

# Eesti koolinoorte 45. bioloogiaolümpiaad

## Praktiline töö – loomade käitumise uurimine



Eesnimi: .....

Perekonnanimi: .....

Kool: .....

Klass: .....

Õpetaja:.....

Teie ees on praktilise töö juhend koos küsimustega. Täitke töö käigus tabelid ning vastake seejärel küsimustele. Vastused kirjutage juhendisse, küsimuste juurde jäetud lünkadesse. NB! Mõned küsimused nõuavad jah-ei vastust, mõne puhul tuleb oma otsust põhjendada.

### Jõudu tööle!

Käesoleva töö eesmärgiks on hinnata mitmesuguste ainete toimet loomade ärevusele, hirmule ja depressiooni seisundile nende käitumise vaatlemise kaudu. Õpilastel tuleb hiirtega tehtud katseid videofilmilt jälgida, neid protokollida ja tulemusi analüüsida.

Katseid on neli ja nende abil määratakse:

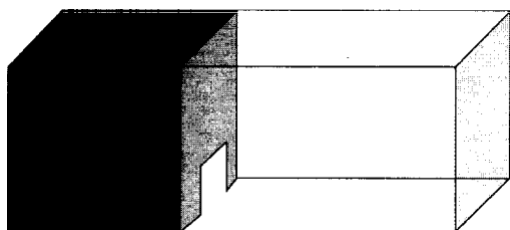
1. ravimi antidepressiivne toime,
2. ravimi toime ärevusreaktsioonile
3. ravimi toime liikumisaktiivsusele – NB! puudub video, katse on eelnevalt protokollitud
4. ravimi toime koordineerimisele

Ravimite antidepressiivse toime uurimiseks kasutatakse Porsolt'i testi. Katse põhimõte seisneb selles, et väiksesse, veega täidetud klaasanumasse asetatud katseloom loobub mõne aja järel aktiivsest ujumisest ja jääb veepinnale hulpima (loomal tekib depressioon). Antidepressiivsed ained pikendavad oluliselt aktiivse ujumise (väljapääsu otsimise) aega.

Katse läbimisel tuleb silmas pidada seda, et loomade liikumisaktiivsust suurendavad ained võivad anda valepositiivse tulemuse.

Katseloomade ärevusreaktsioonide hindamiseks kasutatakse katseseadet, mida nimetatakse hele-tume puur. Selle abil saab uurida ravimite ärevust vähendavat (anksiolüütilist) või ärevust suurendavat (anksiogeenset) toimet ja ärevuse mehhanisme. Hele-tume puur põhineb hiirte ja rottide loomulikul kartusel heleda ja avara paiga ees ja sellele kartusele vastanduval uudishimul. Ärevust vähendavad (anksiolüütilised) ained pikendavad puuri kaitsmata osades viibimise aega.

Katseloomadena kasutatakse hiiri. 5. minuti jooksul mõõdetakse katselooma poolt heledas pooles veedetud aeg ning käikude arv puuri poolte vahel.



Joonis 1. Hele-tume puur

Katseloomade liikumisaktiivsuse (lokomotsiooni) määramine.

Paljud ravimid mõjutavad katseloomade liikumisaktiivsust, mis võib põhjustada valepositiivseid või valenegatiivseid tulemusi teistes katsetes, kus uuritakse käitumist. Seetõttu on oluline teada erinevate ainete toimet loomade liikumisaktiivsusele. **Moti-boks** kujutab endast loomade liikumisaktiivsuse määramise automatiseeritud süsteemi. Katse objektiks on hiired või rotid, kelle liikumisaktiivsust määratakse ruudukujulise põhjaga kastis, kuhu on horisontaal- ja vertikaaltasapinda paigutatud andurid. Süsteemis saab mõõta nii looma liikumisaktiivsust kasti põrandal kui liikumisi vertikaalsuunas (püstitõusmine, hüppamine).

NB! Käesolevas ülesandes videofilmi ei analüüsita, liikumisaktiivsuse hindamine toimub katseandmete eel-täidetud tabeli abil.

Katseloomade koordinatsiooni uurimine.

Mitmed ained võivad mõjutada katseloomade lihastoonust, koordinatsiooni ja tasakaalu, neid reaktsioone saab uurida katseseadme abil, mida nimetatakse **rotarodiks**. Rotarod on väikese diameetriga horisontaalne pöörlev silinder, millel püsimiseks peab katseloom liikuma. Tavaliselt vajavad katseloomad 2- 4 treeningut, et nad püsiks rotarodil kogu testi aja. Järgnevalt registreeritakse aeg looma esimese kukkumiseni ja kukkumiste arv 2 minuti jooksul. Ravimid, mis muudavad loomade lihastoonust, häirivad koordinatsiooni või tasakaalumeelt, lühendavad aega esimese kukkumiseni ja suurendavad kukkumiste arvu.

### **Katses kasutatavad ravimid**

#### **Imipramiin:**

Esimene tritsüklilistest antidepressantidest, mis võeti kasutusele juba 1950 aastal. Klassikaline antidepressant, pikka aega olnud kasutusel kui standard ravim. Tänapäeva kliinilises praktikas ei kasutata enam esimese valiku ravimina. On näidustatud raskete meeleoluhäirete, depressiooni teise valiku ravimina. Lisaks kasutatakse imipramiini ka migreeni, krooniliste valusündroomide, paanikahäirete, unehäirete ja öise uriinipidamatuse raviskeemides.

Imipramiin parandab kesknärvisüsteemis serotoniinergilist ja noradrenaliinergilist närviülekanne pidurdades nende neuromediaatorite tagasivõtmist presünapsitesse.

#### **Diazepaam:**

Teine bensodiazepiinide ritta kuuluv preparaat, mis võeti kasutusele 1963 aastal. Diazepaamil on tugev närviülekanne pidurdav, ärevust ja hirmu leevendav (anksiolüütiline), krambivastane, uinutav, skeletilihaseid lõõgastav ja unustamist soodustav toime.

Diazepaami molekul seostub GAVH (?-aminovõihappe) A tüüpi retseptoriga ja soodustab selle retseptori loomuliku ligandi GAVH seostumist sellega. Selle retseptori näol on tegemist ionikanal-retseptoriga ja GAVH seostumisel sellega suureneb Cl<sup>-</sup> ionide sissevool läbi selle kanali närvirakku sisse. See suurendab selle neuroni pidurdust, kuna suureneb selle närviraku membraani polariseeritus ja aktsioonipotentsiaali vallandumise tõenäosus sellelt membraanilt väheneb.

#### **TRIM**

Selektiivne neuronaaalse NO-süntaasi inhibiitor. Üldtoimetest on vähe teada, kliinilises praktikas kasutusel ei ole.

NO on elusorganismides universaalne signaalmolekul.

Närvikoes reguleerib NO:

- Neurotransmitterite vabanemist
- Rakkude diferentseerumist
- Rakkude regenereerumist

## Töö nr. 1 Antidepressiivsete ainete toime uurimine Porsolt'i testiga

**Katse objektiks** on isased hiired, kes on vastavalt neile manustatud ainetele jaotatud 3 gruppi (vt. Tabel 1). Testi (ühe hiire ujumise) kestus on 6 minutit. Vaatlused tehakse videolindile salvestatud katsete alusel.

### Töö käik

Mõõta stopperiga hulpimise kestus, s.o. summaarne aeg, mille jooksul hiir testi viimase 4 minuti jooksul aktiivselt ei uju, vaid hulbib, püüdes lihtsalt veepinnal püsida. Andmed kanda tabelisse 1.

Tabel nr. 1 Katseloomadele intraperitoneaalselt süstitud ained ja katsetulemused

### Küsimused

1. Kas TRIM-il on selles katses antidepressiivne toime?

Hiir nr.	Manustatud aine	Hulpimise kestus (s)
3	0,9 % NaCl lahus (kontroll)	
9	Imipramiin 15 mg/kg i. p. (tritsükliline antidepressant - standard)	
2	TRIM 50 mg/kg i. p. (selektiivne neuronaaalse NO süntaasi inhibiitor)	

2. Põhjendada oma seisukohta aine toime iseloomustamisel

## Töö nr 2. Katseloomade ärevusreaktsioonide hindamine hele-tume puuri abil

**Katseobjektiks** on isased hiired, kes on vastavalt neile manustatud ainetele jaotatud 3 gruppi (vt. tabel nr. 2). Vaatlused tehakse videolindile salvestatud katsete alusel.

### Töö käik

Katse kestab 5 minutit, mille jooksul tuleb mõõta:

1. puuri heledas osas viibimise aeg,
2. käikude arv puuri kahe poole vahel.

Hiir loetakse sisenenuks puuri ühte poolde, kui kõik 4 käppa on vastaval poolel. Tulemused kanda tabelisse nr. 2.

Tabel 2 Katseloomadele süstitud ained ja ärevusreaktsiooni hindamise tulemused

Hiir nr.	Manustatud aine	Puuri heledas pooles viibimise aeg(s)	Käikude arv
1	0,9 % NaCl lahus (kontroll)		
7	Diasepaam 0.5 mg/kg i. p. (standardne bensodiasepiini tüüpi anksiolüütikum)		
2	TRIM 50 mg/kg i.p.		

### Küsimused

3. Kas TRIM-il on antud katses ärevust vähendav toime?
4. Kas leitud efekt võib olla põhjustatud mittespetsiifilisest liikumisaktiivsuse muutusest?

### Töö nr. 3 Hiirte liikumisaktiivsuse mõõtmine katseseadme Moti-boks abil

Porsolt'i testis osalenud loomade liikumisaktiivsus on eelnevalt mõõdetud 10 minuti jooksul süsteemi Moti-boks abil ja tulemused on kantud tabelisse nr. 3. Vaatlused tehti videolindile salvestatud katsete alusel.

NB! Seda katset õpilastele videolindilt ei demonstreerita, küsimustele vastamiseks vajalikud andmed leiad eel-täidetud tabelist.

Tabel 3. Katseloomadele süstitud ained ja liikumisaktiivsuse mõõtmise tulemused

Hiir nr.	Manustatud aine	Distsants (m)	Tagakäppadele tõusude arv
3	0,9 % NaCl lahus	14,1	4
9	Imipramiin 15 mg/kg	27,5	7
2	TRIM 50 mg/kg	38,0	15
1	0,9 % NaCl lahus	62,5	127

### Küsimused

5. Kas katsetulemuste alusel võib järeldada, et mõni kasutatud ravimitest muutis hiirte liikumisaktiivsust?

#### Töö nr. 4. Hiirte koordinatsiooni uurimine rotarodil

**Katseobjektiks** on isased hiired, kes on vastavalt neile manustatud ainetele jaotatud 3 gruppi (vt. tabel nr. 4). Vaatlused tehakse videolindile salvestatud katsete alusel.

#### Töö käik

Katse kestab 2 minutit, mille jooksul tuleb mõõta:

1. aeg esimese kukkumiseni,
2. kukkumiste arv.

Kukkumiste arvu loetakse kuni 10. kukkumiseni. Kui loom ei suuda seadmel püsida, kasutada kukkumiste arvuna 10.

Tabel 4 Diasepaami erinevate annuste toime hiirte koordinatsioonile

Manustatud aine	Hiir 1		Hiir 2		Hiir 3		Keskmine	
	aeg (s)	kukkumisi	aeg (s)	kukkumisi	aeg (s)	kukkumisi	aeg (s)	kukkumisi
0,9 % NaCl i.p.								
Diasepaam 1 mg/kg								
Diasepaam 5mg/kg								

#### Küsimused

6. Arvutada, mitu kukkumist tuleb iga uuringugrupi kohta keskmiselt ja milline on rotarodil püsimise aeg grupis keskmiselt ning kanna tulemused tabelisse
7. Kuidas mõjutab diasepaam loomade koordinatsiooni?

8. Kas koordinatsiooni mõjutav toime sõltub diasepaami doosist?

9. Diasepaami toimel suureneb närvirakkude membraanide juhtivus Cl<sup>-</sup> ionide suhtes. Selle tulemusena rakumembraani puhkepotentsiaal muutub ja aktsioonipotentsiaali vallandumise tõenäosus nendelt membraanidelt väheneb. Aktsioonipotentsiaali vallandumine erutuva koe rakumembraanilt tähendab selle membraani:

(tähistage õige vastus)

- depolariseerumist
- hüperpolariseerumist
- repolariseerumist
- polariseerumist

10. Mis on vale positiivne tulemus?

11. Mis on vale negatiivne tulemus?

12. Mida tähendab negatiivne kontroll katses?

13. Mida tähendab positiivne kontroll katses?

14. Kas katse planeerimisel oleks alati vaja leida sobilik positiivne ja negatiivne kontroll või ei ole see alati oluline?