



<p><b>Key words:</b></p> <p><b>Address for correspondence:</b></p>	<p>dependent changes in the body temperature of rats. We suggest a modulating role of caffeine after acute and chronic administration in the changes, associated with the thermoregulatory mechanisms in rats with model of depression. This study investigated effect of caffeine, a nonselective adenosine receptor antagonist, and desipramine, a tricyclic antidepressant on the body temperature in male Wistar rats after systemic (p.o. or i.p.) chronic administration. The rats were divided into two randomized groups: normal rats and rats with model of depression. As an experimental model of depression we used chronic unpredictable stress (Chronic Unpredictable Stress, CUS). The core temperature of the experimental animals was measured with thermistor probes inserted rectally and monitored on multichannel recorder with computing program. The results of the present study demonstrate hyperthermic effects after chronic administration of caffeine in both non-stressed and stressed group of rats. Desipramine reduced the core temperature in rats of non-stressed group. The hyperthermic response observed in the stressed group of rats was reduced by desipramine. These data suggest involving of purinergic system in the processes of thermoregulation, as well as a specific modulating role of caffeine in the thermoregulatory responses to chronic unpredictable stress.</p> <p>caffeine, desipramine, chronic unpredictable stress, body temperature, rats</p> <p><i>Rumen Nikolov, M. D., Ph. D., Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, Medical University, 2 „Zdrave“ Str., Bg – 1431 Sofia, tel. +359 2 91 72 621, e-mail address: ru_nikolov@abv.bg</i></p>
--	---

## ВЪВЕДЕНИЕ

Телесната температура на бозайниците е резултат от баланса между хипоталамичната "set point" (стремяща се към нормалната за съответния вид средна телесна температура), действието на централни медиатори и модулатори, топлопродукцията и загубата на топлина. Стойността на "set point" при бозайниците варира от 36 до 38°C, като при човека е  $\approx 37^\circ\text{C}$ . В терморегулаторните процеси участват редица медиаторни системи и техните невротрансмитери, като например серотонин, норадреналин, допамин, ацетилхолин, простагландини, гама-аминомаслена киселина (ГАМК), глутамат и  $\beta$ -ендорфин.

Съвременни литературни данни предполагат участие на пуринергичната система в процесите на терморегулация у плъхове [6, 20, 24]. Предполага се, че  $A_1$  и/или  $A_2$ -рецепторите са включени в регулацията на телесната температура [6, 23]. Метилксантиновото производно кофеин осъществява фармакологичните си ефекти посредством блокиране на аденозиновите рецептори и инхибиране на ензима фосфодиестераза. Кофеинът действа като неселективен антагонист на аденозин-ергичните рецептори, като проявява афинитет предимно към  $A_1$ ,  $A_{2A}$  и  $A_{2B}$ -рецепторите и по-малък афинитет към  $A_3$ -рецепторите [5].

При еднократно приложение на кофеин у плъхове се наблюдават доза-зависими ефекти върху телесната температура. Прилагането на кофеин в ниски дози предизвиква хипертермия, докато при прилагането му във високи дози се развива хипотермия [18]. Наши предишни проучвания показаха, че при еднократно прилагане на кофеин в ниски дози (2, 20 и 40 mg/kg i.p.) се предизвиква доза-зависимо покачване на телесната температура на плъховете в норма и при плъховете с модел на депресия, докато при еднократно прилагане на кофеин във високи дози (100 mg/kg i.p.) се наблюдава хипотермия при нормалните плъхове и хипертермия при плъховете от групата с експериментален модел на депресия [14].

Литературни данни предполагат роля на аденозиновата модулаторна система и нейните мозъчни рецептори в регулацията на депресивното поведение и реактивност [13]. Хроничният стрес е рисков фактор за развитие на депресия и тревожно разстройство [1, 7]. Експериментални изследвания са показали, че хроничният стрес с редуване на различни стресогени провокира развитие на депресивно състояние със съпътстващи поведенчески и биохимични изменения у гризачи [21]. Наши проучвания върху този модел на депресия показаха участието на пуринергични механизми, включително на аденозиновия рецепторен антагонист кофеин, прилаган еднократно, в регулацията на телесната темпе-

ратура, болковата чувствителност, моторната активност и емоционалното поведение у мишки и плъхове [16].

**Цел** на настоящото изследване е установяване ролята на хронично прилаган кофеин в терморегулаторните изменения при модел на депресия у плъхове. Ефектите на метилксантина кофеин ще бъдат сравнени с тези на дезипрамин, за който е установен антидепресивен ефект при този модел на депресия.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### Фармакологични вещества

В настоящото проучване бяха използвани Caffeine Reagent Plus (Sigma, Germany) и Desipramine (Sigma, Germany). Дозите на веществата бяха определени на базата на литературни данни, както и от собствени предварителни експерименти. Изследваните субстанции бяха прилагани хронично на плъховете от стресираната (след третата седмица) и нестресираната група по следната схема: caffeine (8 mg/kg/ден, p.o. – 2 седмици) и desipramine (10 mg/kg/ден, i.p. – 2 седмици). Кофеинът се въвеждаше перорално чрез сонда в обем 0,1 ml/100 g. Дезипраминът беше прилаган чрез интраперитонеално инжектиране в обем 0,1 ml/100 g. На контролните животни от стресираната и нестресираната група беше инжектиран 0,9% NaCl (физиологичен разтвор) в обем 0,1 ml/100 g.

### Експериментални животни

Експериментите бяха проведени върху мъжки полово зрели плъхове порода Wistar. Индивидуалните тегла се отчитаха ежедневно по време на експерименталните процедури. Плъховете бяха разделени рандомизирано в две основни групи: едната група се отглежда при стандартни условия без стресогенни стимули, а другата група, подложена на хроничен стрес – с редуване на различни стресогени в продължение на 5 седмици. Животните от двете групи (стресирана и нестресирана) бяха разпределени в 3 подгрупи по 10 плъха във всяка (контролна група с прилагане на физиологичен разтвор, експериментална група с прилагане на дезипрамин и експериментална група с прилагане на кофеин).

По време на изследванията животните бяха поставени при стандартизирани условия: свободен достъп до вода и храна, температура в помещението  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , цикъл на осветление 12 часа светло (08:00-20:00)/12 часа тъмно (20:00-

08:00). Всички експерименти се проведоха в рамките на един годишен сезон и по едно и също време от денонощния цикъл (10:00-13:00 h).

При планиране и провеждане на експериментите стриктно бяха спазвани Международните насоки и принципи за експерименти с животни (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals), както и етичните принципи на КЕНИМУС (Комисия по етика на научните изследвания при Медицински университет – София).

### Експериментален модел на депресия

Моделът на депресия, с многократно прилагане на различни физически и психичен стресогени на гризачи в непредсказуем ред (Chronic Unpredictable Stress, CUS) е утвърден модел за проучване на депресивните състояния, при които успешно се имитират няколко характерни клинични симптома на униполярната депресия [21]. В настоящото изследване прилагаме схема на хроничен стрес с редуване на различни стресогени в непредсказуем ред в продължение на 5 седмици.

### Мониторирание на телесната температура

Експериментите бяха проведени при температура на околната среда  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Температурата на плъховете от двете експериментални групи беше регистрирана 24 h след последното прилагане на кофеин или дезипрамин.

Телесната температура на животните регистрирахме чрез ректални термисторни проби (TX-8), свързани към работещ с компютърна програма мултиканален апарат Iso-Thermex 16 (Columbus Instruments, USA). След лубрикация с вазелин термисторите се въвеждаха ректално на дълбочина 6 см. Температурата на плъховете се регистрираше на 30-ата, 60-ата, 90-ата min след апликацията на термисторите и регистрирането на изходната температура на животните. По време на експериментите животните бяха леко ограничени в движенията си [17].

### Статистически методи

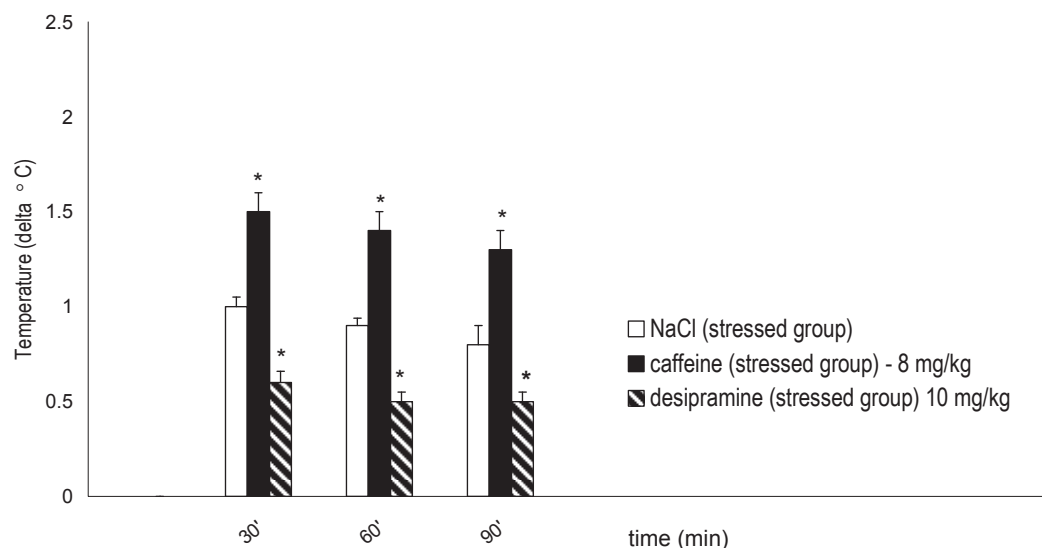
Експерименталните резултати бяха обработени статистически и представени като средни стойности  $\pm$  S.E.M (mean  $\Delta$  values  $\pm$  S.E.M.) посредством методите на дисперсионния анализ (one-way ANOVA). Статистическата достоверност бе установена с помощта на t-test на Student. За статистически достоверни се отчитаха резултатите с  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛТАТИ

### 1. Ефекти върху телесната температура на плъхове с модел на депресия след хронично перорално приложение на кофеин

При хронично прилагане (2 седмици) на метилксантиновото производно кофеин в доза 8

mg/kg/24 h p.o. при плъхове с експериментален модел на депресия се наблюдава статистически значимо повишаване на телесната температура на животните, регистрирано на 30-ата, 60-ата и 90-ата min след апликацията на термисторите (\*P < 0,05) (фиг. 1).



Фиг. 1. Ефекти върху телесната температура на плъхове с модел на депресия след хронично прилагане на кофеин (p.o.) и дезипрамин (i.p.)

Средна стойност на промяната в телесната температура (temperature delta °C) на плъховете след приложение на caffeine (8 mg/kg/24 h p.o.), desipramine (10 mg/kg/24 h i.p.) и NaCl (0,1 ml/100g p.o. и i.p.). Статистическа значимост спрямо NaCl: \*P < 0,05.

### 2. Ефекти върху телесната температура на плъхове с модел на депресия след хронично интраперитонеално приложение на дезипрамин

След хронично въвеждане (2 седмици) на трицикличния антидепресант дезипрамин в доза 10 mg/kg/24 h i.p. при плъхове с експериментален модел на депресия се наблюдава статистически значимо понижаване на телесната температура на животните, регистрирано на 30-ата, 60-ата и 90-ата min след апликацията на термисторните проби (\*P < 0,05) (фиг. 1).

### 3. Ефекти върху телесната температура на плъхове в норма след хронично перорално прилагане на кофеин

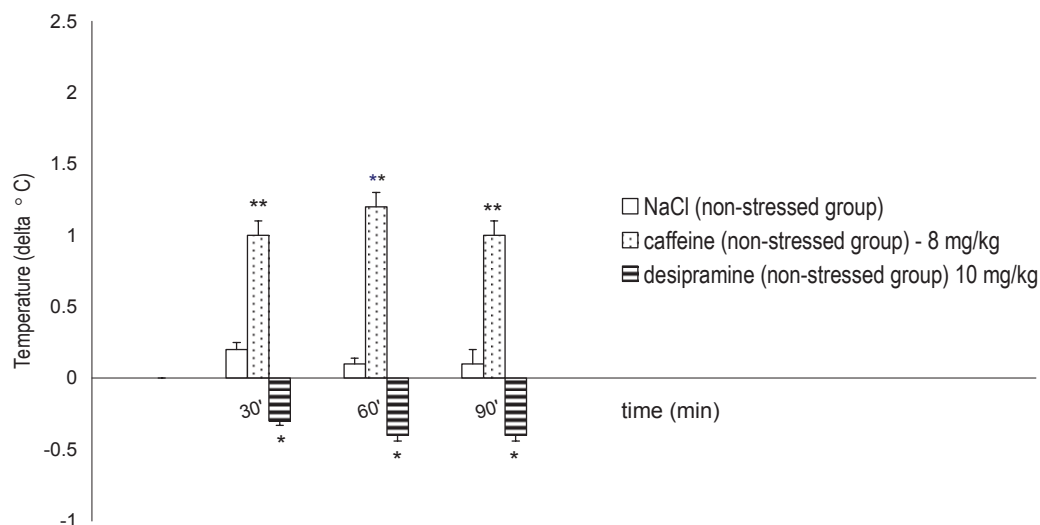
Приложението на кофеин в доза 8 mg/kg/24 h p.o. в продължение на 2 седмици при плъхове в норма предизвика статистически значимо повишаване на телесната температура на плъховете, регистрирано на 30-ата, 60-ата и 90-ата min след апликацията на термисторите (\*\*P < 0,01) (фиг. 2).

### 4. Ефекти върху телесната температура на плъхове в норма след хронично интраперитонеално приложение на дезипрамин

Интраперитонеалното инжектиране на дезипрамин в доза 10 mg/kg/24 h в продължение на 2 седмици при плъхове в норма предизвика понижаване на телесната температура на плъховете при мониториране на 30-ата, 60-ата и 90-ата min след апликацията на термисторните проби (\*P < 0,05) (фиг. 2).

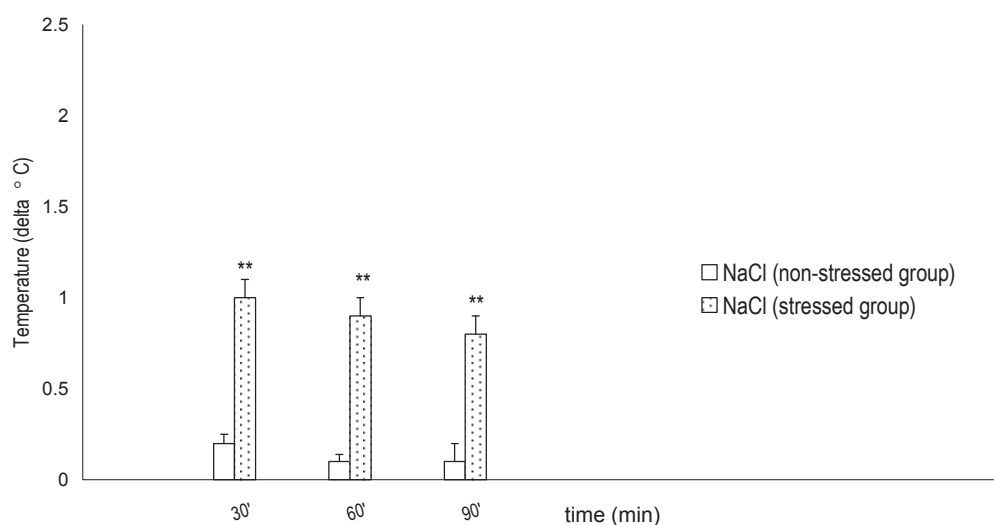
### 5. Промяна в телесната температура на плъхове в норма (non-stressed group) и плъхове с модел на депресия (stressed group) при хронично приложение на физиологичен разтвор

При сравняване на контролните групи с прилаган физиологичен разтвор при плъхове в норма и плъхове с модел на депресия, бе установено статистически значимо повишаване на телесната температура на плъховете с експериментално предизвикан хроничен стрес спрямо плъховете в норма на 30-ата, 60-ата и 90-ата min след апликацията на термисторните проби (\*\*P < 0,01) (фиг. 3).



**Фиг. 2.** Ефекти върху телесната температура на плъхове в норма (non-stressed) след хронично прилагане на кофеин (р.о.) и дезипрамин (i.p.)

Средна стойност на промяната в телесната температура (temperature delta °C) на плъховете след приложение на caffeine (8 mg/kg/24 h p.o.), desipramine (10 mg/kg/24 h i.p.) и NaCl (0,1 ml/100g p.o. и i.p.). Статистическа значимост спрямо NaCl: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.



**Фиг. 3.** Промяна в телесната температура на плъхове в норма (non-stressed group) и плъхове с модел на депресия (stressed group) при хронично приложение на физиологичен разтвор

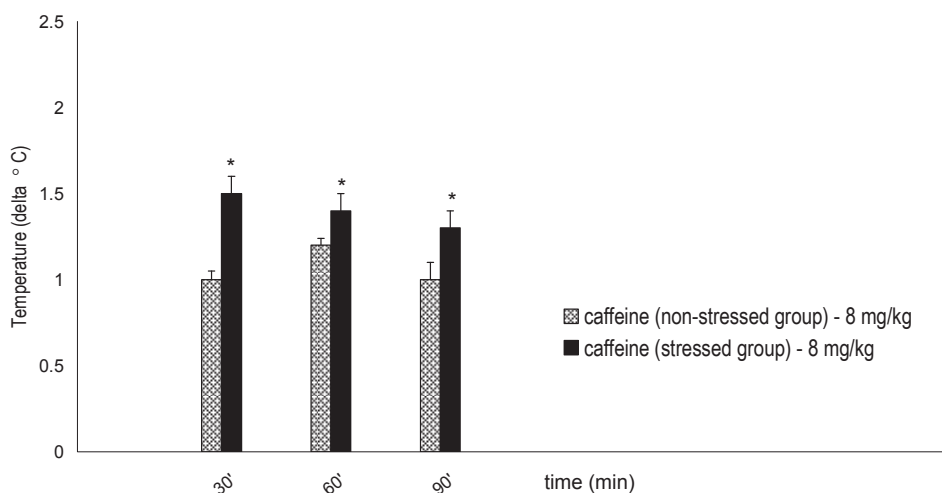
Средна стойност на промяната в телесната температура (temperature delta °C) на плъховете след приложение на 0,9% NaCl (0,1 ml/100g p.o. и i.p.). Статистическа значимост спрямо NaCl (non-stressed group): \*\*P < 0,01.

**6. Промяна в телесната температура на плъхове в норма (non-stressed group) и плъхове с модел на депресия (stressed group) при хронично приложение на кофеин**

Хипертермичният ефект на кофеин в доза 8 mg/kg/24 h при плъхове с експериментален модел на депресия бе статистически значимо изразен (\*P < 0,05) от този, установен при плъховете в норма на 30-ата, 60-ата и 90-ата min след апликацията на термисторните проби (фиг. 4).

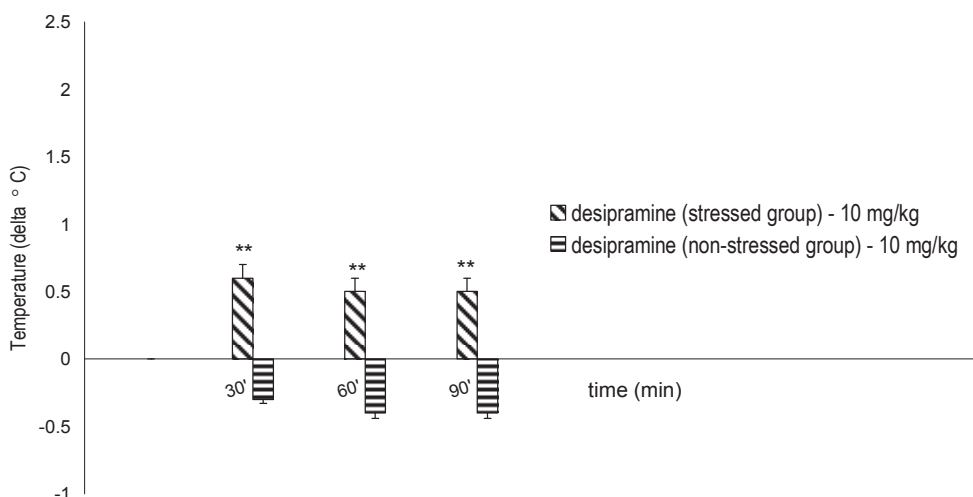
**7. Промяна в телесната температура на плъхове в норма (non-stressed group) и плъхове с модел на депресия (stressed group) при хронично приложение на дезипрамин**

Предизвиканото понижаване на телесната температура от дезипрамин, в доза 10 mg/kg/24 h при плъхове в норма, бе променено в посока на значимо повишаване на телесната температура у плъховете с експериментален модел на депресия при мониториране на 30-ата, 60-ата и 90-ата min след апликацията на термисторните проби (\*\*P < 0,01) (фиг. 5).



**Фиг. 4.** Промяна в телесната температура на плъхове в норма (non-stressed group) и плъхове с модел на депресия (stressed group) след хронично приложение на кофеин

Средна стойност на промяната в телесната температура (temperature delta °C) на плъховете след приложение на caffeine (8 mg/kg/24 h p.o.). Статистическа значимост спрямо caffeine (non-stressed group): \*P < 0,05.



**Фиг. 5.** Промяна в телесната температура на плъхове в норма (non-stressed group) и плъхове с модел на депресия (stressed group) след хронично приложение на дезипрамин

Средна стойност на промяната в телесната температура (temperature delta °C) на плъховете след приложение на desipramine (10 mg/kg/24 h i.p.). Статистическа значимост спрямо desipramine (non-stressed group): \*\*P < 0,01.

### ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от нашето изследване демонстрират развитието на хипертермични ефекти при хронично приложение на кофеин както при плъховете в норма, така и при плъховете с модел на депресия. Повишаването на телесната температура след хронично прилагане на кофеин в ниска доза показва отсъствие на развитие на толерантност към хипертермичния му ефект. В експериментални изследвания е наблюдавано развитие на толерантност към хипотермичния ефект на кофеина и липса на толерантност към хипертермичния му ефект [18]. Според Gourine et al. ефектите на кофеина върху телесната температура на плъхове са обусловени от блокиране на A<sub>2</sub>-рецепторите в хипоталамуса и мозъчния

ствол [6]. Вероятно терморегулаторните ефекти на кофеина се модулират от взаимодействието му с други невротрансмитери, включени в терморегулаторните процеси, като напр. норадреналин, серотонин, допамин и ендогенни опиоиди. В механизма на кофеин-индуцираната хипертермия се обсъждат повишено освобождаване на катехоламини и ускорен метаболизъм [9]. При едновременно приемане на кофеин и субституирани амфетаминови производни (MDMA, MDA) се наблюдава хипертермия и намаляване на мозъчната концентрация на серотонина [11]. Пълният конкурентен антагонист на опиоидните рецептори налоксон, въведен преди кофеина, предизвиква намаляване на хипотермичната реакция на кофеина [4].

При хронично приложение на дезипрамин ние наблюдавахме понижаване на телесната температура на плъховете в норма. Дезипраминът инхибира невроналното захващане (reuptake или uptake I) на невротрансмитерите норадреналин и серотонин. Като вторичен амин дезипрамин повлиява поизбирателно обратното захващане на норадреналин, отколкото на серотонин. Експериментални данни показват, че интраперитонеалното приложение на дезипрамин предизвиква доза-зависимо повишаване на мозъчната концентрация на ГАВА [15]. В механизма на хипотермията, индуцирана при хронично прилагане на дезипрамин, се обсъжда down-регулация на  $\beta$ -адренорецепторите и up-регулация на  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -адренорецепторите [3]. Освен това при хронично приложение на дезипрамин се установява функционална up-регулация на супраспиналните и спиналните 5-HT<sub>1A</sub>-рецептори [10].

Повишаването на телесната температура, предизвиквано от психичен стрес, се дефинира като стрес-индуцирана хипертермия (SIH) или психогенна треска ("psychogenic fever"). Стрес-индуцирана хипертермия е описана както у човека, така и при различни животински видове, вкл. плъхове и мишки [2, 8, 25]. Експозицията на хроничен стрес предизвиква дълготрайни промени в телесната температура на експериментални животни. В условията на хроничен стрес при плъхове е установено повишаване на телесната температура през светлия период на денонощието [12, 19].

Данните от настоящото проучване показват понижаване на хипертермичната реакция при стресираната група плъхове след хроничното въвеждане на трицикличния антидепресант дезипрамин. Експериментални данни установяват по-голямо значение на норадренергичната система, отколкото на серотонинергичната в механизма на антидепресивното действие на дезипрамин при модел на депресия у мишки с хронично прилагане на стресогени в непредсказуем ред [22].

Резултатите в нашето изследване подкрепят хипотезата за участието на централната пуринергична медиаторна система в терморегулаторните промени, настъпващи при хронична експозиция на стресогени, прилагани в непредсказуем ред у плъхове.

*Тази разработка е финансирана от СНМ – МУ – София, Договор 35/2010.*

### Библиография

- Anisman, H. et R. M. Zacharko. Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors. – Br. J. Psychiatry, 1992, **160**, 36-43.
- Briese, E. Emotional hyperthermia and performance in humans. – Physiol. Behav., **58**, 1995, 615-618.
- Deupree J. D., W. J. Burke et D. B. Bylund. Alpha-2 adrenergic-induced changes in rectal temperature in adult and 13-day old rats following acute and repeated desipramine administration. – BMC Pharmacol., **8**, 2008, 17.
- Durcan, M. J. et P. F. Morgan. Opioid receptor mediation of the hypothermic response to caffeine. – Eur. J. Pharmacol., **224**, 1992, № 2-3, 151-156.
- Ferre, S. An update on the mechanisms of psychostimulant effects of caffeine. – J. Neurochem., **105**, 2008, 1067-1079.
- Gourine, A. V. et al. Involvement of purinergic signaling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. – Br. J. Pharmacol., **135**, 2002, 2047-2055.
- Heim, C. et C. B. Nemeroff. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. – Biol. Psychiatry, **49**, 2001, 1023-1039.
- Kluger, M. J. et al. Further evidence that stress hyperthermia is a fever. – Physiol. Behav., **39**, 1987, 763-766.
- Lin, M. T., A. Chandra et G. G. Liu. The effects of theophylline and caffeine on thermoregulatory functions of rats at different ambient temperatures. – J. Pharm. Pharmacol., 1980, **32**, 204-208.
- Lund, A., N. Mjelle-Jolly et K. Hole. Desipramine, administered chronically, influences 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub>-receptors, as measured by behavioral tests and receptor binding in rats. – Neuropharmacol., **31**, 1992, № 1, 25-32.
- McNamara, R. et al. Caffeine promotes hyperthermia and serotonergic loss following co-administration of the substituted amphetamines, MDMA ("Ecstasy") and MDA ("Love"). – Neuropharmacol., **50**, 2006, № 16, 69-80.
- Meerlo, P. et al. Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. – Physiol. Behav., **59**, 1996, 735-739.
- Meyer, L. et J. Caston. Stress alters caffeine action on investigatory behaviour and behavioural inhibition in the mouse. – Behav. Brain Res., **149**, 2004, 87-93.
- Nikolov, R. et al. Effects of caffeine on body temperature of rats in norm and depression. – Pharmacy, **56**, 2009, № 1-4, 10-14.
- Patel, G. J. et al. Effect of desipramine and pargyline on brain gamma-aminobutyric acid. – Biochem. Pharmacol., **24**, 1975, №1, 57-60.
- Pechlivanova, D. et al. Dose-dependent effects of caffeine in a chronic mild stress model of depression in rats. – Behav. Brain Res., **209**, 2010, № 2, 205-211.
- Rosow, C.E. et al. Opiates and thermoregulation in mice. I. Agonists. – J. Pharmacol. Exp. Ther., **213**, 1980, 273-283.
- Schlosberg, A. J. Temperature responses in rats after acute and chronic administration of caffeine. – Pharmacol. Biochem. Behav., **18**, 1983, № 6, 935-942.
- Tornatzky, W. et K. A. Miczek. Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. – Physiol. Behav., **53**, 1993, 983-993.
- Wager-Srdar, S. A. et al. Thermoregulatory effects of purines and caffeine. – Life Sci., **33**, 1983, 2431-2438.
- Willner, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. – Psychopharmacology, 1997, **134**, № 4, 319-329.
- Yalcin I., F. Aksu et C. Belzung. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. – Eur. J. Pharmacol., **514**, 2005, 165-174.
- Zarrindast, M. R. Involvement of adenosine receptors in mouse thermoregulation. – J. Psychopharmacol., **7**, 1993, № 4, 365-370.
- Zarrindast, M. R. et M. R. Heidari. On the mechanisms by which theophylline changes core body temperature in mice. – Eur. J. Pharmacol., **257**, 1994, №1-2, 13-20.
- Zethof, T. J. J. et al. Stress-induced hyperthermia in mice: a methodological study. – Physiol. Behav., **55**, 1994, 109-115.