

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
PSÜHHOLOOGIA INSTITUUT

**Kroonilise muutliku stressi ja amfetamiini akuutse manustamise mõju  
ajukoore monoamiinidele erineva positiivse afektiivsuse ja  
püsisuhkrutarbimisega rottidel**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Markus Vares

Juhendajad prof. Jaanus Harro, Dr. med.

Jüri Parik, MSc

TARTU 2020

## **INFOLEHT**

### **Kroonilise muutliku stressi ja amfetamiini akuutse manustamise mõju ajukoore monoamiinidele erineva positiivse afektiivsuse ja püsisuhkrutarbimisega rottidel**

Stress on organismi reaktsioon keskkonnas esinevatele ebameeldivatele stiimulitele. Pikaajaline stressi mõju võib kaasa aidata erinevate psüühikahäiretete välja kujunemisel. Haavatavus stressi suhtes on individuaalselt erinev ja võib määrata, kui tõenäoline on organism kogema stressiga seotud häiret. Stressitundlikkust modelleeritakse loomkatsemudelites, uurides kaasasündinud ja elukestvaid individuaalseid erinevusi. Meie uurimisgrupis on varasemalt leitud seoseid kudisemise ja stressitaluvuse ning suhkrutarbimise ja stressile tundlikkuse vahel. Käesolev töö keskendub nende kahe fenotüübi koosmõjudele monoamiinide neurokeemiale stressi tingimustes ja amfetamiini akuutsel manustamisel. Tulemustest selgus, et stressile tundlikumad on vähekudisejad paljumaiustajad rotid ja vastupidavamad on paljukudisejad ja paljumaiustajad.

Märksõnad: positiivne afektiivsus, mõnutundmisvõime, roti ultrahelihäälitsused, stress, psühhostimulandid

CERCS: B740 Farmakoloogia, farmakognoosia, farmaatsia, toksikoloogia

### **The effects of chronic variable stress and acute amphetamine on monoamines in frontal cortex of rats with different positive affect and sucrose intake levels**

Stress is the response of an organism to uncomfortable stimuli in the environment. Chronic stress can lead to the development of several psychiatric disorders. There are individual differences in vulnerability to stress, which could help us predict, whether an organism will experience a stress-related disorder or not. Vulnerability to stress can be modeled in animals, which focus on the innate individual differences. Our research group has previously found that high rate of 50-kHz calls that indicates level of positive affect is protective against stress while high sucrose consuming rats are more reactive to stressors. This paper focuses on the effects of chronic stress and acute amphetamine on monoamines in rats with different sucrose consumption and 50-kHz call rate phenotypes. Results showed that low-calling high sucrose consuming rats are more vulnerable to stress whereas high-calling high sucrose consuming rats are resilient to stress.

Keywords: positive affectivity, stress, rat ultrasonic vocalizations, hedonic capacity, amphetamine

CERCS: B740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

# SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	8
2.1. Töö eesmärgid .....	8
2.2. Materjal ja meetodika .....	8
2.2.1. Katseloomad .....	8
2.2.2. Kõdistamine .....	8
2.2.3. Püsisuhkrutarbimise fenotüübi määramine .....	9
2.2.4. Krooniline muutlik stress .....	9
2.2.5. Amfetamiini manustamine .....	10
2.2.6. Kõrgsurvevedelikkromatograafia .....	10
2.2.7. Statistiline analüüs .....	11
2.3. Tulemused .....	12
2.3.1. Fenotüüpide stabiilsus .....	12
2.3.2. Kaaluive stressirežiimi vältel .....	12
2.3.3. 50-kHz ultrahelihäältsused akuutsel amfetamiini manustamisel .....	13
2.3.4. Vereseerumi glükoos .....	14
2.3.5. Monoamiinide tase ajukoos .....	15
2.4. Arutelu .....	17
KOKKUVÕTE .....	19
Summary .....	20
Tänuõnad .....	21
KIRJANDUSE LOETELU .....	22
LIHTLITSENTS .....	27

## KASUTATUD LÜHENDID

5-HIAA – 5-hüdroksüindooläädikhape (ingl k - *5-hydroxyindoleacetic acid*)

5-HT – 5-hüdroksütrüptamiin (ingl k – *5-hydroxytryptamine*) ehk serotoniin

CVS – krooniline muutlik stress (ingl k – *chronic variable stress*)

EDTA – etüleendiamiintetraädikhape (ingl k - *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

GABA -  $\gamma$ -aminovõihape (ingl k –  *$\gamma$ -aminobutyric acid*)

GAD – glutamaadi dekarboksülaas (ingl k – *glutamate decarboxylase*)

HC – paljukudiseja (ingl k – *high-calling*)

HPA – hüpotalamus-hüpopüüs-neerupealise telg (ingl k – *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*)

HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia (ingl k – *high-performance liquid chromatography*)

HSuc – paljumaiustaja (ingl k – *high sucrose consuming*)

LC – vähekudiseja (ingl k – *low-calling*)

LSuc – vähemaiustaja (ingl k – *low sucrose consuming*)

NA - noradrenaliin

NMN - normetanefriin

USV – ultrahelihäälitsused (ingl k – *ultrasound vocalizations*)

## SISSEJUHATUS

Stress on organismi vastus, mida iseloomustavad füsioloogilised, afektiivsed ja käitumuslikud muudatused, keskkonnas esinevatele ebameeldivatele või kontrollimatutele stiimulitele (Koolhaas *et al.*, 2011). Stressivastus on välja kujunenud bakterite mutageneesist kuni inimeste hormooniregulatsioonini. Erinevatelt tänapäeva inimestest kui bakter satub ebasoodsasse keskkonda siis ta muudab oma DNAd vähem täpsema polümeraasi kasutusega ning mutatsioonide tulemusel on suuteline ellu jääma uues keskkonnas. Organismi võime keskkonnaga adapteeruda loodusliku valiku teel on arenenud välja kuni tänapäeva inimeseni, kes üldjuhul ei pea enda geneetilist koodi muutma, vaid lihtsalt keskkonnaga harjuma hormooniregulatsiooni läbi. (Foster, 2007; Bradshaw ja Hardwick, 1989) Pikaajaline stressi mõju eelmainitud muutuste läbi võib viia erinevate psüühikahäireteni (McEwen, 2003), mille keskmes on sageli vähenenud positiivsed emotsioonid ning mõnutundmisvõime ehk anhedoonia (Snaith 1993). Haavatavus stressi suhtes on individuaalselt erinev ning võib määrata, kui tõenäoline keegi on kogema stressiga seotud häiret (Sapolsky, 2015). Nii on kaasajal välja kujunenud stressiga toimetuleku seiremudelite arendamine katseloomadel, mis keskenduvad kaasasündinud individuaalsete erinevuste uurimisele, mis võivad näidata haavatavust stressi poolt.

Käesolev katse põhineb afektiivsuse fenotüüpide erinevustel, mis on määratud kudisemise ja püüsuuhkrutarbimise põhjal. Kudisemisfenotüübi määramiseks viiakse läbi kõdistamiseprotsess ja püüsuuhkrutarbimiseks tehakse suhkruelistusteste. Stressitundlikkuse jälgimiseks on viidud läbi kroonilise muutliku stressi režiim. Sellele järgnevad amfetamiini- ja käitumiskatsed (käitumiskatsete tulemusi ei raporteerita) on uurimaks loomade käitumises väljenduvaid erinevusi.

Töö on koostatud Tartu Ülikooli Psühholoogiainstituudis ning on osa suuremast katsest, mistõttu ei raporteerita siin kõiki tulemusi. Autori panus katsesse oli stressirežiimi läbiviimisel, loomade talitamisel ning suhkruetsete ja muude katseprotseduuride juures assisteerimisel.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Suhkrutarbimine ja -eelistus on pikki aastaid kasutusel olnud mõnutundmisvõime käitumusliku korreelaadina stressiuuringutes (Willner *et al.*, 1987). Madalamat suhkrutarbimist on märgata kroonilises stressis rottidel ning sellist nähtust seostatakse kõrgema ärevustaseme ja anhedooniaga (DeSousa *et al.*, 1998). Magusainete tarbimine on rottide seas individuaalselt varieeruv ja elukestvalt stabiilne ning võimaldab jälgida kaasasündinud mõnutundmisvõimet loomkatsetes (Tõnissaar *et al.*, 2006). Hiljutisest uuringust avaldus aga huvitav tulemus: paljumaiustavad rotid (HSuc) näitasid käitumuslikes testides suuremat tundlikkust stressi mõjudele kui vähemaiustajad (LSuc) (Kõiv *et al.*, 2019; Kanarik *et al.*, 2011).

Positiivne afektiivsus on kaasasündinud võime kogeda positiivseid emotsioone vastusena meeldivatele stiimulitele (Ashby *et al.*, 1999). Varasemalt on leitud, et kõrge positiivne afektiivsus toimib kui kaitsev mehhanism stressi negatiivsete mõjude eest ja vähendab haavatavust meeleoluhäiretele (Vasey *et al.*, 2013; Grafton *et al.*, 2012; Mällo *et al.*, 2009). Rottide 50-kHz ultraheliäänlitsused (USV – *ultra-sound vocalizations*) ehk kudinad on käitumuslik positiivsete afektide väljendus (Knutson *et al.*, 2002) ning närilisi võib märgata kudisemas vastusena erinevatele positiivsetele stiimulitele: toit, paaritumine, loomade omavaheline müramismäng ja psühhostimulandid (Brenes ja Schwarting, 2015; Knutson *et al.*, 2002; Knutson *et al.*, 1998; Burgdorf *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2006). Sarnaselt ilmuvad häänlitsused ka meeldivate stiimulite ootusel (Brudzynski, 2009; Burgdorf *et al.*, 2000; Knutson *et al.*, 1999). Kudisemine on elukestvalt stabiilne ning erineb loomade vahel – rotte saab jagada paljukudisejateks (HC – *high-calling*) ja vähekudisejateks (LC – *low-calling*) (Burgdorf *et al.*, 2005).

Eelnevalt on leitud, et kudisemine tuleneb dopamiini D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> retseptorite aktivatsioonist. Kudinaid saab pidurdada, süstides *nucleus accumbens*'isse dopamiini retseptorite antagonisti haloperidooli (Thompson *et al.*, 2006). See-eest 22-kHz USV-d on vastuseks negatiivsetele stiimulitele nagu kiskja või agressiivne liigikaaslane (Brudzynski, 2009). 22-kHz tulenevad vastumeelsetes olukordades mediaalse vaheaju ja eesaju limbilise süsteemi aktivatsioonist muskariin-tundlike M<sub>2</sub>-atsetüülkoliiniretseptorite vahendusel. On leitud, et 22-kHz vokalisatsioon rottidel võib vähendada morfiiniga. (Brudzynski, 2015)

Ultrahelihäälitsusi kasutatakse stressitundlikkuse uurimiseks loomudelites (Vares et al., 2018; Knutson et al., 2002). Varasemalt on välja töötatud mitmeid kroonilise stressi režiime (Katz et al., 1981; Willner et al., 1987; Harro et al., 2001). Stressirežiimi tagajärjel loomade kaalukasv aeglustub, langeb huvi magusainete vastu, alaneb liikumisaktiivsus ja kudinade arv väheneb (Mällo *et al.*, 2009; Willner *et al.*, 1987). Stressile vastusena toimub mitmete hormoonide vabastamine hüpotalaamuse-hüpofüüsi-neerupealiste telje (HPA – *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*) aktiveerumise tulemusena. Neerupealiste koos sünteesitakse glükokortikoide, mis on laiatoimelised stressihormoonid. Glükokortikoidid muudavad energiametabolismi, et hoida energiatasemeid tasakaalus peale liikumisaktiivsuse tõstmist, eesmärgiga hoida stressoriga distantsi. Glükokortikoidid vähendavad ka teiste hormoonide sekretsiooni, et hoida energiat kokku – sellest tuleneb eelmainitud liikumisaktiivsuse ja huvilangus. (Angelier ja Wingfield; 2013) See on kooskõlas ka eelneva uuringuga, kus kortikosterooni (glükokortikoid) tasemed olid vähekudisejatel stressirottidel kõrgemad (Raudkivi, 2012). Serotoniin töötab koos glükokortikoididega energia metabolismi reguleerides. Serotoniin moduleerib ööpäevarütmi ja söögiisu. Serotoniinil on suur mõju kognitiivsetele funktsioonidele sh mälu ja õppimine. (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008) Noradrenaliin seostub samuti stressireaktsiooniga, mis töötab koos glükokortikoididega, et panna organism liikuma stressorist vabanemise eesmärgil. Noradrenaliin mobiliseerib keha, samaaegselt vähendades tähelepanu teistelt organismi funktsioonidelt – hooldamine, taastumine jne. Seetõttu on ka kroonilise stressi tulemusena näiteks nõrgem immuunsüsteem. (Chrousos, 2009)

Töö käigus läbi viidud katse hõlmab ka akuutset amfetamiini manustamist, mille peamine eesmärk on testida, kuidas katseloomad reageerivad sõltuvusttekitavale psühhostimulaatorile. Amfetamiin suurendab annusest sõltuvalt monoamiinide, peamiselt dopamiini ja noradrenaliini taset sünaptilises pilus. Käitumuslikult, stimuleerides sarrustasuringet, kutsub see esile eufooriat, liikumisaktiivsuse tõusu ja suuremat kudisemisaktiivsust (Gold *et al.*, 1988; Burgdorf *et al.*, 2001). Käesolevas töös oli amfetamiin testfarmakoniks kudisemisaktiivsuse hindamisel.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käeoleva töö eesmärgiks oli uurida:

- Kuidas mõjutab stress erineva püsikusubstrarbimise fenotüübiga rottide 50-kHz USV reaktsiooni ühekordsele amfetamiini annusele;
- Kuidas mõjutab stress erineva positiivse afektiivsusega loomade reaktsiooni ühekordsele amfetamiini annusele;
- Kas käitumuslikud erinevused peegelduvad ka bioloogilistes näitajates – monoamiinide tasemetes eesaju ajukoos ja vereseerumi glükoositasemes.

### 2.2. Materjal ja metoodika

#### 2.2.1. Katseloomad

Katses kasutati isaseid Wistari liini rotte ( $n=80$ ), kes kaalusid katse alguses 304-446g. Rotipojad eraldati emast 21-päevaseks ning majutati üksinda. Loomad olid majutatud üksikult standardsetes läbipaistvates polüpropüleenist puurides (puidulaastudest allapanuga) 24-kohalistes spetsiaalsetes hoiuriulites, kus puurid paiknesid üksteise kõrval nii, et ühes reas paiknes neli puuri ning ühes hoiuriulis oli kuus rida. Selle läbi oli rottidele üksikmajutuse jooksul tagatud kuulmis-, nägemis- ning haistmiskontakt liigikaaslastega. Ruumis oli püsiv temperatuur ( $20-21^{\circ}\text{C}$ ) ning 12:12 valgustsüklil, kus kell 07:30 valgustid hakkasid tööle. Igal loomal oli piiramatu ligipääs toidule ja joogile. Kõik käitumiskatsed toimusid valgusperioodil, väljaarvatud suhkruelustus testid. Loomkatse eetikakomitee loa number - KL1209.

#### 2.2.2. Kõdistamine

Rotte kõdistati iga päev 14 päeva jooksul, määramaks nende kudisemisfenotüüpi. Kõdistamisprotseduur toimus vastavalt eelnevates katsetes läbiviidud meetodile (Mällo *et al.*, 2007): loomad viidi ühekaupa kodupuurist väiksemasse läbipaistmatusse plastpuuri (30 x 15 x 13 cm). Esmalt rott harjus 15 sekundit katsepuuriga, millele järgnes 15 sekundit kõdistamist katsesooritaja poolt. Kokku toimus neli 15-sekundilist kõdistamise sessiooni 15-sekundiliste vaheaegadega, pärast mida viidi katseloom kodupuuri tagasi ning testipuuri puhastatati niiske lapiga. Kõdistamise protsess

koosnes roti stimuleerimisest ühe käega, mis seisnes ergastatavates vahelduvates näpuliigutustes roti kaelal ja seljal, samal ajal kui looma pöörati ümber selja peale. (Burgdorf ja Panksepp, 2001; Panksepp ja Burgdorf, 2000; Panksepp *et al.*, 2007) Pärast kōdistamisperioodi majutatati rotid nelja kaupa. Rotid jaotati puuridesse vastavalt määratud kudisemisfenotüübile – ühte puuri majutati kokku 2 vähekudisejat ja 2 paljukudisejat rotiti.

### **2.2.3. Püsisuhkrutarbimise fenotüübi määramine**

Loomade kahekuuseks saamisel viidi neljal järjestikusel nädalal läbi kord nädalas suhkruelistuse test. Protseduur toimus vastavalt eelnevates uuringutes läbiviidud meetodile (Kõiv *et al.*, 2019). Testid toimusid pimedustsükli ajal, algusega 19.30. Rotid majutati tund aega enne testi algust üksikpuuridesse, kusjuures toit oli neile vabalt kättesaadav. Testi alguses asetati iga roti puurile kaks identset pudelit: üks täidetud 1%-lise suhkrulahusega ning teine veega. Pudelite asukohta puuril vahetati igal nädalal. Mõlemad pudelid kaaluti vahetult enne puuridele asetamist ning vahetult pärast puuridelt võtmist. Test lõppes kell 7.30. Testide keskmise suhkrulahuse tarbimise alusel jaotati rotid palju- ja vähemaiustavateks loomadeks. Hilisemal katseloomade kokkumajutamisel jagati rotid viisil, et igas puuris oleks 2 paljumaiustavat rotiti ning 2 vähemaiustavat rotiti.

### **2.2.4. Krooniline muutlik stress**

Neljakümnele katseloomale sai osaks viienädalane kroonilise muutliku stressi (CVS – *chronic variable stress*) stressirežiim, kusjuures neljandal ja viiendal nädalal viidi läbi intensiivsem stressirežiim, mis koosnes sagedasematest stressoritest (kuni 2 korda päevas) ning eelistati häirivamaid stressoreid. Kontroll-loomad (n=40) elasid segamatult kodupuurides. Stressirežiimi seitsmendal nädalal viidi läbi käitumiskatsed (tulemusi ei raporteerita).

CVS koosneb mitmest kontrollimatutest ja vahelduvatest keskkondlikust stressoritest. Stressorid imiteerivad ebameeldivaid, kuid mitte katastroofilisi igapäevasündmusi inimestel. (Willner, 1997) Stressorid olid erinevaid nii kestuselt kui ka iseloomult. Esimesel kolmel nädalal kogesid rotid ühte stressorit 24 tunni jooksul, kuid neljandal ja viiendal nädalal lisati mõnedel päevadel ka teine stressor 24 h jooksul. Stressirežiim kestis kokku 5 nädalat. Stressoreid viidi aga aeg-ajalt (3-4 korda nädalas) läbi katse lõpuni, et säilitada stressiefekti. Stressorite hulka kuulus: liikumise piiramine plastanumas (25x9 cm, 2 h), liikumise piiramine süsti imitatsiooniga (3 min), puurikalle 45° (24 h), öine valgus (900 lx, 12 h), sabanäpistus pesulõksuga (5 min), külmruumis viibimine (4°C, 1 h), stroboskoopiline

valgus (12 h, 10 Hz), ülerahvastatus (8 rott standardpuuris, 16-24 h), maapinnast 75 cm tõstetud alusel eredas valguses viibimine (900 lx, 30 min). Stressorid toimusid kontroll-loomadest eraldatud ruumides vältimaks nende häirimist.

### **2.2.5. Amfetamiini manustamine**

Pärast CVS lõppu tehti akuutse amfetamiini katse, kus rottidele manustati ühekordne annus amfetamiini, mis oli lahustatud 0,9% saliidis (1 mg/kg kõhuõõnesisesi) ning järgneva 20 minuti jooksul mõõdeti nende ultrahelihäälitsusi kodupuuri-sarnases puidulaastudega kaetud puuris. Kontroll-loomadele süstiti saliidilahust. Ultraheli mikrofoni (Avisoft Ultra Sound Gate 116-200, Avisoft Bioacoustics, Berliin, Saksamaa) paiknes puurist 30 cm kõrgusel. 50-kHz ultrahelihäälitsused skooriti Deepsqueak automated USV scoring tarkvaraga. Viis päeva pärast amfetamiini manustamist loomad dekapiteeriti ning ajukude säilitati -80 kraadi C juures.

### **2.2.6. Kõrgsurvevedelikkromatograafia**

Pärast koe külmutamist tehti ajukoemõõtmised kõrgsurvevedelikkromatograafiaga (HPLC – *high-performance liquid chromatography*). Protseduur viidi läbi vastalt eelnevates katsetes kasutatud meetodile (Altoa *et al.*, 2005). Roti ajukoed homogeniseeriti ultraheli homogenisaatoriga (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic, Berlin, Germany) jääkülmas 0.1 M perkloriidhappe lahuses (30 µl/mg), milles oli 5 mM naatriumbisulfit ja 0.4 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid* – etüleendiamiintetraädikhape), et vältida oksüdatsiooni. Järgnevalt homogenaat tsentrifugeeriti 14 000 rpm 10 minutit 4°C juures. Alikvoodid (10 µl) supernatandist kromatografeeriti Luna C18(2) kolonnil (150x2 mm, 5 µm). Eemaldamine toimus isokraatlikus elueerimisrežiimil kolonnitemperatuuril 30°C, kasutades liikuvat faasi, mis sisaldas 0.05 M naatriumtsitraadi puhvrit (pH 3.7), 0.02 EDTA, 1 mM KCl, 1 mM naatrium oktaansulfonaat ja 7.5% atsetonitriili. Kromatograafi süsteem koosnes isokraatlikust pumbast (HP1100, Agilent, Waldbronn, Saksamaa), temperatuuriga reguleeritud automaatproovijast, temperatuuriga reguleeritud kolonn-anumast ja HP 1049 elektrokeemiline detektorist (Agilent, Waldbronn, Saksamaa) koos klaasjas süsinik-elektroodiga. Mõõtmised toimusid elektroodi potentsiaali +0.7V vs Ag/AgCl etalonelektrood. Tuvastussignaali piirid signaal-müra suhte=3 korral olid järgnevalt: 0.08 5-HT jaoks, 0.04 5-hüdroksüindoolädikhappe jaoks (5-HIAA), 0.07 noradrenaliini jaoks (NA), 0.03 normetanefriini jaoks (NMN).

### **2.2.7. Statistiline analüüs**

Statistiline analüüs tehti StatView (SAS Institute Inc., USA) ja Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) tarkvaraga. Andmed analüüsiti faktoriaalse ANOVA abil, faktoriteks olid positiivne afektiivsus (tähistusega HC/LC), püsisuhkrutarbimine (tähistusega LSuc/HSuc), stress võrdluses kontroll-grupiga (tähistusega Stress). Vajadusel kasutati kordusmõõtmisfaktorina mõõtmiskorda. Gruppide erinevused peale märkimisväärseid ANOVA-sid analüüsiti *post-hoc* Fisheri PLSD testiga. Kõik andmed on esitatud keskmisena  $\pm$  standardviga. Korrelatsioonianalüüsid tehti Pearson'i korrelatsiooni alusel.

## 2.3. Tulemused

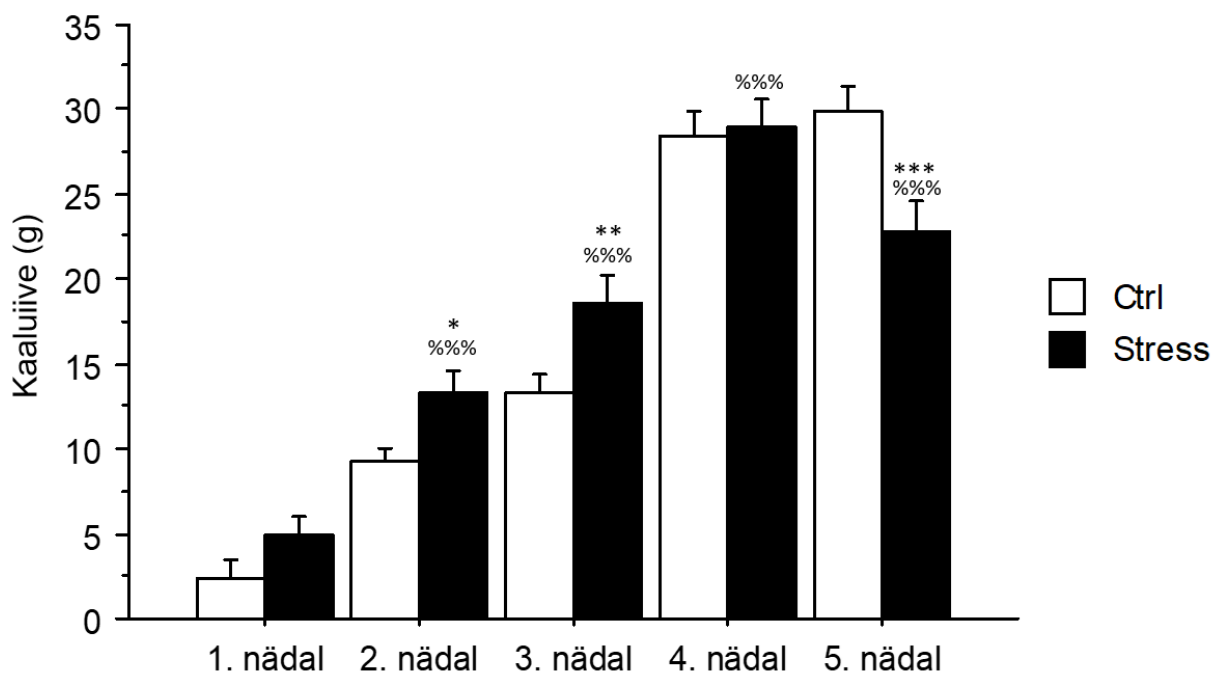
### 2.3.1. Fenotüüpide stabiilsus

Kõiki loomi kōdistati kahe nädala vältel ning jaotati päevadel 12-14 tehtud kudinade alusel võrdselt paljukudisevateks ja vähekudisevateks loomadeks (mõlemad grupis n=40). Paljukudisevad loomad häälitsevad keskmiselt 367 korda ning vähekudisevad loomad 245 korda salvestuspäevade (12-14. päev) lõikes. Loomade häälitsemine ei erinenud päevade lõikes ning mõõtmiskordade-vaheline korrelatsioon oli  $r=0.8-0.9$ . Gruppide vaheline kudinade arvukus jäi oluliselt erinevaks [ $F(1,92)=98.56$ ;  $p<.001$ ].

Püsisuhkrutarbimise fenotüübi määramiseks viidi neljal järjestikusel nädalal läbi kord seitsme päeva jooksul toimuv suhkrutest ning loomad jaotati nende testide keskmise tarbimise alusel palju- ja vähemaiustavateks loomadeks. Esimene mõõtmiskord jäeti hilisemast analüüsist välja, sest selle korrelatsioon järgnevate mõõtmiskordadega oli madalam ( $r=0.5$ ), samuti tehti ka eelnevas katses (Kõiv *et al.*, 2019). Paljumaiustavad loomad tarbisid mõõtmiskordade keskmiselt 128.0 grammi 1% suhkrulahust ning vähemaiustavad loomad 80.7 grammi 1% suhkrulahust, mis tingis olulise erinevuse gruppide vahel [ $F(1,93)=145,59$ ;  $p<.001$ ]. Paljumaiustavad loomad tarbisid stabiilselt testide vältel enam suhkrulahust kui vähemaiustavad loomad ( $p<.001$ ). Kolme mõõtmiskorra omavaheline korrelatsioon oli kõrge ( $r=0.7-0.8$ )

### 2.3.2. Kaaluiive stressirežiimi vältel

Loomad kaaluti päev enne stressirežiimi algust ning kaal ei erinenud ühegi grupi lõikes. Kaaluiivet arvutati igal nädalal lahutades stressi-eelse kaalu mõõtmiskorra kaalust. Üldiselt võtsid viie nädala jooksul kõik grupid kaalus juurde [ $F(4,312)=349.43$ ;  $p<.001$ ]. Ilmnes aga huvitav trend, kus stressiloomade kaaluiive oli juba teiseks nädalaks märgatavalt kõrgem kui kontroll-loomadel ( $p<.05$ ) ning efekt oli suurem kolmandal nädalal ( $p<.01$ ). Alustades neljanda nädalaga stressi intensiivrežiimi, kus stressorid muutusid sagedasemateks ning eelistati häirivamaid stressoreid, võrdsustus loomade kaaluiive stressi- ja kontrollgrupi võrdluses. Viienda nädala lõpuks oli stressiloomadel oluliselt aeglasem kaalukasv kui kontroll-loomadel ( $p<.001$ ).

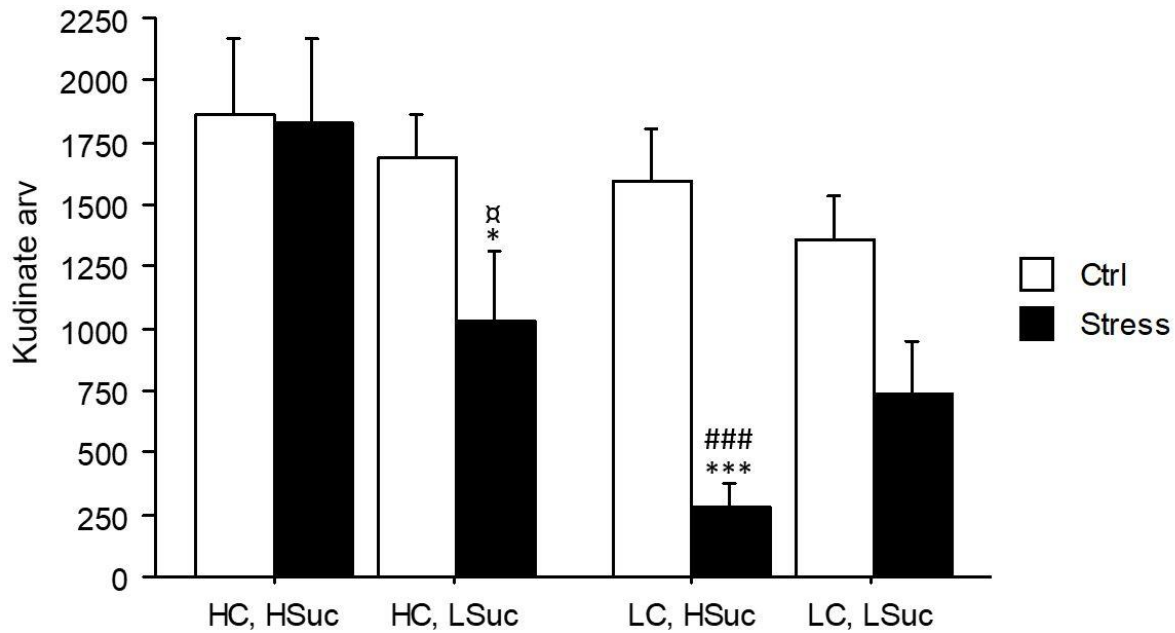


Joonis 1. Kaaluive viienädalase stressirežiimi vältel stressirootide ja kontrollgrupi võrdluses (andmed esitatud gruppide keskmiste väärtustena ja standardviga). %%% -  $p < .001$  vs. stressi-eelne kaal; \*, \*\*, \*\*\* - vastavalt  $p < .05$ ;  $.01$ ;  $.001$  vs. kontroll-grupp samal nädalal.

### 2.3.3. 50-kHz ultrahelihäälitsused akuutsel amfetamiini manustamisel

Kõdistamise käigus palju- (HC) ja vähekudisevateks (LC) loomadeks jagatud rotid reageerisid amfetamiinile (1 mg/kg, kõhuõõnesisesi) kudisemisaktiivsuses erinevalt: üldiselt HC rotid häälitsesid rohkem kui LC rotid [ $F(1,68)=12.99$ ;  $p < .001$ ]. Seevastu oli märgata, et stressirežiimi kogenud rotid häälitsesid reaktsioonina amfetamiini suhtes oluliselt vähem [ $F(1,68)=15.26$ ;  $p < .001$ ]. Kudisemisaktiivsus ei erinenud aga palju- (HSuc) ja vähemaiustavate (LSuc) rottide lõikes.

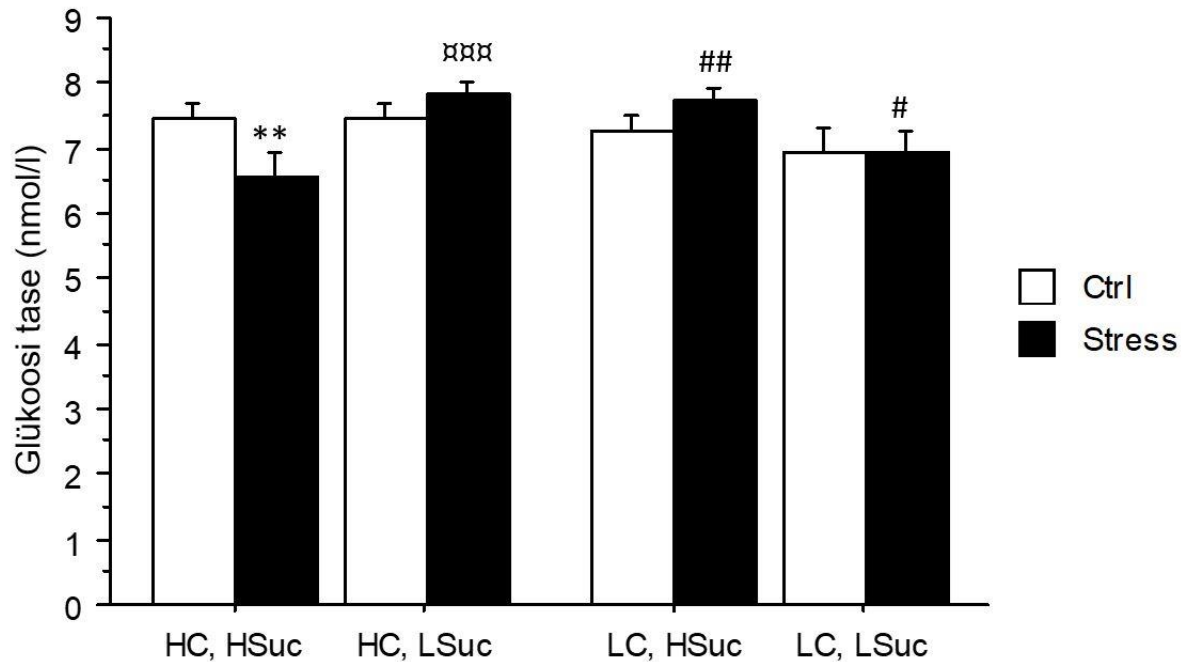
Stressi pidurdavat mõju kudisemisele oli näha kõikides gruppides peale HC-HSuc grupis, kus stressi kogenud rottide ja kontroll-grupi kudinade arvukus jäi sarnaseks. Märkimisväärset stressi pidurdavat mõju amfetamiini poolt esile kutsutud kudisemisele oli märgata aga LC-HSuc grupis ( $p < .001$ ) ning HC-LSuc grupis ( $p < .05$ ).



Joonis 2. Ühekordse amfetamiiniannuse (1 mg/kg, kõhuõonesisesi) poolt esile kutsutud kudinad gruppide lõikes (andmed esitatud gruppide keskmiste väärtustena ja standardviga). \*, \*\*\* -  $p < .05$ ; .001 vs. vastav kontroll; ## -  $p < .001$  vs. HC/HSuc;  $\alpha$  -  $p < .05$  vs. HC/HSuc.

#### 2.3.4. Vereseerumi glükoos

Vereseerumi glükoosi mõõtmisel ilmnas palju- ja vähekuudisejate, palju ja vähemaiustavate ning stressi ja kontroll-grupi vaheline koosmõju [ $HC/LC \times HSuc/LSuc \times Stress - F(1,72)=4.89; p < .05$ ]. Üldiselt oli märgata stressigruppides kõrgemat või võrdset glükoostaset, võrreldes kontrollgruppidega ( $p < .05$ ). Seevastu HC-HSuc loomadel oli märgata stressigrupis madalamat glükoositaset kui HC-LSuc gruppides (vastavalt  $p < .01$  vs kontroll-grupp,  $p < .001$  vs HC-LSuc).



Joonis 3. Vereseerumist mõõdetud glükoos viis päeva pärast amfetamiinitesti lõppu gruppide lõikes (andmed esitatud gruppide keskmiste väärtustena ja standardviga). \*\* -  $p < .01$  vs. vastav kontrollrühm; #, ## -  $p < .05$ ; .01 vs. vastav HC-rühm; ααα -  $p < .001$  vs. HC/HSuc

### 2.3.5. Monoamiinide tase ajukoores

Tabel 1. Ajukoore monoamiinide tase gruppide lõikes (andmed esitatud gruppide keskmiste väärtustena ja standardviga). \*, \*\*, \*\*\* -  $p < .05$ ; .001 vs. vastav kontroll; #, ## -  $p < .05$ ; .01 vs. vastav HC-rühm; α, αα -  $p < .05$ ; .01 vs. vastav HSuc-rühm

	NA	NMN	NMN/NA	5-HIAA	5-HT	5-HIAA/5-HT
<b>HC HSuc Kontroll</b>	3.84±.46	4.34±.30	1.23±.14	1.72±.11	5.07±.25	0.34±.02
<b>HC HSuc Stress</b>	5.57±.59	5.70±.28 **	1.16±.16	1.86±.10	5.23±.49	0.37±.03
<b>HC LSuc Kontroll</b>	4.17±.71	4.58±.27	1.64±.39	1.67±.59	4.76±.19	0.35±.02
<b>HC LSuc Stress</b>	4.28±.46	4.70±.24 α	1.19±.12	1.59±.06	4.82±.18	0.33±.01
<b>LC HSuc Kontroll</b>	4.28±.51	4.70±.16	1.24±.15	1.80±.13 *	4.97±.28	0.37±.03
<b>LC HSuc Stress</b>	4.64±.47	4.52±.23 ##	1.06±.11	1.44±.08 ##	4.33±.25	0.34±.03
<b>LC LSuc Kontroll</b>	6.22±.99 α	5.41±.52	0.99±.06 ##	2.15±.21 ## α	5.36±.47	0.41±.03
<b>LC LSuc Stress</b>	5.27±.50	5.35±.53	1.05±.09	1.90±.11 αα	5.11±.47	0.39±.04

Ajukoorest mõõdeti HPLC meetodil monoamiinide ja nende metaboliitide taset. Mõõdetud aineteks oli noradrenaliin (NA) ja normetanefriin (NMN), millest arvutati noradrenaliini käive (NMN/NA)

ning 5-hüdroksüindooläädikhape (5-HIAA) ja serotoniin (5-HT), millest arvatati serotoniini käive (5-HIAA/5-HT). Tulemuste uurimisel on oluline ka märkida, et kõikidele rottidele süstiti ühekordne annus amfetamiini (1mg/kg kõhuõõnesisesi), mis võis mõjutada virgatsainete metabolismi närvikoes.

Noradrenaliini tase eesaju kooses oli mõjutatud fenotüüpide omavahelisest interaktsiooniefektist [ $HC/LC \times HSuc/LSuc - F(1,70)=4.05; p<.05$ ] ning oli mõnevõrra kõrgem HC HSuc stressigrupis, võrdluses vastava kontrollgrupiga, kuid see erinevus ei ületanud statistilise olulise piiri ( $p=.06$ ). Seevastu oli näha olulist erinevust palju- ja vähemaiustavate rottide LC gruppides, kes ei kogenud stressi. Nimelt oli märgata vastavate vähemaiustavate rottide noradrenaliini kõrgemat taset ajukoore koes ( $p<.05$ ).

Normetanefriini tase eesaju kooses oli sõltuv fenotüüpide omavahelisest koosmõjust [ $HC/LC \times HSuc/LSuc - F(1,70)=5.72; p<.05$ ]. Täpsemalt, HC paljumaiustavate loomade grupis tingis stress noradrenaliini metaboliidi NMN-i kõrge taseme, võrreldes vastava kontrollgrupiga ( $p<.01$ ) ja vastavate vähemaiustavate rottidega ( $p<.05$ ) ning vastava LC grupiga ( $p<.01$ ). Eelnevalt mainitud muutused aga ei tinginud olulisi erinevusi noradrenaliini ja normetanefriini käibes. Märgata oli aga LC vähemaiustavate rottide, kes ei kogenud stressi, madalamat NMN/NA käivet, võrdluses vastavate HC loomadega ( $p<.01$ ).

Eesaju koore serotoniini tasemes ei olnud olulisi muutusi. Küll aga serotoniini metaboliidi 5-HIAA tase ajukooses oli sõltuv nii fenotüüpide interaktsioonist kui ka positiivse afektiivsuse ja stressi koosmõjust [vastavalt:  $HC/LC \times HSuc/LSuc - F(1,70)=11.63; p<.001$  ja  $HC/LC \times Stress - F(1,70)=3.93; p<.05$ ]. Nimetatud metaboliidi tase oli oluliselt madalam LC HSuc stressirottidel, võrdluses nende vastavate kontrollloomadega ( $p<.05$ ), paljumaiustajate grupiga ( $p<.01$ ) ning paljukudisevate rottidega ( $p<.01$ ). Taaskord ei väljendunud need muutused aga serotoniini ja 5-HIAA omavahelises käibes.

## 2.4. Arutelu

Töö eesmärgiks oli uurida kroonilise stressi ja akuutse amfetamiini manustamise mõju erineva püsisuhkrutarbimise ja positiivse afektiivsusega rottidel. Varasemalt on uurimisgrupis teostatud sarnase katsedisainiga töödest selgunud, et madalama positiivse afektiivsusega (LC) (Mällo *et al.*, Raudkivi *et al.*, 2012, Kõiv *et al.*, 2016) ja madalama püsisuhkrutarbimisega (LSuc) (Kanarik *et al.*, 2011, Kõiv *et al.*, 2019) rotid on stressile tundlikumad. Käesolev töö oli nende tulemustega kooskõlas, demonstreerides positiivse afektiivsuse ja püsisuhkrutarbimise fenotüüpide stabiilsust ja usaldusväärsust stressitundlikkuse modelleerimisel.

Töös uuriti esmakordselt kroonilise stressi mõju organismile, jälgides positiivse afektiivsuse ja püsisuhkrutarbimise fenotüüpe samaaegselt. Tulemustest selgus, et stressitundlikkus on seotud nende fenotüüpide omavahelise koosmõjuga: kõrge positiivse afektiivsusega (HC) paljumaiustavad (HSuc) rotid on vastupidavamad, kuid madala positiivse afektiivsusega paljumaiustavad rotid pigem haavatamad stressi mõjudele. Kudinatele stressi pidurdav mõju oli näha igas grupis peale HC paljumaiustajate grupis. Märkimisväärseim stressiefekt amfetamiini poolt esile kutsutud kudinatele oli LC paljumaiustajate stressigrupis, kes häälitsevad kõige vähem, võrdluses teiste gruppidega. Varasemalt on leitud, et rotid, kes on enam huvitatud magusainete tarbimisest, kalduvad olema ka enam huvitatud psühhoaktiivsete ainete hedoonilistest mõjudest (Gosnell ja Krahn, 1992; Gosnell, 2000). Uurimisgrupi hiljutises artiklis (Kõiv *et al.*, 2019) leiti omakorda, et stressi kogenud paljumaiustavatel rottidel ilmneb akuutsel amfetamiini (1 mg/kg) manustamisel oluliselt rohkem 50-kHz häälitsevi kui vastaval kontrollgrupil, kusjuures nendel rottidel tekkis ka amfetamiini korduvmanustamisel sensitiseerimine psühhostimulantide tasustavate efektide suhtes. Käesolev katse pakub sellele nendele leidudele uut perspektiivi, sest see efekt võib olla määratletud just positiivse afektiivsuse fenotüübist.

Gruppide-vahelisi erinevusi oli märgata ka biokeemilistes korrelaatides. Noradrenaliini metaboliidi, normetanefriini, tase oli suurenenud kroonilises stressis kõrge positiivse afektiivsusega paljumaiustavatel rottidel, kuid mitte üheski teises grupis. Lisaks oli samas grupis märgata tendentsi kõrgemaks noradrenaliinitasemeks, ehkki see tulemus ei osutunud statistiliselt oluliseks ( $p=0.06$ ). Selliseid nähtusi aga ei ilmnenud vähekuudisejate vastavates gruppides. Samuti oli HC paljumaiustajate grupp ainus, kellel ei ilmnenud stressi kudisemisaktiivsust pidurdavat efekti amfetamiinitestis. Tulemus langeb ka kokku vanema uuringuga, kus leiti, et paljumaiustajad on

reaktiivsemad stressile kui teised fenotüübid (Kanarik et al., 2011). Varasemalt on leitud, et stressi tingimustes tõuseb ajukoos monoamiinide käive (Fujino et al., 2002; Rossetti et al., 1990).

Organism reguleerib tihedalt glükoositasemeid veres, et hoida ainevahetust tasakaalus (Wasserman, 2009). Kroonilise stressi mõjul on suurem tõenäosus hüperglükeemia ja tüüp II diabeedi tekkeks (Surwit et al., 1992; McCowen et al., 2001). Katses oli kasutusel selle uurimiseks vereseerumi glükoosi näitaja. HC LSuc grupis ja LC HSuc grupis tingis stress tendentsi kõrgemaks glükoosi tasemeks. Seevastu HC HSuc stressigrupis oli glükoositaseme madalam. Sellised tulemused võivad tähendada, et viimased olid efektiivsemad kohanema stressiga. See võib olla seoses eelnevate tulemustega, kus stressigruppides, kellel oli GAD<sub>65</sub><sup>1</sup> amügdalas kõrgema ekspressiooniga, oli glükoosi tase kõrgem (Li, 2012).

Lisaks, oli märgata madalama positiivse afektiivsusega loomade seas erinevusi baastaseme 5-HIAA-s, mis oli sõltuv püsivuhkrutarbimise fenotüübist. Üldiselt kaldusid 5-HIAA tasemed olema stressirottidel madalamad. Need erinevused ei laienenud serotoniini tasemele ega käibe. Varasemalt on madalam 5-HIAA tase stressirottidel seostatud kõrgema ärevustasemega (Tõnissaar et al., 2008).

Inimestel on üks stressi sümptom märkimisväärne kehakaalu kõikumine. Kaalu kõikumine on usaldusväärne näitaja loomkatsemudelites, mis on kasutusel stressi ja stressiga seotud häirete uurimisel. Katses uuritav stressigrupp võttis kaalus esimeste nädalate jooksul rohkem juurde kui kontrollgrupid, kuid stressi intensiivistamisel ilmnes trend, kus stressirottid 5. nädala ajal olid keskmiselt kaalu kaotanud erinevalt kontrollgrupist, kelle kaal stabiilselt tõusis ka 5. nädalal. Algne kaaluühe suurem kasv on uus tulemus võrreldes varasemate uuringutega, kus aeglasem kaaluühe stressigrupis oli arvestatud stressi indikaatoriks (Kõiv et al., 2019, Marin et al., 2007). Sarnaseid tulemusi on raporteeritud 5-HT transporterite *knock-out* rottidel ja inimestel, kellel on ärevuse ja depressiooni komorbiidsus (de Wit et al., 2015; Olivier et al., 2008).

---

<sup>1</sup> *glutamate decarboxylase* - ensüüm, mis on katalüsaator glutamaadi dekarboksüleerimisel GABAks (*γ-aminobutyric acid* - *γ*-aminovõihape)

# KOKKUVÕTE

Varasemad uuringud on näidanud püsishukrutarbimise ja kudisemisfenotüübi rolle individuaalse organismi stressivastuses. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida nende kahe fenotüübi omavahelisi seoseid ja erinevusi akuutse amfetamiini efektides ja kuidas need väljenduvad ajukoore monoamiinide tasemetes. Katses läbi viidud kroonilise muutliku stressirežiim oli efektiivne soovitud seisundi loomises katseloomadel. Stressirežiimile järgnevate mõõtmiste ja katsete käigus tuli välja 4 tähtsamat leidu:

- amfetamiini poolt esile-kutsutud kudinate arv oli stressirottidel väiksem kõigis gruppides peale paljukudisejate paljumaiustajate grupi;
- ka sama grupi rottidel suurenes stressigrupis eesaju koore NA ja NMN tase. Teistes gruppides aga mitte;
- madalamad 5-HIAA tasemed stressirottidel ning erinevused baastasemetes madala positiivse afektiivsusega rottidel;
- vereseerumi glükoosi tase oli HC HSuc stressigrupil kõige madalam.

Nendest leidudest järeldades võib väita, et kuigi paljumaiustajate fenotüüp iseseisvalt on haavatavam stressile, siis paljukudisemise fenotüübiga koosmõjul tekib katsegruppide seas kõige efektiivsem stressivastus; haavatavus väljendub vähekudisejatel. Edasiseks uurimissuunaks antud teemal võiks olla sama fenotüüpide koosluse uurimine ning mis nende stressivastuses on unikaalset.

# **The effects of chronic variable stress and acute amphetamine on monoamines in frontal cortex of rats with different positive affect and sucrose intake levels**

Markus Vares

## **Summary**

Stress results from responses to uncomfortable stimuli in environment, which can cause stress-related disorders as to which some individuals are more vulnerable to than others, based on individual differences. Individual differences in trait positive affectivity seem to regulate vulnerability to stress, as high positive affectivity results in more effective resilience to stress, while low positive affectivity posits as a vulnerability to stress. Similar inter-individual differences exist in hedonic capacity as well – brain's innate ability to experience pleasure and reward – as previous work has suggested that higher affinity to hedonic reactions can be seen as a vulnerability to stress effects. Present study further aims to describe interactions between positive affectivity and hedonic capacity, and how these innate properties can regulate stress responses on behavioural and neurobiological level.

Current research has focused on the interaction of 50-kHz USV calling and sucrose consumption phenotypes in chronic stress and acute amphetamine test. The experiment used 80 rats, whose rate of 50-kHz calls was classified as low-calling or high-calling. After that 40 rats were part of chronic variable stress regime for 5 weeks followed by a intensification period. During the stress regime several sucrose consumption tests were implemented to classify the sucrose consumption phenotype of rats. After the stress regime an amphetamine and behavioral tests were carried out. 5 days later rats were decapitated and their brain tissue was frozen in liquid nitrogen for HPLC and other measurement tests. In accordance with previous research the results showed that low-calling low sucrose consuming rats are most vulnerable to stress meanwhile high-calling high sucrose consuming rats are least vulnerable to stress. The conclusion was made from results that amphetamine-elicited calls were all reduced by stress effects other than in high-calling high sucrose consuming stress group, lower blood glucose levels in the same stress group, higher normetanephrine and noradrenaline levels in the frontal cortex of the same group and lower 5-HIAA levels in stress groups and differences in base levels in rats with low positive affect.

## **Tänuõnad**

Sooviksin tänada oma juhendajaid, kes olid abiks töö valmimisel ja andsid mulle võimaluse tööd antul teemal kirjutada. Tänu veel Marten Varesele, kes andis idee töö kirjutamiseks ja võimaluse katses osaleda ning abi eest töö kirjutamisel.

## KIRJANDUSE LOETELU

1. Alttoa, 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.
2. Angelier, F. ja Wingfield, J.C. (2013). Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: Theory, hypotheses and perspectives. *General and Comparative Endocrinology* 190: 118-128.
3. Ashby, G.F., Isen, A.M., Turken, A.U. (1999). A neuropsychological theory of positive affect and its influence on cognition. *Psychological Review* 106: 529-550.
4. Bradshaw, A.D. ja Hardwick, K. (1989). Evolution and stress – genotypic and phenotypic components. *Biological Journal of the Linnean Society* 37: 137-155.
5. Brenes, J.C. ja Schwarting, R.K. (2015). Individual differences in anticipatory activity to food rewards predict cue-induced appetitive 50-kHz calls in rats. *Physiology and Behavior* 149: 107-118.
6. Brudzynski, S.M. (2009). Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: Biological, sociobiological, and neuroscience approaches. *ILAR Journal* 50: 43-50.
7. Brudzynski, S.M. (2015). Pharmacology of ultrasonic vocalizations in adult rats: Significance, call classification and neural substrate. *Current Neuropharmacology* 13: 180-192.
8. Burgdorf, J., Knutson, B., Panksepp, J., Ikemoto, S. (2001). Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behavioral Neuroscience* 115: 940-944.
9. Burgdorf, J. ja Panksepp, J. (2001). Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiology and Behavior* 72: 167-173.
10. Burgdorf, J., Panksepp, J., Brudzynski, S.M., Kroes, R., Moskal, J.R. (2005). Breeding for 50-kHz positive affective vocalization in rats. *Behavior Genetics* 35: 67-72.
11. Chrousos, G.P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 5: 374-381.

12. de Wit, L.M., van Straten, A., Lamers, F., Cujipers, P., Penninx, B.W.J.H. (2015). Depressive and anxiety disorders: Associated with losing or gaining weight over 2 years? *Psychiatric Research* 227: 230-237.
13. DeSousa, N.J., Wunderlich, G.R., De Cabo, C., Vaccarino, F.J. (1998). Individual differences in sucrose intake predict behavioral reactivity in rodent models of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 60: 841-846.
14. Foster, P.L. (2007). Stress-induced mutagenesis in Bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42: 373-397.
15. Fujino, K., Yoshitake, T., Inoue, O., Ibi, N., Kehr, J., Ishida, J., Nohta, H., Yamaguchi, M. (2002). Increased serotonin release in mice frontal cortex and hippocampus induced by acute physiological stressors. *Neuroscience Letters* 320: 91-95.
16. Gold, L.H., Swerdlow, N.R., Koob, G.F. (1988). The role of mesolimbic dopamine in conditioned locomotion produced by amphetamine. *Behavioral Neuroscience* 102: 544-552.
17. Gosnell, B.A. (2000). Sucrose intake predicts rate of acquisition of cocaine self-administration. *Psychopharmacology* 149: 286-292.
18. Gosnell, B.A., Krahn, D.D. (1992). The relationship between saccharin and alcohol intake in rats. *Alcohol* 9: 203-206.
19. Grafton, B., Watkins, E., MacLeod, C. (2012). The ups and downs of cognitive bias: Dissociating the attentional characteristics of positive and negative affectivity. *Journal of Cognitive Psychology* 24: 33-53.
20. Harro, J., Tönissaar, M., Eller, M., Kask, A., Oreland, L. (2001). Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: Effects on behavior and monoamine neurochemistry. *Brain Research* 899: 227-239.
21. Kanarik, M., Alttoa, A., Matrov, D., Kõiv, K., Sharp, T., Panksepp, J., Harro, J. (2011). Brain responses to chronic stress social defeat stress: Effects on regional oxidative metabolism as a function of a hedonic trait, and gene expression in susceptible and resilient rats. *European Neuropsychopharmacology* 21: 92-107.
22. Katz, R.J., Roth, K.A., Carroll, B.J. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 5: 247-251.
23. Knutson, B., Burgdorf, J., Panksepp, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *Journal of Comparative Psychology* 112: 65-73.

24. Knutson, B., Burgdorf, J., Panksepp (1999). High-frequency ultrasonic vocalizations index conditioned pharmacological reward in rats. *Physiology and Behavior* 66: 639-643.
25. Knutson, B., Burgdorf, J., Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective state in rats. *Psychological Bulletin* 128: 961-977.
26. Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., ... Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35: 1291-1301.
27. Kõiv, K., Metelitsa, M., Vares, M., Tiitsaar, K., Raudkivi, K., Jaako, K., Vulla, K., Shimmo, R., Harro, J. (2016). Chronic variable stress prevents amphetamine-elicited 50-kHz calls in rats with low positive affectivity. *European Neuropsychopharmacology* 26: 631-643.
28. Kõiv, K., Vares, M., Kroon, C., Metelitsa, M., Tiitsaar, K., Laugus, K., Jaako, K., Harro, J. (2019). Effect of chronic variable stress on sensitization to amphetamine in high and low sucrose-consuming rats. *Journal of Psychopharmacology* 33: 1-12.
29. Li, X., Zhang, W., Liang, B., Zheng, X., Zhou, X. (2012). Up-expression of GAD65 in the amygdala of the rat model of chronic immobilization stress with elevated blood glucose. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 166: 77-80.
30. Marin, M.T., Cruz, F.C., Planeta, C.S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology & Behavior* 90: 29-35.
31. McCowen, K.C., Malhotra, A., Bistran, B.R. (2001). Stress-induced hyperglycemia. *Critical Care Clinics* 17: 107:124.
32. McEwen, B.S. (2003). Mood Disorders and Allostatic load. *Biological Psychiatry* 54: 200-207.
33. Mohammad-Zadeh, L.F., Moses, L., Gwaltney-Brant, S.M. (2008). Serotonin: A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31: 187-199.
34. Mällo, T., Matrov, D., Herm, L., Kõiv, K., Eller, M., Rinken, A., Harro, J. (2007). Tickling-induced 50-kHz ultrasonic vocalization is individually stable and predicts behaviour in tests of anxiety and depression in rats. *Behavioural Brain Research* 184: 57-71.
35. Mällo, T., Matrov, D., Kõiv, K., Harro, J. (2009). Effect of chronic stress on behavior and cerebral oxidative metabolism in rats with high or low positive affect. *Neuroscience* 164: 963-974.
36. Olivier, J.D.A., van der Hart, M.G.C., van Swelm, R.P.L., Dederen, P.J., Homberg, J.R., Cremers, T., Deen, P.M.T., Cuppen, E., Cools, A.R., Ellenbroek, B.A. (2008). A study in

- male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. *Neuroscience* 152: 573-584.
37. Panksepp, J. ja Burgdorf, J. (2000). 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: Effects of social housing and genetic variables. *Behavioural Brain Research* 115: 25-38.
  38. Panksepp, J., Burgdorf, J., Beinfeld, M.C., Kroes, R.A., Moskal, J.R. (2007). Brain regional neuropeptide changes resulting from social defeat. *Behavioral Neuroscience* 121: 1364-1371.
  39. Raudkivi, K., Mällo, T., Harro, J. (2012). Effect of chronic variable stress on corticosterone levels and hippocampal extracellular 5-HT in rats with persistent differences in positive affectivity. *Acta Neuropsychiatrica* 24: 208-214.
  40. Rossetti, Z.L., Portas, C., Pani, L., Carboni, S., Gessa, G.L. (1990). Stress increases noradrenaline release in the rat frontal cortex: prevention by diazepam. *European Journal of Pharmacology* 176: 229-231.
  41. Sapolsky, R.M. (2015). Stress and the brain: Individual variability and the inverted-U. *Nature Neuroscience* 18: 1344-1346.
  42. Snaith, P. (1993). Anhedonia: A neglected symptom of psychopathology. *Psychological Medicine* 23: 957-966.
  43. Surwit, R.S., Schneider, M.S., Feinglos, M.N. (1992). Stress and diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15: 1413-1422.
  44. Thompson, B., Leonard, K.C., Brudzynski, S.M. (2006). Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: A quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behavioural Brain Research* 168: 64-73.
  45. Tõnissaar, M., Herm, L., Rincken, A., Harro, J. (2006). Individual differences in sucrose intake and preference in the rat: Circadian variation and association with dopamine D2 receptor function in striatum and nucleus accumbens. *Neuroscience Letters* 403: 119-124.
  46. Tõnissaar, M., Mällo, T., Eller, M., Häidkind, R., Kõiv, K., Harro, J. (2008). Rat behavior after chronic variable stress and partial lesioning of 5-HT-ergic neurotransmission: Effects of citaloprim. *Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32: 164-177.
  47. Vares, M., Metelitsa, M., Kõiv, K., Kaldmäe, M., Laugus, K., Tiitsaar, K., Shimmo, R., Harro, J. (2018). Chronic stress sensitizes amphetamine-elicited 50-kHz calls in the rat: Dependence on positive affective phenotype and effects of long-term fluoxetine pretreatment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 171: 10-19.

48. Vasey, M.W, Harbaugh, C.N., Mikolich, M., Firestone, A., Bijttebier, P. (2013). Positive affectivity and attentional control moderate the link between negative affectivity and depressed mood. *Personality and Individual Differences* 54: 802-807.
49. Wasserman, D.H. (2009). Four grams of glucose. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: 11-21.
50. Willner, P. (1997). The chronic mild stress procedure as an animal model of depression: Valid, reasonably reliable, and useful. *Psychopharmacology* 134: 371-377.
51. Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 93: 358-364.

# LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Markus Vares,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Kroonilise muutliku stressi ja akuutse amfetamiini mõju ajukoore monoamiinidele erineva positiivse afektiivsuse ja püsisuhkrutarbimisega rottidel“, mille juhendajad on Jaanus Harro ja Jüri Parik, 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 Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, 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.

*Markus Vares*

**08.06.2020**