuromodulaatorid või neurotroofilised faktorid. Näiteks mõningad nendest neuropeptiididest asuvad samades neuronites klassikaliste meeleoluhäiretega seotud neurotransmitteritega, nagu näiteks noradrenaliini, serotoniini ja dopamiiniga (joonis 1). Neuropeptiidide retseptorid on terapeutiliselt atraktiivsed, kuna nende suure afiinsuse tõttu ligandidele arvatakse mõju nende kaudu olevat rohkem selektiivne, mis toob ravis kaasa vähem kõrvalnähte kui klassikaliste neurotransmitterite süsteemide mõjustamise puhul. Mitmed asjaolud näitavad neuropeptiidide potentsiaalselt tähtsat rolli meeleolu ja meeleoluhäirete juures. Neuropeptiidid ja nende retseptorid on sageli esindatud kesknärvisüsteemis nendes ajupiirkondades, mis on seotud afektiivse käitumisega ja stressireaktsioonidega (Höckfelt et al., 2000). Teiseks omavad neuropeptiidid tugevat füsioloogilist mõju afektiivse käitumise regulatsioonile nii kesknärvisüsteemis kui ka perifeerses närvisüsteemis (Kuteeva, 2007). Kolmandaks avalduvad neuropeptiidid sageli koos monoamiinergiliste neurotransmitteritega (NA, DA, 5-HT) ja teiste neuropeptiididega, mis on seotud depressiooni ja meeleolu regulatsiooniga (Höckfelt et al., 2003). Neljandaks oluliseks tunnusjooneks mõningate neuropeptiidsüsteemide juures on asjaolu, et need aktiveeruvad stressirikkas või traumaatilises olukorras, kui neuronaalne aktiivsus on kõrge (Kuteeva, 2007).



Joonis 1. Galaniini peamised juhteteed roti ajus (Kuteeva, 2007).

Lühendid joonisel: 5-HT-serotoniin; ACh – atsetüülkoliin; AMY – mandelkeha; Arc – arkuaattuumad; BST – stria terminalise sängituumad; DR – dorsaalne raphe; Enk – enkefaliin; GABA – gamma-aminovõihape; GRF – kasvuhormooni vabastav faktor; HiFo – hippokampuse kujundamine; LC – locus coeruleus; Me – mediaalne eminents (kõrge koht); MS/DBB – mediaalne vahesein ja diagonaalne Broca ala; NA – noradrenaliin; NPY – neuropeptiid Y; NT – neurotensiin; SP – substantia P; TH – türosiini hüdroksülaas; TMN – tuberaalsed magnotsellulaarsed tuumad; VP – vasopressiin.

Galaniin ja depressioon

Juba 1991. aastal kirjeldati olulist interaktsiooni galaniini ja serotoniini (5-HT) ning noradrenaliini süsteemide vahel ning pakuti välja ka galaniinimehhanismide mõju depressioonile (Fuxe et al., 1991). Serotoniin on seotud mitmete füsioloogiliste funktsioonidega: uni, mälu, toitumine, kognitiivsed funktsioonid ja meeleoluhäired. 5HT-süsteemis on oluliselt rohkem retseptorite alatüüpe kui NA-süsteemis. On teada seitse 5HT retseptorite perekonda ning vähemalt 14 retseptori alatüüpi. Esimene selge farmakoloogiline vihje galaniini seotusest depressioonimehhanismidega

saadi käitumiskatsetest närilistel. Selleks kasutati tänapäeval väga laialdaselt kasutatavat depressiooni seiretesti – Porsolt (ehk sundujumise) test – kus looma teatud käitumismuster korreleerub (teadmata põhjustel) ravimi antidepressiivse toimega. Selle testiga nähti, et rottide ventraalsesse katendialasse (VTA) galaniini manustamisel, saadi rohkem depressiivset käitumist. Mõjutatud olid nii motoorne aktiivsus kui ka hüvede tarbimisega seotud mehhanismid (Kuteeva et al., 2008).

Tulemused antidepressantide seiretestis tekitasid suurema huvi galaniini ja kliinilise depressiooni uurimiseks. Näiteks saadi huvitavad tulemused meeleoluhäiretega inimestega: sügava depressiooniga patsientidele manustati intravenoosselt galaniini ning ilmnes selge akuutne antidepressiivne efekt (Murck et al., 2004). See efekt oli eeldatavasti seotud mesolimbiliste dopamiinergiliste neuronite aktiivsuse pärssimisega, mis vähendab dopamiini vabanemist. Lähtuvalt hiljutistest tulemustest närilistel depressioonimudelites, on välja pakutud, et GalR1 alatüüp vahendab "prodepressiivseid" ja GalR2 "antidepressiivseid" efekte (Kuteeva et al., 2008).

Galaniini potentsiaalne roll meeleoluhäirete juures baseerub roti puhul galaniini kolokaliseerumisel noradrenaliiniga locus coeruleuses, serotoniiniga dorsaalses raphe tuumas ja nende projektsiooni aladel limbilises süsteemis ja peaaju korteksis. Need kaks monoamiinergilist tuuma mängivad depressioonis peamist rolli. Locus coeruleuses on neurotransmitterite koosinemine galaniiniga väga kõrge (ligi 100% neuronitest), raphe-tuumas mõnevõrra madalam (umbes 70%) (Kuteeva et al., 2008).

Esimene farmakoloogiline tõestus galaniini osalusest depressioonilaadses käitumises saadi galaniini manustamisel roti ventraalsesse tegmentaalsesse alasse (VTA), kui nähti suurenenud immobiilsust antidepressandi toime esmases seiretestis (FST) (Weiss et al., 1998). Efekti seostati sellega, et galaniin vähendab dopamiini vahendatud signaaliseerimist naalduvas tuumas (NAc), mis oli põhjustatud noradrenaliinergilisest aktivatsioonist locus coeruleus-st (LC) ventraalsesse tegmentaalsesse alasse (VTA). GalR2 antidepressiivse efekti mehhanism võib olla vahendatud 5HT (DR) ja NA (LC) interaktsiooni muutumise poolt. Need on samad kesknärvisüsteemi alad, mis vahendavad ka GalR1 aktivatsiooni korral prodepressiivseid efekte (Weiss et al., 1998).

Depressiooni patofüsioloogiasse on jäänud palju ebaselget, kuid see hõlmab aju monoamiinergiliste ülekannete häireid (Kuteeva et al., 2008). Neuropeptiidid, sealhulgas galaniin, on meeleoluhäirete juures asjakohased ning olulised. Galaniin reguleerib noradrenaliini ja serotoniini süsteeme, mis mõjutavad otseselt depressioonikäitumist (Kuteeva et al., 2008). Hetkel on käimas uurimine, kas selliseid aineid saab kasutada kliinilistes uuringutes meeleoluhäiretega patsientidel.

Depressiooni loomkatsemudelid

Juba üle 50 aasta on arendatud mitmeid depressiooni loomkatsemudeleid, mis põhinevad depressiooni teoreetilistele aspektidele. Hoolimata asjakohasuse küsitavusest ja madalast ennustavast valiidsusest, on loomkatsed olnud üliolulise tähtsusega uute kliiniliselt efektiivsete ravimite avastamises (McArthur & Borsini, 2006). Tõsi, ennustav valiidsus on saavutatud eeskätt ravimite seiremodelitega, millel puuduvad mitmed depressioonimudeli valiidsuse tunnused. Lisaks käesolevas töös kasutatud sotsiaalse lüüasaamise katsele, on näriliste puhul kõige laialdasemalt kasutatud järgmisi seireteste ja depressioonimudeleid:

- sundujumise test – erinevalt kaasaegsemast, modifitseeritud sundujumise testist, on algupärasel testil mõned protseduurilised üksikasjad täpsustamata või ei ole neile tähelepanu pööratud. Näiteks vee sügavus anumast on madalam (modifitseeritud variandis on vee sügavus umbes 30 cm).
- sabastriputamise test (tail suspension test)
- olfaktoorne bulbektoomia (olfactory bulbectomy)
- õpitud abitus (passive/active avoidance seadmega) (learned helplessness)
- krooniline kerge stress (chronic mild stress)
- sünnieelne stress (prenatal stress)
- sotsiaalne lüüasaamine (social defeat)
- sissetungija test (resident intruder)
- intrakraniaalne enesestimuleerimine närilistel (ärajäämanähud) (withdrawal syndrome)

Järgnevalt on toodud lühiülevaade enimlevinud depressioonimudelite tugevustest ja puudustest.

Sundujumise test (forced swim test). Testi kasutamine on lihtne, usaldusväärsus on kõrge ning testi spetsiifilisus on samuti kõrge. Test on tundlik akuutsele antidepressandi manustamisele, kuid samas ei määra test usaldusväärselt SSRI-tüüpi (5HT tagasihaaret pärssivaid) antidepressante. Samas ei oma akuutne manustamine kliinilises mõistes suurt tähtsust, sest inimesel akuutne antidepressandi manustamine efekti ei oma. Sundujumise test on kõige laialdasemalt kasutatud prekliiniline meetod ennustamiseks antidepressiivset toimet (Cryan et al., 2002).

Sabastriputamise test (tail suspension test). Test on teoreetiliselt kontseptsioonilt sarnane sundujumise testiga, sest mõlema testi puhul toimub ravimi mõju määramine immobiilsuse ajale tuginedes. Metodoloogiliselt on test lihtne, usaldusväärsus on kõrge ning võimalik määrata lai hulk

antidepressiivseid ravimeid (Cryan et al., 2002). Lisaks on võimalik vaadelda ka liigutuste energiat ning võimsust. Samas tuleb arvestada loomade liigutuste fenotüüpset erinevust – näiteks C57BL/6 ei ole selleks testiks ideaalsed loomad, sest neil esineb tendents oma saba pidi üles ronida (Cryan & Mombereau, 2004). Akuutse manustamisega seotud puudused on samad, mis sundujumise testil.

Olfaktoorne bulbektoomia (olfactory bulbectomy). Metodoloogiliselt on tegemist eelmistest keerukama protsessiga, sest loomal eemaldatakse bilateraalselt haistesibulad, mis põhjustavad neurokeemilisi, -endokriinseid ja -immuunseid ning käitumuslikke muutusi, mis on võrreldavad sügava depressiooni sümptomitega. Peamine erinevus kahe eelnevaga – indutseeritakse depressioonilaadne seisund. Depressioonimudelite hindamisel on olfaktoorne bulbektoomia saanud kõrgeima valiidsuse võrreldes teiste depressioonimudelitega (Cryan & Mombereau, 2004). Testi usaldusväärsus ja spetsiifilisus on kõrged. Samas sobilik ainult kroonilise manustamise korral (Cryan et al., 2002).

Õpitud abitus (learned helplessness). Depressioonilaadne seisund kutsutakse esile tajutud kontrolli puudumisega keskkonna üle. Puudusteks on kaks olulisemat aspekti: enamik depressioonilaadseid sümptome kaob kahe kuni kolme päeva jooksul pärast kontrollimatute šokkide lõpetamist. Lisaks areneb abitus välja ainult teatud hulgal loomadel (vahemikus 10% - 80%). Hiirtel esineb ka suuri erinevusi erinevate liinide ja sugude vahel. Mudeli usaldusväärsust ja metodoloogilist keerukust hinnatakse keskmiseks. Spetsiifilisus on seevastu kõrge. Mudel on tundlik lühiajalisele ravile ja sellega on võimalik määrata lai hulk antidepressiivseid ravimeid, kuid on mõningates riikides tõkestatud eetiliste piirangutega (Cryan et al., 2002).

Krooniline kerge stress (chronic mild stress). Depressioonilaadne seisund kutsutakse esile kasutades kahe nädala jooksul kergeid ennustamatuid stressoreid. Mõõdetavad parameetrid, suhkruaegne ja intrakraniaalne enesestimulatsioon, on seotud anhedooniaga, mis on üks peamine depressioonisümptom. Testi kasutamine on keerukas ja usaldusväärsus on madal, kuid spetsiifilisus on kõrge. Tundlik ainult kroonilisele ravile (Cryan et al., 2002).

Ravimi ärajäämanähud (drug withdrawal). Võimaldab esile kutsuda alanenud uudishimu ja tugevat ebamugavustunnet. Amfetamiini ärajäämanähud on välja pakutud sobiva vahendina depressiooni indutseerimiseks (Cryan & Mombereau, 2004). Testi kasutamist peetakse keeruliseks, usaldusväärsust kõrgeks ja spetsiifilisust keskmiseks. Mudel eeldab edasist valideerimist. Mudel ei suuda eristada liinivahelisi erinevusi (Cryan et al., 2002).

Kõikides kirjeldatud mudelites on võimalik mõningate modifikatsioonide abiga kasutada nii rotte kui ka hiiri (Cryan et al., 2002).

Depressioonimudelite analüüs

Loomkatsemudelid on asendamatud ja hädavajalikud vahendid uute antidepressantide otsingus ja identifitseerimises. Samuti võimaldavad need leida uusi teadmisi depressiooni neuropatoloogia kohta. Depressiooni loomkatsemudelites esineb palju küsitavusi. Näiteks esmaste seiretestides (sundujumine, sabastriputamine) mõjub akuutselt manustatud antidepressiivne ravim loomale vähem kui 30 minutiga. Inimestel algab anti-depressantide toime üldjuhul 3-4 nädala pärast. Seega tekib kohe ilmselge küsimus – kas loommodelis mõõdetud suurus on tegelikult depressioon?

Teine kitsaskoht on asjaolu, et kõige sagelikasutatavad testid mõõdavad antidepressiivset toimet mittedepressiivsetel loomadel. Seega on tõenäoline, et loomkatsemudelid mõõdetava parameetri ja antidepressandi kliinilise efektiivsuse vahel esineb vaid korrelatiivne, aga mitte põhjuslik seos. See ei tähenda muidugi, et olematu valiidsuse, mis on autori isiklik hinnang, juures need mudelid täiesti kasutud oleks. Testi tagamaid teades ja seda arvesse võttes, on kokkuvõttes tegemist äärmiselt vajaliku ja asendamatu seiremeetodiga, mis mingil teadmata põhjusel ennustab uute ühendite antidepressiivset toimet. Kõige sagedamini kasutatavad depressiooni loomkatsemudelid kasutavad looma depressioonilaadseesse seisundisse viimiseks stressi. Stressi esitamisega, mis võib olla tugev, ennustamatu, pikaajaline, pidev jne, tekitatakse loomale seisund, mida implitsiitselt defineeritakse depressioonina. Võrreldes seda lähenemist inimestega, tekib vastuolu: lähtuvalt depressiooni tekitavast stressist, peaks stressi või traumeeriva elusündmuse järel tekkima inimestel depressioon. Inimeste puhul saab sellisel juhul rääkida posttraumaatilisest stressihäirest, mis aga ei ole depressioon. See puudujääk võib selgitada mitmeid kitsaskohti loomkatsemudelites, muuhulgas seda, miks käitumuslik efekt (oletatav depressioonilaadne seisund) kaob mõne päeva jooksul pärast looma viimist normaalsesse keskkonda. See omakorda muudab väga keeruliseks antidepressantide kroonilise toime hindamise: käitumuslik efekt kaob ka ilma antidepressiivse ravita.

Sotsiaalse lüüasaamise katse, kus kümne päeva jooksul üritatakse agressorlooma ründamise abil depressioonilaadset seisundit esile kutsuda, nõrgaks küljeks on asjaolu, et depressiooni esilekutsumisel ei esine 30-40% loomadest antidepressiivset käitumist. Seejuures 65-75% inimestest ei allu antidepressiivsele ravile. Millega selliseid tulemusi selgitada? Kas siin mängib peamist rolli depressioon või on oma osa ka mõnel teisel psühholoogilisel või füsioloogilisel protsessil: mälu, ärevus või hoopis miski kolmas? Kõigil depressioonimudelitel on omad nõrkused ning ideaalilähedast mudelit pole seni õnnestunud välja mõelda, mistõttu tuleb nendest mudelitest saadud tulemustesse suhtuda mõningase ettevaatlikkusega. Depressioonimudelite ja kaasaegse depressiooniravi kitsaskohad on eelkõige põhjustatud haiguse heterogeensusest: sümptomid

avalduvad nii füsioloogilisel, käitumuslikul kui ka psühholoogilisel tasandil, mis teeb selle modelleerimise keeruliseks. Näiteks kahte depressioonisümptomit, surma- ning suitsiidimõtteid ja tugevat süütunnet on katseloomal võimatu modelleerida (Cryan et al., 2005).

Lisaks sellele on depressiooni patofüsioloogias veel palju ebaselget. On teada, et naistel esineb sügavat depressiooni oluliselt rohkem kui meestel, ehkki kuni puberteedini ei esine soolisi erinevusi sügava depressiooni esinemises. On mitmeid bioloogilisi, psühhosotsiaalseid ja sotsioloogilisi teooriaid, mis üritavad seda seletada, kuid ükski neist pole piisavalt seletav. Hetkel ei ole võimalik öelda, milline depressiooniravi (SSRI või tritsükliline) on efektiivne erinevatele patsientidele, kuid sugu ja menopaus on kindlasti antidepressandi efektiivsusega seotud (Dalla et al., 2009). Soolised erinevused kehtivad nii haiguse esinemise sageduse, haiguse suuna kui ka ravile allumise suhtes. Sellele kliinilisile faktile tuginedes, on mõnevõrra paradoksaalne, et suur enamik käitumiskatseid viiakse läbi isaste loomadega. Isaste loomade kasutamise kasuks räägib eelkõige asjaolu, et isastel loomadel puuduvad hormonaalsed östrutsüklid, mida ei pea kontrollima ja arvesse võtma. Seetõttu on katsed isasloomadega väiksema variatiivsusega (Cryan et al., 2005). Sageli on tõstatatud küsimus, kuidas me teame, kas laboratooriumi katseloom on "depressioonis"? Kõige rohkem viidatud kriteerium depressioonimudelite loomiseks arendati McKinney ja Bunney poolt 1969. aastal. See sisaldab järgmisi nõudeid:

- loomkatsemudel on "mõistlikult analoogne" inimese häire esinemise või sümptomitega.
- peab esinema käitumuslik muutus, mida on võimalik objektiivselt jälgida.
- täheldatud käitumuslikke muutuseid peaks saama annulleerida samade ravivõimalustega, mis on efektiivsed inimeste puhul.
- mudel peaks olema erinevate uurijate poolt reprodutseeritav (Cryan et al., 2002).

Hiirte geneetilist modifitseerimist võib pidada oluliseks läbimurdeks tänapäeva meditsiinis, puudutades kõiki valdkondi, sealhulgas psüühilisi haigusi (Cryan & Mombereau, 2004). Näiteks *knock-out* strateegiad on loonud täiesti uued võimalused depressiooniravimite sihtmärkideks (Cryan et al., 2002). Lisaks *knock-out* strateegiale, kasutatakse veel geeni mahasurumine (*knockdown*), punktmutatsioonid, juhuslikult muteerunud ja transgeenset tehnoloogiat. Tähelepanuta ei tohi jätta ka erinevatele hiireliinidele omaseid käitumuslikke erinevusi: näiteks sundujumise katses on hiireliin kriitiline muutuja, mis määrab soorituse keskmist taset ja tundlikkust erinevatele antidepressantidele (Lucki et al., 2001).

MEETOD

Sotsiaalne lüüasaamine

Sotsiaalne lüüasaamine on atraktiivne ja efektiivne mudel (Joonis 2), et uurida uue potentsiaalse ravimi antidepressiivset efekti ja võrrelda uue ravimi mõju traditsioonilise antidepressandiga. Sotsiaalse lüüasaamise mudel on tundlik ainult kroonilisele antidepressandi manustamisele. Akuutse manustamise korral ravimi antidepressiivne mõju ei avaldu (Berton et al., 2006). See on ka sotsiaalse lüüasaamise peamine erinevus teistest loomkatsemudelitest, kus enamasti toimib vaid akuutne manustamine. Lisaks sellele on sotsiaalne mudel uuem ning selle mudeli kasutamise puhul on vastuvõetav, et kõikidel loomadel ei teki depressiooni (Berton et al., 2006).

Mudeli ülesehitus koosneb depressiooni indutseerimisest (10 päeva), depressiooni mõõtmisest pärast kümnet päeva, antidepressiivsest ravist (4 nädalat) ja depressiooni mõõtmisest pärast ravi lõppu (Joonis 2).

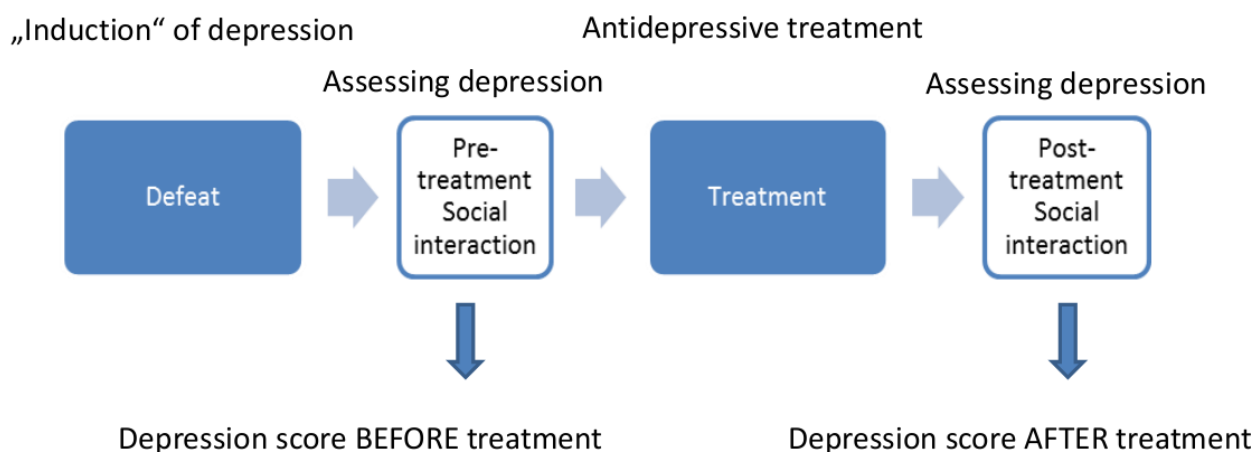
Depressiooni indutseerimine. Standardiseeritud korduva sotsiaalse lüüasaamise mudeli jaoks on vajalikud katseloomad (näiteks C57BL/6J), kelle peal lüüsaamine toimub, ja katseloomadest suuremad agressorloomad (näiteks CD-1), kellel on eelnevalt skriinitud agressiivne käitumine. Skriinimine on väga oluline, sest agressiivse käitumise tase võib CD-1 hiirte seas tugevalt varieeruda. Umbes poolte CD-1 hiirte agressiivsuse tase on liiga madal ja on eksperimendi jaoks sobimatud (Berton et al., 2006). On teada, et erinevate hiirteliinide stressi- ja ärevuskäitumises esineb erinevusi. C57BL/6J on stressile vastupanuvõime teiste liinidega võrreldes halvem, mis on sotsiaalse lüüasaamise jaoks sobiv. Hiired olid katse alguses 7-8 nädala vanused. Jook ja söök oli katse käigus *ad libitum*, väljaarvatud interaktsiooni ja sotsiaalse lüüasaamise ajal.

Iga päev toimub üks sotsiaalne lüüasaamine kümne minuti jooksul, järgnevad 24 tundi veedavad loomad samas puuris, kuid puur on jagatud augustatud pleksiklaasi abil kaheks (Joonis 3). Loomad ei puutu omavahel kokku, kuid tänu aukudele tunnetavad teise looma lõhna ja olemasolu. Iga päev pannakse katseloom kokku uue agressoriga, et vältida harjumist. Katse käigus selgus kriitiline asjaolu, mida tuleb kindlasti jälgida: kui agressorloom ei ründa, siis tuleb loom asendada uue agressoriga, et agressiivne rünnak kindlasti toimuks. Vastasel juhul tekib katseloomadel depressioonikäitumist märgatavalt vähem, mis omakorda näitab, et sotsiaalne allasurumine on kvantitatiivselt seotud hiljem mõõdetud depressiivse käitumise suurusega. Kui tõmmata paralleele inimkäitumisega, on depressioonikäitumise põhjustajaks madal enesehinnang, mis tuleneb järjepidevast lüüasaamisest (Marrow et al., 1999). Lüüsaamine toimub kümnel järjestikusel päeval. Enamikele katseloomadele tekitab selline kohtlemine sotsiaalse vältimise esilekutsumist, mis

väljendub sotsiaalse interaktsiooni katses võõra looma vältimist. Umbes ühel kolmandikul loomadel sotsiaalse vältimise esilekutsumine ei õnnestu. Sotsiaalse lüüasaamise läbinud loomadel esinevad järgmised sümptomid: kasvanud ärevuselaadne käitumine, kehakaalu kasv ja suurenenud kortikosterooni vabanemine (Berton et al., 2006).

Depressiooni mõõtmine. Pärast kümmet (kümne päeva jooksul) järjestikust sotsiaalset lüüasaamist, tuleb järgmise etapina mõõta võõra looma vältimist sotsiaalse interaktsiooni katses. Erinevus standardsest interaktsioonikatses on asjaolu, et agressorloom on väikeses suletud puuris ning füüsiline kontakt agressori ja katselooma vahel on välistatud (Joonis 3). Katse koosneb kahest osast. Esmalt asetati loom tühja interaktsioonikasti ning mõõdeti interaktsioonitsoonis viibitud aega. Teises seerias on interaktsioonikastis ka agressorloom ning katselooma viibimist agressorlooma läheduses võrreldakse esimesest seeriast saadud samas alas viibimisega, mis võimaldabki hinnata vältimiskäitumist. Mõlemad mõõtmised kestavad 150 sekundit ning kahe seeria vahe peab olema umbes 30 sekundit, mille ajal asetatakse loom oma puuri. Toimub kaks (või rohkem) mõõtmist (Joonis 2): esmalt pärast kümmet päeva sotsiaalset lüüasaamist ning seejärel pärast ravimite manustamist (4 nädalat).

• Experimental setup



Joonis 2. Sotsiaalse lüüsaamise mudeli eksperimentaalne ülesehitus.

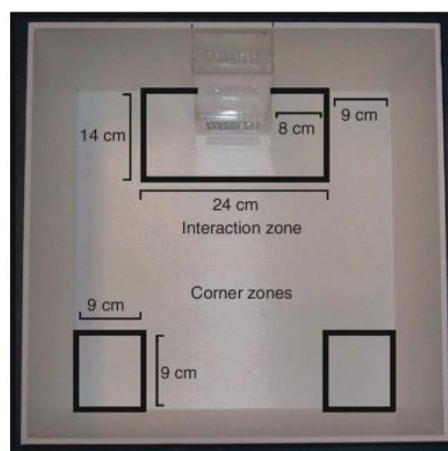
Katse läbiviimiseks vajamineva aparatuuri alla kuuluvad järgmised vahendid: videokaamera (soovitavalt infrapunafunktsiooniga, sest interaktsioon peaks teoreetiliselt toimuma pimedas või väga hämara valgustusega); interaktsioonikast (42x42cm), kuhu on markeriga märgitud ka kriitilised alad (vt. joonis 3); kaks väikest puuri (ühes paikneb agressorloom, teine on

uudistamiskäitumise mõõtmiseks, kui katseloom on interaktsioonikastis üksi); 5 %-line etanooli lahus ja vahendid kasti puhastamiseks.

Sõltuvaks muutujaks on sotsiaalses tsoonis viibitud aeg. Sotsiaalne tsoon on nelinurkne ala, kus asub ka agressorlooma puur (või tühi puur).

Induction of depression:

Assessment of depression:



Joonis 3. Sotsiaalse lüüasaamise depressiooni indutseerimise puurid ja sotsiaalse interaktsiooni puur.

Katseloomad ja uuringuravim

Katseloomad jaotati sotsiaalse lüüsaamise katses kolme gruppi: uuringuravimi grupp, kontrollgrupp ja standardravimi grupp. Uuringuravimi grupi loomadele manustatakse (i.p) igapäevaselt (kokku 28 päeva) GalR2 agonisti (20 mg/kg). Võrdluseks kasutada standardravimit (imipramiin, 20 mg/kg) ning kontrollgrupi loomadele manustatakse füsioloogilist lahust. Lisaks veel kontrollgrupi loomad, kes ei osale sotsiaalses lüüsaamises ega saa ühtegi ainet. Gruppidesse jaotamisel võrdsustati sotsiaalse interaktsiooni mõõtmise skoorid sedasi, et iga grupi keskmine sotsiaalses tsoonis veedetud aeg oleks võimalikult sarnane. Eraldi grupina olid veel kontrollgrupi loomad, kes ei puutunud kokku agressorloomadega ja ei osalenud sotsiaalses lüüsaamises. Lisaks on vaja agressorina kasutatavaid loomi. Nendeks olid CD1 (paaritusloomad) isased loomad, kelle rünnakulatents on lühem kui 30 sekundit kolmes järjestikuses katses.

TULEMUSED

Tulemused 1

Sotsiaalse lüüsaamise katse on osaks suuremast projektist, mille käigus disainiti ja testiti uut tüüpi GalR2 agoniste. Töö autor osales enamikes depressiooni skriinimise katsetes, millekohane publikatsioon on avaldatud (Saar et al., 2013).

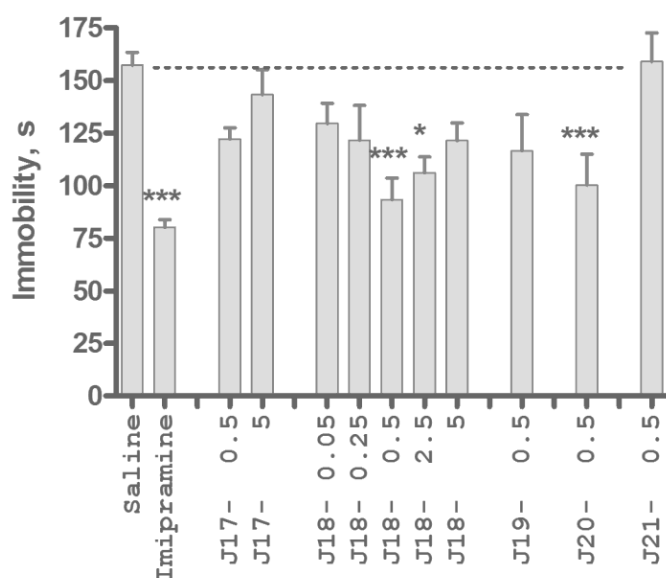
Uurimuses kasutatud peptiidide aminohapete järjestused ja afiinsused (nanomolaarses skaalas) on allolevas tabelis (Tabel 1). Peptiide J17-J21 testiti kolmes sõltumatus eksperimendiseerias, et hinnata peptiidide seondumise omadusi. Üldiselt omavad kõik modifitseeritud analoogid seondumisaktiivsust galaniini retseptoritega ning esineb tendents suurema selektiivsusega GalR2 suunas, kuigi selektiivsus pole väga kõrge. Tulemused viitavad, et peptiidid J18 ja J20 on kõige potentsiaalsemad, sest nende afiinsus GalR2-le on kõige kõrgem ning ainult sidumisandmeid vaadates võib oletada, et J20 võiks omada efektiivset toimet läbi kõigi kolme retseptori, aga J18 pigem selektiivselt läbi GalR2. Seetõttu valisime edasiseks uuringuks J18.

Tabel 1. Aminohapete järjestused ja afiinsused uurimuses kasutatud peptiidide kohta. Järjestustes on sinisega tähistatud galaniinist pärit osa ning punasega tehtud keemilisi modifikatsioone.

Name	Sequence	K _i GalR1 (nM)	K _i GalR2 (nM)	K _i GalR3 (nM)	K _i GalR1/GalR2	K _i GalR3/GalR2
Galanin(1-29), rat	G WTLNSAGYLLGP HAIDNHRFSFDKHGLT-amide	1.75 ± a 1.7	2.98 ± a 1.4	4.49 ± a 0.8	a 0.6	a 1.5
b M1153	RGRGN- WTLNSAGYLLGP K(ε-NH-C(O)CH(NH) ₂ COOH) – amide	587 ± a 250	6.55 ± a 2.7	497 ± a 150	b 380	b 46
a M1145	RGRGN- WTLNSAGYLLGP VLPPPALALA - amide	1890 ± b 329	4.98 ± b 0.81	230 ± b 149	a 90	a 76
J17	RGRGN- WTLNSAGYLLGP - KKK (εNH-C(O) stearic acid)-amide	156 ± 102	29 ± 18	125 ± 94	5.4	4.3
J18	RGRGN- WTLNSAGYLLGP - kkk (εNH-C(O) stearic acid)k-amide	138 ± 46	20 ± 8.0	112 ± 14	6.9	5.6
J19	RGRGN- WTLNSAGYLLGP - ¹ O ¹ K(εNH-C(O) stearic acid) O ¹ - amide	231 ± 120	83 ± 23	114 ± 70	2.8	1.4
J20	RGRGN- WTLNSAGYLLGP - XXK (εNH-C(O) stearic acid)K-amide	25 ± 5.5	4.9 ± 1.6	13 ± 7.0	5.1	2.7
J21	¹ O ¹ GO GN- WTLNSAGYLLGP - O ¹ O K(εNH-C(O) stearic acid) O ¹ - amide	138 ± 60	41 ± 22	65 ± 8.6	3.4	1.6

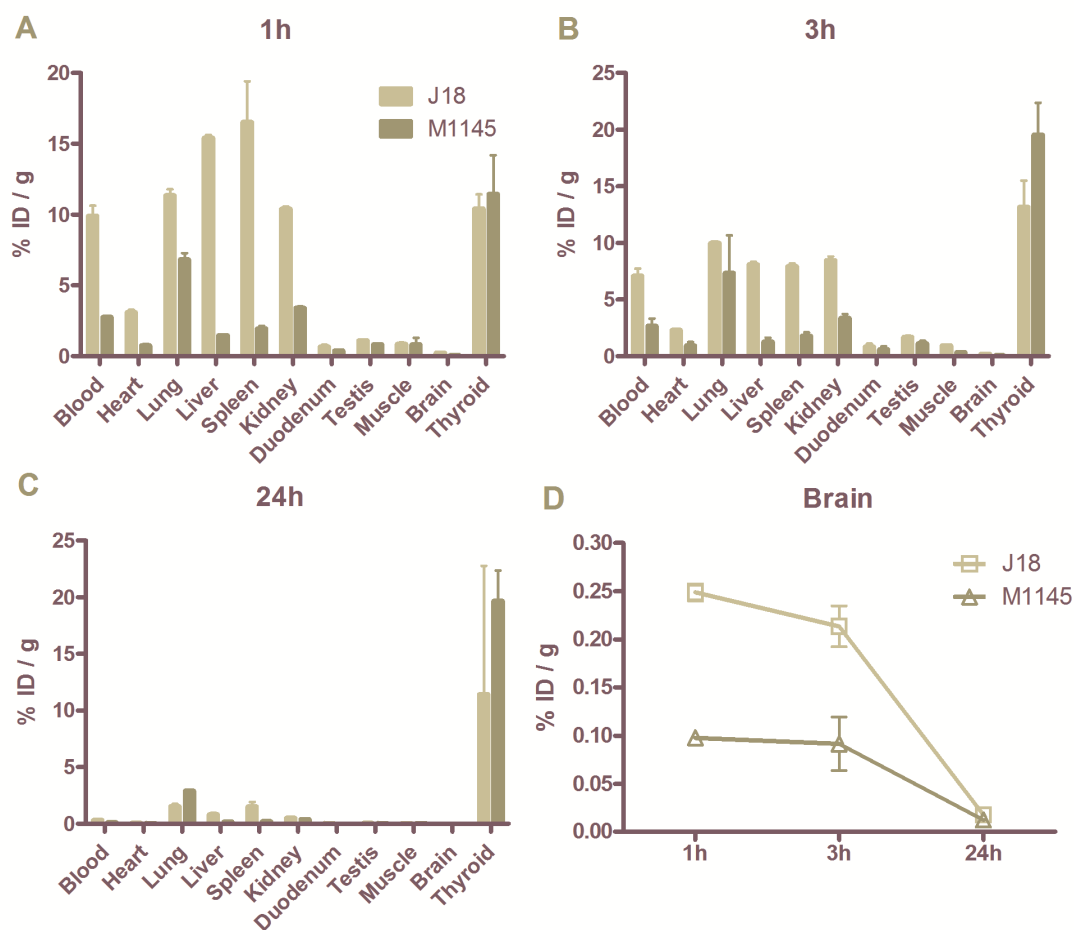
X – 6-aminohexanoic acid; O¹ - Ornithine; ^a (Runesson et al. 2009) ^b (Saar et al. 2011)

Järgmisena testisime uute peptiidide potentsiaalset aktiivsust hiire depressiooni seiretestis (sundujumine), manustades galaniini analooge (i.v.). Sundujumise testis pärast ühekordset intravenooset (i.v.) manustamist oli J18 ja J20 antidepressiivne efekt (ANOVA F (11, 81) = 6.21) võrreldav imipramiini efektiga. Mitmed modifitseeritud peptiidid mõjutasid hiire käitumist depressiooni loomkatsemudelil (Joonis 4). Mida madalam on immobiilsuse aeg, seda tugevam on ravimi antidepressiivne toime.



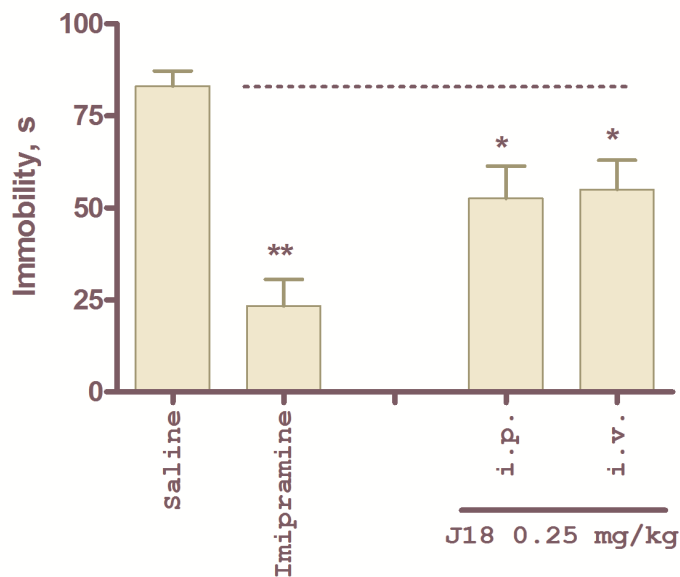
Joonis 4. Immoibiilsuse ajad erinevate peptiidide ja erinevate kontsentratsioonidena sundujumise testis, võrrelduna füsioloogilise lahuse ja standardse antidepressandiga (imipramiin). Doosid (mg/kg) on X-teljel, immobiilsuse ajad on Y-teljel. Tärnid tähistavad Tukey post-hoc analüüsi võrreldes füsioloogilise lahuse grupiga. *** $p < .001$, ** $p < .01$, * $p < .05$.

Kuigi sundujumise testi tulemused (Joonis 4) lubasid oletada, et uued analoogid omavad aju kaudu vahendatud aktiivsust, testisime uute modifikatsioonide mõju biodistributsioonile, kasutades radioaktiivselt märgistatud peptiide. Modifikatsioonidega peptiidi J18 levikut võrreldi ilma modifikatsioonideta eellaspeptiidi (M1145) levikuga. J18 tasemed olid oluliselt kõrgemad kõigis kudedes 1h ja 3h pärast mansutamist, kui ilma stearüülita peptiidil M1145 (Joonis 5). Samuti oli J18 üldtase ajus 2,5 korda kõrgem, võrreldes kontrollpeptiidiga. Tõenäoliselt on sellised tulemused saadud tänu kõrgemale stabiilsusele ja lipofiilsusele, mis on põhjustatud stearüüli ja mittenaturaalsete aminohapete lisamisest.



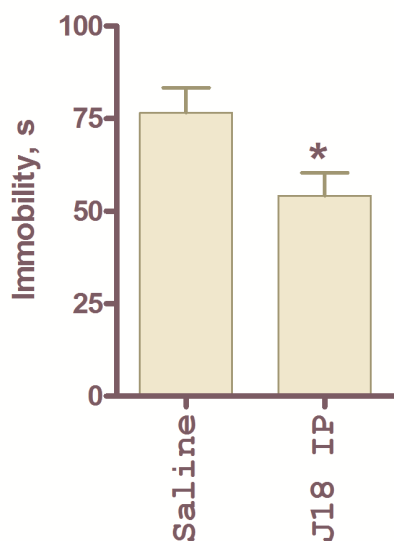
Joonis 5. Peptiidide J18 ja M1145 biodistributsioon pärast ainete manustamist (i.v. 0,5 mg/kg).

Edastisteks uuringuteks valiti üks peptiid, J18. Kui depressiooni mõistes on oluline ravimi krooniline manustamine, siis esialgu testisime sabastruputamise testis intraperitoneaalse (i.p.) manustamisviisi toime olemasolu võrrelduna i.v. manustamisega, sest kroonilisel manustamisel on i.p. manustamisviisi lihtsam läbi viia ja see on loomale vähem stressitekitav. Akuutne i.p. manustamine andis sarnase toime (ANOVA $F(3, 23) = 7.5$, $p < .01$) võrreldes i.v. manustamisega (Joonis 6).



Joonis 6. Immoibiilsuse ajad i.p. manustamine (0,25 mg/kg) võrreldes i.v. manustamisega sabastriputamise testis, võrrelduna saliini ja standardse antidepressandiga (imipramiin). Tärnid tähistavad Tukey post-hoc analüüsi. ** $p < .01$, * $p < .05$.

Seejärel tahtsime hinnata J18 antidepressiivset toime säilimist kroonilise manustamise puhul. Krooniline J18 manustamine (0.25 mg/kg) 17 päeva jooksul säilitas J18 antidepressiivse toime sabastriputamise testis (Tukey post-hoc $p < .05$, ANOVA $F(1,25) = 5.98$) (Joonis 7).

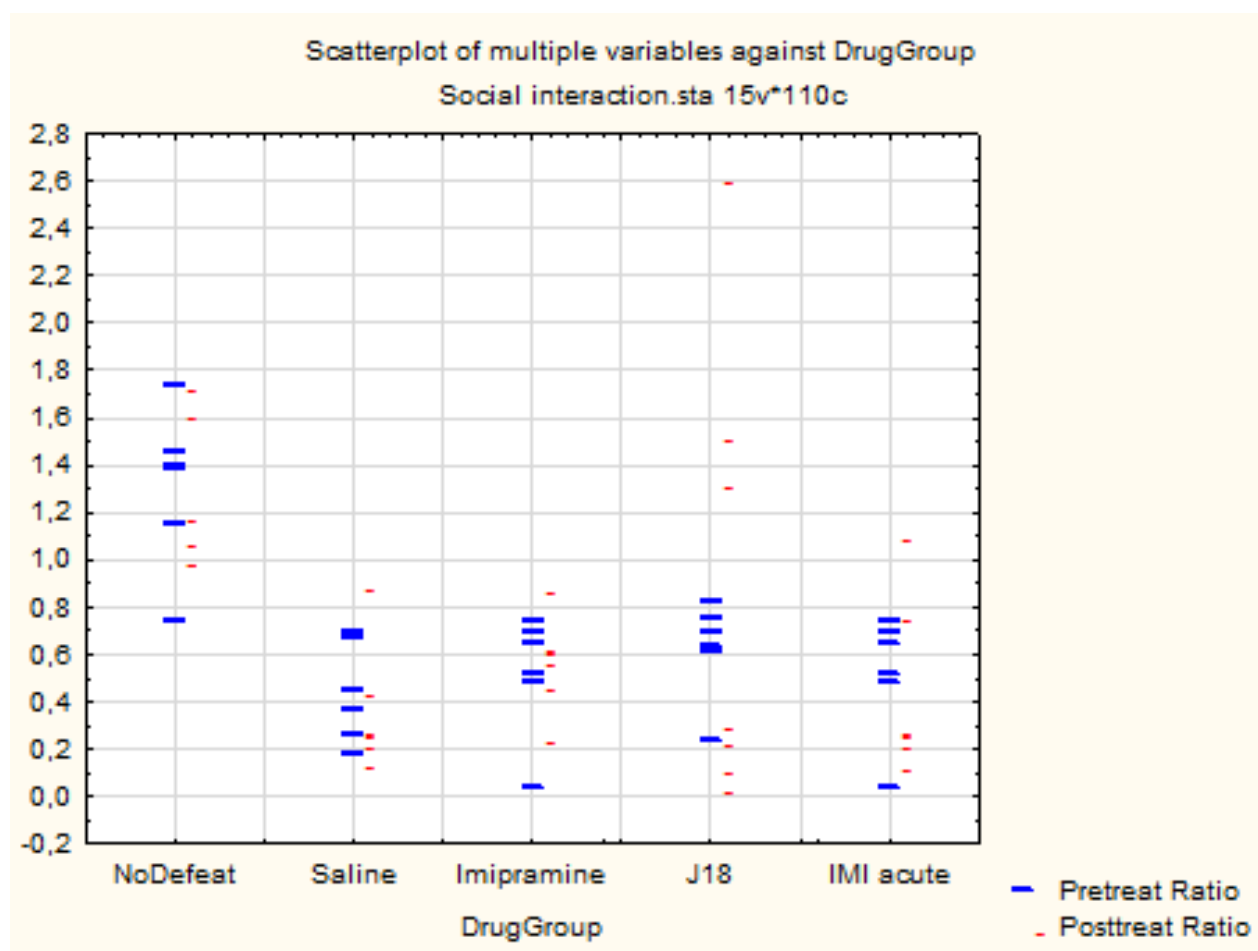


Joonis 7. Immoibiilsuse ajad pärast kroonilist J18 manustamist (i.p.) (0.25 mg/kg) 17 päeva jooksul võrreldes füsioloogilise lahusega sabastriputamise testis. Tärnid tähistavad Tukey post-hoc analüüsi.

* $p < .05$.

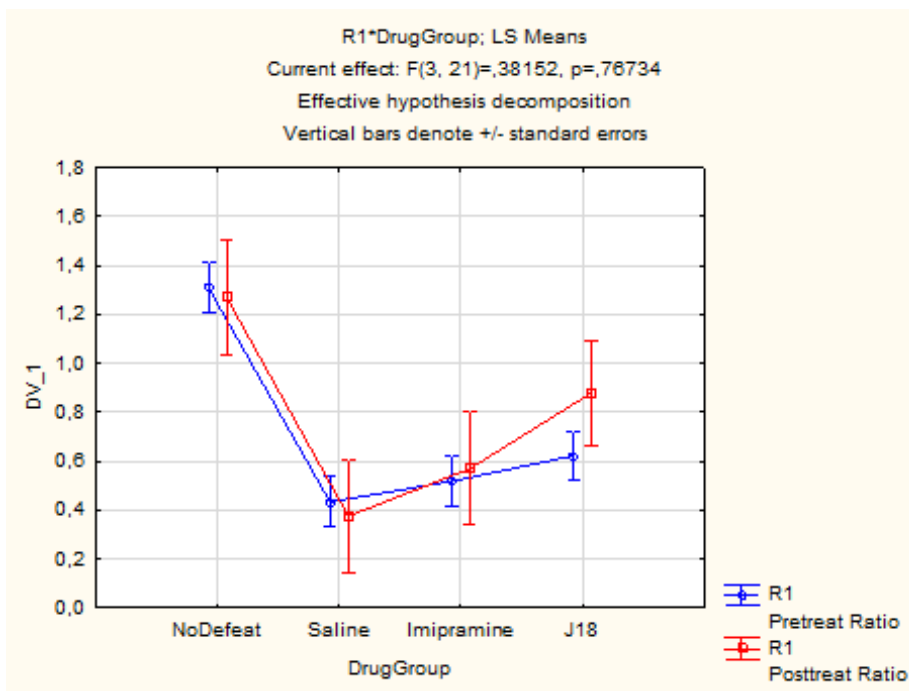
Sotsiaalse lüüasaamise tulemused

Sotsiaalse lüüasaamise tulemuste hindamiseks on peamiseks parameetriks vältimiskäitumist väljendav suhe (ratio), mis näitab, kui palju veetis loom aega interaktsiooni tsoonis agressorlooma olemasolul võrreldes agressorlooma puudumisega. Suhe < 1 iseloomustab depressiivset (vältivat) käitumist ja suhe > 1 antidepressiivset (vältimise puudumist, normaalset) käitumist (Joonis 8, 9). Olgu märgitud, et normaalsetel katseloomadel on suhe alati > 1 . Sinine joon tähistab tulemusi pärast sotsiaalset lüüasaamist enne ravi algust ning punane joon tähistab tulemusi pärast ravi lõppu. Positiivse kontrolli rühmas (imipramiin 20 mg/kg/100ul) ei selgunud paranemist ehk looma depressiivse käitumise vähenemist mitte ühelgi loomal. Mõnevõrra üllatuslikult on näha J18 (20 mg/kg/100ul) tendentsi paranemise poole, kus kolmel loomal seitsmest esineb selge antidepressiivne käitumine pärast ravi lõppu (neljal loomal paranemist ei toimunud) (Joonis 8).



Joonis 8. Loomade individuaalsed skoorid. Sinine tähistab vältimiskäitumise suhet enne ravi algust ning punane tähistab suhet pärast ravi lõppu.

Eri gruppide tulemuste võrdluseks teostati Tukey Post Hoc analüüs (pooled MS = 0,19, df = 41,88), milles ei ilmnenud statistiliselt olulist erinevust enne ja pärast ravi olukordades ei kontrollgrupi, imipramiini ($p = 0,13$) grupi ega J18 grupi ($p = 0,75$) sees. Samas ilmnes oluline erinevus pärast ravi kontrollgrupi ja füsioloogilise lahuse grupi ($p = 0,02$) vahel. Lisaks saame väita, et sotsiaalne lüüsaamine tekitas olulise depressioonilaadse seisundi või olulise muutuse looma käitumises.



Joonis 9. Sotsiaalse interaktsiooni tulemused: $F(3, 21) = 0,38$, $p > 0,05$. Looma depressiivsust iseloomustab välitumiskäitumine, mis on numbriliselt väljendatud suhtega (ratio), näitab, kui palju viitis loom aega interaktsiooni tsoonis agressorlooma olemasolul võrreldes agressorlooma puudumisega. Suhe < 1 iseloomustab depressiivset käitumist ja suhe > 1 antidepressiivset või normaalset käitumist.

ARUTELU JA JÄRELDUSED

Käesolev magistritöö oli osa suuremast projektist, mille käigus disainiti uut tüüpi peptiidsed (peptiidisarnased) GalR2 agonistid, mis omaksid süsteemset aktiivsust (läbivad aju-vere barjääri). Projekti lõppeesmärgiks oli disainida, luua ja testida *in vivo* uute GalR2 agonistide toimet depressioonimudelites. Töö autori fookuses olnud depressioonitestidele eelnes mahukas keemia-alane projekt koos suure hulga läbiviidud töödega (Saar, 2013; Saar et al., 2013).

Aju-vere barjäär on peamine takistus miks mõningad makromolekulaarsed ained, sealhulgas neuropeptiidid, ei jõua kesknärvisüsteemi. Peptiidide puhul on probleemiks näiteks lühike poolväärtusaeg. Farmakokineetiliste omaduste parandamiseks kasutati varasemalt kirjeldatud keemilisi strateegiaid: süsteemse aktiivsuse tugevdamiseks modifitseeriti (lisati stearüül, lisati mittenaturaalsed aminohapped ja katioonne domään) keemiliselt olemasolevaid potentseid GalR2 peptiidseid agoniste, mis on oma olemuselt galaniini analoogid. Stearüül on rasvhape, mille lisamine molekuli teeb aine rohkem hüdrofoobseks. Teisisõnu on rasvhappe jäägi lisamine potentsiaalne meetod, millega võiks ravim läbida aju-veri barjääri (Bulaj et al., 2008). Eesmärk oli suurendada lipofiilsust, resistentsust ensümaatilisel lagundamisele ja peamine siht oli molekuli bioloogilise efekti säilimine. Biodistributsioonide võrdluses selgus, et modifitseeritud ligand J18 näitas selgelt kõrgemat poolväärtusaega kui modifitseerimata ligand M1145, millest saame järeldada, et tugevdatud stabiilsus ja lipofiilsus suurendasid J18 aju-vere barjääri läbimist.

Edasine töö käik baseerus varasematele tulemustele (Kuteeva, 2007; Saar, 2013), mis näitasid, et GalR2 agonistidel võiks olla antidepressiivne toime. Seetõttu testimise uusi ligande *in vivo* depressiooni seiretestides ja sotsiaalse lüüasaamise depressioonimudelites. Tööst selgus, et keemiliselt modifitseeritud galaniini analoogid (J18) omavad antidepressiivset toimet esmastes depressiooni seiretestides (sundujumine ja sabariputamine). Kui depressiooni mõistes on oluline ravimi krooniline manustamine, siis testisime, kas J18 on võimalik manustada ka i.p., mis on oluliselt mugavam ja vähem stressitekitavam kui i.v. Selgus, et i.p. manustamisviisiga oli võimalik tekitada sarnane antidepressiivne toime nagu i.v. Lisaks sellele saime teada, et J18 antidepressiivne toime säilib ka kroonilisel manustamise (i.p.) sabastriputamise testis. Seega saime teada, et järelikult on mõtet J18 kroonilist toimet mõõta ka depressioonimudelites, mis eeldavad kroonilist manustamist. Lähtudes antidepressandi toime esmaste seiretestide tulemustest, tahtsime näidata J18 antidepressiivset toimet mõnes depressiooni mõistes adekvaatsemas loommudelites ja valisime selleks sotsiaalse lüüasaamise mudeli (social defeat). Mudeli töölesaamisega esines mõningaid probleeme, sest me ei suutnud mudelis näidata antidepressiivset toimet standardravimi

imipramiiniga. Samas ei saa mudeli töölesaamist päris läbikukkunuks nimetada, sest depressiooni indutseerimine toimis ootuspäraselt. Asjaolu, et standardravim ei omanud efekti, viitab siiski sellele, et mudel ei toimunud korrektselt.

Kokkuvõtvalt, käesolevas magistritöös esitleti keemilisi strateegiaid uute ja samas süsteemselt aktiivsete GalR2 selektiivsete peptiidsete ligandide disainiks. Uudseid ühendeid on tulevikus võimalik kasutada erinevate galaniini retseptorite alatüüpide rolli tuvastamiseks erinevates haigustes ja patoloogilistes seisundites. Töös esitletud esmaste skriiningute tulemused viitavad J18 võimalikule antidepressiivsele toimele, mida kinnitavad mitmed tulemused. Töö peamiseks eesmärgiks oli testida J18 toimet mõnes depressioonimudelil, milleks valisime sotsiaalse lüüasaamise mudeli. Hoolimata mudeli töölesaamisega seotud probleemidest, võib autori seisukohalt tööd pidada igati õnnestunuks. Töö autor omandas uusi teadmisi sotsiaalse lüüasaamise mudelist ning depressiooni esmastest seiretestidest ja depressioonimehhanismide toimimisest üldiselt. Sotsiaalse lüüasaamise katse töölesaamisega seotud probleemid panid töö autori süübima täpsemalt depressioonimudelite kitsaskohtadele ning sellest tulenes ka idee kirjutada peatükk depressioonimudelite analüüsimisest. Tööle tuginedes võiks tulevikus olla kaks eesmärki, mis uurimisteemaga jätkamisel kindlasti aktuaalsed oleks: sotsiaalse lüüasaamise mudeli töölesaamise katsetamisega tuleb kindlasti jätkata, et mõista paremini depressioonimehhanisme; arendada tuleks suurema GalR2 spetsiifilisusega ligand, et defineerida paremini galaniini antidepressiivne toime, mis võib tulevikus anda uusi lähtepunkte ravimite valmistamiseks.

KASUTATUD ALLIKAD

<http://www.kliinikum.ee/psyhiaatrikliinik/lisad/ravi/RHK/RHK10-FR17.htm> vaadatud
24.04.2013

Berton O, McClung CA, DiLeone RJ, Krishnan V, Renthal W, Scott JR, Graham D, Tsankova N, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW and Nestler EJ. (2006). Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science* **311**, 864.

Bulaj G, Green BE, Lee H, Robertson CH, White K, Zhang L, Sochanska M, Flynn SP, Scholl EA, Pruess TH, Smith MD, and White HS. (2008). Design, Synthesis, and Characterization of High-Affinity, Systemically-Active Galanin Analogues with Potent Anticonvulsant Activities. *Medicinal Chemistry*, 51(24), 8038-8047

Clark L, Chamberlain S and Sahakian BJ. (2009). Neurocognitive mechanisms in depression: implications for treatment, *Annual Review Neuroscience*, 32, 57-74.

Crisafulli C, Fabbri C, Porcelli S, Drago A, Spina E, Ronchi D and Serretti A (2011) Pharmacogenetics of antidepressants. *Frontiers in pharmacology* 2:6.

Cryan JF, Markou A and Lucki I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238-245.

Cryan JF and Mombereau C. (2004). In Search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behaviour in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry* 9, 326-357.

Cryan JF, Mombereau C and Vassout A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 571-625.

Dalla C, Pitychoutis MP, Kokras N and Papadopoulou-Daifoti Z. (2009). Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 106, 226-233.

- Fisone G, Wu CF, Consolo S, Nordsröm O, Brynne N, Bartfai Y, Melander T and Hökfelt T. (1987). Galanin inhibits acetylcholine release in the ventral hippocampus of the rat: histochemical, autoradiographic, in vivo, and in vitro studies. *Proc Natl Acad Sci*, 84, 7339-7343.
- Fuxe K, Hedlund P, von Euler G, Lundgren K, Martire M, Ögren SO, Eneroth P and Agnati LF. (1991). Galanin/5-HT interactions in the rat central nervous system. Relevance for depression. *Galanin: A New Multifunctional Peptide in the Neuro-Endocrine System* 58, 221–236.
- Holmes A, Heilig M, Rupniak NM, Steckler T and Griebel G (2003). Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, 580-588.
- Hökfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeev V, Ubink R and Diez M. (2000). Neuropeptides: an overview. *Neuropharmacology* 39(8), 1337-1356.
- Hökfelt T, Bartfai T and Bloom F (2003). Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol*, 2(8), 46-472.
- Kolakowski LF, O'Neill GP and Howard AD. (1998). Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *Journal of Neurochemistry*, 71, 2239-2251.
- Kuteeva E. (2007). Brain Galanin Systems and Their Role in Depression-Like Behaviour.
- Kuteeva E, Hökfelt T, Wardi T and Ögren SO. (2008). Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65, 1854-1863.
- Kuteeva E, Wardi T, Lundström L, Sollenberg U, Langel Ü, Hökfelt T and Ögren SO. (2008). Differential Role of Galanin Receptors in the Regulation of Depression-Like Behaviour and Monoamine/Stress-Related Genes and the Cell Body Level. *Neuropsychopharmacology*, 1-13.
- Lawrence CB, Baudoin FM-H, Luckman SM. (2002). Centrally Administered Galanin-Like Peptide Modifies Food Intake in the Rat. A Comparison with Galanin. *Journal of*

Neuroendocrinology, 14, 853-860

Lu X, Barr AM, Kinney JW, Sanna P, Conti B, Behrens MM and Bartfai T. (2005). A role for galanin in antidepressant actions with a focus on the dorsal raphe nucleus. *PNAS*, 102, 874-879.

Lundström L, Sollenberg U and Brewer A. (2005). A Galanin Receptor Subtype 1 Specific Agonist. *Int J Pept Res Ther*, 11, 17-27.

Lucki I, Dalvi A and Mayorga AJ. (2001). Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology*, 155, 315-322.

Mahoney SA, Hosking R, Farrant S, Holmes FE, Jacoby AS, Shine J, Iismaa TP, Scott MK, Schmidt R and Wynick D. (2003). The second galanin receptor GalR2 plays a key role in neurite outgrowth from adult sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 23, 416-421.

Marrow PL, Overton PG and Paul PF. (1999). A re-evaluation of social defeat as a model of depression. *Journal of Psychopharmacology*, 13(2), 115-121.

McArthur R and Borsini F. (2006). Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 84, 436-452.

Merchenthaler I, Lopez FJ and Negro-Vilar A. (1993). Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Progress in Neurobiology*, 40, 711-769.

Mitsukawa K, Lu X, Bartfai T. (2002). Galanin, galanin receptors and drug targets. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 1796-1805.

Murck H, Held K, Ziegenbein M, Kunzel H, Holsboer F ja Steiger A. (2004). Intravenous administration of the neuropeptide galanin has fast antidepressant efficacy and affects the sleep EEG. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 1205-1211.

Musselman DL, Evans DL and Nemeroff CB. (1998). The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry*, 55(7), 580-592.

Runesson J, Saar I, Lundström L, Järv J, Langel Ü. A novel GalR2-specific peptide agonist. *Neuropeptides* 43 (2009), 187-192.

Saar I. (2013). Design of GalR2 subtype specific ligands: their role in depression-like behavior and feeding regulation.

Saar I, Lahe J, Langel K, Runesson J, Karlsson K, Järv J, Rytkönen J, Närvänen A, Kurrikoff K, Langel Ü. (2013). Novel systemically active galanin receptor subtype specific ligands in depression-like behaviour. *Journal of Neurochemistry*, submitted.

Shi TJ, Zhang X, Holmberg K, Xu ZQ and Hökfelt T. (1997). Expression and regulation of galanin-R2 receptors in rat primary sensory neurons: effect of axotomy and inflammation. *Neuroscience Letters*, 237, 57-60.

Waters SM and Krause JE. (2000). Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience*, 95, 265-271.

Weiss JM, Bonsall RW, Demetrikopoulos MK, Emery MS and West CH. (1998) Galanin: a significant role in depression? *Ann N Y Acad Sci*, 863, 364-382.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Jaanus Lahe, 21.08.1984

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Galaniini retseptor 2 (GALR2) spetsiifiliste agonistide testimine depressiooni loomkatsemudelitel, mille juhendajad on Kaido Kurrikoff, Jaanus Harro ja Indrek Saar,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus 27.05.2013