

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Anna-Liisa Lorenz

**129S6 JA C57BL/6 HIIRELIINIDE VÕRDLUSUURING
ERINEVATES DEPRESSIOONITESTIDES**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Ph.D. Sirli Raud
Ph.D. Kersti Lilleväli

TARTU 2013

SISUKORD

| | |
|---|----|
| SISUKORD | 2 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 3 |
| SISSEJUHATUS | 4 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 5 |
| 1.1 Depressioon | 5 |
| 1.1.1 Sümptomid | 5 |
| 1.1.2 Depressiooni teooriad | 6 |
| 1.1.3 Depressiooni ravi | 7 |
| 1.1.3.1 Imipramiin | 7 |
| 1.2 Depressiooni uurimine hiirtel | 8 |
| 1.2.1 C57BL/6 hiireliin | 9 |
| 1.2.2 129S6 hiireliin | 9 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 10 |
| 2.1 Töö eesmärgid | 10 |
| 2.2 Materjal ja meetodika | 10 |
| 2.2.1 Uuritavad hiired | 10 |
| 2.2.2 Käitumuslikud testid | 11 |
| 2.2.2.1 Sabast riputamise test | 11 |
| 2.2.2.2 Sundujumise test | 12 |
| 2.2.2.3 Reserpiini-indutseeritud hüpotermia test | 13 |
| 2.2.3 Ravimid | 13 |
| 2.2.4 Statistiline analüüs | 13 |
| 2.3 Tulemused | 14 |
| 2.3.1 Sabast riputamise test | 14 |
| 2.3.2 Sundujumise test | 15 |
| 2.3.3 Reserpiini-indutseeritud hüpotermia test | 17 |
| 2.4 Arutelu | 22 |
| KOKKUVÕTE | 26 |
| SUMMARY | 27 |
| TÄNUAVALDUSED | 29 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 30 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID | 35 |
| LIHTLITSENTS | 36 |

KASUTATUD LÜHENDID

5-HT – 5-hüdroksütrüptofaan ehk serotoniin

DA – dopamiin

FST – (forced swimming test) sundujumise test

IMI – imipramiin

NA – noradrenaliin

NAT – noradrenaliini transporter

RIH – reserpiini-indutseeritud hüpotermia test

SERT – serotoniini transporter

TST – (tail suspension test) sabast riputamise test

Sal – saliini ehk füsioloogiline lahus (0.9% naatriumkloriidi lahus)

SISSEJUHATUS

Depressioon on keeruline ning laia sümptomitespektriga haigus, mis mõjutab umbes viiendikku elanikkonnast. Naistel on depressiooni esinemissagedus kaks korda kõrgem kui meestel, ilmnedes enamasti viljakusvõimelistel aastatel. Depressiooni üheks põhjuseks on peetud monoamiinide, eelkõige serotoniini ja noradrenaliini madalat taset ajus. Mitmekümne aasta jooksul on läbi viidud suurel hulgal uuringuid, mille abil on üritatud leida nii depressiooni põhjuseid kui ka efektiivset ravi.

Imipramiin on tritsükliline antidepressant, mida on kasutatud depressiooni ravis juba pikemat aega. See ravim inhibeerib serotoniini ja noradrenaliini transporterite talitust, pärssides monoamiinide tagasihaaramist presünaptilisse neuronisse. Imipramiini toimet on uuritud paljude erinevate hiireliinide peal, kuid senini ei ole tehtud põhjalikumaid võrdlusuuringuid 129S6 ja C57BL/6 hiirtel.

Eelnevalt mainitud hiireliinid erinevad teineteisest “käitumusliku meeleheite” poolest, mis on üheks depressiooni sümptomiks inimestel. C57BL/6 hiirtel, keda on kasutatud laborites kõige sagedamini, esineb mõõdukas ärevus ja aktiivsus. 129S6-d aga seevastu peetakse kõrge ärevusega ja vähenenud liikumisaktiivsusega liiniks.

Antud töö on läbi viidud Tartu Ülikooli Füsioloogia Instituudis. Töö eesmärk oli uurida antidepressandi imipramiini toimet 129S6 ja C57BL/6 hiirtel kasutades “käitumuslikke meeleheite” teste ning “keemilise depressiooni mudelit”.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Depressioon

Depressioon on levinud ja kompleksne haigus, mis on põhjustatud geenide ja keskkonna vastastikusest mõjust (Gold et al., 2013). Haigus on krooniline ja mentaalne, seda iseloomustab alanenud meeleolu, huvi ja nauding kadumine päevastest tegevustest, madal enesehinnang ning kõrge kalduvus enesetapule. See haigus mõjutab paljude inimeste elukvaliteeti ning on muutunud üheks peamiseks enesetappude põhjuseks (Pati et al., 2010).

Arenenud riikides on depressioon teine, maailmas aga neljas kõige sagedamini esinev haigus. Vaatamata kuuekümnelt aastalt jooksul tehtud rohketele uuringutele on depressiooni tekkepõhjused siiani täpsemalt teadmata ning praegused terapeutilised lähenemised põhinevad hüpoteesidel, mis on üle neljakümne aasta vanad (Gold et al., 2013).

1.1.1 Sümptomid

Kõige levinumad sümptomid on (Wasserman, 2011):

- lootusetus – masendus suuremas osas päevast, peaaegu iga päev;
- rõõmutus – vähenenud huvi ja nauding tegevustest;
- söögiisu muutused – vähenenud söögiisu ja kaalukaotus, mõnel juhul kaalutõus;
- häiritud uni või unetus – raskused magamajäämisega, varakult ärkamine või liiga pikk uni;
- muutused motoorses aktiivsuses – rasked ning loiid liigutused, vähenenud miimika, mõnikord rahutus;
- väsimus – suurenenud füüsiline ja vaimne väsimus;
- madal enesehinnang, süütunne – enese halvustamine ja põhjendamatu süütunne;
- süvenemise raskused – komplikatsioonid õppimises, otsuste tegemises ja üldises süvenemises;
- mõtted surmast ja enesetapust, enesetapukatsed – hiljutised mõtted surmast, enesetapust.

Depressiooni diagnoosimiseks peab põhisümptomitena alati esinema rõõmutus ja lootusetus ning lisasümptomitena lisaks eelnevale kahele veel kolm ülalnimetatud sümptomit. Kindlasti

peavad sümptomid esinema suurema osa päevast, igapäevaselt ning vähemalt kahe nädala jooksul (Wasserman, 2011).

1.1.2 Depressiooni teooriad

Üheks tuntumaks depressiooni teooriaks on monoamiini hüpotees, mis väidab, et depressioon on põhjustatud monoamiinide, eriti serotoniini (5-HT) vähesest aktiivsusest. Depressioonihaigetel on leitud 5-HT ja noradrenaliini (NA) defitsiit ajust. Sellest on järeldatud, et ravimid, mis suurendavad 5-HT ja/või NA hulka, on efektiivsed depressiooni ravimises. Oletatakse, et nende neurotransmitterite tase suureneb kohe, kui manustada monoamiini agoniste ning kui depressioon on põhjustatud neurotransmitterite madalast tasemest, peaks haiguse sümptomid vähenema monoamiinide taseme tõusuga (Hall, 1998). Monoamiini teooria on aidanud mõista monoamiinide tagasihaarde inhibiitorite toimemehhanisme (Hinz et al., 2012), kuid ei selgita täielikult nende ravimite aktiivsuse mehhanismi ega anna ulatuslikku arusaama depressiooni patofüsioloogiast (Hindmarch, 2002). Hüpoteesi baasil on loodud ohutumaid antidepressante, kuid need ei ole toonud olulist läbimurret kliinilises tõhususes. Ravi antidepressantidega võib aega võtta paarist nädalast kuni mitme kuuni enne kui ilmneb raviefekt ja sümptomid hakkavad kaduma (Wasserman, 2011). Veelgi enam, umbes 1/3 patsientidest reageerib ravile antidepressantidega halvasti või ei reageeri üldse (Wong ja Licinio, 2001).

Sellest tulenevalt on arvatud, et monoamiinide teooria seletab üksnes väikest osa antidepressantide aktiivsuse mehhanismidest ning seetõttu loodi 1980-ndatel nn retseptorite adaptiooni teooria. Selle teooria kohaselt on 5-HT ja β -adrenergiliste retseptorite allaregulatsioon kutsutud esile nende pidevast aktiveerimisest, mis on omakorda põhjustatud 5-HT ja NA kontsentratsiooni tõusust sünaptilises pilus. See on nähtus, mis esineb ka antidepressantide kasutamisel ravi alguses (Lopez-Munoz ja Alamo, 2012). Kahjuks ei ole retseptorite adaptiooni teooria kõikide antidepressantide jaoks universaalne. Lisaks puudub 5-HT ja β -adrenergiliste retseptorite blokaatoritel antidepressiivne toime.

Seega pakuti järgnevalt välja düsregulatsiooni teooria (Siever ja Davis, 1985), mis kaasas mitmeid neurotransmitteri radu, sealhulgas NA-ergilisi, 5-HT-ergilisi ja isegi dopamiinergilisi (DA-ergilisi) radu. Selle teooria kohaselt on depressioon põhjustatud erinevate ajupiirkondade (frontaalkoore, hippokampuse, amügdala, basaalganglionite) väärtalitusest, mida moduleerivad omakorda erinevad monoamiinergilised süsteemid (Delgado ja Moreno,

2000). Nende ajustruktuuride normaalne talitus sõltub mitmetest faktoritest, aga eriti avaldab mõju just stress.

Viimaste aastakümnete jooksul on paremate molekulaarbioloogiliste meetodite ja transgeensete loomade kasutamisel jõutud järeltulele, et depressiooni päritolu ning kõikide ainete antidepressantlikku efekti ei ole võimalik seletada ühtse biokeemilise mehhanismiga (Lopez-Munoz ja Alamo, 2012).

1.1.3 Depressiooni ravi

Depressioon on heterogeenne, mitmekülgne haigus, mille sümptomid avalduvad psühholoogilisel, käitumuslikul ja füsioloogilisel tasandil (Cryan et al., 2005). Üheks põhiliseks ravivõimaluseks psühhoteraapia ja muude ravimeetodite kõrval on kasutada farmakoteraapiat. Erinevatesse klassidesse kuuluvatel antidepressantidel on erinevad märklauad, suurendamaks monoamiinide (serotoniini, noradrenaliini) taset ajus, kusjuures võidakse mõjutada monoamiinide transportereid, retseptoreid või lagunemist pärssivaid ensüüme (Torres et al., 2003). Depressiooni ravi üheks olulisemaks nurgakiviks on 5-HT ja/või NA transporterite talitlust pärssivad antidepressandid, mis võivad toimida selektiivsete või mitteselektiivsete monoamiinide tagasihaarde inhibiitoritena. Üheks mitteselektiivseks monoamiinide tagasihaarde inhibiitoriks on imipramiin (Abbas et al., 2012).

1.1.3.1 Imipramiin

Imipramiin on aine, mille toimet uuritakse käesolevas töös erinevatel hiireliinidel. See kuulub tritsükliliste antidepressantide hulka ja on peamiselt näidustatud depressiooni ravis, kuid on kasutusel ka ärevuse ja enureesi ravis (Lawless, 2001; Kahn et al., 1986).

Toimemehhanismilt inhibeerib imipramiin serotoniini ja noradrenaliini tagasihaaret sünaptilisest pilust, pärssides 5-HT ja NA transporterite (SERT ja NAT) talitlust (Wasik et al., 2013). Lisaks seostub imipramiin organismis vähemal määral veel histamiin-1, atsetüülkoliini, 5-HT_{2A} ja alfa-1-adrenergiliste retseptoritega. SERT-i ja NAT-i inhibeerimine arvatakse olevat antidepressiivse toime taga, teiste retseptorite blokaad põhjustab sedatsiooni, kuiva suud ja ortostaatilist hüpotensiooni (Preskorn, 2000).

1.2 Depressiooni uurimine hiirtel

Senini ei ole veel loodud testi, mis indutseeriks kõiki depressiooni sümptomeid katseloomadel. Selle asemel hinnatakse kindlaid haiguse aspekte, nagu näiteks psühhomotoorset aktiivsust, muutuseid tunnetamises või selliseid funktsioone nagu söömine ja magamine (Meyer ja Quenzer, 2004). Depressiooni sümptomeid on katseloomadel püütud esile kutsuda farmakoloogilisi, ajustruktuuri kahjustamise, keskkonna, geneetilisi ning erinevaid stressimanipulatsioone kasutades (Cryan et al., 2002; Willner ja Mitchell, 2002; Cryan ja Mombereau, 2004; Geyer ja Markou, 2000; Weiss ja Kilts, 1998; McKinney, 2001; Nestler et al., 2002). Selle juures on oluline, et loomadel põhjustatud depressiooni sümptomeid oleks võimalik kergesti tõlgendada mõõdetavateks käitumuslikeks parameetriteks (Duman, 2010).

Stress on peamine keskkonnast tulenev riskifaktor, mida seostatakse depressiooni esinemisega. Selle tõttu on üritatud stressi abil loomades esile kutsuda mõningaid põhilisi depressiooni sümptomeid (Duman, 2010). Stressiga seotud testidest on tänapäeval ühed laialdasemalt kasutatavad sundujumise (forced swimming test (FST)) ning sabast riputamise testid (tail suspension test (TST)), mis baseeruvad „käitumusliku meeleheite” tekitamisel looma väljapääsmatusse olukorda panemisel. Mõlema testi puhul on tuvastatud hiirtel nii liinisiseseid kui ka liinivahelisi erievuusi (Jacobson ja Cryan, 2007). Näiteks uuringus, kus võrreldi C57BL/6 ja NIH-Swiss hiireliinide baasimmobiilsust ning imipramiini mõju hiirte immobiilsusele, leiti, et NIH-Swiss hiirte baasimmobiilsus erines nendes testides 7 korda ja imipramiin omas neil hiirtel toimet ainult TST puhul. C57BL/6 hiirte puhul oli loomade baasimmobiilsus mõlemas testis sarnane ning imipramiinil immobiilsust vähendav toime (Bai et al., 2001). Vähesed liinivõrdlusuuringud, mis on tehtud C57BL/6 ja 129S6 hiirtega on demonstreerinud nende liinide erinevat käitumist FST-s (Abramov et al., 2008). Veelgi vähem on võimalik leida kirjandusest võrdlusandmeid antidepressantide toimetest nendel liinidel antud testides. Ühes läbiviidud uuringus, kus võrreldi TST-s imipramiini (30 mg/kg) toimet C57BL/6 ja 129S6 hiirtel, leiti, et imipramiin ei vähendanud kummagil liinil immobiilsust (Liu ja Gershenfeld, 2001). Lähtuvalt eelnevast uuriti antud töös põhjalikumalt mitteselektiivse SERT ja NET inhibiitori, imipramiini toimet nendel hiireliinidel kahes „käitumusliku meeleheite” testis ning „keemilise depressiooni mudelis“.

1.2.1 C57BL/6 hiirelin

C57BL/6 on üks kõige enam kasutatavaid hiireline käitumuslikes, farmakoloogilistes, geneetilistes ning liinivõrdlusuuringutes (Mayorga ja Lucki, 2001). Sellel hiirelinil on erinevates ärevustestides tuvastatud kõrgem uudistamisaktiivsus (väiksem ärevus) ja liikumisaktiivsus kui näiteks BALB/c või 129S6 liinidel (Lepicard et al., 2000; Carola et al., 2003; Abramov et al., 2008). “Käitumusliku meeleheite” testides, FST-s ja TST-s, on neil kõrgem baasimmobiilsus kui näiteks FVB/NJ liinil (Võikar et al., 2001; Liu ja Gershenfeld, 2001). Samas on C57BL/6 hiired võrreldes 129S2 või 129S6 liini hiirtega oluliselt madalama baasimmobiilsusega (Võikar et al., 2001; Abramov, 2008).

Farmakoloogilised uuringud antidepressantidega on näidanud, et C57BL/6 liini tundlikkus erineb testiti ja antidepressanditi. Näiteks, selektiivsetest 5-HT tagasihaarde inhibiitoritest vähendas tsitalopraam immobiilsust nii TST-s kui FST-s (Cervo et al., 2006) vastupidiselt floksetiinile, mis ei mõjutanud üldse immobiilsust FST-s (Lucki et al., 2001). Imipramiinil oli aga mõlemas testis immobiilsust vähendav toime C57BL/6 hiirtele (Bai et al., 2001).

1.2.2 129S6 hiirelin

129S6 on üks paljudest alaliinidest 129/Sv hiirelinis (<http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=424> [2]). 129S6 liini hiirtel on sarnaselt teiste 129 alaliinidega tuvastatud madal uudistamisaktiivsus (suurenenud ärevus) ja vähenenud liikumisaktiivsus (Cook et al., 2002; Rodgers et al., 2002; Abramov et al., 2008). Teisiti on immobiilsuskäitumisega, kus FST-s ja TST-s tulemused erinevad alaliinide vahel (Jacobson ja Cryan, 2007). 129S6 hiirte puhul on näidatud võrreldes C57BL/6 hiirtega kõrget baasimmobiilsust nii FST-s (Abramov et al., 2008) kui TST-s (Jacobson ja Cryan, 2007).

Antidepressantide toimet 129 liinile on enam uuritud 129T2/SvEmsJ hiirtel. Näiteks on neil teatatud tsitalopraami ja floksetiini immobiilsust vähendavast toimest (Crowley et al., 2005; Lucki et al., 2001). 129S6 liinil on antidepressantide toimet vähem uuritud. Ühest vähestest nende hiirtega tehtud uuringutest leiti, et imipramiin ei oma anti-immobiilset toimet 129S6 hiirtele (Liu ja Gershenfeld'i, 2001).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli klassikalise antidepressandi imipramiini toime uurimine 129S6 ja C57BL/6 hiirtel. Selleks püstitati järgnevad uurimisülesanded:

- uurida imipramiini toimet C57BL/6 ning 129S6 hiirtel kahes antidepressantide valideerimise testides – sabast riputamise ja sundujumise testides;
- uurida imipramiini toimet C57BL/6 ning 129S6 hiirtel nn ”keemilise depressiooni mudelis“ – reserpiini-indutseeritud hüpotermia mudelis;
- uurida kuidas mõjutab sugu imipramiini toimet sabast riputamise testis, sundujumise testis ning reserpiini-indutseeritud hüpotermia mudelis.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Uuritavad hiired

Antud töös kasutati kahte hiireliini: C57BL/6 (tellitud firmast Scanbur) ja 129S6 (tellitud firmast Taconic), kelle paljundamine viidi läbi Tartu Ülikooli Biomeedikumi vivaariumis. Käitumiskatsetes olid kasutusel nii emas- kui isasloomad. Vähendamaks katsetes kasutatavate loomade arvu, kasutati hiiri korduvalt. Iga testi puhul oli kokku neli katset, igas katses osales umbes viisteist C57BL/6 ja viisteist 129S6 hiirt. Kaks katset tehti isas- ja kaks emasloomadega, mõlema puhul said pooled loomad imipramiini ja pooled saliini lahust.

Loomade vanus oli sundujumise testi ajal 3 kuud. Sabast riputamise test sooritati järgneva kahe kuu jooksul. Reserpiini-indutseeritud testi ajal olid hiired 6-7kuused. Hiiri hoiti puurides kaheksakesi, mõnel juhul ka üheksakaupa ning standardtingimustel – temperatuuril $20\pm 2^{\circ}$, valgusrežiimil 12h valget ja 12h pimedat aega (valgustus lülitus välja kell 19.00). Söök ja joogivesi oli loomadele piiramatus koguses pidevalt kättesaadav. Tartu Ülikooli Loomkatsete Eetika Komitee, kooskõlas 24. novembril 1986. aastal välja antud Euroopa Ühenduse direktiiviga 86/609/EEC, kiitis heaks kõik loomadega läbi viidud protseduurid.

2.2.2 Käitumuslikud testid

2.2.2.1 Sabast riputamise test

Hiire sabast riputamise test (TST) on käitumuslik test, mis töötati välja antidepressantide aktiivsuse hindamiseks (Porsolt et al., 1987; Berrocoso et al., 2013). Ehkki seda testi on kasutatud ka hiirte depressiivse fenotüübi määramiseks, on tegu esmajoones siiski farmakonide valideerimise testiga (Gardier, 2009). TST eelisteks peetakse selle lihtsust, odavust (Colla et al., 2012) ning suuremat tundlikkust antidepressantide suhtes kui FST-l (Cryan et al., 2005; Petit-Demouliere et al., 2005). TST põhineb “käitumusliku meeleheite” tekitamisel närilise väljapääsmatusse olukorda panemisel (Cryan et al., 2005). TST puhul eristatakse hiirtel kahte tüüpi käitumist: aktiivset stressiolukorrast väljapääsemisele suunatud käitumist ning passiivset ”ootavat käitumist”, mil loom on liikumatu (Mohrbacher et al., 2011). Antidepressandid vähendavad katseloomade passiivset immobiilset käitumist, mis korreleerub tugevalt antidepressantide mõjuga depressiivsetel inimestel (Berrocoso et al., 2013).

Imipramiini või saliini lahust süstiti hiirele 40 minutit enne katsesse minekut. Antud katses pandi hiir teibiga riuli külge rippuma, nii et loom oli lauapinnast umbes 58 cm kõrgemal ja teip asetseb sabaotsast umbes 1 cm eemal (Joonis 1). Katse kestis 6 minutit. Imobiilsuse aeg mõõdeti videosalvestiselt viimase nelja minuti jooksul. Hiir loeti immobiilseks vaid siis, kui ta rippus passiivselt ja täiesti liikumatult.

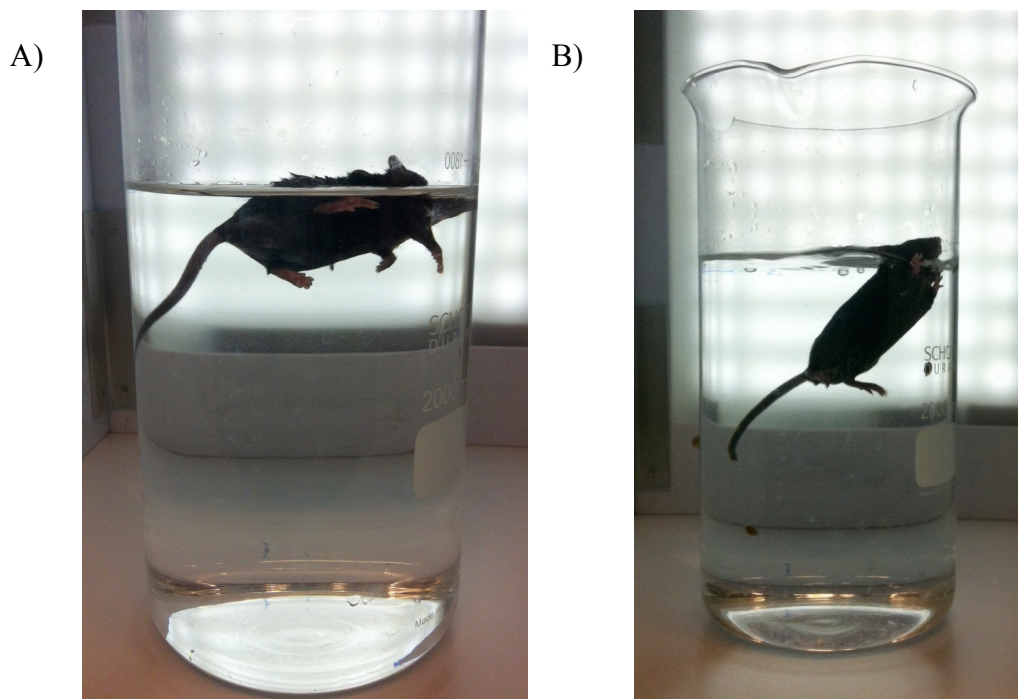


Joonis 1. Sabast riputamise testi läbiviimine laboris (Grünbach, 2012).

2.2.2.2 Sundujumise test

Sundujumise test (FST) on TST kõrval teine kõige laialdasemalt kasutatav test antidepressantide efektiivsuse hindamiseks, olles lihtne, usaldusväärne ning spetsiifiline (Castagné et al., 2009; Slattery ja Cryan, 2012).

FST baseerub sarnaselt TST-le “käitumusliku meeleheite” indutseerimisel loomal, mis väljendub immobiilses käitumises ning mida saab antidepressantidega antagoniseerida (Porsolt et al., 1977; Castagné et al., 2009). Loom asetati silindrikujulisse anumasse (diameeter 12 cm, kõrgus 24 cm), mis oli täidetud 18 cm ulatuses 25°C veega. Silindri kõrgus ja vee sügavus olid piisavad, et hiire saba ei ulatuks puudutama silindri põhja. Katse kestis 6 minutit, millest viimasel neljal minutil mõõdeti aega, mil loom oli immobiilne. Käitumine salvestati videofailidele, kust hiljem toimus selle automaatne analüüsimine, kasutades programmi Ethovision (NOLDUS). Analüüsimise jaoks määrati paari hiire käitumise baasil immobiilsuse läheväärtus, mille puhul oli hiir liikumatu ja tegi vaid minimaalseid liigutusi, mis olid vajalikud pea vee peal hoidmiseks (Dalvi ja Lucki, 1999). Läheväärtuse leidmiseks võrreldi visuaalselt arvuti programmi graafilist käitumisanalüüsi inimese analüüsitulemustega. Tulemuste kokkulangevuse korral võeti antud läheväärtus automaatse analüüsi aluseks.



Joonis 2. Sundujumise testi läbiviimine laboris. A) Hiire passiivne käitumisviis ehk immobiilsus, B) väljapääsemisele suunatud käitumine.

2.2.2.3 Reserpiini-indutseeritud hüpothermia test

Reserpiin on inimestel kasutatav hüpertooniavastane aine. Toimemehhanismilt tühjändab reserpiin katehoolamiinide depoooid, pärssides pöörduumatult vesikulaarseid monoamiini transportereid (El-Sisi, 2011). Katehoolamiinide defitsiiti on seostatud depressiooniga (Schildkraut, 1965), mistöttu on reserpiini kasutatud nn "keemilise depressiooni" esilekutsumiseks ja järgnevalt antidepressantide efektiivsuse uurimiseks närilistel (Askew, 1963; Bourin et al., 1983). Loomadel põhjustab reserpiini manustamine ülemise silmalau allavajumist (ptoosi) ja hüpothermiat. Antidepressandid antagoniseerivad need reserpiini poolt esile kutsutud toimed.

Käesolevas töös mõõdeti üksnes kehatüve temperatuuri. Hiirtele süstiti kehatüve baastemperatuuri mõõtmise järgselt reserpiini (1 mg/kg). Kehatüve temperatuuri mõõtmiseks kasutati elektroonilist TST termomeetrit (TST Technicaland Scientific Equipment GmbH, Germany), mille vaseliiniga kaetud sond (otsa diameeter 1.7 mm) sisestati umbes 20mm sügavusele pärasoolde. Pärast 18 tunni möödumist mõõdeti uuesti temperatuuri (Srinath et al., 2010). Seejärel süstiti imipramiini (30 mg/kg) või saliini lahust kõhuõõnde ning temperatuur mõõdeti tunniste vahedega viie tunni jooksul. Järgmine ja ühtlasi ka viimane mõõtmine tehti 24 tundi pärast imipramiini süstimist. Tulemused esitati kehatemperatuuri vahena (baastemperatuur lahutada kehatemperatuur X tundi pärast imipramiini või saliini lahuse süstimist).

2.2.3 Ravimid

Imipramiin vesinikkloriid, annustes 10mg/kg, 20mg/kg ja 30mg/kg, lahustati saliini lahuses ja manustati kõhuõõnde 40 minutit enne TST ja FST katse algust.

Reserpiin (1 mg/kg) lahustati destilleeritud vees ja manustati subkutaanselt 18 h enne imipramiini (30 mg/kg) kõhuõõnde manustamist.

Ravimid süstiti hiirtele mahus 0.1 ml 10 g kohta.

2.2.4 Statistiline analüüs

Tulemused on väljendatud keskmiste väärtusena ja nende standardveana (\pm S.E.M.).

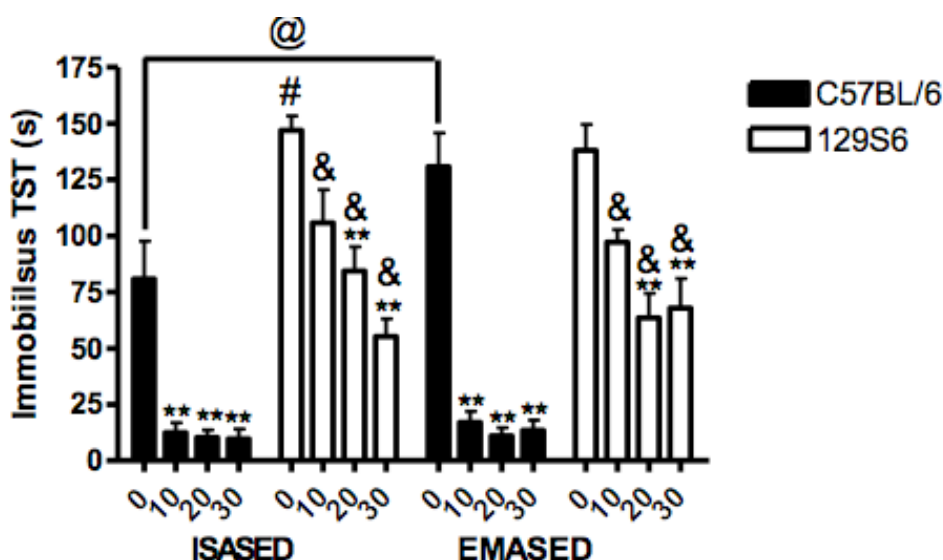
Statistilised analüüsid tehti Statistica programliga, mis on mõeldud Windows'i tarkvarale. TST ja FST andmeid analüüsiti kolmesuunalist variatsioonianalüüsi kasutades (three-way ANOVA). Analüüsimisel kasutati sõltumatute muutujatena liini, ravimit ja sugu, et avastada olulisi efekte.

Reserpiini-indutseeritud hüpotermia testi (RIH) tulemusi analüüsiti korduvmõõtmiste ANOVA (repeated measures ANOVA) abil. Selle testi puhul oli sõltumatudeks muutujateks aeg, sugu, liin ning ravim. Erinevate gruppide post-hoc võrdlus tehti Tukey HSD testiga Statistica tarkvara abil.

2.3 Tulemused

2.3.1 Sabast riputamise test

Kolmesuunaline variatsioonianalüüs näitas TST puhul, et imipramiin omas enamikul juhtudel olulist mõju immobiilsusaja vähenemisele (Joonis 3). Efektid ilmned nii liini ($F(1,107)=154.8$, $p<0.001$) kui ka ravimi ($F(3,107)=68.8$, $p<0.001$) puhul. Interaktsioonide korral olid statistiliselt olulised efektid liin \times ravim ($F(3,107)=4.9$, $p<0.01$) ja liin \times sugu ($F(1,107)=5.0$, $p<0.05$) vahel.



Joonis 3. Imipramiini (10-30 mg/kg) toime emaste ja isaste hiirte immobiilsusele TST-s. & $p<0.01$ – 129S6 imipramiini lahuse grupp võrreldes sama doosi samast soost C57BL/6 grupiga, # $p<0.01$ – isaste 129S6 saliini lahuse grupp võrreldes isaste C57BL/6 saliini lahuse grupiga, ** $p<0.01$ – imipramiini grupp võrreldes sama liini saliini lahuse grupiga, @ $p<0.05$ – sama liini saliini lahuse grupi võrdlus.

Isaste 129S6 ja C57BL/6 hiirte baasimmobiilsus erines oluliselt (Joonis 3). C57BL/6 hiiretel tuvastati oluliselt suurem tundlikkus imipramiini suhtes, kuna neil esines anti-immobiilne

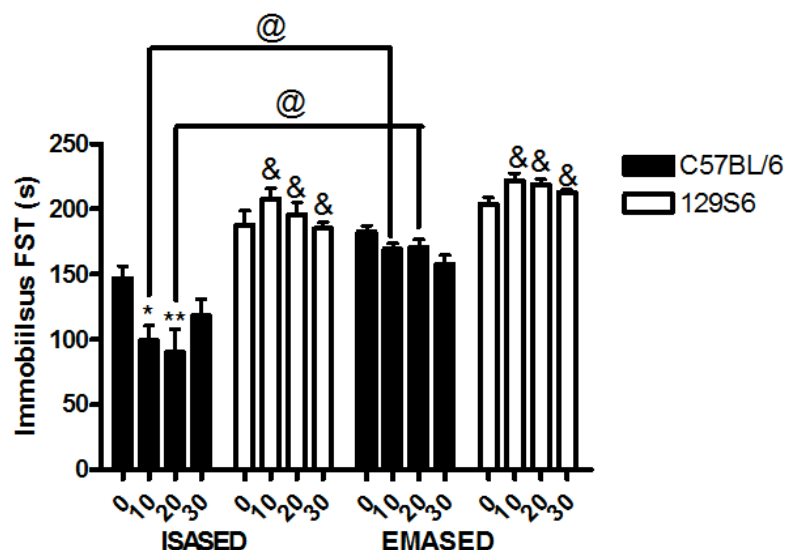
toime kõikide imipramiini dooside korral ($p < 0.001$). 129S6 hiirtel vähenes immobiilsus oluliselt ainult 20 mg/kg ja 30 mg/kg annuste puhul. Isaste 129S6 ja C57BL/6 hiirte saliini lahuse gruppide vahelisest võrdlusest selgus, et C57BL/6 hiired olid oluliselt vähem immobiilsed kui 129S6 hiired. Imipramiini gruppide tulemuste analüüsimine näitas, et isastel C57BL/6 hiirtel vähendasid kõik antidepressandi doosid oluliselt tugevamalt immobiilsust kui 129S6 loomadel.

Emaste C57BL/6 ja 129S6 hiirte puhul ei tuvastatud olulist erinevust baasimmobiilsuses (Joonis 3). C57BL/6 hiirte puhul vähendas imipramiin immobiilsuse aega märgatavalt kõikide dooside korral võrreldes sama liini saliini lahusega ($p < 0.001$). Emastel 129S6 hiirtel esines statistiliselt oluline liikumatuse vähenemine ainult 20 mg/kg ja 30 mg/kg annuse puhul ($p < 0.001$). Võrreldes 129S6 ja C57BL/6 hiirte immobiilsuse aegu erinevate imipramiini dooside korral, on näha, et antidepressandi toime on C57BL/6 hiirtel märgatavalt tugevam kui 129S6 hiirtel (Joonis 3).

Sugudevaheline erinevus tuvastati ainult C57BL/6 hiirte saliini lahust saanud gruppidel vahel – isaste hiirte baasimmobiilsus oli oluliselt madalam kui sama liini emastel hiirtel. Teistel gruppidel soolisi erinevusi ei leitud.

2.3.2 Sundujumise test

Sundujumise testis oli imipramiini immobiilsust vähendav toime mõnevõrra nõrgem kui sabast riputamise testis (Joonis 4). Märkimisväärsed muutused ilmnisid soo ($F(1,115)=74.6$, $p < 0.001$), liini ($F(1,115)=198.1$, $p < 0.001$), sugu \times ravim interaktsiooni ($F(1,115)=16.8$, $p < 0.001$) ja ravim \times liin interaktsiooni ($F(3,115)=6.4$, $p < 0.001$) efektide korral.



Joonis 4. Imipramiini (10-30 mg/kg) toime emaste ja isaste hiirte immobiilsuse ajale FST-s. & $p < 0.01$ – 129S6 imipramiini grupp võrreldes sama doosi samast soost C57BL/6 grupiga, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – isaste C57BL/6 imipramiini grupp võrreldes sama liini saliini lahuse grupiga, @ $p < 0.001$ – isaste C57BL/6 liini imipramiini grupp võrreldes emaste C57BL/6 sama doosi imipramiini grupiga.

Isaste hiirte baasimmobiilsuses ei esinenud statistiliselt olulisi muutusi (Joonis 4). C57BL/6 hiirtel vähendas imipramiini 10 mg/kg ja 20 mg/kg doos märgatavalt immobiilsusaega võrreldes sama liini saliini lahuse grupiga. 129S6 hiirtele oli antidepressandil pigem vastupidine toime – imipramiin suurendas või ei muutnud hiirte immobiilsust võrreldes sama liini saliini lahuse grupiga. Isaste C57BL/6 ja 129S6 hiirte tulemuste võrdlus näitas, et C57BL/6 hiired olid kõikide imipramiini dooside korral oluliselt vähem aega immobiilsed kui 129S6 hiired.

Emaste hiirte puhul ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi baasimmobiilsuses (Joonis 4). C57BL/6 hiirtel ei vähendanud imipramiin statistiliselt oluliselt liikumatuse aega. 129S6 hiirtel ilmnes antidepressandi manustamise järgselt hoopis immobiilsuse suurenemine. Võrreldes emaste C57BL/6 ja 129S6 hiirte imipramiini vastavate dooside gruppe, oli 129S6 hiirte immobiilsuse aeg märgatavalt kõrgem.

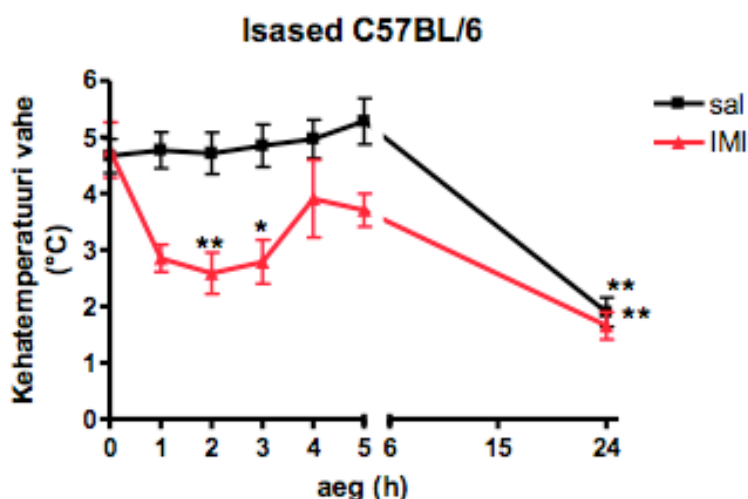
FST-s tuvastati sooline erinevus üksnes C57BL/6 hiirte puhul – isased C57BL/6 hiired olid vähem immobiilsemad kui emased C57BL/6 hiired. Siiski, statistiliselt oluline erinevus ilmnes 10 mg/kg ja 20 mg/kg imipramiini dooside korral, kus anti-immobiilne toime oli isaste hiirte puhul oluliselt tugevam kui emastel hiirtel ($p < 0.001$). 129S6 hiirte puhul märkimisväärseid soolisi erinevusi ei esinenud.

2.3.3 Reserpiini-indutseeritud hüpotermia test

18 tundi pärast reserpiini süstimist manustati imipramiini (30 mg/kg) või saliini lahust. Kehatüve temperatuur mõõdeti vahetult enne reserpiini süstimist ning 0, 1, 2, 3, 4, 5 ja 24 tundi pärast imipramiini süsti. Tulemused väljendati kehatemperatuuri vahena (baastemperatuur, mis mõõdeti 18 tundi **enne** imipramiini lahuse süstimist lahutatud kehatemperatuur, mis mõõdeti X tundi **pärast** imipramiini lahuse süstimist).

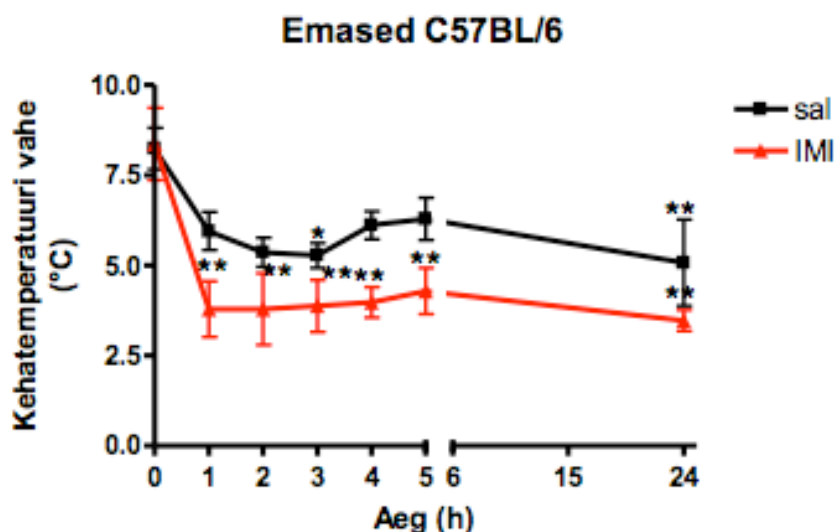
Korduvmõõtmiste ANOVA-t kasutades leiti oluline liini ($F(1,83)=45.3$, $p<0.001$), ravimi ($F(1,83)=15.2$, $p<0.001$) ning aja ($F(6,498)=43.1$, $p<0.001$) efekt. Samuti tuvastati statistiliselt oluline efekt interaktsioonidel sugu \times liin ($F(1,83)=7.6$, $p<0.01$), sugu \times ravim ($F(1,83)=5.7$, $p<0.05$), aeg \times sugu ($F(6,498)=20.4$, $p<0.001$) ning aeg \times ravim ($F(6,498)=11.5$, $p<0.001$). Kolme muutuja vaheline statistiliselt oluline efekt ilmnis sugu \times ravim \times liin ($F(1,83)=4.0$, $p<0.05$) ja aeg \times liin \times ravim ($F(6,498)=2.3$, $p<0.05$) korral. Aeg \times liin \times sugu \times ravimi interaktsiooni ($F(6,498)=2.1$, $p<0.05$) efekt oli samuti statistiliselt oluline.

Isaste C57BL/6 hiirte puhul põhjustas imipramiini manustamine olulise vähenemise kehatemperatuuri vahes. Täpsemalt toimus C57BL/6 hiirtel antud parameetri statistiliselt oluline vähenemine 2, 3 ning 24 tundi pärast imipramiini süsti (võrreldes 0 tunni kehatemperatuuri vahega) (Joonis 5). Saliini lahuse grupil jäi kehatemperatuuri vahe esimesel viiel tunnil praktiliselt muutumatuks, kuid viimasel mõõtmisel oli temperatuur praktiliselt taastunud.



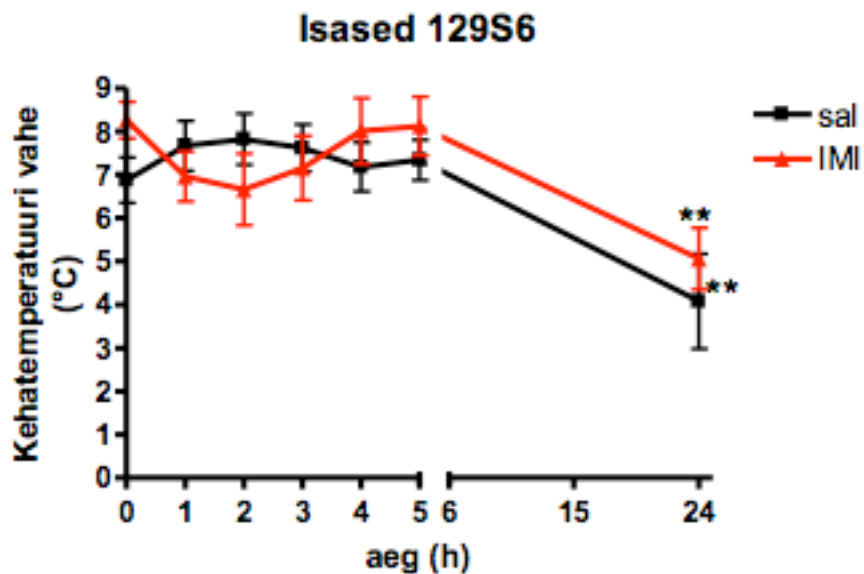
Joonis 5. Imipramiini (30 mg/kg) toime isaste C57BL/6 hiirte kehatemperatuuri vahele RIH-is. Sal – saliini lahus, IMI – imipramiini (30 mg/kg) lahus. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ – võrreldes sama grupi 0 tunniga.

Emastel C57BL/6 hiirtel antagoniseeris imipramiin samuti reserpiini hüpotermilist toimet (Joonis 6). Imipramiini süstimise järgselt ilmnis kõikidel ajahetkedel statistiliselt oluline kehatemperatuuri vahe vähenemine võrreldes selle grupi 0 tunni temperatuuri vahega. Emaste C57BL/6 hiirte saliini lahuse grupil esines süstimisest tuleneva stressi tõttu kehatemperatuuri tõus, seetõttu vähenes neil temperatuuri vahe. Statistiliselt oluline erinevus leiti ainult 3 ja 24 tunnil mõõdetud temperatuuri vahede puhul (võrreldes antud ajahetki sama grupi 0 tunniga).



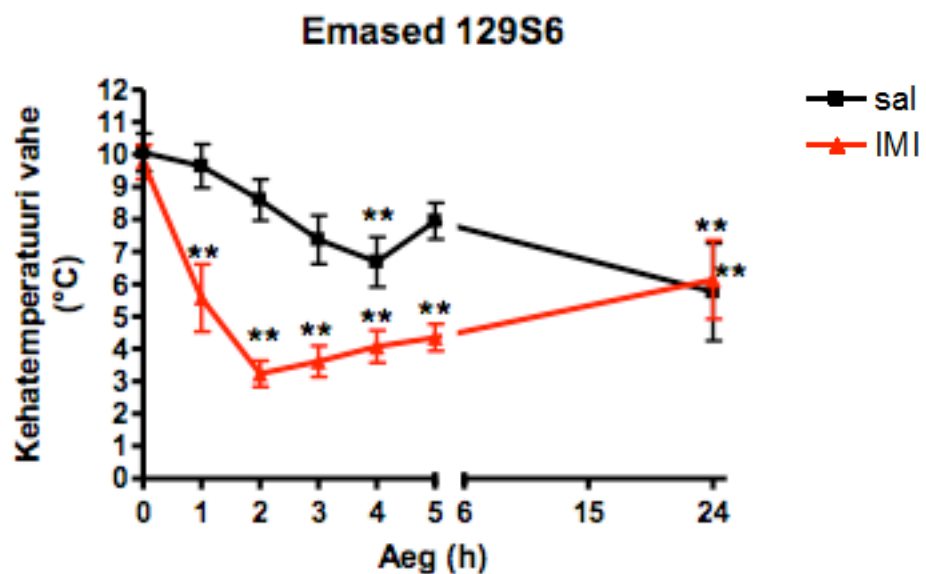
Joonis 6. Imipramiini (30 mg/kg) toime emaste C57BL/6 hiirte kehatemperatuuri vahele RIH-is. Sal – saliini lahus, IMI – imipramiini (30 mg/kg) lahus, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – võrreldes sama grupi 0 tunniga.

Erinevalt isastest C57BL/6 hiirtest, ei vähendanud imipramiin isastel 129S6 hiirtel oluliselt temperatuuri vahet (Joonis 7). Veelgi enam, antidepressandi manustamine isegi suurendas hüpotermiat. Statistiliselt oluline temperatuuri vahe vähenemine tuvastati ainult imipramiini grupi 0 tunnil mõõdetud andmete võrdlemisel 24 tunni temperatuuri vahega. 129S6 hiirte saliini grupi puhul leiti samadel ajahetkedel esinevate temperatuuri vahede võrdlemisel samuti selle parameetri märkimisväärne vähenemine.



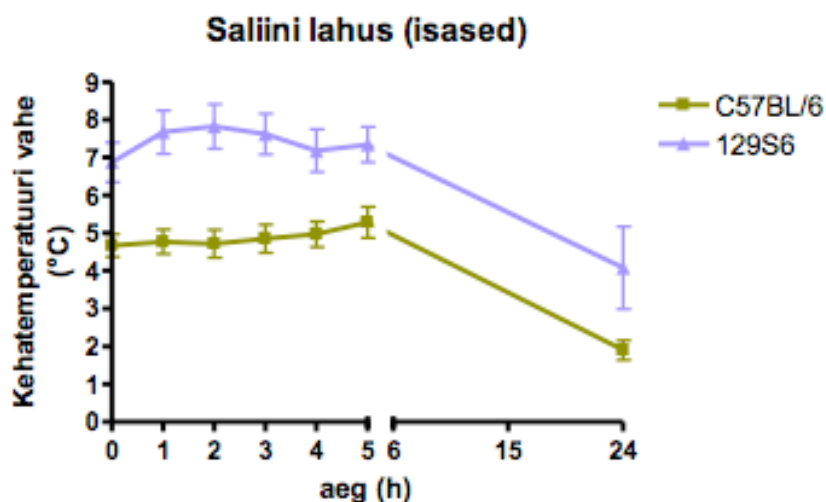
Joonis 7. Imipramiini (30 mg/kg) toime isaste 129S6 hiirte kehatemperatuuri vahele RIH-is. Sal – saliini lahus, IMI – imipramiini (30 mg/kg) lahus.

Emastel 129S6 hiirtel antagoniseeris imipramiin oluliselt reserpiini hüpotermilist toimet (Joonis 8). Märkimisväärne temperatuuri vahe vähenemine, võrreldes imipramiini grupi 0 tunni temperatuuri vahega, esines 129S6 hiirtel kõikidel ajahetkedel pärast imipramiini süstimist, olles väiksem 2 tundi pärast antidepressandi manustamist. Saliini lahuse grupil tuvastati statistiliselt oluline kehatemperatuuri vahe vähenemine 4 ja 24 tundi pärast süstimist (seda võrreldes antud grupi 0 tunniga).



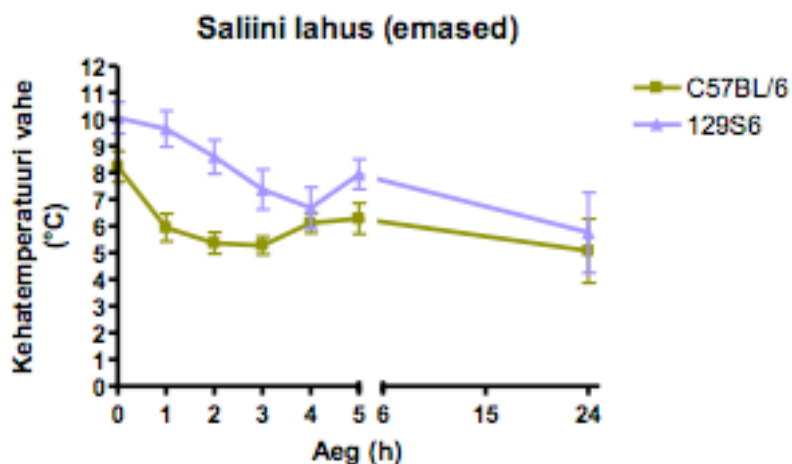
Joonis 8. Imipramiini (30 mg/kg) toime emaste 129S6 hiirte kehatemperatuuri vahele RIH-is. Sal– saliini lahus, IMI – imipramiini (30 mg/kg) lahus, ** $p < 0.01$ – võrreldes sama grupi 0 tunniga.

Isaste hiirte saliini lahuse temperatuuride vahe võrdlusel ei leitud olulisi muutusi (Joonis 9). C57BL/6 hiirtel vähendas reserpiin kehatemperatuuri vähem kui 129S6 hiirtel (umbes kaks kraadi vähem). Samuti erinesid liinid omavahel basaalse temperatuuri taastumise poolest. Kui C57BL/6 hiired olid katse lõpuks saavutanud peaaegu esialgse baaskehatemperatuuri väärtuse, siis 129S6 hiirtel jäi kehatemperatuur umbes neli kraadi madalamaks antud liini baas temperatuurist.



Joonis 9. Kehatemperatuuri vahe isaste C57BL/6 ja 129S6 hiirte saliini gruppidel RIH-is.

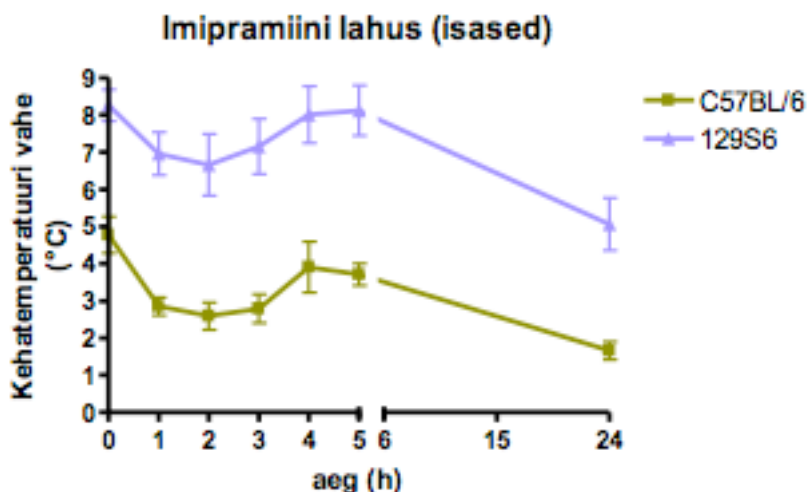
Emaste hiirte saliini lahuse gruppide puhul ei leitud olulisi muutusi temperatuuri vahes (Joonis 10). Reserpiini temperatuuri vähendav toime avaldus veidi tugevamalt 129S6 hiirtel (erinevus oli umbes kaks kraadi). C57BL/6 hiirtel indutseeris süstimisest tulenev stress mõningal määral temperatuuri vahe vähenemist. Temperatuuri vahede võrdlusel (ajamomendil 24 tundi pärast saliini lahuse süsti), esines mõlemal hiireliinil sarnane baas temperatuuri taastumiskiirus – temperatuuri vahed erinesid vaid kraadi võrra.



Joonis 10. Kehatemperatuuri vahe emaste C57BL/6 ja 129S6 hiirte saliini gruppidel RIH-is.

Isaste ja emaste saliini lahuse gruppide omavaheline võrdlus Tukey HSD testiga statistiliselt olulisi erinevusi ei näidanud. Siiski võis täheldada reserpiini hüpotermilise toime tugevamat mõju emastele hiirtele ning seda sõltumata liinist. Emaste ja isaste C57BL/6 saliini lahuse gruppide võrdlemisel oli näha temperatuuri vahe erinevat dünaamikat. Emaste C57BL/6 hiirte puhul esines saliini lahuse süstimise järgselt temperatuuri vahe langus, kuid isastel sellist efekti ei täheldatud (Joonis 9 ja 10). Samuti oli emaste C57BL/6 hiirte baastemperatuuri taastumine aeglasem kui sama hiireliini isastel. 129S6 isaste ja emaste saliini lahuse gruppide võrdluse korral ilmnnes, et emastel hiirtel vähenes kehatemperatuuri vahe järk-järgult nelja tunni jooksul, kuid isastel hiirtel vastupidiselt suurenes või ei muutunud antud parameeter samadel ajahetkedel (Joonis 9 ja 10). Baastemperatuuri taastumise kiirus oli aga mõlemal sool sarnane.

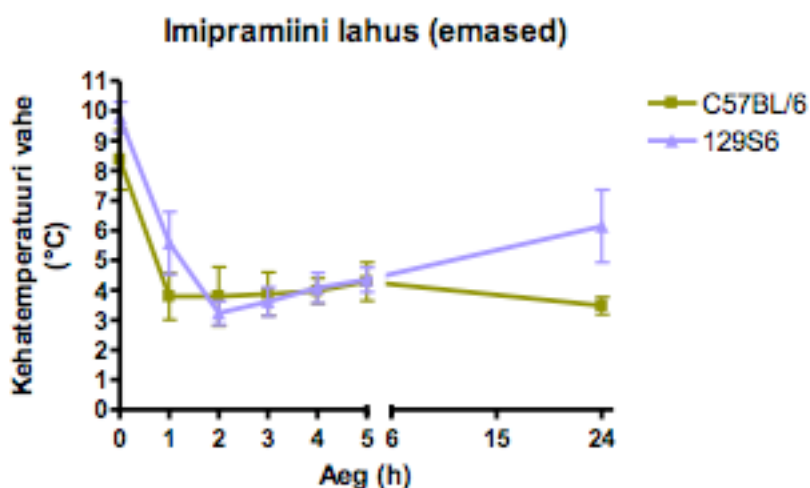
Isaste C57BL/6 ja 129S6 imipramiini gruppide võrdlemisel 18 tundi pärast reserpiini manustamist (ajamomendil 0 tundi) erines liinidevaheline temperatuuri vahe märkimisväärselt, olles 129S6 liinil kõrgem (reserpiin indutseeris oluliselt enam hüpotermiat 129S6 hiirtel kui C57BL/6 hiirtel) (Joonis 11). Teiste ajamomentide korral leiti samuti temperatuuri vahes statistiliselt oluline liinidevaheline erinevus. 24 tundi pärast imipramiini manustamist oli C57BL/6 hiirtel kehatemperatuur umbes kaks kraadi ja 129S6 hiirtel umbes viis kraadi madalam baastemperatuurist.



Joonis 11. Imipramiini (30 mg/kg) toime isaste C57BL/6 ja 129S6 hiirte kehatemperatuuri vahele RIH-is.

Emaste C57BL/6 ja 129S6 imipramiini gruppide võrdlemisel ajamomendil 0 tundi ei leitud olulisi erinevusi temperatuuri vahedes (Joonis 12). Järgnevate tundide puhul ei tuvastatud samuti statistiliselt olulisi erinevusi imipramiini toimes. Siiski võis liinide puhul märgata uuritava parameetri erinevat muutumiskäiku. Esimesel tunnil pärast imipramiini süsti esines

mõlema hiireliini puhul järsk temperatuuri tõus, mis jäi C57BL/6 hiirtel järgnevatel tundidel konstantseks, kuid 129S6 liini hiirtel toimus kehatemperatuuri vahe languse jätkumine ka tund pärast süsti, vähenedes veelgi umbes 2.5 kraadi. Teisest tunnist alates aga hakkas 129S6 imipramiini grupi kehatemperatuuri vahe jällegi suurenema, olles viimasel (24 h) mõõtmisel baastemperatuurist kuus kraadi madalam. C57BL/6 hiirte puhul oli samaks ajamomendiks toimunud väike kehatemperatuuri tõus, jäädes baastemperatuurist umbes neli kraadi madalamaks.



Joonis 12. Imipramiini (30 mg/kg) toime emaste C57BL/6 ja 129S6 hiirte kehatemperatuuri vahele RIH-is.

Isaste ja emaste imipramiini gruppide võrdluses statistiliselt olulisi erinevusi temperatuuri vahedes ei ilmnenud. Samas võib jooniste 11 ja 12 alusel täheldada uuritava parameetri erinevat dünaamikat eri sugudel. Emaste ja isaste C57BL/6 hiirte imipramiini gruppide temperatuuri vahe võrdlemisel on näha, et antidepressandil on emastele hiirtele oluliselt tugevam toime, kuna oluline temperatuuri vahe langus esines kõikidel ajamomentidel. Isastel C57BL/6 hiirtel oli märkimisväärne temperatuuri vahe muutus ainult kolmel ajamomendil (2, 3 ja 24 tunnil). Samas taastusid isased C57BL/6 hiired paremini hüpothermiast kui emased C57BL/6 hiired. Isased ja emased 129S6 hiired reageerisid imipramiinile vastandlikult. Kui emastel 129S6 hiirtel antagoniseeris antidepressant täielikult reserpiini hüpothermilise toime, siis isaste 129S6 hiirte puhul sellist efekti ei nähtud. Mõlema soo puhul oli baastemperatuuri taastumise kiirus sarnane.

2.4 Arutelu

Töö eesmärk oli uurida antidepressandi imipramiini toimet C57BL/6 ja 129S6 hiireliinidel “käitumuslikes meeleheite” testides ja “keemilise depressiooni mudelis”. Antud töö on

teadaolevalt ainuke, kus on võrreldud imipramiini poolt indutseeritud efekte C57BL/6 ja 129S6 hiirtel TST-s, FST-s ja RIH-is.

TST-s tuvastati isastel ja emastel C57BL/6 hiirtel statistiliselt erinev baasimmobiilsus. See tulemus on kooskõlas Liu ja Gershenfeld'i (2001) poolt avaldatud uuringu tulemustega, mis näitasid samuti emaste C57BL/6 hiirte oluliselt kõrgemat baasimmobiilsust. Järgnevalt leiti, et C57BL/6 hiired on imipramiini suhtes tundlikumad kui 129S6 hiired. C57BL/6 hiirtel esines anti-immobiilne toime kõikide (10-30 mg/kg) dooside korral ning seda mõlema soo puhul. 129S6 hiirtel toimus märkimisväärne immobiilsuse vähenemine alles 20 mg/kg ja 30 mg/kg dooside kasutamisel. Need tulemused on aga osaliselt vastuolus Liu ja Greshenfeld'i (2001) tööga. Nimelt ei leidnud nad oma uuringus, et imipramiini 30 mg/kg annus toimiks 129S6 hiirtele immobiilsust vähendavana. Selline lahknevus võib olla põhjustatud metodoloogilistest erinevustest.

Teises "käitumusliku meeleheite" testis, FST-s, leiti, et imipramiini anti-immobiilne toime ilmneb kõrgemate annuste puhul kui TST-s. Selline tulemus ühtib varasemate uuringutega, kus samuti tuvastati FST madalam tundlikkus antidepressantide suhtes (Ripoll et al., 2003; David et al., 2002). Käesolevas töös ilmnes imipramiini C57BL/6 hiirte puhul sooline erinevus. Kui emaste C57BL/6 hiirte immobiilsusele ei avaldanud ükski annus märkimisväärset mõju, siis isastel hiirtel põhjustasid 10 mg/kg ja 20 mg/kg doosid oluliselt antud parameetri alanemist. Kõrgeima (30 mg/kg) annuse manustamise korral aga kadus oluline anti-immobiilne efekt. Need leiud on kooskõlas Bai et al. (2001) tulemustega. Tema uurimisrühma poolt tehtud uuringus imipramiini (2.5-30mg/kg) toimest isastele C57BL/6 hiirtele, leiti, et immobiilsust vähendasid ainult 5-15 mg/kg annused, mis moodustasid „U-kujulise” doosikõvera (Bai et al., 2001). Seega, võrreldes TST tulemustega, kus avaldas toimet ka kõrgeim 30 mg/kg annus, ilmneb FST puhul imipramiini nõrgem toime isaste C57BL/6 hiirte käitumisele. 129S6 hiirte puhul ei omanud imipramiini ükski doos statistiliselt olulist mõju immobiilsusele.

Ehkki TST ja FST kuuluvad mõlemad "käitumusliku meeleheite" testide hulka, ei pruugi neurokeemilistel teguritel olla nendes testides identne toime. Näiteks uuringus, kus mõõdeti Swiss hiireliini aju monoamiinide ja nende metaboliitide kontsentratsiooni FST ja TST ajal, leiti, et TST puhul ei ilmnenu olulisi muutusi monoamiinide tasemes samas kui FST-s tõusis nii DA kui ka 5-HT tase (Renard et al., 2003). Käitumuslikult on Swiss hiired FST-s oluliselt immobiilsemad kui TST (7-kordne baasimmobiilsuse erinevus) (Bai et al., 2001). Käesolevas uuringus leitud umbes kahekordne baasimmobiilsuse erinevus isaste C57BL/6 hiirte puhul

võib samuti tuleneda neurokeemilistest erinevustest nendes testides. Ka liinidesisesed ning -vahelised võrdlusuuringud ravimite toimes lubavad arvata, et neurokeemilised rajad, mis mõjutavad käitumist FST-s ja TST-s, ei ole samasugused. Seda illustreerib hästi C57BL/6 ja Swiss hiirtega tehtud võrdlusuuring, kus imipramiini oli erinev toime nii liinisiselt kui ka -vaheliselt (Bai et al., 2001). Erinevus imipramiini toimes võib tuleneda nii farmakokineetilistest (näiteks imipramiini ja/või tema aktiivsete metaboliitide kontsentratsioonide erinevustest) kui ka farmakodünaamilistest (näiteks retseptorite ja signaaliülekanne mehhanismide erinevustest) faktoritest. Siiski üks tõenäolisemaid seletusi imipramiini toime käitumuslikest erinevustest hiirtel on võimalik erinevus 5-HT ja NA transporterite ekspressioonis, kuna imipramiini immobiilsust vähendav toime arvatakse olevat vahendatud just nende transporterite kaudu (Preskorn, 2000).

Sugudevahelises võrdluses leiti, et emastel hiirtel sõltumata liinist on käitumuslikes testides kõrgem baasimmobiilsus kui isastel hiirtel. Selle põhjuseks võib olla 5-HT-ergiliste neuronite madalam aktiivsus dorsaalses raphe tuumas, mis võib emastel närilistel olla kuni 41% madalam. Samuti esineb emastel närilistel vähenenud 5-HT süntees, olles lausa neli korda madalam (Klink et al., 2002). Sellised sugudevahelised erinevused serotoniinergilise süsteemi aktiivsuses, võivad seletada ka imipramiini erinevat toimet FST-s.

RIH-is põhjustas reserpiin (1 mg/kg) kõigil hiirtel kehatemperatuuri alanemist. Tugevam hüpothermiline toime esines 129S6 liinil. Reserpiini tugevam toime 129 liinile võib kõige tõenäolisemalt tuleneda vesikulaarse monoamiini transporterite muutunud aktiivsusest, kuna see transporter on peamine märklaud reserpiinile (Gros ja Schuldiner, 2010). Imipramiini (30 mg/kg) manustamine antagoniseeris kõikide liinide emastel hiirtel oluliselt reserpiini toime. Isastel hiirtel ilmnes imipramiini antagoniseeriv efekt ainult C57BL/6 hiirte puhul. C57BL/6 hiirte temperatuuri taastumine oli peaaegu täielik, kuid 129S6 liini isenditel jäi aga temperatuur umbes viis kraadi madalamaks baas temperatuurist. Przegaliński et al. (1983) uuringust on selgunud, et tritsükliliste antidepressantide poolt antagoniseeritud hüpothermia sõltub noradrenergiliste mehhanismide aktivatsioonist ning efekt on vahendatud alfa-1-, beeta-adrenoretseptorite ja postsünaptiliste alfa-2-adrenoretseptorite poolt. Seetõttu võib oletada, et antud uuringus leitud liinivälised ja -sisesed erinevused imipramiini anti-hüpothermilises toimes võivad tuleneda erinevast NA-ergilise süsteemi aktiivsusest.

Kokkuvõtteks võib öelda, et imipramiin omab toimet nii 129S6 kui C57BL/6 hiirtel, kuid see varieerub soo ja testi kaupa. Emaste 129S6 hiirte puhul avaldus antidepressandi toime TST-s ja RIH-s, isastel ainult TST-s. C57BL/6 hiirte puhul selgus, et isased hiired reageerisid

imipramiinile kõigis kolmes testis, emaste C57BL/6 puhul tuvastati oluline käitumise muutus TST-s ja RIH-s. Hinnates imipramiini immobiilsust vähendavat toimet liinide vahel, selgus et C57BL/6 hiired on soost sõltumata selle farmakoni suhtes tundlikumad kui 129S6 hiired.

KOKKUVÕTE

Depressioon on raske ja mitmekülgne haigus, mis mõjutab paljude inimeste tervist. Antidepressandid vähendavad depressiooni sümptomeid, kuid see toimub pikema aja jooksul. Tritsüklilist antidepressanti, imipramiini, on kasutatatud depressiooni ravis väga pikka aega.

Käesolevas töös uuriti imipramiini toimet kahel erineval hiireliinil, kes erinevad üksteisest käitumuslikul tasandil. Uuriti nii emaseid kui ka isaseid 129S6 ja C57BL/6 hiiri. Kokku oli uuringus 130 hiirt, keda kõiki kasutati kolmes testis. Imipramiini toimet hinnati kahes “käitumusliku meeleheite” testis (sundujumise ja sabast riputamise testis) ning ühes “keemilise depressiooni mudelis” (reserpiini-indutseeritud hüpotermia testis).

Sabast riputamise testis (TST-s) ilmnes nii emastel kui ka isastel C57BL/6 ja 129S6 hiirtel imipramiini immobiilsust vähendav toime. C57BL/6 hiirtel omas antidepressant antud parameetrile toimet madalama annuse korral kui 129S6 hiirtel.

Sundujumise testis (FST-s) ei ilmnenud imipramiinil nii tugevat toimet kui TST-s. Põhjuseks võib olla antud testi madalam tundlikkus antidepressantidele, kuna statistiliselt omasid olulist mõju vaid isastel C57BL/6 hiirtel 10 mg/kg ja 20 mg/kg imipramiini doosid.

Erinev tundlikkus imipramiini toime suhtes käitumuslikes testides võib tuleneda farmakokineetiliste ja –dünaamiliste tegurite erinevustest. Suure tõenäosusega just serotoniini ja noradrenaliini transporterite ekspressiooni erinevusest.

Reserpiini-indutseeritud hüpotermia testis (RIH-is) omas imipramiin tugevamat efekti mõlema liini emastele hiirtele, antagoniseerides oluliselt enam reserpiini hüpotermilist toimet. Isastele 129S6 hiirtele ei avaldanud imipramiin anti-hüpotermilist toimet. Põhjus võib olla seotud liinide ja/või sugude NA-ergilise süsteemi erineva aktiivsusega (Przegaliński et al., 1983).

Antud töös ilmnes antidepressandi imipramiini toime C57BL/6 ja 129S6 hiireliinidel, kuid see mõju sõltus testist ja hiireliinist. Järgmise etapina oleks vaja viia läbi võrdlusuuringud selektiivsete 5-HT ja NA-tagasihaarde inhibiitoritega, selgitamaks nende transmitterainete rolli immobiilsele käitumisele C57BL/6 ja 129S6 liinide puhul. Saadud tulemuste alusel võiks järgnevalt läbi viia valgu- ja geeniekspressiooni uuringud.

SUMMARY

The comparison of 129S6 and C57BL/6 mice in different depression tests.

Anna-Liisa Lorenz

Depression is a common and complex disease that is influencing about one fifth of the population. Women are affected about twice as much as men. Due to the fact that the reasons for depression are not well-known, there have been many studies about the causes and effectiveness of antidepressants. One of the main explanations for the appearance of depression is the lack of monoamines in the brain, mainly serotonin and noradrenaline. Most of the studies have been done on animal models, especially on rodents.

In this study, two mice strains were used – 129S6 and C57BL/6. C57BL/6 is a wide-used laboratory mice. C57BL/6 mice are more active and less anxious, while 129S6 have higher anxiety with decreased locomotor activity. These mice have been used in various studies, but to our knowledge there have not been a thorough comparison of antidepressant effects on them.

Imipramine, which inhibits the activity of noradrenergic and serotonergic transporters, has been used for treating depression for a long time. This tricyclic antidepressant has been proven to be very efficient.

The aim of this study was to assess the difference in the impact of imipramine on 129S6 and C57BL/6 strains. The evaluation was done in two behavioural despair tests (tail suspension test and forced swimming test) and one chemical depression model (reserpine-induced hypothermia test).

In the tail suspension test (TST) mice were put in unescapable situation by suspending them by tail. Imipramine decreased the immobility in both mouse strains. The effect of reducing immobility was shown on C57BL/6 mice in all doses (10-30 mg/kg), while on 129S6 mice only 20 mg/kg and 30 mg/kg doses were effective. This might have been caused by the different expression level of the monoamine transporters.

In another behavioural despair test, forced swim test (FST), imipramine had smaller impact on the decreasing of immobility. It is well known that FST is less sensitive test than TST. In FST, mice were also put in unescapable situation by placing them in a cylinder filled with

water. In this test the only doses that had a statistical influence on immobility were 10 mg/kg and 20 mg/kg and only on male C57BL/6 mice. There were no statistically significant influences by any doses on 129S6 (both sexes) and on female C57BL/6.

The different sensitivity of imipramine on mice in behavioural despair tests might come from the differences of pharmacokinetic or –dynamical factors. Most probably from the different expression of serotonin and noradrenaline transporters.

In reserpine-induced hypothermia test mice were injected reserpine (1 mg/kg) and 18 hours later imipramine (30 mg/kg). Both strains of female mice responded to the antagonising effect of imipramine very well. Imipramine did not induce the anti-hypothermic effect on male 129S6 mice. It might have been caused by noradrenergic system difference in different mouse strains.

In the given work, the imipramine was effective on both C57BL/6 and 129S6 mice, however the impact of imipramine varied throughout the tests and strains. The following step should include comparison studies with selective serotonin and noradrenaline re-uptake inhibitors to explain the role of these transmitters on the immobility of C57BL/6 and 129S6 strains. Based on the received findings, protein and gene expression should be carried through.

TÄNUAVALDUSED

Avaldan eriti suurt tänu oma juhendajatele Sirli Rauale ja Kersti Lillevälile töö koostamisel ja katsete planeerimisel. Tänan abi eest Maarja Loometsa ja Riin Reimetsa katsete läbiviimisel.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Abbas G., Naqvi S., Dar A. (2012). Comparison of monoamine reuptake inhibitors for the immobility time and serotonin levels in the hippocampus and plasma of sub-chronically forced swim stressed rats. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25: 441-445.
- [2] Abramov U. 2008. Sex and environmental factors determine the behavioural phenotype of mice lacking CCK₂ receptors: implications for the behavioural studies in transgenic lines, p 19-24. *Tartu Ülikooli Kirjastus*.
- [3] Abramov U., Puussaar T., Raud S., Kurrikoff K., Vasar E. (2008). The behavioural differences between C57BL/6 and 129Sv mice are reproducible in mice reared in distinct environmental conditions. *Neurosci. Lett.* 443: 223-227.
- [4] Askew B.M. (1963). A simple screening procedure for imipramine-like antidepressant agents. *Life Sci., Oxford.* 10: 725-730.
- [5] Bai F., Li X., Clay M., Lindstrom T., Skolnick P. (2001). Intra- and interstrain differences in models of "behavioural despair". *Pharmacol Biochem Behav.* 70: 187-192.
- [6] Berrocoso E., Ikeda K., Sora I., Uhl G.R., Sánchez-Blázquez P., Mico J.A. (2013). Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 16: 151-162.
- [7] Bourin M., Poncelet M., Chermat R., Simon P. (1983). The value of the reserpine test in psychopharmacology. *Arzneimittelforschung.* 33: 1173-6.
- [8] Carola V., D'Olimpio F., Brunamonti E., Bevilacqua A., Renzi P., Mangia F. (2003). Anxiety-related behavior in C57BL/6 BALB/c chimeric mice. *Behavioural Brain Research.* 150: 25-32.
- [9] Castagné V., Porsolt R.D., Moser P. (2009). Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *European Journal of Pharmacology.* 616: 128-133.
- [10] Cervo L., Canetta A., Calcagno E., Burbassi S., Sacchetti G., Caccica S., Fracasso C., Albani D., Forloni G., Invernizzi R.W. (2005). Genotype-dependent activity of tryptophan hydroxylase-2 determines the response to citalopram in a mouse model of depression. *J*

Neurosci. 25: 165-72.

[11] Colla A.R.S., Machado D.G., Bettio L.E.B., Colla G., Magina M.D.A., Brighente I.M.C., Rodrigues A.L.S. (2012). Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 143: 720-731.

[12] Cook M.N., Bolivar V., McFadyen M.P., Flaherty L. (2002). Behavioral differences among 129 substrains: Implications for knockout and transgenic mice. *Behavioral Neuroscience*. 116: 600-611.

[13] Crowley J.J., Blendy J.A., Lucki I. (2005). Strain-dependent antidepressant-like effects of citalopram in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology*. 183: 257-264.

[14] Cryan J.F., Markou A., Lucki I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*. 23: 238-45.

[15] Cryan J.F., Mombereau C. (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry*. 9: 326-357.

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

[17] Dalvi A., Lucki I. (1999). Murine models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 147: 14-6.

[18] David D.J., Renard C.E., Jolliet P., Hascoët M., Bourin M. (2003). Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 166: 373-82.

[19] Delgado P.L., Moreno F.A. (2000). Role of norepinephrine in depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 61: 5-12.

[20] Duman C.H. (2010). Models of depression. *Vitamins and Hormones*. 82: 1-21.

[21] El-Sisi S.F.I. (2011). Evaluation of the antidepressant like effect for some natural supplements against reserpine induced behavioral depression in mice. *Nature and Science*. 9: 125-136.

- [22] Gardier M. (2009). Mutant mouse models and antidepressant drug research: focus on serotonin and brain-derived neurotrophic factor. *Behavioural Pharmacology*. 20: 18-32.
- [23] Geyer M.A., Markou A. 2000. The role of preclinical models in the development of psychotropic drugs, p. 445. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Lippincott Williams & Wilkins. New York, USA.
- [24] Gold P.W., Licinio J., Pavlatou M.G. (2013). Pathological parainflammation and endoplasmic reticulum stress in depression: potential translational targets through the CNS insulin, klotho and PPAR- γ systems. *Molecular Psychiatry*. 18: 154-165.
- [25] Gros Y., Schuldiner S., (2010). Directed Evolution Reveals Hidden Properties of VMAT, a Neurotransmitter Transporter. *Journal of Biological Chemistry*. 285: 5076-5084
- [26] Grünbach M. 2012. WFS1-puudulikkusega hiire serotoniinergilise süsteemi uurimine. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
- [27] Hascoët M., Bourin M., Bradwejn J. (1991). Behavioral models in mice. Implication of the alpha noradrenergic system. *Prog Neuro-Psychopharmacol and Biol Psychiat*. 15: 825-840.
- [28] Hindmarch I. (2002). Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *Eur Psychiatry*. 3: 294-9.
- [29] Hinz M., Stein A., Uncini T. (2012). Discrediting the monoamine hypothesis. *Int J Gen Med*. 5: 135-142.
- [30] Jacobson L.H., Cryan J.F. (2007). Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behaviour in mice: A review. *Behav Genet*. 37: 171-213.
- [31] Kahn R.J., McNair D.M., Lipman R.S., Covi L., Rickels K., Downing R., Fisher S., Frankenthaler L.M. (1986). Imipramine and chlordiazepoxide in depressive and anxiety disorders. II. Efficacy in anxious outpatients. *Arch Gen Psychiatry*. 43: 79-85.
- [32] Klink P., Robichaud M., Debonnel G. (2002). Gender and gonadal status of modulation of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons. Part I: Effects of gender and pregnancy. *Neuropharmacology*. 43: 1119-28.
- [33] Lawless M. (2001). Nocturnal Enuresis: current concepts. *Pediatrics in Review*. 22: 399-

407.

- [34] Lepicard E.M., Joubert C., Hagneau I., Perez-Diaz F., Chapouthier G. (2000). Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 67: 739-748.
- [35] Liu X., Gershenfeld H.K. (2001). Genetic Differences in the Tail-Suspension Test and Its Relationship to Imipramine Response among 11 Inbred Strains of Mice. *Biol Psychiatry*. 49: 575-81.
- [36] Lopez-Munoz F., Alamo C. 2012. Neurobiology of depression, p. 134-136. *Frontiers in Neuroscience*. CRC Press Inc. Florida, USA.
- [37] Lucki I., Dalvi A., Mayorga A.J. (2001). Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 155: 315-322.
- [38] Mayorga A.J., Lucki I. (2001). Limitations on the use of C57BL/6 mouse in the tail suspension test. *Psychopharmacology*. 155: 110-112.
- [39] McKinney W.T. (2001). Overview of the past contributions in animal models and their changing place in psychiatry. *Semin Clin Psychiatry*. 6: 68-78.
- [40] Meyer J.S., Quenzer L.F. 2004. *Psychopharmacology. Drugs, the brain, and behaviour*, p. 392. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA, USA.
- [41] Mohrbacher N., Hofstetter J., Mayeda A. 2011. *Biological Rhythm Research*, p. 299-302. Assessment time affects the outcome of the tail suspension test. Taylor and Francis Ltd. Indianapolis, IN, USA.
- [42] Nestler E.J., Barrot M., DiLeone R.J., Eisch A.J., Gold S.J., Monteggia L.M. (2002). Neurobiology of Depression. *Neuron*. 34: 13-25.
- [43] Pati D., Pandey D.K., Mahesh R., Jhadav V.K.H.R. (2010). Anti-depressant-like activity of *Mucuna Pruriens*; A traditional Indian herb in rodent models of depression. *Pharmacologyonline*. 1: 537-551.
- [44] Petit-Demouliere B., Chenu F., Bourin M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 177: 245-55.

- [45] Porsolt R.D., Chemat R., Lenégre A., Avril I., Janvier S., Stéru L. (1987). Use of the automated tail suspension test for the primary screening of psychotropic agents. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 288: 11-30.
- [46] Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M. (1977). Depression: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 266: 730-732.
- [47] Preskorn S.H. (2000). Imipramine, Mirtazapine and Nefazodone: Multiple Targets. *Journal of Practical Psychiatry and Behavioral Health.* 6: 97-102.
- [48] Przegaliński E., Siwanowicz J., Baran L., Bigajska K. (1983). Antagonism by tricyclic antidepressants of reserpine-induced hypothermia in mice. Involvement of postsynaptic alpha-2-adrenoreceptors. *Pol J Pharmacol Pharm.* 35: 309-17.
- [49] Renard C.E., Dailly E., David D.J.P, Hascoët M., Bourin M. (2003). Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 17: 449-455.
- [50] Ripoll, N., David, D. J., Dailly, E., Hascoët, M., and Bourin, M. (2003). Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behav. Brain Res.* 143: 193–200.
- [51] Rodgers R.J., Boullier E., Chatzimichalaki P., Cooper G.D., Shorten A. (2002). Contrasting phenotypes of C57BL/6J^{OlaHsd}, 129S2/Sv^{Hsd} and 129/Sv^{Ev} mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour. *Physiology & Behaviour.* 77: 301-310.
- [52] Schildkraut J.J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 7: 524–533.
- [53] Siever L.J., Davis K.L. (1985). Overview: toward a dysregulation hypothesis of depression. *Am J Psychiatry.* 142: 1017-31.
- [54] Slattery D.A., Cryan J.F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.* 7: 1009-14.
- [55] Srinath R., Pinkal D.V., Saravanan J., Pravin S.J., Prashant R., Aravind S. (2010). Synthesis and evaluation of anti-depressant like activity of some novel thieno 1,2,3 – triazine 4 – ones. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 1: 143-150.
- [56] Torres G.E., Gainetdinov R.R., Caron M.G. (2003). Plasma membrane monoamine

transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci.* 4: 13-25.

[57] Võikar V., Kõks S., Vasar E., Rauvala H. (2001). Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiology & Behaviour.* 72: 271-281.

[58] Wasik A., Mozdzeń E., Romańska I., Michaluk J., Antkiewicz-Michaluk L. (2013). Antidepressant-like activity of the endogenous amine, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in the behavioral despair test in the rat, and its neurochemical correlates: A comparison with the classical antidepressant, imipramine. *European Journal of Pharmacology.* 700: 110-117.

[59] Wasserman D. 2011. *Depression.* Second edition. p. 12-14, 100. Oxford University Press Inc. New York, USA.

[60] Weiss J.M., Kilts C.D. 1998. Animal models of depression and schizophrenia, p. 89-131. *The American Psychiatric Press textbook of psychopharmacology.* American Psychiatric Press. Washington, DC, USA.

[61] Willner P., Mitchell P.J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol.* 13: 169-88.

[62] Wong M.-L., Licinio J. (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews Neuroscience.* 2: 343-351.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

[1] Hall R. 1998. Theories of Depression.
http://web.mst.edu/~rhall/neuroscience/07_disorders/depression_theory.pdf

[2] Taconic. Revised Nomenclature for Strain 129 Mice.
<http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=424>

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anna-Liisa Lorenz

(sünnikuupäev: 17.04.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose 129S6 ja C57BL/6 hiireliinide võrdlusuuring erinevates depressioonitestides, mille juhendajad on Sirli Raud ja Kersti Lilleväli
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.13