



Laura Kaljala

Metabotrooppisen glutamaattireseptorin rooli morfiinin vaikutuksessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

24.10.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Laura Kaljala
Otsikko:	Metabotrooppisen glutamaattireseptorin rooli morfiinin vaikutuksessa
Sivumäärä:	25 sivua + 9 liitettä
Aika:	24.10.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	-
Ohjaajat:	Dosentti Teemu Aitta-aho Lehtori Jarmo Palm

Morfiini sitoutuu ja aktivoi spesifisiä opiaattireseptoreita, jotka osallistuvat eri aivotointojen hallintaan. LY341495 on tutkimuskäyttöön kehitetty lääkeaine, joka toimii selektiivisenä antagonistina ryhmän II metabotrooppisille glutamaattireseptoreille. Tutkimuksessa käytettiin c-Fosia hermosolujen aktiivisuuden markkerina. Tuloksia analysoitiin tilastollisilla testeillä.

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian osastolla osana neurofarmakologista tutkimusta. Opinnäytetyössä tutkittiin selektiivisen antagonistin LY341495:n vaikutusta huumemuistin, toleranssin sekä vieroitusoireiden syntyyn ja LY341495:n vaikutusta aivosolujen aktivaatioon. Tutkimuksessa käytettiin addiktion eläinmalleja ja koe-eläiminä käytettiin C57BL/6J-villityyppihiirikantaa.

Tutkimustyön laajuuden ansiosta saatujen mittaustulosten määrä oli suuri, minkä johdosta saadut tulokset olivat luotettavia. Tulosten perusteella LY341495 vaikuttaa estävästi huumemuistin syntymiseen. Morfiinin toleranssia se ei kuitenkaan vähennä, eikä se lisää tai vähennä vieroitusoireita. LY341495:n selkeä estävä vaikutus huumemuistin syntyyn mahdollistaa, että sille voisi olla jatkossa käyttöä addiktio tutkimuksessa.

Avainsanat: glutamaattireseptori, morfiini, c-Fos, addiktio, LY341495

Abstract

Author: Laura Kaljala
Title: Role of the Metabotropic Glutamate Receptor in the Action of Morphine
Number of Pages: 25 pages + 9 appendices
Date: 24 October 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major: -
Supervisors: Teemu Aitta-aho, University Lecturer
Jarmo Palm, Senior Lecturer

Morphine binds to and activates specific opiate receptors that are involved in the control of various brain functions. LY341495 is a drug developed for research use that acts as a selective antagonist for group II metabotropic glutamate receptors.

The thesis work was conducted at the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of the University of Helsinki, as part of neuropharmacological research. The aim was to study the effect of LY341495 on the generation of drug memory, tolerance and withdrawal symptoms, and the effect of LY341495 on the activation of brain cells. Animal models of addiction were used in the study, and the C57BL/6J wild-type mouse strain was used as experimental animals. The study used c-Fos as a marker of neuronal activity. The results were analyzed with statistical tests.

Due to the scope of the research, the amount of data obtained was large, which made the results reliable. Based on the results, LY341495 has an inhibitory effect on the generation of drug memory. However, it does not reduce the tolerance of morphine, nor does it increase or decrease withdrawal symptoms. The clear inhibitory effect of LY341495 on the generation of drug memory enables it to be used in addiction research in the future.

Keywords: glutamate receptor, morphine, c-Fos, addiction, LY341495

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	1
2.1	Addiktio	1
2.1.1	Addiktiotutkimuksen tärkeys	2
2.1.2	Toleranssi	2
2.1.3	Vieroitusoireet	3
2.2	Addiktion eläinmallit	3
2.3	Opioidijärjestelmä ja morfiini	4
2.3.1	Elimistön opioidijärjestelmä	4
2.3.2	Opioidireseptorit	4
2.3.3	Opioidit lääkkeenä ja huumeina	5
2.3.4	Morfiini	6
2.3.5	Naloksoni	7
2.4	Glutamaattijärjestelmä	8
2.4.1	Glutamaatti	8
2.4.2	Glutamaattireseptorit	8
2.4.3	mGlu3	8
2.4.4	LY341495	9
2.5	c-Fos hermosolujen aktivaation mittarina	9
3	Tutkimusmenetelmien kuvaus	10
3.1	Huumemuistikoe	10
3.2	Toleranssikoe	13
3.3	Vieroitusoireet	14
3.4	c-Fos-vasta-ainevärjäys, kuvaus ja aktiivisuuden määrittäminen	14
4	Tulokset	18
4.1	Huumemuistikoe	18
4.2	Toleranssikoe	19
4.3	Vieroitusoireet	21
4.4	Hermosolujen aktiivisuus	22

Liitteet

Liite 1. c-Fos-protokolla

Liite 2. Huumemuistikokeen tulokset

Liite 3. Toleranssikokeen tulokset

Liite 4. Vieroitusoireiden pisteytykset

Liite 5. Aktiivisten solujen laskennalliset tulokset

Liite 6. Huumemuistikokeen tilastoanalyysi

Liite 7. Toleranssikokeen tilastoanalyysi

Liite 8. Vieroitusoireiden tilastoanalyysi

Liite 9. Aktiivisten solujen tilastoanalyysi

Lyhenteet

ANOVA	Analysis of variance. Varianssianalyysi.
ATP	Adenosiinitrifosfaatti. Tärkeä osa solun energiataloudessa: käytetään energian siirtoon ja lyhytaikaiseen varastointiin.
cAMP	Syklinen adenosiinimonofosfaatti. Adenosiinitrifosfaatin johdannainen, jonka muodostumista ATP:stä katalysoi adenylaattisyklaasi-entsyymi.
c-Fos	Cellular homologue of the retroviral oncogene v-Fos. Proto-onkogeeni.
GABA	Gamma-aminovoihappo. Hermoston inhibitorinen välittäjäaine.
LY	LY341495. Tutkimuskäyttöön kehitetty lääkeaine, joka toimii selektiivisenä antagonistina ryhmän II metabotrooppisille glutamaattireseptoreille (C ₂₀ H ₁₉ NO ₅).
mGlu	Metabotrooppinen glutamaattireseptori.
MOR	Morfiini. (C ₁₇ H ₁₉ NO ₃) opiaattialkaloidi, jota saadaan eristämällä oopiumunikosta.
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid. Lähetti-RNA.
SAL	Saliini. Fysiologinen suolaliuos (NaCl 0,9 %).

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian osastolla Biomedicumissa osana neurofarmakologista tutkimusta. Farmakologian osaston tutkimustyö painottuu keskushermoston farmakologiaan, sydän- ja verenkiertoelimistön farmakologiaan, regeneratiiviseen farmakologiaan sekä suoliston fysiologiaan. Farmakologian osasto tarjoaa farmakologian perusopetusta sekä valinnaista opetusta lääketieteellisessä tiedekunnassa. [1.]

Opinnäytetyössä tutkittiin selektiivisen antagonistin LY341495:n vaikutusta huumemuistin, toleranssin sekä vieroitusoireiden syntyyn ja LY341495:n vaikutusta aivosolujen aktivaatioon. Tutkimuksessa käytettiin addiktion eläinmalleja ja koe-eläiminä käytettiin C57BL/6J-villityyppihiirikantaa.

Nykyinen käsitys riippuvuuden mekanismeista perustuu neurofarmakologisen tutkimuksen tuloksiin. Riippuvuuden synty edellyttää sitä, että käyttäjä saa riippuvuuden kohteesta palkitsevan vaikutuksen (esimerkiksi opiaatista saatava hyvänolon tunne). Geneettiset alttiustekijät ja elinympäristö voivat vaikuttaa riippuvuuden syntyyn, mutta riippuvuus vaatii aina altistuksen riippuvuuden kohteelle. [2, luku 21.]

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Addiktio

Addiktio eli riippuvuus on kroonisesti uusiutuva sairaus, jolle on tunnusomaista pakonomainen addiktion kohteen tarve/käyttö, kontrollin menetys käyttömäärien suhteen sekä negatiivinen emotionaalinen tila (esimerkiksi ahdistuneisuus ja ärtyneisyys), kun addiktion kohteen saanti on estetty. Riippuvuuden muodostuminen addiktion kohteeseen edellyttää sitä, että addiktion kohde tuottaa mielihyvää. Mitä nopeammin kohde tuottaa mielihyvää, sitä helpommin riippuvuus syntyy. Riippuvuudelle altistavat myös perinnölliset tekijät sekä sosiaalinen

oppiminen, mutta ne eivät kuitenkaan itsessään tuota riippuvuutta. Huumausaineiden jatkuvaan käyttöön voi liittyä myös sosiaalinen riippuvuus, joka tarkoittaa huumausaineiden käytön ympärille rakentunutta kaveripiiriä. Päihteiden ja huumausaineiden pitkäaikainen käyttö saattaa aiheuttaa muutoksia aivojen toiminnassa, mikä tekee käytön omaehtoisen lopettamisen erittäin vaikeaksi. [3, luku 1; 4.]

2.1.1 Addiktio tutkimuksen tärkeys

Addiktio vähentää ihmisen hyvinvointia ja heikentää elämänhallintaa, minkä myötä riippuvuus voi ottaa entistä vahvemman otteen henkilön elämästä. Riippuvuuden kohteesta muodostuu elämän keskipiste kaiken muun kustannuksella. Addiktiosta aiheutuva sosiaalinen haitta on merkittävä. Henkilön terveet ihmissuhteet kariutuvat ja tilalle tulee yksinäisyys tai samoin toimivia ihmisiä, toisia addikteja. Addiktion seurauksena voi aiheutua riitaisuutta tai vihan tunnetta muita ihmisiä kohtaan. Myös fyysisesti raskaat vieroitusoireet aiheuttavat henkistä pahoinvointia. Riippuvuudesta seuraa usein fyysisiä, psyykkisiä, sosiaalisia, terveydellisiä ja taloudellisia ongelmia. Nämä ongelmat kohdistuvat myös henkilön lähipiiriin ja esimerkiksi henkilön kykyyn huolehtia lapsistaan. Negatiivisista seurauksista huolimatta henkilö ei välttämättä pysty muuttamaan käytöstään. Riippuvuudet ja niiden hoito sekä oheissairauksien hoito lisäävät terveydenhuollon kustannuksia yhteiskunnalle. Tämän lisäksi riippuvaiset käyttäjät saattavat aiheuttaa alueellista rauhattomuutta, turvattomuutta sekä järjestyshäiriöitä. [5; 6.]

2.1.2 Toleranssi

Päihde- ja huumausaineiden jatkuva käyttö johtaa sietokyvyn kasvuun eli toleranssin syntymiseen. Esimerkiksi opiaattien kohdalla jatkuva käyttö voi johtaa jopa kymmenkertaiseen sietokykyyn, jolloin henkilö käyttää niin suurta annosta, että se olisi tottumattomalle kuolettavaa. Sietokyvyn nouseminen aiheuttaa käyttöannosten kasvamisen, kun sama määrä ainetta ei enää tuota toivottua oloa kuten aiemmin. Jatkuvan käytön aiheuttama toleranssi ja suuret

käyttömäärät tekevät lopettamisesta vaikeaa, mikä entisestään syventää riippuvuutta. Annosten noustessa myös yliannostuksen riski kasvaa. [7.]

2.1.3 Vieroitusoireet

Vieroitusoireet ovat psyykkisiä tai fyysisiä oireita, jotka johtuvat riippuvuutta aiheuttavan aineen säännöllisen käytön lopettamisesta. Riippuvaisen henkilön elimistö on tottunut riippuvuutta aiheuttavan aineen tuomaan olotilaan, jolloin aineen poistuminen elimistöstä voi aiheuttaa erilaisia vieroitusoireita. Tavallisimpia psyykkisiä oireita ovat masentuneisuus, ahdistuneisuus sekä unihäiriöt. Fyysisiin vieroitusoireisiin kuuluu esimerkiksi vapina, hikoilu, sydämen tykytys, päänsärky, pahoinvointi ja jopa kouristukset. Lopetettaessa esimerkiksi alkoholin, opiaattien tai rauhoittavien lääkkeiden käytön vieroitusoireet voivat olla hyvin voimakkaita. Psykostimulanttien tai nikotiinin käytön lopettamisesta johtuvat vieroitusoireet voivat olla lievempiä ja hallusinogeenien tai kannabistuotteiden vieroitusoireet hyvin lieviä tai jopa olemattomia. Luonteeltaan vieroitusoireet ovat ohimeneviä, mutta toisinaan vaikeat oireet voivat vaatia hoitoa. [7.]

2.2 Addiktion eläinmallit

Eläinmallit ovat tärkeitä riippuvuuden muodostumiseen vaikuttavien neurofarmakologisten mekanismien ymmärryksessä. Vaikka riippuvuudesta ei ole olemassa täydellisiä eläinmalleja, eläinmalleja on olemassa monille oireyhtymän elementeille. Eläinmallia voidaan pitää kokeellisena menetelmänä, joka on kehitetty tutkimaan tiettyä ihmisessä esiintyvää ilmiötä. Eläinmallien luotettavuus perustuu menetelmien toistettavuuteen ja kokeeseen vaikuttavien olosuhteiden hallittavuuteen. Koe-eläimet ovat keskenään (saman kannan sisällä) geneettisesti lähes identtisiä, jolloin yksilöiden välinen vaihtelu on pientä. Tehtäessä tieteellistä tutkimusta dataa tarvitaan paljon, jotta tulokset ja niistä tehdyt johtopäätökset olisivat luotettavia. Eläinmalleja kehitetään ja käytetään, koska lainsäädännön ja eettisyyden kannalta moniakaan tutkimuksia ei pystyttäisi toteuttamaan ihmisillä eikä keinotekoisista vaihtoehtoa useinkaan ole. Usein koe-eläimet joudutaan lopettamaan kokeen päätyttyä esimerkiksi kudoksenäytteiden tai elinten

keräämiseksi. Pienten koe-eläinten, kuten hiirten, metabolia on hyvin nopea verrattuna ihmiseen, mikä saattaa vaikeuttaa lyhytaikaisesti vaikuttavien aineiden tutkimista. Toisaalta nopeasta metaboliasta voi olla myös hyötyä esimerkiksi lääkeaineen vaikutuksen lakatessa nopeammin (vähemmän päällekkäistä vaikutusta esimerkiksi peräkkäisinä koepäivinä). [3, luku 2.]

2.3 Opioidijärjestelmä ja morfiini

Opioideihin kuuluvat endogeeniset opioidipeptidit, opioidialkaloidit sekä puolisynnteettiset ja synteettiset opioidit [2, luku 8].

2.3.1 Elimistön opioidijärjestelmä

Elimistön omilla opioidipeptideillä eli endorfiineilla on morfiinin kaltaisia farmakologisia ominaisuuksia. Endorfiinit voivat sitoutua opioidien reseptoreihin, ja niillä voi olla opioidien kaltaisia vaikutuksia solutasolla sekä kokonaisen eliön tasolla. Opioidipeptidit hyperpolarisoivat hermosoluja lisäämällä K^+ -kanavien toimintaa ja vähentävät solunsisäisen Ca^{2+} :n määrää. Tämä vähentää solujen erityis- ja supistusaktiivisuutta sekä estää cAMP:n muodostusta. Endorfiinien on arveltu osallistuvan muistin, emootioiden, muiden korkeampien aivotointojen, motorii-kan, kivuntunnon, kouristusherkkyyden, ruumiinlämmön, syömisen, juomisen, maha-suolikanavan toiminnan, immuunijärjestelmän ja hormonierityksen säätelyyn. Opioidipeptidit jaetaan kolmeen pääluokkaan: enkefaliinit, dynorfiinit ja β -endorfiinit. Ne pilkkoutuvat isoista prohormoneista proenkefaliinista, prodynorfiinista ja pro-opiomelanokortiinista (POMC). Lisäksi on joitakin kolmeen pääluokkaan kuulumattomia ja rakenteeltaan erilaisia peptidejä (mm. demorfiini, endomorfiinit). [2, luku 8.]

2.3.2 Opioidireseptorit

Opioidireseptoreita on löydetty kolmenlaisia: μ -, δ -, κ -opioidireseptorit. Tämän lisäksi opioidireseptoreita on kloonattu neljää eri tyyppiä: MOR, DOR, KOR ja ORL1. Opioidireseptorit kytkeytyvät G-proteiineihin monien muiden

peptidivälittäjäaineiden reseptorien tavoin. Niiden toistolähettilävaikutukset välittyvät estävien G_i - ja G_o -kaltaisten G-proteiinien kautta. Ihmisellä opioidireseptoripitoisuuksista suurimmat löytyvät aivojen keskiharmalta alueelta, talamuksen mediaalisista ja intralaminaarisista tumakkeista, striatumista, amygdalasta, temporaalisesta ja prefrontaalisesta aivokuorelta sekä singulaarisella aivokuorelta ja nucleus caudatuksesta. Myös aivosillan alueelta, ydinjatkoksesta ja pikkuaivoista löytyy opioidireseptoreita. Primaarisella somatosensorisella aivokuorella on vähiten opioidireseptoreita. Myös ääreishermostossa on runsaasti erilaisia opioidireseptoreja. [2, luvut 8 ja 18.]

2.3.3 Opioidit lääkkeenä ja huumeina

Opioideja käytetään voimakkaan kudonvauriosta aiheutuvan kivun hoitoon annosteltuna kivun voimakkuuden mukaan. Analgesia (kiputunnottomuus), heikentyneet refleksit, hengityslama, mielialavaikutukset (hyvänolontunne, anksiolyyssi eli ahdistuksen lieventyminen), suun kuivuminen sekä ummetus ovat opioidien vaikutuksia. Analgeettisen vaikutuksen arvellaan johtuvan reseptorien välittämän Ca^{2+} -kanavien eston aiheuttamaan nosiseptiivisten välittäjäaineiden estoon selkäytimen tasolla sekä niiden ja K^+ -kanavien aktivaation välittämään hermosolujen hyperpolarisaatioon aivojen ja selkäytimen tasolla. Opioidireseptorit ilmentyvät myös presynaptisesti ja estävät GABA:n vapautumista interneuroneista. Tämä on niin sanotusti disinhibition mekanismi, jolla opioidit vähentävät aivorungon laskevien kipuaistimusta säätevien ratojen toimintaa sekä aktivoivat ventraalisten keskiaivojen toimintaa, mikä vaikuttaa riippuvuuden syntymekanismiin. Opioidit ovat voimakkaasti riippuvuutta aiheuttavia päihde- ja lääkkeitä. Jatkuvässä käytössä käyttäjälle kehittyy toleranssi, jolloin käyttömäärät kasvavat. Taulukossa 1 on esitetty muutamia yleisesti tunnettuja opioideja ja niiden käyttötarkoituksia. [2, luku 18.]

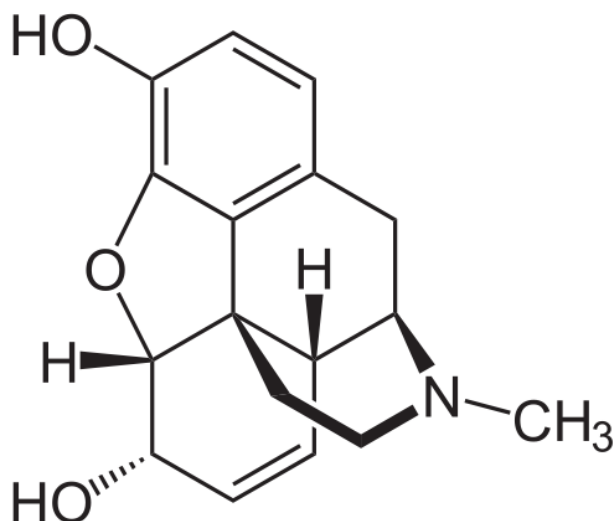
Taulukko 1. Esimerkkejä opioideista ja niiden käyttötarkoituksia.

Opioidit		Käyttö
Oopiumalkaloidit	morfiini	voimakkaan kivun hoito
	kodeiini	kipulääke, yskänlääke, huumausaine
Puolisynnteettiset	heroiini	kivunlievitys, huumausaine
	buprenorfiini	kivunlievitys, korvaus- ja vieroitushoito, huumausaine
	oksikodoni	voimakkaan kivun hoito, huumausaine
Synnteettiset	fentanyyli	anestesian yhteydessä, voimakkaan kivun hoito, huumausaine
	metadoni	kivunlievitys, vieroitus, korvaushoito
	tramadoli	kohtalaisen ja kohtalaisen vaikean kivun hoitoon
	loperamidi	ripulilääke "Imodium"

Suomessa eniten väärinkäytetty opioidi on buprenorfiini, jonka laillinen käyttötarkoitus on korvaushoitolääke. Opioidiriippuvuus on yleisin syy Suomessa päihdehoitoon hakeutumiselle. [8.]

2.3.4 Morfiini

Morfiini ($C_{17}H_{19}NO_3$) on opiaattialkaloidi, jota saadaan eristämällä sitä oopiumunikosta (*Papaver somniferum*) tai syntetisoimalla sitä. Morfiinin kemiallinen rakenne on esitetty kuvassa 1.

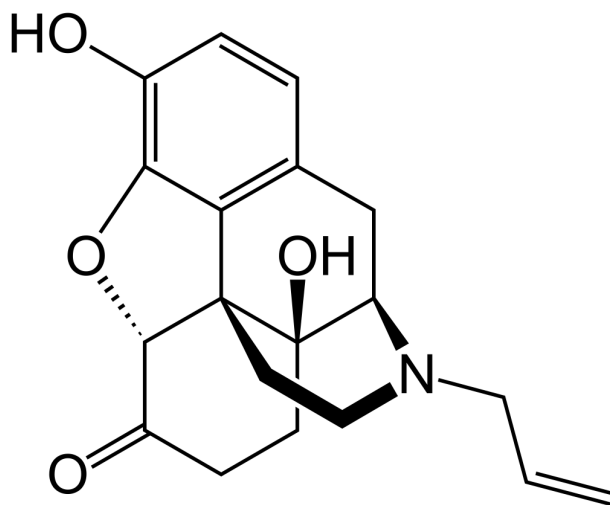


Kuva 1. Morfiinin kemiallinen rakenne. [9.]

Morfiini sitoutuu ja aktivoi spesifisiä opiaattireseptoreita, jotka osallistuvat eri aivo toimintojen hallintaan. Keskushermostossa ja ruoansulatuskanavassa morfiinilla on laaja-alaisia vaikutuksia, kuten analgesia (kiputunnottomuus), ahdistuksen lievitys, euforia, sedaatio, hengityslama sekä ruoansulatuskanavan lamaan tuminen (ummetus). Morfiini on huonosti rasvaliukoinen, joten sen vaikutus alkaa hitaammin kuin muiden opioidien. Morfiinia käytetään lääketieteellisesti voimakkaan kivun hoidossa. Herkkyys morfiinille on yksilöllinen, joten yksilöllinen annostelu kivunhoidossa on tärkeää. Morfiinin yliannostuksen vasta-aine on naloksoni. [2, luku 18; 10.]

2.3.5 Naloksoni

Naloksoni ($C_{19}H_{21}NO_4$) on opioidiantagonisti, joka estää opioidien vaikutukset opioidireseptoreihin. Naloksonilla voidaan kumota opioidiyliannostuksen aiheuttamat oireet ja se metaboloituu nopeasti maksassa. [2, luku 18.] Kuvassa 2 on esitettyä naloksonin kemiallinen rakenne.



Kuva 2. Naloksonin kemiallinen rakenne. [11.]

Naloksonin on todettu aiheuttavan hyperalgesiaa (kipuherkkyys) tilanteissa, joissa endogeeninen opioidianalgesia on aktivoitunut (esimerkiksi kirurgisen toimenpiteen jälkeen). Naloksoni on syntetisoitu tebaiinista (paramorfiini). [2, luku 18.]

2.4 Glutamaattijärjestelmä

2.4.1 Glutamaatti

Hapan aminohappo välittäjäaine glutamaatti on tärkeä aivojen toiminnalle, ja sitä tavataan suurina pitoisuuksina eri osissa aivoja. Aivojen kemiallisesta tiedonsiirrosta hermosolusta toiseen välittävät aminohapot. Glutamaatti toimii kiihdyttävänä välittäjäaineena monissa pitkissä hermoradoissa. Glutamaatti on ei-välttämätön aminohappo, joka ei läpäise veri-aivoestettä, ja se on syntetisoitava neuroneissa paikallisista esiasteista. Yleisin glutamaatin esiaste synaptisissa päätteissä on glutamiini. Glutamiini vapautuu gliasoluista, ja kun se on esisynaptisissa terminaaleissa, se metaboloituu glutamaatiksi mitokondrioiden glutaminaasientsyymin vaikutuksesta. [2, luku 8; 12, luku 6.]

2.4.2 Glutamaattireseptorit

Glutamaatti sitoutuu AMPA-, NMDA- ja kainaatireseptoreihin, joiden rakenne koostuu suuresta solunulkoisesta osasta, portista sekä pienestä solunsisäisestä osasta. Glutamaattireseptorien läpäisevyys natriumille ja kaliumille lisääntyy glutamaatin sitoutuessa niihin. NMDA-reseptorit ovat vähiten ioniselektiivisiä, joten ne läpäisevät myös kalsiumia. Ionotrooppisten glutamaattireseptorien lisäksi on olemassa kolmen tyyppisiä metabotrooppisia glutamaattireseptoreita (mGlu). Ne jaetaan kolmeen ryhmään. Ryhmä I sisältää mGlu1- ja mGlu5-reseptorin alatyypit, ryhmä II mGlu2- ja mGlu3-reseptorin alatyypit sekä ryhmä III mGlu4/6/7/8-reseptorin alatyypit. Nämä reseptorit eroavat toisistaan kytkentänsä suhteen solunsisäisiin lähettämiin ja herkkyytensä farmakologisille aineille. Monien näiden reseptorien aktivoituminen johtaa postsynaptisten Ca^{2+} - ja Na^{+} -kanavien estämiseen. [2, luku 2; 12, luku 7.]

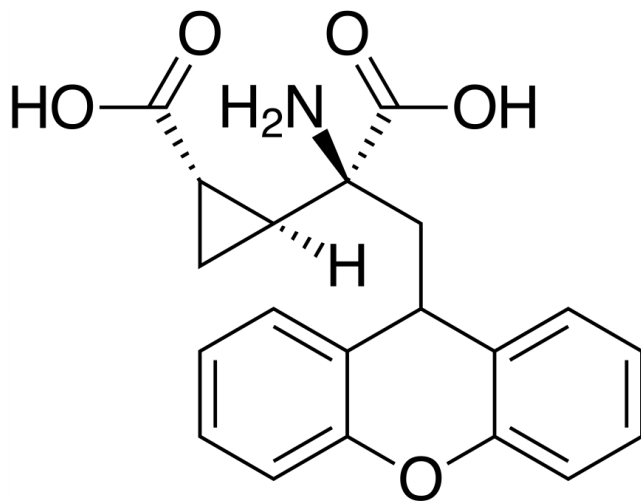
2.4.3 mGlu3

mGlu3-reseptorin mRNA:n ja proteiinin ilmentymistä on havaittu oligodendrogliaalisissa progenitorisoluissa ja erilaistuneissa oligodendrosyyteissä.

Normaalissa aivokuoressa, väliseinässä ja caudate putamenissa, oligodendrosyytit osoittavat mGlu3-reseptorin mRNA:n ilmentymisen homogeenista jakautumista, joka lisääntyi vaurioituneissa aivoissa. Ryhmän II agonisteja on käytetty paniikkikohtauksien ja ahdistuneisuushäiriön hoitoon. Vaikka mGlu-reseptoriliigandien anksiolyyttisen vaikutuksen mekanismia ei ole täysin selvitetty, vaikutus johtunee lisääntyneen glutamatergisen virittyneisyyden vaimenemiseen aivosynapseissa, jotka liittyvät pelkoon ja ahdistuneisuuteen. [13.]

2.4.4 LY341495

LY341495 (C₂₀H₁₉NO₅) on lääkeyhtiö Eli Lillyn tutkimuskäyttöön kehittämä lääkeaine, joka toimii selektiivisenä antagonistina ryhmän II metabotropisille glutamaattireseptoreille. Kuvassa 3 on esitetty LY341495:n kemiallinen rakenne. [14.]



Kuva 3. Antagonisti LY341495:n kemiallinen rakenne [15.]

2.5 c-Fos hermosolujen aktivaation mittarina

c-Fos on välittömän varhaisen vasteen geeni, joka osallistuu solujen lisääntymiseen ja erilaistumiseen solunulkoisten ärsykkeiden jälkeen, kun taas sen säätelyn purkaminen on yhdistetty onkogeeneihin eli syöpiin liittyvään etenemiseen. Proto-onkogeeni c-Fosin mRNA- ja proteiinitasot indusoituvat nopeasti, mutta

ohimenevästi ärsykkeiden vaikutuksesta. Siksi c-Fosia käytetään hermosolujen aktiivisuuden markkerina (maksimissaan 1,5 h tapahtuman jälkeen), ja se on liitetty useisiin hermo- ja käyttäytymisvasteisiin akuutin ärsykkeen ilmentymisessä. c-Fosin ilmeneminen hermosoluissa kalvojen depolarisaation vaikutuksesta riippuu kalsiumionien sisään virtauksesta jänniteohjatun kalsiumkanavan kautta. Normaalisti c-Fos ekspressoituu suuressa määrässä soluja eri aivoalueilla, jolloin c-Fosia voidaan käyttää yleisesti hermosolujen aktivaation tutkimisessa. [16.]

3 Tutkimusmenetelmien kuvaus

3.1 Huumemuistikoe

Hiirien huumemuistia tutkittiin käyttäytymiskokeella, jossa hiirien sijaintia videoitiin ja EthoVision-ohjelmalla analysoitiin kunkin hiiren kulkemaa matkaa. Kokeessa käytettiin fysiologista suolaliuosta (saliini), morfiini- sekä LY341495-injektioita, jotka annettiin eri lattiamateriaaleilla. Huumemuistin syntymisen lisäksi tarkoituksena oli myös selvittää, onko antagonistilla LY341495:llä vaikutusta huumemuistin syntymiseen. Huumemuistikoe toteutettiin kuvan 4 aikataulun mukaan.

Taulukko 2. Huumemuistikokeen ryhmien saamat injektiot eri päivinä (kuva 4).

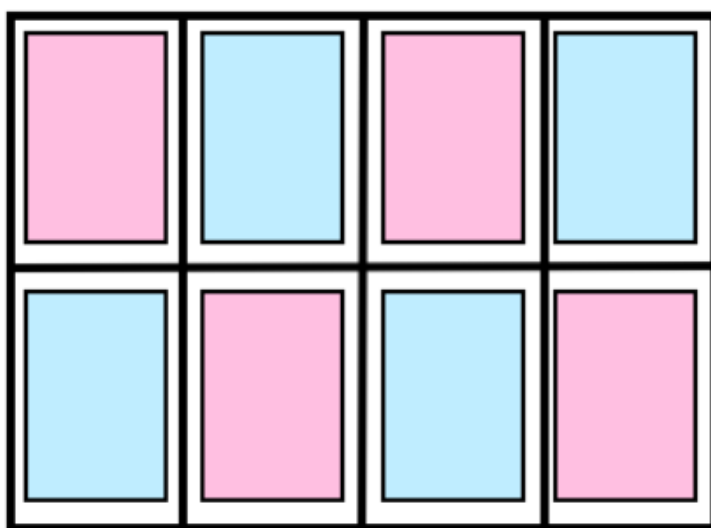
Ryhmä	A		B	
	1. injektio	2. injektio	1. injektio	2. injektio
1	vehikkeli	saliini	vehikkeli	morfiini
2	vehikkeli	saliini	LY	saliini
3	LY	saliini	LY	morfiini
4	vehikkeli	saliini	vehikkeli	saliini

Kokeessa hiiret jaettiin neljään ryhmään, jotka saivat eri injektioyhdistelmiä taulukon 2 mukaan. Ryhmän 4 hiiret toimivat kokeen kontrolleina. Kokeessa oli mukana 40 hiirtä, ja koetilanteeseen otettiin kerrallaan kahdeksan hiirtä. Jokainen koetilanne kesti 30 minuuttia.

MA	TI	KE	TO	PE	LA	SU
					Totutus	1. koepäivä A
2. koepäivä B	3. koepäivä A	4. koepäivä B				1. testi

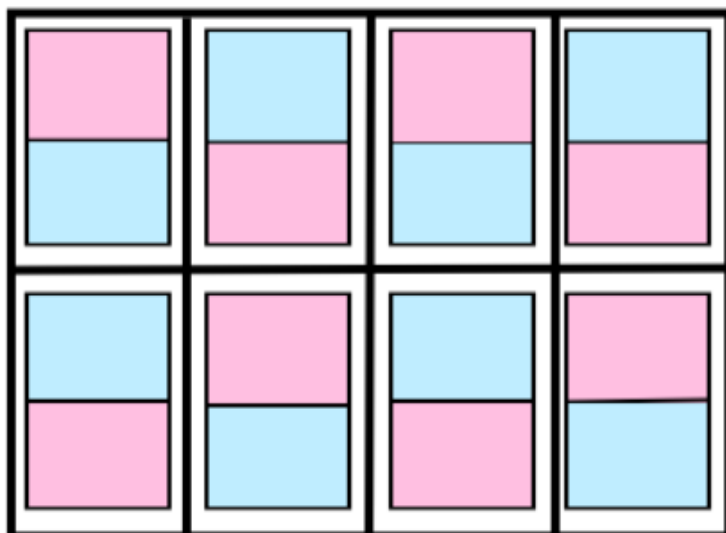
Kuva 4. Huumemuistikokeen toteutusaikataulu. A/B injektiot selitetty taulukossa 2.

Hiiriä ehdollistettiin koepäivinä yhdistämään tietty lattiamateriaali (kuva 5) morfiinin tuomaan hyvään oloon. Kokeessa käytettiin lattiamateriaaleina vaaleanpu-naista aaltoilevaa raidallista kylpyhuonemattoa sekä vaaleansinistä täplikästä kylpyhuonemattoa, joiden tuntumaeron hiiret tunnistivat. Saliinia (NaCl 0,9 %) hiiret saivat eri alustalla kuin morfiinia. Koepäivinä hiiret saivat vuoropäivin A tai B -injektiot kuvan 4 aikataulun mukaan.



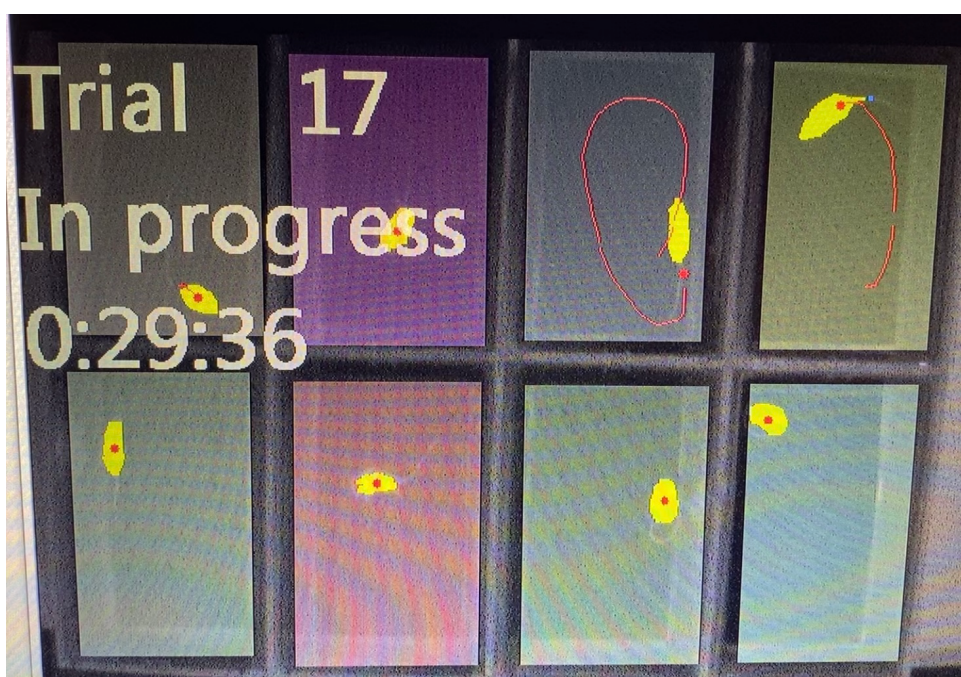
Kuva 5. Koepäivinä koelaatikoissa oli vain toista lattiamateriaalia.

Testipäivinä koelaatikossa (kuva 6) hiirillä oli molempia lattiamateriaaleja ja Et-hoVision-ohjelma (kuva 7) laski matkan lisäksi eri lattiamateriaaleilla vietetyn ajan sekunneissa. Hiirten odotettiin viihtyvän paremmin materiaalilla, jolla olivat aiemmin saaneet morfiinia.



Kuva 6. Testipäivän koelaatikoissa oli kumpaakin lattiamateriaalia.

EthoVision-ohjelmassa keltaiset pikselit merkitsevät analysoitavaa kohdetta ja punaiset pikselit kohteen perässä merkitsevät kohteen sijaintia viisi sekuntia aiemmin.



Kuva 7. EthoVision-ohjelma analysoi hiirten liikettä testilaatikoissa (kuvassa ehdollistumisvaihe).

Huumemuistikokeessa käytettiin 20 mg/kg suuruisia morfiini-injektioita ja 3 mg/kg suuruisia LY341495-injektioita.

3.2 Toleranssikoe

Toleranssikokeessa oli neljä testiryhmää, yhteensä 40 hiirtä, jotka saivat viikon ajan kahdesti päivässä taulukon 3 mukaiset injektiot.

Taulukko 3. Testiryhmien saamat lääkeaineinjektiot.

testiryhmä	1. injektio	2. injektio
1	vehikkeli	saliini
2	LY	saliini
3	vehikkeli	morfiini
4	LY	morfiini

Toleranssin syntymistä testattiin kiputuntotestillä Hot plate analgesia meter -laitteistolla +52 °C:ssa. Ennen koetta hiiriä totutettiin koetilanteeseen, jotta uudesta ympäristöstä aiheutuva stressi ei myötävaikuttanut tuloksiin. Ensimmäinen kiputuntotesti tehtiin ennen kroonista altistusta, jotta saatiin lähtöarvot (baseline), joihin lopullisia tuloksia verrattiin. Kiputuntotestissä aluksi mitattiin ensimmäinen lähtöarvo ja 15 minuuttia myöhemmin toinen lähtöarvo, jonka jälkeen hiiri sai saliini-injektion. 30 minuuttia injektioista suoritettiin analgesiamittaus, jonka jälkeen hiiri sai pitoisuudeltaan 10 mg/kg morfiini-injektion. Tästä injektioista 30 ja 60 minuutin kuluttua suoritettiin ensimmäinen ja toinen analgesiamittaus. Analgesiamittauksissa mitattiin aikaa, kauanko kuluu ennen kuin hiiri alkaa näyttää epämukavuuden merkkejä tassuja ravistelemalla. Muita epämukavuuden merkkejä olivat kurkottelu ja turkin sukiminen. Toleranssikoe suoritettiin sokkoutettuna, sillä epämukavuuden merkkien tulkinta vaati tutkijalta objektiivista tulkintaa.

3.3 Vieroitusoireet

Kroonisesti morfiinia saaneen hiiren vieroitusoireet syntyvät, kun hermoston altistus huumausaineelle äkkiä lakkaa. Vieroitusoireet voivat olla sekä fyysisiä että psyykkisiä. Tutkimuksessa tutkittiin fyysisesti ilmeneviä oireita. Kiputuntotestin jälkeen kroonisesti morfiinia saaneet hiiret saivat 90 mg/kg annoksen morfiinia (annokset yhteensä 100 mg/kg) ja salinia saaneet hiiret saivat salinia. Kahden tunnin jälkeen hiiret saivat naloksonia, jonka aiheuttamat vieroitusoireet videoitiin (15 min). Videot analysoitiin tarkkaillen tyypillisimpiä vieroitusoireita ja jokaisen hiiren oireet pisteytettiin.

Taulukko 4. Analysoidut vieroitusoireet

Vieroitusoire	Arvo
Kaivaminen (ei/kyllä)	0/1
Venyttely	0/1
"Märkä koira" ravistelu	0/1
Tassuilla "leipominen"	0/1
Pään nykiminen	0/1
Kehon vääntelehtiminen	0/1
Silmien ummistaminen	0/1
Karvojen pystyyn nousu	0/1
"Peruutus"	0/1
Vieroitusasento	0/1
Tassujen vapina	0/1
Ripuli (ei/vähän/paljon)	0/1/2
Hypyt	lkm

Hiiret ilmentävät vieroitusoireita monella tavalla (taulukko 4), mutta selkeimpinä merkkeinä oli voimakas hyppiminen sekä ripuli. Vieroitusoireiden analysointi toteutettiin sokkoutettuna, jotta analyysi olisi mahdollisimman objektiivinen.

3.4 c-Fos-vasta-ainevärjäys, kuvaus ja aktiivisuuden määrittäminen

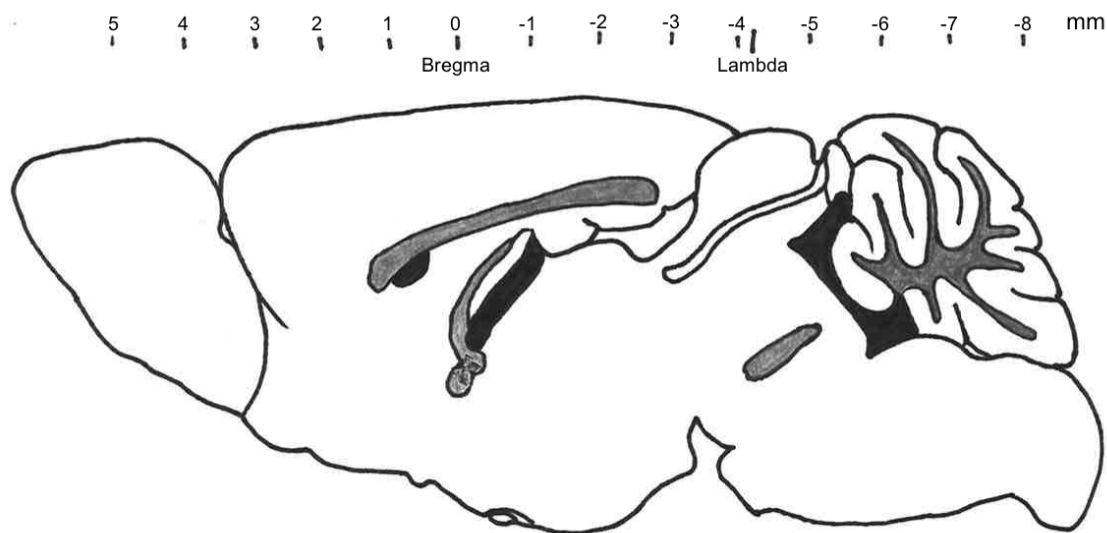
Hiirien aivot tuli kerätä ja pakastaa 1,5 h:n kuluttua naloksoni-injektiosta, jolloin c-Fos:n esiintyminen aivoissa oli suurinta. Dissekoidut ja pakastetut aivot

leikattiin Leica CM3050 S -kryostaatilla. Aivoleikkeistä otettiin talteen c-Fos-vasta-ainevärjäystä varten taulukon 5 mukaiset neljä aivoleikettä.

Taulukko 5. Tutkittavat aivoalueet sekä niiden sijainnit suhteessa bregmaan.

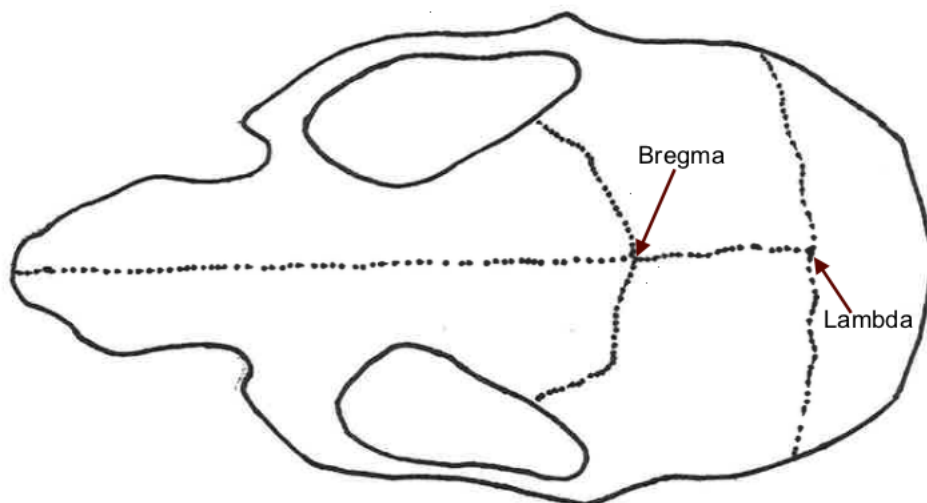
Leike	Sijainti suhteessa bregmaan (mm)	Aivoleikkeestä tutkitut alueet
1	+0,02	bed nucleus of the stria terminalis (BST) x2
2	-1,5	paraventrikulaarinen yläalamus (PV), mediaalinen talamus (MT), paraventrikulaarinen hypotalamus (PVHT) x2
3	-2,5	paraventrikulaarinen yläalamus (PV)
4	-3,0	lateraalihypotalamus (LH) x2

Aivoleikkeet leikattiin etuosasta alkaen pystysuuntaisesti 14 µm:n paksuisiksi leikkeiksi. Leikatessa oikeiden leikkeiden sijaintia arvioitiin aivoleikkeiden muodon ja rakenteen perusteella sekä laskemalla leikattujen leikkeiden määrää (noin 70 leikettä = 1 mm). Kuvassa 8 sivuttainen poikkileikkaus hiiren aivoista havainnollistamassa bregman sijaintia pituussuunnassa.



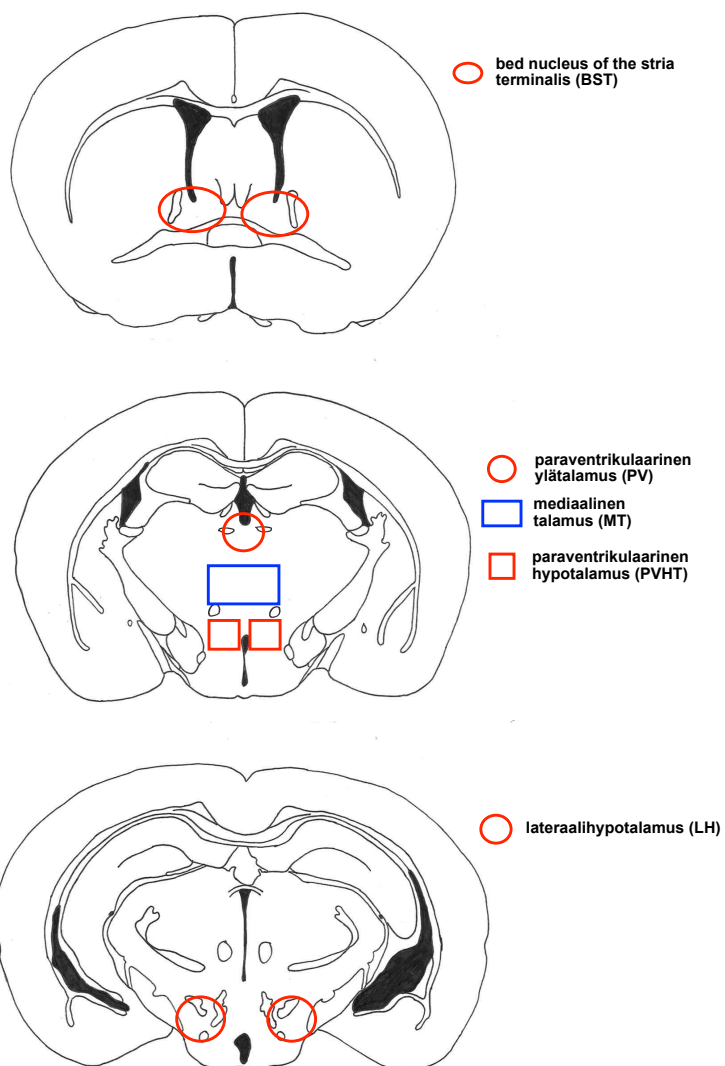
Kuva 8. Sivuttainen poikkileikkaus hiiren aivoista.

Bregma on viitepiste kallossa, jossa kallon saumat yhtyvät. Kuvassa 9 havainnollistettu hiiren kallon saumojen yhtymäkohdat sekä bregman sijainti.



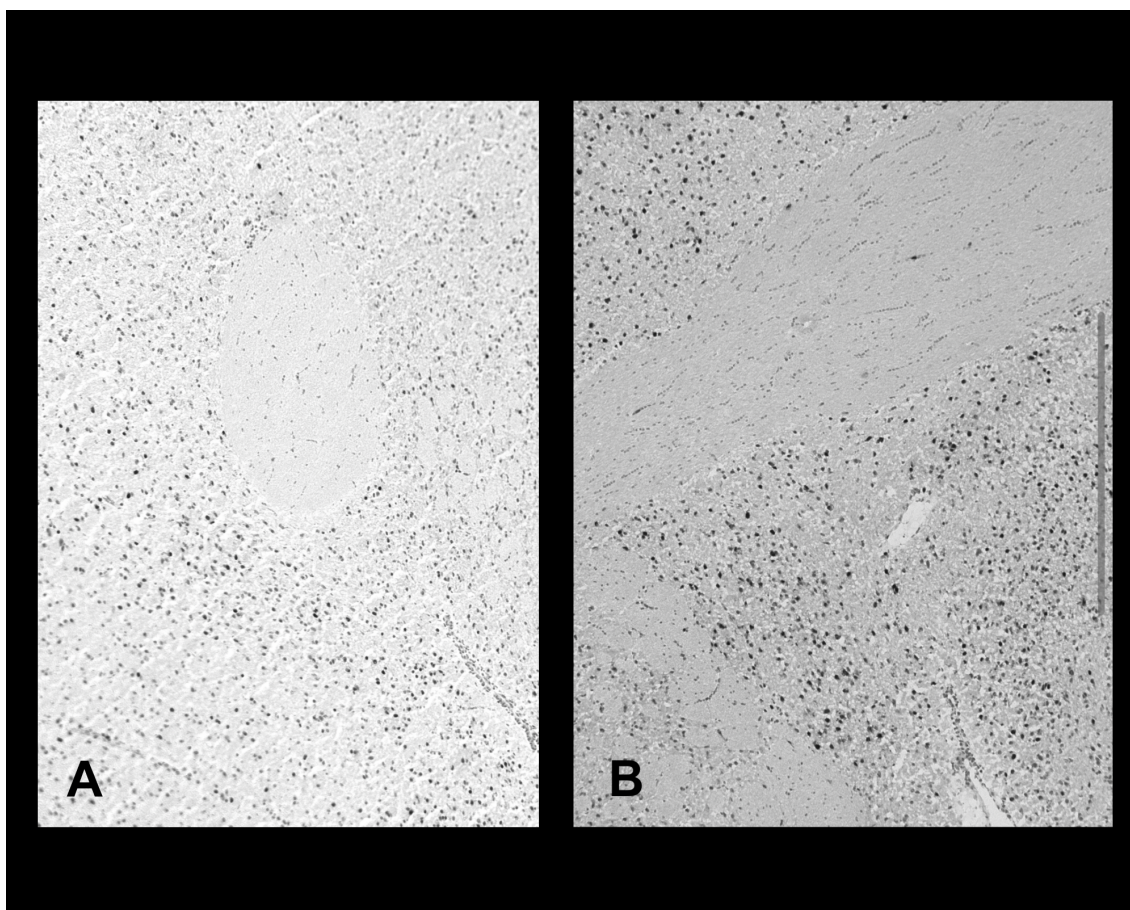
Kuva 9. Hiiren kallon saumojen yhtymäkohdat.

Värjättäviksi aivoleikkeiksi valittiin 16 eri yksilön aivoleikkeet (4 yksilöä kustakin ryhmästä). Aivoleikkeille suoritettiin kaksipäiväinen c-Fos-vasta-ainevärjäys liitteen 1 protokollan mukaisesti. Kaikki leikkeet värjättiin yhtä aikaa värjäyksen sävyerojen välttämiseksi. Värjätyt aivoleikkeet kuvattiin Leica DMR -mikroskoopilla käyttäen kymmenkertaista (10x) objektiivia sekä LAS V4.8 -ohjelmaa. Kuvassa 10 esitetty kohdat, joissa tutkittavat alueet sijaitsivat.



Kuva 10. Tutkittavien aivoalueiden sijainnit aivoleikkeillä.

Aktivoituneet solut laskettiin ImageJ-ohjelman avulla. Ohjelma hyödyntää mustavalko-sävyisen kuvan kontrastieroja. Aktivoituneet solut ovat kaikista tummimmat pikselit kuvassa.



Kuva 11. A: hiiren 1047 BST. B: hiiren 1089 BST (asetukset exp. 17,6, gain 1,0x, gamma 0,95).

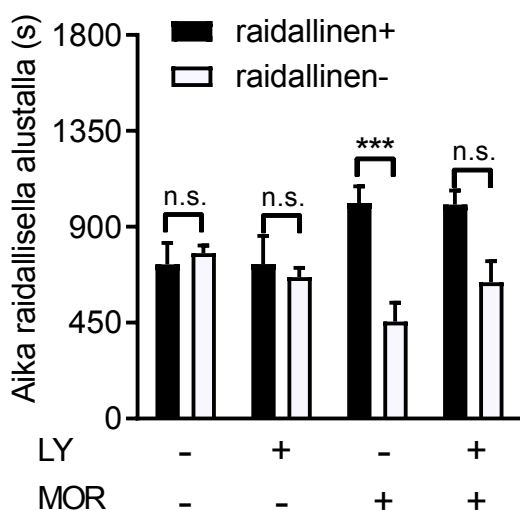
Kuvassa 11 on kymmenkertaisella objektiivilla otetut mikroskooppikuvat hiiren 1047 (A) ja 1089 (B) BST-aivoalueista. ImageJ-ohjelmalla analysoituna hiiren 1047 (A) BST-alueella aktivoituneita soluja oli 20 kpl ja hiiren 1089 (B) BST-alueella aktivoituneita soluja oli 284 kpl.

4 Tulokset

4.1 Huumemuistikoe

Huumemuistikokeessa (kuva 12) pelkästään saliinia saaneet hiiret eivät kehittäneet huumemuistia. Myöskään LY341495 itsessään ei aiheuttanut huumemuistia. Morfiinille syntyi tilastollisesti merkitsevä huumemuisti (ANOVA, ehdollistamisryhmien väliset erot, $F_{1,36} = 13,48$, $p < 0,001$). LY341495 esti morfiinin

huumemuistin muodostumisen (ANOVA, ehdollistamisryhmän ja LY-ryhmän välinen vuorovaikutus, $F_{3,36} = 4,74$, $p < 0,01$).



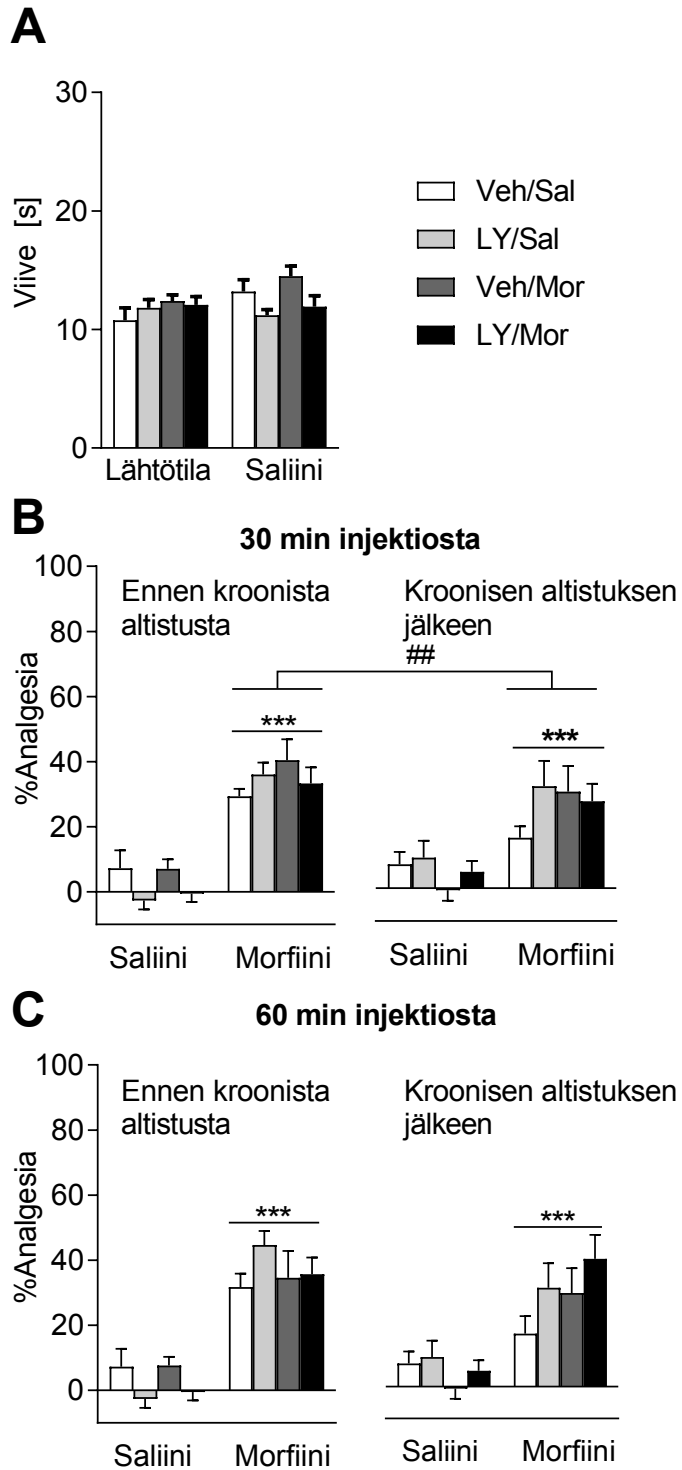
Kuva 12. Huumemuistikoe: hiiren raidallisella alueella viettämä aika. Jokainen lääkeaineryhmä sisälsi kaksi alaryhmää, joista toisen eläimet saivat morfiinin raidallisella (ryhmä: raidallinen+) ja toisen täplikällä (ryhmä: raidallinen-). Ilman morfiinia näillä ryhmillä ei ollut eroa, eli huumemuistia ei muodostunut. Kuvan merkinnät: n.s. = non significant, ei tilastollisesti merkitsevä. *** = $p < 0,001$, tilastollinen merkitsevyys, t-testi.

Liitteessä 2 esitetynä huumemuistikokeen tulokset taulukossa sekä liitteessä 6 huumemuistikokeen tilastoanalyysi.

4.2 Toleranssikoe

Toleranssikokeessa (kuva 13) testattiin aluksi hiirten kiputunto. Kiputunto oli ryhmien välillä samanlainen perustilanteessa ilman injektioita ja saliini-injektio jälkeen (ANOVA, ryhmien väliset erot, $F_{1,30} = 2,14$, $p = 0,12$), kuva 13A. Ennen kroonista morfiiniannostelua morfiini aiheutti kiputunnon vähenemisen (kuva 13B) tilastollisesti merkitsevästi 30 minuutin ja 60 minuutin aikapisteissä (ANOVA, saliini ja morfiiniryhmien välinen ero, 30 min: $F_{1,30} = 135,8$, $p < 0,001$, 60 min: $F_{1,30} = 94,3$, $p < 0,001$). Kroonisen morfiiniannostelun jälkeen kiputunto väheni morfiinin vaikutuksesta tilastollisesti merkitsevästi 30 minuutin

aikapisteessä (ANOVA, kroonisen annostelun vaikutus, $F_{1.30} = 8,2$, $p < 0,01$), mutta ei 60 minuutin aikapisteessä (ANOVA, kroonisen annostelun vaikutus, $F_{1.30} = 3,0$, $p = 0,09$).

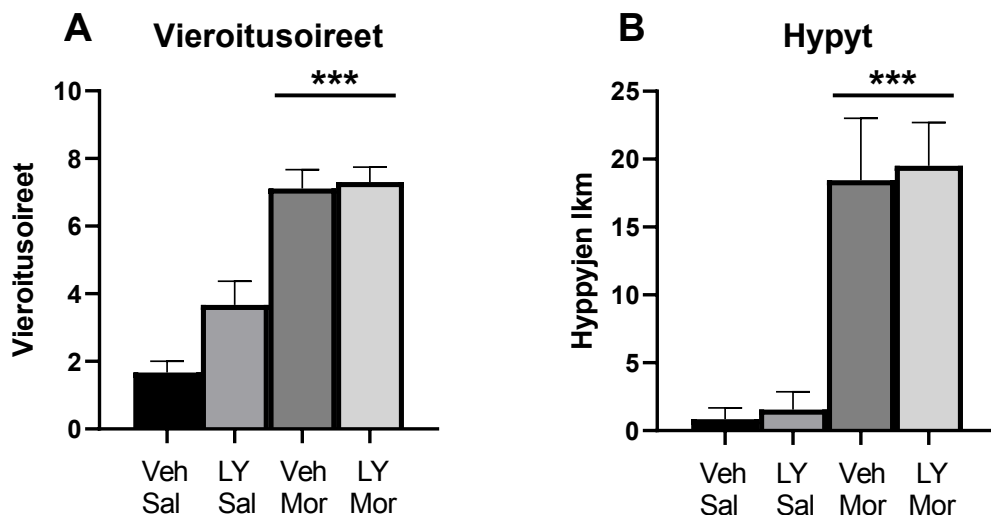


Kuva 13. A. Perustila B. 30 min injektiosta C. 60 min injektiosta. Kuvan merkinnät: *** = $p < 0,001$ tilastollinen merkitsevyys saliiini- ja morfiiniryhmien välillä, ANOVA. ### = $p < 0,001$, tilastollinen merkitsevyys ennen kroonista altistusta verrattuna kroonisen altistuksen jälkeen, ANOVA.

Liitteessä 3 toleranssikokeen tulokset taulukossa sekä liitteessä 7 toleranssikokeen tilastollinen analyysi.

4.3 Vieroitusoireet

Kroonisen morfiiniannostelun jälkeen hiiren vieroitusoireet saatiin voimistetuksi esille opioidireseptoriantagonisti naloksonilla. Kaikkien vieroitusoireiden määrä oli lisääntynyt tilastollisesti merkitsevästi kroonisen morfiinin annostelun jälkeen verrattuna verrokkiryhmiin (kuva 14), jotka saivat kroonisesti keittosuolaliuosta (ANOVA, $F_{1,30} = 40,6$, $p < 0,001$), mutta LY ei muuttanut vieroitusoireiden määrää (ANOVA, $F_{1,30} = 0,22$, $p = 0,64$). Vieroitusoireina esiintyvissä hypyissä nähtiin samanlainen tulos, eli krooninen morfiini lisäsi hypyjen määrää (ANOVA, $F_{1,30} = 28,9$, $p < 0,001$), mutta LY ei vaikuttanut hypyjen määrään ($F_{1,30} = 0,04$, $p = 0,83$).

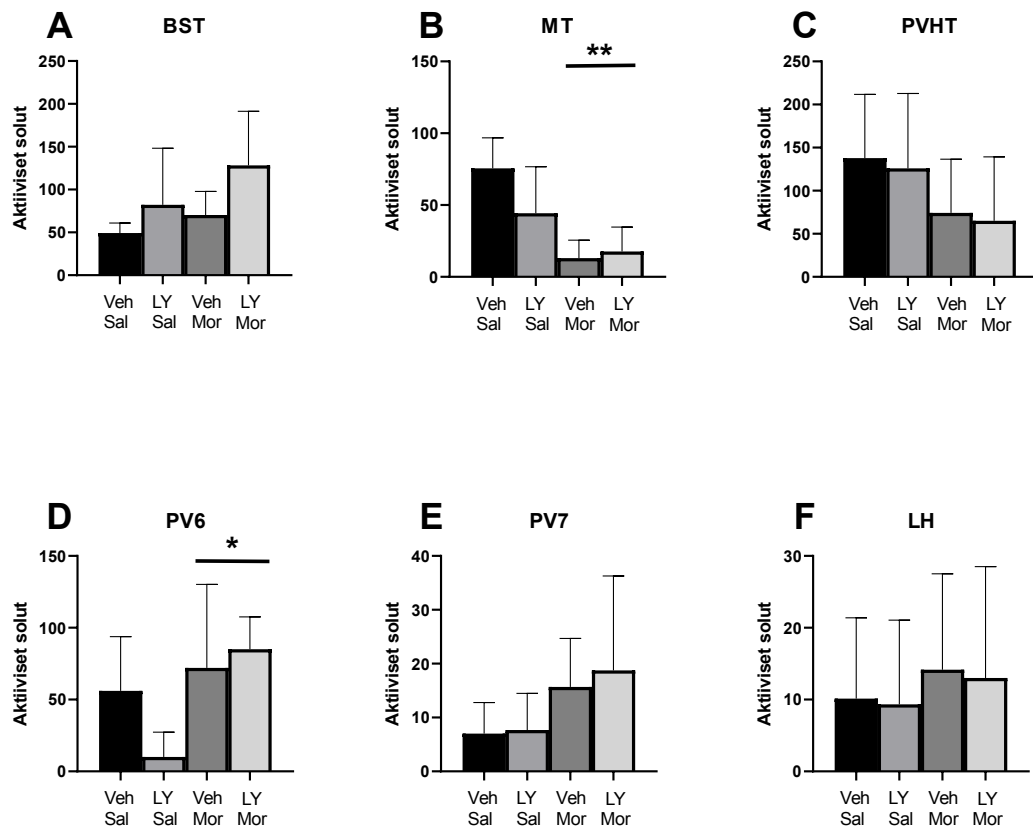


Kuva 14. A. Vieroitusoireet ryhmittäin. B. Hypyjen lukumäärät ryhmittäin. Kuvien merkinnät: *** = $p < 0,001$, kroonisesti morfiinia saaneet hiiret verrattuna kroonisesti keittosuolaa saaneet hiiret, ANOVA.

Liitteessä 4 vieroitusoireiden tulokset taulukossa sekä liitteessä 8 vieroitusoireiden tilastollinen analyysi.

4.4 Hermosolujen aktiivisuus

Hermosolujen aktiivisuus väheni kroonisen morfiinin vaikutuksesta aivoalueella MT (kuva 15B: ANOVA, $F_{1,9} = 13,2$, $p < 0,01$) ja lisääntyi aivoalueella PV6 (kuva 15D: ANOVA, $F_{1,9} = 5,9$, $p < 0,05$). Muilla aivoalueilla ei tapahtunut muutoksia kroonisen morfiinin tai LY:n vaikutuksesta (Kuva 15A,C,E,F: ANOVA, $p > 0,05$). Tuloksissa on paljon hajontaa johtuen otoksen pienestä koosta ja siitä, että kaikkien aivoleikkeiden värjäys ei ollut täysin onnistunut.



Kuva 15. Hermosolujen aktiivisuusmarkkeri c-Fos'in mukaan aktivoituneiden hermosolujen määrät analysoiduilla aivoalueilla. Kuvan merkinnät: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$, krooninen morfiini verrattuna krooniseen saliiiniin.

Liitteessä 5 aktiivisten solujen laskennalliset tulokset taulukossa sekä liitteessä 9 aktiivisten solujen tilastollinen analyysi.

5 Johtopäätökset

Saatujen tulosten perusteella LY341495 vaikuttaa estävästi huumemuistin syntyyn. Morfiinin toleranssia se ei kuitenkaan vähennä, eikä se lisää tai vähennä vieroitusoireita. Vieroitusoireiden aikainen hermosolujen aktiivisuus muuttui MT- ja PV6-alueella, mutta ei muualla: MT-alueella aktiivisuus väheni ja PV6-alueella aktiivisuus lisääntyi. Morfiinin vaikutus verrattuna kontrolliryhmään (saliini) on selkeä, mikä osoittaa injektoiden onnistuneen. LY341495:llä itsessään ei ole vaikutusta verrattuna sen kontrolliryhmään (vehikkeli), mikä oli odotettua.

Hiiriä oli totutettu käsittelyyn, koetilanteisiin ja injektioihin, joten niiden ei voida katsoa vaikuttaneen tuloksiin. Toleranssikoe sekä vieroitusoireiden analysointi suoritettiin sokkoutettuna, sillä tulkinta vaati tutkijalta objektiivista tulkintaa. Näin saatiin mahdollisimman luotettavia tuloksia.

LY341495:n selkeä estävä vaikutus huumemuistin syntyyn mahdollistaa, että sille voisi olla jatkossa käyttöä addiktio tutkimuksessa.

Lähteet

- 1 Farmakologian osasto. Verkkoaineisto. Helsingin yliopisto. <<https://www.helsinki.fi/fi/laaketieteellinen-tiedekunta/tutkimus/tieteenalat/farmakologian-osasto>> Luettu 20.10.2022.
- 2 Pelkonen, Olavi; Ruskoaho, Heikki; Hakkola, Jukka; Huupponen, Risto; MacDonald, Ewen; Moilanen, Eeva; Pasanen, Markku; Scheinin, Mika; Vähäkangas, Kirsi. 2014. 4. painos. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Duodecim.
- 3 Koob, George F.; Le Moal, Michel. 2006. Neurobiology of addiction. Amsterdam; Boston, Elsevier/Academic Press.
- 4 Riippuvuus. Verkkoaineisto. Päihdelinkki. <<https://paihdelinkki.fi/fi/tietopankki/tietoiskut/mielenterveys/riippuvuus>> Luettu 15.10.2022.
- 5 Mistä tunnistaa riippuvuuden? Verkkoaineisto. Myllyhoito yhdistys. <<https://myllyhoitoyhdistys.fi/2021/06/23/mista-tunnistaa-riippuvuuden/>> Luettu 10.10.2022.
- 6 Päihdehaitat. Verkkoaineisto. THL. <<https://thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihdehoito/paihdehaitat>> Luettu 10.10.2022.
- 7 Toleranssi. Verkkoaineisto. Terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00414/paihde-ja-huumeriippuvuus?q=toleranssi#s1>> Luettu 24.10.2022.
- 8 Opioidit. Verkkoaineisto. Päihdelinkki. <<https://paihdelinkki.fi/fi/tietopankki/pikatieto/opioidit>> Luettu 20.10.2022.
- 9 Morfiinin kemiallinen rakenne. Verkkoaineisto. Wikimedia. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/33/Morphin_-_Morphine.svg> Luettu 10.8.2022.
- 10 Morphine. Verkkoaineisto. PubChem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Morphine>> Luettu 10.8.2022.
- 11 Naloksonin kemiallinen rakenne. Verkkoaineisto. Wikimedia. <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2f/Naloxone.svg>> Luettu 10.8.2022

- 12 Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. 2001. 2nd edition. Neuroscience. Sinauer Associates.
- 13 Neuropharmacology, vol 66. mGlu3 receptor and astrocytes: Partners in neuroprotection. Daniela Durand, Lila Carniglia, Carla Caruso, Mercedes Lasaga. Verkkoaineisto. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390812001451?via%3Dihub>> Luettu 18.10.2022
- 14 Certificate of Analysis. Verkkoaineisto. Tocris. <https://documents.tocris.com/pdfs/tocris_coa/1209_15_coa.pdf?1629363795&_ga=2.97017435.53348019.1629363741-451902197.1628764598> Luettu 10.8.2022.
- 15 LY341495:n kemiallinen rakenne. Verkkoaineisto. Wikimedia. <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/LY-341%2C495.svg>> Luettu 10.8.2022.
- 16 c-Fos importance for brain development. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4712328/>>

-Fos-protokolla

1st day procedure (time: at least 60 min)

Important: The needed volume for one jar is approximately 160 ml. This volume is just enough to cover all the slides (10 slides per slide holder in a jar). To be safe, you may use just a bit less than 200 ml in a single jar.

Bubble technique refers to pipetting 500 µl / glass slide which has a hydrophobic barrier. The hydrophobic barrier, created with the Liquid Blocker Super Pap Pen, prevents polar liquid solutions from dispersing over the glass slides, thus creating a "bubble" of liquid on the slide.

- 1) Bring slides to RT from -80 °C (open slide boxes only in -20 °C freezer or inside cryostat)
- 2) Mark the borders of the glass slides (use the Liquid Blocker Super Pap Pen)
- 3) Immerse the glass slides (which are in the slide holder) in **4 % PFA / 1x PBS** (keep the slides in **1 jar for 10 min**; keep **on ice in a fume hood**) → Fixation
- 4) Wash the glass slides in **1x TBS-T** (keep the slides in **3 jars; each for 3 min**; RT)
- 5) Immerse the glass slides in **0.3–1 % H₂O₂ / methanol** (keep the slides in **1 jar for 15 min**; RT) → Blocks endogenous peroxidase (= Peroxidase quenching)
- 6) Wash the glass slides in **1x TBS-T** (keep the slides in **3 jars; each for 3 min**; RT)
- 7) Put some 1x TBS-wet paper towels at the base of the tray to create a humid atmosphere. Move the glass slides onto the sticks inside the tray.
- 8) Incubate in **Endogenous protein blocking solution (bubble technique; 15 min**; RT) → Blocks endogenous protein
- 9) Suction away liquid in excess from the glass slides with vacuum (the slides should not dry!)

Tip: With 10 or more slides, you may progress with 5 samples at once (unless you are fast). Suction away excess liquid from 5 slides and then pipette the last solution (step 10) onto these slides. Continue with another 5 slides in a similar manner. Continue normally afterwards.

10) Incubate the glass slides in **Primary antibody solution (bubble technique; O/N; +4 °C OR 60–120 min; RT)**

-During incubation, there is no need for a shaker.

2nd day procedure (time: at least 130 min)

Note: The needed volume for one jar is approximately 160 ml. This volume is just enough to cover all the slides (10 slides per holder in a jar). To be safe, you may use just a bit less than 200 ml of solution in a single jar.

Bubble technique: 500 µl / glass slide.

- 1) Wash the glass slides in **1x TBS-T** (keep the slides in **3 jars; each for 3 min; RT**)
- 2) Incubate the glass slides in **Secondary antibody solution (bubble technique; 30 min, can wait till 1 h; RT)**
- 3) Remember the ABC-solution. Put the solution onto a shaker for mixing for at least 30 min before use.
- 4) Wash the glass slides in **1x TBS-T** (keep the slides in **3 jars; each for 3 min; RT**)
- 5) Incubate the glass slides in **Avidin/Biotin peroxidase complex (bubble technique; 30 min, can wait till 1 h; RT)**
- 6) Wash the glass slides in **1x TBS-T** (keep the slides in **3 jars; each 3 min; RT**)
-Do not discard the 1x TBS-T in the last (the cleanest) jar.
- 7) Stain the glass slides with **DABNi (bubble technique; 5-6 min, max 10 min; The time needs to be tested before hand because it may vary; RT)**

Tip 1: Take 1 glass slide and place it in a new slide holder with a carry handle. Leave the rest in 1x TBS-T. Do the stain with DABNi and measure the precise time required for a faint black color to appear on the edges of the brain samples and on the samples themselves.

Tip 2: With the one glass slide, continue to step 8 and 9. Leave this glass slide (in the slide holder) in the last (the cleanest) 1x TBS-T jar in step 9. When you arrive at step 9 with the rest of the glass slides, place all the slides in the same holder when you are at the last 1X TBS-T jar. Continue normally. The results should not be affected even if the one glass slide gets a bit more washing time with the rest of the glass slides.

Tip 3: When staining 10 or more samples, start the counting of the incubation time on the first sample onto which bubble technique has been applied. If you stain 10 or more samples and start the counting on the last sample, the first sample will get more incubation time than the last sample. The effect is also increased because it will take additional time to place the slides back to the slide holder in the order of incubation. During this time, the DABNi reaction continues; The reaction stops once the slides are immersed in mQ-water.

- 8) Immerse the glass slides immediately in **mQ-H₂O** (keep the slides in **1 jar for 2 min**; RT)
- 9) Wash the glass slides in **1x TBS-T** (keep the slides in **2 jars; each for 3 min or longer**; RT)
- 10) Wash the glass slides in **mQ-H₂O** (keep the slides in **3 jars; each for 2 min**; RT; **fumehood**)
- 11) Wash the glass slides in **70 % EtOH** (**2 jars; each for 2 min**; RT; **fumehood**)
- 12) Wash the glass slides in **96 % EtOH** (**2 jars; each for 2 min**; RT; **fumehood**)
- 13) Wash the glass slides in **100 % EtOH** (**2 jars; each for 2 min**; RT; **fumehood**)
- 14) Wash the glass slides in **Histoclear** (**2 jars; each for 2 min**; RT; **fumehood**)
- 15) **Add coverslips with DPX mounting medium or Coverquick** (RT; **fumehood**; use a clean disposable glass/plastic pipette, discard the pipet after use)

-Place a coverslip onto the glass slide after you have pipetted 3 drops of mounting medium (DPX or Coverquick) onto the glass slide (1 drop near the top of the glass part, 1 at the center, 1 at the bottom). Work with 1 or 2 slides at once to prevent the medium from becoming too solid. In case air bubbles are formed, break the bubbles (with the glass pipette or the coverslip). Place the slides in a dry place for storage. Observe the samples with 10x objective lens.

-Different EtOHs and Histoclear can be put back into the bottles where they were taken from and stored at +4 C° provided that the solutions are still clean; Otherwise locate the appropriate waste containers.

Huumemuistikokeen tulokset

id	Cage	weight	group	subgroup	test_pink_direction	Distance mov Center-point	Velocity Center-point	In zone Arena / Center- Frequency	In zone Arena / Center- Frequency	In zone 2 Pink / Center- Frequency	In zone 2 Pink / Center- Frequency	In zone 2 Latency to Firs s
Trial 36	TAA1032CC	1	30	1 pink+	up	22434	38,6513	5	1797,2	35	1363,36	0
Trial 36	TAA1033CC	1	32	1 blue+	up	22434	39,9543	5	1797,2	33	673,6	0
Trial 36	TAA1034CC	1	33	1 pink+	down	22434	50,0005	5	1797,2	63	947,84	0
Trial 36	TAA1035CC	6	31	1 blue+	down	22434	46,9418	5	1797,2	54	632,16	12,4
Trial 36	TAA1038CC	7	23	2 pink+	up	22434	49,4389	5	1797,2	42	478,48	0
Trial 36	TAA1039CC	7	27	2 blue+	up	22434	48,6125	5	1797,2	46	411,84	0
Trial 36	TAA1040CC	7	32	2 pink+	down	22434	54,4567	5	1797,2	51	792,08	6
Trial 36	TAA1050CC	9	31	2 blue+	down	22434	39,5178	5	1797,2	36	592,08	0,48
Trial 37	TAA1047CC	10	22	3 pink+	up	22494	31,956	1	1800,08	32	1161,92	0
Trial 37	TAA1055CC	10	24	3 blue+	up	22494	42,1506	1	1800,08	48	758,64	5,44
Trial 37	TAA1052CC	12	32	3 pink+	down	22494	41,4199	1	1800,08	45	1213,44	0
Trial 37	TAA1053CC	12	31	3 blue+	down	22494	40,3258	1	1800,08	43	742,16	0
Trial 37	TAA1054CC	12	33	1 pink+	up	22494	57,9808	1	1800,08	55	792,32	0
Trial 37	TAA1065CC	35	21	1 blue+	up	22494	49,1729	1	1800,08	43	527,12	6,8
Trial 37	TAA1085CC	35	21	1 pink+	down	22494	59,6227	1	1800,08	53	1258,32	4,4
Trial 37	TAA1103CC	35	24	1 blue+	down	22494	40,2779	1	1800,08	27	397,44	10
Trial 38	TAA1059CC	27	30	2 pink+	up	22492	40,3838	1	1800,08	33	949,84	0
Trial 38	TAA1073CC	29	22	2 blue+	up	22492	44,0822	1	1800,08	43	920,08	10,16
Trial 38	TAA1074CC	29	22	2 pink+	down	22492	48,3104	1	1800,08	47	754,08	0
Trial 38	TAA1076CC	30	30	2 blue+	down	22492	53,0725	1	1800,08	57	851,2	4,72
Trial 38	TAA1081CC	33	29	3 pink+	up	22492	39,5311	1	1800,08	36	888,72	7,12
Trial 38	TAA1100CC	41	22	3 blue+	up	22492	50,4492	1	1800,08	59	624,4	1,6
Trial 38	TAA1101CC	41	22	3 pink+	down	22492	65,895	1	1800,08	64	1244,64	0
Trial 38	TAA1102CC	41	29	3 blue+	down	22492	72,0821	1	1800,08	87	787,6	0
Trial 39	TAA1061CC	28	30	1 pink+	up	22498	44,9531	1	1800,08	40	915,84	15,36
Trial 39	TAA1062CC	28	31	1 blue+	up	22498	33,3633	1	1800,08	31	555,76	6,56
Trial 39	TAA1097CC	43	34	1 pink+	down	22498	35,3997	1	1800,08	32	706,4	0
Trial 39	TAA1098CC	43	30	1 blue+	down	22498	39,5751	1	1800,08	38	464,8	15,76
Trial 39	TAA1099CC	43	34	2 pink+	up	22498	38,8889	1	1800,08	33	465,36	4,72
Trial 39	TAA1094CC	44	25	2 blue+	up	22498	58,8238	1	1800,08	56	900,8	0
Trial 39	TAA1095CC	44	26	2 pink+	down	22498	39,822	1	1800,08	35	397,28	2,16
Trial 39	TAA1096CC	44	23	2 blue+	down	22498	46,5	1	1800,08	48	1108,72	4,8
Trial 40	TAA1086CC	37	27	3 pink+	up	22486	45,5608	1	1800,08	43	1100,56	0
Trial 40	TAA1087CC	37	30	3 blue+	up	22486	48,8287	1	1800,08	44	833,68	1,92
Trial 40	TAA1088CC	37	27	3 pink+	down	22486	30,6106	1	1800,08	22	1224,48	0
Trial 40	TAA1089CC	37	27	3 blue+	down	22486	39,1531	1	1800,08	35	636,08	12,64
Trial 40	TAA1090CC	52	26	4 kontrolli	up	22486	65,1175	1	1800,08	64	697,6	0
Trial 40	TAA1091CC	52	27	4 kontrolli	up	22486	43,345	1	1800,08	43	665,12	0
Trial 40	TAA1092CC	52	29	4 kontrolli	down	22486	46,816	1	1800,08	46	737,84	34,56
Trial 40	TAA1093CC	52	26	4 kontrolli	down	22486	58,6102	1	1800,08	48	490,4	0

Toleranssikokeen tulokset

mouse_id	sex	weight	häkki	basal1	basal2	sal_ml	mor 30 min	mor 60 min	Ryhmä
TAa1032C	Uros	33.00	1	7,5	11,4	10,5	13,4	25	1
TAa1033C	Uros	34.00	1	15,8	8,7	11,2	17	15,3	1
TAa1047C	Naaras	23.00	10	9,2	12,7	11,3	20,1	18,1	1
TAa1055C	Naaras	25.00	10	12,5	11,6	14,5	13,6	12,1	1
TAa1073C	Naaras	23.00	29	15,3	14,2	20,8	16,8	18,4	1
TAa1074C	Naaras	26.00	29	16,1	15,6	15	17,2	17,5	1
TAa1098C	Uros	37.00	43	10,1	13,1	13,1	15,7	14	1
TAa1099C	Uros	40.00	43	14,7	14,9	20,5	21,8	19	1
TAa1034C	Uros	38.00	1	8,2	17,7	19,2	19,3	17,4	2
TAa1035C	Uros	36.00	6	7,8	12,4	17,4	35,9	32,5	2
TAa1052C	Uros	35.00	12	9,4	14,3	17,9	22,8	27,4	2
TAa1053C	Uros	33.00	12	9,4	16,8	21,9	15,7	18,2	2
TAa1076C	Uros	34.00	30	13,2	9,1	12,2	24,1	29,8	2
TAa1081C	Uros	31.00	33	8,8	15,6	12,5	20,5	23,7	2
TAa1100C	Naaras	24.00	41	14,3	12,8	8,4	15,3	19,7	2
TAa1101C	Naaras	23.00	41	11,4	8,9	8,1	11,6	14,2	2
TAa1095C	Naaras	32.00	44	10,9	9,6	11,2	17	9,4	2
TAa1096C	Naaras	28.00	44	13,2	11,4	15,1	24,2	18,3	2
TAa1038C	Naaras	27.00	7	12,1	15,4	15,3	16	22,5	3
TAa1039C	Naaras	31.00	7	14	17,1	17,6	22,8	26,5	3
TAa1054C	Uros	36.00	12	13,9	16	16,7	28,4	21,6	3
TAa1059C	Uros	34.00	27	20,9	15,4	15,3	25,5	25,1	3
TAa1065C	Naaras	23.00	35	19,5	12,1	14,7	14,9	13,5	3
TAa1085C	Naaras	23.00	35	20,8	12,2	13,6	25,5	13,7	3
TAa1086C	Uros	29.00	37	14,5	13,3	12,6	20,4	22	3
TAa1090C	Uros	30.00	52	17,8	12,6	18,6	17,4	23,8	3
TAa1091C	Uros	31.00	52	12,9	16,3	13,2	32,5	29,2	3
TAa1040C	Naaras	32.00	7	13,1	14,1	14,4	13,8	21,1	4
TAa1050C	Uros	32.00	9	12,5	8,8	16,3	30,2	27,4	4
TAa1061C	Uros	31.00	28	8,3	13,8	13,5	17,8	17,2	4
TAa1062C	Uros	31.00	28	17,1	21,5	16,3	25,9	39,1	4
TAa1103C	Naaras	24.00	35	16,5	14,2	19,2	18,8	20,7	4
TAa1097C	Uros	41.00	43	9,8	14,8	14,1	21,9	17,7	4
TAa1102C	Naaras	33.00	41	18,9	11,2	11,9	22,3	33,1	4
TAa1088C	Uros	28.00	37	15	12,8	16,7	22,2	25,6	4
TAa1089C	Uros	28.00	37	13,5	11,2	16,6	15,1	19,5	4
TAa1094C	Naaras	30.00	44	16,7	15,2	17,2	19,2	23,5	4
TAa1092C	Uros	34.00	52	14,8	15,9	14,7	24	21	4

Vieroitusoireiden pisteytykset

Hiiri	Sukupuoli	1. inj	2. inj	Ryhmä	Pisteet	Hypyt
1032	Uros	veh	sal	1	2	
1033	Uros	veh	sal	1	1	
1047	Naaras	veh	sal	1	1	
1055	Naaras	veh	sal	1	1	
1098	Uros	veh	sal	1	3	5
1099	Uros	veh	sal	1	2	
1034	Uros	LY	sal	2	1	
1052	Uros	LY	sal	2	2	1
1053	Uros	LY	sal	2	3	
1076	Uros	LY	sal	2	6	12
1081	Uros	LY	sal	2	8	
1095	Naaras	LY	sal	2	3	1
1096	Naaras	LY	sal	2	3	
1100	Naaras	LY	sal	2	4	
1101	Naaras	LY	sal	2	3	
1038	Naaras	veh	mor	3	7	18
1039	Naaras	veh	mor	3	7	35
1054	Uros	veh	mor	3	7	2
1059	Uros	veh	mor	3	6	
1065	Naaras	veh	mor	3	9	19
1085	Naaras	veh	mor	3	4	25
1086	Uros	veh	mor	3	7	12
1090	Uros	veh	mor	3	7	14
1091	Uros	veh	mor	3	10	41
1040	Naaras	LY	mor	4	7	6
1050	Uros	LY	mor	4	7	9
1061	Uros	LY	mor	4	8	15
1062	Uros	LY	mor	4	9	23
1088	Uros	LY	mor	4	8	32
1089	Uros	LY	mor	4	9	24
1092	Uros	LY	mor	4	8	36
1094	Naaras	LY	mor	4	5	23
1097	Uros	LY	mor	4	5	19
1103	Naaras	LY	mor	4	7	8

Aktiivisten solujen laskennalliset tulokset

hiiri	ryhmä	BST	MT	PVHT	PV	LH
1032	1	52	51	66	42,5	22
1033	1	39,5	74	130	46,5	1
1047	1	25	103	241	36	0
1099	1	80,5	74	114	73	17,5
1052	2	25	7	47	21,5	0
1081	2	214	64	112	77	22,5
1095	2	7,5	62	219	50,5	5,5
1038	3	25	1	4	1	16
1065	3	66	12	122	34	0
1086	3	120	26	97	20,5	26,5
1061	4	226		2	5	33,5
1062	4	19,5	0	0	0	2
1089	4	249	19	137	32,5	16,5
1094	4	18	34	121	51,5	0

Ryhmien keskiarvot						
ryhmä	BST	MT	PVHT	PV	LH	
1	49,3	75,5	137,8	49,5	10,1	
2	82,2	44,3	126,0	49,7	9,3	
3	70,3	13,0	74,3	18,5	14,2	
4	128,1	17,7	65,0	22,3	13,0	

Huomemuistikokeen tilastoanalyysi

Table Analyzed Huomemuistitesti

Two-way ANOVA Ordinary
Alpha 0,05

Source of Variation	% of total	va	P value	P value summary	Significant?
Interaction	20,37		0,0069	**	Yes
treatment_group	3,393		0,5081	ns	No
subgroup	19,33		0,0008	***	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	609016	3	203005	F (3, 36) = 4.735	P = 0.0069
treatment_group	101446	3	33815	F (3, 36) = 0.7888	P = 0.5081
subgroup	577915	1	577915	F (1, 36) = 13.48	P = 0.0008
Residual	1,54E+06	36	42871		

Toleranssikokeen tilastoanalyysi

Notes

Output Created		03-DEC-2021 11:48:...
Comments		
Input	Data	/Users/aittaaho/Documents/AA-Teemu/Opetus/ohjattavat/kaljala_laura/mglur_antago_mor_toler_withd_syksy2020/Untitled2_antago_mor_toler_hotplate_ver2_outliers.spv.sav
	Active Dataset	DataSet2
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	38
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		GLM @1chal_mor30_mpe @2chal_mor30_mpe BY group sex_code /WSFACTOR=time 2 Polynomial /METHOD=SSTYPE(3) /CRITERIA=ALPHA(.05) /WSDSIGN=time /DESIGN=group sex_code group*sex_code.
Resources	Processor Time	00:00:00.03
	Elapsed Time	00:00:00.00

Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE_1

time	Dependent Variable
1	@1chal_mor30_mpe
2	@2chal_mor30_mpe

**Between-Subjects
Factors**

		N
group	1	8
	2	10
	3	9
	4	11
sex_code	1	22
	2	16

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df
time	Pillai's Trace	.217	8.312 ^b	1.000	30.000
	Wilks' Lambda	.783	8.312 ^b	1.000	30.000
	Hotelling's Trace	.277	8.312 ^b	1.000	30.000
	Roy's Largest Root	.277	8.312 ^b	1.000	30.000
time * group	Pillai's Trace	.024	.250 ^b	3.000	30.000
	Wilks' Lambda	.976	.250 ^b	3.000	30.000
	Hotelling's Trace	.025	.250 ^b	3.000	30.000
	Roy's Largest Root	.025	.250 ^b	3.000	30.000
time * sex_code	Pillai's Trace	.035	1.077 ^b	1.000	30.000
	Wilks' Lambda	.965	1.077 ^b	1.000	30.000
	Hotelling's Trace	.036	1.077 ^b	1.000	30.000
	Roy's Largest Root	.036	1.077 ^b	1.000	30.000
time * group * sex_code	Pillai's Trace	.034	.350 ^b	3.000	30.000
	Wilks' Lambda	.966	.350 ^b	3.000	30.000
	Hotelling's Trace	.035	.350 ^b	3.000	30.000
	Roy's Largest Root	.035	.350 ^b	3.000	30.000

Multivariate Tests^a

Effect		Sig.
time	Pillai's Trace	.007
	Wilks' Lambda	.007
	Hotelling's Trace	.007
	Roy's Largest Root	.007
time * group	Pillai's Trace	.861
	Wilks' Lambda	.861
	Hotelling's Trace	.861
	Roy's Largest Root	.861
time * sex_code	Pillai's Trace	.308
	Wilks' Lambda	.308
	Hotelling's Trace	.308
	Roy's Largest Root	.308
time * group * sex_code	Pillai's Trace	.789
	Wilks' Lambda	.789
	Hotelling's Trace	.789
	Roy's Largest Root	.789

- a. Design: Intercept + group + sex_code + group * sex_code
Within Subjects Design: time
- b. Exact statistic

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^b Greenhouse-Geisser
time	1.000	.000	0	.	1.000

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Epsilon ^b	
	Huynh-Feldt	Lower-bound
time	1.000	1.000

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

- a. Design: Intercept + group + sex_code + group * sex_code
Within Subjects Design: time
- b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square
time	Sphericity Assumed	1859.311	1	1859.311
	Greenhouse-Geisser	1859.311	1.000	1859.311
	Huynh-Feldt	1859.311	1.000	1859.311
	Lower-bound	1859.311	1.000	1859.311
time * group	Sphericity Assumed	167.570	3	55.857
	Greenhouse-Geisser	167.570	3.000	55.857
	Huynh-Feldt	167.570	3.000	55.857
	Lower-bound	167.570	3.000	55.857
time * sex_code	Sphericity Assumed	240.913	1	240.913
	Greenhouse-Geisser	240.913	1.000	240.913
	Huynh-Feldt	240.913	1.000	240.913
	Lower-bound	240.913	1.000	240.913
time * group * sex_code	Sphericity Assumed	234.872	3	78.291
	Greenhouse-Geisser	234.872	3.000	78.291
	Huynh-Feldt	234.872	3.000	78.291
	Lower-bound	234.872	3.000	78.291
Error(time)	Sphericity Assumed	6710.598	30	223.687
	Greenhouse-Geisser	6710.598	30.000	223.687
	Huynh-Feldt	6710.598	30.000	223.687
	Lower-bound	6710.598	30.000	223.687

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		F	Sig.
time	Sphericity Assumed	8.312	.007
	Greenhouse-Geisser	8.312	.007
	Huynh-Feldt	8.312	.007
	Lower-bound	8.312	.007
time * group	Sphericity Assumed	.250	.861
	Greenhouse-Geisser	.250	.861
	Huynh-Feldt	.250	.861
	Lower-bound	.250	.861
time * sex_code	Sphericity Assumed	1.077	.308
	Greenhouse-Geisser	1.077	.308
	Huynh-Feldt	1.077	.308
	Lower-bound	1.077	.308
time * group * sex_code	Sphericity Assumed	.350	.789
	Greenhouse-Geisser	.350	.789
	Huynh-Feldt	.350	.789
	Lower-bound	.350	.789
Error(time)	Sphericity Assumed		
	Greenhouse-Geisser		
	Huynh-Feldt		
	Lower-bound		

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	time	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F
time	Linear	1859.311	1	1859.311	8.312
time * group	Linear	167.570	3	55.857	.250
time * sex_code	Linear	240.913	1	240.913	1.077
time * group * sex_code	Linear	234.872	3	78.291	.350
Error(time)	Linear	6710.598	30	223.687	

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	time	Sig.
time	Linear	.007
time * group	Linear	.861
time * sex_code	Linear	.308
time * group * sex_code	Linear	.789
Error(time)	Linear	

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	61974.131	1	61974.131	179.425	.000
group	1309.630	3	436.543	1.264	.304
sex_code	2784.704	1	2784.704	8.062	.008
group * sex_code	228.037	3	76.012	.220	.882
Error	10362.102	30	345.403		

Notes

Output Created	03-DEC-2021 11:49:...	
Comments		
Input	Data	/Users/aittaaho/Documents/AA-Teemu/Opetus/ohjattavat/kaljala_laura/mglur_antago_mor_toler_withd_syksy2020/Untitled2_antag_mor_toler_hotplate_ver2_outliers.spv.sav
	Active Dataset	DataSet2
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	38
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.

Notes

Syntax		GLM @1chal_mor60_mpe @2chal_mor60_mpe BY group sex_code /WSFACTOR=time 2 Polynomial /METHOD=SSTYPE(3) /CRITERIA=ALPHA(.05) /WSDSIGN=time /DESIGN=group sex_code group*sex_code.
Resources	Processor Time	00:00:00.03
	Elapsed Time	00:00:00.00

**Within-Subjects
Factors**

Measure: MEASURE_1

time	Dependent Variable
1	@1chal_mor60_mpe
2	@2chal_mor60_mpe

**Between-Subjects
Factors**

		N
group	1	8
	2	10
	3	9
	4	11
sex_code	1	22
	2	16

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df
time	Pillai's Trace	.091	2.995 ^b	1.000	30.000
	Wilks' Lambda	.909	2.995 ^b	1.000	30.000
	Hotelling's Trace	.100	2.995 ^b	1.000	30.000
	Roy's Largest Root	.100	2.995 ^b	1.000	30.000
time * group	Pillai's Trace	.108	1.212 ^b	3.000	30.000
	Wilks' Lambda	.892	1.212 ^b	3.000	30.000
	Hotelling's Trace	.121	1.212 ^b	3.000	30.000
	Roy's Largest Root	.121	1.212 ^b	3.000	30.000
time * sex_code	Pillai's Trace	.000	.000 ^b	1.000	30.000
	Wilks' Lambda	1.000	.000 ^b	1.000	30.000
	Hotelling's Trace	.000	.000 ^b	1.000	30.000
	Roy's Largest Root	.000	.000 ^b	1.000	30.000
time * group * sex_code	Pillai's Trace	.042	.443 ^b	3.000	30.000
	Wilks' Lambda	.958	.443 ^b	3.000	30.000
	Hotelling's Trace	.044	.443 ^b	3.000	30.000
	Roy's Largest Root	.044	.443 ^b	3.000	30.000

Multivariate Tests^a

Effect		Sig.
time	Pillai's Trace	.094
	Wilks' Lambda	.094
	Hotelling's Trace	.094
	Roy's Largest Root	.094
time * group	Pillai's Trace	.322
	Wilks' Lambda	.322
	Hotelling's Trace	.322
	Roy's Largest Root	.322
time * sex_code	Pillai's Trace	.998
	Wilks' Lambda	.998
	Hotelling's Trace	.998
	Roy's Largest Root	.998
time * group * sex_code	Pillai's Trace	.724
	Wilks' Lambda	.724
	Hotelling's Trace	.724
	Roy's Largest Root	.724

- a. Design: Intercept + group + sex_code + group * sex_code
Within Subjects Design: time
- b. Exact statistic

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^b
					Greenhouse-Geisser
time	1.000	.000	0	.	1.000

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Epsilon ^b	
	Huynh-Feldt	Lower-bound
time	1.000	1.000

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

- a. Design: Intercept + group + sex_code + group * sex_code
Within Subjects Design: time
- b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

(12)

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square
time	Sphericity Assumed	1173.702	1	1173.702
	Greenhouse-Geisser	1173.702	1.000	1173.702
	Huynh-Feldt	1173.702	1.000	1173.702
	Lower-bound	1173.702	1.000	1173.702
time * group	Sphericity Assumed	1424.548	3	474.849
	Greenhouse-Geisser	1424.548	3.000	474.849
	Huynh-Feldt	1424.548	3.000	474.849
	Lower-bound	1424.548	3.000	474.849
time * sex_code	Sphericity Assumed	.004	1	.004
	Greenhouse-Geisser	.004	1.000	.004
	Huynh-Feldt	.004	1.000	.004
	Lower-bound	.004	1.000	.004
time * group * sex_code	Sphericity Assumed	521.407	3	173.802
	Greenhouse-Geisser	521.407	3.000	173.802
	Huynh-Feldt	521.407	3.000	173.802
	Lower-bound	521.407	3.000	173.802
Error(time)	Sphericity Assumed	11756.794	30	391.893
	Greenhouse-Geisser	11756.794	30.000	391.893
	Huynh-Feldt	11756.794	30.000	391.893
	Lower-bound	11756.794	30.000	391.893

(12)

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		F	Sig.
time	Sphericity Assumed	2.995	.094
	Greenhouse-Geisser	2.995	.094
	Huynh-Feldt	2.995	.094
	Lower-bound	2.995	.094
time * group	Sphericity Assumed	1.212	.322
	Greenhouse-Geisser	1.212	.322
	Huynh-Feldt	1.212	.322
	Lower-bound	1.212	.322
time * sex_code	Sphericity Assumed	.000	.998
	Greenhouse-Geisser	.000	.998
	Huynh-Feldt	.000	.998
	Lower-bound	.000	.998
time * group * sex_code	Sphericity Assumed	.443	.724
	Greenhouse-Geisser	.443	.724
	Huynh-Feldt	.443	.724
	Lower-bound	.443	.724
Error(time)	Sphericity Assumed		
	Greenhouse-Geisser		
	Huynh-Feldt		
	Lower-bound		

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	time	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F
time	Linear	1173.702	1	1173.702	2.995
time * group	Linear	1424.548	3	474.849	1.212
time * sex_code	Linear	.004	1	.004	.000
time * group * sex_code	Linear	521.407	3	173.802	.443
Error(time)	Linear	11756.794	30	391.893	

(12)

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	time	Sig.
time	Linear	.094
time * group	Linear	.322
time * sex_code	Linear	.998
time * group * sex_code	Linear	.724
Error(time)	Linear	

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	73640.397	1	73640.397	195.289	.000
group	2316.285	3	772.095	2.048	.128
sex_code	4983.439	1	4983.439	13.216	.001
group * sex_code	1031.830	3	343.943	.912	.447
Error	11312.510	30	377.084		

Vieroitusoireiden tilastoanalyysi

Univariate Analysis of Variance

Notes

Output Created		01-FEB-2022 14:06:29
Comments		
Input	Data	/Users/aittaaho/Documents/AA-Teemu/Opetus/ohjattavat/kaljaja_laura/mglur_antago_mor_toler_withd_syksy2020/Untitled2_withdrawal_ly_antag_tehtiin_tasta_laura.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	34
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		UNIANOVA jumps BY ekainj tokainj /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /CRITERIA=ALPHA (0.05) /DESIGN=ekainj tokainj ekainj*tokainj.
Resources	Processor Time	00:00:00.01
	Elapsed Time	00:00:00.00

Between-Subjects Factors

		N
eka inj	LY	20
	veh	14
toka inj	mor	19
	sal	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: jumps

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2641.819 ^a	3	880.606	10.307	.000
Intercept	3184.580	1	3184.580	37.274	.000
ekainj	4.145	1	4.145	.049	.827
tokainj	2471.884	1	2471.884	28.932	.000
ekainj * tokainj	.841	1	.841	.010	.922
Error	2563.122	30	85.437		
Total	9452.000	34			
Corrected Total	5204.941	33			

a. R Squared = .508 (Adjusted R Squared = .458)

Univariate Analysis of Variance

Notes

Output Created		01-FEB-2022 14:21:42
Comments		
Input	Data	/Users/aittaaho/Documents/AA-Teemu/Opetus/ohjattavat/kaljaja_laura/mglur_antago_mor_toler_withd_syksy2020/Untitled2_witdrawal_ly_antag_tehtiin_tasta_laura.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax	UNIANOVA total BY ekainj tokainj /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /CRITERIA=ALPHA (0.05) /DESIGN=ekainj tokainj ekainj*tokainj.	

Notes

Resources	Processor Time	00:00:00.01
	Elapsed Time	00:00:00.00

Between-Subjects Factors

		N
eka inj	LY	20
	veh	14
toka inj	mor	19
	sal	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: total

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4157.113 ^a	3	1385.704	14.163	.000
Intercept	6962.841	1	6962.841	71.167	.000
ekainj	21.884	1	21.884	.224	.640
tokainj	3971.745	1	3971.745	40.595	.000
ekainj * tokainj	1.432	1	1.432	.015	.905
Error	2935.122	30	97.837		
Total	16250.000	34			
Corrected Total	7092.235	33			

a. R Squared = .586 (Adjusted R Squared = .545)

Aktiivisten solujen tilastoanalyysi

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	BST	4043.494 ^a	3	1347.831
	MT	8776.897 ^b	3	2925.632
	PVHT	9361.814 ^c	3	3120.605
	PV6	11403.692 ^d	3	3801.231
	LH	97.543 ^e	3	32.514
Intercept	BST	70686.050	1	70686.050
	MT	18120.200	1	18120.200
	PVHT	143877.339	1	143877.339
	PV6	43059.200	1	43059.200
	LH	1266.701	1	1266.701
veh_vai_ly	BST	2698.939	1	2698.939
	MT	561.800	1	561.800
	PVHT	.006	1	.006
	PV6	460.800	1	460.800
	LH	61.835	1	61.835
sal_vai_mor	BST	947.606	1	947.606
	MT	6360.556	1	6360.556
	PVHT	8556.006	1	8556.006
	PV6	8000.000	1	8000.000
	LH	.613	1	.613
veh_vai_ly * sal_vai_mor	BST	48.050	1	48.050
	MT	1027.222	1	1027.222
	PVHT	438.672	1	438.672
	PV6	3699.200	1	3699.200
	LH	41.568	1	41.568
Error	BST	67775.583	9	7530.620
	MT	4348.333	9	483.148
	PVHT	50473.417	9	5608.157
	PV6	12218.000	9	1357.556
	LH	1174.688	9	130.521
Total	BST	139933.000	13	
	MT	34489.000	13	
	PVHT	212766.000	13	
	PV6	67122.000	13	
	LH	2562.250	13	
Corrected Total	BST	71819.077	12	
	MT	13125.231	12	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	BST	.179	.908
	MT	6.055	.015
	PVHT	.556	.657
	PV6	2.800	.101
	LH	.249	.860
Intercept	BST	9.386	.013
	MT	37.504	.000
	PVHT	25.655	.001
	PV6	31.718	.000
	LH	9.705	.012
veh_vai_ly	BST	.358	.564
	MT	1.163	.309
	PVHT	.000	.999
	PV6	.339	.574
	LH	.474	.509
sal_vai_mor	BST	.126	.731
	MT	13.165	.005
	PVHT	1.526	.248
	PV6	5.893	.038
	LH	.005	.947
veh_vai_ly * sal_vai_mor	BST	.006	.938
	MT	2.126	.179
	PVHT	.078	.786
	PV6	2.725	.133
	LH	.318	.586
Error	BST		
	MT		
	PVHT		
	PV6		
	LH		
Total	BST		
	MT		
	PVHT		
	PV6		
	LH		
Corrected Total	BST		
	MT		