

Tartu Ülikool
Sotsiaalteaduste valdkond
Psühholoogia instituut

Carolina Kristina Koplimes

**AJUPIIRKONDADE PIKAAJALISE ENERGEETILISE AKTIIVSUSE
KAARDISTAMINE NING VÕRDLUS SEROTONIINDEFITSIITSETEL JA
ULUKALLEELSETEL ISASTEL HIIRTEL**

Uurimistöö

Juhendaja: Margus Kanarik

Jooksev pealkiri: Serotoniinidefitsiitsete hiirte ajuaktiivsus

Tartu
2020

AJUPIIRKONDADE PIKAAJALISE ENERGEETILISE AKTIIVSUSE KAARDISTAMINE NING VÕRDLUS SEROTONIINDEFITSIIDTSETEL JA ULUKALLEELSETEL ISASTEL HIIRTEL

Lühikokkuvõte

Depressioon ja ärevushäire on kompleksse etioloogiaga psüühikahäired, mille farmatseutiline ravi pole seni andnud universaalselt rahulduspakkuvaid tulemusi. Serotoniin ja sellega seotud ajuringete uurimine, mida on eksperimentaalselt muudetud, võib anda juhtlõngu nende psüühikahäiretega seotud piirkondadest ja võimaldada välja töötada efektiivsem ravi. Selle töö raames uuriti 12 ulukalleelseid ja 12 serotoniini katalüüsis reaktsiooni kiirust määrava TPH2 ensüümi kodeeriva *TPH2* geeni nokaudiga hiiri tsütokroom c histokeemia abil, mis võimaldas näha aju pikaaegset energiametabolismi. Leiti statistiliselt oluline energiametabolismi erinevus *raphe*-tuumades, kuid teistes emotsioonitöötlusega seotud piirkondades nagu amügdala, *striatum*, *stria terminalise* sängituumad ja *ventral pallidum* ei ilmutanud statistiliselt olulist vahet erinevate genotüüpidega hiirte vahel. Lisaks olid osade ajupiirkondade ühenduvus KO hiirtel WT hiirtest suurem, viidates 5-TH defitsiiti kompenseerivatele mehhanismidele.

Märksõnad: serotoniin, COX histokeemia, nokaut hiired, TPH2, depressioon, ärevushäire, energiametabolism.

LONG TERM ENERGY METABOLISM MAPPING AND COMPARISON BY BRAIN REGIONS IN MALE *TPH2* KNOCKOUT AND WILD-TYPE MICE

Abstract

Depression and anxiety are psychopathologies with complex (a)etiologies; its pharmacologic cure has not yet provided universally satisfactory results. Investigating experimentally altered serotonin and serotonergic brain circuitries can provide clues of brain regions connected with these mental illnesses and offer an opportunity to develop a more effective cure. In present study, the long term brain energy metabolism of 12 wild-type (WT) and 12 *TPH2* knockout (KO) mice was evaluated using cytochrome c oxidase histochemistry. A statistically significant difference between WT and *TPH2* KO was found in the raphe nucleus region, however, other regions connected with affective processing such as amygdala, striatum, bed nuclei of stria terminalis and ventral pallidum did not differ significantly between mice with different phenotypes. In addition, brain connectivity of certain regions was higher in *TPH2* KO mice than in WT mice, indicating serotonin deficiency coping mechanisms.

Keywords: serotonin; COX histochemistry, knockout mice, TPH2, depression, anxiety, energy metabolism.

I Sissejuhatus

Meeleoluhäired on tõsine ühiskonna terviseprobleem, mis pole seni täiesti rahuldustpakkuvaid farmatseutilisi raviviise leidnud (Warden et al., 2007). Senised antidepressandid keskenduvad neurotransmitterite või nendega seotud süsteemide töö mõjutamisele, kuid neil esineb tugevad kõrvaltoimeid ning nad alati ei toimi, kuna on olemas ka ravimitele resistentseid meeleoluhäire vorme (Rabinowitz, 2016; Turner, 2008).

Efektiivse ravimi väljatöötamisel peab integreerima omavahel klassikalisi psühholoogilisi teooriaid uuenevate arusaamadega emotsioonitööstusest (Harro et al, 2011). Loommudeleid on tihti kasutatud pre-kliiniliste antidepressantide efektiivsuse testimisel, uusi juhtlõngu meeleoluhäirete tekkepõhjustest võib anda üldiste stressi indikaatorite uurimise asemel konkreetsete afektiivsete ringete vaatluse alla võtmine (*ibid.*). Selle töö käigus vaadeldakse lähemalt serotoniiniga seotud närviringeid. Läbi nende ringete aktiivsuse uurimise võib selguda depressiooni ning ärevushäiretega seotud piirkonnad, mis võimaldab astuda sammu lähemale efektiivsemate meeleoluhäirete ravimite suunas.

I.1 Serotoniini funktsioon ja seos käitumishäiretega

Serotoniin ehk 5-HT (5-hüdroksütrüptamiin) on üks paljudest neurotransmitteritest; ainetest, mis vahendavad signaale närvirakkude vahel. Ehkki üle 90% serotoniinist leidub kesknärvisüsteemist (edaspidi KNS) väljaspool olevas seedetraktis, osaleb serotoniin enamus inimese käitumuslikest protsessidest nagu meeleolu, tajus, seksuaalsus, mälu ja tähelepanu (Berger et al., 2009). Lisaks on läbi serotoniinireseptorite toimival serotoniinil muid olulisi füsioloogilisi funktsioone nagu soolestiku töö toetamine, vasokonstriksioon või -dilatsioon, hingamise ja metabolismi reguleerimine, valutunnetuse vahendamine, piimanäärmete areng ja palju muud (*ibid.*).

Serotoniinil ja sellega seotud süsteemidel on tuvastatud märkimisväärne seos käitumis- ja meeleoluhäiretega. Serotoniini lähteainet, trüptofaani, sisaldavate toiduainete piiramine dieedis on inimkatsetes esile kutsunud tugevat meeleolulangust (Young et al., 1985; Delgado et al., 1994; Neumeister, 2004) ning relapsi muidu depressioonist paranenud patsientidel (Chilmonczyk et al., 2015). Variatiivsus serotoniinitransporteri (5-HTT) väljenduses, kus serotoniini postsünaptiline imendumine on häirunud, on tugevas seoses ärevushäirete (Lesch et al., 1996, Lesch ja Mössner, 1998), agressiivsuse ning madala impulsikontrolliga

(Baumgarten ja Grozdanovic, 1995; Hen, 1996), depressiooni (Salomon, 2013; Bartolomucci, 2010) ja kõrge enesetapuriskiga (Galfalvy et al., 2009). Lisaks, serotoniinisüsteemi häired ei piirdu vaid psüühikaprobleemidega, näiteks on ebakorrapärase serotoniinisüsteemiga patsientidel tuvastatud normaalsusest palju tugevamat valutunnetust (Basbaum ja Braz, 2008) ning psühhomotoorseid häireid nagu aeglasem kõne, liikumise vähenemine ja kognitiivse funktsiooni kahjustus (Buyukdura et al., 2011).

Seetõttu on serotoniinireseptoritele suunatud ravimeid kasutatud laialdaselt psühhiaatriliste haiguste ravis, kuna ajutüvest johtuvad serotoniini tootvad neuronid projekteeruvad kõikidesse põhilistesse ajupiirkondadesse ja võimaldavad vahendada erinevate aju närviringete tööd (Berger et al., 2009). Selektiivsed serotoniini tagasihaarde inhibiitorite (edaspidi SSRI) põhimõttel loodud antidepressandid on praegu ühed kõige populaarsemad depressiooni ja ärevushäirete ravimid (Papakostas, 2008; Allsbrook, 2016) lisaks teistele serotoniinisüsteemile suunatud ravimitele nagu tri- ja tetratsükliilised antidepressandid (Charnay ja Leger, 2010).

I.II Serotoniinisüsteemi kirjeldus

Inimkehas ringlevat serotoniini jaotatakse kaheks: *perifeerseks serotoniiniks*, mis liikleb KNS-ist väljaspool veres ning toodetakse soolestiku neuronites ning kromafiinsetes rakkudes, vastutades veresoonkonna toimimise, homöostaasi ja teiste psüühikaväliste funktsioonide eest, ja *neuraalseks serotoniiniks*, mida toodetakse ajutüve *raphe*-tuumades asuvates neuronites ning mis mängib suurt rolli psüühikaprotsessides (Herr et al., 2007). Perifeerset ja neuraalset serotoniini eraldab hematoentsefaalne barjäär, mis hoiab nende tegevusvaldkondi ja -välju lahus (Sahu et al., 2018). Selles töös keskendutakse just neuraalsele serotoniinile, sest see on oluline käitumisspektri regulatsioonis, mida see töö käsitleb.

Serotoniini sünteesitakse läbi kaheastmelise protsessi. Enamasti valgurikkast toidust saadud asendamatu aminohappe trüptofaan (Friedman ja Cuq, 1988) reageerib ensüümi trüptofaan-5 hüdroksülaasi (TPH) abil, mille tulemusel lisatakse trüptofaanile hüdroksüülgrupp ning ta keemiline struktuur muutub (Arreola, 2015). Imetajatel toodetakse kahte tüüpi TPH ensüümi - nii TPH1 kui ka TPH2 - millest TPH2 vastutab neuraalse serotoniini sünteesi eest ning kodeeritakse vastavalt *TPH2* geeni abil (Tyce, 1990). Pärast hüdroksüülgrupi lisamist, eemaldab L-aminohappe dekarboksülaas trüptofaanist karboksüülgrupi ning seejärel tekib serotoniin ehk 5-HT (5-hüdroksütrüptamiin) (*ibid.*).

Pärast seda, kui serotoniini liigub presünaptiliselt neuronilt kahe neuroni vahel olevasse sünaptilisse pilusse, reageerivad sellele postsünaptilise neuroni serotoniinireseptorid, edastades piisava serotoniini olemasolu korral signaali järgmisele neuronile. Serotoniinireseptoreid jaotatakse vastavalt nende farmakoloogiliste, struktuuriliste ja ülekandeliste omaduste järgi seitsmeks erinevaks klassiks, millest kuus retseptoriklassi seitsmest töötab G valgu seondumise põhimõttel (Hoyer, 2019). Palju eri tüüpi serotoniinireseptoreid asub aju mustaines, hipokampus, amügdalas, *striatumis* ja frontaalkorteksis (Charnay ja Leger, 2010). Keemilise ülekande järel haaratab serotoniinitransporter 5-HTT serotoniini presünaptilisse rakku tagasi, kontrollides nii signaali tugevust ja kestust (*ibid.*).

Nagu eelnevalt mainitud, jõuavad serotoniinineuronite aksonid ajutüvest peaagu igasse inimaju ossa (Fink ja Göthert, 2007). *Raphe*-tuumades olevaid serotoniinineuroneid jagatakse kahte ossa: 1) rostraalseks rühmaks, mille närvirakkude aksonid küündivad eesajju, ja 2) kaudaalseks rühmaks, mis ühendub seljaaju ja ajutüvega. Inimajus asub umbes 85% serotoniinineuronitest rostraalses osas (Charnay ja Leger, 2010). Selles töös keskendutakse rostraalse rühma serotoniinineuronitele, mille juhteteed küündivad amügdalani, striatumini, hipokampuseni ja mitmetesse teistesse piirkondadesse, mõjutades nii infotöötlust, kognitsiooni, taju jpm (Lesch ja Waider, 2012).

I.III Meeleoluhäirete spektrid ja senine olukord

Eelnevalt on selgunud, et serotoniinil on tugev mõju inimese käitumisele ja psüühikahäirete ravis kasutatakse serotoniinisüsteemi mõjutamisele suunatud ravimeid (vt peatükki I.I). Senised lünklikult teadmised aga oluliselt raskendavad nende haiguste farmakoloogilist ravi, kuna näiteks depressioonil pole mingeid konkreetseid inimkehas väljenduvaid muutuseid või selgeid biomarkereid, ka selle tunnused erinevad sõltuvalt haiguste klassifikatsioonist (Dantzer et al., 2011). Meeleoluseisundid, kus on häirunud kognitiivne kontroll ja emotsiooniregulatsioon, avaldab patsiendile pikaaegset negatiivset mõju, kus pole võimalik ka sotsiaalne kohanemine (Lesch et al., 2012).

Meeleoluhäiretele suunatud ravimid nagu antidepressandid omavad mingit mõju, kuid me ei tea, kuidas täpselt nad toimivad (Lesch et al., 2012). On vaieldav, kuivõrd efektiivsed on näiteks SSRI-d depressiooniga toimetulekuks (Fournier et al., 2010; Pies, 2016), sest umbes

50% depressioonipatsientidest ei reageeri esimesel ravikuuril ravile; üleüldiselt valitseb antidepressantide efektiivsuses märkimisväärselt ebaselgust (Papakostas, 2009). Seetõttu on vajalik põhjalikum analüüs häireid põhjustavatesse faktoritesse, et saaks välja töötada efektiivsemat ravi.

Psüühikahäired nagu depressioon, ärevus ja agressiivsus arvatakse inimestes tekkivat erinevate keskkondlike ja geneetiliste faktorite koosmõjul, kus keskkond võib mõjutada näiteks 5-TH süsteemi kodeerivate geenide tööd ning ekspressiooni (Waider et al., 2011). Populatsioonigeneetikale keskendunud uuringud on näidanud, et need käitumisega seotud häired on vähemalt osaliselt päritavad, kuid konkreetseid serotoniinisüsteemi geene, mis on seotud psüühikahäiretega, on tuvastatud vähe (*ibid.*). Lisaks on leitud, et kui vaadelda meeleoluhäired põhilise isiksushäirete klassifikatsiooni DSM-i (ing *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) klastrisüsteemi järgi, kus A klatri (veiderad-ekstsensilised isiksused) alla kuuluvad paranoiline, skisoidne ja skisotüüpne isiksushäire, B klatri (dramaatilised-ebastabiilsed isiksused) alla antisotsiaalne, piirialane, histriooniline ja nartsissistlik isiksushäire ning C klatri (ärevad-vältivad isiksushäireted) alla vältiv, sõltuv ja obsessiivkompulsiivne häire, siis *TPH2* geeni variatsioonid päädivad tugevalt just B ja C klatri isiksushäirete ning üldise emotsionaalse ebastabiilsusega (*ibid.*).

Harro ja teiste (2014) uuring on näidanud, et depressioonile vastuvõtlikumatel rottidel oli pärast pikaajast stressi kogemist mitu ajupiirkonda samaaegselt kõrgema oksüdatiivse metabolismi indikaatoritega, viidates, et mitmed ajupiirkonnad töötavad omavahel koostöös ning võivad olla seotud depressiivsuse või ärevusega. Erinevate piirkondade, näiteks amügdala ja taalamuse, ühenduvust on kinnitanud ka teised loomsed uuringud (Matrov et al., 2019; Matrov et al., 2020).

I.V Töö eesmärk

Üks võimalustest, kuidas kindlaks teha depressiooni aluseks olevaid piirkondi, on kasutada COX (tsütokroom c oksüdaas) histokeemiat, mille tulemusena on näha selle ensüümi aktiivsust erinevates ajupiirkondades. COX-i talitus mitokondrite elektronitranspordiahelas on otseselt seotud universaalse energia talitaja ja ülekandja ATP (adenosiintrifosfaat) tootmisega ja peegeldab pikaajalisi energianõudluse trende, võimaldades omavahel seostada närvirakkude ainevahetust käitumuslike fenotüüpidega (Sakata et al., 2005). Pannes COX-i reageerima

diaminobensidiiniga (DAB), polümeriseerub DAB ja muutub pruunikaks, mille tulemusel on võimalik ensüümi hulka mõõta raku tasandil, võimaldades nii aju aktiivsust kaardistada (Gonzales-Lima ja Garrosa, 1991). Ehkki COX histokeemia meetod ei suuda kirjeldada protsesse dünaamiliselt ja infot ringete kohta peab saama teiste, statistiliste meetoditega, lubab ta siiski seostada pikaajalisi ajuaktiivsuse muutusi pikema käitumislase muutustega (Harro et al, 2011).

Selleks, et kunstlikult esile kutsuda katseloomades erinevaid pikaajalisi vaimseid seisundeid, võib ühena võimalustest ajukeemiaga seotud geene välja lülitada. Varem on uuritud erinevate nokautidega hiiri (nt Matrov, 2019), kuid serotoniini defitsiidiga hiirte pikaajalist ajuenergeetikat veel mitte.

Selles töös uuritakse aju metaboolset aktiivsust hiirtel, kellel on serotoniini tootmisega seotud TPH2 ensüümi kodeeriv geen *TPH2* välja lülitatud. Uurimuse alla võeti 78-st Würzburgi ülikoolist välja töötatud hiirtest 24 isast hiirt, pidades silmas uurimistöö soovitatavat mahtu. Pooled valimisse kuuluvatest isenditest (e 12 hiirt) olid ulukalleelsed (edaspidi WT, ing *wild type*) ja pooled geneetiliselt muundatud (edaspidi KO, ing *knockout*), mille tulemusena oli viimasel grupil välja lülitatud TPH2 ensüümi kodeeriv geen. Selle tulemusena on *TPH2* KO hiirtel vähenenud serotoniini tootmine 40-70% frontaalkorteksis ja *striatumis*, kuid TPH1 tase veres ja ajuvälistes siseorganites ei muutunud, samuti jäi samaks serotoniinireseptorite ja serotoniinitransporterite arv (Waider et al., 2011). Uurimuse alla on valitud neli piirkonda: amügdala, süngituumad, *striatum*, *ventraalne pallidum* ning *raphe*-tuumad, mis on tugevalt seotud serotoniiniringetega ning võivad potentsiaalselt olla ärevuse- ja depressioonilaadse käitumise vahendajad. Töö eesmärk on välja selgitada läbi COX meetodi, kuidas serotoniini defitsiit mõjutab ja muudab hiirte aju aktiivsust.

Uurimisküsimused on järgnevad:

1. Kas TPH2 KO hiirte aju energiametabolism amügdalas, *striatumis*, *ventraalses pallidumis*, *stria terminalise* süngituumades ja *raphe*-tuumades erineb kontrollloomadest?
2. Kas *TPH2* geeni väljalülitamine mõjutab uurimuse alla võetud ajupiirkondade vahelist ühenduvust?

II Autori roll uurimuses

Selle töö autori panus uurimisprojekti seisnes järgnevas:

1. osaleti laboratoorsetes töodes, kus valmistati uurimuse alla kuuluvaid aju preparaate;
2. analüüsiti ajulõigete fotodest olevaid piirkondi, arvutati välja analüüsitavate piirkondade energeetilisi väärtusi;
3. kogutud andmetele tehti statistiline analüüs.

III Meetod

Töö käigus valmistati COX histokeemia meetodil WT ja KO hiirte ajude preparaadid Tallinna Ülikooli laboris. Pärast nende valmimist pildistati ühesuguste valgustingimuste juures preparaadid mikroskoobi külge kinnitatud kaamera abil üles ja hiljem analüüsiti fotod fototöötlusprogrammis Image J, kus selekteeriti huvipakkuvaid piirkondi, mis olid järgnevad:

1. Dorsaalne raphe-tuum:
 - a. DRD -- *dorsaalne raphe-tuum, dorsaalne osa;*
 - b. DRL -- *dorslaane raphe-tuum, lateraalne osa;*
 - c. DRV/DRI - *dorsaalne raphe-tuum, ventraalne/interfastsikulaarne osa.*
2. Sängituumad:
 - a. BNST -- *sängituumade kõikide piirkondade keskmine;*
 - b. BSTLD -- *sängituumad, mediaalne jaotus, lateraal-dorsaalne osa;*
 - c. BSTLV -- *sängituumad, lateraalne jaotus, ventraalne osa;*
 - d. BSTM/BSTMV - *sängituumad, mediaalne jaotus, mediaalne-ventraalne osa.*
3. Amügdala:
 - a. La -- *lateraalne amügdala tuum;*
 - b. BLA -- *basolateraalne amügdala tuum, anterioorne osa;*
 - c. BMA -- *basomediaalne amügdala tuum, anterioorne osa;*
 - d. Aco -- *anterioorne kortikaalne amügdala tuum;*
 - e. MeA -- *mediaalne amügdala tuum;*
 - f. Amy - *amügdala kõikide piirkondade keskmine*
 - g. CeA - *tsentraalne amügdala tuum.*
4. *Striatum*:
 - a. CPu -- *caudate putamen.*
5. VP -- *ventral pallidum.*

Hiljem arvutati vastavalt nende piirkondade hall-skaalale Rodboardi funktsiooni järgi piirkondade optilise tiheduse keskmised väärtused. Seejärel analüüsiti andmeid mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testi järgi ning uuriti arvutati välja piirkondade vahel Pearsoni r ning tehti korrelatsiooniline võrdlus.

III.I Tsütokroom C oksüdaas

COX histokeemia on meetod aju aktiivsuse mõõtmiseks, mille funktsiooni ja olulisust on ülevahtlikult käsitletud eelnevalt (vt peatükki I.V). Siin kirjeldatakse lähemalt selle läbiviimise protokoll, mille on põhjalikult ära kirjeldanud Gonzales-Lima ja teised (1998) ning võetud aluseks selle töö preparaate valmistamisel.

Kui hiired on küündinud vajaliku vanuseni (umbes 3 kuud), surmatakse neid pea eemaldamisega. Kiirelt (sama kaua kõikide hiirte puhul) lõigatakse välja aju, mis seejärel külmutatakse, keeratakse fooliumi sisse ja hoitakse temperatuuril -80 kraadi Celsiust. Külmutatud hiire aju lõigatakse hiljem sobival ajal $50\ \mu\text{m}$ paksusteks lõikudeks koronaalselt, pannakse alusklaasile ja külmutatakse uuesti kuni neid saab paigutada lahustesse. Valmistatakse 12 erinevat lahust (juhindudes Hevneri ja teiste (1993) juhenditest), mis sisaldavad endas puhverlahust sahharoosi baasil, preinkubatsioonilahuseid ja tsütokroom c-d ning diaminobenseeni sisaldavaid töölahuseid, kuhu külmutatud viilud asetatakse ja hoitakse 5-10 minutit, sõltuvalt lahuse tüübist, igas lahuses. Lõpuks asetatakse preparaadid 37 -kraadisesse inkubaatorisse 60 minutiks ning kui manipualtsioonid on lõpule viidud, fikseeritakse formaliiniga koelõigud alusklaasile ning preparaatidele liimitakse peale katteklaas.

III.II Uuritud loomade kirjeldus

TPH2 KO hiired on eelnevates uurimustes ilmutanud end elujõulistena, erinedes kontrollgrupist madalama kaalu poolest, kuid jäädes kontrollgrupiga samale tasemele nii füsioloogilises kui neuraalses arengus (Guteknecht et al., 2008). Samas on hilisemad uuringud täpsustanud, et *TPH2* KO hiirte agressiivsustase on WT hiirtest erinev ning neil on kõrgem õpitud abitus (Lesch et al., 2012). Lisaks suudab närvisüsteem nendel hiirtel sertoniniidefitsiidiga kohaneda ja läbi neuroplastilisuse serotoniini puudust kompenseerida näiteks teise inhibeeriva neurotransmitteri GABA (gamma-aminovõihappe) ja teatud neuronite arvu suurendamise abil (Jacobsen et al., 2012; Beaulieu et al., 2008).

IV Tulemused

IV.I Esimene uurimisküsimus

Selle töö raames analüüsiti energiaaktiivsuse andmeid läbi mittepameetrilise Mann-Whitney U-testi, mille läbi püüti selgusele jõuda, kuidas erines KO ja WT energiametabolism huvipakkuvates regioonides. Vaadeldi kõiki valimis olevaid KO ja WT hiiri ja jõuti tulemuseni, et ainus regioon, kus esines statistiliselt oluline erinevus energiametaboolismis (p väärtus, mis peaks olema vähem kui 0,05) oli DRV/DRI regioonis, mille p väärtus on 0,0331 (vt Tabel 1).

Tabel 1. KO ja WT hiirte energiametaboolismi erinevused piirkonniti.

Regioon	P väärtus	Statistiline olulisus
CPu	0,7857	ns
VP	0,8291	ns
MeA	0,8729	ns
Aco	0,8291	ns
BMA	0,9616	ns
CeA	0,5059	ns
BLA	0,4037	ns
La	0,1957	ns
Amy	0,8291	ns
BSTMA/BSTMV	0,5059	ns
BSTLV	0,4364	ns
BSTLD	0,5059	ns
BNST	0,5059	ns
DRV/DRI	0,0331	*
DRD	0,0881	ns
DRL	0,0679	ns

ns -- statistiline olulisus puudub;

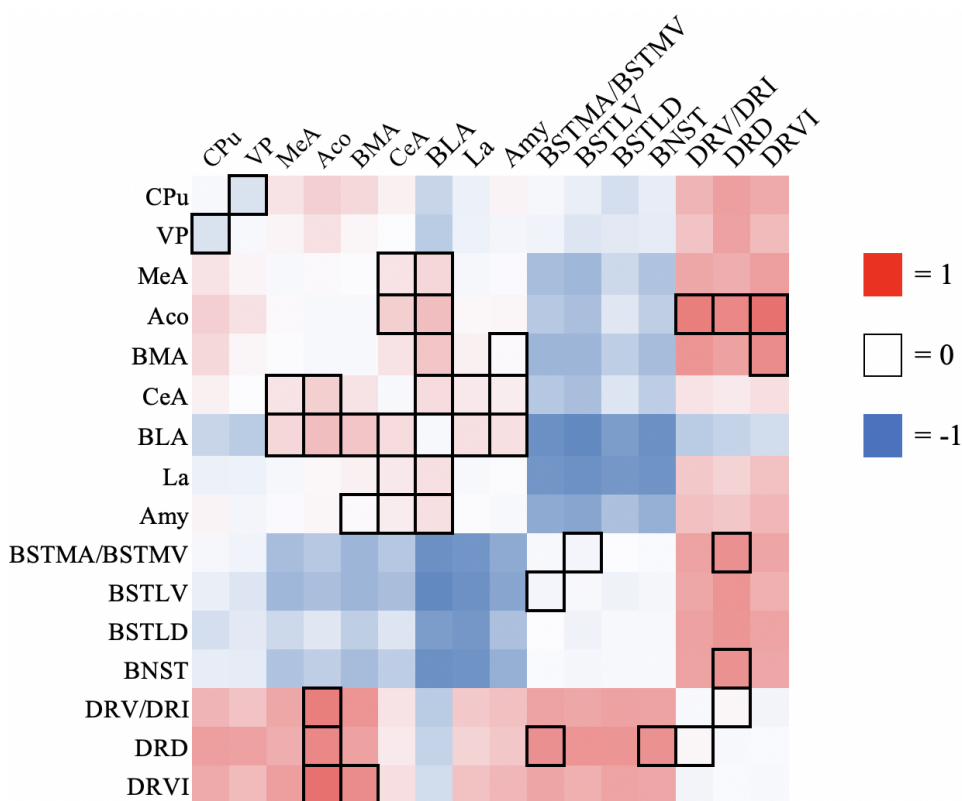
* -- andmed on statistiliselt olulised.

Lisaks esines tähelepanuväärset energiametaboolismi erinevust teistes *raphe*-tuumade piirkondades nagu DRD (p=0,0881) ja DRL (p=0,0679), kuid nad polnud Mann-Whitney testi järgi statistiliselt oluliselt erinevad. Teistes piirkondades nagu *striatum*, amügdala ja *stria*

terminalise sängituumades polnud KO ja WT loomade võrdluses statistiliselt märkimisväärsed erinevused, seega on selge, et nendes piirkondades ei muuda *TPH2* geeni väljalülitamine energiametabolismi.

IV.II Teine uurimisküsimus

Eelmise uurimisküsimuse vastus näitas, et peale *raphe*-tuumade ei esinenud teistes valimisse kuuluvates piirkondades energiaaktiivsuse märkimisväärsed erinevusi. Kuna töö eelnevast osast on selgunud, et piirkonnad koostöös võivad moodustada erinevaid energetilisi trende, siis otsustati arvutada Pearsoni r 'i korrelatsioonid piirkondade vahel WT ja KO hiirtel eraldi, arvutati nende vahe ning kombineeriti nad ühtseks nn soojuskaardiks (ing *heat map*), mis visualiseerib ülevaatlilikult korrelatsioonide vahesid ja nende trende (vt joonis 1).



Joonis 1. Korrelatsiooni vahede soojuskaart (ing *heat map*).

* Rasvaste piirjoontega on tähistatud andmelahtrid, mille P väärtus ei ületanud 0.09 ühikut.

Korrelatsioonide vahe põhjal arvutati z -statistikud internetikalkulaatori abil (<https://www.psychometrica.de/correlation.html>); P skoor aga andmete statistilist olulisust.

Sellest tulenevalt on näha, et *TPH2* väljalülitamine on tekitanud kaks suuremat klastrit: ühes jooniselt nähtavalt klastrilt on geeni väljalülitamine loonud olukorra, kus KO hiirtel on tsentraalse ja basolateraalse amügdala ühenduvus teiste amügdala tuumadega tugevam kui

WT-del; teisest joonisel kujutatud klastrist ilmneb, et KO hiirtel on tugevam ka *raphe-* ja amügalavaheline seos. Lisaks on tugevaid erinevusi *raphe*-tuumade ja *stria terminalise* süngituumade vahel.

Tabel 2. KO ja WT hiirte piirkondade z-skoorid.

	CPu	VP	MeA	Aco	BMA	CeA	BLA	La	Amy	BSTMA/BSTMV	BSTLV	BSTLD	BNST	DRV/DRI	DRD	DRVI
CPu	NaN															
VP	1,383*	NaN														
MeA	-0,331	-0,12	NaN													
Aco	-0,547	-0,34	-0,91	NaN												
BMA	-0,439	-0,1	-0,87	0,08	NaN											
CeA	-0,172	-0,03	2,171*	2,075*	-2,373	NaN										
BLA	0,41	0,488	1,667*	1,744*	-2,371*	-2,763*	NaN									
La	0,092	0,077	0,054	-0,3	-0,768	-1,442*	-1,901*	NaN								
Amy	-0,138	0,029	-0,31	-0,9	-1,374*	-4,05*	-2,398*	-0,235	NaN							
BSTMA	0,03	0,102	0,581	0,483	0,654	0,473	1,037	0,968	0,764	NaN						
BSTLV	0,18	0,337	0,634	0,555	0,644	0,551	1,102	1,005	0,804	1,409*	NaN					
BSTLD	0,498	0,306	0,323	0,182	0,413	0,18	0,922	0,963	0,556	-0,35	0,474	NaN				
BNST	0,23	0,25	0,524	0,418	0,518	0,409	1,036	0,992	0,72	-0,885	0,906	0,14	NaN			
DRV/DRI	-1,018	-0,71	-1,03	1,461*	-1,243	-0,33	0,597	-0,59	-0,727	-1,143	-1,09	1,105*	1,136*	NaN		
DRD	-1,251	-1,08	-0,94	1,335*	-1,077	0,461	0,461	-0,475	-0,639	-1,329*	-1,27	-1,2	-1,3	-1,71	NaN	
DRVI	-1,239	-0,82	-1,2	1,705*	-1,422*	-0,42	0,396	-0,708	-0,899	-1,077	-0,94	-1,1	-1,05	0,96	-0,15	NaN

* Tärniga on märgistatud väärtused, mille *P* väärtus ei ületanud 0,1 ühikut.

V Arutelu ja järeldused

Nokaut-loommudelid on seni andnud vastuolulisi tulemusi: neile on ette heidetud nii liigset spetsiifilisust, kus nende põhjal saadud tulemusi on raske üldistada, kui ka üleüldist uuringute tulemuste liigset variatiivsust (Harro et al., 2014). On olnud ka küsitav, kuivõrd palju põhjustavad nokaut geenid just neid muutusi, mida me oma mudelites näha soovime (Lesch et al., 2012). Siiski võimaldavad nad näidata kätte juhtlõngu, mida tasub uurida spetsiifilisemate meetoditega lähemalt.

Selles töös selgus, et erinevused KO ja WT hiirtel esinesid eelkõige ajupiirkondade ühenduvuses, arvatavasti just neuroplastilisuse tõttu, kus organism püüab kompenseerida 5-TH puudust aju närvingetes. Tulemused viitavad, et serotoniinipuudulikkus mõjutab organismi mitte ainult läbi biokeemiliste ja struktuursete muutuste, vaid ka läbi konkreetsete käitumuslike ja meeleoluliste muutuste. Hetkel pole selge, kas säärased struktuuralsed muutused on organismi püüd olukorraga kohaneda või viib see hoopis suurema haavatavuseni. Kindlasti on tarvis neid tulemusi kontrollida suurema valimiga uuringutes, kus konkreetsemad

mustrid ja statistiliselt tugevamad tulemused võivad välja joonistuda. Seni jääb üle loota, et selles töös tuvastatud tendetse kinnitavad ka tulevased põhjalikumad uuringud.

VI Kasutatud allikad

- Allsbrook, M., Fries, B. E., Szafara, K. L. ja Regal, R. E. (2016). Do SSRI Antidepressants Increase The Risk of Extrapyrarnidal Side Effects In Patients Taking Antipsychotics? *Pharmacy and Therapeutics*, 41(2), 115-119.
- Basbaum, A. I. ja Braz, J. M. (2010). Transgenic Mouse Models for the Tracing of “Pain” Pathways. Boca Raton (*toim.*), CRC Press: New York.
- Bartolomuxxi, A., Carola, V., Pascucci, T., Puglisi-Allegra, S., Cabib, S., Lesch, KP. ... Gross, C. (2010). Increased vulnerability to psychosocial stress in heterozygous serotonin transporter knockout mice. *Disease Models and Mechanisms*, 3, 459-470. DOI: 10.1242/dmm.004614
- Baumgarten, H. G. ja Grozdanovic, Z. (1995). Psychopharmacology of Central Serotonergic System. *Pharmacopsychiatry*, 28, 73-79. DOI: 10.1055/s-2007-979623
- Beaulieu, J. M., Zhang, X., Rodriguiz, R. M., Sotnikova, T. D., Cools, M. J., Wetsel ... Caron, M. G. (2008). Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(4), 1333-1338. DOI: 10.1073/pnas.0711496105
- Berger, M., Gray, J. A. ja Roth, B. L. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60, 355-366. DOI: 10.1146/annurev.med.60.042307.110802.
- Buyukdura, J. S., McClintock, S. M. ja Croarkin, P. E. (2011). Do SSRI Antidepressants Increase The Risk of Extrapyrarnidal Side Effects In Patients Taking Antipsychotics? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(2), 395-409. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.10.019
- Charnay, I. ja Leger, L. (2010). Brain Serotonergic Circuitries. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(4), 471-487.
- Chilmonczyk, Z., Bojarski, A. J., Pilc, A. ja Sylte, I. (2015). Functional Selectivity and Antidepressant Activity of Serotonin 1A Receptor Ligands. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18474–18506. DOI: 10.3390/ijms160818474
- Fink, K. B. ja Göthert, M. (2007). 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacological Review*, 59(4), 360-417. DOI: 10.1124/pr.107.07103
- Fournier, J. C., DeRubeis, R. J., Hollon, S. D., Dimidjian, S., Amsterdam, J. D., Shelton, R. C. ja Fawcett, J. (2010). Antidepressant Drug effects and Depression Severity: A Patient-Level Meta-Analysis. *JAMA*, 303(1), 47-53. DOI: 10.1001/jama.2009.1943
- Friedman, M. ja Cuq, J. (1985). Chemistry, Analysis, Nutritional Value, and Toxicology of Tryptophan in Food. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 1079-1093. DOI: 10.1021/jf00083a042

- Galfalvy, H., Huang, Y. Y., Oquendo, M. A., Currier, D., ja Mann J. J. (2009). Increased risk of suicide attempt in mood disorders and TPH1 genotype. *Journal of Affective Disorders*, 115(3), 331-338. DOI: 10.1016/j.jad.2008.09.019.
- Gonzales-Lima, F. ja Garrosa, M. (1991). Quantitative histochemistry of cytochrome oxidase in rat brain. *Neuroscience Letters*, 2(25), 251-253. doi: 10.1016/0304-3940(91)90943-N
- Gutknecht, L., Waider, J., Kraft, S., Kriegebaum, C., Holtmann, B., Reif, A. ... Lesch, K. (2008). Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *Basic Neurosciences, Genetics and Immunology - Rapid Communication*, 115, 1127-1132. DOI: 10.1007/s00702-008-0096-6
- Harro, J., Kanarik, M., Matrov, D. ja Panksepp, J. (2011). Mapping patterns of depression-related brain regions with cytochrome oxidase histochemistry: Relevance of animal affective systems to human disorders, with a focus on resilience to adverse events. *Neuroscience & Biobehavioural Reviews*, 35(9), 1876-1889. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.02.016
- Hen, R. (1996). Mean Genes. *Neuron*, 16(1), 17-21. DOI: S0896-6273(00)80019-7
- Herr, N., Bode, C. ja Duerschmied, D. (2017). The Effect of Serotonin in Immune Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4, 1-48. DOI: 10.3389/fcvm.2017.00048
- Hevner, R. F., Liu, S. ja Wong-Riley, M. T. T. (1993). An optimized method for determining cytochrome oxidase activity in brain tissue homogenates. *Journal of Neuroscience Methods*, 50(3), 309-319. DOI: 10.1016/0165-0270(93)90038-S.
- Hoyer, D. (2019). Serotonin receptors nomenclature. *History, Neuropharmacology, and Pathology: the Serotonin System*, 63-93. DOI: 10.1016/B978-0-12-813323-1.00004-9
- Jacobsen, J. P., Siesser, W. B., Sachs, B. D., Peterson, S., Cools, M.J., Setola, V. ... Caron, M. G. (2012). Deficient serotonin neurotransmission and depression-like serotonin biomarker alterations in tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) loss-of-function mice. *Molecular Psychiatry*, 17(7), 694-704. DOI: 10.1038/mp.2011.50
- Lesch, KP., Araragi, N., Waider, J., van den Hove, D. ja Gutknecht, L. (2012). Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367, 2426-2443.
- Lesch, KP. ja Mössner, R. (1998). Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biological Psychiatry*, 44(3), 179-192. DOI: 10.1016/S0006-3223(98)00121-8
- Lesch, KP. ja Waider, J. (2012). Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron*, 76(1), 175-191. DOI: j.neuron.2012.09.013

- Matrov, D., Kaart, T., Lanfumey, L., Maldonado, R., Sharp, T., Tordera, R. M., Kelly, P. A., Deakin, B. ja Harro, J. (2019). Cerebral oxidative metabolism mapping in four genetic mouse models of anxiety and mood disorders. *Behavioural Brain Research*, 356(1), 435-443. doi: 10.1016/j.bbr.2018.05.031
- Matrov, D., Imbeault, S., Kanarik, M., Shkolnaya, M., Schikorra, P., Milijan E. ... Harro, J. (2020). Comprehensive mapping of cytochrome c oxidase activity in the rat brain after sub-chronic ketamine administration. *Acta Histochem*, 122(3). DOI: 10.1016/j.acthis.2020.151531
- Neumaster, A. (2003). Tryptophan depletion, serotonin, and depression: where do we stand? *Psychopharmacology Bulletin*, 37(4), 99-115.
- Papakostas, G. I. (2008). Tolerability of Modern Antidepressants. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 69(1), 8-13.
- Papakostas, G. I. (2009). Managing partial response or nonresponse: switching, augmentation, and combination strategies for major depressive disorders. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 70(6), 16-25. DOI: 10.4088/jcp.8133su1c.03
- Pies, R. W. (2016). Antidepressants: Conundrums and Complexities of Efficacy Studies. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 36(1), 1-4. DOI: 10.1097/JCP.0000000000000455
- Psychometrica: Testing the Significance of Correlations* (2017). Kasutatud 18.05.2020, <https://www.psychometrica.de/correlation.html>
- Rabinovitz, J., Werbeloff, N., Mander, F. S., Menard, F., Marangell, L. ja Kapur, S. (2016). Initial depression severity and response to antidepressants v. placebo: patient-level data analysis from 34 randomised controlled trials. *The British Journal of Psychiatry*, 209(5), 427-428. DOI: 10.1192/bjp.bp.115.173906
- Sahu, A., Gopalakrishnan, L., Gaur, N., Chatterjee, O., Moll, P., Kumar, P. ... Prasad, T. S. K. (2018). The 5-Hydroxytryptamine signaling map: an overview of serotonin-serotonin receptor mediated signaling network. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 12, 731-735. DOI: 10.1007/s12079-018-0482-2
- Sakata, J. T., Crews, D. ja Gonzales-Lima, F. (2005). Behavioral correlates of differences in neural metabolic capacity. *Brain Research Reviews*, 48(1), 1-15. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.017
- Salomon, R. M. (2013). Oscillatory serotonin function in depression. *Synapse*, 67(11), 801-820. DOI: 10.1002/syn.21675
- Turner, E. H. (2008). Efficacy of antidepressants. *BMJ*, 336(7643), 516-517. DOI: 10.1136/bmj.39510.531597.80
- Tyce, G. M. (1990). Origin and Metabolism of Serotonin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 16(3), 1-7.

- Waider, J., Araragi, N., Gutknecht ja Lesch, KP (2011). Tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) in disorders of cognitive control and emotion regulation: A perspective. *Psychoneuroendocrinology*, 36(3), 393-405. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2010.12.012
- Warden, D., Rush, A. J., Trivedi, M. H., Fava, M. ja Wisniewski, S. R. (2007). The STAR*D project results: a comprehensive review of findings. *Current Psychiatry Reports*, 9(6), 449-549. DOI: 10.1007/s11920-007-0061-3
- Young, S. N., Smith, S. E., Pihl, R. O. ja Ervin, F. E. (1985). Tryptophan depletion causes a rapid lowering of mood in normal males. *Psychopharmacology*, 87, 173-177. DOI: 10.1007/BF00431803

Käesolevaga kinnitan, et olen korrektselt viidanud kõigile oma töös kasutatud teiste autorite poolt loodud kirjalikele töödele, lausetele, mõtetele, ideedele või andmetele.

Olen nõus oma töö avaldamisega Tartu Ülikooli digitaalarhiivis DSpace.

Carolina Kristina Koplimes