

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Neuropsühhofarmakoloogia õppetool

Kelly Haapsal

Millised on rottide sotsiaalse käitumise monoamiinergilised alusmehhanismid?

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad:

Karita Laagus, PhD

prof. Jaanus Harro, MD, PhD

Tartu 2025

INFOLEHT

Millised on rottide sotsiaalse käitumise monoamiinergilised alusmehhanismid?

Sotsiaalne käitumine on inimese jaoks keskse tähtsusega, mistõttu selle neurobioloogiliste mehhanismide mõistmine omab olulist praktilist väärtust. Loomkatsemudelid võimaldavad sotsiaalse käitumise fenotüüpi ehk püsisotsiaalsust uurida korduvate interaktsioonikatsete kaudu, mõõtes loomade keskmist sotsiaalses kontaktis veedetud aega erinevate partneritega. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida püsisotsiaalsuse seoseid monoamiinergiliste alusmehhanismidega, keskendudes dopamiini ja serotoniini rollile rottide ajus. Monoamiinide sisaldust uuriti juttkehas *ex vivo* ja mikrodialüüsimetodil eesajukoos *in vivo*, kasutades kõrgsurvevedelikkromatograafiat (HPLC). Kuigi töö käigus ei leitud sotsiaalsuse alusel statistiliselt usaldusväärseid erinevusi dopamiini või serotoniini tasemetes juttkehas või eesajukoos, ilmnis statistiliselt usaldusväärne tulemus suurema püsisotsiaalsusega emastel rottidel võrreldes isaste rottidega. Suurema püsisotsiaalsusega emastel rottidel oli märkimisväärselt kõrgem serotoniini vabanemise potentsiaal eesajukoos.

Märksõnad: HPLC, mikrodialüüs, serotoniin, dopamiin, dopamiini vabanemine, loomkatsemudelid, paraklooramfetamiin, serotoniini vabanemine, sotsiaalne käitumine

CERCS koodid: B640, P300, S260

What are the monoaminergic mechanisms underlying social behavior in rats?

Social behaviour plays a central role in human life, making the understanding of its neurobiological mechanisms highly valuable from a practical perspective. Animal models allow the investigation of the social behaviour phenotype—also referred to as trait-like sociability—through repeated social interaction tests, where the average time spent in social contact with different partners is measured. The aim of this bachelor's thesis was to investigate the neurochemical mechanisms underlying trait-like sociability in rats, focusing on the role of the monoamines dopamine and serotonin in the brain. Monoamine levels were measured in the striatum *ex vivo* and in the prefrontal cortex *in vivo* via microdialysis with high-performance liquid chromatography (HPLC). Although no statistically significant differences in dopamine or serotonin levels were found in the striatum or in the prefrontal cortex based on sociality, one key result emerged: female rats with higher trait-like sociability showed significantly greater serotonin release potential in the prefrontal cortex compared to male rats.

Keywords: HPLC, microdialysis, serotonin, dopamine, dopamine release, animal models, parachloroamphetamine, serotonin release, social behaviour

CERCS codes: B640, P300, S260

SISUKORD

INFOLEHT	2
1. KASUTATUD LÜHENDID	5
2. SISSEJUHATUS.....	6
3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
3.1 Sotsiaalne interaktsioon.....	7
3.2 Sotsiaalse interaktsiooni loomkatsemudel.....	7
3.3 Dopamiinergiline süsteem	8
3.3.1.1 Dopamiin.....	8
3.3.1.2 Dopamiini sünteesi regulatsioon	8
3.3.1.3 Dopamiini retseptorid ja nende paiknemine	10
3.4 Serotonergiline süsteem.....	11
3.4.1.1 Serotoniin	11
3.4.1.2 Serotoniini sünteesi regulatsioon	12
3.4.1.3 Serotoniini retseptorid ja nende paiknemine.....	13
3.5 Juttkeha (<i>striatum</i>).....	13
3.6 Prefrontaalne korteks ehk eesajukoor (PFC).....	14
3.7 Paraklooramfetamiin (PCA).....	14
3.8 Mikrodialüüs	14
3.9 Kõrgsurvevedelikkromatograafia ja elektrokeemiline detekteerimine	16
4. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
4.1 Katseloomad.....	19
4.2 Katsete ja analüüside kirjeldused	19
4.2.1. Sotsiaalse interaktsiooni test	19
4.2.2. <i>Ex vivo</i> katse ja analüüsi kirjeldus	20
4.2.3. <i>In vivo</i> katse ja analüüsi kirjeldus	21

4.3	Monoamiinid, nende metaboliidid ja standardlahused.....	24
4.4	Töös kasutatud standardained	25
4.5	Andmeanalüüs	25
4.6	Autori panus	26
5.	TULEMUSED JA ARUTELU.....	27
5.1	<i>Ex vivo</i> analüüsi tulemused	27
5.2	<i>In vivo</i> analüüsi tulemused	29
6.	KOKKUVÕTE.....	37
7.	SUMMARY	38
8.	KASUTATUD KIRJANDUS.....	39
9.	LISAD.....	42
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	45

1. KASUTATUD LÜHENDID

3-MT – 3-metoksütüramiin

5-HIAA – 5-hüdroksüindooläädikhape

5-HT – 5-hüdroksütrüptamiin, serotoniin

COMT – katehool-O-metüültransferaas

DA – 3-hüdroksütüramiin, dopamiin

DOPAC – 3,4-dihüdroksüfenüüläädikhape

HClO₄ – perkloorhape

HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia

HS – suurema püsisotsiaalsusega rotid

HVA – homovanilliinhape

KCl – kaaliumkloriid

LS – väiksema püsisotsiaalsusega rotid

MAO – monoamiinide oksüdaas

MDMA - metüleendioksümetamfetamiin

Na₂EDTA – etüleendiamiintetraädikhappe dinaatriumsool

Na₂S₂O₅ – naatriumbisulfit

SOS – 1-oktaansulfoonhape, naatriumsool

STR – juttkeha (*striatum*)

PCA – paraklooramfetamiin

PFC – prefrontaalne korteks ehk eesajukoor (*prefrontal cortex*)

2. SISSEJUHATUS

Biomeditsiinilistes teadusuuringutes kasutatavate loomade käitumise põhilised indiviididevahelised erinevused avavad uusi võimalusi inimese psühhopatoloogia modelleerimiseks (Mällo *et al.* 2007). Sotsiaalne käitumine on oluline aspekt inimese elus, seega on arusaam sotsiaalse käitumise alusmehhanismidest praktilise väärtusega. Rottide sotsiaalse käitumise fenotüübi ehk püsisotsiaalsuse mõõtmiseks saab kasutada korduvaid katseid erinevate partneritega, kus mõõdetakse sotsiaalses interaktsioonis veedetud aega.

Käitumine ja seda mõjutavad neurokeemilised alusmehhanismid on seotud erinevate monoamiinidega. Monoamiinid on keemilised ühendid, mis sisaldavad ühte aminorühma ja aromaatsset tuuma, mis on ühendatud etüülahela kaudu. Monoamiinse struktuuriga virgatsained – dopamiin ja serotoniin – on keemilised neurotransmitterid, mis reguleerivad paljusid kehafunktsioone. Dopamiinil on keskne roll naudingu- ja tasusüsteemis ning lisaks osaleb see liikumise ja koordineerimise reguleerimises (Harsing 2008). Serotoniin on seotud mälu ja õppimisega, meeleolu muutustega, toidu tarbimisega, une, paljunemisega, valu tajumise ja sotsiaalse käitumisega. (Kiser *et al.* 2012)

Monoamiinergilised süsteemid on olulised sihtmärgid mitmete neuropsühhiaatriliste ja neuroloogiliste seisundite puhul. Monoamiinergiliste süsteemide häiritus mängib olulist rolli vaimse tervise häirete, näiteks depressioon, Parkinsoni tõbi jpt tekkepõhjustes. (Di Giovanni *et al.* 2016)

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, millised on erineva püsisotsiaalsusega rottide sotsiaalse käitumise monoamiinergilised alusmehhanismid. Selleks viidi läbi katsed kahe erineva meetodika abil, uurides dopamiini ja serotoniini sisaldusi juttkehas *ex vivo* ja eesajukooses mikrodialüsaadi meetodil *in vivo*.

Pandi paika neli uurimushüpoteesi:

- 1) Suurema püsisotsiaalsusega rottidel on dopamiini käive juttkehas väiksem;
- 2) Suurema püsisotsiaalsusega rottidel on serotoniini käive juttkehas suurem;
- 3) Dopamiini vabanemise potentsiaal eesajukooses on suurema püsisotsiaalsusega rottide puhul väiksem;
- 4) Serotoniini vabanemise potentsiaal eesajukooses on suurema püsisotsiaalsusega rottide puhul suurem.

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1 Sotsiaalne interaktsioon

Evolutsiooniliselt on sotsiaalne käitumine olnud oluline tegur indiviidi ja liigi ellujäämisel. Paljud kliinilised häired, näiteks sotsiaalne ärevushäire, mitmed isiksusehäired ja autism, hõlmavad raskusi sotsiaalsete kontaktide loomisel või säilitamisel. Sotsiaalse käitumise fenotüüpset väljendust reguleerivad paljud erinevad neurokeemilised süsteemid, kuid seos ei ole veel välja kujunenud. Monoamiinergilised süsteemid, hõlmates dopamiini ja serotoniini, on seotud peaaegu kõigi ajufunktsioonidega ning nende tasemete muutumist on tuvastatud enamiku neuropsühhiaatriliste ja neuroloogiliste haiguste puhul. (Di Giovanni *et al.* 2016) Hiljutised uuringud inimeste kohta on näidanud serotoniini ja dopamiini (Yamaguchi *et al.* 2015) rolli isiksuse omaduste väljendumisel protsessides, mis on seotud afektiivsete ja motivatsiooniliste protsessidega. Sotsiaalse käitumise ja sellega seotud häirete neurobioloogiliste mehhanismide üksikasjalikku uurimist võimaldavad mudeldada loomkatsemudelid. (Tõnissaar *et al.* 2004) On välja töötatud erinevad loomkatsemudelid ärevuse ja depressiooni fenotüüpide mudeldamiseks, näiteks pluss-kujuline labürindi katse (*elevated plus maze*), sunnitud ujumise katse (*forced swim test*), valguse/pimeduse ülemineku katse (*light/dark exploration test*) jpt. (Wang *et al.* 2017) Üks peamisi käitumise mudeldamiseks kasutatav loomkatsemudel on sotsiaalse interaktsiooni mudel.

3.2 Sotsiaalse interaktsiooni loomkatsemudel

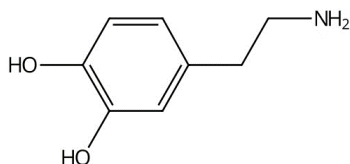
Näriliste sotsiaalse käitumise uuringud on enamasti läbi viidud üsna spetsiifiliste paradigmade raames, näiteks agressiivset või emalikku käitumist uurides. Siiski on olemas sageli kasutatav lihtne loomkatsemudel, mis on välja töötatud anksiogeensete (ärevus- ja hirmutunnet suurendav) ja anksiolüütiliste (ärevus- ja hirmutunnet pärssiv) ravimite mõju mõõtmiseks, kuid mis põhineb sotsiaalsel käitumisel. See koosneb sotsiaalse suhtluse testist, mille puhul mõõdetakse kahe teineteise jaoks võõra roti vahel neutraalsel areenil aktiivses sotsiaalses suhtluses kulunud aega. Rottide käitumine sotsiaalse suhtluse testis ei korreleeru hästi nende tulemustega teistes ärevuse loomkatsemudelites, mis viitab sellele, et mudelil on muid olulisi alusmehhanisme kui ainult üldine ärevus. Seda võiks kasutada sotsiaalse käitumise neurobioloogia uurimiseks, tingimusel, et looma sotsiaalne käitumine oleks selles testis järjekindlalt väljendatud tunnus. Varasemad uuringud on näidanud, et sotsiaalne aktiivsus sotsiaalse suhtluse testis on tõepoolest stabiilne isiksuseomadus (Tõnissaar *et al.* 2004). Sotsiaalne käitumine üksikutes testides korreleerub tugevalt keskmise sotsiaalse aktiivsusega

kõigis testides kokku ning see tunnus püsib üle mitme mõõtmise (Tõnissaar *et al.* 2004), vaatamata sellele, et sotsiaalse käitumise väljendamine sõltub partneri sotsiaalsest aktiivsusest ja kipub vanuse ja kehakaalu suurenemisega vähenema. (Tõnissaar *et al.* 2008)

3.3 Dopamiinergiline süsteem

3.3.1.1 Dopamiin

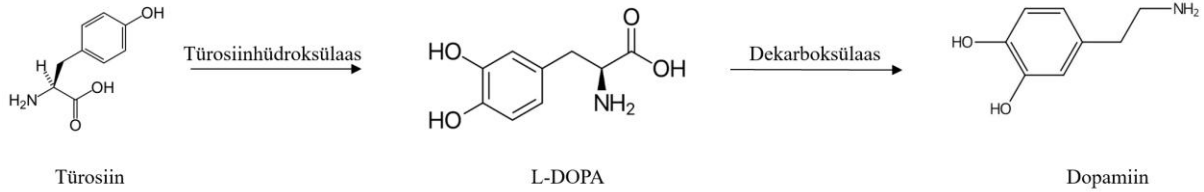
Dopamiin (vt joonis 1), nomenklatuurse (IUPAC) nimega 3-hüdroksütüramiin (DA), on monoamiinne neurotransmitter, massiga 153 Da. Dopamiin mängib olulist rolli aju toimimises ja selle puudujäägid on seotud mitmete psühhiaatriliste häiretega (Yamaguchi *et al.* 2015). Dopamiini vähenemist prefrontaalses ajukoos ja striataalse dopamiini vabanemise pärssimist on seostatud skisofreenilistel patsientidel. Dopamiini kadu juttkehas on seostatud motoorse kontrolli kadumisega, mis kutsub esile Parkinsoni tõve. Dopamiini vabanemise ja tagasihaarde ebanormaalset talitlust on seostatud ka näiteks Gilles de la Tourette'i sündroomiga. (Best *et al.* 2009) Kuigi DA rolli kognitiivsetes ja afektiivsetes funktsioonides on põhjalikumalt uuritud kui sotsiaalsetes funktsioonides, siis kogunevate tõendite põhjal saab öelda, et dopamiinergilisesüsteem on üks peamisi neurotransmittersüsteeme, mis reguleerib sotsiaalset tegevust nii loomadel kui ka inimestel. Sotsiaalne funktsioon, millega DA on seotud võib väljenduda individuaalselt mitmetes käitumistes nagu paarisuhted, vanemate ja järglaste seotus, agressiivsus, sotsiaalne äratundmine ja mälu kuni sotsiaalse struktuuri tasandini nagu sotsiaalne võrgustik ja hierarhia. (Yamaguchi *et al.* 2015)



Joonis 1. Dopamiini molekuli struktuur

3.3.1.2 Dopamiini sünteesi regulatsioon

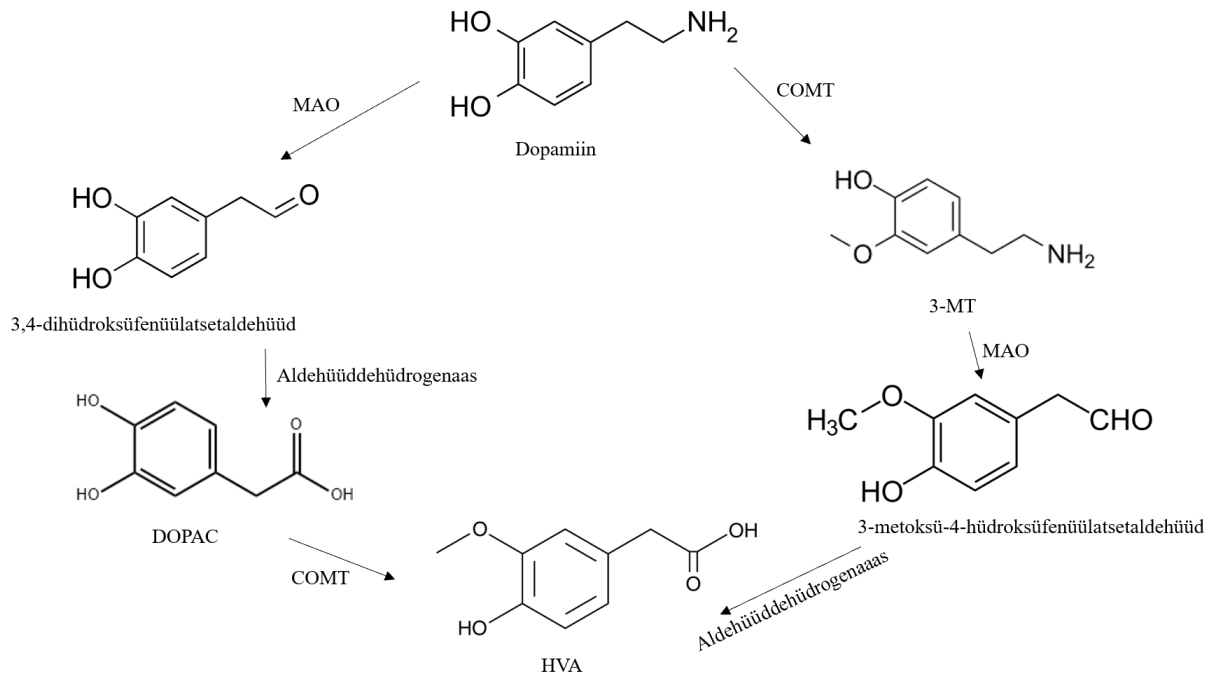
Dopamiini süntees algab türosiinist. Türosiin hüdroksüülitakse ensüümi türosiinhüdroksülaasi (TH) abil, moodustades 3,4-dihüdroksü-L-fenüülalaniini (L-DOPA). L-aromaatsete aminohapete dekarboksülaas (AADC) muundab L-DOPA dopamiiniks (vt joonis 2). (Harsing 2008)



Joonis 2. Dopamiini süntees türosiinist

Dopamiinergilistes närvilõpmetes on dopamiini molekulid pakendatud transpordivalkudesse ning transporditakse nende kaudu säilituspõiekestesse. Dopamiini ülekande signaali lõpetamises osalevad kaks ensüümi: monoamiinide oksüdaas (MAO) ja katehhool-O-metüültransferaas (COMT) (Harsing 2008). Kui dopamiin vabaneb sünapsis, saab see seonduda nii pre- kui ka postsünaptilistele DA-retseptoritele. Viimase tagajärjel transpordib dopamiini transporterimolekul (DAT) selle tagasi presünaptilistesse närvilõpmetesse. Kui dopamiin jõuab tagasi tsütosooli, siis see kas pakitakse uuesti säilituspõiekesse või lagundatakse. (Davis *et al.* 2023)

Dopamiini lagunemisel metaboliitideks deamineerib MAO dopamiini, moodustades 3,4-dihüdrosüfenüülalsetaldehydi, ja COMT metüülitud 3-MT, moodustades 3-metoksü-4-hüdrosüfenüülalsetaldehydi, mis on mõlemad inaktiivsed ja ebastabiilsed ühendid. Aldehyddehydrogenaasi abil saab 3-metoksü-4-hüdrosüfenüülalsetaldehydist homovanilliinhape (HVA) ning 3,4-dihüdrosüfenüülalsetaldehydist 3,4-dihüdrosüfenüülaldehydihape (DOPAC), mis laguneb COMT abil edasi homovanilliinhappeks (HVA) (vt joonis 3). (Harsing 2008) Metaboliitide tasemete uurimine on oluline sellepärast, et see annab meile terviklikuma pildi ajus toimuvatest biokeemilistest protsessidest.



Joonis 3. Dopamiini lagunemine metaboliitideks

3.3.1.3 Dopamiini retseptorid ja nende paiknemine

Dopamiinergilise süsteemi ja selle häirete uurimisel võetakse arvesse nii käitumuslikke, füsioloogilisi kui ka biokeemilisi aspekte. Inimkehas on palju erinevaid signaaliretseptoreid, millest enamik on seotud G-valguga (GPCR-d), sh dopamiiniretseptor. On olemas viite tüüpi dopamiiniretseptoreid: D₁, D₂, D₃, D₄ ja D₅, millest kõigil on erinev funktsioon ning need jaotatakse kahte eraldi alagruppi D₁-tüüpi (D₁- ja D₅-retseptorid) ja D₂-tüüpi (D₂-, D₃- ja D₄-retseptorid).

D₁- ja D₅-retseptorite tihedus on suurim juttkehas (*striatum*), naalduvas tuumas (*nucleus accumbens*), haistesibulas (*bulbus olfactorius*) ja mustolluses (*substantia nigra*). Need retseptorid paiknevad postsünaptiliselt (Davis *et al.* 2023) ning reguleerivad tasu süsteemi, motorset aktiivsust ning mälu ja õppimist. D₁- ja D₅-retseptorid haakuvad G-valgu stimuleerivate kohtadega (*stimulatory sites*) ja selle tagajärjel aktiveerib G-valk adenüültsüklaasi, mis toob kaasa cAMP tootmise. Sellele järgneb proteiinkinaas-A tootmine, mis toob kaasa transkriptsiooni raku tuumas.

D₂-, D₃- ja D₄-retseptorid paiknevad peamiselt juttkehas (*striatum*), naalduvas tuumas (*nucleus accumbens*), hipokampuses (*hippocampus*), mandelkehas (*amygdala*) ja ajukoos (*cortex*). D₂-, D₃- ja D₄-retseptorid väljenduvad nii pre- kui ka postsünaptilistes närvilõpmetes (Davis *et al.* 2023), haakudes G-valgu inhibeerivate kohtadega (*stimulatory sites*), mille järel toimub

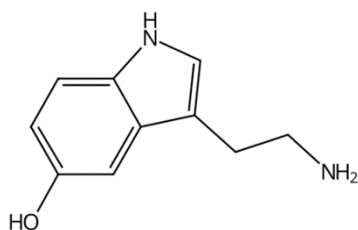
adenüülsüklaasi inhibeerimine, vähendades cAMP tootmist (Davis *et al.* 2023), ja K⁺ kanalite aktiveerimine. (Bhatia *et al.* 2023)

Dopamiini retseptorite paiknemine on tihedalt seotud dopamiinergiliste juhteteedega, kus toimub dopamiini liikumine sünteesipaiga ja sihtpunkti vahel. Dopamiinergilisi juhteteid on neli: nigrostriataalne (mustollusest juttkehasse), mesokortikaalne (kõhtmisest katendialast ajukoode), mesolimbiline (kõhtmisest katendialast naalduvasse tuuma ja mandelkehasse) ja tuberoinfundibulaarne (hüpotalamusest ajuripatsisse). (Missale *et al.* 1998; Luo and Huang 2016)

3.4 Serotonergiline süsteem

3.4.1.1 Serotoniin

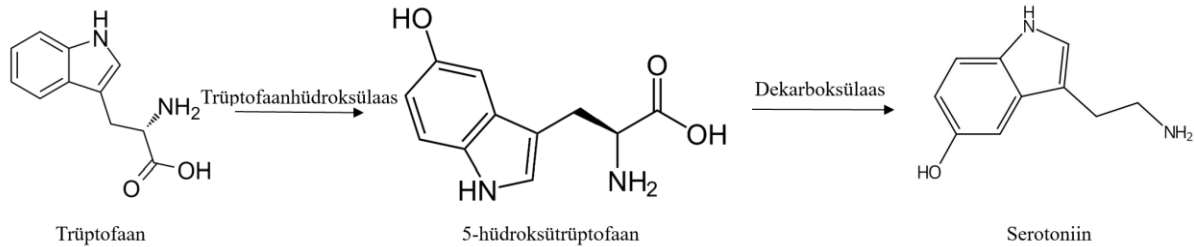
Serotoniin (vt joonis 4), nomenklatuurse (IUPAC) nimega 5-hüdroksütrüptamiin (5-HT), on monoamiinne neurotransmitter, massiga 176 Da. Serotoniin sünteesitakse kesknärvisüsteemi serotonergilistes neuronites (Jonnakuty and Gagnoli 2008). Serotonergilinesüsteem juhib käitumisreaktsioone keskkonnast tulenevatele stiimulitele ning üheks võimsaks keskkonnateguriks on sotsiaalne keskkond. Serotoniini poolt moduleeritud käitumuslikud ja neuropsühholoogilised protsessid hõlmavad meeleolu, taju, tasu, viha, mälu, seksuaalsust ja tähelepanu. (Berger *et al.* 2009) Soodsas keskkonnas, näiteks toetavas ja rikastavas sotsiaalses olukorras on kõrge reageerimisvõime keskkonnaomadustele kasulik, kuna see võimaldab kergemini kasu saada. Seevastu ebasoodsas keskkonnas, näiteks rõhuvas ja ahistavas sotsiaalses olukorras on kõrge reageerimisvõimega inividid sellest negatiivsemalt mõjutatud. (Kiser *et al.* 2012) 5-HT häiritud regulatsioon aitab kaasa mitmete häirete, nagu narkomaania, skisofreenia, söömishäired, impulsside kontrolli häired jpt (Murphy *et al.* 2004). Inimestel on serotoniini tase positiivses korrelatsioonis kahju vältivate isiksuseomadustega ning serotonergiliste kõrvalekalletega on seotud psühhiaatrilised häired, nagu ärevus ja depressioon (Siegel and Crockett 2013).



Joonis 4. Serotoniini molekuli struktuur

3.4.1.2 Serotoniini sünteesi regulatsioon

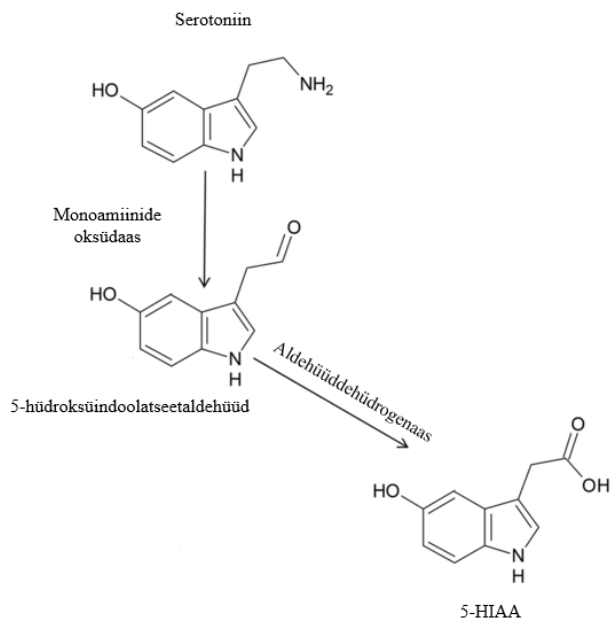
Serotoniini süntees koosneb kahest ensümaatilisest etapist. Esimene ja kiiruse poolest piiratud etapp algab asendamatu aminohappest trüptofaan, mis muudetakse esmalt trüptofaani hüdroksülaasi abil 5-hüdroksütrüptofaaniks. Seejärel muudetakse 5-hüdroksütrüptofaan aromaatsete aminohapete dekarboksülaasi abil serotoniiniks (vt joonis 5). (Kiser *et al.* 2012)



Joonis 5. Serotoniini süntees trüptofaanist

Üheks võimalikuks serotoniini signaali ülekande lõppemiseks on tagasihaare, serotoniini transporter molekuli SERT abil. Kui 5-HT on liikunud sünapsist rakumembraani, viib vesikulaarne monoamiini transporter (VMTA2) serotoniini sünaptilistesse säilituspõiekestesse ladustamiseks. Teine võimalus 5-HT signaali ülekande lõpetamiseks on 5-HT lagundamine monoamiini oksüdaas-A poolt. (Olivier 2015)

Monoamiinide oksüdaas deamineerib serotoniini oksüdeerivalt toksiliseks 5-hüdroksüindoolatsetaldehyüdiks, mis muudetakse seejärel aldehyüddehüdrogenaasi abil 5-hüdroksüindooläädikhappek (5-HIAA) (vt joonis 6) (Feldman 2004).



Joonis 6. Serotoniini lagunemine metaboliidiks

3.4.1.3 Serotoniini retseptorid ja nende paiknemine

Serotoniin interakteerub 7 (5-HT₁₋₇) retseptoriperekonnaga ja vähemalt 14 erineva retseptori alatüübiga (5-HT_{1A}, 1B, 1D, 1E, 1F; 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6 ja 7), mis on samuti seotud G-valguga (Olivier 2015; Żmudzka *et al.* 2018). 5-HT süsteem koosneb morfoloogiliselt neuronite rühmast, mille rakukehad asuvad ajutüve raphetuumades (*raphe nuclei*), ja keerukatest aksonaalsüsteemidest, mis varustavad pea kõiki kesknärvisüsteemi piirkondi projektsioonidega, sealhulgas prefrontaalset ajukoort (*prefrontal cortex*), basaalganglione ning ajutüve piirkondi. Serotonergilise süsteemi saab jaotada kaheks: rostraalne ehk eespoolne ja kaudaalne ehk sabapoolne. (Törk 1990) Ärevuse ja depressiooni regulatsioonis osalevad 5-HT₁-, 5-HT₂-, 5-HT₄-, 5-HT₆- ja 5-HT₇-retseptorid, mis jagunevad omakorda mitmeks alatüübiks (Yohn *et al.* 2017). 5-HT_{1A}-retseptorite suurim tihedus on hipokampuses (*hippocampus*), mandelkehas (*amygdala*), hüpotalamuses (*hypothalamus*) ja neokorteksis (*neocortex*), 5-HT_{1B}-retseptorid paiknevad basaalganglionides ja mustolluses (*substantia nigra*). Uuringud näitavad, et 5-HT_{1B}- ja 5-HT_{1D}- retseptorid reguleerivad serotoniini vabanemist, kuid on ebaselge kas need retseptorid asuvad rakukehadel või mujal. 5-HT_{2C}-retseptoreid leidub enim hüpotalamuses (*hypothalamus*), hipokampuses (*hippocampus*), neokorteksis (*neocortex*) ja mustolluses (*substantia nigra*). 5-HT₄-retseptorid paiknevad juttkehas (*striatum*) ja mustolluses (*substantia nigra*) ning on leitud, et ka hipokampuses (*hippocampus*). 5-HT₆-retseptoreid leidub enim juttkehas (*striatum*), naalduvas tuumas (*nucleus accumbens*) ja ajukooses (*cortex*) ning 5-HT₇-retseptoreid hüpotalamuses (*hypothalamus*) ja ülemistes künkakestes (*superior colliculus*). (Frazer and Hensler 1999)

3.5 Juttkeha (*striatum*)

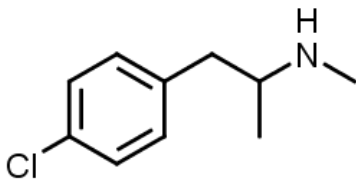
Juttkeha on basaalganglionide peamine sisendüksus (*input unit*). Juttkeha saab dopamiinergilisi ja motoorsete funktsioonidega seotud signaale ja on ühenduses piirkondadega, mis töötlevad emotsioone (Delgado 2007). Juttkeha impulsid saabuvad kolmest allikast: ajukoorest, keskajust ja hüpotalamusest (Báez-Mendoza and Schultz 2013). Juttkeha on jaotatud funktsionaalselt kaheks eraldiseisvaks osaks: ventraalne ja dorsaalne. Uuringud näilistel on näidanud, et ventraalne striatum on seotud afektiivsete ja motivatsiooniliste protsesside töötlemisega. Seevastu dorsaalne striatum on seotud kognitiivsete ja sensomotoorsete funktsioonidega. (Delgado 2007) Neurofüsioloogilised uuringud näitavad, et juttkeha aktiivsust mõjutavad sotsiaalsed hüved ja tegevused. Eelkõige aktiveerub juttkeha sotsiaalsetes olukordades tasu saamisel ning sellel on oluline roll ka paarisuhete moodustamisel. (Báez-Mendoza and Schultz 2013)

3.6 Prefrontaalne korteks ehk eesajukoor (PFC)

Suurajukoor jaguneb neljaks alaosaks: otsmiku-, oimu-, kiiru- ja kuklasagaraks (Javed *et al.* 2023). Otsmikusagaras paikneb prefrontaalne korteks ehk eesajukoor (PFC), millel on oluline roll kognitiivsetes protsessides nagu tähelepanu, otsuste langetamine ja emotsionaalse käitumise reguleerimine (Morecraft and Yeterian 2002). Inimese prefrontaalse korteksi saab jagada kolmeks piirkonnaks: lateraalne, mediaalne ja orbitaalne. Orbitaalsed ja mediaalsed piirkonnad on peamiselt seotud emotsioonidega ning lateraalne piirkond kontrollib kognitiivsust. (Santana and Artigas 2017)

3.7 Paraklooramfetamiin (PCA)

Serotonergilise süsteemi talitlushäire tekitamise üheks viisiks on neurotoksiinide nagu 3,4-metüleendioksümetamfetamiin (MDMA) või paraklooramfetamiini (PCA) kasutamine. MDMA on tuntud ja laialdaselt kasutatav psühoaktiivne uimasti, millel on stimuleeriv ja prosotsiaalne (Kamilar-Britt and Bedi 2015) toime. Pärast MDMA tarvitamist võivad inimesed kogeda heaolutunnet, muutunud ajataju, kergeid hallutsinatsioone, suurenenud enesekindlust, vähenenud ärevust jpm. (Davison and Parrott 1997) Paraklooramfetamiin (vt joonis 7) on kvalitatiivselt sarnane neurotoksiin, kuid palju neurotoksilisem kui MDMA. Serotoniini neuronite neurodegeneratsiooni saavutamiseks on vaja MDMA korduvat manustamist, samas kui PCA tekitab mõju pärast ühekordset väikest annust. 5-HT selektiivsed neurotoksiinid toimivad kahes etapis: esimestel tundidel pärast ravimi manustamist vabaneb 5-HT kiiresti ning järgmise 24 tunni jooksul 5-HT tase normaliseerub; järgmiste päevade jooksul väheneb 5-HT tase ajukoes neurodegeneratsiooni tõttu. (Sanders-Bush and Steranka 1978) PCA põhjustab vähemal määral ka dopamiini massilist depolarisatsioonist sõltumatut vabanemist (Norden *et al.* 2024).



Joonis 7. Paraklooramfetamiini struktuur

3.8 Mikrodialüüs

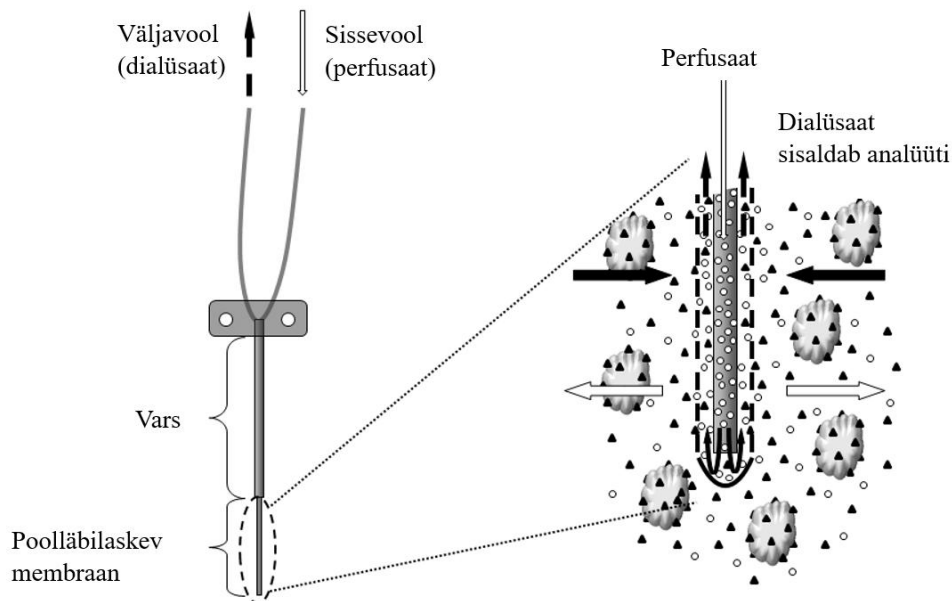
Mikrodialüüs on proovivõtu meetod, mis võimaldab võtta ja koguda proove rakkudevahelisest ruumist, tänu spetsiaalse sondi ja poolläbilaskva membraani paigaldamisel huvipakkuvasse koesse (Chefer *et al.* 2009). Analüütide hulka võivad kuuluda endogeensed ühendid, näiteks

neurotransmitterid, et hinnata nende biokeemilist rolli organismis, või eksogeensed ühendid, näiteks ravimid, et määrata nende jaotumist organismis.

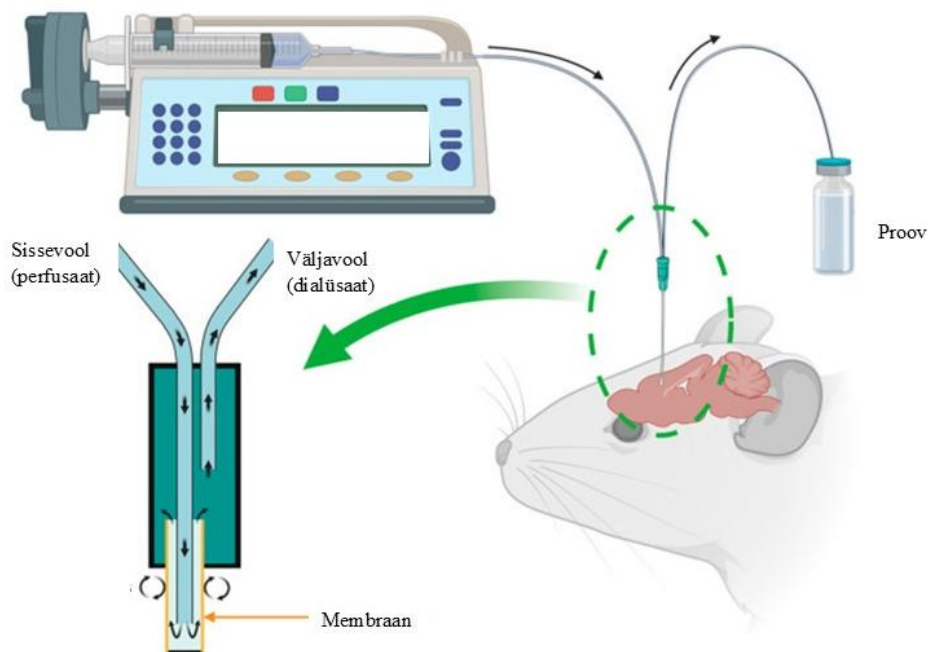
Mikrodialüüsi põhielement on kirurgiliselt sisestatud sond, mis dialüüsi põhimõttel eraldab makromolekulid ja mis võimaldab võtta proove valkudega ja ensüümidega mitteseotud kujul rakuvälisest ruumist. (Chaurasia *et al.* 2007)

Mikrodialüüsisond koosneb tavaliselt roostevabadest torudest, mis on tehtud terasest, sulatatud ränidioksiidist või nende kahe segust, ning membraanist, mis on enamasti polükarbonaadist, tselluloosatsetaadist või polüakrüülnitriilist (Weiss 2000). Membraani läbilaskvus on tavaliselt piiratud ühenditega, mille molekulmassid on $< 20\,000$ Da.

Sond paigaldatakse uuritavasse koesse peale mida perfusioonitava lahusega voolutamisel saavad dialüüsimembraani välispinnal olevad ained difundeeruda läbi membraani päri kontsentratsioonigradiendi (vt joonis 8 ja joonis 9). Sondist väljuv lahus kogutakse teatud ajavahemike järel ja seda nimetatakse dialüsaadiks (Chaurasia *et al.* 2007). Tavaline proovi kogumise aeg ühe proovi jaoks jääb vahemikku 1 kuni 20 minutit. (Chefer *et al.* 2009)



Joonis 8. Mikrodialüüsi sondi põhimõte



Joonis 9. *In vivo* mikrodialüüsi süsteem koos rotiga (Guiard and Gotti 2024)

3.9 Kõrgsurvevedelikkromatograafia ja elektrokeemiline detekteerimine

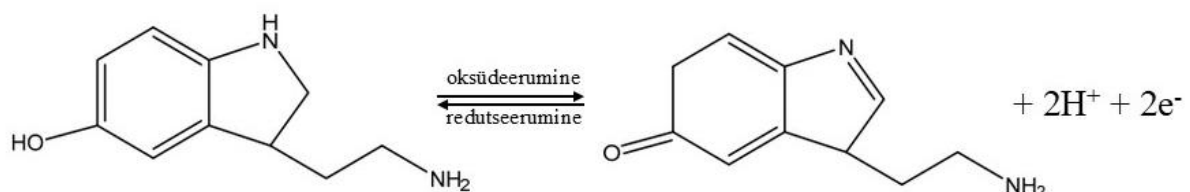
Kõrgsurvevedelikkromatograafia (*High Performance Liquid Chromatography*) on kromatograafia liik, mille puhul süstitakse lahuse kujul olev proov vedelasse liikuvasse faasi, mida nimetatakse mobiilseks faasiks. Mobiilne faas viib proovi kõrge rõhu abil läbi statsionaarse faasi. Statsionaarse faasi osakesed, mis jäävad suurusjärku vaid mõni mikromeeter, on kolonnis tihedalt kokkupakitud ja proovis olevad molekulid adsorbeeruvad-desorbeeruvad kolonni läbimisel tuhandeid kordi, tagades kõrge lahutuvuse efektiivsuse. Komponentide signaali registreerimiseks kasutatakse HPLC-s elektrokeemilist, UV-Vis, fotodiodrivi-, fluorestsents- või massispektromeetrilisi detektoreid. Detektorite puhul on oluline nende kõrge tundlikkus ja lai lineaarne ala. (Harvey 2019)

Statsionaarse ja mobiilse faasi polaarsuse alusel jagatakse kõrgsurvevedelikkromatograafia kaheks: normaal- ja pöördfaaskromatograafia. Normaalfaaskromatograafias on eluent mittepolaarne (näiteks heksaan või isopropüüleeter) ja statsionaarne faas polaarsete omadustega (näiteks modifitseerimata pinnaga silikageel). Pöördfaaskromatograafias on mobiilne faas polaarne ning statsionaarne faas mittepolaarsete omadustega. Eluendina kasutatakse polaarsete solvente (näiteks metanooli või atsetonitriili ja vee segu). (Harvey 2019) Pöördfaaskromatograafias määrab analüüdi retentsioonaja peamiselt selle hüdrofoobsus. Kolonnist väljuvad kiiremini polaarsemad molekulid kui mittepolaarsed ning vastavalt sellele

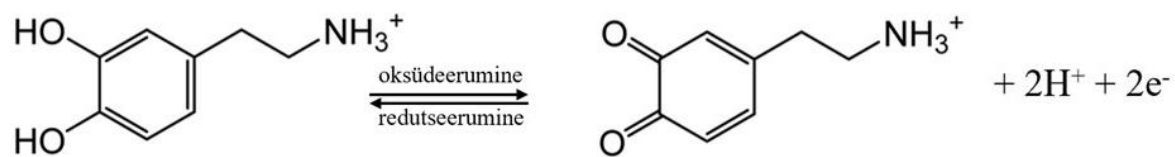
kasvab ka proovi komponentide retentsiooniaeg järjestuses polaarsemast mittepolaarsemani. Kui uuritavatel ühenditel puuduvad happelised või aluselised omadused, on mobiilse faasi pH mõju nende ühendite retentsioonile olematu. (Dolan 2017) Kromatografeerimispuhver peab tagama konstantse pH kogu elueerimise vältel ning kasutatav solvent olema muutumatu kõikide analüüside vältel, vältimaks retentsiooniaja muutusi. (Dolan 2016)

Kromatograafia võimaldab viia läbi kvalitatiivset ja kvantitatiivset analüüsi. Kehtib seaduspära, et aine jaoks on samade kromatografeerimistingimuste juures retentsiooniaeg sama. Retentsiooniaeg on ajavahemik proovilahuse süstimisest kromatogrammi kuni huvipakkuva ühendi piigi maksimumi ilmumiseni kromatogrammil (Lee 2011). Kui standardainetega on paika pandud kromatografeerimise parameetrid ja on teada, millal analüüdid kolonnist väljuvad, võib usaldusväärselt saada ka kvalitatiivset infot. Kvantitatiivne analüüs põhineb piikide kõrguste või pindalade mõõtmisel kromatogrammil. Piigi kõrgus või piigi pindala on võrdeline kromatograafi süstitud proovisegus oleva konkreetse komponendi kogusega. (Harvey 2019)

Elektrokeemiline detekteerimine on laialdaselt kasutatud meetod neurotransmitterite ja nende metaboliitide analüüsimiseks ja kvantifitseerimiseks (Guiard and Gotti 2024). Amperomeetiline detekteerimine on üks mitmest elektrokeemilise detekteerimise meetodist, mille puhul mõõdetakse elektrodile rakendatud fikseeritud potentsiaali juures voolu muutust ajas. Rakendatud potentsiaali tulemusena toimub elektroaktiivsete ühendite redoksreaktsioon. Serotoniini ja dopamiini redoksreaktsioonid on nähtavad joonisel 10 ja joonisel 11. Ajas registreeritud elektrivool on otseselt seotud analüüdi kontsentratsiooniga lahuses. Meetodi eeliseks on tundlik ja selektiivne tuvastamine. (Wang 2002) IUPAC defineerib selektiivsust kui omadust, mil määral analüüsimiseks kasutatav meetod suudab eristada analüüti teistest proovis leiduvatest ühenditest, samas kui tundlikkus on numbriline väljendus selle kohta, kuidas signaal muutub koos analüüdi kontsentratsiooniga (Delmo *et al.* 2023).



Joonis 10. Serotoniini redoksreaktsiooni mehhanism



Joonis 11. Dopamiini redoksreaktsiooni mehhanism

4. EKSPERIMENTAALNE OSA

4.1 Katseloomad

Juttkehist dopamiini ja serotoniini ning nende metaboliitide sisalduste mõõtmiseks kasutati katseloomadena isaseid Wistar liini rotte ($n = 30$), vanuses 2-3 kuud. Katseloomi hoiti ruumis, kus oli automatiseeritud 12-tunnine, kell 8:00-20:00, valguse-pimeduse tsükkel. Kõik katsed toimusid valgusperioodil ning katsevälistel aegadel oli katseloomadele tagatud vaba juurdepääs toidule ja veele. Katsed viidi läbi TalTech-i vivaariumis ning olid kooskõlas Eesti ja Euroopa liidu õigusega (direktiiv 2010/63/EU) (Euroopa Parlament & Euroopa Liidu Nõukogu, 2010). Loomkatse luba: Ethical Committee for Animal Experiments of the Estonian Ministry of Rural Affairs (permission no 149).

Eesajukoos dopamiini ja serotoniini tasemete ja vabanemispotentsiaali mõõtmiseks mikrodialüüsi meetodil kasutati Sprague-Dawley liini emaseid ($n = 20$) ja isaseid ($n = 20$) rotte, vanuses 6 kuud. Katseloomi hoiti ruumis, kus oli automatiseeritud 12-tunnine, kell 8:00-20:00, valguse-pimeduse tsükkel. Kõik katsed toimusid valgusperioodil ning katsevälistel aegadel oli katseloomadele tagatud vaba juurdepääs toidule ja veele. Katsed viidi läbi TalTech-i vivaariumis ning olid kooskõlas Eesti ja Euroopa liidu õigusega (direktiiv 2010/63/EU) (Euroopa Parlament & Euroopa Liidu Nõukogu, 2010). Loomkatse luba: Ethical Committee for Animal Experiments of the Estonian Ministry of Rural Affairs (permission no 127, 134, 149).

4.2 Katsete ja analüüside kirjeldused

4.2.1. Sotsiaalse interaktsiooni test

Käesolevas töös kasutati sotsiaalse interaktsiooni testi, mille käigus mõõdeti neutraalsel areenil kahe, teineteise jaoks võõra, roti vahelist aktiivses suhtluses veedetud aega. Testiks kasutati puuri (30 x 30 x 60 cm), mille põrand oli kaetud puidulaastudega. Interaktsioonis veedetud aja alla loeti järgmised käitumisparameetrid: vastasele lähenemine, nuusutamine ja järgimine; vastase ründamine, hammustamine või jälitamine; sugemine (*grooming*), võõra partneri selga kinnitumine, partneri maas hoidmine; ning kaelapiirkonna lakkumine või näksimine. Ühte katseloomapaari testiti 10 minutit. Loomi testiti samas kaaluklassis ning samast soost katseloomadega. Enne testi hoiti katseloomi kümme päeva üksikmajutuses, kus oli tagatud vaba juurdepääs toidule ja veele ning automatiseeritud 12 tunnine valguse-pimeduse tsükkel.

4.2.2. *Ex vivo* katse ja analüüsi kirjeldus

Sotsiaalse interaktsiooni testi sooritati 2-3-kuu vanuste katseloomadega. Katseid sooritati erinevatel päevadel, kokku kolm korda. Kolme katse põhjal arvutati keskmine interaktsioonis veedetud aeg iga looma kohta. Kõigi mõõtmiste mediaani (Mdn = 115 s) alusel jagati loomad kahte gruppi: 15 väiksema sotsiaalsusega (LS) ja 15 suurema sotsiaalsusega (HS) looma (vt lisa 1). Ajud dissekteeriti piirkondadeks ning hoiti -80 °C juures analüüsimiseni.

Analüüsiks ajukoe proovid kaaluti ja homogeniseeriti 30 sekundit, sagedusel 20 kHz ± 500 Hz, tsüklite arv (*cycle*) 7 * 10 % ja võimsus (*power*) 70 % ultraheli-homogenisaatori (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic) abil külmas (+4°C) homogeniseerimislahuses, mis sisaldas 1 mg/ml kohta naatriumbisulfitit. 100 ml 0,1 M homogeniseerimislahust sisaldas 10 ml 1 M perkloorhapet ja 0,4 ml 10 mM Na₂EDTA. Vahetult enne homogeniseerimist lisati 5 mM Na₂S₂O₅ suhtes 1 mg/1 ml homogeniseerimislahuse kohta. Homogenaadid tsentrifugiti 14 000 pööret/minutis (*rcf* = 17092 m/s²) 10 minuti vältel +4°C juures.

Kogutud supernatandid pipeteeriti seejärel 2 ml viaalidesse. Väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega rottidel mõõdeti monoamiinide ja nende metaboliitide taset juttkehas kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) meetodi abil. Proovide sisestamiseks kõrgsurvevedelikkromatograafi (Shimadzu LC-20AD) kasutati automaatset jahutusega proovisisestussüsteemi (Shimadzu SIL-20AC). Süsti ruumala oli 3 µl. Elueerimise voolukiirus oli 0,4 ml/min. Kasutati isokraatilist elueerimist. Käesolevas töös kasutatud kromatograferimispuhver, ainete molaarsustega ja sisaldustega ühes liitris on toodud tabelis 1.

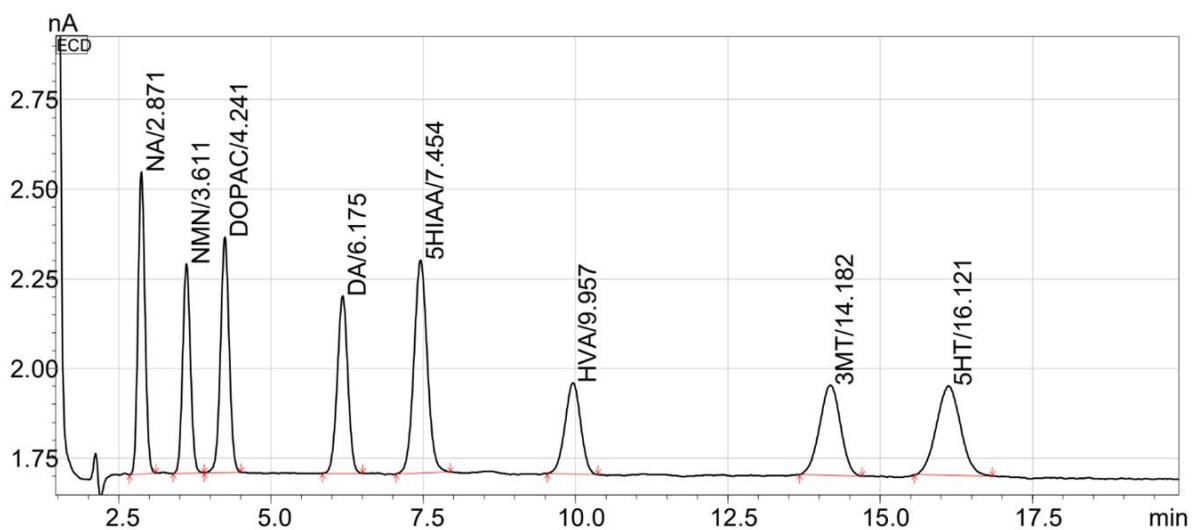
Tabel 1. Töös kasutatud kromatograferimispuhver monoamiinide ja nende metaboliitide analüüsiks

Aine	Aine kontsentratsioon C	Aine või emalahuse kogus/l
Sidrunhape	0,05 M	10,507 g
Na ₂ EDTA x H ₂ O	0,01 M	2 ml
KCl	0,5 M	2 ml
pH = 3,7		
SOS	0,001 M	0,2163 g
Atsetonitriil	7,5 % (V)	75 ml

Monoamiinide sisaldused mõõdeti kasutades pöördfaasikoloni (Luna C18(2), 150 x 2 mm, 5 µm) ja elektrokeemilist detekteerimist (Antec, Decade II) klaassüsinik elektroodiga potentsiaalil +0,7 V, võrdluselektroodiks oli Ag/AgCl.

Analüüdid eristati retentsioonaja alusel, analüüdid ja retentsiooniajad on nähtavad joonisel 12. Mõõtmist teostati 20 min. Detekteerimise piirid signaalimüra suhte kohta (S/N) = 3 olid järgmised (pmol/mg koe kohta): 0,02 DA, 0,01 HVA, 0,02 DOPAC, 0,02 5-HT, 0,02 5-HIAA, 0,01 3-MT.

Näidiskromatogrammid proovist ning proovist võrdluses standardlahusega on leitavad lisa 3 ja lisa 4.



Joonis 12. Monoamiinide ja nende metaboliitide kromatogramm. Analüütide retentsiooniajad on nähtavad analüütide nimetuse lühendi taga

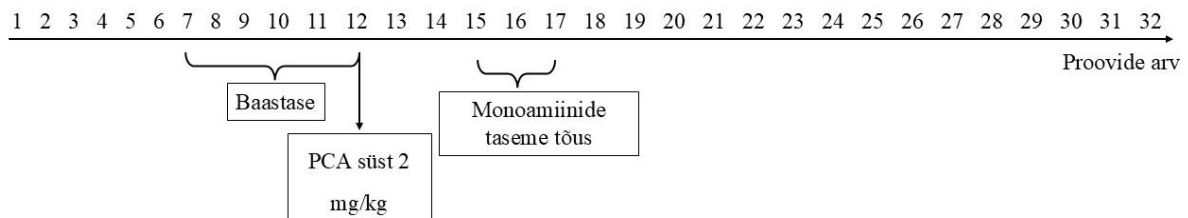
4.2.3. *In vivo* katse ja analüüsi kirjeldus

In vivo analüüsiks sooritati sotsiaalse interaktsiooni testi 4-5-kuu vanuste katseloomadega erinevatel päevadel, kokku neli korda ning arvutati keskmine interaktsioonis veedetud aeg iga looma kohta. Sotsiaalse interaktsiooni testi kõigi mõõtmiste mediaani (Mdn = 147 s) alusel jagati loomad kahte gruppi: 19 väiksema sotsiaalsusega (LS) ja 21 suurema sotsiaalsusega (HS) looma, sealjuures 10 emast väiksema sotsiaalsusega ja 10 suurema sotsiaalsusega ning 9 isast väiksema sotsiaalsusega ning 11 suurema sotsiaalsusega (vt lisa 2). Mikrodialüüsi katse sooritati 6-kuu vanuste katseloomadega.

Katses kasutati Y-kujulisi sonde nagu näidatud joonisel 8 ja joonisel 9. Mikrodialüüsimembraanina kasutati polüakrüülnitriili/naatriummetüülsulfonaadi kopolümeeri

(Filtral 12; siseläbimõõt 0,22 mm; välisläbimõõt 0,31 mm; AN 69, Hospal). Katseloomade mediaalsesse eesajukoode opereeriti koordinaatidel AP: 3,3 mm; ML: -0,8 mm; DV: -5,0 mm mikrodialüüsisond, mis kinnitati kahe roostevabast terasest kruvi ja hambatsemendiga. Enne operatsiooni süstiti katseloomadele lokaalselt lidokaiini 1% lahust (Lidocaine, Grindeks) ja operatsioonijärgse valu leevendamiseks meloksikaami (Meloxidyl, 1 mg/kg SC; Ceva Sante Animale). Pärast operatsiooni paigutati rotid individuaalsetesse puuridesse (21 x 36 x 18 cm), kus nad viibisid kogu katse vältel. Rottidele anti operatsioonist taastumiseks umbes 24 tundi ja mikrodialüüsi katse viidi läbi ärkvelolevatel, vabalt liikuvatel loomadel. Pärast mikrodialüüsi dekapikeeriti rotid ja ajud dissekteeriti, et kontrollida sondi asukohta visuaalselt.

Mikrodialüüsisondid ühendati süstlapumpadega (World Precision Instruments, Inc, Sarasota, FL, USA) ja proovikollektoritega, millel oli paindlik FEB-toru (i.d. 0. 12 mm; AgnTho's AB, Rootsi) ja perfundeeriti Ringeri lahusega (vt tabel 2). Mikrodialüsaate koguti 15-minutiliste vahedega voolukiirusel 1,5 µl/min, kokku 32 proovi ühelt loomalt. Esimest kuute proovi kasutati süsteemi stabiliseerimiseks ja järgnevat kuute proovi baastaseme mõõtmiseks. Pärast 12 proovi kogumist tehti PCA süst (2 mg/kg), millele järgnes 5 h proovide kogumist (vt joonis 13). PCA annuse sobivus *in vivo* mikrodialüüsi katsete jaoks suurusega 2 mg/kg on varem kindlaks tehtud ühes teises katses (Mällo *et al.* 2008). Kogutud mikrodialüsaatide ruumala varieerus vahemikus 23-25 µl.



Joonis 13. *In vivo* mikrodialüüsi katseskeem

Monoamiinide taset väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega loomadel mõõdeti kõikidest kogutud mikrodialüsaatidest samuti kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) meetodi abil. Analüüsiks pipeteeriti 23 µl mikrodialüsaati, millele lisati 27 µl filtreeritud Ringeri lahust (pH=7,21). Ringeri lahuse koostis koos ainete molaarsustega ja sisaldustega ühes liitris on nähtav tabel 2.

Tabel 2. Ringeri lahuse koostis

Aine	Aine kontsentratsioon C	Aine kogus l/l
NaCl	0,14 M	8,1816 g
KCl	0,004 M	0,2982 g
CaCl ₂	0,0012 M	0,1764 g
MgCl ₂	0,001 M	0,2033 g
Na ₂ HPO ₄	0,001 M	0,358 g
NaH ₂ PO ₄	0,0002 M	0,0312 g

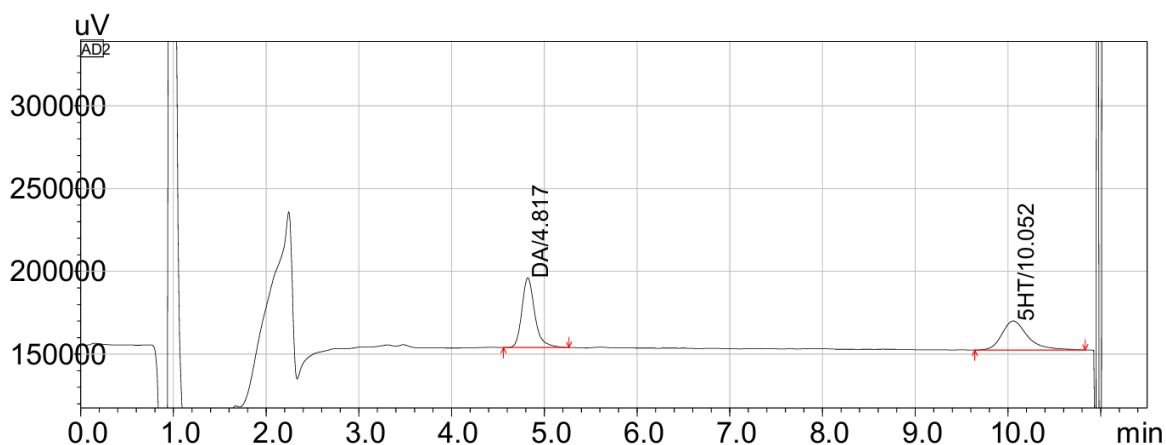
Proovi sisestamiseks kõrgsurvedelikkromatograafi (Shimadzu LC-20AD) kasutati käsitsi proovisisestussüsteemi. Süsti ruumala oli 50 µl. Elueerimise voolukiirus oli 0,2 ml/min. Kasutati isokraatilist elueerimist. Töös kasutatud kromatograferimispuhver *in vivo* proovide analüüsimiseks, ainete molaarsustega ja sisaldustega ühes liitris on toodud tabel 3.

Monoamiinide sisaldused mõõdeti kasutades pöördfaasikoloni (Luna C18(2), 150 x 2 mm, 5 µm) ja elektrokeemilist detekteerimist (Antec, Decade II) klaassüsinik elektroodiga potentsiaalil +0,4 V, võrdluselektroodiks oli Ag/AgCl.

Tabel 3. Töös kasutatud kromatograferimispuhver *in vivo* analüüsiks

Aine	Aine kontsentratsioon C	Aine või emalahuse kogus/l
Sidrunhape	0,05 M	10,507 g
Na ₂ EDTA x H ₂ O	0,01 M	2 ml
KCl	0,5 M	4 ml
pH = 5,3		
SOS	0,035 M	0,757 g
Atsetonitriil	14 % (V)	140 ml

Mõõtmist teostati 13 min. Analüüdid eristati retentsiooniaja alusel, mis on välja toodud joonisel 14 ning näidiskromatogrammide proovist võrdluses standardlahusega on leitavad lisas (vt lisa 5).



Joonis 14. Dopamiini ja serotoniini kromatogramm. Analüütide retentsiooniajad on nähtavad analüütide nimetuse lühendi taga

Kogu andmete arvutamine viidi läbi vedelikkromatograafia tarkvaraga LabSolutions (Shimadzu).

4.3 Monoamiinid, nende metaboliidid ja standardlahused

Käesolevas töös analüüsitud monoamiinid ja nende metaboliidid on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Töös kasutatud standardained CAS-numbrite, tootja ja puhtusastmega

Ühend [CAS]	Tootja	Puhtusaste
DA [51-61-6]	Sigma-Aldrich	≥ 98,5 %
DOPAC [102-32-9]	Sigma-Aldrich	≥ 95,0 %
3-MT [554-52-9]	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %
HVA [306-08-1]	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %
5-HT [50-67-9]	Sigma-Aldrich	-
5-HIAA [54-16-0]	Sigma-Aldrich	≥ 95,0 %

Kalibratsioonilahuste valmistamiseks kaaluti vastavat monoamiini vahemikus 15-25 mg, mis lahustati 25 ml standardilahuses (0,01 M HCl, 0,25 mM Na₂EDTA ja 50 mM Na₂S₂O₅). Lahuseid hoiustati külmkapis +4°C juures.

Igapäevaselt tehti värsked töölahused *ex vivo* analüüsile järgmiselt:

I lahendus – valmistati töölahus, mis sisaldas kõiki monoamiinide ja derivaatide lahuseid 25 µl/25 ml.

II lahendus – valmistati 4 erinevat lahendust kalibratsiooni sirge saamiseks:

- A) 250 µl standardlahust 25 ml-sse kolbi
- B) 500 µl standardlahust 25 ml-sse kolbi
- C) 750 µl standardlahust 25 ml-sse kolbi
- D) 1000 µl standardlahust 25 ml-sse kolbi

Igapäevaselt tehti värsked töölahused *in vivo* analüüsile järgmiselt:

I lahjendus – valmistati töölahus, mis sisaldas dopamiini ja serotoniini lahust 25 µl/25 ml.

II lahjendus – valmistati lahus, mis sisaldas I lahjenduse lahust 10 µl/25 ml

4.4 Töös kasutatud standardained

Käesolevas töös kasutatud standardained CAS numbri, tootja ja puhtusastmega on toodud tabelis 5. Kemikaale hoiustatakse vastavalt vajadusele toatemperatuuril või +4°C juures.

Tabel 5. Töös kasutatud standardained CAS-numbrite, tootja ja puhtusastmega

Ühend [CAS]	Tootja	Puhtusaste
C ₆ H ₈ O ₇ (sidrunhape) [77-92-9]	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %
Na ₂ EDTA x H ₂ O [6381-92-6]	Sigma-Aldrich	≥ 95,0 %
KCl [7447-40-7]	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %
SOS [5324-84-5]	Sigma-Aldrich	≥ 95,0 %
C ₂ H ₃ N (atsetonitriil) [75-05-8]	Honeywell	≥ 99,0 %
HClO ₄ [7601-90-3]	Sigma-Aldrich	< 90,0 %
Na ₂ S ₂ O ₅ [7681-57-4]	Sigma-Aldrich	≥ 98,0 %
NaCl [7647-14-5]	Sigma-Aldrich	-
CaCl ₂ [10043-52-4]	Honeywell	≥ 99,0 %
MgCl ₂ [7791-18-6]	Roth	≥ 98,0 %
Na ₂ HPO ₄ [7558-79-4]	AppliChem	≥ 98,0 %
NaH ₂ PO ₄ [7558-80-7]	AppliChem	≥ 98,0 %

4.5 Andmeanalüüs

Ex vivo analüüsist saadud andmed analüüsiti, kasutades JASP (versioon 0.17.1) andmetöötlusprogrammi ja Microsoft Excelit (versioon 2303). Monoamiinide (pmol/mg) jaotuse normaaljaotusele vastavuse hindamiseks kasutati Shapiro-Wilki testi, mille põhjal leiti, et tegemist ei ole normaaljaotusega. Edasi toimetati mitteparameetrilise testiga Mann-Whitney,

millega sai hinnata monoamiinide ja nende käivate erinevust kahe grupi vahel. Lisaks leiti Spearmani korrelatsiooni astak kordaja rho. Saadud tulemuste olulisusenivooks võeti $p < 0,05$.

In vivo analüüsist saadud andmed analüüsiti, kasutades JASP (versioon 0.19.0) andmetöötlusprogrammi ja Microsoft Excelit (versioon 2503). Dopamiini ja serotoniini rakuväliste tasemete muutuste hindamiseks viidi läbi korduvmõõtmise dispersioonanalüüs (ANOVA), et analüüsida ajas toimunud muutusi ja võrrelda muutusi püsisotsiaalsuse ja soo vahel. Selle analüüsi puhul F-statistik näitab variatsioonisuhet rühmade vahel ja sees. Sulgudes toodud arv F-statistiku järel viitab vabadusastmetele: esimene arv tähistab rühmade arvu miinus üks ja teine arv tähistab koguvabadusastmeid. Andmeanalüüsist jäeti välja esimesed 6 proovi, mida kasutati mõõtmisignaali stabiliseerimise eesmärgil ja mis ei kajastanud eksperimentaalset mõju.

Dopamiini ja serotoniini tasemete muutuste kvantifitseerimiseks võrreldes baastasemega kasutati suhtelise muutuse protsentarvutust järgmise valemi alusel: $(\text{prooviväärtus} * 100) / \text{baastase}$). Järelanalüüsina kasutati Fisheri testi, et tuvastada statistiliselt olulisi erinevusi sotsiaalsusetaseme rühmade ja/või sugude vahel, juhul kui ANOVA tulemused näitasid olulist peamist mõju. Saadud tulemuste olulisusenivooks võeti $p < 0,05$.

4.6 Autori panus

Eelnevalt on määratud sotsiaalses interaktsioonis oldud aeg ning kogutud ajukoeproovid ja mikrodialüsaadid. Autori poolt viidi läbi ajukoeproovide ja mikrodialüsaatide kromatograafiline analüüs ja andmetöötlus.

5. TULEMUSED JA ARUTELU

5.1 *Ex vivo* analüüsi tulemused

Tabelis 6 toodud tulemuste põhjal saab öelda, et dopamiini ja selle metaboliitide keskmised sisaldused ning dopamiini käive juttkehas ei erinenud oluliselt väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega rottide vahel. Kuigi LS-rühma kuuluvatel loomadeli oli keskmine dopamiinisaldus veidi kõrgem ($51,46 \pm 9,76$ pmol/mg) võrreldes HS-rühma kuuluvate loomadega ($49,44 \pm 9,55$ pmol/mg), ei ole see erinevus statistiliselt usaldusväärne ($p=0,619$). Statistiliselt usaldusväärseid erinevusi ei täheldatud ka dopamiinimetaboliitide sisalduste erinevustes ega dopamiinikäibe, (DOPAC+3-MT+HVA)/DA, erinevustes.

Serotoniini ja selle metaboliidi 5-hüdroksüindooläädikhappe sisaldused ning serotoniini käive ei erinenud statistiliselt usaldusväärsest väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega rottide vahel. Kuigi LS-rühma kuuluvad rotid näitasid kõrgemaid 5-HIAA tasemeid ($10,13 \pm 12,00$ pmol/mg) võrreldes HS-rühma kuuluvate rottidega ($6,31 \pm 6,07$ pmol/mg), ei saavutanud erinevused statistilist usaldusväärset ($p=0,619$). Statistiliselt usaldusväärne tulemus ei olnud ka serotoniinikäibe puhul ($p=0,561$), kuigi LS-rühma kuuluvad rotid näitasid kõrgemat serotoniinikäivet ($2,84 \pm 3,42$) kui HS-rühma kuuluvad rotid ($1,61 \pm 1,82$).

Tabel 6. LS- ja HS-rühmade keskmised monoamiinide ja metaboliitide (pmol/mg) sisaldused koos standardhälbega, mediaanid, gruppide võrdluse (Mann-Whitney U-test) statistik ja tõenäosus.

	HS/LS	Keskmine sisaldus (pmol/mg)		Standardhälve	Mann-Whitney U-testi statistik	p
DOPAC	HS	7,06	±	2,36	114	0,967
	LS	6,61	±	1,31		
DA	HS	49,44	±	9,55	100	0,619
	LS	51,46	±	9,76		
3-MT	HS	1,52	±	0,48	108	0,868
	LS	1,65	±	0,84		
HVA	HS	2,45	±	0,99	115	0,934
	LS	2,31	±	0,75		

	HS/LS	Keskmine sisaldus (pmol/mg)		Standardhälve	Mann- Whitney U-testi statistik	p
(DOPAC+3- MT+HVA)/DA	HS	0,22	±	0,03	140	0,267
	LS	0,21	±	0,03		
5-HIAA	HS	6,31	±	6,07	100	0,619
	LS	10,13	±	12,00		
5-HT	HS	6,78	±	5,00	109,5	0,917
	LS	6,40	±	5,36		
5-HIAA/5-HT	HS	1,61	±	1,82	98	0,561
	LS	2,84	±	3,42		

Hindamaks dopamiini ja serotoniini tasemete erinevusi suurema ja väiksema sotsiaalsusega loomadel võrreldi Spearmani korrelatsioonianalüüsiga iga katselooma keskmist sotsiaalses interaktsioonis veedetud aega vastava monoamiini ja selle metaboliitide sisaldustega juttkehas.

Varasemalt on uuritud Tõnissaare jt poolt dopamiini ja selle metaboliitide seost püsisotsiaalsusega frontaalkoores, septumis ja hipokampuses, kuid statistiliselt usaldusväärset seost ega korrelatsiooni ei leitud (Tõnissaar *et al.* 2004). Käesolevas uuringus näitasid ka juttkeha tulemused sarnast tulemust: dopamiinitaseme ja sotsiaalses interaktsioonis veedetud aja vaheline seos ei olnud statistiliselt usaldusväärne ($\rho = -0,217$; $p = 0,248$). Samuti puudus usaldusväärne korrelatsioon DOPAC-i, 3-MT, HVA või dopamiinikäibe (DOPAC + 3-MT + HVA)/DA ja sotsiaalse aktiivsuse vahel (vt tabel 7).

Juttkehas oleva serotoniinitaseme ja sotsiaalses interaktsioonis veedetud aja vahel puudus statistiliselt usaldusväärne seos ($\rho = 0,100$; $p = 0,599$). Samas näitas serotoniinimetaboliidi 5-HIAA tase negatiivset korrelatsiooni sotsiaalse aktiivsusega ($\rho = -0,234$), kuid seos ei olnud statistiliselt usaldusväärne ($p = 0,213$). Ka serotoniinikäibe näitas negatiivset korrelatsiooni ($\rho = -0,250$; $p = 0,182$), mis võib viidata sellele, et suurema sotsiaalsusega loomadel on madalam serotonergiline käibe, kuid tulemus ei ole statistiliselt usaldusväärne.

Saadud tulemus on kooskõlas Tõnissaare jt tulemusega, kus püsisotsiaalsus oli negatiivselt seotud frontaalkorteksi 5-HIAA tasemega, mis viitab võimalusele, et kõrgem 5-HT käibe võib pärssida sotsiaalset aktiivsust (Tõnissaar *et al.* 2004).

Tabel 7. Spearmani korrelatsioonianalüüs monoamiinide, nende metaboliitide, monoamiinide käibe ja keskmises sotsiaalses kontaktis veedetud aja suhtes

		Spearman's rho p	
Keskmine kontaktis veedetud aeg (s)	- DOPAC	-0,055	0,772
Keskmine kontaktis veedetud aeg (s)	- DA	-0,217	0,248
Keskmine kontaktis veedetud aeg (s)	- 5-HIAA	-0,234	0,213
Keskmine kontaktis veedetud aeg (s)	- HVA	-0,077	0,686
Keskmine kontaktis veedetud aeg (s)	- 3-MT	-0,089	0,639
Keskmine kontaktis veedetud aeg (s)	- 5-HT	0,100	0,599
Keskmine kontaktis veedetud aeg (s)	- 5-HIAA/5-HT	-0,250	0,182
Keskmine kontaktis veedetud aeg (s)	- DOPAC+3-MT+HVA/DA	0,208	0,271

Märkused. Rho = korrelatsioonikordaja

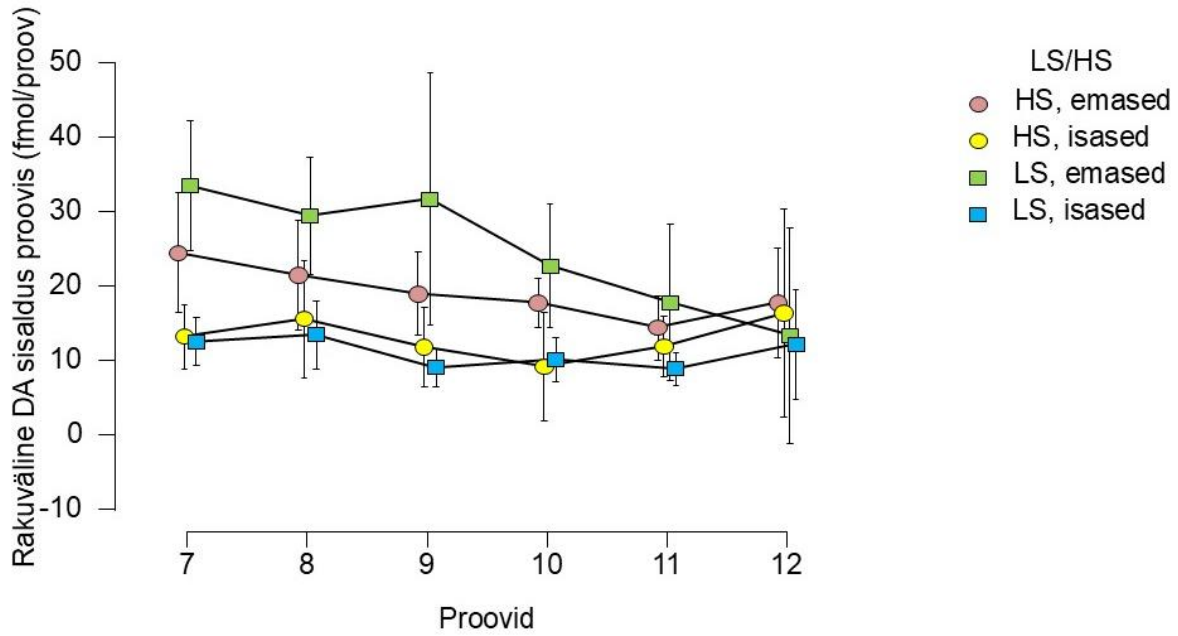
Tulemused viitavad, et dopamiinisüsteemi aktiivsus ei erista väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega loomi, mistõttu dopamiin ei pruugi olla otseselt seotud isiksusliku sotsiaalsuse tunnuse kujunemise või püsimisega vähemalt nende näitajate põhjal. Eelnevad uuringud on näidanud dopamiini rolli eelkõige motivatsiooni ja uudishimu vahendajana (Mällo *et al.* 2007), kuid sotsiaalse käitumise stabiilsemate aspektide puhul võivad määravamad olla teised neurokeemilised süsteemid, näiteks serotonergiline neurotransmissioon.

Kuigi serotoniini ja selle metaboliidi sisaldustes ei ilmnenud samuti statistiliselt usaldusväärseid erinevusi, täheldati trendi kõrgemate 5-HIAA ja 5-HIAA/5-HT suhete suunas väiksema püsisotsiaalsusega rottidel. See võib viidata võimalikele erinevustele serotonergilises käibes, mida ei olnud käesolevas andmestikus võimalik lõplikult kinnitada. Varasemad uuringud on näidanud, et sotsiaalne aktiivsus võib olla negatiivselt seotud 5-HIAA tasemetega frontaalkoores ja septumis (Tõnissaar *et al.* 2004), mis toetab serotoniinisüsteemi osalust sotsiaalse käitumise regulatsioonis.

5.2 *In vivo* analüüsi tulemused

Korduvmõõtmiste ANOVA analüüsi tulemused näitasid, et *in vivo* mõõdetud rakuväline dopamiinisisaldus baastasemel prefrontaalses korteksis ei olnud seotud sotsiaalsusega ehk ei erinenud statistiliselt usaldusväärsetl väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega rottide vahel ($F(1,34) = 0,859$, $p = 0,360$). Küll aga oli DA baastase märgatavalt kõrgem emaste rottide puhul ($F(5,85) = 3,329$, $p = 0,009$) (vt joonis 15, lisa 6). Varasemalt läbi viidud katses Wistari liini

isaste rottidega, leiti, et rakuväline dopamiinisisaldus baastasemel ei erine prefrontaalses korteksis HS- ja LS- rühma kuuluvate isaste rottide vahel (Norden *et al.* 2024). See on kooskõlas ka antud töö tulemustega, kus samuti ei leitud isaste rottide rakuvälise dopamiinisisalduse ja sotsiaalsuse vahel statistiliselt usaldusväärset seost ($F(1,18) = 0,435, p = 0,518$).

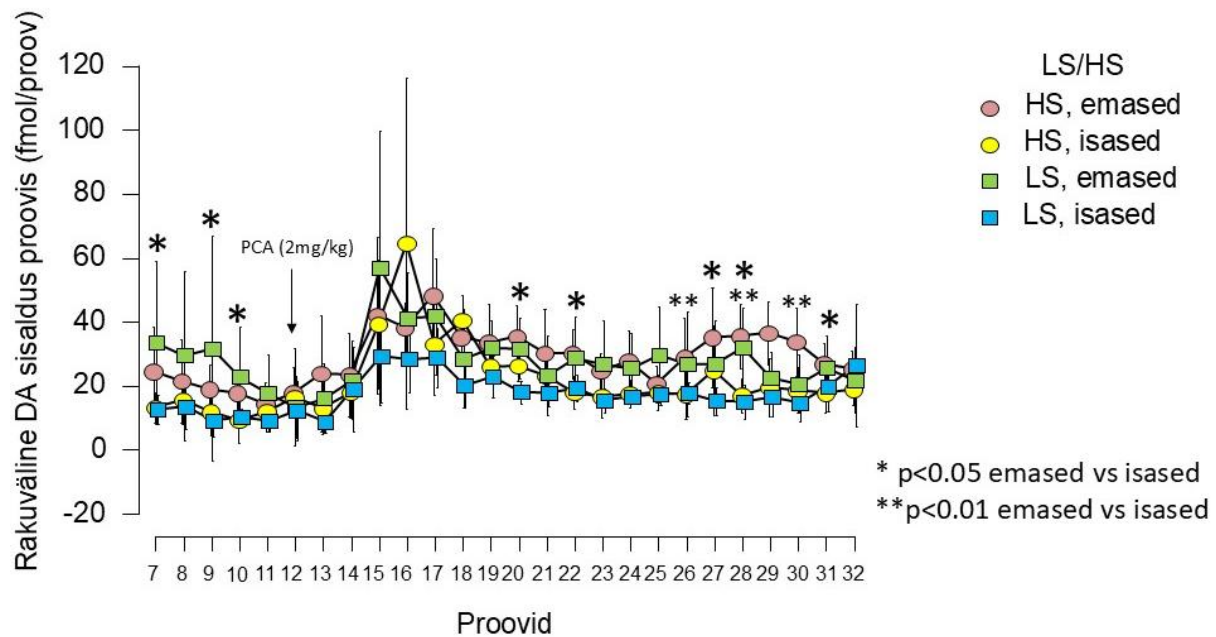


Joonis 15. Rakuväline dopamiinisisaldus baastasemel väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emaste ja isaste rottide proovides

Pärast PCA manustamist suurenes rakuväline dopamiinisisaldus proovis kõigis rühmades võrdset, mis viitab üldisele dopamiinergilisele aktivatsioonile sõltumata sotsiaalsusest. Samas, oli dopamiinitaseme taastumine baastasemele mõnevõrra aeglasem emaste rottide, eelkõige suurema püsisotsiaalsusega emaste rottide puhul, võrreldes isasloomadega (vt joonis 16).

Kasutati ANOVA korduvmõõtmiste analüüsi ja leiti, et statistiliselt usaldusväärset ei erinenud rakuväline dopamiinisisaldus proovides, võrreldes kõiki väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega rotte ($F(1,35) = 0,508, p = 0,481$). Statistiliselt usaldusväärset tulemust näitas aga sotsiaalsusest sõltumata sugudevaheline analüüs ($F(1,35) = 6,060, p = 0,019$), viidates sellele, et rakuvälises dopamiinitasemes esineb erinevusi emaste ja isaste rottide vahel. Joonisel 16 on märgitud Fisheri analüüsi tulemusena, et rakuvälised dopamiinisisaldused erinesid statistiliselt usaldusväärset emaste ja isaste rottide vahel baastaseme mõõtmise ajal proovides 7, 9 ja 10 ning proovides numbritega 20, 22, 27, 28 ja 31. Kohe pärast PCA

manustamist rakuvälises dopamiinisalduses proovis statistiliselt usaldusväärseid erinevusi ei saavutatud.

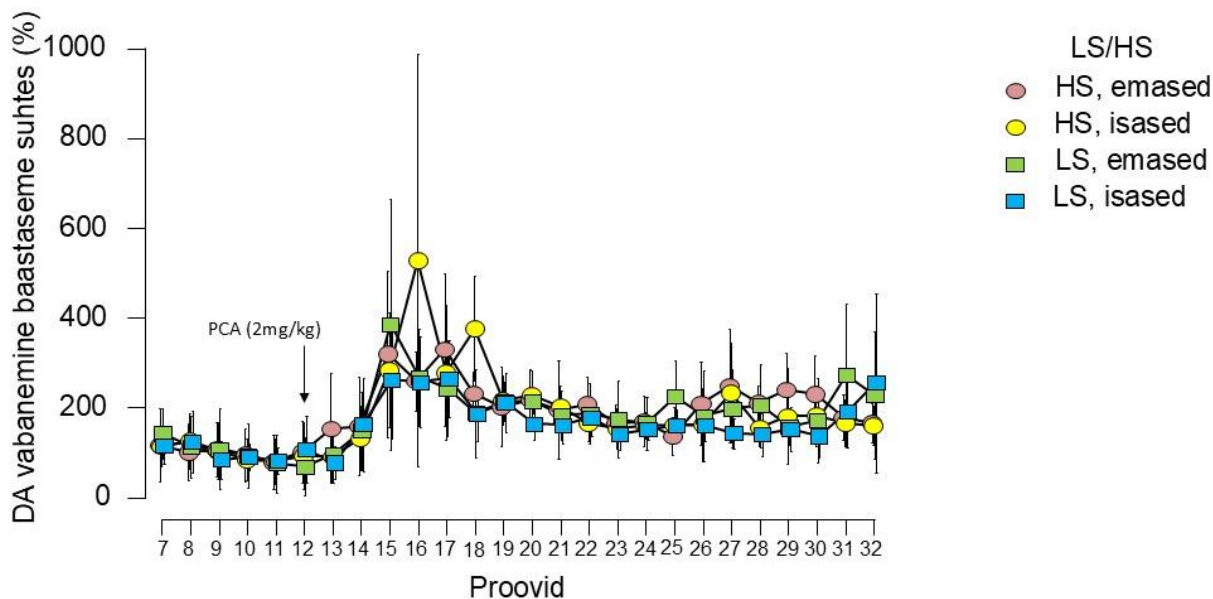


Joonis 16. Rakuvälise dopamiinisaldus proovides väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emastel ja isastel rottidel

Paraklooramfetamiini manustamise järgselt suurenes dopamiinivabanemine rakuväliselt baastaseme suhtes nii emastel kui ka isastel loomadel, sõltumata nende kuuluvusest väiksema või suurema püsisotsiaalsusega rühma (vt joonis 17). Kuigi ilmnes selge vabanemistaseme tõus, ei olnud see erinevus statistiliselt usaldusväärne soo ($F(1,34) = 0,683$, $p = 0,415$) ega sotsiaalse iseloomu ($F(1,34) = 0,118$, $p = 0,733$) lõikes. Tulemus viitab sellele, et PCA toime dopamiinergilisele aktiivsusele on üldine ja ei sõltunud looma sotsiaalsusest ega soost.

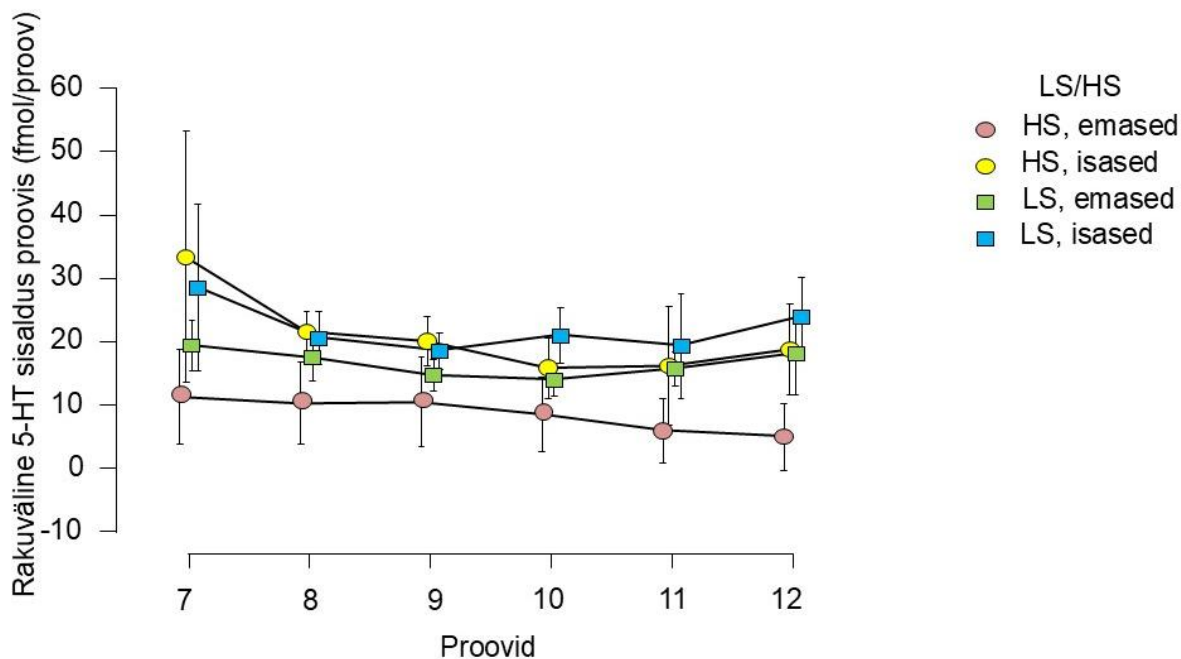
Joonisel 17 on näha, et vabanemise maksimum saavutati vahetult pärast PCA manustamist (proovid 15-17), millele järgnes vabanemistaseme normaliseerumine. Kuigi HS-isased näitasid keskmiselt suuremat dopamiini vabanemist baastaseme suhtes võrreldes teiste rühmadega, viitab suur varieeruvus andmepunktides sellele, et esinesid suured individuaalsed erinevused.

Varasemalt Wistari liini isaste rottidega tehtud katse näitab, et paraklooramfetamiini poolt esile kutsutud dopamiini vabanemine ei sõltu sotsiaalsusest (Norden *et al.* 2024). Käesolevas töös Sprague-Dawley liini rottidega tehtud katses ei ilmne samuti usaldusväärset seost isaste rottide sotsiaalsuse ja PCA poolt esile kutsutud dopamiini vabanemise vahel ($F(1,18)=0,944$, $p=0,344$).



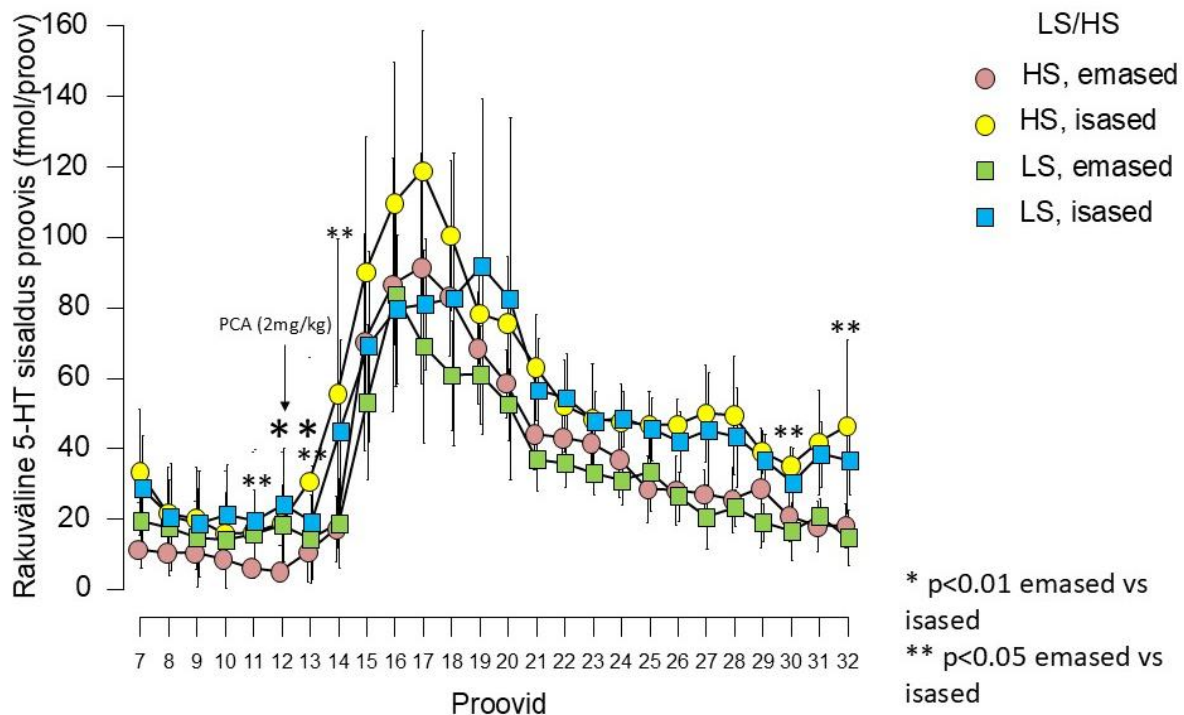
Joonis 17. Dopamiini vabanemise muutus baastaseme keskmisest väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emastel ja isastel rottidel

Korduvmõõtmiste ANOVA analüüs *in vivo* mõõdetud rakuvälise serotoniinisalduse baastasemete kohta prefrontaalses korteksis ei andnud statistiliselt usaldusväärset seost sotsiaalsusega ($F(1,33) = 0,882$, $p = 0,354$), kuid oli kõrgem isaste rottide puhul (vt lisa 7) ($F(1,33) = 3,491$, $p < 0,01$). Ka väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emaste rottide vahel esines kahekordne erinevus tulemustes (vt joonis 18 ja lisa 7), mis võib viidata võimalikule sotsiaalsele sõltuvusele, kuid antud töös ei andnud statistiliselt usaldusväärset tulemust ($F(1,17) = 1,492$, $p = 0,239$). Tõnissaar jt on leidnud, et ühekaupa majutatud suurema sotsiaalsusega rotid on tundlikumad stressi suhtes (Tõnissaar *et al.* 2004) seega suurema sotsiaalsusega emaste rottide madal 5-HT baastase võib viidata ka stressirohkele üksikmajutusele. Samas on Tõnissaar jt leidnud, et vähemalt Wistari liini rottide HS- ja LS-rühma kuuluvate rottide vahel ei ole erinevusi 5-HT ega 5-HT transportervalkude tasemetes frontaalses korteksis (Tõnissaar *et al.* 2008). Seetõttu ei tohiks baastaseme erinevused väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega rottide vahel olla tingitud suurenenud serotoniini tagasihaardest, mis viitaks madalama serotoniini sisaldusele baastasemes HS-rühma rottidel, nagu on täheldatud väiksema püsisotsiaalsusega rottidel (Mällo *et al.* 2008).



Joonis 18. Rakuväline serotoniinisaldus baastasemel väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emaste ja isaste rottide proovides

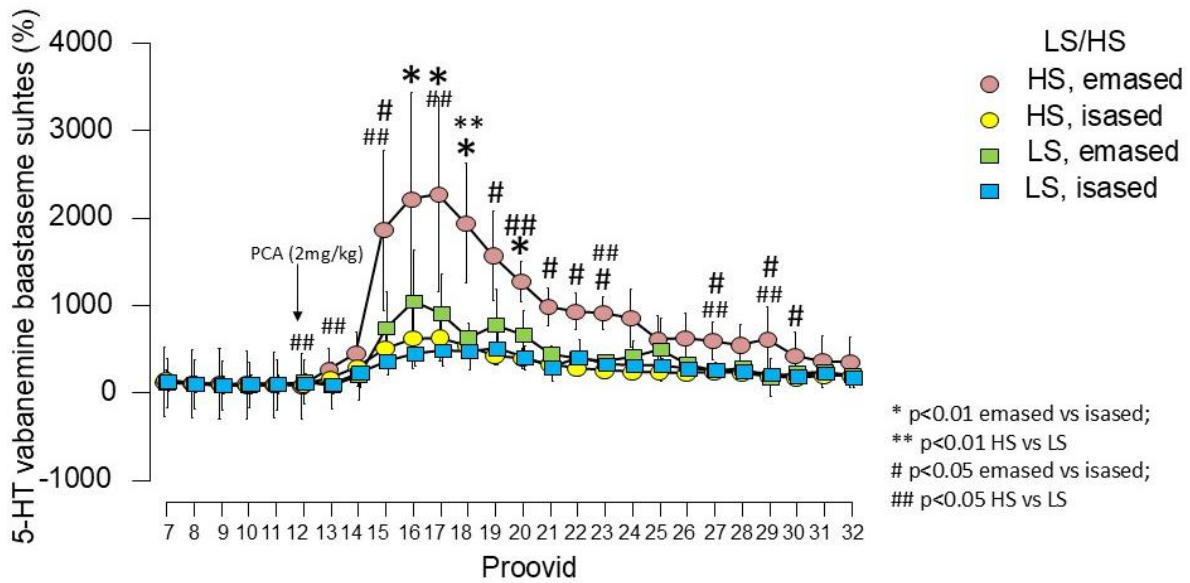
Kordumõõtmiste ANOVA analüüs näitas rakuvälise serotoniinisalduse erinevustes statistilist usaldusväarsust vaid sugude analüüsimisel, sotsiaalsust arvestamata ($F(1,33) = 4,557, p < 0,05$). ANOVA ei näidanud statistiliselt usaldusväärseid erinevusi sotsiaalsust ja sugusid arvesse võttes ($F(1,33) = 0,083, p = 0,858$) ega üldiselt väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega rottide vahel ($F(1,33) = 0,316, p = 0,558$). Järelanalüüsina teostatud Fisheri test näitas statistiliselt usaldusväärseid erinevusi emaste ja isaste rottide rakuvälise serotoniinisalduste vahel proovides 11, 12, 13 ja 14, ning lisaks proovides 30 ja 32, nagu näidatud joonisel 19.



Joonis 19. Rakuväline serotoniinisaldus proovides väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emastel ja isastel rottidel

PCA manustamine kutsus esile märkimisväärse rakuväline serotoniini vabanemise baastaseme suhtes. Serotoniinitaseme muutus ajas võrreldes baastasemega sõltus statistiliselt usaldusväärselt soost ($F(25,825) = 2,322, p < 0,001$). Kogu katse jooksul oli emastel rottidel serotoniini üldine vabanemine suurem kui isastel rottidel ($F(1,33) = 8,357, p < 0,01$), kuid eriti selge oli see pärast PCA manustamist ($F(25,825) = 6,812, p < 0,0001$). PCA poolt esilekutsutud rakuväline serotoniini vabanemine oli omakorda kõige suurem suurema püsisotsiaalsusega emaste rottide puhul, nagu joonisel 20 näha. Samas oli PCA poolt esile kutsutud serotoniini vabanemine väiksem isaste rottide puhul ja üldiselt madalam LS-rühma rottide puhul ($F(25,825) = 3,302, p < 0,0001$), kuid märkimisväärselt ei erinenud omavahel LS-emased ning HS- ja LS-isased rotid (vt joonis 20).

Tõnissaar jt on leidnud, et Wistari liini isaste rottide puhul *ex vivo* mõõdetuna, oli suurem sotsiaalsus seotud 5-HIAA madalama tasemega frontaalses korteksis, mis viitab kaudselt 5-HT madalamale vabanemisele HS-rühma kuuluvatel rottidel (Tõnissaar *et al.* 2004). Käesolevas katses kasutatud Sprague-Dawley liini rottide puhul on näha 5-HT madalamat vabanemist aga LS-rühma kuuluvate isaste rottide puhul, kuigi tulemused on üsna sarnased nii HS- kui ka LS-rühma kuuluvate isaste rottide puhul.



Joonis 20. Serotoniini vabanemise muutus baastaseme keskmisest väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emastel ja isastel rottidel

Toetudes varasemalt tehtud katsele Wistari liini isaste rottidega *in vivo* meetodil, kus tulemuste põhjal selgus, et dopamiini vabanemisega dorsomediaalses juttkehas seost püsisotsiaalsusega ei ilmnenud (Norden *et al.* 2024), saab käesoleva töö tulemuste põhjal öelda, et seost ei ilmnenud ka prefrontaalses korteksis Sprague-Dawley liini rottide puhul. Statistiliselt usaldusväärseid tulemusi või olulisi avastusi ei leitud kahe erineva püsisotsiaalsusega rühmade ega sugude vahel.

Põhirõhk *in vivo* katse puhul oli seatud väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega rottide rakuvälise serotoniini taseme ja serotoniini vabanemise potentsiaali võrdlusele, manustades neile väikest annust paraklooramfetamiini.

Varasemalt isaste Wistari liini rottidega tehtud katses oli dorsomediaalse striatumi puhul püsisotsiaalsus seotud PCA poolt esile kutsutud serotoniini vabanemisega (Norden *et al.* 2024). Käesolevas töös saadud tulemused viitavad, et serotoniini regulatsioon prefrontaalses korteksis võib olla seotud nii sotsiaalse käitumisega kui ka soospetsiifiliste neurobioloogiliste mehhanismidega. Selle kinnitamiseks oleksid vajalikud üksikasjalikud võrdlevad uuringud serotoniini regulatsiooni ja individuaalsete erinevuste kohta.

Serotoniini vabanemise potentsiaali uurimine PCA abil näitas võrreldavat rakuvälise serotoniini taseme tõusu väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emaste ja isaste rottide puhul. Erilist huvi pakub edasiseks uurimiseks kõrge serotoniini vabanemise potentsiaali uurimine suurema

püsisotsiaalsusega emaste rottide puhul, mis on märgatavalt suurem kui isaste rottide puhul ja mida varem uuritud ei ole.

6. KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida rottide sotsiaalse käitumise monoamiinergilisi alusmehhanisme, keskendudes dopamiini ja serotoniini rollile.

Uuringus kasutati kahte meetodit: *ex vivo* analüüsi, mille käigus mõõdeti monoamiinide ja nende metaboliitide sisaldust dissekteeritud ajukoest, täpsemalt juttkehast; ning *in vivo* mikrodialüüsimeetodi, mille abil mõõdeti eesajukoorest neurotransmitterite rakuväliseid tasemeid ja vabanemise potentsiaali paraklooramfetamiini toimet. Eksperimentides kasutati Wistari liini isaseid rotte ja Sprague-Dawley liini emaseid ja isaseid rotte, kelle püsisotsiaalsus määrati korduvalt läbi viidud sotsiaalse interaktsiooni testide põhjal.

Ex vivo analüüsile seatud hüpoteesid ei leidnud kinnitust. Dopamiini- ega serotoniinikäive ei erinenud väiksema ja suurema püsisotsiaalsuse rühma kuuluvate rottide vahel. Spearmani korrelatsioonianalüüs ei näidanud tugevaid seoseid monoamiinide sisalduste ega nende käivate ja rottide sotsiaalses interaktsioonis veedetud aja vahel.

In vivo analüüsist selgus, et kuigi ilmnes sugudevaheline erinevus rakuvälise dopamiini baastasemetes, polnud see statistiliselt usaldusväärne. Dopamiini vabanemise potentsiaal ei olnud seotud soo ega püsisotsiaalsusega. Paraklooramfetamiin kutsus esile üldise dopamiinergilise aktivatsiooni kõigis rühmades sarnaselt. Rakuvälise serotoniini baastasemed olid kõrgemad isaste rottide puhul võrreldes emaste rottidega. Samas esines kahekordne sisalduse erinevus ka väiksema ja suurema püsisotsiaalsusega emaste rottide vahel. Kuid sarnaselt dopamiinile ei esinenud serotoniini baastasemetes statistiliselt usaldusväärset tulemust nii sugude kui ka sotsiaalsuse lõikes. Seevastu suurema püsisotsiaalsusega emastel rottidel oli selgelt kõrgem serotoniini vabanemise potentsiaal eesajukooses võrreldes isasloomadega. Tegu on olulise avastusega, mis viitab soospetsiifilisele seosele serotonergilise süsteemi aktiivsuse ja sotsiaalse käitumise vahel.

Edasised uuringud antud teemal võiks käsitleda sotsiaalse käitumise neurobioloogiat soospetsiifiliselt.

Antud bakalaureusetöö on osa Eesti Teadusagentuuri poolt rahastatavast projektist PRG1213.

7. SUMMARY

The aim of this bachelor's thesis was to investigate the monoaminergic mechanisms underlying social behavior in rats, focusing on the roles of dopamine and serotonin. Two methods were employed: an *ex vivo* analysis measuring monoamines and their metabolites in dissected brain tissue (specifically the striatum), and an *in vivo* microdialysis method assessing extracellular neurotransmitter levels and release in the prefrontal cortex following para-chloroamphetamine administration. The study used male Wistar rats and both male and female Sprague-Dawley rats, whose trait sociality was repeatedly assessed through social interaction tests.

The *ex vivo* results did not support the initial hypotheses: no significant differences in dopamine or serotonin turnover were observed between rats with low or high sociability. Furthermore, Spearman correlation analysis did not reveal strong associations between monoamine levels or turnover rates and the time spent in social interaction.

The *in vivo* analysis revealed that although a sex difference in baseline extracellular dopamine levels was observed, it was not statistically significant. The potential for dopamine release was not associated with sex or stable social status. Baseline extracellular serotonin levels were higher in male rats compared to female rats. Additionally, a twofold difference in serotonin concentration was observed between female rats with lower and higher stable social status. However, similar to dopamine, the differences in baseline serotonin levels were not statistically significant with respect to either sex or social status. Notably, females with high sociability exhibited a significantly greater serotonin release potential in the prefrontal cortex compared to males. This finding suggests a sex-specific link between serotonergic system activity and social behavior.

In conclusion, the study highlights the importance of considering sex-specific neurobiological mechanisms in future research on social behavior.

This bachelor's thesis is part of the project PRG1213, funded by the Estonian Research Council.

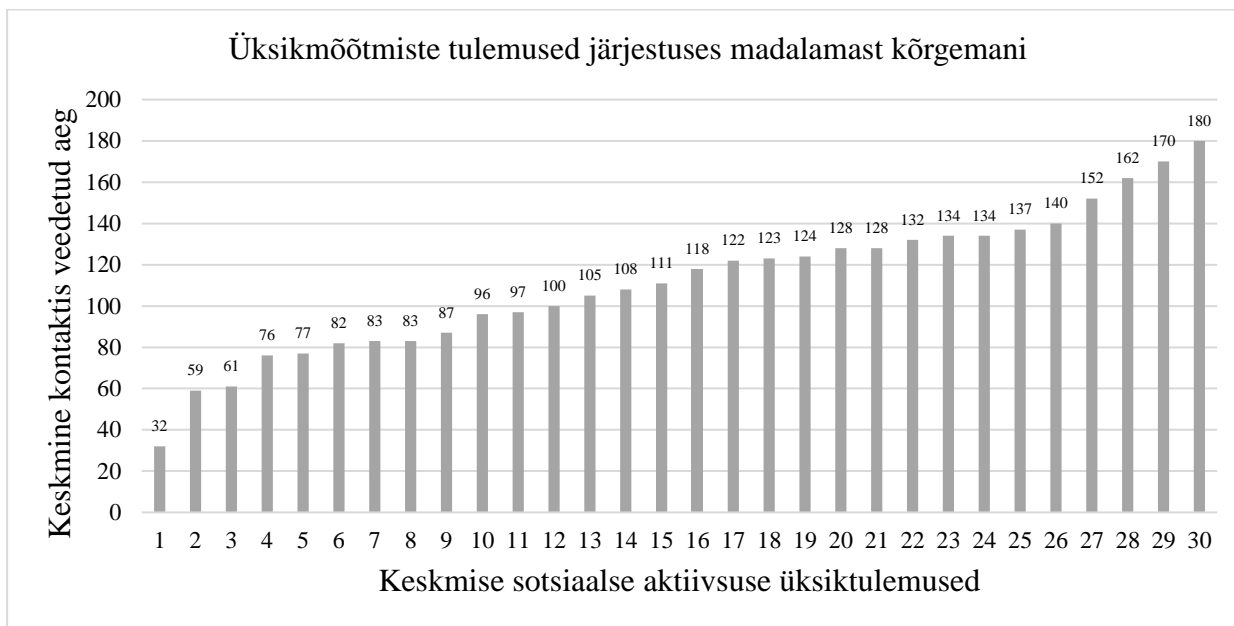
8. KASUTATUD KIRJANDUS

- Báez-Mendoza R., Schultz W. (2013) The role of the striatum in social behavior. *Frontiers in Neuroscience* **7**.
- Berger M., Gray J. A., Roth B. L. (2009) The Expanded Biology of Serotonin. *Annu Rev Med* **60**, 355–366.
- Best J. A., Nijhout H. F., Reed M. C. (2009) Homeostatic mechanisms in dopamine synthesis and release: a mathematical model. *Theor Biol Med Model* **6**, 21.
- Bhatia A., Lenchner J. R., Saadabadi A. (2023) Biochemistry, Dopamine Receptors, in *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Chaurasia C. S., Müller M., Bashaw E. D., Benfeldt E., Bolinder J., Bullock R., Bungay P. M., et al. (2007) AAPS-FDA workshop white paper: Microdialysis principles, application, and regulatory perspectives report from the Joint AAPS-FDA Workshop, November 4–5, 2005, Nashville, TN. *AAPS J* **9**, E48–E59.
- Chefer V. I., Thompson A. C., Zapata A., Shippenberg T. S. (2009) Overview of Brain Microdialysis. *Curr Protoc Neurosci* chapter, Unit7.1.
- Davis S. E., Cirincione A. B., Jimenez-Torres A. C., Zhu J. (2023) The Impact of Neurotransmitters on the Neurobiology of Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* **24**, 15340.
- Davison D., Parrott A. C. (1997) Ecstasy (MDMA) in Recreational Users: Self-Reported Psychological and Physiological Effects. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* **12**, 221–226.
- Delgado M. R. (2007) Reward-Related Responses in the Human Striatum. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1104**, 70–88.
- Delmo N., Mostafiz B., Ross A. E., Suni J., Peltola E. (2023) Developing an electrochemical sensor for the *in vivo* measurements of dopamine. *Sens. Diagn.* **2**, 559–581.
- Di Giovanni G., Svob Strac D., Sole M., Unzeta M., Tipton K. F., Mück-Šeler D., Bolea I., et al. (2016) Monoaminergic and Histaminergic Strategies and Treatments in Brain Diseases. *Front Neurosci* **10**, 541.
- Dolan J. (2016) Retention Time Drift—A Case Study. **34**, 254–261.
- Dolan J. (2017) Back to Basics: The Role of pH in Retention and Selectivity. **30**, 30–33.
- Feldman J. M. (2004) Serotonin, in *Encyclopedia of Gastroenterology*, (Johnson L. R., ed), pp. 346–351. Elsevier, New York.

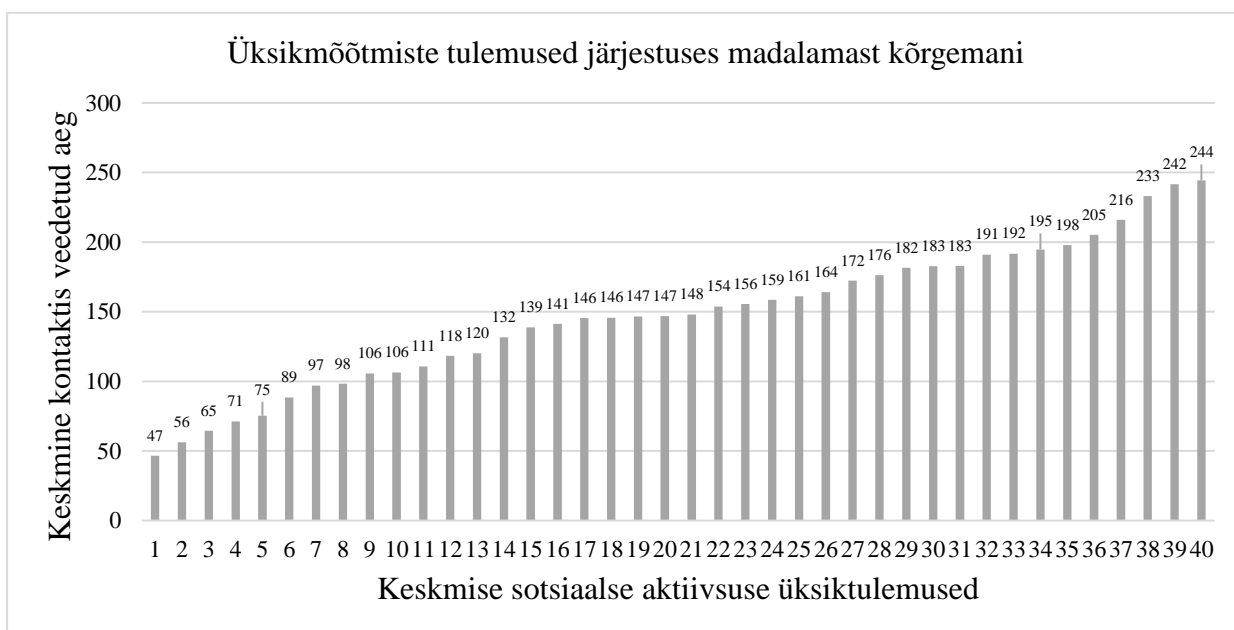
- Frazer A., Hensler J. G. (1999) Serotonin Receptors, in *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition*. Lippincott-Raven.
- Guiard B. P., Gotti G. (2024) The High-Precision Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (HPLC-ECD) for Monoamines Neurotransmitters and Their Metabolites: A Review. *Molecules* **29**, 496.
- Harsing L. G. (2008) Dopamine and the Dopaminergic Systems of the Brain, in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neurotransmitter Systems*, (Lajtha A., Vizi E. S., eds), pp. 149–170. Springer US, Boston, MA.
- Harvey D. (2019) 12.5: High-Performance Liquid Chromatography, in *Analytical Chemistry 2.1*. LibreTexts.
- Javed K., Reddy V., Lui F. (2023) Neuroanatomy, Cerebral Cortex, in *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Jonnakuty C., Gagnoli C. (2008) What do we know about serotonin? *Journal Cellular Physiology* **217**, 301–306.
- Kamilar-Britt P., Bedi G. (2015) The prosocial effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): Controlled studies in humans and laboratory animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **57**, 433–446.
- Kiser D., Steemer S. B., Branchi I., Homberg J. R. (2012) The reciprocal interaction between serotonin and social behaviour. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **36**, 786–798.
- Lee T. D. (2011) Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 196–196.
- Luo S. X., Huang E. J. (2016) Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways. *Am J Pathol* **186**, 478–488.
- Mällo T., Alftoa 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**, 269–281.
- Mällo T., Kõiv K., Koppel I., Raudkivi K., Uustare A., Rinken A., Timmusk T., Harro J. (2008) Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. *Brain Research* **1194**, 110–117.
- Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M., Caron M. G. (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* **78**, 189–225.
- Morecraft R. J., Yeterian E. H. (2002) Prefrontal Cortex, in *Encyclopedia of the Human Brain*, (Ramachandran V. S., ed), pp. 11–26. Academic Press, New York.

- Murphy D. L., Lerner A., Rudnick G., Lesch K.-P. (2004) Serotonin Transporter: Gene, Genetic Disorders, and Pharmacogenetics. *Molecular Interventions* **4**, 109.
- Norden M., Kanarik M., Laugus K., O'Leary A., Liiver K., Tõnissaar M., Shimmo R., Harro J. (2024) Serotonin release by parachloroamphetamine in rats with high and low sociability: High prefrontal release capacity in sociable females. *J Psychopharmacol* **38**, 1016–1024.
- Olivier B. (2015) Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology* **753**, 2–18.
- Sanders-Bush E., Steranka L. R. (1978) Immediate and long-term effects of p-chloroamphetamine on brain amines*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **305**, 208–221.
- Santana N., Artigas F. (2017) Laminar and Cellular Distribution of Monoamine Receptors in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Front Neuroanat* **11**, 87.
- Siegel J. Z., Crockett M. J. (2013) How serotonin shapes moral judgment and behavior. *Ann N Y Acad Sci* **1299**, 42–51.
- Tõnissaar M., Herm L., Eller M., Kõiv K., Rinken A., Harro J. (2008) Rats with high or low sociability are differently affected by chronic variable stress. *Neuroscience* **152**, 867–876.
- Tõnissaar M., Philips M.-A., Eller M., Harro J. (2004) Sociability trait and serotonin metabolism in the rat social interaction test. *Neuroscience Letters* **367**, 309–312.
- Törk I. (1990) Anatomy of the Serotonergic Systema. *Annals of the New York Academy of Sciences* **600**, 9–34.
- Wang J. (2002) Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. *Talanta* **56**, 223–231.
- Wang Q., Timberlake M. A., Prall K., Dwivedi Y. (2017) The Recent Progress in Animal Models of Depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **77**, 99–109.
- Weiss D. (2000) In vivo microdialysis as a tool for monitoring pharmacokinetics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **19**, 606–616.
- Yamaguchi Y., Lee Y.-A., Goto Y. (2015) Dopamine in socioecological and evolutionary perspectives: implications for psychiatric disorders. *Front Neurosci* **9**, 219.
- Yohn C. N., Gergues M. M., Samuels B. A. (2017) The role of 5-HT receptors in depression. *Molecular Brain* **10**, 28.
- Žmudzka E., Sałaciak K., Sapa J., Pytka K. (2018) Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. *Life Sciences* **210**, 106–124.

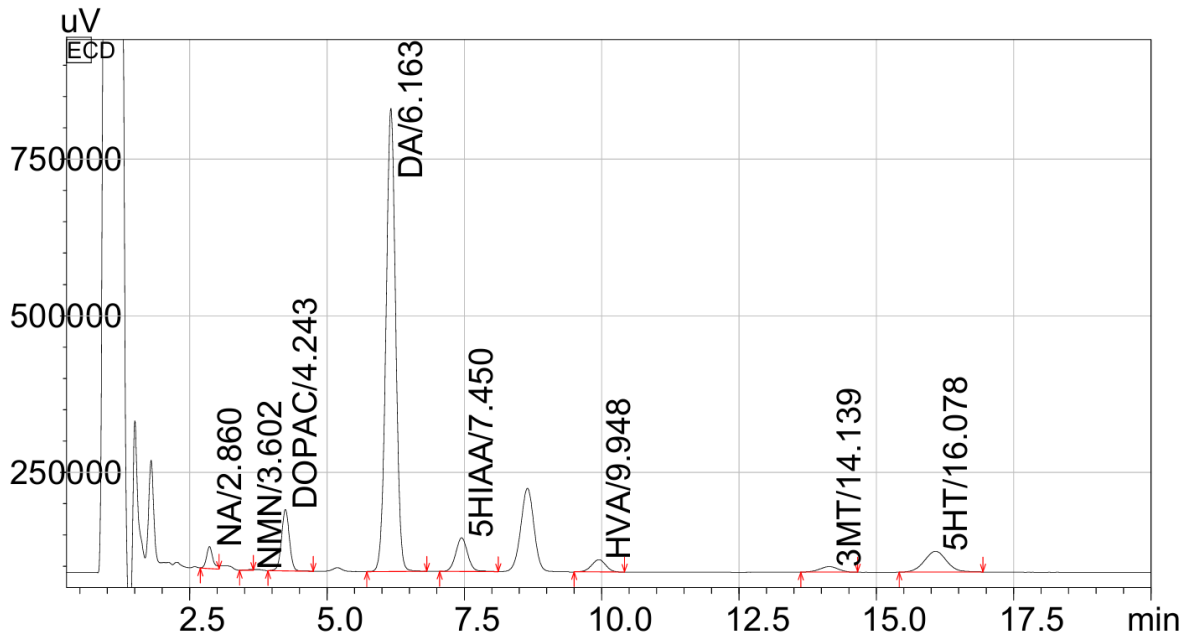
9. LISAD



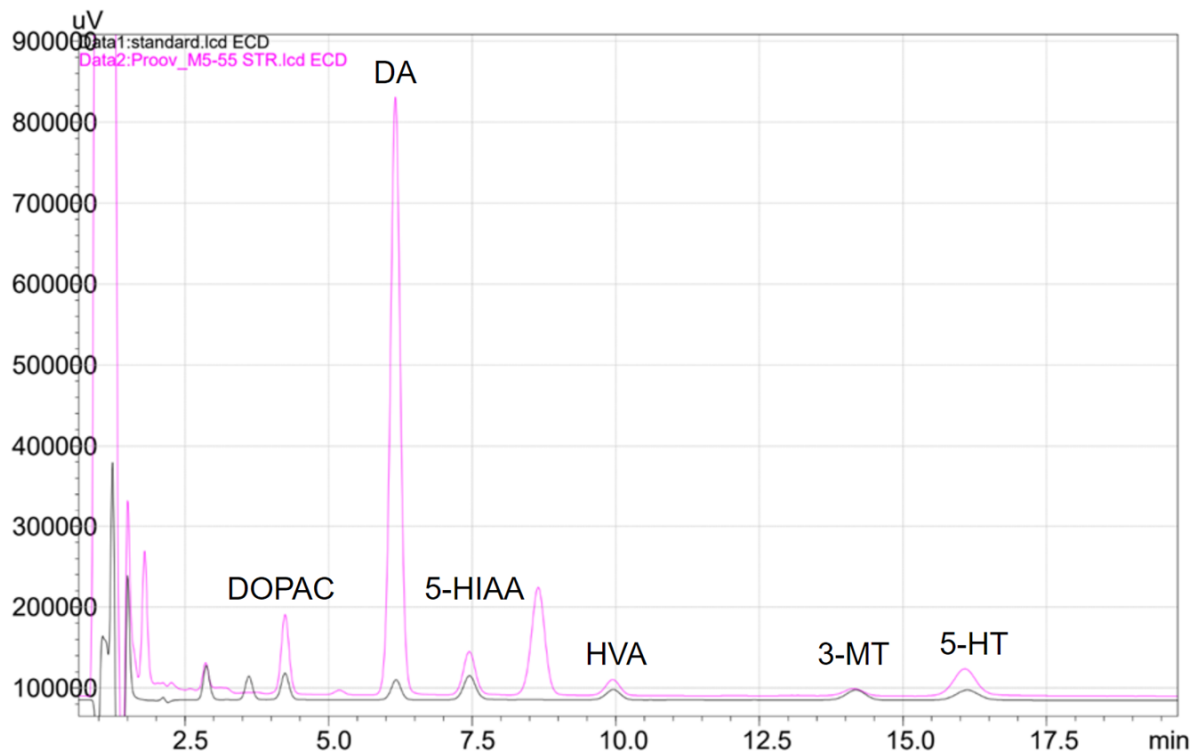
Lisa 1. Info üksikmõõtmiste kohta *ex vivo* katseks



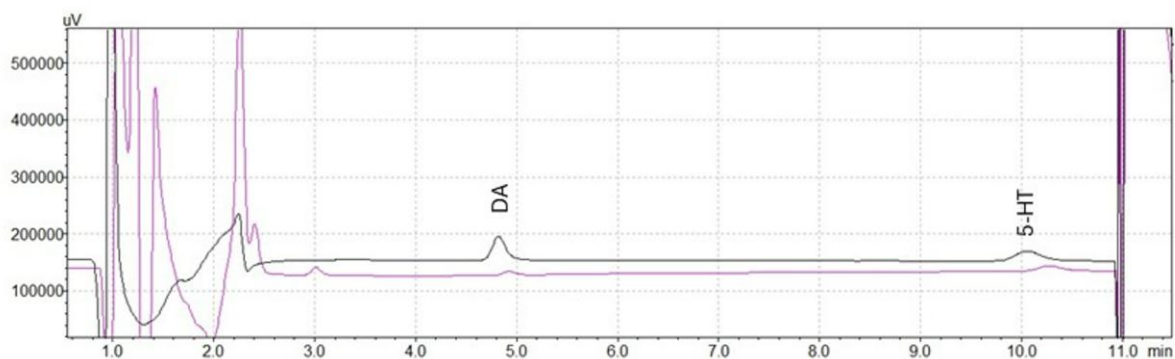
Lisa 2. Info üksikmõõtmiste kohta *in vivo* katseks



Lisa 3. Näidiskromatogramm proovist. Analüüdi retentsiooniaeg on nähtav analüüdi nimetuse lühendi taga



Lisa 4. Näidiskromatogramm võrdluses standardlahus (must) ja proov (roosa)



Lisa 5. Näidiskromatogramm võrdluses standardlahus (must) ja proov (roosa)

Sotsiaalsus/sugu	Baastaseme keskmine sisaldus (fmol/proov)		Standardhälve
HS (emased)	19,16	±	15,00
LS (emased)	24,76	±	32,82
HS (isased)	13,04	±	9,22
LS (isased)	11,05	±	2,28

Lisa 6. Madala ja kõrge püsisotsiaalsusega emaste ja isaste rottide keskmised dopamiini (DA) baastaseme tulemused sotsiaalsuse- ja soorühmade kaupa

Sotsiaalsus/sugu	Baastaseme keskmine sisaldus (fmol/proov)		Standardhälve
HS (emased)	8,58	±	9,52
LS (emased)	16,55	±	17,33
HS (isased)	20,99	±	14,42
LS (isased)	21,95	±	14,76

Lisa 7. Madala ja kõrge püsisotsiaalsusega emaste ja isaste rottide keskmised serotoniini (5-HT) baastaseme tulemused sotsiaalsuse- ja soorühmade kaupa

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kelly Haapsal,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose, “Millised on rottide sotsiaalse käitumise monoamiinergilised alusmehhanismid?“, mille juhendajateks on Karita Laugus ja Jaanus Harro, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kelly Haapsal

27.05.2025