

**CCK₂ retseptori geneetiline väljalülitamine kutsub emastel
hiirtel esile GABAergilise süsteemi aktiivsuse muutused
ajus.**

Ain Reimets

Magistritöö biomeditsiinis

Juhendajad: prof. E. Vasar

assist. A. Veraksitš

Tartu 2006

SISUKORD

Töös kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	4
Kirjanduse ülevaade	6
Eesmärgid	10
Materjalid ja metoodika	12
Katseloomad	12
Manustatud farmakoloogilised ained	13
Käitumise uurimine	13
Valutundlikkuse uurimine	15
Radioligandi sidumiskatse	15
Geeniekspressiooni analüüs	16
Andmete statistiline analüüs	18
Tulemused	19
Liikumisaktiivsuse muutused	19
Uuditamisaktiivsuse muutused	20
Koordinatsiooni muutused	22
Esmane valutundlikkus	23
Valu tolerants	24
Radioligandi sidumiskatse	25
Geeniekspressiooni muutused	26
Diskussioon	27
Järeldused	31
Abstract	33
Kasutatud kirjandus	34

Lühendid

(-/-)	CCK ₂ RETSEPTORI PUUDULIKKUSEGA HIRED
(+/-)	HETEROSÜGOOTSED OSALISE CCK ₂ RETSEPTORI PUUDULIKKUSEGA HIRED
(+/+)	METSIKUT TÜÜPI HIRED
ANOVA/MANOVA	ÜHE- JA MITMESUUNALINE VARIATSIOONIANALÜÜS
CCK	KOLETSÜSTOKINIIN
CCK ₁ R	ESIMEST TÜÜPI KOLETSÜSTOKINIINI RETSEPTOR
CCK ₂ R	TEIST TÜÜPI KOLETSÜSTOKINIINI RETSEPTOR
CCK-8S	KOLETSÜSTOKINIINI SULFATEERITUD OKTAPEPTIID
DMCM	METÜÜL-6,7-DIMETOKSÜ-4-ETÜÜL-β-KARBOLIIN-3- KARBOKÜLAAT
GABA -	γ-AMINO-VÕIHAPE
HPRT	HÜPOKSANTIIN-GUANIIN FOSFORIBOSÜÜL TRANSFERAAS
i.p.	INTRAPERITONAALSELT
PCR	POLÜMERAASI-AHELREAKTSIOON
SEM	KESKMISTE VÄÄRTUSTE STANDARDVIGA

Sissejuhatus

Koletsüstokiniin (CCK) on neuropeptiid, mis esineb imetaja organismis väga laialdaselt ja avastati algselt seedetraktis (Ivy ja Olberg, 1928). CCK nimetus viitab sapipõie funktsiooni regulatsioonile, kuid praeguseks ajaks on selge, et tema roll organismis on märgatavalt avaram ja ei piirdu sugugi ainult seedetrakti talitluse regulatsiooniga. CCK bioloogiliselt aktiivsed vormid erinevad aminohapete arvult (4-58) ja toime aktiivsusest sõltuvalt C-terminaalselt seitsmenda aminohappe – türosiini sulfaatühemega seostumisest. Kesknärvisüsteemis ongi levinud sulfateeritud oktapeptiid (CCK-8s). CCK-8s omab suurt afiinsust CCK₁ retseptori suhtes, samal ajal CCK₂ retseptorile toimivad ka sulfateerimata CCK peptiidid ja gastriin. Seedetraktis on CCK toime vahendatud eelkõige CCK₁ tüüpi retseptorite kaudu. Kesknärvisüsteemis vahendavad CCK toimet peamiselt CCK₂ tüüpi retseptorid. Ometigi ei ole selline jaotus absoluutne ja mitmed seedetrakti funktsioonid realiseeruvad CCK₂ tüüpi retseptorite kaudu (näeks gastriini toime maos), samuti on mitmetes aju struktuurides leitud CCK₁ retseptoreid.

Antud töö eesmärk on uurida CCK kesknärvisüsteemi kaudu kulgevaid regulatsiooni mehhanisme ärevuse ja valutundlikkuse modulatsioonis, kasutades selleks katseloomadena CCK₂ retseptori puudulikkusega (-/-) emaseid hiiri. Selline hiir loodi 1996 aastal Nagata ja kaastöötajate poolt ning on praeguseks ajaks laialdaselt kasutatud uurimisobjektina eelkõige mitmete tsentraalsete regulatsioonimehhanismide uurimiseks. Me seadsime ülesandeks uurida muutusi GABA-ergilises süsteemis, sest nimetatud neuromediaator on mitmetes olulistes ajupiirkondades CCK kaasmediaatoriks. Kasutades diasepaami, mis mõjutab bensodiasepiini retseptorite vahendusel GABA_A retseptorite aktiivsust, püüdsime leida erinevusi liikumisaktiivsuses, ärevuskäitumises, motoorses koordineerimises ja valutundlikkuses. Muidugi ei saa katseloomades toimuvaid protsesse kasutada kui absoluutset tõde CCK rollist

inimese organismis, aga senised uurimused on näidanud, et olulisemad muutused katseloomadel on üldjuhul toimivad ka inimorganismis.

Antud väitekirj põhineb kahel ajakirjas Psychopharmacology ilmunud artiklil (Raud jt. 2003; 2005). Minu roll nendes uuringutes oli osade käitumiskatsete läbiviimine ja osalemine artiklite kirjutamises. Lisaks uurisime kuumplaadi mudelis diasepaami toimet CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte notsitseptiivsele tundlikkusele. Läbiviidud katsete tulemusena võib väita, et CCK₂ retseptori geneetiline väljalülitamine suurendab olulisel määral GABA-ergilise süsteemi aktiivsust emaste hiirte ajus.

Kirjanduse ülevaade

1.1. CCK-ergilise süsteemi iseloomustus kesknärvisüsteemis

Koletsüstokiniin (CCK) on üks levinumaid neuropeptiide ajus. CCK esineb erinevate bioloogiliselt aktiivsete molekulaarsete vormidena, mis kõik pärinevad 115 aminohappest koosnevast pre-proCCK molekulist (Rehfeld ja Nielsen, 1995). 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.

Imetajate kesknärvisüsteemis võib CCK leida enamikus aju piirkondades, välja arvatud väikeaju (Rehfeld jt. 1992). CCK leidub peentes närvilõpmetes kõigis ajukoore kihtides (Larsson ja Rehfeld, 1979), kuid CCK tootvaid neuroneid on vaid mõningal määral neokorteksi II-IV kihis. Arvukalt on CCK tootvaid neuroneid hipokampuses, mandeltuuma piirkonnas, juttkehas ja hüpotaalamuses. Mõõdukalt esineb CCK-ergilisi neuroneid septumi lateraalsetes tuumades, ajuveejuha ümbritsevas hallaines, keskajus ja *area postrema* piirkonnas.

CCK interakteerub kahte tüüpi retseptoritega – CCK₁ ja CCK₂ retseptoritega. Nii CCK₁ kui ka CCK₂ retseptorite puhul on tegemist G-valk seoseliste retseptoritega. CCK₁ retseptorite rakusisesed vahendusmehhanismid on uuritud peamiselt pankrease aatsinuserakkudel ja on leitud, et see retseptorvalk on seotud G_q, G₁₁ või G_s valguga. CCK₂ retseptorite rakusisestest signaaliülekanne mehhanismidest on teada vähem, kuid on täiesti võimalik, et ka CCK₂ retseptorid on samuti seotud G_q, G₁₁ või G_s valguga ja vastavate rakusiseste signaaliülekanne radadega (Noble jt. 1999).

Kesknärvisüsteemis on valdavaks CCK₂ retseptorid. CCK₂ retseptorite spetsiifiliste radioligandide sidumiskatsete abil on teada, et nimetatud retseptorid esinevad näriliste eesaju struktuurides nagu haistmissibulad, haistmistuumad, mandelkeha, ajukoore III ja IV kiht, naalduv tuum, juttkeha ning hipokampus. Vaheajus leidub CCK₂ retseptoreid nii taalamuse kui ka hüpotaalamuse erinevates tuumades. Keskajus leidub CCK₂ retseptoreid mustolluses, ülemistes ja alumistes künkakestes, selgmises õmblustuumas ja ajuveejuha ümbritsevas hallaines. CCK₁ retseptoreid leidub kesknärvisüsteemis oluliselt vähem. CCK₁ retseptorid paiknevad põhiliselt järgmistes ajustruktuurides: *area postrema*, *nucleus interpeduncularia*, *nucleus medialis tracti solitarii*, amügdala tsentraalses tuumas ja hüpotalamuses. CCK₁ retseptorite mRNA on muuhulgas leitud ka hipokampuses ja naalduvas tuumas (Noble jt. 1999).

1.2. CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte lühiiseloostus

CCK₂ retseptorite puudulikkusega hiired loodi Nagata ja kolleegide poolt homoloogse rekombinatsiooni teel, asendades CCK₂ retseptori genoomses DNAs osa teist, kolmandat, neljandat ja viiendat eksonit (Nagata jt. 1996). Selle mutatsiooni tulemusena jääb CCK₂ retseptorist alles 109 aminohapet, kuid retseptor ei ole funktsionaalne. Homosügootsetel hiirtel (-/-) ei ole leitud CCK₂ retseptori mRNA mao limaskestas, peaju koostes ega basaalganglionides. CCK₁ retseptorite mRNA tase ei ole selle mutatsiooni tõttu oluliselt muutunud. Radioligand sidumiskatsete abil ei ole võimalik detekteerida CCK₂ retseptoreid ajus (Nagata jt. 1996; Kõks jt. 2001). 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 (+/+) pesakaaslaste kehakaalust. Järgnevalt loetletud tööstes on valdavalt uuritud mutatsiooni suhtes homosügootseid (-/-), kuid vahel ka heterosügootseid (+/-) CCK₂ retseptori puudulikkusega hiiri. Kontrollrühmana on kasutatud nendes uuringutes rakendatud samasoolisi ja samaealise mutatsioonita pesakaaslast (+/+).

CCK₂ retseptoripuudulikkusega hiirtel esineb mitmeid funktsionaalseid kui ka morfoloogilisi kõrvalekaldeid võrreldes normaalse genotüübiga katseloomadega. Nii on näidatud häireid mao limaskesta arengus (Nagata jt. 1996), muutusi õppimisvõimes (Sebret jt. 1999). Eelnevad uuringud on näidanud, et isastel CCK₂ retseptori puudulikkusega (-/-) hiirtel esineb suurenenud dopamiini D₂ retseptorite tundlikkus juttkehas ning dopamiinergiliste ainete efekt on neil oluliselt modifitseeritud (Dauge jt. 2001; Kõks jt. 2001). CCK₂ retseptori puudulikkusega isastel hiirtel on langenud dopamiini D₂ retseptorite mRNA ekspressioon ning dopamiini D₂ retseptorite valk mesolimbilistes struktuurides (Rünkorg jt. 2006; Miyasaka jt. 2005). Samuti on CCK₂ retseptorite puudulikkusega isastel (-/-) hiirtel kirjeldatud muutusi opioid-ergiliste ainete toimes, mille põhjuseks on muutused opioid-ergilises süsteemis (Dauge jt. 2001; Pommier jt. 2002; Rünkorg jt. 2003; Veraksitš jt. 2003). Areda ja kaasautorid (2006) leidsid, et emastel CCK₂ retseptori puudulikkusega emastel hiirtel on suurenenud μ -opioidi retseptori mRNA kaks korda keskajus ja kolm korda otsmikukoostes. CCK ja opioidide retseptorid paiknevad mõlemad kesknärvisüsteemis mitmetes valuregulatsiooniga seotud struktuurides, seetõttu eeldati ka CCK osa valumehhanismide realiseerumisel (Baber jt. 1989). Valuvastase efekti realiseerumine kesknärvisüsteemis vahendub ka läbi CCK₂ retseptorite (Noble jt. 1999) ning CCK, toimides läbi kesknärvisüsteemis prevaleerivate CCK₂ retseptorite, omab opioid-süsteemile

antagonistlikku toimet (Wiesenfeld-Hallin jt. 1999). Praeguseks on selge, et CCK valu impulsse reguleeriv toime avaldub kesknärvisüsteemis nii spinaalsel kui tsentraalsel tasemel ja et CCK₂ retseptorite puudulikkusega hiirtel esinevad muutused mõlemal tasandil. Pommier jt. (2002) näitas CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel kuumaplaadi katsetes hüperalgeesia teket ja samuti vähenenud tundlikkust morfiinile. Vastupidiselt viimasele muutusele näitas Veraksitš jt. (2003) isastel CCK₂ retseptoripuudulikkusega hiirtel kuumaplaadi katses valuläve tõusu ja samal ajal valutaluvuse vähenemist. Närvisüsteemi kahjustused võivad tekitada kroonilist valu, mida sel puhul nimetatakse neuropaatiliseks valuks. Kuigi analgeetilise toimega ravimeid on palju, on neuropaatilise valu leevendamine sageli ebaefektiivne isegi opioidsete analgeetikumidega (Portenoy jt. 1990). Valutundlikkuse muutusi on näidatud ka CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel seoses muutustega CCK- ja opioidsisüsteemi tasakaalus perifeerse närvikahjustuse korral (Kurrikoff jt. 2004). Samas on viimaste aastate uuringute tulemused näidanud, et CCK süsteemi toime valuaistingu moduleerimisel on komplekssem kui seni on arvatud, hõlmates inimesel väga tugevalt emotsioonidega, sh. ootuse ja ärevusega, seotud struktuure (Luana Colloca ja Fabrizio Benedetti 2005).

1.3. CCK ja γ -aminovõihape (GABA).

CCK seost GABA süsteemiga on näidatud juba üle kahekümne aasta tagasi teostatud uuringutes, kus bensodiasepiini retseptorite agonistid diasepaam ja flurasepaam kõrvaldasid väikestes annustes CCK poolt indutseeritud hipokampuse neuronite üliaktiivsust (Bradwejn ja de Montigny 1984). Mitmete uurimustega on näidatud, et CCK lokaliseerub GABA-ergilistes neuronites ajukoos, mandelkehas ja hipokampuses (Hendry jt. 1984; Kosaka jt. 1985; Cope jt. 2002). Samuti on näidatud, et CCK stimuleerib GABA vabanemist ajukoos ja hipokampuses ning seda toimet vahendavad CCK₂ retseptorid (Perez de la Mora jt. 1993; Miller jt. 1997; Ferraro jt. 1999). Diasepaam ja teised bensodiasepiini retseptori agonistid mõjustavad GABA_A retseptorite aktiivsust, suurendades endogeense GABA afiinsust retseptorite suhtes (Möhler jt. 2002). Diasepaami toime on seotud ärevuse vähendamisega, samuti on näidatud tema pidurdavat toimet katselomade liikumiaktiivsusele ja motoorsele koordinatsioonile (Möhler jt. 2002). CCK₂ retseptorite antagonistid vähendavad diasepaami pikaajalise kasutamise järgselt ilmnevaid võõrutusnähte närilistel (Singh jt. 1992; Rasmussen jt. 1993). Emastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel on näidatud vähenenud ärevust tõstetud pluss-puuri mudelis (Vasar jt. 2002).

Eesmärgid

Käesoleva uuringu põhieesmärgiks oli määrata emaste CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte käitumuslikke iseärasusi ja muutusi valutundlikkuses. Eelnevates katsetes on ainult isastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel uuritud muutusi valutundlikkuses (Veraksitš jt. 2003). Samuti seadsime ülesandeks leida seost GABAergilise süsteemi aktiivsuse ja käitumuslike muutuste vahel emastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel, sest CCK ja GABA on kaasmediaatoriteks mitmetes ajustruktuuride (ajukoor, hipokampus ja mandelkeha), mis omavad olulist rolli käitumise regulatsioonis.

1. Käitumuslikes katsetes püüdisime leida vastuseid järgmistele küsimustele:

- a) milline on liikumisaktiivsus emastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel võrreldes metsikut tüüpi pesakaaslastega?
- b) kas nende hiirte ärevusetase erineb metsikut tüüpi liigikaaslaste omast?
- c) kas emaste geneetiliselt modifitseeritud loomade valutundlikkus erineb metsikut tüüpi liigikaaslastest?

2. Farmakoloogilistes eksperimentides rakendasime diasepaami, bensodiasepiini retseptorite agonisti, ja metüül-6,7-dimetoksü-4-etüül-β-karboliin-3-karboksülaati (DMCM), bensodiasepiini retseptorite pöördagonisti. Nendes katsetes püüdsime leida vastust järgmistele küsimusele:

- a) Kas diasepaami ja DMCM mõjul muutub geneetiliselt modifitseeritud katseloomade käitumine heleda-tumeda puuri uudistamise testis, mis on üheks ärevuse uurimise mudeliks?
- b) Kas diasepaami mõjul muutub emaste CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte käitumine rotarodi ja kuumaplaadi testides?

3. Erinevates ajustruktuurides läbiviidud radioligandi sidumiskatsetes püüdsime leida muutusi [³H]-flunitrasepaami, bensodiasepiini retseptorite agonisti, sidumist iseloomustavates parameetrites CCK₂ retseptorite geneetilise väljalülitamise mõjul.

4. Geeniekspressiooni uuringutes püüdsime leida CCK₂ retseptorite geneetilise väljalülitamise mõju GABA_A retseptori alaühikute α1, α2 ja γ2 geenitranskriptide ekspressioonile erinevates ajustruktuurides.

Materjalid ja meetodika

Katseloomad.

CCK₂ retseptori puudulikkusega hiired on algselt saadud Toshimitsu Matsui laboratooriumist (Nagata jt. 1996) ja katsete jaoks paljundati hiiri TÜ Biomeedikumi vivaariumis. Katsetes kasutati emaseid ~ 3 kuu vanuseid hiiri. Hiirte genotüpeerimine toimus polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil, kasutades amplifikatsioonil kahte paari praimereid: HE2F (TGG AGT TGA CCA TTC GAA TCA C) ja LacZrev (GTG CTG CAA GGC GAT TAA GTT G) disainiti mutantse alleeli detekteerimiseks ja HE3F (TAT CAG TGA GTG TGT CCA CTC T) ja HE3R (ACA TTT GTT GGA CAG GTT CAC) normaalse genotüübi määramiseks. PCR protokoll nendel määramistel oli järgmine: 96°C 10 min algseks denaturatsiooniks; 96°C 50 sek., 60°C 50 sek., 72°C 2 min. (25 tsükli), 72°C 10 min. lõplikuks amplifitseerimiseks. PCR produktid määrati elektroforeesi meetodil. Katseloomi hoiti vivaariumis järgmistel tingimustel: 20±2°C ruumi temperatuur, 12/12 tundi valguse/pimeduse tsükkel (valgustsükli algus kell 7.00), vesi ja toit graanulitena saadaval *ad libitum*. Igat katselooma kasutati eksperimendis ainult üks kord. Eelnevates katsetes on näidatud soost sõltuvat erinevat reaktsiooni 129Sv/C57Bl/6 taustaga hiirte käitumiskatsetes (Raud jt. 2003; Abramov jt. 2004). Isaste loomade valutundlikkuse muutusi on juba kirjeldatud CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel (Veraksitš jt. 2003; Kurrikoff jt. 2004). Antud töös on kasutatud emaseid CCK₂ retseptori puudulikkusega hiiri, selgitamaks soost sõltuvat muutuste olemust. Kõik loomadega läbiviidud protseduurid vastavad Tartu Ülikooli Loomkatsete Eetikakomitee protokollidele, mis omakorda vastavad 24. novembril 1986 väljastatud Euroopa Liidu direktiividele (86/609/EEC).

Manustatud farmakoloogilised ained

Diasepaam (Sigma), lahustati füsioloogilises lahuses (0,9 % NaCl), lisades mõned tilgad Tween 80 (Sigma) ja arvestusega lahuse koguhulk 10 ml/kg. Kontrollgrupile manustati steriilset füsioloogilist lahust, kuhu oli lisatud moned tilgad Tween-80, samades kogustes. Ravimit manustati katseloomadele intraperitoneaalselt (i.p.) 30 minutit enne katse algust annustes 0,5 - 3 mg/kg. Metüül-6,7-dimetoksü-4-etüül- β -karboliin-3-karboksülaat (DMCM), ärevusttekitav β -karboliin, mille toimed on diasepaamile antagonistlikud, lahustati 0,25 ml 0,2 M HCl lahuses, neutraliseeriti 0,05 M NaOH abil ja lahustati seejärel füsioloogilises lahuses arvestusega, et lahuse hulk oli 10 ml/kg.

Käitumise uurimine

Katseloomad toodi ruumi, kus eksperiment läbi viidi, vähemalt 1 tund enne katse algust. Kõik katsed viidi läbi kella 10.00 ja 17.00 vahel. Päeva jooksul on võimalik katseloomade liikumisaktiivsuse oluline erinevus, seetõttu toimusid kõik uuringud randomiseeritud järjekorras ja alati uuriti kontrollrühma hiiri paralleelselt CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtega.

1. Liikumisaktiivsuse test.

Liikumisaktiivsuse hindamiseks kasutati fotoelektrilist jälgimissüsteemi, mis on ühendatud arvutiga (Technical & Scientific Equipment GmbH). Hiired asetati läbipaistvatesse pleksiklaasist kastidesse (448 x 448 x 450 mm), kus nende liikumisaktiivsust määrati infrapunaandurite abil. Liikumisaktiivsuse parameetrid registreeriti automaatselt spetsiaalse arvutiprogrammi abil. Kastide sisemuses oli valguse tugevuseks ~ 500 lux. Iga katse järgselt puhastati kast hoolikalt 5% etanooli vesilahusega ja kuivatati. 30 minutilise jälgimisperioodi

jooksul mõõdeti järgmiseid liikumiaktiivsuse parameetreid: liikumisaeg (s), läbitud vahemaa (m), tagakäppadele tõusude ja nurkadesse sisenemiste arv.

2. Uudistamisaktiivsuse test.

Antud katse võimaldab hinnata hiirte ärevusseisundit ja on kasutusel sellel eesmärgil väga erinevates labortaooriumites (Crawley & Goodwin 1980). Katseloomad asetatakse pleksiklaasist kasti, mis on vaheseinaga eraldatud. 2/3 kastist on heledalt valgustatud (~ 500 lux) 60 W elektripirni poolt, mis on kasti kohal 30 cm kasti põrandapinnast. 1/3 kastist on ülejäänud osast eraldatud vaheseinaga, milles on 13 x 5 cm avaus ja antud kasti osa seinad on seest musta värvi ja pealt kaetud kattega. Katseloomad asetatakse kasti heledama osa keskele näoga avausest eemale ja mõõdetakse aeg hiire liikumiseni tumedasse kasti osasse, samuti aeg, mis katseloom viibis heledalt valgustatud kasti osas ja ka erinevate kasti osade vahelise ava läbimiste arv. Katse kestvus oli 5 minutit alates esimesest kasti tumedamasse osasse sisenemisest.

3. Rotarodi test.

Antud katses asetatakse hiired liikuvale silindrile (rotarod), mille diameeter on 8 cm ja pöörlemiskiirus 9 pööret minutis. Katselooma motoorset koordineerimist hinnatakse rotarodilt kukkumise aja järgi. Diasepaam doosides 0.5 mg/kg ja 3 mg/kg või füsioloogiline lahus manustati katseloomadele 30 min. enne eksperimendi algust intraperitonaalselt.

Valutundlikkuse uurimine

Loomad toodi katseruumi vähemalt 1 tund enne katsete algust. Kõik katsed toimusid ajavahemikus 10:00 – 16:00. Katse alguseni viibisid loomad kodupuurides. Katseloomad olid jagatud nelja gruppi:

1. Kontrollgrupp (eelmõjutuseta)
2. 0,9 % NaCl 10 ml/kg i.p.
3. Diasepaam 1 mg /kg i.p.
4. Diasepaam 3 mg/kg i.p.

4. Kuumplaadi test.

Hiired asetati katse käigus kuumale metallplaadile (30 x 50 cm) temperatuuriga $52 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, kus nende liikumine oli piiratud läbipaistva, pealt avatud pleksiklaasist silindriga (diameeter 15 cm, kõrgus 20 cm). Aeg hetkeni, mil katseloom lakkus või raputas intensiivselt tagakäppa fikseerit käsitsi stopperiga kui esmane reaktsioon valuaistingule. Sekundaarne reaktsioon fikseeriti hetkel, mil hiir püüdis hüppamisega katsesituatsioonist põgeneda. Kohe pärast sekundaarse reaktsiooniaja fikseerimist eemaldati katseloom metallplaadilt ja asetati kodupuuri tagasi. Maksimaalne katsesituatsioonis viibimise aeg (cut-off time) oli 3 min. Kui selle aja jooksul reaktsiooni ei ilmnenu, siis katseloomad eemaldati plaadilt ja aeg (180 sekundit) märgiti kui tulemus protokollis.

Radioligandi sidumiskatsed

Radioligandi sidumiskatsetes mõõdeti bensodiasepiini retseptorite afiinsust ja nende tihedust suurajukoos, hipokampus ja väikeajus. Bensodiasepiini retseptorite märgistamiseks kasutati [^3H]-flunitrasepaami ja mittespetsiifilise sidumise määramiseks bensodiasepiini retseptorite agonisti diasepaami. Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooni abil. Peaaju eemaldati kiiresti ja jahutati jääl. Järgnevalt prepareeriti välja ja eraldati järgmised ajustruktuurid: frontaalne ja parietaalne ajukoor, hipokampus ja väikeaju (Franklin jt. 1997). Kuult hiirelt võetud ajustruktuurid pandi kokku. Retseptor-membraani kompleksid eraldati homogeniseerimise ja sellel järgneva suspendeerimise teel (Kõks jt. 1997). Saadud

suspensiooni kasutati radioligandi sidumiseks. [³H]-flunitrasepaami seostumise küllastuskõverat analüüsiti Windows'i tarkvaral põhineva *GraphPad Prism* (Versioon 3,0) arvutiprogrammi abil. Eksperimenti korrati neljal korral.

Geeniekspressiooni analüüs: erinevate ajustruktuuride prepareerimine, RNA

eraldamine ja cDNA süntees.

Geeniekspressiooni analüüsi jaoks kasutati kahte gruppi katsetes mitteosalenud hiiri: metsikut tüüpi (+/+) ja CCK₂ retseptori puudulikkusega hiired (-/-), kummaski rühmas 12 looma. Loomad surmati dekapitatsiooniga, ajustruktuurid (väikeaju, ajutüvi, hipokampus, frontaalkoor) eraldati ja paigutati kiiresti vedela lämmastiku keskkonda.

Koetükke hoiti kuni kuni edasise töötluseni -80°C juurs. RNA eraldati Rneasy Midi Kit (Qiagen) abil vastavalt tootja protokollile. cDNA esimene ahel sünteesiti First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) abil samuti vastavalt tootja protokollile. Eelnimetatud ajustruktuurid mõlemas katseloomade grupis pandi kokku kahe katselooma kaupa, et vähendada individuaalsetest erinevustest tulenevaid geeniekspressiooni kõikumisi. Mõõtmised mõlema katseloomade grupi jaoks toimusid paralleelselt. Mõõdeti GABA_A retseptori alaühikute $\alpha 1$, $\alpha 2$ ja $\gamma 2$ geenitranskriptide ekspressioonimäärasid. Ekspressioonitasemete määramiseks kasutati *real-time* PCR (qRT-PCR) reaktsiooni, mis viidi läbi ABI PRISM 7700 SDS aparaadiga (Applied Biosystems, USA), kasutades tootja poolt kaasa antud tarkvara. Kõigis kvantitatiivse geeniekspressiooni katsetes kasutati hüpoksantiin-guaniin fosforibosüül transferaasi (HPRT) kui endogeenset võrdlusgeeni. Praimerid disainiti Primer Express TM tarkvara (PE Applied Biosystems) abil. Praimerite järjestused on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Praimerite järjestused qRT-PCR katsetes.

TRANSKRIPT	(FORWARD) PRAIMER	(REVERSE) PRAIMER
GABA_A retseptori α1 alaühik	5'-CACCAGTTTCGGACCAGTTT-3'	5'-ACAGCAGAGTGCCATCCTCT-3'
GABA_A retseptori α2 alaühik	5'-CACAGAGGATGGCACTCTGCT-3'	5'-TTCAGCTCTCACGGTCAACCT-3'
GABA_A retseptori γ2 alaühik	5'-TGACAACAACTTCGACCTGACA-3'	5'-CTGTATGAATTAATGTTGGTTTCACTC-3'
HPRT	5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'

Kõikide reaktsioonide puhul kasutati SYBR Green I Master Mix (Roche) reaktiivide segu, jälgides täpselt tootja poolt väljatöötatud protokolle. PCR produkti puhtuse kontrollimiseks kasutati sulamiskõvera analüüsi. Kõik võrdlusgrupid töödeldi samas mõõtmistsükli. Suhtelised geeniekspressiooni tasemed arvutati võrdleval Ct ($\Delta\Delta Ct$) meetodil (Livak & Schmittgen 2001). Iga reaktsioon toimus 4 paralleelses korduses, et vähendada võimalikke katsevigu.

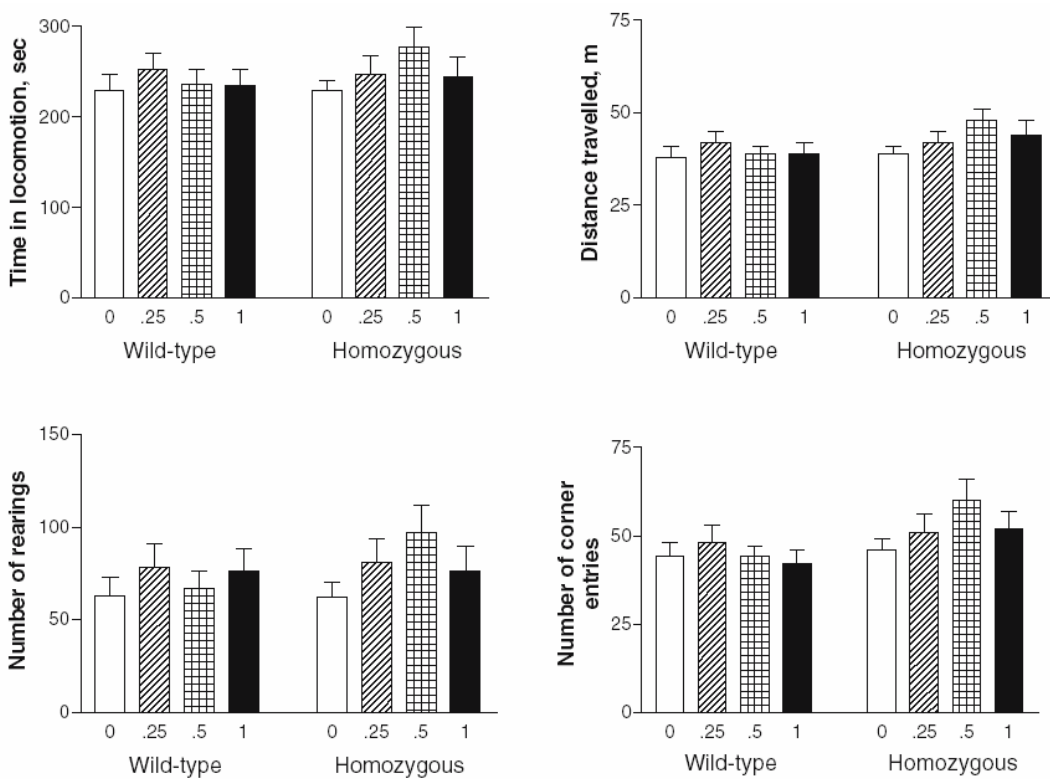
Andmete statistiline analüüs

Tulemused avaldati gruppide keskmiste väärtustena \pm S.E.M. Tulemuste analüüsil kasutati ühe- ja mitmesuunalist variatsioonianalüüsi (ANOVA/MANOVA). *Post hoc* võrdlus gruppide vahel tehti Scheffe, Newman-Keuls'i ja Tukey HSD testide abil, kasutades selleks *Statistica* tarkvara Windowsi keskkonnas. Radioligandi sidumiskatse tulemuste hindamiseks kasutasime Student'i t-testi.

Tulemused

DMCM mõju liikumisaktiivsusele CCK₂ retseptorite puudulikkusega hiirtel

DMCM ei muutnud üheski kasutatud doosis oluliselt katseloomade liikumisaktiivsust, samuti ei esinenud statistiliselt usaldusväärseid muutusi metsikut tüüpi ja CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte liikumisaktiivsuses.

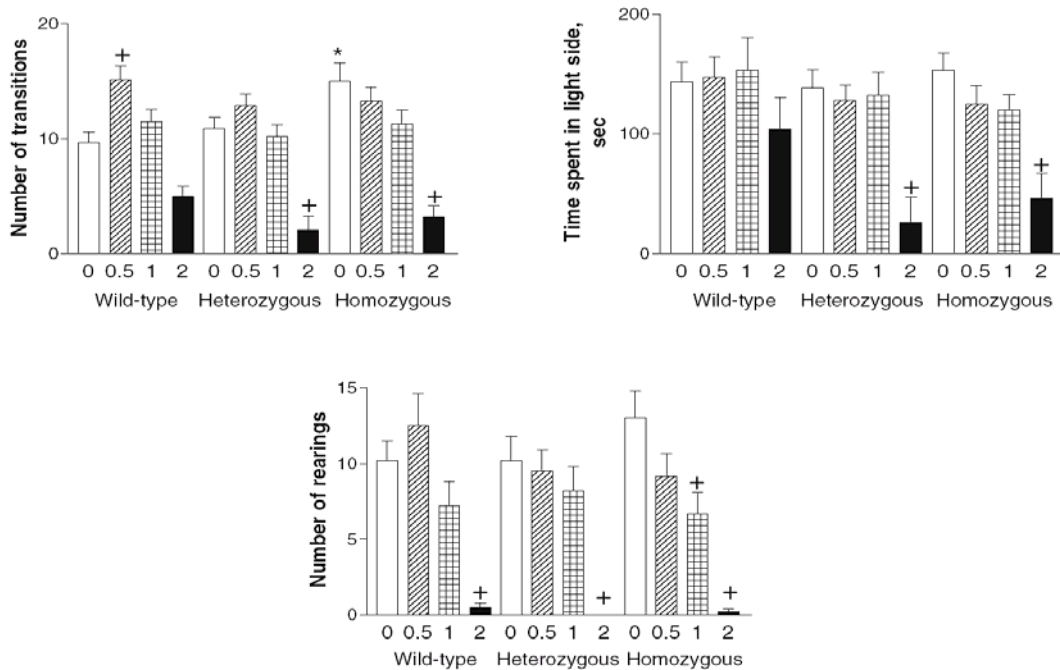


Joonis 1. DMCM (0,25-1 mg/kg) mõju katseloomade motoorikale. Rühma suurus oli 14 või 15 hiirt. Valged tulbad – füsioloogilise lahuse toime, triibulised tulbad – DMCM 0,25 mg/kg, ruudulised tulbad – DMCM 0,5 mg/kg, mustad tulbad – DMCM 1 mg/kg.

Diasepaami ja DMCM toime CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte käitumisele

heleda-tumeda puuri uudistamise testis.

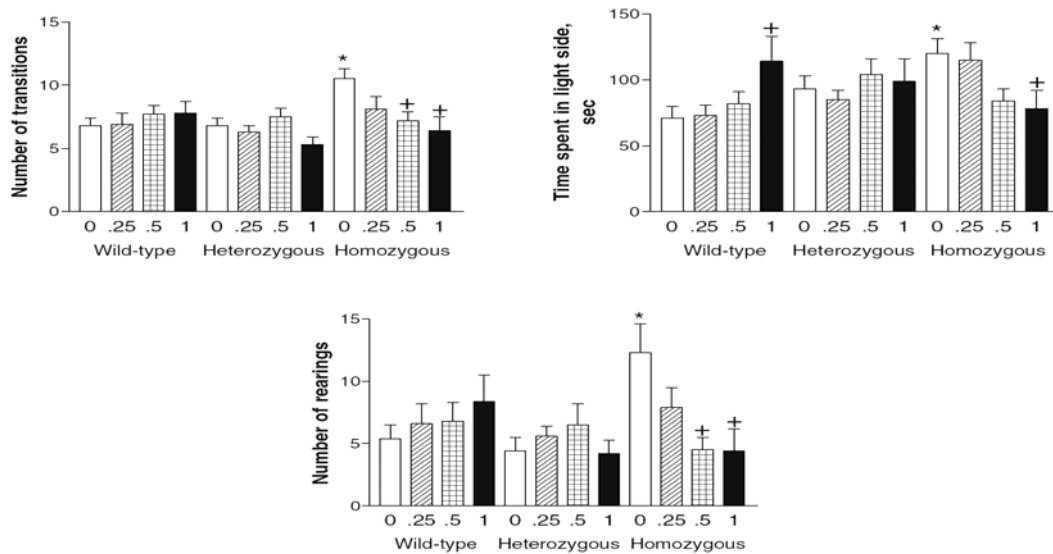
Nagu näha jooniselt 2, mõjutas diasepaami manustamine (0,5-2 mg/kg) katseloomade käitumist erinevalt. Metsikut tüüpi hiirtel põhjustas diasepaami väikseim doos (0,5 mg/kg) erinevate kasti osade vahelise ava läbimiste arvu tõusu, CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel põhjustas suurim diasepaami doos (2 mg/kg) olulist erinevate kasti osade vahelise ava läbimiste arvu vähenemist. Diasepaami suurim doos põhjustas CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel kasti heledamas pooles veedetud aja vähenemist. Tagakäppadele tõusude arv vähenes diasepaami suurima doosi toimet kõikides uuritavates gruppides oluliselt.



Joonis 2. Diasepaami (0,5-2 mg/kg) mõju katseloomade uudistamisaktiivsusele. Rühma suurus oli 23-27 hiirt. Valged tulbad - füsioloogilise lahuse toime, triibulised tulbad – diasepaam 0,5 mg/kg, ruudulised tulbad – diasepaam 1 mg/kg, mustad tulbad – diasepaam 2 mg/kg. (*) $P < 0,05$ võrreldes metsikut tüüpi hiirte (+/+) kontrollgrupiga, Newman-Keuls'i test peale usaldusväärset kahesuunalist variatsiooni analüüsi. (+) $P < 0,05$ võrreldes diasepaami toimet vastava grupi füsioloogilise lahuse toimega.

DMCM avaldas samuti katseloomade uudistamisaktiivsusele erinevat mõju. CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel põhjustas DMCM doosist sõltuvat erinevate kasti osade vahelise avatõlgete arvu vähenemist. Kasti heledas osas viibimise aega mõjutas DMCM samuti erinevalt - metsikut tüüpi katseloomadel põhjustas selline manipulatsioon küllalt ootamatult kasti heledas osas viibimise aja pikenemist, samas CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel vähenes kasti heledas osas viibimise aeg DMCM doosist sõltuvalt.

Tagakäppadele tõusude osas oli DMCM toime samuti erinev ja nimelt metsikut tüüpi hiirtel põhjustas selline mõjustus tagakäppadele tõusude arvu suurenemist, kuigi muutus ei olnud statistiliselt usaldusväärne. CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel põhjustas DMCM manustamine doosist sõltuvat tagakäppadele tõusude vähenemist.

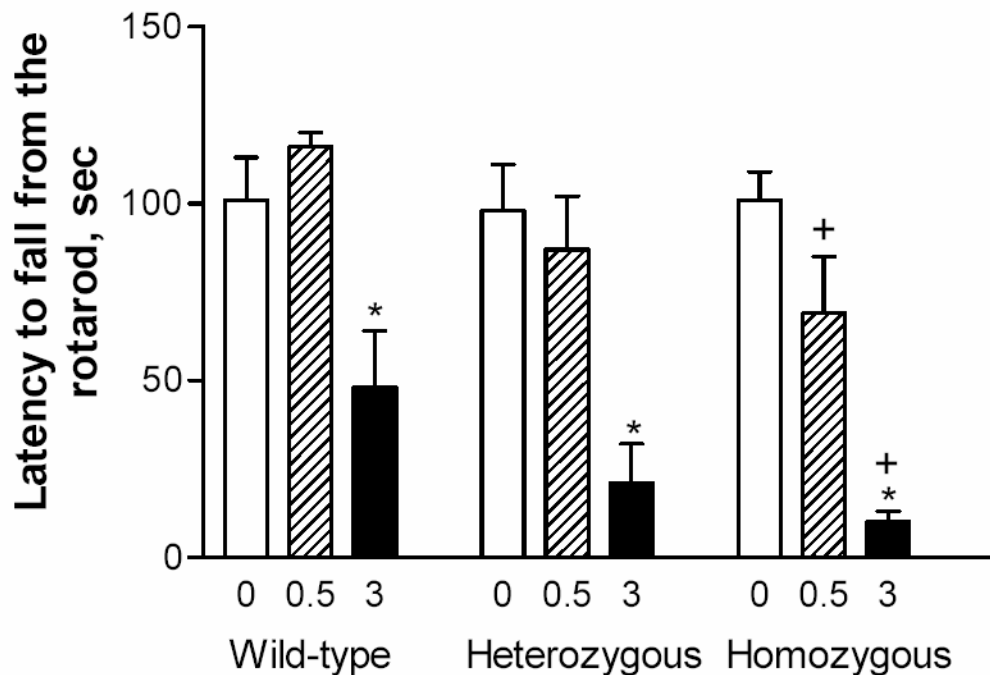


Joonis 3. DMCM (0,25 – 1 mg/kg) toime katseloomade uudistamisaktiivsusele. Rühma suurus oli 14 kuni 16 hiirt. Valged tulbad – füsioloogilise lahuse toime, triibulised tulbad – DMCM 0,25 mg/kg, ruudulised tulbad – DMCM 0,5 mg/kg, mustad tulbad – DMCM 1 mg/kg. (*) P<0,05 võrreldes metsikut tüüpi hiirte (+/+) kontrollgrupiga, Newman-Keuls'i test peale usaldusväärset kahe-suunalist variatsiooni analüüsi. (+) P<0,05 võrreldes DMCM toimet vastava grupi füsioloogilise lahuse toimega.

Diasepaami mõju CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtele motoorse koordineerimise testis.

Diasepaami manustamine kutsus esile doosist sõltuva motoorika häirumise kõigis katseloomade gruppides [genotüüp: $F(2,77)=4,94$, $P<0,01$; annus: $F(2,77)=38,04$, $P<0,01$; genotüüp x annus: $F(4,77)=0,99$, $P>0,25$]. Hilisem *post-hoc* analüüs näitas aga diasepaami oluliselt tugevamat toimet motoorsele koordineerimisele CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte grupis võrreldes metsikut tüüpi hiirtega (Tukey HSD test: $P<0,05$).

Joonis 4. Diasepaami toime katseloomadele rotarod testis. Valged tulbad – kontroll (füsioloogiline

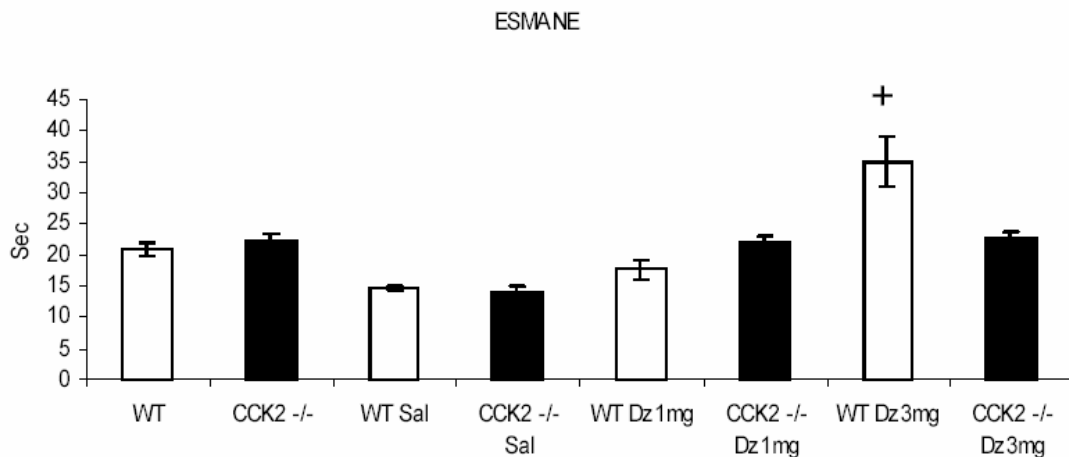


lahus); viirutatud tulbad – diasepaam 0,5 mg/kg; mustad tulbad – diasepaam 3 mg/kg). (*) $P<0,05$ võrreldes vastava kontrollgrupiga, Tukey HSD test peale usaldusväärset kahe-suunalist variatsiooni analüüsi; (+) $P<0,05$ võrreldes diasepaami toimega metsikut tüüpi hiirtele.

Valutundlikkuse määramine kuumplaadi katses.

Esmase valutundlikkuse test

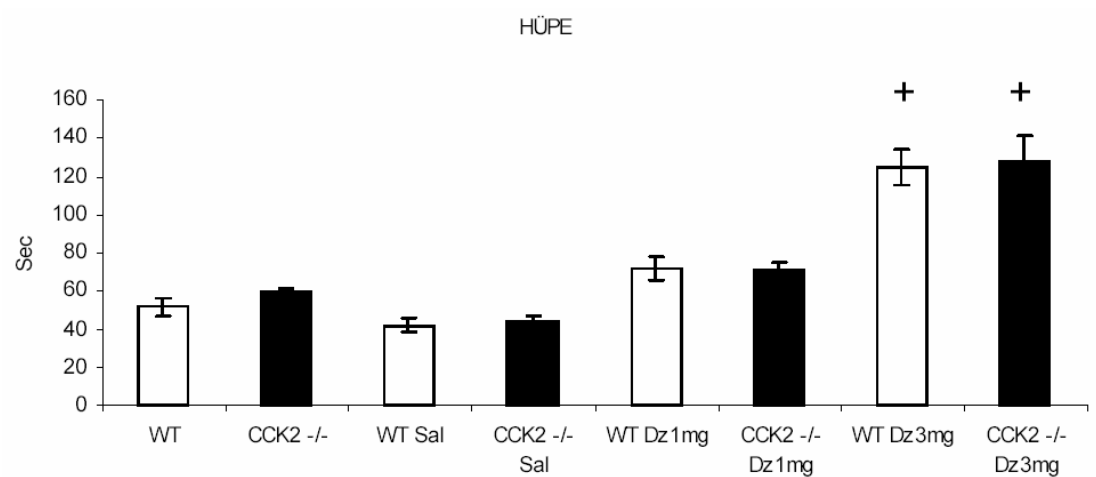
Antud katsemudelid olid baasväärtused nii normaalse genotüübiga kui ka CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel sarnased. Füsioloogilise lahuse eelnev süstimine põhjustas küll mõõdukat valutundlikkuse suurenemist, aga toime oli mõlemale grupile sarnane. 1 mg/kg diasepaami manustamine katse eelselt põhjustas valutundlikkuse taastumise esialgsele tasemele, kusjuures normaalse genotüübiga hiirtel jäi reaktsiooni aeg valule siiski mõnevõrra lühemaks. 3 mg/kg diasepaami manustamise järgselt esinesid gruppide vahel aga märgatavad erinevused. Metsikut tüüpi hiirtele toimis selline doos valutundlikkust vähendavalt, aga CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte grupis selline toime puudus. Valutundlikkust iseloomustav tagakäpa raputuse/lakkumise reaktsioon jäi praktiliselt samale tasemele vastava genotüübiga kontrollgrupi algsele reaktsiooniaja väärtustele.



Joonis 5. Diasepaami mõju CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte esmasele reaktsioonile kuumplaadi testis. + - märgib statistiliselt olulist erinevust (Scheffe test $p < 0,01$) peale usaldusväärset kahe-suunalist variatsiooni analüüsi kõigist teistest gruppidest.

Valu taluvuse test

Nagu järgneval diagrammil näha, käituvad nii metsikut tüüpi emased hiired kui ka CCK₂ retseptori puudulikkusega loomad selles katsemudelis sarnaselt. Olulist erinevust ei esine ühegi mõjustuse puhul ning samuti ei erine statistiliselt ka baasväärtused. Diasepaami (3 mg/kg) mõjul suureneb oluliselt katseloomade valutaluvus.

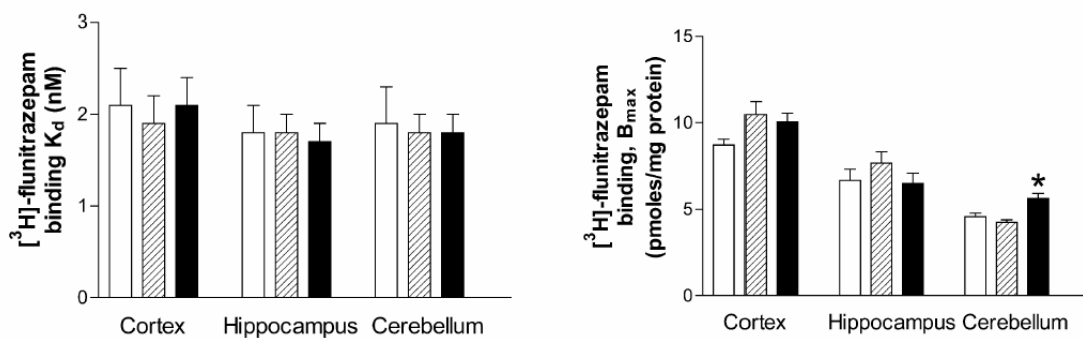


Joonis 6. CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte valutaluvuse muutused diasepaami mõjul kuumplaadi katses. + - märgib statistiliselt olulist erinevust (Scheffé test $p < 0,01$) peale usaldusväärset kahesuunalist variatsiooni analüüsi kõigist teistest gruppidest välja arvatud sama diazepamini doosi (3 mg/kg) mõjust vastavale võrdlusgrupile.

CCK₂ retseptorite geneetilise väljalülitamise mõju bensodiasepiini retseptorite omadustele.

[³H]-flunitrazepaami sidumiskohtade arv (B_{max}) väikeajus oli suurenenud homosügootsetel (-/-) hiirtel võrreldes metsikut tüüpi (+/+) katseloomadega.

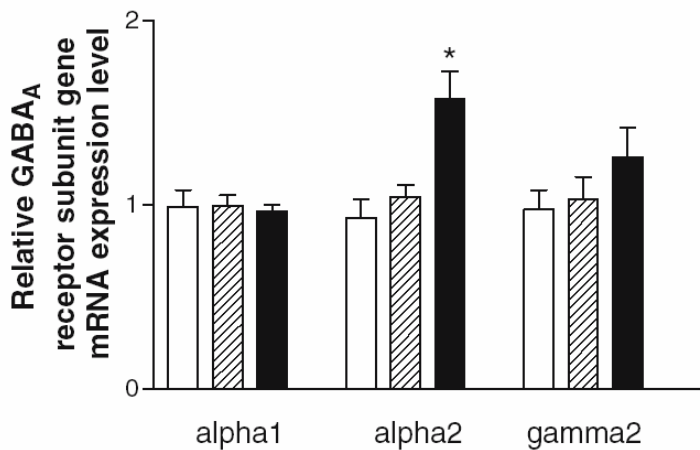
Ajukoos ja hipokampus selline erinevus puudus. Bensodiasepiini retseptorite afinsuses (K_d) kõigis uuritud ajustruktuurides gruppide vahelised statistiliselt usaldusväärsed erinevused puudusid.



Joonis 7. CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte erinevate ajustruktuuride [³H]-flunitrazepaami sidumise parameetrid. Igasse rühma kuulus 24 looma, kuue katselooma koed segati omavahel homogeniseerimise käigus ja keskmised väärtused iseloomustavad nelja erineva katse tulemusi. Valged tulbad – metsikut tüüpi (+/+) hiired, viirutatud tulbad – heterosügootsed (+/-) hiired ja mustad tulbad – homosügootse mutatsiooniga (-/-) hiired. (*) P<0,05 (võrdlus metsikut tüüpi hiirte rühmaga, Student'i t-test).

GABA_A retseptori alaühikute geeniekspressiooni muutused CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel.

Enamusel juhtudest ei esinenud GABA_A retseptoriga seotud geenide ekspressioonis olulisi erinevusi. Statistiliselt oluline erinevus oli täheldatav ainult $\alpha 2$ alaühiku osas otsmikukooses ja see avaldus CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel 1,6 kordses ekspressiooni tõusus. $\gamma 2$ alaühiku osas oli erinevus 1,24 kordne, aga see ei ületanud statistilise usaldatavuse taset.



Joonis 8. GABA_A retseptori alaühikute ($\alpha 1$, $\alpha 2$ ja $\gamma 2$) suhtelised mRNA ekspressiooni määrad CCK₂ retseptorpuudulikkusega hiirte otsmikukooses, väikeajus ja hipokampuses. Valged tulbad – väikeaju, viirutatud tulbad – hipokampus, mustad tulbad – frontaalne ajukoore. (*) $P < 0,05$ (võrdlus metsikut tüüpi hiirte rühmaga, Student'i t-test).

Diskussioon.

Läbiviidud katsete tulemusena võib öelda, et emastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel on suurenenud uudistamisaktiivsus võrreldes metsikut tüüpi hiirtega. Samas tasub märkida, et basaalses motoorses aktiivsuses nende kahe grupi vahel erinevusi ei esinenud. Seega võib leitud erinevus uudistamisaktiivsuses tuleneda CCK₂ retseptori puudulikkusega emaste hiirte vähenenud ärevusest. Vähenenud ärevusseisundile viitavad ka varem saadud andmed pluss-puuri katses (Raud jt. 2003; Abramov jt. 2004). Samas on ilmne, et ärevuse tase on sõltuvuses ka metsikut tüüpi hiirte lähte ärevustasemest. Erineva geneetilise taustaga hiirtel võib see olla üsna erinev. Näiteks C57B1/6 hiired on võrreldes 129Sv hiireliiniga oluliselt vähenenud ärevusega (Võikar jt. 2001, 2004). Uudistamisaktiivsuse erinevusi on näidatud isastel Wistar liini rottidel (Kõks jt. 2000). Selline erinevus ilmnes rottidel erinevatel aastaegadel, olles talvel rohkem väljendunud kui suvel. Leiti ka muutunud CCK₂ retseptori tihedus frontaalses ajukoos ja hipokampuses. Nimelt oli vähenenud uudistamisaktiivsusega rottidel CCK₂ retseptorite tihedus nendes aju piirkondades tõusnud. Kas sellised muutused kehtivad ka hiirtel, vajab veel uurimist.

Diasepaami madal doos (0,5 mg/kg) põhjustas metsikut tüüpi hiirtel uudistamisaktiivsuse tõusu, kõrgem doos (2 mg/kg) aga toimis vastupidiselt. Madala doosi puhul aktiveerus metsikut tüüpi hiirte uudistamiskäitumine täpselt CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte tasemele. Analooogne muutus on leitud ka eelnevates uuringutes tõstetud pluss-puuri katses (Raud jt. 2003). Chaouloff jt. (1999) väidab, et tõstetud pluss-puuri mudel on uudistamisaktiivsuse taseme määratlemisel diasepaami toimele tundlikum kui heleda-tumeda puuri eksploratsiooni mudel, kuna see katse sõltub rohkem hiirte motoorsest aktiivsusest, mida diasepaam teadupärast pärsib. CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel ei põhjustanud diasepaami madal doos (0,5 mg/kg) olulisi nihkeid uudistamisaktiivsuses heleda-

tumeda puuri uudistamise katses, kuid alates doosist 1 mg/kg sedastasime püstumiste arvu vähenemist, mis viitab mootorika pärssumisele.

Rotarod testis oli sama doosi diasepaami toime samuti tugevam CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel. See on ka tõenäoline põhjus, miks me ei ole võimelised sedastama ärevust vähendavat toimet geneetiliselt modifitseeritud hiirtel. Diasepaami ärevust pärssiva toime realiseerumine sõltub oluliselt kasutatava hiireliini ärevuse lähtetasemest. Eespool sai juba mainitud, et 129Sv liini hiired on tunduvalt ärevamad võrreldes C57B1/6 liini hiirtega (Võikar jt. 2001, 2004). Seega võib tagasiristamine C57B1/6 hiireliiniga varjata ravimite või geneetilise manipulatsiooni mõju ärevusseisundile. See aspekt võib olla ka põhjuseks, miks Miyasaka jt. (2002) näitasid vähenenud uudistamiskäitumise taset CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel, kuna metsikut tüüpi hiirte basaalne uudistamiskäitumise tase oli liiga kõrge, et loota geneetilise manipulatsiooni järgseid muutusi aktiveerumise suunas.

Bensodiasepiini retseptorite pöördagonist DMCM põhjustas metsikut tüüpi hiirtel küllalt ootamatult uudistamisaktiivsuse tõusu. Selle põhjuseks võiks olla tugev 129Sv hiireliini taust kasutatud katseloomadel. CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel põhjustas DMCM doosist sõltuvat uudistamisaktiivsuse vähenemist. DMCM toime katsetes osalenud hiirtele ei ole seotud nende mootorika muutusega, kuna mootorika muutusi selliste DMCM dooside juures me ei sedastanud. Järelikult toimib DMCM eelkõige hiirte ärevusseisundile ja tema toime sõltub samuti katseloomade basaalsest uudistamisaktiivsuse tasemest. Geneetilise tausta osa ärevusseisundi väljakujunemisel demonstreerivad ilmekalt ka Holmes ja kaasautorite (2003) uuringud, kus serotoniini transporter geeni väljalülitamine põhjustas ärevusseisundit C57B1/6 liini hiirtel aga mitte 129Sv hiirtel.

Väikeaju omab tsentraalset rolli motoorse koordinatsiooni regulatsioonis (Mason & Stoletto 1997). Mootorika häirete väljakujunemine oli ilmekam CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel. Selle muutuse põhjuseks võib olla bensodiasepiini retseptorite

suurenenud tihedus CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte väikeajus võrreldes metsikut tüüpi hiireliiniga.

Diasepaami anksiolüütiline toime realiseerub läbi GABA_A retseptori $\alpha 2$ alaühiku. Selle alaühiku geneetiline väljalülitamine põhjustab diasepaami anksiolüütilise toime kadumist (Löw jt. 2000; Möhler jt. 2002). Meie oma uuringutes leidsime GABA_A $\alpha 2$ alaühiku 1,6 kordse tõusu CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte otsmikaju kooses. GABA_A retseptorite $\alpha 1$ ja $\gamma 2$ alaühikute geenide ekspressiooni tase oli erinevates gruppides sama, kuigi $\gamma 2$ alaühiku osas esines 1,24 kordne tõus, mis aga see ei osutunud statistiliselt oluliseks. CCK lokaliseerub ajukooses ainult GABA-ergilistes neuronites (Hendry jt. 1984) ja seega CCK moduleerib nende neuronite aktiivsust (Ferraro jt. 1999). CCK₂ retseptorite puudumine viib olukorrani, kus CCK tasakaalustav roll GABAergilistele neuronitele puudub. See võib olla ka põhjuseks GABA_A retseptori $\alpha 2$ alaühiku ekspressiooni tõusule CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte otsmikaju kooses.

Valutundlikkus antud katsetes ei olnud metsikut tüüpi hiirtel ja CCK₂ retseptori puudulikkusega emastel hiirtel oluliselt erinev. Veraksitš jt. (2003) näitas isastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel kuumaplaadi katses valuläve tõusu ja samal ajal valutaluvuse vähenemist. Käesolevas uuringus esineb erinevus ainult esmase valureaktsiooni mõjutamisel diasepaamiga annuses 3 mg/kg, mille puhul metsikut tüüpi emaste hiirte reaktsiooni aeg notsitseptiivsele ärritajale oli tunduvalt pikenenud, samal ajal emastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel jäi nimetatud reaktsiooni aeg praktiliselt algnivoo tasemele. Samas ei ole muutunud diasepaami toime valutaluvusele. Arvestades diasepaami oluliselt tugevamat toimet metsikut tüüpi loomade uudistamiskäitumisele, võib oletada, et hiirte esmane reaktsioon notsitseptiivsele ärritajale võib mingil moel olla seotud nende kahe hiireliini erineva emotsionaalsusega ja sellest tulenevalt erineb neil ka diasepaami toime. Selle kasuks räägib asjaolu, et diasepaami väikseim (0.5 mg/kg) annus suurendas uudistamisaktiivsust

metsikut tüüpi hiirtel, aga mitte geneetiliselt modifitseeritud katseloomadel. Need tulemused tõestavad GABA süsteemis toimunud adaptatiivseid muutusi CCK₂ retseptorite väljalülitamise mõjul.

Kokkuvõtlikult näitavad meie katsetulemused GABA-ergilise süsteemi toonuse tõusu ja vähenenud ärevust 129Sv/C57Bl/6 taustaga emastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel. Farmakoloogilised ja geeniekspressiooni uuringud toetavad neid järeldusi. GABA-ergilise süsteemi toonuse tõus võib olla vähemalt osaliselt selleks põhjuseks, miks on ärevus vähenenud CCK₂ retseptori puudulikkusega emastel hiirtel.

JÄRELDUSED

1. CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel on suurenenud uudistamisaktiivsus heleda-tumeda puuri katses, kusjuures CCK₂ retseptori geneetiline väljalülitamine ei mõjuta oluliselt homosügootsete hiirte mootorikat. Need tulemused viitavad vähenenud ärevusele geneetiliselt modifitseeritud loomadel.
2. Bensodiasepiini retseptorite agonist diasepaam suurendab eksploratiivset aktiivsust metsikut tüüpi, aga mitte CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel. Bensodiasepiini retseptori pöördagonist DMCM kutsub geneetiliselt modifitseeritud hiirtel esile doosist sõltuva uudistamisaktiivsuse languse. Metsikut tüüpi katseloomadel avaldab DMCM vastupidist toimet, suurendades uudistamisaktiivsust. Diasepaami ja DMCM mõju metsikut tüüpi hiirtele saab seletada suuremat lähteärevust tingivate 129Sv hiireliini geenide domineerimisega nende genotüübis.
3. Metsikut tüüpi ja CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirte reaktsioon ei erine motoorse koordineerimise testis. Diasepaami manustamisel ilmnevad aga oluliselt tugevamad motoorse koordineerimise häired geneetiliselt modifitseeritud katseloomadel. Homosügootsetel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel on suurenenud bensodiasepiini retseptorite arv väikeajus. See neurokeemiline muutus on ilmselt seostatav diasepaami oluliselt tugevama motoorset koordineerimise häiriva toimega CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel.
4. Emastel CCK₂ retseptori puudulikkusega hiirtel ei ole valutundlikkus oluliselt muutunud võrreldes metsikut tüüpi pesakaaslastega. Küll on oluliselt tugevam diasepaami toime metsikut tüüpi loomade esmasele notsitseptiivsele reaktsioonile, mis on ilmselt seletatav metsikut tüüpi loomade suurema ärevusega võrreldes geneetiliselt modifitseeritud katseloomadega.

5. CCK₂ retseptori geneetiline väljalülitamine suurendab märkimisväärselt GABA_A retseptori $\alpha 2$ alaühiku, mis on seotud diasepaami anksiolüütilise toimega, ekspressiooni otsmikaju kooses. Käitumiskatsete ning farmakoloogiliste ja neurokeemiliste uuringute tulemuste alusel võib väita, et CCK₂ retseptori geeni väljalülitamine kutsub esile GABAergilise süsteemi toonuse olulise tõusu KNS-is.

ABSTRACT

In this work, we established that the genetic invalidation of CCK₂ receptors increased the exploratory activity of mice.

The changes in the action of diazepam and DMCM, compounds having an opposite influence on GABA_A receptors, on the animal behaviour suggest that the activity of the GABAergic system is affected by the genetic invalidation of CCK₂ receptors.

Our study also indicates that female mice of 129Sv/C57Bl/6 background are more suitable for the study of anxiety compared to their male littermates. This is in good agreement with the experiments performed by Vöikar and colleagues (2001). The exploratory activity of female wild-type (+/+) mice in the elevated plus-maze is significantly higher compared to male animals. This behaviour of female mice can be increased and reduced by genetic and pharmacological manipulations, whereas in male mice the effect of anxiolytic-like manipulations can be established.

Alterations in the activity of the GABAergic system, established in the pharmacological studies, are confirmed by the data from radioligand binding studies with [³H]-flunitrazepam and expression studies using the genes of GABA_A receptor subunits. An increased density of benzodiazepine receptors in the cerebellum and an increased expression of GABA_A receptor subunit $\alpha 2$ gene are clear indications of an increased function of the GABAergic system in the brain.

Altogether, the data of behavioral, pharmacological and neurochemical studies reflect an increased tone of GABAergic system in mice, lacking CCK₂ receptors.

Kasutatud kirjandus

1. Abramov U, Raud S, Koks S, Innos J, Kurrikoff K, Matsui T, Vasar E. Targeted mutation of CCK(2) receptor gene antagonises behavioural changes induced by social isolation in female, but not in male mice. *Behav Brain Res.* 2004 Nov 5;155(1):1-11.
2. Areda T, Raud S, Philips MA, Innos J, Matsui T, Koks S, Vasar E, Karis A, Asser T. Cat odour exposure decreases exploratory activity and alters neuropeptide gene expression in CCK(2) receptor deficient mice, but not in their wild-type littermates. *Behav Brain Res.* 2006 May 15;169(2):212-219.
3. Baber NS, Dourish CT, Hill DR. The role of CCK, caerulein, and CCK antagonists in nociception. *Pain* 1989 39:307–328.
4. Becker C, Thiebot MH, Touitou Y, Hamon M, Cesselin F, Benoliel JJ. Enhanced cortical extracellular levels of cholecystokinin-like material in a model of anticipation of social defeat in the rat. *J Neurosci* 2001 21:262–269.
5. Bradwejn J, De Montigny C. Benzodiazepines antagonize cholecystokinin-induced activation of rat hippocampal neurones. *Nature* 1984 312:363–364.
6. Chaouloff F, Courvoisier H, Moisan MP, Mormede P. GR 127935 reduces basal locomotor activity and prevents RU 24969-, but not D-amphetamine-induced hyperlocomotion, in the Wistar-Kyoto hyperactive (WKHA) rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Jan;141(3):326-31.
7. Colloca L, Benedetti F. Placebos and painkillers: is mind as real as matter? *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jul;6(7):545-452.
8. Cope DW, Maccaferri G, Márton LF, Roberts JDB, Cobden PM, Somogyi P. Cholecystokinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neurosci* 2002 109:63–80.
9. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980 13:167–170.
10. Dugé V, Beslot F, Matsui T, Roques BP. Mutant mice lacking the cholecystokinin2 receptor show a dopamine-dependent hyperactivity and a behavioural sensitization to morphine. *Neurosci Lett* 2001 306:41–44.
11. Dugé V, Sebret A, Beslot F, Matsui T, Roques BP. Behavioral Profile of CCK2 Receptor deficient Mice. *Neuropsychopharmacology* 2001 25:690–698.

12. Farook JM, Zhu YZ, Wang H, Moochhala S, Lee L, Wong PT. Strain differences in freezing behavior of PVG hooded and Sprague-Dawley rats: differential cortical expression of cholecystokinin₂ receptors. *Neuroreport* 2001 12:2717–2720.
13. Farook JM, Zhu YZ, Wang Q, Moochhala SM, Lee L, Wong PT. Analysis of strain difference in behavior to Cholecystokinin (CCK) receptor mediated drugs in PVG hooded and Sprague-Dawley rats using elevated plus-maze test apparatus. *Neurosci Lett* 2004 358:215-219.
14. Ferraro L, Beani L, Trist D, Reggiani A, Bianchi C. Effects of cholecystokinin peptides and GV 150013, a selective cholecystokininB receptor antagonist, on electrically evoked endogenous GABA release from rat cortical slices. *J Neurochem* 1999 73:1973–1981.
15. Franklin KBJ, Paxinos G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press 1997 San Diego.
16. Hendry SH, Jones EG, DeFelipe J, Schmechel D, Brandon C, Emson PC. Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 81:6526–6530.
17. Holmes A, Lit Q, Murphy DL, Gold E, Crawley JN. Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. *Genes Brain Behav* 2003 2:365–380.
18. Kõks S, Vasar E, Soosaar A, Lang A, Volke V, Võikar V, Bourin M, Männistö PT. Relation of exploratory behavior of rats in elevated plus-maze to brain receptor binding properties and serum growth hormone levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 1997 7:289–294.
19. Kõks S, Männistö PT, Bourin M, Shlik J, Vasar V, Vasar E. Cholecystokinin-induced anxiety in rats: relevance of pre-experimental stress and seasonal variations. *J Psychiatry Neurosci* 2000 25:33–42.
20. Kõks S, Volke V, Veraksitš A, Rünkorg K, Sillat T, Abramov U, Bourin M, Huotari M, Männistö PT, Matsui T, Vasar E. Cholecystokinin₂ receptor-deficient mice display altered function of brain dopaminergic system. *Psychopharmacol (Berl)* 2001 158:198-204.
21. Kombian SB, Ananthlakshmi KV, Parvathy SS, Matowe WC. Cholecystokinin inhibits evoked inhibitory postsynaptic currents in the rat nucleus accumbens indirectly through gamma-aminobutyric acid and gamma-aminobutyric acid type B receptors. *J Neurosci Res*. 2005; Feb 1;79(3):412-420.

22. Kosaka T, Kosaka K, Tateishi K, Hamaoka Y, Yanaihara N, Wu JY, Hama K
GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the
rat hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1985 239:420–430.
23. Kurrikoff K, Koks S, Matsui T, Bourin M, Arend A, Aunapuu M, Vasar E. Deletion of
the CCK2 receptor gene reduces mechanical sensitivity and abolishes the development
of hyperalgesia in mononeuropathic mice. *Eur J Neurosci*.2004; 20(6):1577-1586.
24. Larsson L, Rehfeld JF. A peptide resembling COOH-terminal tetrapeptide amide of
gastrin from a new gastrointestinal endocrine cell type.
Nature. 1979 Feb 15;277(5697):575-578.
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time
quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method.
Methods. 2001 Dec;25(4):402-408.
26. Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy J-M, Rüllicke T,
Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U Molecular and neuronal substrate for the
selective attenuation of anxiety. *Science* 2000 290:131–134.
27. Mason C, Sotelo C (eds) *The cerebellum: a model for construction of a cortex.*
Perspect Dev Neurobiol 1997 5:1–95.
28. McCleane GJ. A phase 1 study of the cholecystokinin (CCK) B antagonist L-365,260
in human subjects taking morphine for intractable non-cancer pain. *Neurosci Lett*.
2002 Nov 8;332(3):210-212.
29. Miyasaka K, Hosoya H, Takano S, Ohta M, Sekime A, Kanai S, Matsui T, Funakoshi
A. Differences in ethanol ingestion between cholecystokinin-A receptor deficient and -
B receptor deficient mice. *Alcohol*. 2005 May-Jun;40(3):176-180.
30. Miller KK, Hoffer A, Svoboda KR, Lupica CR Cholecystokinin increases GABA
release by inhibiting a resting K⁺ conductance in hippocampal interneurons. *J Neurosci*
1997 17:4994–5003.
31. 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. *The
Journal of Nutrition* 2002 132:739–741.
32. Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U A new benzodiazepine pharmacology. *Pharmacol
Exp Ther* 2002 300:2–8.
33. 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 USA* 1996 93:11825–11830.
34. 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 51:745–781.
 35. Perez de la Mora M, Hernandez-Gomez AM, Mendez-Franco J, Fuxe K Cholecystokinin-8 increases K(+)-evoked [³H] gamma-aminobutyric acid release in slices from various brain areas. *Eur J Pharmacol* 1993 250:423–430.
 36. Pommier B, Beslot F, Simon A, Pophillat M, Matsui T, Daugé V, Roques B P, Noble F Deletion of CCK₂ receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. *J Neurosci* 2002 22:5 2005–2011.
 37. Portenoy RK, Foley KM, Inturrisi CE. The nature of opioid responsiveness and its implications for neuropathic pain: new hypotheses derived from studies of opioid infusions. *Pain*. 1990 Dec;43(3):273-286.
 38. Rasmussen K, Helton DR, Berger JE, Scearce E The CCK-B antagonist LY288513 blocks effects of diazepam withdrawal on auditory startle. *Neuroreport* 1993 5:154–156.
 39. Raud S, Runkorg K, Veraksitš A, Reimets A, Nelovkov A, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Volke V, Koks S, Vasar E. Mutation of CCK2 receptor gene modifies the behavioural effects of diazepam in female mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Aug;168(4):417-425.
 40. Raud S, Innos J, Abramov U, Reimets A, Koks S, Soosaar A, Matsui T, Vasar E. Targeted invalidation of CCK2 receptor gene induces anxiolytic-like action in light-dark exploration, but not in fear conditioning test. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Sep;181(2):347-57.
 41. Rehfeld JF, Mogensen NW, Bardram L, Hilsted L, Monstein HJ. Expression, but failing maturation of procholecystokinin in cerebellum. *Brain Res*. 1992 Mar 27;576(1):111-119.
 42. Rehfeld JF, Nielsen FC. Molecular forms and regional distribution of cholecystokinin in the central nervous system. In Bradwejn J, Vasar E (eds). *Cholecystokinin and Anxiety: From Neuron to Behavior*. Austin R.G. Landers Company 1995 pp 33–56
 43. Rezayat M, Tabarrai E, Parvini S, Zarrindast M, Piralı M. Effects of CCK antagonists on GABA mechanism-induced antinociception in the formalin test. *European Neuropsychopharmacology* 1999 9:9-14.

44. Runkorg K, Veraksits A, Kurrikoff K, Luuk H, Raud S, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Koks S, Vasar E. Distinct changes in the behavioural effects of morphine and naloxone in CCK2 receptor-deficient mice. *Behav Brain Res.* 2003 Sep 15;144(1-2):125-135.
45. Runkorg K, Varv S, Matsui T, Koks S, Vasar E. Differences in behavioural effects of amphetamine and dopamine-related gene expression in wild-type and homozygous CCK2 receptor deficient mice. *Neurosci Lett.* 2006 Oct 2;406(1-2):17-22.
46. Sebret A, Lena I, Crete D, Matsui T, Roques BP, Daugé V. Rat hippocampal neurons are critically involved in physiological improvement of memory processes induced by cholecystokinin-B receptor stimulation. *J Neurosci* 1999 19:7230–7237.
47. Shlik J, Vasar E, Bradwejn J. Cholecystokinin and Psychiatric disorders. Role in Aetiology and Potential of Receptor Antagonists in Therapy. *CNS Drugs* 1997 8:134–152.
48. Singh L, Field MJ, Vass CA, Hughes J, Woodruff GN. The antagonism of benzodiazepine withdrawal effects by the selective cholecystokininB receptor antagonist CI-988. *Br J Pharmacol* 1992 105:8–10.
49. Vasar E, Raud S, Veraksits A, Runkorg K, Matsui T, Bourin M, Greengrass CJ, Volke V, Kõks S. Mice lacking CCK2 receptors display reduced anxiety in the plus-maze. *Eur. Psychiatr. Suppl.* 2002: 1-50
50. Veraksits A, Runkorg K, Kurrikoff K, Raud S, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Koks S, Vasar E. Altered pain sensitivity and morphine-induced anti-nociception in mice lacking CCK2 receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 2003 Mar;166(2):168-175.
51. Võikar V, Kõks S, Vasar E, Rauvala H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 2001 72:271–278.
52. Võikar V, Vasar E, Rauvala H. Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/Sv mice: implications for phenotyping screens. *Genes Brain Behav* 2004 3:27–38.
53. Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ. The role of cholecystokinin in nociception, neuropathic pain and opiate tolerance. *Regul Pept.* 1996; 65(1):23-28.
54. Wiesenfeld-Hallin Z, de Aruja Lucas G, Alster P, Xu XJ, Hokfelt T. Cholecystokinin/opioid interactions. *Brain Res.* 1999 Nov 27;848(1-2):78-89.
55. Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hokfelt T. The role of spinal cholecystokinin in chronic pain states. *Pharmacol Toxicol.* 2002 Dec;91(6):398-403.

Tänuavaldused

Käesolev töö on valminud Tartu Ülikooli Füsioloogia Instituudis. Tänan kõiki kolleege, kes aitasid kaasa selle teoks saamisel, eelkõige juhendajaid, professor Eero Vasarat ja med. Dr. Alar Veraksitš'it.