

TARTU ÜLIKOOL

Arstiteaduskond

Füsioloogia instituut

KERTU RÜNKORG

**CCK2 RETSEPTORI GENEETILISE VÄLJALÜLITAMISE
MÕJU OPIOID-ERGILISE SÜSTEEMI TALITLUSELE AJUS**

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendaja: prof. EERO VASAR

Tartu 2005

SISUKORD

LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. CCK ja selle retseptorid kesknärvisüsteemis	6
1.2. CCK2R puudulikkusega hiirte iseloomustus.....	8
1.3. CCK-ergilise süsteemi seosed opioidergilise süsteemiga	11
2. TÖÖ EESMÄRGID	13
3. MATERJALID JA MEETODID	14
3.1. Katseloomad	14
3.2. Ravimid	15
3.3. Käitumise uurimine	15
3.4. Liikumisaktiivsuse test	15
3.5. Kohatingimise uuringud	16
3.6. Radioligandi sidumiskatsed	17
3.7. Statistiline analüüs	18
4. TULEMUSED	19
4.1. Liikumisaktiivsus	19
4.2. Kohatingimine	24
4.3. Radioligandi sidumiskatsed	25
5. TULEMUSTE ARUTELU	27
JÄRELDUSED	31
ABSTRACT	37
KIRJANDUS	32

LÜHENDID

CCK	koletsüstokiniin (<i>cholecystokinin</i>)
CCK1R	esimest tüüpi koletsüstokiniini retseptor
CCK2R	teist tüüpi koletsüstokiniini retseptor
CCK-8	koletsüstokiniini oktapeptiid
GABA	γ -amino-võihape (<i>gamma-amino butyric acid</i>)
NMDA	N-metüül-D-asparagiinhape (<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>)
ANOVA	variatsioon analüüs (<i>analysis of variance</i>)
SEM	standardviga (<i>standard error of mean</i>)

SISSEJUHATUS

Koletsüstokiniin (CCK) on peptiidse struktuuriga neurohormoon, mis algselt avastati seedetraktis. Peamisteks CCK vabanemise vallandajateks kaksteistsõrmiksoole limaskesta endokriinrakkudest on valkude ja rasvade seedeproduktid, mis on jõudnud maost soolde. CCK mõjul sapipõis tõmbub kokku ja toimub sapi eritumine soolde. Suureneb ka kõhunäärme ensüümide rikka seedenõre eritumine. Samuti osaleb soolest vabanenud CCK ütnärvi vahendusel küllastustunde tekkes.

Vanderhaegheni jt. kirjeldasid 1975. aastal esmakordselt imetajate kesknärvisüsteemis CCK kui väikest peptiidmolekuli, millel on gastriinile sarnane immuunoreaktiivsus. Hiljem on selgunud, et koletsüstokiniin on üldse üks kõige laialdasemalt levinud neuropeptiid ajus. CCK esineb erinevate bioloogiliselt aktiivsete molekulaarsete vormidena (CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-22, sulfateeritud CCK-8 ja CCK-7, mittesulfateeritud CCK-8 ja CCK-7, CCK-5 ja CCK-4), mis kõik pärinevad 115 aminohappest koosnevast pre-proCCK molekulist (Rehfeld and Nielsen, 1995). Selle viiest peptiidist koosnev C-terminaalne osa on struktuurselt homoloogne gastriini molekuliga (Mutt 1980). CCK molekulide maksimaalse bioloogilise aktiivsuse avaldumiseks on vajalik, et nende C-terminaalne ots oleks α -amideeritud ja C-terminaalses osas seitsmendas positsioonis paiknev türosiin oleks sulfateeritud.

CCK toimet vahendavad kaks erinevat tüüpi retseptorit, kusjuures mõlemad on G-valkseoselised. Need retseptorid on kahe erineva geeni produktid, omavad erinevat afiinsust erinevate CCK molekulide suhtes, nende paiknemine organismis ja molekulaarne struktuur pole sarnane. CCK₁ retseptorid (CCK1R) paiknevad peamiselt perifeerias (seedetraktis) ja omavad suurt tundlikkust sulfateeritud CCK-8 suhtes. CCK₂ retseptorid (CCK2R) lokaliseeruvad ajus ja mao limaskestas ning omavad suurt afiinsust erinevate sulfateeritud ja sulfateerimata CCK molekulide kui ka gastriini suhtes. CCK1R ja CCK2R vahendusel osaleb kesknärvisüsteemis paiknev CCK erinevate neurobioloogiliste protsesside moduleerimises ja kontrollis. Mitmekülgselt on uuritud CCK mõju toitumiskäitumisele, ärevusele,

õppimisele, mälule ning valutundlikkusele. CCK füsioloogilistest toimetest on tähtsal kohal interaktsioon erinevate virgatsainetega (dopamiin, serotoniin, noradrenaliin, γ -aminovõihape, glutamaat ja opioidsed peptiidid), kusjuures mitmel juhul on CCK nende virgatsainete kaasmediaatoriks.

CCK on opioidsete peptiidide kaasmediaatoriks mitmetes ajupiirkondades. CCK toimed on sageli vastupidised opioidsetele peptiididele, kusjuures antud efekti vahendamisel osalevad CCK2R'd. Tulenevalt CCK ja opioidsete peptiidide tihedast koostoimest seab käesolev töö enesele eesmärgiks uurida, millist mõju avaldab suunatud CCK2R geneetiline mutatsioon opioidergilisele süsteemile ja selle süsteemi poolt reguleeritud käitumisele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. CCK ja selle retseptorid kesknärvisüsteemis

Imetajate kesknärvisüsteemis võib CCK leida enamikus aju piirkondades, välja arvatud väikeaju (Rehfeld jt., 1992). Peaaju koore immunohistoloogilistel uuringutel on näidatud, et CCK leidub peentes närvilõpmetes kõigis neokorteksi kihtides (Larsson jt., 1979). Kortikaalsed neuronid CCK üldiselt ei tooda. CCK ekspresseerivaid neurone võib leida mõningal määral neokorteksi II-IV kihis. Ajukoos on CCK sisaldavate jätkete tihedus suurim entorhinaalkoore piirkonnas. Arvukalt on CCK tootvaid neuroneid hipokampuses, mandeltuuma piirkonnas, juttkehas ja hüpotaalamuses. Mõõdukamalt esineb CCK-ergilisi neuroneid septumi lateraalsetes tuumades, periakveduktaalses hallaines, keskajus ja *area postrema* piirkonnas.

CCK interakteerub kahte tüüpi retseptoritega - CCK1R ja CCK2R. Mõlemat retseptorit kodeerivad geenid on organiseeritud sarnasel viisil, koosnedes viiest eksonist ja neljast intronist. Nendel retseptorite tüüpidel on homoloogsed eksoni/introni liitekohad. See tähendab, et mõlemal juhul I ekson kodeerib N-terminaalset rakuvälist osa, II ekson on esimest membraani läbivat osa kodeeriva ala algusest kuni kolmandat membraani läbivat osa kodeeriva ala alguseni. III ekson on kolmandat membraani läbivat osa kodeeriva ala algusest kuni viienda membraani läbiva osa kodeeriva ala alguseni. IV ekson kodeerib ala viienda membraani läbiva osa algusest kuni kolmanda rakusisese lingu esimese neljandiku lõpuni. V ekson kodeerib ülejäänud retseptorit kuni lõpuni (Song jt., 1993; Miller jt., 1995; Wank jt., 1995; Inoue jt., 1997). CCK2R geenil esineb kolm splaisingu varianti. Sellepärast eristatakse sellel retseptoril kolme isovormi. Esimese ja teise isovormi puhul toimub splaisimine erinevusena IV eksoni piirkonnas (Song jt., 1993). Tulemusena on teisel variandil viie aminohappe võrra lühem kolmas rakusisene ling. Seda pisut lühemat retseptorvalku leidub peamiselt maolimaskesta rakkudes. Esimese ja teise isovormi võrdlemisel pole leitud erinevusi retseptorite afiinsuses või rakusisestes vahenduse mehhanismides (Ito jt., 1993, 1994). Kolmandat splaisinguvariandi puhul on tegemist N-terminaalselt trunkeeritud retseptorval-

guga Δ CCK2R. Δ CCK2R algab täispikal valgul 67's positsioonis paikneva metioniiniga esimeses membraani läbivas alas. Rohkem erinevusi võrreldes täispika valgu järjestusega ei ole. Δ CCK2R retseptori puhul splaisitakse I eksoni asemel alternatiivne I ekson, mis kodeerib 5' mittetransleeritavat ala. II eksonis esimene metioniini kodeeriv järjestus on Δ CCK2R jaoks translatsiooni algatamise kohaks. Δ CCK2R afiinsus looduslike agonistide suhtes on oluliselt madalam võrreldes täispikkade retseptorvalkudega (Miyake, 1995). Seda retseptori isovormi leidub mõningal määral nii ajukoos, mao limaskestas, kui ka kõhunäärmes.

Nii CCK1R kui ka CCK2R puhul on tegemist tüüpilise G-valk seoselise retseptoriga. CCK1R rakusiseseid vahendusmehhanisme on uuritud peamiselt pankrease aatsinuserakkudel ja on leitud, et see retseptorvalk on seotud G_q , G_{11} või G_s valguga, s.t. rakusisest signaali ülekannet vahendab fosfolipaas C ja inositol trifosfaat, adenülaaditsüklaas ja cAMP ning fosfolipaas A_2 ja arahhidoonhape. CCK2R rakusisestest vahendusmehhanismidest on teada vähem, kuna isoleeritud neuronite ja mao limaskesta rakkude uurimine on tehniliselt komplitseeritum. On võimalik, et CCK2R on seotud nii G_q , G_{11} või G_s valguga ja vastavate rakusiseste signalisatsiooni radadega (Noble jt., 1999).

Kesknärvisüsteemis esinevad valdavalt CCK2R. CCK1R leidub oluliselt vähem. CCK2R spetsiifiliste radioligandite sidumiskatsete järgi on teada, et CCK2R esineb näriliste eesaju järgmistes struktuurides: haistmissibulates, haistmistuumades, mandelkehades, neokorteksi III ja IV kihis (eelkõige *cortex retrosplenialis*'es, *cortex cinguli*'s ja *cortex piriformis*'es), *nucleus accumbens*'is, juttkehades ja hipokampustes. Vaheajus leidub CCK2R nii taalamuse, kui ka hüpotaalamuse erinevates tuumades. Keskajus esineb CCK2R *substantia nigra*'s, *nuc. paraventricularis*'es, *colliculi superiores*'es ja *inferiores*'es, *nn. parabrachiales*'tes, *nn. raphe dorsales*'tes ja periakvaduktaalses hallaines. Aju tüves on CCK2R vähesel või mõõdukalt määral *nucleus pontini*'s, *nucleus olivaris superioris*'es ja *nucleus tracti solitarii*'s. Seljaajus leidub CCK2R mõõdukalt nii hallaine dorsaalsarves kui ka ventraalsarves.

CCK1R spetsiifiliste radioligandite sidumiskatsete järgi on näriliste tsentraalsete CCK1R paiknemise kohtadeks: *area postrema*, *nucleus interpeduncularis*, *nucleus medialis tracti solitarii*, *nucleus habenularis*, *amygdala centralis* ja hüpotalamus. CCK1R mRNA on

leitud veel haistmissüsteemiga seotud tuumadest, hipokampusest, ajutüves kraniaalnärvide mootorsetest tuumadest ja *nucleus accumbens*'ist (Noble jt., 1999).

1.2. CCK2R puudulikkusega hiirte iseloomustus

CCK2R puudulikkusega hiired loodi Aki Nagata poolt 1996. a. (Nagata jt., 1996). Nad kloneerisid spetsiaalsesse geenisihtimise vektorisse kogu hiire CCK2R genoomse DNA järjestuse ja asendasid selles osa teist, kogu kolmandat, neljandat ja viiendat eksonit kodeeriva ala LacZ ja pGK-neo kassetiga. Tulemusena kadus selles geenis ära enamus retseptori membraani läbivast osast. Alles jäi vaid retseptori esimesed 108 aminohapet esimesest membraani läbivast osast. Geenisihtimise vektorisse jäi genoomsest järjestusest alles 12000 aluspaarist koosnev homoloogne piirkond teisest eksonist eespool ja 7000 aluspaarist koosnev homoloogne piirkond viiendast eksonist tagapool. Genoomse järjestuse 5' otsa lisati juurde veel ka difteeria toksiooni A-osa kodeeriv järjestus. Lineariseeritud vektoriga elektroporeeritud hiire embrüonaalsed tüvirakkude seast selekteeriti geneditsiini suhtes resistentsed kloonid. Homoloogse rekombinatsiooni olemasolu rakukloonis selgitati välja *Southern blot* analüüsiga. „Õigetest“ kloonidest pärit tüvirakud süstiti C57BL/6J emaste hiirte blastotsüsti. Sündinud kimäärid paaritati C57BL/6J ja 129sv hiirtega, et saada heterosügootseid F1 põlvkonna hiiri. Edasispidi on erinevates töödes uuritud põhiliselt mutatsiooni suhtes homosügootseid ($-/-$), kuid vahel ka heterosügootseid ($+/-$) CCK2R puudulikkusega hiiri. Kontrollrühmana on kasutatud samasoolisi ja samaealisi mutatsioonita pesakaaslasi ($+/+$) (metsikut tüüpi hiired). Tekitatud mutatsioon pärandub järgmitele põlvkondadele vastavalt Mendeli seadustele. See mutatsioon ei kahjusta embrüogeneesi. Homosügootsed ($-/-$) hiired on fertiilsed, silmaga nähtavaid kõrvalekaldeid neil ei esine, nende kehakaal ei erine oluliselt samaealiste ja samasooliste metsikut tüüpi hiirte kehakaalust.

Homosügootsetel ($-/-$) hiirtel ei esine CCK2R mRNA mao limaskestas, peaaju koores, ja basaalganglionites. Heterosügootsetel ($+/-$) hiirtel on neis kudedes CCK2R mRNA tase

võrreldes metsikut tüüpi kontrollrühmaga mõnevõrra väiksem. See sihitud mutatsioon hiirte CCK1R mRNA taset erinevates kudedes ei mõjuta.

Radioligandi sidumiskatsetes on leitud, et homosügootsete ($-/-$) hiirte ajukoest valmistatud membraanifraktsioon ei sisalda CCK-8 ja gastriinile spetsiifilisi sidumiskohti. Hetro-sügootsetel ($+/-$) hiirtel on CCK-8 ja gastriinile spetsiifiliste sidumiskohtade arv ajukoest valmistatud membraanifraktsioonis vähenenud, sidumise afiinsus ei erine metsiku hiire omast. Kõhunäärmes olevate CCK1R arv ja afiinsus naturaalsete agonistide suhtes on mutantsetel hiirtel samasugune nagu kontrollrühmal.

CCK2R ($-/-$) hiirtel esineb hüpergastrineemia ja neil on basaalne maohappe sekretsioon oluliselt väiksem võrreldes kontrollrühmaga. Homosügootsete ($-/-$) hiirte hüpergastrineemiat ei mõjuta prootonpumba inhibiitori omeprasooli kestev manustamine. Viimane põhjustab normaalsetel hiirtel maohappe eritumise vähenemise ja seeläbi vereseerumi gastriini taseme tõusu.

Histoloogilisel uuringul avastati homosügootsetel ($-/-$) hiirtel tugev maolimaskesta at-roofia. Oluliselt on vähenenud parietaalsete ja enterokromaffinrakkude arv. Mao antraal-osas on vähenenud somatostatiini produtseerivate rakkude arv ja suurenenud gastriini pro-dutseerivate rakkude arv (Langhans jt., 1997). Pikaajaline omeprasooli manustamine põh-justas kontrollrühma hiirtel maolimaskesta hüpertrofeerumise, homosügootsetel ($-/-$) hiir-tel see ravim aga limaskesta atroofilisi muutusi ei kõrvaldanud (Nagata jt., 1996).

Mao tühjenemise kiirus on isastel homosügootsetel ($-/-$) hiirtel oluliselt kiirem võrrel-des kontrollrühmaga. Sulfateeritud CCK-8 manustamine vähendab mao tühjenemise kiirust oluliselt nii homosügootsetel ($-/-$) kui ka metsikut tüüpi ($+/+$) hiirtel (Miyasaka jt., 2004). Ööpäevane energia tarbimine on isastel homosügootsetel ($-/-$) hiirtel oluliselt suurem kui metsikut tüüpi loomadel (Miyasaka jt., 2001).

CCK2R puudulikkusega hiirtel on võrreldes metsikut tüüpi hiirtega oluliselt kehvemad tulemused Y puuris teostatud kahefaasilises ruumilise mälu testis (Sebret jt., 1999). Neil on ilmnenud halvem sooritus tagakeha üles vedamise testis (Daugé jt., 2001a) ja *rotarod*'il (Daugé jt., 2001a; Kõks jt., 2001), mille põhjuseks võib olla lihastoonuse ja lihaskontrakt-

siooni jõu tasakaalu häired. CCK2R geeni väljalülitamine on põhjustanud muutusi ka hiirte tsentraalses dopamiinergilises ja opioidide süsteemis. Homosügootsetel (–/–) hiirtel on leitud juttkehas suurenenud dopamiini D₂ retseptorite tihedus (Kõks jt., 2001). Motoorse aktiivsuse mõõtmise katsetes on eelnevalt katsetingimustega kohastamata homosügootsed (–/–) hiired olnud mõnevõrra aktiivsemad ja eelnev dopamiini D₂ retseptori antagonisti sulpiriidi manustamine kõrvaldab selle erinevuse. Samas annuses manustatud sulpiriid ei mõjutanud oluliselt metsikut tüüpi hiirte mootorikat (Daugé jt., 2001b). Samas töös uuriti ka amfetamiini ja kokaiini toimet CCK2R puudulikkusega hiirte liikumisaktiivsusele. Leiti, et amfetamiini mootorikat stimuleeriv toime oli oluliselt enam väljendunud homosügootsetel (–/–) hiirtel, kokaiini mootorikat stimuleeriv toime oli aga tugevam metsikut tüüpi (+/+) kontrollrühmal. Amfetamiini toimet CCK2R puudulikkusega hiirte mootorikale on uuritud ka meie laboris, kuid saime ülalkirjeldatust mõnevõrra erinevad tulemused (Kõks jt., 2001). Leidsime, et amfetamiin madalamates doosides homosügootsetel (–/–) hiirtel mootorikat ei stimuleerinud, samal ajal kui kontrollrühmale oli sellel annusel toime olemas. Amfetamiini suure annuse toimel aga suurenes homosügootsete (–/–) hiirte motoorne aktiivsus metsikut tüüpi (+/+) hiirtest oluliselt enam. Lisaks sellele ilmnes, et apomorfiini mootorikat pärssiv toime on CCK2R puudulikkusega hiirte rühmal oluliselt enam väljendunud võrreldes kontrollrühmaga.

On uuritud ka morfiini toimet katseloomade liikumisaktiivsusele. Peale korduvat manustamist oli morfiini mootorikat stimuleeriv toime homosügootsetele (–/–) hiirtele tugevam kui metsikut tüüpi (+/+) hiirtele. See tähendab, et mutantsetel hiirtel kujunes käitumuslik sensitiseerimine välja kergemini (Daugé jt., 2001). Võrreldes metsikut tüüpi hiirtega on homosügootsetele (–/–) hiirtele ka tugevam morfiini ja enkefaliinide katabolismi inhibiitori RB101 ühekordse annuse mootorikat stimuleeriv toime (Pommier jt., 2002).

CCK2R kaudu pärsib CCK morfiini ja endogeensete opioidide analgeetilist toimet (Noble jt., 1993). Hargreaves'i plantaaranalgeesia testis oli CCK2R puudulikkusega hiirtel madalam valu lävi kui nende metsikut tüüpi pesakaaslastel. Morfiin toimis samas aga homosügootsetel (–/–) hiirtele tugevama valuvaigistina kui kontrollrühma hiirtele (Veraksitš jt., 2002). Metsikut tüüpi hiirtest madalam valutundlikkus ja morfiini tugevam

toimivus ilmnes homosügootsetel (–/–) hiirtel kuuma plaadi testis. Kui hinnata ärahüppe reaktsiooni ilmnemise kiiruse järgi valutaluvust, siis võib väita, et CCK2R puudulikkusega hiired taluvad valu võrreldes metsikut tüüpi liigikaaslastega halvemini. Morfiin pikendas ärahüppamise reaktsiooni ilmnemise aega homosügootsetel (–/–) hiirtel oluliselt vähem kui metsikut tüüpi (+/+) loomadel (Pommier jt., 2002). Väiksema valutaluvuse kõrvaldab CCK2R puudulikkusega hiirtel eelnev NMDA antagonisti MK-801 manustamine (Pommier jt., 2002).

Uuritud on ka CCK2R puudulikkusega hiirte GABA-ergilist süsteemi. On leitud, et mutantsetel hiirtel on suurem bensodiasepiinide sidumiskohtade arv väikeajus (Raud jt., 2003). Rotarodi testis homosügootsete (–/–) ja metsikut tüüpi (+/+) hiirte sooritusel erinevusi ei sedastatud. Erinevused ilmnesisid, kui manustati bensodiasepiini retseptorite agonisti diasepaami. Diasepaami toime häiris motoorne koordinatsioon homosügootsetel (–/–) hiirtel oluliselt enam. Tõstetud pluss-puuri testis olid homosügootsed (–/–) hiired võrreldes kontrollrühmaga oluliselt uudishimulikud ja vähem kartlikud. Ka selles testis pärssis diasepaam homosügootsete (–/–) hiirte uudistamisaktiivsust metsikut tüüpi (+/+) hiirtest oluliselt enam. Diasepaami anksiolüütiline toime oli tugevam metsikut tüüpi hiirtel (Raud jt. 2003).

1.3. CCK-ergilise süsteemi seosed opioidergilise süsteemiga

Anatoomilised ja histoloogilised uuringud osutavad, et CCK- ja opioidergiline süsteem paiknevad kesknärvisüsteemi osades lähestikku (Stengaard-Pedersen ja Larsson, 1981; Gall jt., 1987; Pohl jt., 1990). See on olnud aluseks paljudele edasistele uuringutele, selgitamaks nende kahe süsteemi omavahelisi funktsionaalseid seoseid. CCK mõjutab opioidergilise süsteemi kaudu valu tajumist. Mõned autorid kirjeldasid, kuidas, CCK-8 ja tema analoogid omavad suurtes annustes valuvaigistavat toimet, mis on kõrvaldatav naloksooni, s.o. opioidi retseptorite antagonisti, eelneva manustamisega (Barbaz jt., 1986; Hill jt., 1987; Williams jt., 1997). 1983. aastal kirjeldasid Faris kaasautoritega, et CCK vähendab endogeensete opioidide valuvaigistavat toimet. Lisaks leiti, et erinevate CCK retseptorite anta-

gonistide manustamine potenseerib opioidi poolt esilekutsutud analgeesiat (Watkins jt., 1985). See kinnitab arvamust, et CCK toimib pigem endogeense opioidergilise süsteemi funktsionaalse antagonistina. Spetsiifiliste CCK2R antagonistide kasutamise abil on leitud, et endogeensete opioidide taset langetab CCK just CCK2 retseptori vahendusel (Dourish jt., 1990; Derrien jt., 1993; Valverde jt., 1994). CCK1R stimulatsioon põhjustab endogeensete opioidide vabanemine suurenemise ja otseselt või kaudselt siganaali ülekande paranemise μ -opioidi retseptorite vahendusel (Noble jt., 1993). Opioidergiline süsteem omakorda mõjutab CCK vabanemist. Kui stimuleerida μ -opioidi retseptoreid, väheneb CCK vabanemine kesknärvisüsteemis. δ -Opioidi retseptorite stimulatsioon põhjustab vastupidist toimet, sest suureneb CCK vabanemine närvilõpmetest (Benoliel jt., 1991; 1992; 1994; Ruiz-Gayo jt., 1992).

CCK- ja opioidergilise süsteemi vastastikuse moduleeriva toime kohta on saadud informatsiooni mitmetest käitumiskatsetest. Mõlemad virgatsainete süsteemid mõjutavad tähelepanu, ärevuse ja motivatsioonide mehhanisme ning sellepärast on see interaktsioon tõenäoliselt oluline depressiivsete seisundite kujunemisel. Enkefaliinide lammutamise inhibiitor RB101 toimib sarnaselt klassikaliste antidepressantidega (imipramiin, desimipramiin, amitriptüliin) kõigis peamistes antidepressiivse toime uurimiseks loodud käitumistestides (Porsolt'i sundujumistestis, liikumise tingitud supressiooni testis, õpitud abituse testis). CCK1R ja CCK2R selektiivsed antagonistid mõjustavad RB101 antidepressantide taolist toimet teineteisele vastupidises suunas. CCK1R antagonist L-364,718 kõrvaldab RB101 toime, samas aga CCK2R antagonist L-365,260 potenseerib seda (Smadja jt., 1995).

Üldiselt ollakse arvamusel, et CCK2R antagonistid ei mõjusta oluliselt opioidide toimega seotud subjektiivseid tajuelamusi. Samas on teada, et CCK2R antagonistid potenseerivad morfiinist tingitud kohaeelistuse kujunemist. Perifeerselt manustatud L-365,260, annuses 1 mg/kg tingib ise nõrga, kuid olulise kohaeelistuse kujunemise rottidel. L-365,260 ja PD-134,308 vähendavad morfiinist sõltumatel katseloomadel naloksooniga tingitud kohavältimist, kusjuures CCK1R antagonistidel see toime puudub (Higgins jt., 1992; Valverde jt., 1996).

2. TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva uuringu eesmärgiks oli uurida CCK- ja opioidergilise süsteemi interaktsiooni käitumise regulatsioonis, kasutades selleks CCK2R puudulikkusega hiiri. Seejuures seati ülesandeks vastata järgmistele spetsiifilisematele küsimustele:

1. Kuidas mõjutab CCK2R geneetiline väljalülitamine ühelt poolt morfiini, s.o. μ -opioidi retseptorite agonisti, ja teiselt poolt naloksooni, s.o. opioidi retseptorite antagonist toimet katseloomade liikumisaktiivsusele?
2. Kuidas mõjub CCK2R geneetiline väljalülitamine morfiinist tingitud kohaeelisele ja naloksoonist tingitud kohavältimisele?
3. Kas CCK2R geneetiline väljalülitamine mõjustab [3 H]-diprenorfiini (opioidi retseptori ligandi) sidumiskarakteristikuid (afiinsust ja sidumiskohtade arvu) eesaju struktuurides?
4. Millised kohastumuslikud muutused leiavad aset opioidergilises süsteemis CCK2R geneetilise väljalülitamise mõjul?

3. MATERJALID JA MEETODID

3.1. Katseloomad

Käesolevas töös uuriti Nagata ja kaasautorite (1996) poolt loodud CCK2R puudulikkusega hiiri. Katseloomade paljundamine viidi läbi Tartu Ülikooli Füsioloogia instituudis. Genotüüp määrati polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR) kasutades praimereid HE2F (TGG AGT TGA CCA TTC GAA TCA C) ja LacZrev (GTG CTG CAA GGC GAT TAA GTT G) mutantse alleeli jaoks ning HE3F (TAT CAG TGA GTG TGT CCA CTC T) ja HE3R (ACA TTT GTT GGA CAC GTT CAC) metsikut tüüpi alleeli jaoks.

PCR reaktsiooni läbiviimiseks kasutati järgmist protokollit: 96°C 10 min. (esimene denaturatsioon); 96°C 50 s., 60°C 50 s. ja 72°C 2 min (korrald 25 tsüklit); ja lõpuks viimaseks amplifikatsiooniks 72°C 10 min. PCR produktid säilitati 4°C juures kuni analüüsiks seni agarosgeelis elektroforeesiga.

Kokku kasutasime kõikides käitumiskatsetes ja radioligandi sidumiskatsetes 176 isast mutatsiooni suhtes homosügootset (–/–) CCK2R puudulikkusega hiirt ja kontrollrühmana 176 isast metsikut tüüpi (+/+) hiirt, kes olid homosügootsete (–/–) loomade pesakaaslased. Katseloomade vanus olid 3 kuni 4 kuud. Emaseid mutantseid hiiri ristati paljundamise käigus kuus korda C57Bl/6 hiireliinist pärit isastega, et vähendada 129sv liini geneetilist mõju.

Loomade eluruumis oli õhutemperatuur pidevalt 20±2°C, kasutati valge ja pimedade perioodi vaheldumise 12-tunnist tsüklit (valgus lülitati sisse 07.00 hommikul). Joogivesi tilgapudelitest ja granuleeritud spetsiaaltoit oli loomadele pidevalt piiramatult koguses kättesaadav. Kõik loomadega teostatud protseduurid olid heaks kiidetud Tartu Ülikooli Loomkatsete Eetika Komitee poolt, olles kooskõlas 24. novembril 1986. a. välja antud Euroopa Ühenduse direktiiviga 86/609/EEC.

3.2. Ravimid

Morfiini-sulfaat (*Boehinger-Ingelheim*) ja naloksooni hüdrokloriid (*Sigma Chemical CO.*, St.Louis, MO) lahustati steriilses, pürogeenivabas 0,9% NaCl lahuses (füsioloogiline lahus) (*B.Braun Melsungen AG*). Lahustatud ravimid süstiti katseloomadele intraperitoneaalselt (i.p.) mahus 10 ml/kg. Kohatingimise katsetes kasutatud naloksooni annused (1 ja 10 mg/kg) ning morfiini annused (3 ja 9 mg/kg) valiti kirjanduses avaldatud andmetele tuginedes. Liikumisaktiivsuse hindamise testis kasutati suuremat morfiini annust, sest eelkatsed näitasid, et vaid morfiin annuses 10 mg/kg põhjustas 129sv/C57Bl/6 geneetilise taustaga hiirtel statistiliselt olulise liikumisaktiivsuse tõusu.

3.3. Käitumise uurimine

Katseloomad toodi katseruumi kohanema 1 tund enne katse algust. Kõik katsed viidi läbi päeval kella 11.00 ja 19.00 vahel, katsed kestsid 6-8 tundi järjest. Päeva jooksul võib loomade motoorne aktiivsus oluliselt varieeruda ja see võib mõjutada katsete tulemusi. Seda arvestades toimusid kõik uuringud randomiseeritud korras ja alati uuriti kontrollrühma (+/+) hiiri paralleelselt homosügootsete (-/-) hiirtega. Liikumisaktiivsuse hindamise ja kohatingimise testides kasutati erinevaid katseloomade rühmi. Radioligandi sidumiskatsetes uuriti loomi, kes ei olnud varem osalenud käitumiseksperimentides.

3.4. Liikumisaktiivsuse test

Liikumisaktiivsuse hindamiseks kasutati spetsiaalset fotoelektrilist jälgimise süsteemi, mis oli ühendatud arvutiga (*TSE Technical & Scientific Equipment GMBH*). Hiired asetati läbi-paistvatesse pleksiklaasist kastidesse (448 mm × 448mm × 450 mm), milles infrapunased kiired moodustasid kahe tasapinnalise võrgustiku. Kiirte katkemise järgi toimus katselooma asukoha määramine ruumis ja ajas. Liikumisaktiivsuse parameetrid registreeriti automaatselt spetsiaalse arvutiprogrammi abil. Kastide sisemuses oli valguse tugevuseks ~750 lux.

Peale igat testi, kui katseloom võeti kastist välja, puhastati kast hoolikalt 5% etanooli vesilahusega ja seejärel kuivatati. 30 minutilise jälgimisperioodi jooksul mõõdeti järgmiseid liikumisaktiivsust iseloomustavaid parameetreid: liikumisaeg (s), läbitud vahemaa (m), püstumiste ja nurkadesse sisenemiste arv kordades. Naloksoon ja morfiin süstiti katseloomadele kõhuõõnde 15 minutit enne eksperimendi algust. Naloksooni toimet uuriti kahes erinevas testis – katsetingimustega kohanenud ja mittekohtanenud loomadel. Esimese rühma jaoks oli katsesituatsioon uudne, teine rühm läbis eelnevalt kolmepäevase kohanemise tsükli. Hiired asetati naloksooni manustamisele eelnenud kolmel päeval üks kord päevas motorika jälgimise seadmesse, misjärel nende motoorne aktiivsus registreeriti 30 minuti jooksul. Morfiini toimet motorikale uuriti ainult eelnevalt katsetingimustega kohastatud loomadel.

3.5. Kohatingimise uuringud

Kohatingimise katsed viidi läbi spetsiaalses katseseadmes, milleks oli vaheseinaga kaheks erinevaks osaks jagatud kast. Kaks kasti poolt erinesid üksteisest seinte ja põranda värvi poolest – üks pool oli tumeroheline ja teine heleroheline. Kastis sees oli valguse tugevus ~250 lux. Vaheseinas oli lükanduksega suletav avavus. Lükandukse abil sai vastavalt vajadusele katselooma kas sulgeda ühte kasti poolde või võimaldada hiirel vabalt valida kasti kahe poole vahel. Meie poolt kasutatud katseseade koosnes kolmest sellisest kõrvuti asetatud kastist, mis võimaldab viia katseid läbi kolmel loomal korraga.

Üks kohatingimise katse kestis kokku 7 päeva ja koosnes kolmest osast: eeltingimisest, tingimisest ja järeltingimisest. Eeltingimine viidi läbi kahel esimesel päeval. Selles katse faasis said hiired vabalt liikuda mõlemasse kasti poolde. Esimesel päeval asetati iga katseloom kaks korda 15 minutiks kohatingimise kasti. Teisel päeval mõõdeti 15 minuti jooksul kasti helerohelises pooles veedetud aeg. Kolmandal päeval suleti vaheseinas olev uks ja alustati tingimist. Kohatingimine kestis 4 järgnevat päeva, kus katseloomad läbisid iga päev kaks 30 minutit kestnud tingimise perioodi. Pooltele katseloomadele manustati päeva esimesel perioodil enne kasti ühte poolde asetamist füsioloogilist lahust. Päeva teisel tingimise

perioodil aga enne asetamist kasti teise poolde morfiini (3 ja 9 mg/kg) või naloksooni (1 ja 10 mg/kg). Kõik süstimid toimusid vahetult enne tingimise perioodi algust. Morfiini manustamise järel asetati katseloom kohaeelistuse tekkimiseks kasti heledasse poolde (seda poolt katseloomad eeltingimise tulemuste järgi ei eelista) ja naloksooni manustamise järel kohavältimise tingimiseks aga kasti tumedasse, s.t. eeltingimise tulemuste järgi enam eelistatud poolde. Pooltele katseloomadele manustati füsioloogilist lahust enne mõlemasse poolde asetamist (füsioloogilise lahuse rühm). Katse viimasel, seitsmendal päeval viidi läbi üks 15 minutiline järeltingimise periood. Uks vaheseinas avati ja katseloomad võisid vabalt valida kahe kasti poole vahel. Samal ajal mõõtsime kasti heledas pooles viibimise aja. Nii eel- kui ka järeltingimise perioodi alguses asetati katseloom esmalt kasti tumedasse poolde. Peale iga katselooma viibimise lõppu kastis, kast puhastati ja pesti 5% etanoolilahusega ning kuivatati hoolikalt.

3.6. Radioligandi sidumiskatsed

Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooniga. Peaaju eemaldati kiiresti ja jahutati jääl. Järgnevalt prepareeriti välja ja eraldati järgmised struktuurid: frontaalne ja parietaalne ajukoos, juttkehad, mesolimbiline ala (*nucleus accumbens* ja *tuberculum olfactorium*) ja hipokampus. Kuult hiirelt võetud ajustruktuurid pandi kokku. Koed kaaluti ja homogeniseeriti Potter-S klaas-teflon homogenisaatoriga (1000 rpm, 12 korda) 20 ml jääkülmas 50 mM Tris-HCl puhvril (pH 7,4; 4 °C). Saadud suspensioon tsetrifugeeriti membraanide sadestamiseks (48000 x g 20 min). Supernatant valati ära ja sade suspendeeriti uuesti üles 10 ml Tris-HCl puhvriga. Suspensioon tsetrifugeeriti uuesti (48000 x g 20 min). Lõpuks suspendeeriti pestud retseptor-membraan kompleksid (kontsentratsioon 10 mg/ml) reaktsioonipuhvril (50 mM Tris-Cl; pH 7,4; 4 °C). Üldvalgu sisaldus suspensioonis määrati Bradfordin meetodil (Bradford, 1976). Seda suspensiooni kasutati radioligandi sidumiseks. Opioidi retseptorite märgistamiseks kasutati opioidi retseptorite ligandi [³H]-diprenorfiini (spetsiifiline aktiivsus: 58,0 Ci/mmol, *Amersham Radiochemicals*). [³H]-diprenorfiini (0,05-2,5 nM) sidumise reaktsioon toimus 23 °C juures 60 min. Mittespetsiifilise sidumise määramiseks kasutasime 1 µM naloksooni hüdrokloriidi (RBI). [³H]-diprenorfiini seostu-

mise küllastuskõver analüüsiti Windows'i tarkvaral põhineva *GraphPad Prism* (Version 3.00) arvutiprogrammi abil. Eksperimenti korraldati neljal korral.

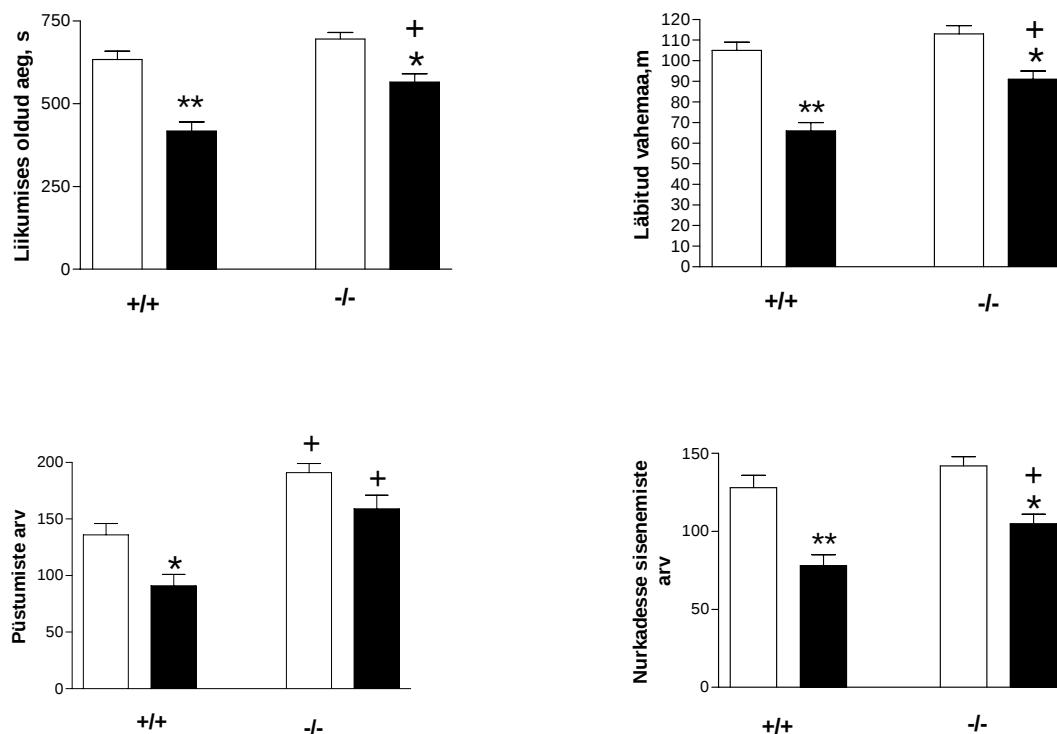
3.7. Statistiline analüüs

Tulemused väljendati keskväärtusena ja standardveana ($\pm$ SEM). Käitumistestid analüüsiti kahe-suunalise variatsiooni analüüsiga (*two-way ANOVA*). Eri gruppide tulemuste *post-hoc* võrdlus tehti *Tukey HSD* testiga Windows'l põhineva *Statistica* tarkvara abil. Radioligandi sidumiskatse tulemuste hindamiseks kasutasime Student'i t-testi.

4. TULEMUSED

4.1. Liikumisaktiivsus

Eelnevalt katsetingimustega kohastamata loomade liikumisaktiivsuse mõõtmisel ei erine nud metsikut tüüpi (+/+) hiirte motoorne aktiivsus homosügootse mutatsiooniga (-/-) pe- sakaaslaste motoorsest aktiivsusest (Joonis 1). Vaid püstumiste arv oli esimesel päeval



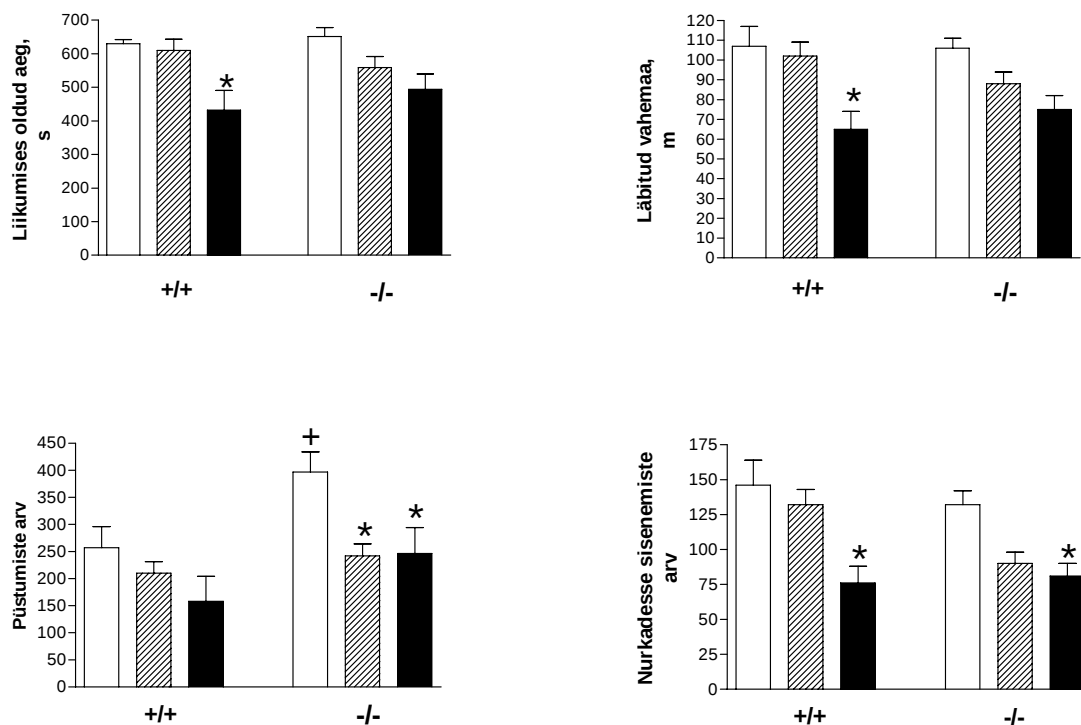
Joonis: 1. Metsikut tüüpi hiirte ja CCK2R puudulikkusega hiirte erinev kohastumine motoorse aktiivsuse testis.

Igas rühmas oli 25 looma. Valged tulbad — motoorse aktiivsuse näitajad esimesel mõõtmisel, mustad tulbad — motoorse aktiivsuse näitajad katse kolmandal päeval. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.001$ (võrdlus esimese mõõtmisega, *Tukey HSD* test peale usaldusväärset variatsiooni analüüsi); (+) $P < 0.05$ (võrdlus vastava metsikut tüüpi hiirte rühmaga).

homosügootsetel (-/-) hiirtel suurem kui metsikut tüüpi (+/+) liigikaaslastel. Olulised erinevused ilmnesid kohanemise kolmandal päeval. Tekkinud motoorse aktiivsuse vähenemine oli oluliselt tugevam kontrollrühma hiirtel. Statistiline analüüs näitas, et metsikut tüüpi (+/+) loomadel vähenes võrreldes homosügootsete (-/-) hiirtega oluliselt liikumises veedetud aeg (ANOVA: genotüüp: $F_{1,96} = 18.2$, $P < 0.001$; päev: $F_{1,96} = 51.7$, $P < 0.001$; genotüüp×päev: $F_{1,96} = 4.06$, $P < 0.05$) ja läbitud vahemaa (ANOVA: genotüüp: $F_{1,96} = 14.7$, $P < 0.001$; päev: $F_{1,96} = 53.5$, $P < 0.001$; genotüüp × päev: $F_{1,96} = 4$, $P < 0.05$) (Joonis 1). Samas püstumiste arv (ANOVA: genotüüp: $F_{1,96} = 32.0$, $P < 0.001$; päev: $F_{1,96} = 15.3$, $P < 0.001$; genotüüp × päev: $F_{1,96} = 0.11$, $P = 0.73$) ja nurkadesse sisenemiste arv (ANOVA: genotüüp: $F_{1,96} = 11.0$, $P < 0.01$; päev: $F_{1,96} = 45.3$, $P < 0.001$; genotüüp × päev: $F_{1,96} = 1.52$, $P = 0.22$) ei erinenud kahesuunalise variatsiooni analüüsi põhjal olulisel määral. Samas *post-hoc* analüüsi rakendamine näitas, et need kaks liikumisaktiivsuse parameetrit olid metsikut tüüpi (+/+) hiirtel siiski võrreldes homosügootsete (-/-) loomadega väiksemad (Tukey HSD test: püstumiste arv $P < 0.001$; nurkadesse sisenemiste arv $P < 0.01$) (Joonis 1).

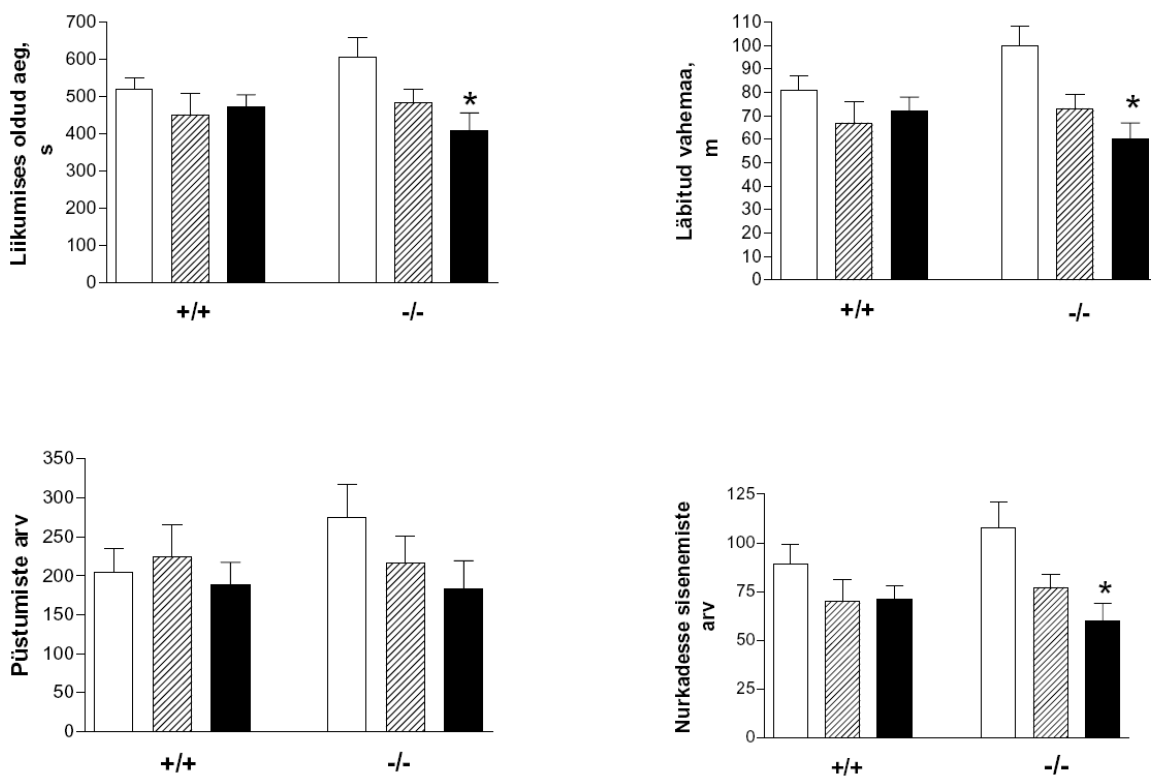
Opioidi retseptori antagonisti naloksooni manustamine annustes 1 ja 10 mg/kg põhjustas annusest sõltuva aktiivsuse pidurdumise nii metsikut tüüpi (+/+) kui ka homosügootsetel (-/-) loomadel (Joonis 2). Statistilisel analüüsil kahe genotüübi vahelisi erinevusi ilmsiks ei tulnud. Naloksoon vähendas annusest sõltuvalt liikumise aega (ANOVA: genotüüp: $F_{1,42} = 0.95$, $P = 0.76$; annus $F_{2,42} = 8.91$, $P < 0.01$; genotüüp × annus: $F_{2,42} = 0.87$, $P = 0.42$), läbitud vahemaad (ANOVA: genotüüp: $F_{1,42} = 0.09$, $P = 0.77$; annus $F_{2,42} = 12.13$, $P < 0.01$; genotüüp × annus $F_{2,42} = 1.21$, $P = 0.30$), püstumiste arvu (ANOVA: genotüüp: $F_{1,42} = 7.94$, $P < 0.01$; annus $F_{2,42} = 6.44$, $P < 0.01$; genotüüp × annus $F_{2,42} = 1.06$, $P = 0.35$) ja nurkadesse sisenemiste arvu (ANOVA: genotüüp: $F_{1,42} = 3.05$, $P = 0.09$; annus: $F_{2,42} = 12.6$, $P < 0.01$; genotüüp × annus $F_{2,42} = 1.79$, $P = 0.17$). Samas *post-hoc* analüüsi rakendamine näitas, et naloksoon annustes 1 ja 10 mg/kg vähendas oluliselt mutantsete hiirte püstumiste arvu ning opioidi retseptorite antagonisti annus 10 mg/kg ei põhjustanud neil olulist liikumises oldud aja vähenemist (Tukey HSD test: metsikut tüüpi (+/+) hiired $P < 0.05$ ja homosügootsed mutantsed (-/-) hiired $P = 0.11$) (Joonis 2).

Naloksooni toime eelnevalt katsetingimustega kohastatud metsikut tüüpi (+/+) ja homo-sügootsete (-/-) hiirte liikumisaktiivsusele oli sarnane [liikumises oldud aeg (ANOVA: genotüüp: $F_{1,52} = 0.27$, $P = 0.61$; annus: $F_{2,52} = 4.06$, $P < 0.05$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,52} = 1.41$, $P = 0.25$); läbitud vahemaa (ANOVA: genotüüp: $F_{1,52} = 0.48$, $P = 0.49$; annus $F_{2,52} = 6.44$, $P < 0.01$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,52} = 2.26$, $P = 0.11$); püstumiste arv (ANOVA: genotüüp: $F_{1,52} = 0.44$, $P = 0.51$; annus: $F_{2,52} = 1.08$, $P = 0.35$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,52} = 0.77$, $P = 0.47$) ja nurkadesse sisenemiste arv (ANOVA: genotüüp: $F_{1,52} = 0.38$, $P = 0.54$; annus: $F_{2,52} = 5.77$, $P < 0.01$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,52} = 1.06$, $P = 0.35$)] (Joonis 3). *Post-hoc* analüüsi rakendamine siiski muutis olukorda. Naloksoon annuses 10 mg/kg põhjustas



Joonis 2. Naloksooni (annustes 1 ja 10 mg/kg i.p.) mõju katsetingimustega mittekohastatud CCK2R puudulikkusega hiirte motoorsele aktiivsusele.

Igasse rühma kuulus 8 hiirt. Valged tulbad — füsioloogilise lahuse manustamise toime, triibulised tulbad — naloksooni annuse 1 mg/kg toime, mustad tulbad — naloksooni annuse 10 mg/kg toime. (*) $P < 0.05$ (võrdlus füsioloogilist lahust saanud hiirtega, *Tukey HSD* test peale usaldusväärset variatsioon analüüsi); (+) $P < 0.05$ (võrdlus füsioloogilist lahust saanud metsikut tüüpi hiirtega).



Joonis 3. Naloksooni (annustes 1 ja 10 mg/kg i.p.) mõju katsetingimustega kohastatud CCK2R puudulikkusega hiirte motoorsele aktiivsusele.

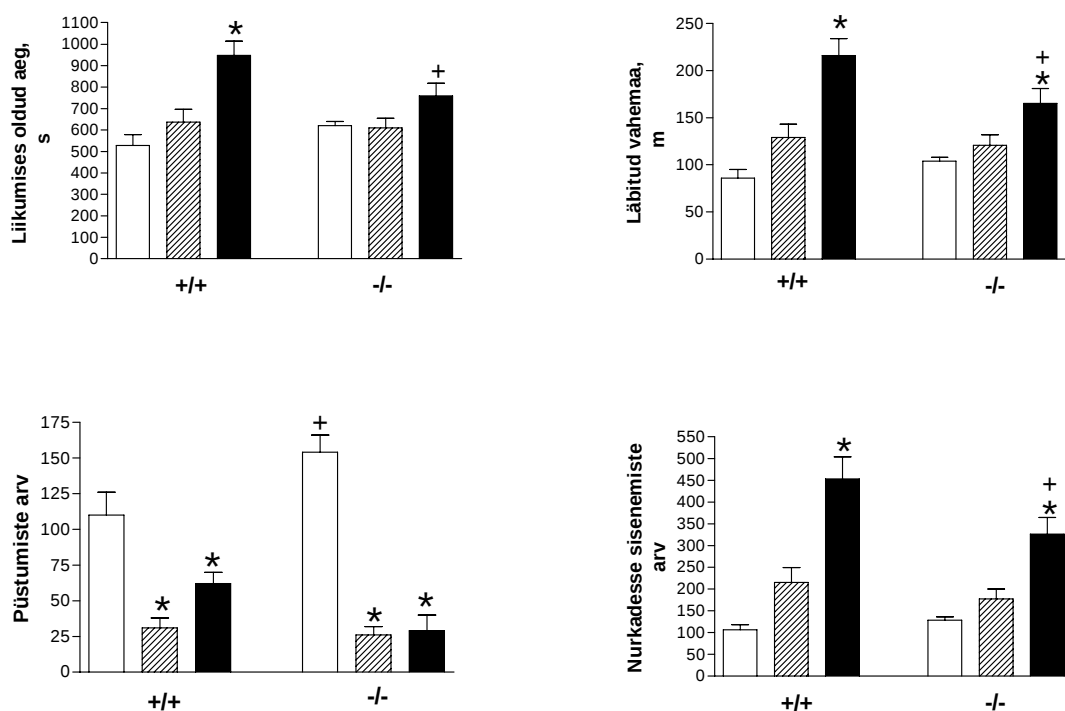
Rühma suurus oli 9 või 10 hiirt. Valged tulbad — füsioloogilise lahuse manustamise toime, triibulised tulbad — naloksoon annuse 1 mg/kg toime, mustad tulbad — naloksooni annuse 10 mg/kg toime. (*) $P < 0.05$ (võrdlus füsioloogilist lahust saanud hiirtega, *Tukey HSD* test peale usaldusväärset variatsiooni analüüsi).

homosügootsetel (-/-) hiirtel olulise liikumisaktiivsuse vähenemise, metsikut tüüpi (+/+) hiirtel aga mitte (*Tukey HSD* test: liikumises veedetud aeg, $P < 0.05$; läbitud vahemaa, $P < 0.01$, nurkadesse sisenemiste arv $P < 0.05$) (Joonis 3).

μ -Opioidi retseptorite agonisti morfiini manustamine annustes 5 ja 10 mg/kg põhjustas katsetingimustega kohastatud metsikut tüüpi (+/+) hiirtel tugeva annusest sõltuva motoorika stimulatsiooni (Joonis 4). Juba morfiini madalama annuse (5 mg/kg) manustamisega ilmnes +/+ hiirtel tendents horisontaalse liikumise näitajate suurenemise suunas, kuid samas ei olnud need muutused statistiliselt olulised. Morfiini suurem annus (10 mg/kg) aga põhjustas nendel loomadel olulise motoorika aktivatsiooni. Morfiin (5 and 10 mg/kg) vä-

hendas metsikut tüüpi hiirte püstumiste arvu. Morfiini manustamise järgselt tekkinud motoorika aktiveerumine oli mutantsetel ($-/-$) hiirtel oluliselt väiksem [aeg liikumises (ANOVA: genotüüp: $F_{1,95} = 0.93$, $P = 0.33$; annus: $F_{2,95} = 16.1$, $P < 0.001$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,95} = 3.70$, $P < 0.05$), läbitud vahemaa (ANOVA: genotüüp: $F_{1,95} = 1.67$, $P = 0.20$; annus: $F_{2,95} = 28.2$, $P < 0.001$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,95} = 3.48$, $P < 0.05$) ja nurkadesse sisenemiste arv (ANOVA: genotüüp: $F_{1,95} = 3.66$, $P = 0.059$; annus: $F_{2,95} = 40.2$, $P < 0.001$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,95} = 3.38$, $P < 0.05$)].

Ainus oluliseks osutunud erinevus oli püstumiste arvu muutus. Kahe-suunalisel variatsiooni-analüüsil ilmnes, et homosügootsetel ($-/-$) hiirtel morfiini toimele tekkinud püstumiste



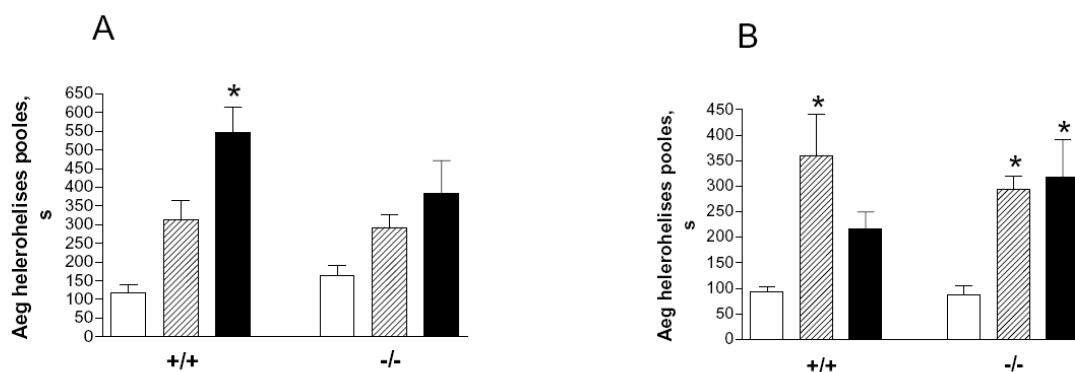
Joonis 4. Morfiini (annustes 5 ja 10 mg/kg i.p.) mõju CCK2R puudulikkusega hiirte motoorsele aktiivsusele.

Rühmade suurus oli 17 hiirt. Valged tulbad — füsioloogilise lahuse manustamise toime, triibulised — morfiini annuse 5 mg/kg toime, mustad tulbad — morfiini annuse 10 mg/kg toime. (*) $P < 0.05$ (võrdlus füsioloogilist lahust saanud hiirtega, *Tukey HSD* test peale usaldusväärset variatsiooni analüüsi); (+) $P < 0.05$ (võrdlus vastava metsikut tüüpi hiirte rühmaga).

te arvu vähenemine oli oluliselt suurem, kui metsikut tüüpi kontrollrühma hiirtel (ANOVA: genotüüp: $F_{1,95} = 0.07$, $P = 0.80$; annus: $F_{2,95} = 56.4$, $P < 0.001$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,95} = 6.71$, $P < 0.01$) (Joonis 4).

4.2. Kohatingimine

Eeltingimise perioodil tehtud mõõtmised näitasid, et esialgu eelistasid nii metsikut tüüpi (+/+) ja ka homosügootsed mutantsed (-/-) hiired enam viibida kasti tumerohelises pooles. Metsikut tüüpi loomad veetsid ainult 115 ± 15 s kasti helerohelises pooles, homosügootse mutatsiooniga hiired aga vastavalt 177 ± 22 s. Kohaeelistuse tingimise perioodil mõlemas kasti pooles füsioloogilise lahusega süstitud loomadel järeltingimisel mõõdetud kohaeelis-



Joonis 5. Naloksooni (annustes 1 ja 10 mg/kg) ja morfiiniga (annustes 3 ja 9 mg/kg) kohatingimine CCK2R puudulikkusega hiirtel

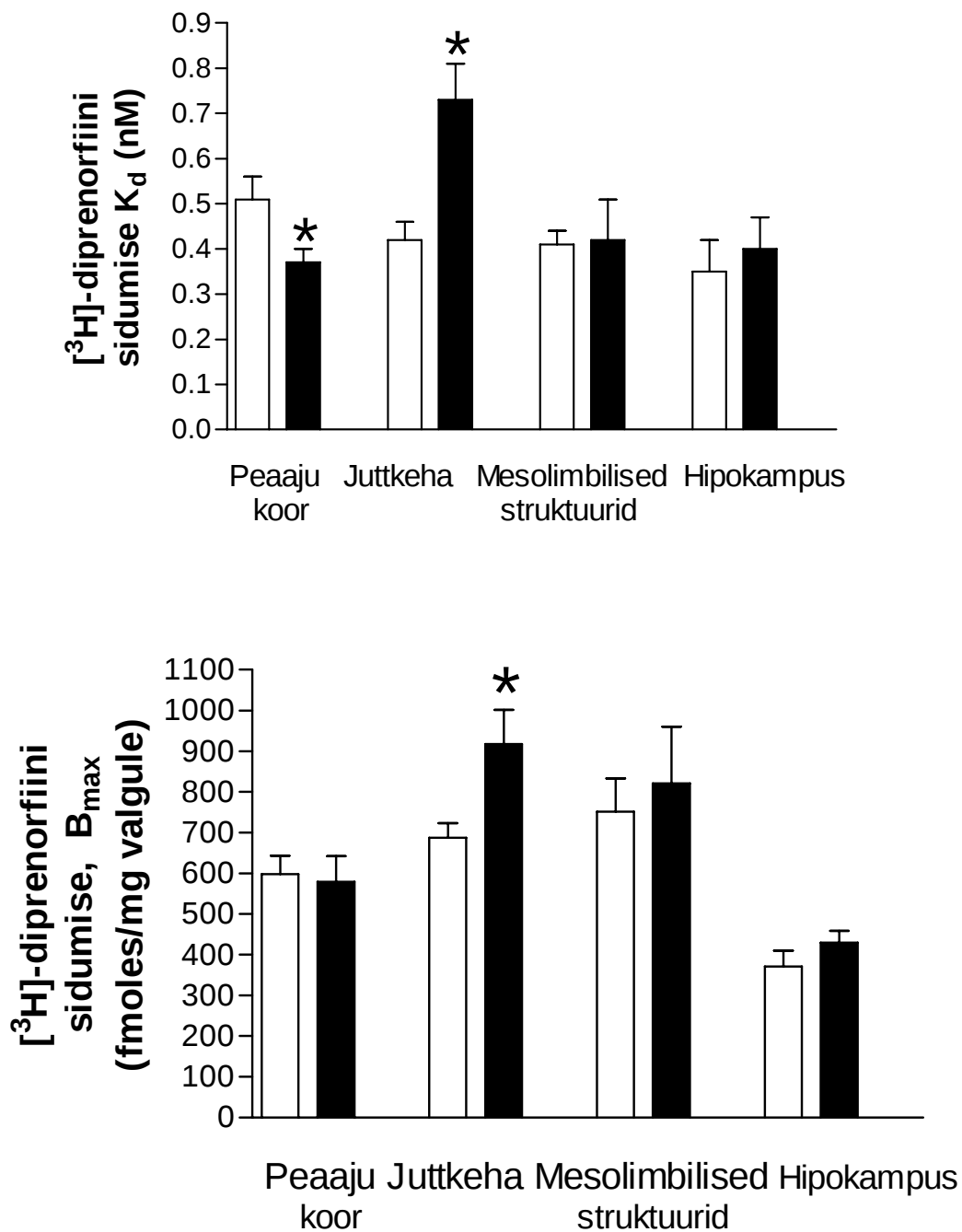
(A) *Naloksooniga kohavältimise tingimine.* Igasse rühma kuulus 8 looma. Valged tulbad — füsioloogilise lahuse manustamise toime, triibulised tulbad — naloksooni annuse 1 mg/kg toime, mustad tulbad — naloksooni annuse 10 mg/kg toime. (*) $P < 0.05$ (võrdlus füsioloogilist lahust saanud metsikut tüüpi hiirtel, Tukey HSD test peale usaldusväärset variatsiooni analüüsi).

(B) *Morfiiniga kohaeelistuse tingimine.* Igasse rühma kuulus 8 looma. Valged tulbad — füsioloogilise lahuse manustamise toime, triibulised tulbad — morfiini toime annuses 3 mg/kg, mustad tulbad — morfiini toime annuses 9 mg/kg. (*) $P < 0.05$ (võrdlus füsioloogilist lahust saanud vastava hiirte rühmaga, Tukey HSD test peale usaldusväärset variatsiooni analüüsi).

tus ei erinenud eeltingimisel saadud tulemusest. Naloksooni süstimine annustes 1 ja 10 mg/kg kohta kasti tumerohelises pooles tingis helerohelises pooles viibimise aja olulise piknemise (Joonis 5A). Kahesuunalisel variatsiooni analüüsil ei ilmnenu, et naloksooni toime oleks metsikut tüüpi (+/+) ja homosügootsetel (-/-) hiirtele oluliselt erinev (ANOVA: genotüüp: $F_{1,42} = 1.0$, $P > 0.3$; annus: $F_{2,42} = 16.7$, $P < 0.01$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,42} = 1.78$, $P > 0.15$). Naloksooni manustamisel annuses 1 mg/kg ilmnis metsikut tüüpi (+/+) hiirtel kalduvus eelistada heledamat poolt (*Tukey HSD* test, $P = 0.055$), samal ajal, kui homosügootsetel (-/-) hiirtel ei olnud suuremast annusest (10 mg/kg) tingitud muutus statistiliselt oluline (*Tukey HSD* test, $P = 0.16$). Naloksoon annuses 10 mg/kg tingis metsikut tüüpi (+/+) hiirtel olulise koha vältimise ja nad hakkasid eelistama esialgu mitte eelistatud heledamat kasti poolt (*Tukey HSD* test $P < 0.001$). Morfiin annuses 3 mg/kg, süstituna enne katselooma asetamist kasti helerohelisse poolde, tingis olulise koha eelistuse muutumise. Nii metsikut tüüpi (+/+) hiired ja homosügootsed (-/-) hiired hakkasid eelistama kasti tumedale poolele kasti heledamat poolt (ANOVA: genotüüp: $F_{1,42} = 0.40$, $P > 0.8$; annus: $F_{2,42} = 10.7$, $P < 0.01$; genotüüp $\times$ annus: $F_{2,42} = 1.30$, $P > 0.25$) (Joonis 5B). Samas põhjustas morfiini suurem annus (9 mg/kg) olulise koha eelistuse muutumise vaid homosügootsetel (-/-) hiirtel.

4.3. Radioligandi sidumiskatsed

Radioligandi [^3H]-diprenorfiini sidumiskatse näitas, et opiooni retseptorite afiinsus on homosügootsete (-/-) hiirte ajukoos suurem kui metsikut tüüpi (+/+) hiirtel (Joonis 6). Samas selgus, et homosügootsete (-/-) hiirte juttkehades oli opiooni retseptorite afiinsus väiksem ja retseptorite tihedus suurem kui metsikut tüüpi (+/+) hiirtel. Hipokampuses ja mesolimbilistes struktuurides genotüüpide vahelised erinevused puudusid.



Joonis 6. CCK2 retseptori puudulikkusega hiirtel erinevate ajustruktuuride [^3H]-diprenorfiini sidumise näitajad. Igasse rühma kuulus 24 looma, kuue katselooma koed segati omavahel homogeniseerimise ajal ja keskmise väärtused iseloomustavad nelja erineva katse tulemusi. valged tulbad—metsikut tüüpi hiired, mustad tulbad—Homosügootse mutatsiooniga hiired. (*) $P < 0.05$ (võrdlus metsikut tüüpi hiirte rühmaga, Studenti t -test).

5. TULEMUSTE ARUTELU

Käesoleva töö tulemuseks on neli olulist leidu. Esiteks, CCK2R puudulikkusega hiirte kohanemisvõime uudses keskkonnas on häiritud. Erinevalt Daugé (2001) ning Pommier (2002) töödest, ei suutnud meie leida statistiliselt olulist erinevust eelnevalt katsetingimustega kohastamata metsikut tüüpi (+/+) hiirte ja homosügootsete (-/-) hiirte horisontaalses liikumisaktiivsuses. Vaid püstumiste arv oli homosügootsetel (-/-) hiirtel jälgimise perioodi jooksul oluliselt suurem kui metsikut tüüpi (+/+) hiirtel. Kui katseloomad läbisid korduva motoorse aktiivsuse mõõtmise, siis kontrollrühma (+/+) hiirte liikumise aktiivsus vähenes järgnevate mõõtmiste käigus oluliselt. Geneetiliselt modifitseeritud (-/-) hiirtel pidurdus mõõtmiste kordamisel liikumisaktiivsus tunduvalt vähem. See tulemus sobib hüpoteesiga, et CCK on seotud kohanemisega uudses ümbruses. Varem on näidatud, et CCK langetab rottidel morfiini valuvaigistavat toimet uudses, aga mitte tuttavas ümbruses (Wiertelak jt., 1992). Samuti on leitud, et morfiin toimib rottidel ärevust vähendavate ainetega sarnaselt vaid uudses keskkonnas (Köks jt., 1999, Köks jt., 2000). Lisaks on testidega Y-puuris on näidatud, et CCK2R puudulikkusega hiirte ruumiline mälu on halvem kui metsikut tüüpi (+/+) pesakaaslastel (Serbet jt., 1999). Miks ja kuidas sellised erinevused tekkinud on, millised neurobiokeemilised muutused täpsemalt neid põhjustavad, vajab veel edasist uurimist ja selgitamist.

Teiseks leidsime, et morfiin mõjutab mutantsete hiirte motoorika regulatsiooni ja motiivatsiooni süsteemi erinevalt. Morfiini manustamine annuses 3 mg/kg tingis nii metsikut tüüpi (+/+) hiirtel kui ka homosügootsetel (-/-) hiirtel olulise kohaeelistuse muutumise. Tingimise perioodi järel hakkasid mõlema genotüübiga hiired eelistama eeltingimise perioodil vähem eelistatud poolt. Samas on oluline, et eeltingimise perioodil eelistasid nii metsikut tüüpi (+/+) kui ka homosügootsed (-/-) hiired väga ülekaalukalt just tumerohelist poolt. Tulemuste hindamisel tuleb sellisel puhul arvestada ka katse keskkonnaga harjumise mõju ning manustatava preparaadi võimalikku toimet katseloomade hirmule ja ärevusele (Tzschentke 1998). Meie ei võrrelnud järeltingimisel saadud tulemusi eeltingimisel saadud tulemustega, vaid hoopis kõrvutasime omavahel vastavate rühmade morfiiniga mõjutatud ja

ainult füsioloogilise lahusega süstitud loomade järeltingimisel saadud tulemusi. See tähendab, et kohastumise mõju oli kõikidel juhtudel ühesugune. Varem on tõstetud pluss-puuri ja null-puuri testidega näidatud, et morfiinil on uudses katsesituatsioonis rottidel hirmu ja ärevust vähendav toime (Kõks jt., 2000). Seda arvestades kontrollisime me morfiini annuse 3 mg/kg toimet katsetingimustega kohastamata $+/+$ hiirte uudistamiskäitumisele pime/valge puuri testis. Selgus, et morfiin selles annuses nende hiirte uudistamiskäitumist ei mõjuta. See tähendab, et kohatingimise testis saadud tulemust ei saa seletada morfiini ärevust leevendava toimega. Varsemad farmakoloogilised uuringud on näidanud, et CCK2R blokaad retseptori antagonistidega potentseerib olulisel määral kohaeelistuse tingimist morfiiniga (Higgins jt., 1992; Valverde jt., 1996). Sarnast mõju CCK2R täielikku puudumist põhjustaval mutatsioonil aga ei ole. Põjendame seda hiirte arengu ja kasvamise jooksul teistes neuromediatoorsetes süsteemides toimunud kompensatoorsete muutustega.

Eelnevalt katsetingimustega kohastatud metsikut tüüpi ($+/+$) hiirtel põhjustas morfiin annuses 5 mg/kg horisontaaltasapinnalist liikumist iseloomustavate näitajate tõusu ja samaegselt püstumiste arvu olulise vähenemise. Morfiini suurema annuse (10 mg/kg) toimel tekkis metsikut tüüpi hiirtel aga oluline liikumisaktiivsuse elavnemine. CCK2R puudulikkusega hiirte motoorikale oli morfiinil samades annustes oluliselt nõrgem toime. See erineb kohaeelistuse tingimise testis saadud tulemustes, kus morfiini toime geneetiliselt modifitseeritud ($-/-$) hiirtele ei olnud nõrgem kui kontrollrühma ($+/+$) hiirtele. Metsikut tüüpi hiirte ülitugev motoorne vastus morfiinile annuses 10 mg/kg oli tõenäoliselt ka põhjuseks, miks ei tinginud morfiini suurem annus neil olulist kohaeelistuse muutust. Morfiin sellises annuses põhjustas kontrollrühma ($+/+$) hiirtel stereotüüpsete liikumiste tekke, see on psühhoootomimeetilise toime väljenduseks, mis tingib häireid ümbruse tajumises ning häirib kohaeelistuse tekkimist. Seda, et kohaeelistuse tingimisel ja motoorse aktiivsuse mõõtmisel morfiini toime muutus on erinev, on täheldatud ka dopamiini D_2 retseptori puudulikkusega hiirte uurimisel (Maldonado jt. 1997). Morfiini manustamisel ei tekkinud dopamiini D_2 retseptori puudulikkusega hiirtel kohaeelistust, samas motoorse aktiivsuse muutus oli neil samasugune nagu nende metsikut tüüpi pesakaaslastel. Tõenäoliselt vahendavad morfiini toimet motivatsioonisüsteemile eelkõige mesolimbilised dopamiini D_2 retseptorid ja morfiini motoorikat aktiveerivat toimet aga juttkehas olevad dopamiini D_1 retseptorid (Daugé

jt., 1989; Kalivas jt., 1983; Longoni jt., 1987; Maldonado jt., 1997). CCK2R puudulikkusega hiirtel on juttkeha piirkonnas tõusnud dopamiini D₂ retseptorite aktiivsus, mis võibki olla üks põhjustest, miks morfiin mõju oli homosügootsete (–/–) hiirte motoorsele aktiivsusele väiksem (Kõks jt. 2001).

Kohatingimise katses naloksooni väiksem annuse (1 mg/kg) manustamise järel ilmnis metsikut tüüpi (+/+) hiirtel kalduvus vältida kasti tumerohelist poolt. Samas kutsus naloksoon annuses 10 mg/kg esile olulise kohavältimise väljakujunemise nendel katseloomadel. CCK2R puudulikkusega hiirtele toimis naloksoon selles testis oluliselt nõrgemalt. Vaid naloksooni suurema annuse manustamisel ilmnis homosügootsetel (–/–) hiirtel kalduvus eelistada eeltingimisel mitteelistatud helerohelist poolt. See tulemus toetab hüpoteesi, et CCK2R puudulikkusega hiirtel on ajus suurenenud opioidergilise süsteemi aktiivsus. Kirjandusest on teada, et CCK₂ retseptori antagonistid nõrgendavad naloksooni kohavältimist tingivat toimet rottidel endogeensete opioidide aktiivsuse suurendamise kaudu (Valverde jt. 1996). Naloksoon põhjustab rottidel kohavältimise väljakujunemise siis, kui seda manustatakse lokaalselt ventraalsesse tegmentaalsesse piirkonda ja *nucleus accumbens*'sse ja mitte siis, kui seda süstitakse juttkehasse ja mediaalsesse prefrontaalsesse ajukoorde (Shippenberg jt., 1995). Peale mesolimbilise dopamiinergilise süsteemi osaleb naloksooni poolt tingitud kohavältimise tekkes ka dorsaalne periakvduktaalne hallaine, sest μ -retseptorite blokaad selles piirkonnas tingib samuti kohavältimise väljakujunemise (Santé jt., 2000). Kuna CCK2R puudulikkusega hiirtel ei ole me mesolimbilises piirkonnas opioidi ja dopamiini D₂ retseptorite aktiivsus muutunud, võib oletada, et muutused võivad esineda periakvduktaalses hallaines. Seda enam, et homosügootsetel (–/–) hiirtel on valutundlikus oluliselt vähenenud ja periakvduktaalse hallaine keskne roll valu regulatsioonis on hästi teada (Veraksitš jt., 2003, Mason 1999).

Neljandaks oluliseks tulemuseks on homosügootsete (–/–) hiirte ajustruktuurides tuvastatud opioidi retseptorite aktiivsuses muutused, mida võib pidada kohastumuslikeks muutusteks. Juttkehas oli CCK2R puudulikkusega hiirtel oluliselt rohkem opioidi retseptoreid ja nende afiinsus oli madalam, kui nende metsikut tüüpi pesakaaslastel. Retseptorite afiinsuse langust mutantsetel hiirtel võib põhjustada kestvalt suurenenud endopiidsete peptiidide

vabanemisega selles piirkonnas. See sobib kokku ka liikumisaktiivsuse mõõtmise testidest saadud tulemustega. CCK2R puudulikkusega hiirtel morfiini, μ -opioidi retseptorite agonisti, motoorikat aktiveeriva toime nõrgenemise põhjuseks võibki olla juttkehas olevate opiaadiretseptorite afiinsuse vähenemise ja endogeensete opioidsete peptiidide vabanemise suurenemine, kuna väliselt manustatud opiaat konkureerib organismiomaste opioidsete peptiididega samadele retseptoritele. Samas leiti, et ajukoos oli homosügootsetel ($-/-$) hiirtel opioidi retseptorite afiinsus kontrollrühma ($+/+$) hiirtest suurem. Mesolimbilistes struktuurides, see tähendab kõige olulisemas motivatsioonide kujunemisega seotud ajustruktuuris, ei leidnud me opioidi retseptorite parameetrite muutusi. Samuti on seal homosügootsetel ($-/-$) hiirtel dopamiini D_2 retseptorite aktiivsus samasugune nagu ($+/+$) hiirtel (Kõks jt., 2001). See sobib asjaoluga, et kohatingimise testides ilmnenud CCK2R puudulikkusega ja kontrollrühma hiirte vahelised erinevused ei olnud nii väljendunud kui liikumisaktiivsuse hindamise testides.

Kokkuvõtteks võib öelda, et erisuunalistel retseptorite aktiivsuse muutustel erinevates ajustruktuurides on tõenäoliselt oma osa selles, miks morfiini ja naloksooni toime CCK2R puudulikkusega hiirtel on muutunud erinevates käitumiskatsetes erinevalt. CCK2 retseptori puudulikkusega hiirtel võib võrreldes $+/+$ hiirtega teatud aju piirkondades endogeensete opioidide vabanemine olla suurem ja samas mõnes teises piirkonnas väiksem või üldse mitte muutunud olla.

JÄRELDUSED

1. CCK2R geneetilise väljalülitamise üheks tagajärjeks mutantsetel hiirtel on morfiini, μ -opioidi retseptorite agonisti, motoorikat aktiveeriva toime nõrgenemine. Naloksoon avaldas katsetingimustega kohastamata homosügootsetele ($-/-$) ja kontrollrühma ($+/+$) hiirtele ühesugust, liikumisaktiivsust vähendavat toimet. Eriti tugevalt vähenes aga homosügootsete ($-/-$) hiirte püstumiste arv. Katsetingimustega kohastamisel vähenes CCK2R puudulikkusega hiirte liikumise aktiivsus oluliselt vähem kui kontrollrühma ($+/+$) hiirtel. Naloksoon põhjustas katsetingimustega eelnevalt kohanenud homosügootsetel ($-/-$), mitte metsikut tüüpi, hiirtel olulise motoorse aktiivsuse vähenemise.
2. CCK2R geneetiline väljalülitamine morfiinist tingitud kohaelistuse teket ei mõjuta. Morfiini manustamine tingis nii metsikut tüüpi ($+/+$) hiirtel kui ka homosügootsetel ($-/-$) hiirtel olulise kohaelistuse muutumise. Morfiini suurem annus ei tinginud metsikut tüüpi hiirtel olulist kohaelistuse muutust, sest see põhjustas neil ülitugeva motoorse reaktsiooni ja stereotüüpsete liikumiste tekke. Naloksoon toimis CCK2R puudulikkusega hiirtele kohavältimise tingimise testis oluliselt nõrgemalt kui nende metsikut tüüpi pesakaaslastele.
3. CCK2R puudulikkusega hiirtel tuvastati eesajustruktuurides opioidi retseptorite aktiivsuses muutused. Juttkehas oli CCK2R puudulikkusega hiirtel oluliselt rohkem opioidi retseptoreid ja nende afiinsus oli madalam kui nende metsikut tüüpi pesakaaslastel. Ajukoos oli homosügootsetel ($-/-$) hiirtel opioidi retseptorite afiinsus kontrollrühma ($+/+$) hiirtest suurem. Mesolimbilistes struktuurides ja hipokampuses ei leidnud me opioidi retseptorite aktiivsust iseloomustavate parameetrite muutusi.
4. Homosügootsete ($-/-$) ja kontrollrühma ($+/+$) hiirte vaheliste opiaadireseptorite aktiivsuse erinevusi võib pidada kohastumuslikeks muutusteks.

Kokkuvõtteks võib öelda, et CCK2R geneetilise väljalülitamise mõjul kujuneb välja mitmetes ajupiirkondades opioid-ergilise süsteemi toonuse oluline tõus.

KIRJANDUS

1. Barbaz BS, Autry WL, Ambrose FG, Hall NR, Liebman JM. Antinociceptive profile of sulfated CCK-8. Comparison with CCK-4, unsulfated CCK-8 and other neuropeptides. *Neuropharmacology*. 1986 Aug; 25(8):823-9.
2. Benoliel JJ, Collin E, Mauborgne A, Bourgoin S, Legrand JC, Hamon M, Cesselin F. Opioid control of the in vitro release of cholecystokinin-like material from the rat substantia nigra. *J Neurochem*. 1992 Mar; 58(3):916-22
3. Benoliel JJ, Collin E, Mauborgne A, Bourgoin S, Legrand JC, Hamon M, Cesselin F. Mu and delta opioid receptors mediate opposite modulations by morphine of the spinal release of cholecystokinin-like material. *Brain Res*. 1994 Aug 8; 653(1-2):81-91.
4. Benoliel JJ, Mauborgne A, Bourgoin S, Legrand JC, Hamon M, Cesselin F. Differential inhibitory/stimulatory modulation of spinal CCK release by mu and delta opioid agonists, and selective blockade of mu-dependent inhibition by kappa receptor stimulation. *Neurosci Lett*. 1991 Apr 1; 124(2):204-7.
5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
6. Dauge V, Sebret A, Beslot F, Matsui T, Roques BP. Behavioral profile of CCK2 receptor-deficient mice. *Neuropsychopharmacology*. 2001a; 25(5):690-8.
7. Dauge V, Beslot F, Matsui T, and Roques BP. Mutant mice lacking the cholecystokinin₂ receptor show a dopamine-dependent hyperactivity and a behavioral sensitization to morphine. *Neurosci. Lett*. 2001b; 306:41-4.
8. Dauge V, Rossignol P, and Roques B.P. Blockade of dopamine receptors reverses the behavioral effects of endogenous enkephalins in the nucleus caudatus but not in the nucleus accumbens: differential involvement of delta and mu opioid receptors. *Psychopharmacology*. 1989; 99:168-75.
9. Derrien M, Noble F, Maldonado R, Roques BP. Cholecystokinin-A but not cholecystokinin-B receptor stimulation induces endogenous opioid-dependent antinociceptive effects in the hot plate test in mice. *Neurosci Lett*. 1993 Oct 1; 160(2):193-6.
10. Dourish CT, O'Neill MF, Coughlan J, Kitchener SJ, Hawley D, Iversen SD. The selective CCK-B receptor antagonist L-365,260 enhances morphine analgesia and prevents morphine tolerance in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1990 Jan 25;176(1):35-44.

11. Faris PL, Komisaruk BR, Watkins LR, Mayer DJ. Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia. *Science*. 1983 Jan;21; 219(4582):310-2.
12. Gall C, Lauterborn J, Burks D and Seroogy K. Co-localization of enkephalin and cholecystokinin in discrete areas of rat brain. *Brain Res*. 1987; 403 pp. 403–408.
13. Higgins GA, Nguyen P and Seller EM. Morphine place conditioning is differentially affected by CCK_A and CCK_B receptor antagonists. *Brain Res*. 1992; 572:208–15.
14. Hill RG, Hughes J, Pittaway KM. Antinociceptive action of cholecystokinin octapeptide (CCK 8) and related peptides in rats and mice: effects of naloxone and peptidase inhibitors. *Neuropharmacology*. 1987 Apr; 26(4):289-300.
15. Inoue H, Iannotti CA, Welling CM, Veile R, Donis-Keller H and Permutt MA () Human cholecystokinin type A receptor gene: Cytogenetic localization, physical mapping, and identification of two missense variants in patients with obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Genomics*. 1997; 42:331-5.
16. Ito M, Iwata N, Taniguchi T, Murayama T, Chihara K and Matsui T. Functional characterization of two cholecystokinin-B/gastrin receptor isoforms: A preferential splice donor site in the human receptor gene. *Cell Growth Differ*. 1994; 5:1127-35.
17. Ito M, Matsui T, Taniguchi T, Tsukamoto T, Murayama T, Arima N, Nakata H, Chiba T and Chihara K. Functional characterization of human brain cholecystokinin-B receptor: A trophic effect of cholecystokinin and gastrin. *J Biol Chem*. 1993; 268:18300-5.
18. Kalivas PW, Widerlow E, Stanley D, Breese G and Prange AJ. Enkephalin action on the mesolimbic system: a dopamine-dependent and a dopamine-independent increase in locomotor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227 (1983), pp. 229–37.
19. Kõks S, Bourin M and Vasar E, Adaptation of rats to the experimental conditions modifies the behavioral effects of naloxone and morphine in the elevated zero-maze. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10 suppl. 2 (2000), p. S66.
20. Kõks S, Soosaar A, Võikar V, Bourin M and Vasar E. BOC-CCK-4, CCK_B receptor agonist, antagonizes anxiolytic-like action of morphine in elevated plus-maze. *Neuropeptides* 1999; 33:63–9.
21. Kõks S, Volke V, Veraksits A, Rünkorg K, Sillat T, Abramov U, Bourin M, Huotari M, Männisto PT, Matsui T, Vasar E. Cholecystokinin₂ receptor-deficient mice display altered function of brain dopaminergic system. *Psychopharmacology*. 2001 Nov; 158(2):198-204.
22. Langhans N, Rindi G, Chiu M, Rehfeld JF, Ardman B, Beinborn M, Kopin AS. Abnormal gastric histology and decreased acid production in cholecystokinin-B/gastrin receptor-deficient mice. *Gastroenterology*. 1997 Jan; 112(1):280-6.

23. Larsson LI, Rehfeld JF. Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Brain Res.* 1979 Apr 13; 165(2):201-18.
24. Longoni R, Spina Land Di Chiara G, Dopaminergic D1 receptors: essential role in morphine-induced hypermotility. *Psychopharmacology* 93 (1987), pp. 401–2.
25. Maldonado R, Derrien M, Noble F, Roques BP. Association of the peptidase inhibitor RB 101 and a CCK-B antagonist strongly enhances antinociceptive responses. *Neuroreport.* 1993 Jul; 4(7):947-50.
26. R. Maldonado, A. Saiardi, O. Valverde, T.A. Sama, B.P. Roques and E. Borrelli, Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D₂ receptors. *Nature* 1997, 388: 586–9.
27. Mason P. Central mechanisms of pain modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1999; 9:436–41.
28. Miller LJ, Holicky E, Ulrich CD and Wieben ED. Abnormal processing of the human cholecystokinin receptor gene in association with gallstones and obesity. *Gastroenterology.* 1995; 109:1375-80.
29. Miyake A. A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208: 230-7.
30. Miyasaka K, Ichikawa M, Ohta M, Kanai S, Yoshida Y, Masuda M, Nagata A, Matsui T, Noda T, Takiguchi S, Takata Y, Kawanami T, Funakoshi A. Energy metabolism and turnover are increased in mice lacking the cholecystokinin-B receptor. *J Nutr.* 2002 Apr;132(4):739-41.
31. Miyasaka K, Ohta M, Kanai S, Yoshida Y, Sato N, Nagata A, Matsui T, Noda T, Jimi A, Takiguchi S, Takata Y, Kawanami T, Funakoshi A. Enhanced gastric emptying of a liquid gastric load in mice lacking cholecystokinin-B receptor: a study of CCK-A,B, and AB receptor gene knockout mice. *J Gastroenterol.* 2004;39(4):319-23.
32. Miyasaka K, Shinozaki H, Suzuki S, Sato Y, Kanai S, Masuda M, Jimi A, Nagata A, Matsui T, Noda T, Kono A, Funakoshi A. Disruption of cholecystokinin (CCK)-B receptor gene did not modify bile or pancreatic secretion or pancreatic growth: a study in CCK-B receptor gene knockout mice. *Pancreas.* 1999 Aug; 19(2):114-8.
33. Mutt V. Chemistry, isolation and purification of gastrointestinal hormones. *Biochem Soc Trans.* 1980 Feb; 8(1):11-4.
34. Nagata A, Ito M, Iwata N, Kuno J, Takano H, Minowa O, Chihara K, Matsui T, Noda T. G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15; 93(21):11825-30.
35. Noble F, Derrien M, Roques BP. Modulation of opioid antinociception by CCK at the supraspinal level: evidence of regulatory mechanisms between CCK and enkephalin systems in the control of pain. *Br J Pharmacol.* 1993 Aug; 109(4):1064-70.

36. Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol Rev.* 1999 Dec; 51(4):745-81.
37. Pohl M, Benoliel JJ, Bourgoin S, Lombard MC, Mauborgne A, Taquet H, Carayon A, Besson JM, Cesselin F, Hamon M. Regional distribution of calcitonin gene-related peptide-, substance P-, cholecystokinin-, Met5-enkephalin-, and dynorphin A (1-8)-like materials in the spinal cord and dorsal root ganglia of adult rats: effects of dorsal rhizotomy and neonatal capsaicin. *J Neurochem.* 1990 Oct;55(4):1122-30.
38. Pommier B, Beslot F, Simon A, Pophillat M, Matsui T, Dauge V, Roques BP, Noble F. Deletion of CCK2 receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. *J Neurosci.* 2002 Mar 1; 22(5):2005-11.
39. Raud S, Rünkorg K, Veraksits A, Reimets A, Nelovkov A, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Volke V, Kõks S, Vasar E. Targeted mutation of CCK2 receptor gene modifies the behavioural effects of diazepam in female mice. *Psychopharmacology.* 2003 Aug; 168(4):417-25.
40. Rehfeld JF, Mogensen NW, Bardram L, Hilsted L, Monstein H. Expression, but failing maturation of procholecystokinin in cerebellum. *Brain Res.* 1992 Mar 27; 576(1):111-9.
41. Rehfeld JF, Nielsen FC. Molecular forms and regional distribution of cholecystocinin in the central nervous system. In Bradwejn J, Vasar E, (eds). *Cholecystocinin and Anxiety: from Neuron to Behavior*. Austin, R.G. Landes Company, 1995; pp 33-56.
42. Ruiz-Gayo M, Durieux C, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. Stimulation of delta-opioid receptors reduces the in vivo binding of the cholecystokinin (CCK)-B-selective agonist [3H]pBC 264: evidence for a physiological regulation of CCKergic systems by endogenous enkephalins. *J Neurochem.* 1992 Nov; 59(5):1805-11.
43. Sante AB, Nobre MJ, Brandao ML. Place aversion induced by blockade of mu or activation of kappa opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter. *Behav Pharmacol.* 2000 Nov;11(7-8):583-9.
44. Sebret A, Lena I, Crete D, Matsui T, Roques BP, Dauge V. Rat hippocampal neurons are critically involved in physiological improvement of memory processes induced by cholecystokinin-B receptor stimulation. *J Neurosci.* 1999 Aug 15;19(16):7230-7.
45. Shippenberg T.S and Bals-Kubik R. Involvement of the mesolimbic dopamine system in mediating aversive effects of opioid antagonists in the rat. *Behav. Pharmacol.* 1995; 6:99-106.
46. Smadja C, Maldonado R, Turcaud S, Fournie-Zaluski M.C and Roques B.P. Opposite role of CCK_A and CCK_B receptors in the modulation of endogenous enkephalin anti-depressant-like effects. *Psychopharmacology.* 1995; 120:400-8.

47. Song I, Brown DR, Wiltshire RN, Gantz I, Trent JM and Yamada T. The human gastrin/cholecystokinin type B receptor gene: Alternative splice donor site in exon 4 generates two variant mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 9085-89.
48. Stengaard-Pedersen K, Larsson LI. Localization and opiate receptor binding of enkephalin, CCK and ACTH/beta-endorphin in the rat central nervous system. *Peptides*. 1981;2 Suppl 1:3-19.
49. Tzschentke TM: Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.* 1998; 56:613–72.
50. Valverde O, Fournie-Zaluski MC, Roques BP and Maldonado R. The CCKB antagonist PD-134,308 facilitates rewarding effects of endogenous enkephalins but does not induce place preference in rats. *Psychopharmacology* 1996; 123:119-26.
51. Valverde O, Maldonado R, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. Cholecystokinin B antagonists strongly potentiate antinociception mediated by endogenous enkephalins. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Jul;270(1):77-88.
52. Vanderhaeghen JJ, Signeau JC, Gepts W. New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature*. 1975 Oct 16; 257(5527):604-5.
53. Veraksits A, Rünkorg K, Kurrikoff K, Raud S, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Köks S, Vasar E. Altered pain sensitivity and morphine-induced anti-nociception in mice lacking CCK2 receptors. *Psychopharmacology*. 2003; 166(2):168-75.
54. Wank SA. Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol.* 1995; 269: G628-G646
55. Watkins LR, Kinscheck IB, Mayer DJ. Potentiation of morphine analgesia by the cholecystokinin antagonist proglumide. *Brain Res.* 1985 Feb 18;327(1-2):169-80.
56. Wiertelak EP, Maier SF and Watkins LR, Cholecystokinin anti-analgesia: safety cues abolish morphine analgesia. *Science*. 1992, 256:830–33.
57. Williams CL, Rosenfeld GC, Burks TF. Cholecystokinin-induced antinociception is not blocked by CCK-A or CCK-B receptor antagonists. *Peptides*. 1997; 18(3):409-14.
58. Zhou Y, Sun YH, Zhang ZW, Han JS. Increased release of immunoreactive cholecystokinin octapeptide by morphine and potentiation of mu-opioid analgesia by CCKB receptor antagonist L-365,260 in rat spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 1993 Apr 6;234(2-3):147-54
59. Zhou Y, Sun YH, Zhang ZW, Han JS, Williams CL, Rosenfeld GC, Burks TF. Cholecystokinin-induced antinociception is not blocked by CCK-A or CCK-B receptor antagonists. *Peptides*. 1997; 18(3):409-14.

ABSTRACT

The effects of morphine, μ -opioid receptor agonist, and naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist, in the locomotor activity and place conditioning tests were studied in the CCK₂ receptor-deficient male mice. The exposure of mice to the motility boxes for 3 consecutive days induced a significant inhibition of locomotor activity in the wild-type (+/+) mice compared to homozygous (-/-) animals. The administration of naloxone (10 mg/kg i.p.) to animals, adapted to the motility boxes, induced a significant reduction of locomotor activity in the homozygous (-/-), but not in the wild-type (+/+) mice. Treatment of habituated mice with morphine (10 mg/kg i.p.) caused a stronger increase of locomotor activity in the wild-type (+/+) mice compared to the homozygous (-/-) littermates. In the place preference test the pairing of the preferred side with naloxone (1 and 10 mg/kg i.p.) induced a dose-dependent place aversion in the wild-type (+/+) mice. The treatment with naloxone was less effective in the homozygous (-/-) mice, because the high dose of naloxone (10 mg/kg) tended to shift the preference. The pairing of morphine (3 mg/kg i.p.) injections with the non-preferred side induced a significant place preference both in the wild-type (+/+) and homozygous (-/-) mice. The increased density of opioid receptors was established in the striatum of homozygous (-/-) mice, but not in the other forebrain structures. In conclusion, the targeted invalidation of CCK₂ receptors induces a dissociation of behavioural effects of morphine and naloxone. Morphine-induced place preference remained unchanged, whereas hyper-locomotion was less pronounced in the mutant mice compared to the wild-type (+/+) littermates. By contrast, naloxone-induced place aversion was weaker, but naloxone caused a stronger inhibition of locomotor activity in the homozygous (-/-) mice than in the wild-type (+/+) animals. These behavioural alterations can be explained in the light of data that the targeted mutation of CCK₂ receptors induces distinct changes in the properties of opioid receptors in various brain structures.

TÄNUAVALDUSED

Käesolev magistritöö on valminud Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis. Tänan südamest kõiki oma häid kolleege ja sõpru, kes osalesid selles töös ja aitasid selle teoks saamisele kaasa. Kuid eelkõige olen tänulik oma juhendajale, professor Eero Vsarale, igakülgse toetuse ja abi eest töö igas etapis.