

Tartu Ülikool
Psühholoogia instituut

Anna-Liisa Luik

Uudistav käitumine ja glutamaadi tase juttkehas

Seminaritöö

Juhendajad: prof Jaanus Harro, dr med

Karita Raudkivi, MSc

Läbiv pealkiri: Uudistav käitumine ja glutamaat

Tartu 2012

Kokkuvõte

Individuaalsed erinevused uudistavas käitumises sõltuvad tundlikkusest stressile ja peegeldavad meeleoluhäiretega seostatavaid füsioloogilisi ja käitumuslikke eripärasid. Käesolevas töös eristatakse uudiskasti testis püsivalt rohkem (HE) ja vähem (LE) uudistavaid rotte. Varem on selles mudelis leitud, et HE-rottidel on juttkehas glutamaadi baastase LE-rottidega samaväärne, kuid LE-rottidest baastaseme suhtes proportsionaalselt kõrgem glutamaadi tase pärast glutamaadi transporterite blokeerimist *L-trans*-pürrolidiin-2,4-dikarboksülaadiga (PDC) (Koolmeister, 2011). Need katsed olid tehtud keskealiste (9-12-kuuste) rottidega. Meie töö eesmärgiks oli uurida, kas nooremate (3-kuuste) HE- ja LE-rottidel leidub juttkehas glutamaadi tasemetes erinevusi. *In vivo* mikrodialüüsi ja kõrgsurve-vedelikkromatograafiat kasutades mõõtsime glutamaadi kontsentratsiooni juttkehas enne PDC-d (4 mM) sisaldava füsioloogilise lahusega voolutamist, voolutamise ajal ning järgselt. Me ei leidnud HE- ja LE-rottidel glutamaadi baastasemetes olulisi erinevusi, samuti ei olnud gruppidevahelisi olulisi erinevusi glutamaadi kontsentratsioonide muutustes baastasemetelt pärast PDC lahusega voolutamist, kuid HE-rottidel oli glutamaadi taseme tõus baastasemelt pärast PDC lisamist voolutuslahusesse proportsionaalselt suurem kui LE-rottidel ($p=0,0022$). See tähendab, et kuigi glutamaadi käibes erineva uudistamisaktiivsusega rottidel erinevusi ei leitud, on kõrge uudistamisaktiivsusega rotid juttkehas glutamaadi ringluse mõjutuste suhtes tundlikumad.

Abstract

Individual differences in exploratory behavior are influenced by vulnerability to stress and reflect physiological and behavioral differences related to mood disorders. In the present study rats with stable differences in exploratory behavior, either high (HE) or low (LE) were differentiated by using the exploration box test. Previously the same model has been used to show that HE rats do not differ from LE rats in baseline glutamate, but have a proportionally higher increase in striatal extracellular glutamate from baseline glutamate after glutamate transporter inhibition with with L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (PDC) (Koolmeister, 2011). These experiments were performed on middle-aged (9 to 12 months old) rats. The aim of our study was to examine whether there are any differences between younger (3 months old) HE and LE rats in striatal glutamate levels. Using *in vivo* microdialysis and HPLC we measured striatal glutamate concentration before, during and after perfusion with a physiological solution containing PDC (4mM). We found no significant differences in baseline glutamate between HE and LE rats, there were no between-group differences in the concentration changes compared to baseline glutamate in dialysate glutamate after perfusion with PDC, but compared to LE rats, HE rats had proportionally higher increase in striatal glutamate from baseline glutamate after perfusion with PDC ($p=0,0022$). This means that although no differences in glutamate turnover in rats with different exploratory levels were found, HE rats are more sensitive to changes in glutamate circulation.

Sissejuhatus

Uudistav käitumine

Uudistav käitumine võimaldab koguda informatsiooni tundmatu ümbruskonna ja uute objektide kohta ning loob võimalusi toidu, vee, paarilise, ohutu keskkonna ja muu ellujäämiseks olulise leidmiseks (Berlyne, 1955; viidatud Mällo jt, 2007 järgi). Uudistamisaktiivsust võib vaadelda kui neofobia ja uudishimu või avastamismotivatsiooni suhet, kuna uudistamiseks on vaja ületada soov jääda turvalisse keskkonda (Mällo jt, 2007). Madala uudistamisaktiivsusega loomadel on kõrge ärevus ja madal avastamismotivatsioon, mis on sümptomaatilised kliinilisele depressioonile. Uudistav käitumine on seotud tundlikkusega psühhostimulantidele ja nende kuritarvitamisele. Uudistamisaktiivsuse hindamiseks kasutatakse erinevaid meetodeid, millega kaasnevad erinevused leitavates seostes (Harro, 2010).

Uudistava käitumise loomkatsemudelid

Uudistava käitumise mõõtmiseks on mitmeid lähenemisi (vt Harro jt, 1993). Üks esimesi ja enim kasutatavaid uudistava käitumise mõõtmisviise on klassikaline avarvälja test (vt Prut & Belzung, 2003; Altkoa, 2008). Tegemist on sunnitud uudistamise testiga, mille puhul katseloomad paigutatakse teatud ajaks tundmatusse katseseadmesse, kus igasugune aktiivne liikumine loetakse uudistavaks käitumiseks (Altkoa, 2008). Kõrge (HR - *high responders*) ja madala (LR – *low responders*) liikumisaktiivsusega loomade eristamisemudel põhineb samuti liikuvusel uudses keskkonnas, kus loomal pole võimalik varjuda. On arvatud, et see mudel peegeldab rottidel joont (*trait*), mis sarnaneb inimeste elamusi otsiva käitumisega. HR-rottidel on suurem liikumisaktiivsus ja nad eelistavad uudseid keskkondi tuttavatele (Blanchard jt, 2009).

Käesolevas töös kasutasime uudistamisaktiivsuse mõõtmiseks uudiskasti testi, milles jagati rotid spontaanselt kõrge (HE) või madala (LE) uudistamisaktiivsusega loomadeks. Selles testis on rottidel erinevalt avarvälja testist võimalus valida, kas jääda pimedamasse kambrisse kaitsvate seinte lähedusse või uudistada tundmatuid esemeid kambrist märksa

avaramal väljal. Erinevalt mitmetest varasematest mudelitest ei ole uudistamine “sunnitud” ning samuti on loomade eristamisel lisaks liikuvusele uudes keskkonnas arvesse võetud ka esemete uudistamist. Alates teisest katsepäevast on testis jälgitav uudistamiskäitumine indiviiditi püsiv. Individuaalsed erinevused püsivad vähemalt kuus kuud (Mällo jt 2007).

Individuaalsed erinevused

Käitumuslikul fenotüübil põhinevate mudelite uurimustes on just individuaalsete erinevused uurimine uudistavas käitumises leidnud laialdast kasutamist. Selline lähenemine on aidanud välja selgitada neurokeemilisi ning füsioloogilise mehhanisme, mis on seotud selliste käitumiste põhjustega (Pawlak jt, 2008). Püsivaid erinevusi katseloomade käitumises kasutatakse inimestele omaduste tunnuste modeleerimise eesmärgil. Enim uuritud aspektid loomade käitumise individuaalsete erinevuste uuringutes on ilmselt seotud uudistava käitumisega (vt Pawlak jt, 2008).

Uudes keskkonnas kõrge (HR) ja madala (LR) liikumisaktiivsusega loomad reageerivad stressile nii füsioloogiliselt kui käitumuslikult erinevalt. HR rotid reageerivad stressirohkele olukorrale vähem valvsalt kui LR rotid. Neil on uudsele keskkonnale vastuseks suurem ja kauem kestav kortikosteroidide sisaldus vereseerumis. Selle põhjuseks võib olla väiksem glükokortikoidsete retseptorite hulk hippokampuses, mis tingib madalamal tasemel hüpotaalamuse-hüpofüüsi-neerupealiste (HPA) telje negatiivse tagasiside (Blanchard, 2009). Duclot jt (2010) uurisid sotsiaalsest alistumisest (*social defeat*) põhjustatud pikaajalise stressi mõju HR ja LR rottidele. Sotsiaalset alistumist kutsuti esile isaste rottide paigutamise teise agressiivse isase kodupuuri. HR rotid käitusid 2 nädalat peale pikaajalise stressi seisundis olekut võrreldes kodupuuri jäänud rottidega ärevamalt ja vältisid rohkem sotsiaalset kontakti teise rotiga, võtsid vähem kaalus juurde ning neil vähenes eelistus saharoosile. Pikaajalise stressi seisundis olnud LR rotid olid HR rottidega võrreldes nendes käitumuslikes sümptomites stressile vähem haavatavad või resistentsed (Duclot jt., 2010).

HR ja LR loomadel on leitud neurokeemilisi erinevusi tasustamisega seotud ajupiirkondadest (vt Blanchard jt, 2009). Samuti on leitud, et individuaalsed erinevused

liikumis- ja uudistamisaktiivsuses ennustavad ka tundlikkust psühhoaktiivsetele ainetele (Blanchard jt, 2009; Kabbaj, 2006). Piazza ja kolleegid (1989) on näidanud, et nende HR/LR mudelis on HR rottidel uudses keskkonnas kõrgem liikumisaktiivsus ning ka kõrgem tundlikkus amfetamiini ja kokaiini manustamisele, lisaks ka tugevam käitumuslik sensitisatsioon ravimite korduva kasutamisele (nagu viidatud Alttoa jt, 2007).

Samuti on leitud, et mitmed neurokeemilised erinevused on seotud individuaalsete erinevustega vastustes uudsele stiimulile. Uudsusele tugevamalt reageerivatel loomadega võrreldes madala vastusega loomadega naalduvas tuumas kõrgemad nii baastase kui dopamiini stimuleeritud vabanemine. (Hooks jt, 1991; Rouge-Pont jt, 1998). Thiel jt (1999) on näidanud, et nende HRA ja LRA rottide mudelis, mis põhineb avarväljal tagakäppadele tõusudel, on HRA rottidel ventraalses juttkehas kõrgemad dopamiini tasemed ning frontaalses korteksis madalamad serotoniini tasemed. Erinevusi noradrenaliini süsteemis on seostatud hippokampusega stressi tingimustes (Rosario & Abercrombie, 1999).

Antud töös kasutatud LE/HE mudeli puhul on täheldatud, et kõrgendatud plusspuuri testis on madalama (LE) uudistamisaktiivusega rotid võrreldes HE rottidega ärevamad, kasutavad sundujumiskatsetes passiivseid toimetulekstrateegiad ning tingitud hirm püsib neil kauem (Mällo jt, 2007). HE rottidel on amfetamiini psühhostimuleeriv mõju rohkem mõjutatud locus coeruleusest (ehk sinav ala) tulenevate närviteede (*projections*) terviklikkusest (*intactness*) (Alttoa jt, 2005; Alttoa jt, 2007). Juttkehas on HE rottidel leitud kõrgem dopamiini tase nii enne kui pärast amfetamiini manustamist (Alttoa jt, 2009; Mällo jt, 2007). Serotoniini tagasihaarde blokeerimisel tsitalopramiga on LE rottidel leitud suurem tõus rakuvälise serotoniini tasemes (Mällo jt, 2008).

Glutamaat

Glutamiinhape on asendatav aminohape, mis esineb füsioloogilistes tingimustes glutamaataniooni kujul (kõrvalahela $pK_a=4,1$). Glutamaat on imetajate kesknärvisüsteemi (KNS) põhiline erutuslik virgatsaine, põhjustades kuni kolmandiku kogu erutuslikust sünaptilisest aktiivsusest. Aju põhilised väljuvad (*output*) ja saabuavad (*input*) närviteed kasutavad virgatsainena glutamaati, nende seas ka juhteteed kõrgematest keskustest

juttkehasse (Heath & Shaw, 2002). Glutamaati toodavad üle 100 miljardi neuroni ning see osaleb enamikes normaalses aju talitlustes nagu kognitiivsed funktsioonid ja õppimine (Zeyden jt, 2008).

Üha rohkem on andmeid glutamaadi olulisuse kohta kliinilise depressiooni neurobioloogias ja ravis. Kuna kliinilise depressiooni all kannatab üle 120 miljoni inimese ja vaid 60-65% patsientidest saab kaasaegsetest teraapiatest leevendust, on tähtis leida alternatiivseid meetodeid aitamaks inimesi, kes seni pole teraapiale allunud. Loomudelites on leitud erinevate glutamaadi retseptorite antagonistidel antidepressandi laadseid omadusi. Glutamaatergilise signaalülekanne reguleerimine võib pakkuda monoamiinsete (nt serotoniini ja dopamiini) radade kõrval alternatiivset märklauda antidepressantidele (Hashimoto, 2011; Tanti & Belzung 2010; Skolnick jt, 2009). Loomudelites on leitud seoseid glutamaadi tagasihaarde transporterite funktsionaalsuse ja mitmete neuroloogiliste häirete vahel, nende seas näiteks Alzheimeri tõbi, Parkinsoni tõbi, Huntingtoni tõbi, amülotroofiline lateraalskleroos ja epilepsia (Maragakis & Rothstein, 2004).

Glutamaadi tagasihaarde blokeerimine

Inimesel on leitud 5 glutamaadi tagasihaarde transporterit, kõik kõrge afiinsusega, naatrium-sõltuvad ja 40-65% homoloogiaga valkude primaarjärjestustes. Nende koondnimetus on erutusaminohapete transporter (EAAT - *excitatory amino acid transporter*). Transporterid reguleerivad glutamaadi kontsentratsiooni sünaptilises pilus ja on võimelised glutamaati üle rakumembraani mitme tuhande kordselt kontsentreerima (Heath & Shaw, 2002). GLT-1 (rottide EAAT2 homoloog) on põhiline tagasihaarde retseptor gliiarakkudes, mille kanda on kuni 90% glutamaadi tagasihaardest (Danbolt, 2001; Margakis & Rothstein, 2004). Häireid glutamaadi regulatsioonis seostatakse mitmete neurodegeneratiivsete haigustega, kuid ka skisofreenia, depressiooni, psühhotropsete ainete kuritarvitamise (*drug abuse*) ja sõltuvusega (Zeyden jt, 2008).

Glutamaadi transporterite blokeerimisel suureneb glutamaadi tase rakkude vahelises ruumis, ning seetõttu on võimalik uurida erinevusi glutamaadi käibes. Eksperimentaatori poolt mõjutamata taset nimetatakse glutamaadi baastasemeks. Glutamaadi tase

rakkudevahelises ruumis on dünaamiline tasakaal neuronitest vabaneva glutamaadi ja gliia rakkudesse haaratava glutamaadi vahel (Heath & Shaw, 2002), mis peavad püsiva baastaseme säilimiseks toimuma keskmiselt võrdse kiirusega. Eri gruppide baastasemete võrdlemise põhjal ei ole võimalik midagi järeldada nende protsesside kiiruste kohta. Glutamaadi transpordi blokeerimisel hakkab glutamaat rakkude vahelisse ruumi akumuleeruma, mida kiirem on glutamaadi vabanemine või vastupidi, mida kiiremini seda enne takistamist ära transporditi, seda rohkem suureneb glutamaadi rakuväline kontsentratsioon ajaühiku kohta. Oluline on silmas pidada ka baastasemete erinevusi, kuna väiksema baastasemega süsteemis moodustab sama suur kontsentratsiooni muutus suhteliselt suurema osa normaalsest glutamaadi tasemest, mis tähendab, et häire mõju on suurem.

Varasemalt on glutamaadi transporterite blokeerimiseks kasutatud mitmeid inhibiitoreid, näiteks inhibiitorit dihüdrokainaati (DHK), DL-treo- β -bensüülloksüaspartaati (DL-TBOA) ja *L-trans*-pürrolidiin-2,4-dikarboksülaati (PDC). DHK-d ei transpordita läbi rakumembraani, kuid see võib muuta loomade käitumist ebanormaalseks ning kutsuda esile krambihooget (Behrens jt, 2002; Massieu & Tapia, 1997). Massieu ja Tapia (1997) võrdlesid PDC ja DHK neuroloogilisi kahjustusi tekitavat mõju hippokampuses ja juttkehas. Ka väga kõrgetes kontsentratsioonides (25mM ja 100mM) PDC lahusega voolutades ei tuvastatud rottidel neuroloogilisi kahjustusi, kuid DHK-ga voolutades olid kahjustused selgelt eristatavad (Massieu & Tapia, 1997).

Teise alternatiivina on kasutatud DL-TBOA-d, mis ei ole sarnaselt DHK-le substraatne inhibiitor. Erinevalt PDC-st põhjustab DL-TBOA juttkehas doos-sõltuvat neuronite surma ning hippokampuses lisaks ka entsefalograafiliselt ning käitumuslikult jälgitavaid krampe (Montiel jt, 2005). Samuti segab DL-TBOA aminohapete kromatograafilist määramist (Behrens jt, 2002).

Enim kasutatud glutamaadi transporteritele mõjuvat doos-sõltuvat blokaatorit PDC-d, mis on glutamaadi analoog. PDC inhibeerib selektiivselt glutamaadi transportereid, takistamata seejuures glutamaadi retseptor-seondumist ning see ei oma spetsiifikat ühelegi glutamaadi transporterile (vt Bridges jt, 1996). Waldmeieri jt (1993) ning Volterra jt (1996) järgi vabastab PDC hetero-vahetusega tsütosoolset glutamaati rakkude

vahelisse ruumi, mille põhjuseks on arvatavasti PDC transport läbi rakumembraani (nagu viidatud Behrens jt, 2002 & Del Arco, 2001 järgi).

Juttkeha

Juttkeha on basaaltuumade põhiline sisendüksus (*input unit*), mis saab dopamiinergilisi ning mootorikaga seotud signaale ning on ühenduses emotsioonide töötlusega seostatud limbiliste piirkondadega nagu mandelkeha. Juttkeha on seostatud ka harjumuste tekkimise, oskuste omandamise ja tasustamisega seotud õppimisega (*reward-related learning*). Juttkeha on jaotatud funktsionaalselt eristuvateks alaosadeks. Katsed rottidega viitavad, et kõhtmine juttkeha, eriti naalduv tuum (*nucleus accumbens*), on seotud emotsioonide ja motivatsiooniga ning selgmine juttkeha on seotud kognitiivsete ja sensomotoorsete funktsioonidega. Seega on juttkeha nii ühendustelt kui funktsioonidelt heterogeenne, mis võimaldab ühendada mootorset, kognitiivset ning motivatsioonilist informatsiooni ja mõjutada eesmärgile suunatud (*goal-directed*) käitumist (Delgado, 2007).

Katsed primaatidega on näidanud, et juttkeha on seotud nii tasu ootuse kui selle ülekandega (*delivery*), kusjuures juttkeha aktiivsus on suurem eelistatud tasustuse korral (Delgado, 2007). Inimestel on leitud, et stiimuli uudsususega kaasneb suurem uudistamine ning sellest lähtuvalt ka suurem vigade arv tasu ennustamisel ning see langeb ajaliselt kokku juttkeha aktivatsiooniga, mis on korreleeritud individuaalsete erinevustega uudsust otsivas käitumises (Wittmann jt, 2008).

Uurimisküsimus

HR ja LR hiirtel on juttkehas leitud erinevusi rakuvälise glutamaadi baastasemetes, mis on HR hiirtel 35% madalam (Shakil et al., 2005). Eelnevalt on selgunud, et juttkehas on 9-12 kuu vanustel kõrge uudistamisaktiivsusega (HE) rottidel samasse vanusegruppi kuuluvatest madala uudistamisaktiivsusega (LE) rottidest PDC-ga voolutamise tagajärjel oluliselt kõrgem rakuvälise glutamaadi sisalduse proportsionaalne tõus baastasemest (Koolmeister, 2011). Glutamaadi taseme uurimisel juttkeha rakkudevahelises ruumis on leitud ka vanuselisi erinevusi. Massieu ja Tapia (1997) leidsid, et võrreldes 3 kuuste

Wistari rottidega, on 22-24 kuustel rottidel juttkehas ja hippokampuses oluliselt kõrgemad rakuvälise glutamaadi tasemed, ning ka nende tasemete tõus võrreldes baastasemega PDC (100mM) toimet on vanematel loomadel kõrgem. Del Arco jt (2009) oma katses eri vanuses Wistari rottidega (2-4, 12-14 ja 27-32 kuused) juttkehas baastasemetes olulisi erinevusi ei leidnud, kuid erinevalt Massieu ja Tapia (1997) tulemustest, vanuse suurenedes PDC (4mM) poolt põhjustatud glutamaadi tasemete suurenemised baastasemega võrreldes rakkude vahelises ruumis hoopis vähenesid. Käesoleva töö eesmärgiks on uurida PDC toimet 3 kuu vanuste loomade glutamaadi tasemetele. Kuna varasemalt on vastukäivaid andmeid glutamaadi tasemete ja vanuse vahelistest seostest, vajab kinnitamist hüpotees, et ka noorematel loomadel on PDC-ga voolutamisel HE rottidel madalam proportsionaalne glutamaadi taseme tõus baastasemelt kui LE rottidel.

Materjalid ja meetodid

Katseloomad

Katses kasutasime 21 isast 3 kuust Wistari rott, keda hoiti nelja kaupa standardsetesse puuridesse jaotatuna 12-tunnise valgus-pimedustsükliga ja reguleeritud õhutemperatuuriga vivaariumis. Valge periood kestis kellaaegade vahemikus 8:00-20:00. Vesi ja toit olid puuris loomadele alati kättesaadavad. Uudiskasti testi viisime läbi vivaariumis ajavahemikus 13:00 – 19:00. Kõik katsed loomadega vastasid Euroopa Nõukogu direktiividele ja olid heaks kiidetud Tartu Ülikooli Eetikakomitee poolt.

Katses kasutatavad ravimid

Voolutamiseks kasutatud Ringeri lahusesse valmistati 4 mM L-trans-pürrolidiin-2,4-dikarboksülaadi (PDC) lahus. Pärast 7-ndat mikrodialüüsi proovi voolutati PDC lahusega 1 h.

Katseseade

Uudistava käitumise mõõtmiseks kasutasime uudiskasti testi (*exploration box test*) nagu kirjeldatud Otter jt (1997). Viisime testi läbi uudiskastis, mis on valmistatud roostevabast metallist ning koosneb suuremast avatud väljast (50 cm x 100 cm x 40 cm) ja väiksemast kaanega kambrist (20 x 20 x 20 cm), mille põrandapind on sarnaselt looma kodupuuriga kaetud saepuruga. Avatud välja põhi on jagatud kaheksaks ruuduks ning sellele oli asetatud kolm loomale uudset objekti (klaaspudel, puust pulgake ja pappkast) ja üks loomale tuttav objekt (söögipala). Objektide asetus oli igal katsekorral ja kõigil katseloomadel sama.

Mikrodialüsaadid koguti infusioonpumpasid kasutades jahutusega (4°C) kollektoritesse (Univentor 820, Malta) ning määrati kasutades kromatograafilist ja elektrokeemilise detekteerimise meetodit.

Katseprotseduur

Uudiskasti testi alguses pandi roti väiksemasse kaanega pimedasse alasse. Loomal oli vaba valik kas jääda pimedasse alasse või liikuda avarale väljale. Viieteist minutilise vaatluse ajal registreeriti: 1) avatud väljale sisenemise latents, 2) avatud väljale sisenemiste arv, 3) avatud väljal uudistades veedetud aeg, 4) jooneületuste arv, 5) tagajalgadele tõusud, 6) uudsete objektide uudistamisjuhtude arv. Kolme viimase parameetri põhjal arvutati 7) uudistamisjuhtude summa. Pärast iga looma testimist puhastati uudiskasti niiske salvrätikuga. Katseloomad jagati teise katsepäeva uudistamisjuhtude summa alusel kõrge (HE) ja madala (LE) uudistamisaktiivsusega gruppideks.

In vivo mikrodialüüsi kasutades saab uurida elusa koe rakkude vahelise ruumi keemiat. Katseloomade vasakusse juttkehasse koordinaatidel AP: +0,7; ML: +3,0 mm bregmast ja DV:-7,0 mm durast opereeriti spetsiaalne mikrodialüüsisond, mis kinnitati kahe roostevabast terasest kruvi ning hambatsemendiga. Operatsiooni eelselt süstiti katseloomadele intraperitonaalselt kloraalhüdraati (350 mg/kg). Seejärel kontrolliti, kas loom magab: 1) pöörati loom selili, 2) näpistati sabast, 3) näpistati varbast. Kui loom ei reageerinud loeti ta uinunuks ning jätkati operatsiooniga. Pärast operatsiooni jäeti loom mikrodialüüsi läbiviimise ruumis üleöö taastuma.

Mikrodialüüsi proovid koguti puuris vabalt liikuvatelt loomadelt. Koguti 25 proovi, igat proovi 15 minutit voolukiirusel 1,5 µl/min. Enne mikrodialüüsaatide kogumist voolutati 1 tund Ringeri lahusega, et süsteem jõuaks tasakaalustuda. Baastaseme proovid koguti Ringeri lahusega (pH = 7,21, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, 0,2 mM NaH₂PO₄) läbivoolutades. Pärast 7-ndat baastaseme proovi voolutati katselooma juttkeha ühe tunni jooksul 4 mM PDC lahusega. Seejärel koguti veel 14 proovi Ringeri lahusega voolutades. Proovid säilitati -80°C. Pärast katset loomad surmati ja kontrolliti üle sondi asukoht. Tulemuste analüüsi kaasati vaid korrektse sondi asetusega katseloomad.

Mikrodialüüsaatide analüüsiti kasutades kromatograafi Hewlett Packard (HP) 1100 süsteemi. Esmalt derivatiseeriti 7,5 µl mikrodialüüsaati 1,5 minuti jooksul 3,8 µl 40 mM orto-ftaalaldehüüdi (OPA) lahusega. Seejärel süstiti 10 µl reaktsioonisegu kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) süsteemi. Kromatograferimine toimus isokraatilises

(liikuva faasi koostis ei muutu) režiimis pöördfaasi (statsionaarne faas on mittepolaarne) kolonnil (Luna C 18 (2), 150 x 2 mm; 5 μ m, Phenomenex) voolukiirusel 0,3 ml/min 30°C juures, mobiilseks faasiks oli 0,1 M fosfaatpuhver (pH = 6,6-6,7; 23% metanooli). Glutamaadi derivaat detekteeriti elektrokeemiliselt (Agilent, Waldbronn, Saksamaa) elektroodi potentsiaalil +0,6 V. Glutamaadi kontsentratsiooni arvutamiseks koostati iga päev uus kalibratsioonigraafik, kasutades standardlahuseid.

Analüüs

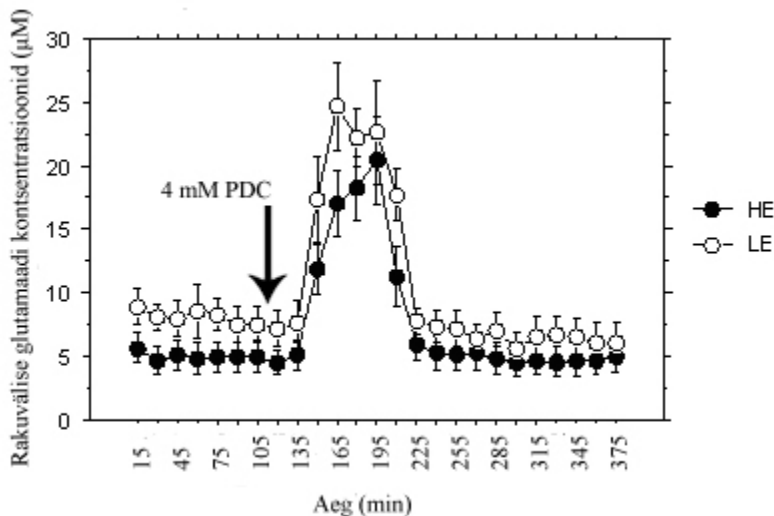
Andmed analüüsisime dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutades Statview andmetöötlusprogrammiga. Sõltumatuks muutujaks oli uudistamisaktiivsus (HE/LE) ja sõltuvaks muutujaks glutamaadi kontsentratsioon rakkude vahelises ruumis ning selle muutumine võrreldes ja suhtes baastasemega.

Tulemused

Kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega rottide glutamaadi baastasemete erinevus

Katseloomad jaotati teise katsepäeva uudistamisjuhtude summa keskmiste järgi kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega isenditeks. HE grupis (14 isendit) oli uudistamisjuhtude summa keskmine väärtus 261 ja LE grupis (7 isendit) 25.

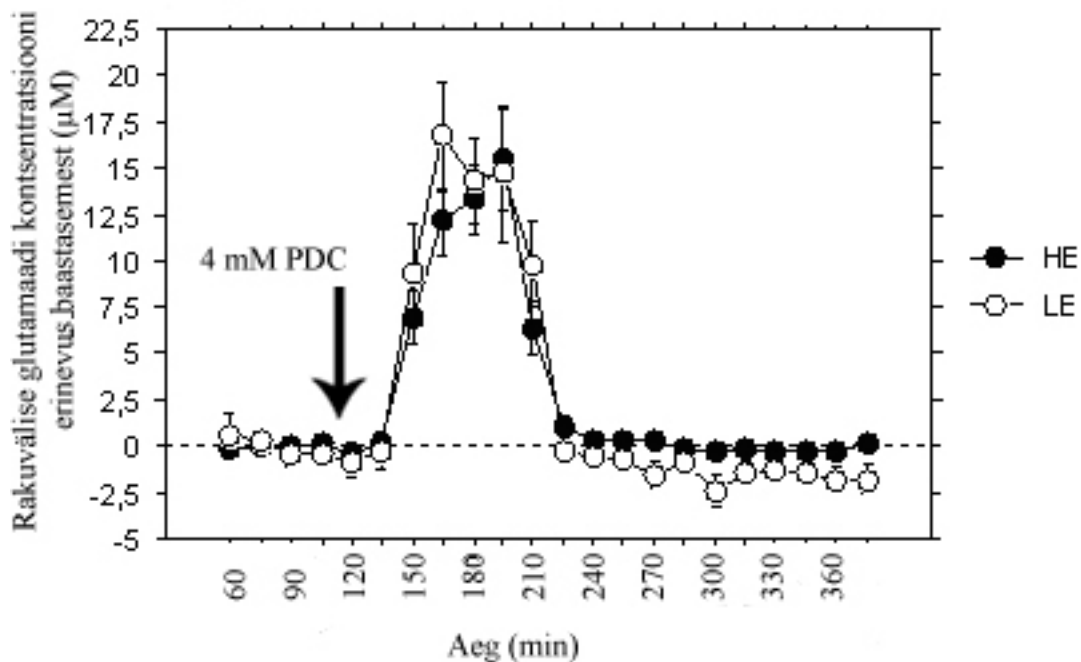
In vivo mikrodialüüsi abil mõõdeti glutamaadi tagasihaarde transporterite blokaatori PDC mõju glutamaadi baastasele. Glutamaadi baastase defineeriti proovide 4.-7., neli viimast proovi enne PDC-ga voolutamist, keskmise kaudu. Joonisel 1 on kujutatud glutamaadi rakuväline sisaldus baastingimustes, transporterite blokeerimisel ja selle järgselt. HE grupi glutamaadi baastase on küll keskmiselt natuke madalam ($4,9 \pm 4,8 \mu\text{M}$) võrreldes LE grupi glutamaadi baastasetega ($8,0 \pm 3,7 \mu\text{M}$), kuid olulisi erinevusi gruppide baastasemete vahel ei esine ($F(1, 24)=1,175$; $p=0,295$). Statistiliselt on oluline grupisisene PDC-st mõjutatud glutamaadi kontsentratsiooni kasv ($F(1,24)=48,219$; $p<0,0001$).



Joonis 1. HE ja LE rottide rakuvälise glutamaadi tasemed baastingimustes, transporterite blokaadi ajal ja pärast seda.

Madala ja kõrge uudistamisaktiivsusega rottide juttkeha glutamaadi rakuvälise sisalduse muutus võrreldes baastasemega

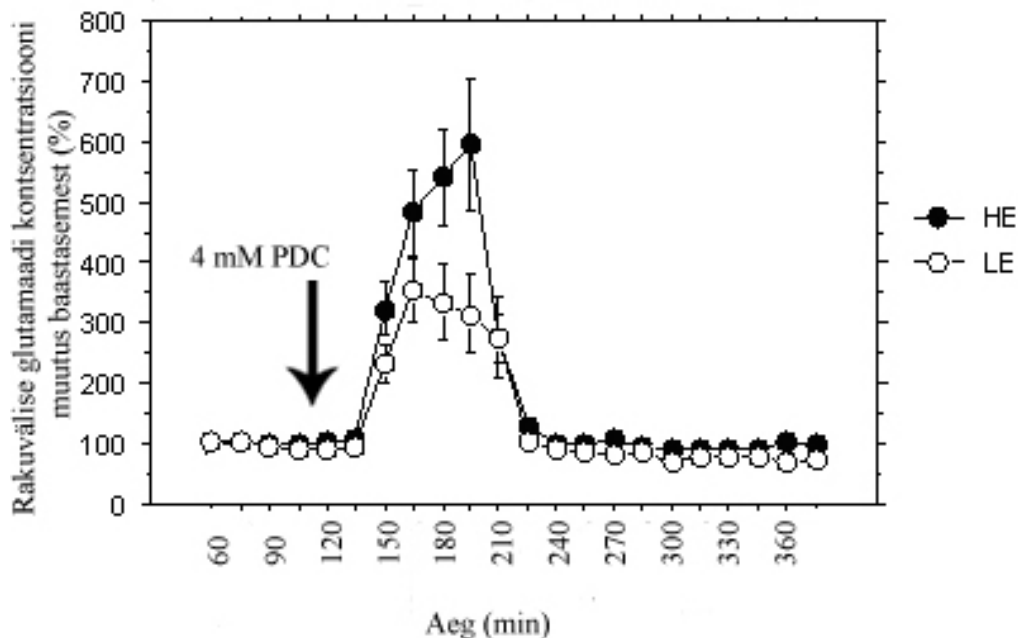
PDC-ga voolutamise järgselt (katseminutitel 120. – 160. ehk 8. – 11. proov) kasvab märgatavalt mõlema grupi loomadel glutamaadi tase rakkude vahelises ruumis (Joonis 1). Võrreldes glutamaadi tasemeid enne PDC-ga voolutamist, selle ajal ning järgselt (Joonis 2) glutamaadi baastasemega, ei esine grupi peaefekti ($F(1,24)=0,106$; $p=0,748$) ega gruppide vahelisi erinevusi glutamaadi kontsentratsiooni muutustes ($F(1,24)=1,222$; $p=0,228$).



Joonis 2. HE ja LE glutamaadi tasemete muutumine võrreldes glutamaadi baastasemega ajateljel glutamaadi tagasihaarde transporterite blokaatori PDC toimel.

Madala ja kõrge uudistamisaktiivsusega rottide juttkeha glutamaadi rakuvälise sisalduse proportsionaalne muutus võrreldes baastasemega

PDC-ga voolutamise järgselt (katseminutitel 120. – 160. ehk 8. – 11. proov) kasvab märgatavalt mõlema grupi loomadel glutamaadi tase rakkude vahelises ruumis (Joonis 2). Vaadeldes proportsionaalseid väärtusi, grupi peaefekti küll ei esine ($F(1,21)=2.99$, $p=0.099$), kuid ilmneb oluline erinevus glutamaadi sisalduse proportsionaalses muutuses baastasemest ($F(1,24)= 25,7$; $p<0,0001$). Statistiliselt on oluline ka interaktsioon HE/LE gruppide ja glutamaadi sisalduse muutuse vahel ($F(1,21)= 2,17$; $p= 0,0022$). Seega leidsime katses HE ja LE loomade vahel juttkehas statistiliselt olulise erinevuse glutamaadi kontsentratsiooni suhtelises tõusus baastasemest pärast lokaalset glutamaadi transpordi blokeerimist, kus HE loomadel oli see proportsionaalselt suurem. PDC mõju lõppedes langevad glutamaadi tasemed tagasi ligikaudu esialgsele tasemele. Seega sõltub glutamaadi proportsionaalne muutus PDC mõjul looma uudistamisaktiivsuse tasemest. Post hoc testidega ei leitud gruppide vahel eri ajamomentidel statistiliselt olulisi erinevusi, mis arvatavasti tuleneb vaatluste arvu vähesusest.



Joonis 3. HE ja LE glutamaadi tasemete proportsionaalne muutumine baastasemest ajateljel glutamaadi tagasihaarde transporterite blokaatori PDC toimel.

Arutelu ja järeldused

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas nooremate (3 kuuste) HE ja LE rottide glutamaadi tasemetes leidub erinevusi PDC lahusega voolutamise eelselt ja järgselt. Uurimusse kaasati vaid loomad, kelle tulemus uudistamisaktiivsuses oli ülemises või alumises kvartiilis.

Shakil jt (2005) leidsid hiirtel HR/LR uudistamisaktiivsusega hiirtel statistiliselt olulise erinevuse juttkeha rakuvälise glutamaadi baastasemetes, kus HR grupil oli keskmiselt 35% madalam baastase. Sarnaselt Koolmeistri (2011) tööle vanemate (11 kuu vanuste) rottidega käesolevas töös gruppide vahelisi statistiliselt olulisi erinevusi glutamaadi baastasemetes ei leitud. On oluline mees pidada, et tulemused on saadud erinevates uudistamisaktiivsuste mudelites erinevate liikide peal. Tulemuste erinevused illustreerivad erinevate mudelite kasutamise vajalikkust.

Glutamaat on neuronite ja gliia rakkude vahel ringluses läbi glutamiini. Gliia rakkudes konverteerib glutamiini süntetaas rakku transporditud glutamaadi glutamiiniks. See vabastatakse rakkude vahelisesse ruumi, haaratakse neuronite poolt, ning sünteesitakse glutaminaasi katalüüsil tagasi glutamaadiks. Üle 50% sünteesitavast virgatsaine funktsioonis glutamaadist on kaudselt saadud läbi glutamiini süntetaasi (Heath & Shaw, 2002). See tähendab, et elujõulise glutamaadi ringluse säilimiseks peavad need kaks sünteesi olema koordineeritud, kuid millisel tasemel täpselt sõltub juba organismist.

Selle ringluse osa on ka glutamaadi transporterid. Eeldusel, et gliia rakkudesse glutamaat ei akumuleeru (mis häiriks dünaamilist tasakaalu glutamaadi väljutamise ning tagasihaarde vahel) peegeldab tagasihaarde blokeerimisel saadav erinevus glutamaadi taseme tõusus erinevusi nii glutamaadi transpordi kui sünteesi kiiruses.

Meie oma töös HE ja LE rottidel glutamaadi tasemete tõusus võrreldes baastasemega transporterite PDC-ga blokeerimisel erinevusi ei leidnud (vt Joonis 2). Küll aga leidsime, et HE rottidel moodustab PDC mõjul tõusnud rakuvälise glutamaadi tase proportsionaalselt suurema osa glutamaadi baastasemest, kui LE rottidel (vt Joonis 3), mis tähendab. Sama on varem leitud vanematel, 9-12 kuu vanustel HE ja LE rottidel

(Koolmeister, 2011). Seega leidis kinnitust hüpotees, et ka noorematel (3 kuu vanustel) loomadel on HE rottidel PDC lahusega voolutamise tulemusel proportsionaalselt suurem tõus baastasemelt kui LE rottidel. Kuna glutamaadi tasemete tõusudes baastasemetelt erinevusi ei leitud, siis ei ole alust väita, et kummalgi grupil oleks suurem glutamaadi vabanemine rakkudevahelisse ruumi ja/või transport gliia rakkudesse. Küll aga võib ette kujutada, et sama suur tõus saab ühel grupil moodustada suurema osa esialgsest tasemest vaid juhul, kui see esialgne tase, ehk antud kontekstis baastase on väiksem. Nii antud töös, kui ka Koolmeisteri (2011) töös leiti, et HE rottidel on võrreldes LE rottidega madalam glutamaadi baastase, kuid see erinevus pole statistiliselt oluline. Kuid just selles erinevuses saab ainsana peitud põhjus, miks HE rottidel on glutamaadi taseme tõus baastasemelt proportsionaalselt suurem kui LE rottidel, kuigi glutamaadi kontsentratsioonide tõus ei erine.

Glutamaadi baastaset võib vaadelda kui normaalse funktsioneerimise taset. Häireteta indiviidi neurofüsioloogia on kohastunud just talle omasel baastasemel funktsioneerimiseks. Põhjused sellisteks eri kohastumusteks on arvatavasti väga mitmepalgelised. Kui ühel indiviidil põhjustab mingi mõjutus suurema suhtelise erinevuse baastasemest kui teisel indiviidil, siis võib öelda, et ta on selle mõjutuse suhtes tundlikum. Olenevalt mõjutuse iseloomust, võib kasutada ka haavatavuse mõistet. Seega oleme oma töös leidnud, et HE rotid on võrreldes LE rottidega tundlikumad glutamaadiringe mõjutustele. Kuna selline erinevus leiti nii 9-12 kuu kui ka 3 kuu vanustel loomadel, võib arvata, et see tundlikkuse vahe eri uudistamisaktiivsusega rottidel püsib vähemalt 6 kuud.

Kliinilise depressiooni all kannatab maailmas üle 120 miljoni inimese ja vaid 60-65% patsientidest saab kaasaegsetest teraapiatest leevendust. See tähendab, et teraapiale pole allunud ligikaudu kolmandik patsientidest, kelle abistamiseks on oluline leida alternatiivseid meetodeid. (Hashimoto, 2011; Tanti & Belzung 2010; Skolnick jt, 2009) Teades, et glutamaatergilise signaalülekanne reguleerimine on järjest olulisem suund monoamiinseid radasid mõjutavatele antidepressantidele efektiivsete alternatiivide leidmiseks (vt Sissejuhatus), võivad sellise regulatsiooni mõjus individuaalsete erinevuste uurimisel saadud teadmised hiljem kliinilises praktikas kasulikuks osutada.

Tänuõnad ja vabandused

Tahan tänada oma seminaritöö juhendajaid Karita Raudkivi ja Jaanus Harrot, kelle abita see seminaritöö poleks valminud. Samuti tahan tänada Aet Altoat, kes lubas mul operatsiooni pealt vaadata ning selgitas toimuvat. Siinkohal vabandan juhendajate ees, et ma kõiges nende sõna ei kuulnud, vaid tegutsesin oma oskustest ja arusaamadest lähtuvalt.

Kirjanduse loetelu

Alltoa, A., Eller, M., Herm, L., Rinken, A., & Harro, J. (2007). Amphetamine-induced locomotion, behavioral sensitization to amphetamine, and striatal D2 receptor function in rats with high or low spontaneous exploratory activity: Differences in the role of locus coeruleus. *Brain Research*, *1131*, 138-148.

Alltoa, A., juhendaja Harro, J. (2008). Neurochemical regulation of rat exploratory behaviour: focus on dopaminergic and noradrenergic neurotransmission. *European Neuropsychopharmacology*, *14*(4), 324-31

Alltoa, A., Kõiv, K., Eller, M., Uustare, A., Rinken, A., & Harro, J. (2005). Effects of low dose *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine administration on exploratory and amphetamine-induced behavior and dopamine D2 receptor function in rats with high or low exploratory activity. *Neuroscience*, *132*, 979-990.

Alltoa, A., Seeman, P., Kõiv, K., Eller, M., & Harro, J. (2009). Rats with persistently high exploratory activity have both higher extracellular dopamine levels and higher proportion of D(2) (High) receptors in the striatum. *Synapse*, *63*(5), 443-6.

Behrens, P. F., Franz, P., Woodman, B., Lindenberg, K. S., & Landwehrmeyer, G. B. (2002). Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain*, *125*, 1908-1922.

Berlyne, D. E. (1950). Novelty and complexity as determinants of exploratory behaviour. *British Journal of Psychology*, *41*, 68–80.

Blanchard, M. M., Mandelsohn, D., & Stamp, J. A. (2009). The HR/LR model: Further evidence as an animal model of sensation seeking. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *33*(7), 1145-1154.

Bridges, R. J., Kavanaugh, M. P., & Chamberlin, A. R. (1999). A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. *Current Pharmaceutical Design*, 5, 363-79.

Del Arco, A., Segovia, G., Prieto L., & Mora F. (2001). Endogenous glutamate-
taurine interaction in striatum and nucleus accumbens of the freely moving rat: studies during the normal process of aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, 401-414.

Delgado, M. R. 2007. Reward-related responses in the human striatum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1104, 70-88.

Duclot, F., Hollis, F., Darcy, M. J., & Kabbaj, M. (2010). Individual differences in novelty-seeking behavior in rats as a model for psychosocial stress-related mood disorders, *Psychology & Behaviour*, 104, 296-305.

Harro, J. 1993. Measurement of exploratory behavior in rodents. In: P. M. Conn (Ed.) , *Methods in Neuroscience: Vol. 14*, pp. 359-377. San Diego: Academic Press.

Harro J. (2010). Inter-individual differences in neuropsychology as vulnerability factors for affective disorders: implications for psühofarmacology, *Pharmacol Ther.*, 125, 402-422.

Hashimoto, K. 2011. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, 1558-1568.

Heath, P. R., & Shaw, P. J. 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 26, 438-458.

Hooks, M. S., Jones, D. N., Smith, A. D., Neill, D. B., Justice, J. B., Jr. 1991. Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. *Synapse*, 9, 121–128.

Kabbaj, M. 2006. Individual difference in vulnerability to drug abuse: The high responders/low responders model. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 5, 513–520.

Koolmeister, M., juhendajad Harro, J., & Raudkivi, K. 2011. Glutamaadi transporterite blokaatori PDC toime glutamaadi baastasemetele juttkehas madala ja kõrge uudistamisaktiivsusega rottidel. Tartu Ülikool.

Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiology of Disease*, 15, 461-473.

Massieu, L., Tapia, R. 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 69, 1151-1160.

Mällo, T., Altoo, 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, *Behavioral Brain Research*, 117, 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.

Pawlak, C. R., Ho, Y. J., & Schwarting, R. K. 2008. Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32, 1544-1568.

Piazza, P.V., Deminière, J.M., Le Moal, M., Simon, H. 1989. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*, 245, 1511-3.

Prut, L., Belzung, C., (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review, *European Journal of Pharmacology*, 463, 3-33.

Shakil, S. S., Holmer, H. K., Moore, C., Abernathy, A. T., Jakowec, M. W., Petzinger, G. M., & Meshul C. K. (2005). High and low responders to novelty show differential effects in striatal glutamate. *Synapse*, 58, 200–207.

Skolnick, P., Popik, P., & Trullas, R. 2009. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 563-569.

Tanti, A., Belzung, C. 2010. Open questions in current models of antidepressant action. *British Journal of Pharmacology*, 159, 1187-1200.

Thiel, C. M., Müller, C. P., Huston, J. P., Schwarting, R. K., 1999. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93, 243–251.

Wittmann, B. C., Daw, N. D., Seymour, B., & Dolan, R. J. 2008. Striatal activity underlies novelty-based choice in humans. *Neuron*, 58, 967–973.

Zeyden, M., van der, Oldenziel, W. H., Rea, K., Cremers, T. I., & Westerink, B. H. 2008. Microdialysis of GABA and glutamate: Analysis, interpretation and comparison with microsen sors. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 90, 135-147.

Käesolevaga kinnitan, et olen korrekselt viidanud kõigile oma töös kasutatud teiste autorite poolt loodud kirjalikele töödele, lausetele, mõtetele, ideedele või andmetele.

Olen nõus oma töö avaldamisega Tartu Ülikooli digitaalarhiivis DSpace.

Anna-Liisa Luik