

TARTU ÜLIKOOL
Arstiteaduskond
Füsioloogia instituut

**CCK₂ retseptori geneetilisel väljalülitamisel ei aktiveeru
endokannabinoidi süsteem ja väheneb stressist tingitud
analgeesia**

Jan Inno

Magistritöö biomeditsiinis

Juhendajad: professor Eero Vasar

vanemteadur Sulev Kõks

assistent Kaido Kurrikoff

Tartu 2008

Sisukord

| | |
|---|----|
| Sissejuhatus | 3 |
| Kirjanduse ülevaade | 5 |
| 1. <i>Stressist tingitud analgeesia</i> | |
| 2. <i>Endopidoidid ja nende toimet vahendavad retseptorid</i> | |
| 3. <i>Endokannabinoidid ja nende toimet vahendavad retseptorid</i> | |
| 4. <i>Endopiidide ja –kannabinoidide interaktsioon koletsüstokiniiniga (CCK) ajus.</i> | |
| Uurimismeetodid | 8 |
| 1. <i>Katseloomad</i> | |
| 2. <i>Saba termilise tundlikkuse test (Tail Flick test)</i> | |
| 3. <i>Elektrivalu stressi esilekutsumine</i> | |
| 4. <i>Geeniekspressioon</i> | |
| 5. <i>Statistiline analüüs</i> | |
| Tulemused | 11 |
| 1. <i>Stress põhjustas doosist sõltuva analgeesia mõlema genotüübiga hiirtel</i> | |
| 2. <i>CB1 retseptorite antagonist rimonabant ei mõjutanud SLA CCK₂^{-/-} loomadel</i> | |
| 3. <i>Opioidi antagonist naloksoon antagoniseeris SLA mõlema genotüübiga hiirtel</i> | |
| 4. <i>Stress põhjustas lumbaalses ja mesolimbilises koes CCK ja CCK2 retseptori mRNA ülesregulatsiooni</i> | |
| 5. <i>Stress põhjustas enokannabinoidse aktivatsiooni lumbaalses ja mesolimbilises alas metsiktüüpi, kuid mitte CCK₂^{-/-} loomadel.</i> | |
| 6. <i>Stress põhjustas opioidi retseptorite geenide ülesregulatsiooni lumbaalses koes, mesolimbilistes struktuurides ja striatumis</i> | |
| Arutelu | 19 |
| Järeldused | 24 |
| Kirjanduse loetelu | 25 |

Sissejuhatus

Endogeensed valuvaigistavad mehhanismid etendavad paljudes organismide talitluses olulist rolli. Nimetatud mehhanismid mõjutavad organismide reageerimist stressogeensete tegurite suhtes ja otsuste vastuvõtmist ohtlikes olukordades. Samuti mõjutab valuläve muutmine organismi füsioloogilist heaolu. Enim uuritud endogeenset valuvaigistavat mehhanismil põhinevaks käitumisavalduseks on stressist tingitud analgeesia. Kõige rohkem on siin uuritud opioidi süsteemi rolli nimetatud käitumusliku avalduse kujunemisel. Viimastel aastatel on aga üha enam uuringute keskmesse tõusnud endokannabinoidi süsteemi osalus stressist tingitud analgeesia mehhanismides. Opioidi ja endokannabinodi süsteemiga interakteeruvad väga erinevad neurmediatoorsed süsteemid, mis avaldavad seoses sellega moduleerivat mõju stressist tingitud analgeesia väljakujunemisele. Samas on teada, et neuropeptiid koletsüstokiniin (CCK) avaldab olulist toimet opioidi süsteemile, kuid puuduvad andmed CCK funktsionaalse interaktsiooni kohta endokannabinoidi süsteemiga. CCK toimed opioidi süsteemile sõltuvad sellest, millist kahest tema retseptorist (CCK1 ja CCK2 retseptorid) stimuleeritakse. CCK1 retseptorid esinevad põhiliselt perifeersetes organites (valdavalt seedetraktis), aga neid retseptoreid on leitud ka ajust. CCK2 retseptorid on eelkõige esindatud ajus, kuid märkimisväärtes hulkades on seda retseptorit ka maos (vahendab gastriini toimet happe sekretsioonile) ja kõhunäärmes. CCK potentseerib opioidi retseptorite agonistide toimeid CCK1 retseptorite vahendusel, kuid avaldab antagonistlikku toimet CCK2 retseptorite kaudu. Mitmed viimastel aastatel teostatud uurimistööd viitavad endokannabinoidi süsteemi interaktsioonile CCK. Näiteks on leitud preproCCK ja kannabinoidi CB1 retseptorite koossekspressioon mitmetes kesknärvisüsteemi piirkondades, sealhulgas ka amügdalas ja hippokampuses. Samas puuduvad otsesed funktsionaalsed tõendid selle kohta, et CCK ja endokannabinoidi süsteem tõepoolest funktsionaalselt interakteeruvad. Käesoleva töö eesmärgiks ongi tuua selgust antud küsimuses. Selle eesmärgi lahendamisel kasutati hiiri, millel on geneetiliste manipulatsioonidega välja lülitatud CCK2 retseptorid, mis on CCK põhiliseks ründepunktiks ajus. Arvestades preproCCK ja kannabinoidi CB1 retseptorite olulist koossekspressiooni ajus võib oletada, et nendel hiirtel on häiritud stressist tingitud analgeesia väljakujunemine. Samuti võib arvata, et nendel katseloomadel on muutunud ka endokannabinoidide roll valuvaigistavates mehhanismides. CCK2 puudulikkusega hiirtel ja nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslastel viidi läbi käitumuslikud katsed, kus uuriti stressist tingitud analgeesia väljakujunemist. Samuti uuriti, millist mõju analgeesia väljakujunemisele avaldavad opioidi antagonist naloksoon ja CB1 retseptorite antagonist rimonabant. Käitumiskatsete järgselt viidi läbi eksperimendid, kus uuriti stressi mõju CCK, opioidi ja endokannabinoidi süsteemi geenide ekspressioonile erinevates ajustruktuurides. **Nimetatud magistritöö on tihedalt seotud Kaido Kurrikoffi doktoritöö projektiga ja kõik uuringud on toimunud magistritöö autori ning Kaido Kurrikoffi koostöös.** Magistritöö autori kohustuseks on olnud käitumiskatsete läbiviimine, ajukoest mRNA eraldamine ja cDNA sünteesimine, kvantitatiivse reaala

polümeraasi ahelreaktsioonide teostamine ning katsetulemuste sisuline analüüsimine ja interpreteerimine. Antud uuringu põhjal on ilmunud artikkel: K. Kurrikoff, J. Inno, T. Matsui, E. Vasar (2008) Stress-induced analgesia in mice: evidence for interaction between endocannabinoids and cholecystokinin. *European Journal of Neuroscience*, 27, 2147-2155.

Kirjanduse ülevaade

1. Stressist tingitud analgeesia

Stress aktiveerib neuronaalse süsteemi, mis tõstavad valuläve. Seda vastust nimetatakse stressist tingitud analgeesiaks (SIA). Nimetatud reaktsioon sõltub neuronaalsest süsteemist, mis projitseerub ajukoorest ja taalamusest keskaju ajuveejuha ümbritsevasse hallainesse (PAG) ja sealt piklikaju *raphe* tuuma kaudu seljaaju hallaine dorsaalsarve (Walker, Hohmann 2005). Endogeenne valuvaigistav süsteem koosneb opioidsest ja mitte-opioidsest osast. Mitte-opioidse osa moodustab endokannabinoidide süsteem (Walker, Hohmann 2005). Opioidne endogeenne valuvaigistav süsteem avastati palju varem kui mitte-opioidne. Opioidide osa valu moduleerimises on tõestatud mitmetes kesknärvisüsteemi piirkondades. Opioidide süstimine PAG'i (Goodman et al 1980), rostraalsesse ventromediaalsesse medullasse (RVM) (Takagi et al 1977), seljaaju hallaine dorsaalsarve põhjustab notsitseptiivse tundlikkuse vähenemist (Baraka et al., 1981). Nimetatud piirkonnad on notsitseptiooni moduleeriva neuronaalse süsteemi osad.

Elektrofüsioloogilised ja neurokeemilised uuringud tõestavad kannabinoidide osalust valuvaistingu leviku takistamisel. Walker'i laboris demonstreeriti, et kannabinoidid vähendavad valustiimuli tulemusena tekkinud närviimpulsse seljaajus ja taalamuses (Hohmann et al., 1995, Hohmann et al., 1998, Martin et al., 1996, Hohmann et al., 1999, Tsou et al., 1996). Kannabinoidide valuvastane toime realiseerub valuvaistingut vahendavates neuronites mehaanilise, termilise kui ka keemilise valustiimuli puhul ning on vahendatud kannabinoidi CB1 retseptorite poolt (Hohmann et al., 1995, Hohmann et al., 1998, Hohmann et al., 1999, Martin et al., 1996, Hohmann et al., 1999).

2. Endopiididid ja nende toimet vahendavad retseptorid

Endopiididid on neuropeptiidid. Nad jagunevad kolme põhilisse rühma: endorfiinid, dünorfiinid ja enkefaliinid (Mansour et al., 1993). Nende eellaspeptiidideks on vastavalt preproenkefaliin (PENK), preprodünorfiin (PDYN) ja proopiomelanokortiin (POMC). Endopiididid toimivad seondudes opioidi retseptoritele, mida leidub peamiselt kesknärvisüsteemis, immuunsüsteemis, perifeerses närvisüsteemis ja seedeelundkonnas. Opioidide retseptorid on G-valk seoselised retseptorid. Opioidide retseptorid on mu opioidi retseptor (MOR), delta opioidi retseptor (DOR) ja kapp opioidi retseptor (KOR) (Loh et al., 1989).

Opioidide retseptorid asuvad paljudes kesknärvisüsteemi ja perifeerse närvisüsteemi piirkondades, k.a. valu ülekandmise ja moduleerimisega seotud kesknärvisüsteemi piirkondades: seljaaju hallaine dorsaalsarves, PAG-is, retikulaarformatsioonis, hüpotalamuses, talamuses, ja ajukoores (Mansour et al., 1993).

3. Endokannabinoidid ja nende toimet vahendavad retseptorid

Enim uuritud endokannabinoidid on anandamiid ja 2-arahidonöüülgütserool (2-AG). 2-AG sünteesitakse kahe ensüümi, fosfolipaas C ja DAG lipaasi (DAGL) poolt. Anandamiid sünteesitakse N-arahidonöüülfosfatidüületanolamiini (NAPE) ja NAPE-spetsiifilise fosfolipaas D poolt. Viimast ensüümi ei ole veel molekulaarselt kirjeldatud. Anandamiidi ja 2-AG lagundamist viib läbi rasvhappe amiidi hüdrolaas (FAAH), 2-AG lagundamist katalüüsib ka monoatsüüülgütserooli lipaas (MGL) (Piomelli 2003).

Kannabinoidi retseptoritest on teada 3 alatüüpi – CB1, CB2 ja CB3. CB1 ekspresseerub suurtes kontsentratsioonides ajus (Matsuda et al., 1990, Buckley et al., 2000, Zimmer et al., 1999), CB2 ekspresseerub suuremal määral immuunkudedes (Galiege et al., 1995, Munro et al., 1993, Schatz et al., 1997) ning kesknärvisüsteemi neuronites on teda vähemal määral (Munro et al., 1993, Buckley et al., 2000, Zimmer et al., 1999). CB3 retseptori kohta on aga vaid kaudsed tõendid ning tema nukleotiidne järjestus on veel teadmata (Fride et al., 2003).

Kannabinoidide retseptorid asuvad valu ülekandmisega ja moduleerimisega seotud ajupiirkondades nagu PAG, rostraalne ventromediaalne medulla (RVM) ja seljaaju hallaine tagumine sarv (Marsicano and Lutz, 1999). See viitab endokannabinoidide kesksele rollile valu moduleerimisel kesknärvisüsteemis.

4. Endopiidide ja –kannabinoidide interaktsioon koletsüstokiniiniga (CCK) ajus.

Avastus, et CCK ja opioidide retseptorite paiknemine kattub ajus ja seljaajus valutundlikkust reguleerivates piirkondades, viis uurijate tähelepanu CCK rollile valutundlikkuse vahendamisel. Juba ammu on näidatud, et CCK-ergiline transmissioon mõjutab opioidide valuvastast toimet (Faris et al., 1984). Täpsemalt, CCK signaal läbi CCK₂ retseptori vähendab opioidide anti-notsitseptiivset toimet (Noble et al., 1999). Seda võib järeldada eksperimendist, mille käigus leiti, et CCK manustamine vähendab morfiini poolt tekitatud anti-notsitseptiivset toimet närilistel, samas kui CCK₂ retseptori antagonist suurendab seda (Faris et al., 1983; Lavigne et al., 1992; Noble et al., 1995). Veel on näidatud, et eelnevalt CCK₂ retseptori nukleotiidse *antisense*-järjestuse ajusisene manustamine suurendab morfiini poolt tekitatud anti-notsitseptiivset toimet (Vanderah et al., 1994). Lõpuks, opioidi ja CCK retseptorid, mis asuvad esmasaferentsete neuronite närvilõpmetel seljaajus omavad vastupidist toimet neuronaaalsele aktiivsusele (Ghilardi et al., 1992; Stanfa et al., 1994). Eelloetletud tulemuste põhjal võib väita, et CCK toimides läbi CCK₂ retseptori omab funktsionaalselt anti-opioidset toimet. Kuna kesknärvisüsteemis on valdavaks retseptoritüübiks CCK₂ retseptor, siis sageli räägitakse CCK- ja opioidi-süsteemist kui antagonistlikest süsteemidest. CCK ja kannabinoidisüsteemi seostest on teada vähe. Põhiline informatsioon on CCK ja CB1 kooslokalisatsiooni kohta mitmetes käitumise regulatsiooniga seotud kesknärvisüsteemi piirkondades nagu hippokampus, amügdala, neokorteks.

Käesolevas töös uurisime CCK rolli stressist põhjustatud analgeesia kujunemises, kasutades CCK₂ retseptori puudulikkusega hiiri. Samadel hiirtel on varem kirjeldatud opioidi-süsteemi suurenenud aktiivsust (Pommier et al., 2002, Kurrikoff et al., 2004) ja kõrgeenenud nootsitseptiivse tundlikkuse lävi (Veraksits et al., 2003). Opioidi süsteemi suurenenud aktiivsusega on samal hiireliinil kirjeldatud ka hüperalgeesia väljakujunemise puudumine Bennett'i neuropaatilises valu mudelis (Kurrikoff et al., 2004). Samas ei ole sellel hiireliinil uuritud opiidide ja endokannabinoidi süsteemi seost CCK süsteemiga stressist tingitud analgeesia kujunemises. Meie eesmärgiks selles uurimustöös oligi kindlaks määrata opiidide ja endokannabinoidi süsteemi osalus endogeensetes valu vähendavates süsteemide ning CCK roll nende süsteemide moduleerijana.

Uurimismeetodid

1. Katseloomad

CCK₂ retseptori puudulikkusega homosügootsed (CCK₂^{-/-}) hiired olid 129Sv/C57Bl/6 taustas (Nagata et al., 1996). CCK₂^{-/-} mutatsioon viidi läbi homoloogilise rekombinatsiooni abil, mille tulemusena cckbr geenist lülitati välja osa eksonist 2 ning eksonid 3, 4, ja 5. Et vähendada 129Sv geneetilise tausta mõju, ristati neid katseloomi vähemalt 10 põlvkonna vältel tagasi C57Bl/6 tausta. Hiiri hoiti vivaariumis temperatuuril 20 ± 2° C, 12 tundi pime / 12 tundi valge tsüklis (tuled pandi põlema hommikul kell 07:00). Vesi ja toit olid loomaruumis hiirtele pidevalt vabalt kättesaadavad. Katses kasutati täiskasvanud isaseid (uuringu alguseks 8 nädalat vanad) hiiri. Loomkatse protseduurid olid heaks kiidetud Tartu Ülikooli loomakaitse komitee poolt, vastavalt EC direktiivile 86/609/EEC 24 novembrist 1986. Samuti oli nende katsete läbiviimiseks luba Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi juures tegutsevast Loomkatsete läbiviimise loakomisjonilt (luba nr. 39, 7. oktoober 2005.a., loa tähtaeg 01.10.2005-31.12.2009).

2. Saba termilise tundlikkuse test (*Tail Flick test*)

Saba termilise tundlikkuse määramiseks rakendati Hargreaves'i plantaartesti määramiseks kasutatavat seadet ((TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Saksamaa)). Stressist tingitud analgeesia (SIA) mõõtmiseks suunati infrapunane kiir hiire sabale ja määrati aeg, mille jooksul hiir oma saba ära tõmbab (*Tail Flick test*). Kirjanduse andmetel kasutatakse antud meetodit maailmas laialdaselt SIA mõõtmiseks. Käesoleva uuringu alguses võrreldi hiire saba infrapunase kiirega stimuleerimise testi kuuma plaadi (hot plate test) ja hiire saba kuuma vette kastmise (tail immersion test) testidega. Nendest eeluuringutest selgus, et infrapunase kiirega saba stimuleerimise test omab teiste uurimisviiside ees olulisi eeliseid, eriti olukorras, kus uuringut tuleb mitu korda korrata. Hiire saba termilise tundlikkuse test viidi alljärgnevalt. Hiire fikseerimiseks kasutati 50 ml plastikust katsuteid, mille otsa tehti auk, et tagada katseloomade normaalset hingamist. Katsete eelnevalt harjutati loomi katsetingimustega viie päeva jooksul, asetades hiire katsutisse umbes 20 sekundiks. Infrapunakiire intensiivsus valiti selline, et kontrollkatsetes oleks reaktsiooniaeg 12-14 s. Koekahjustustuste vältimiseks ei stimuleeritud hiire saba kunagi rohkem kui 30 sekundit. Farmakoloogilistest ainetest manustati hiirtele opioidi retseptorite antagonisti naloksooni (Sigma, USA) (annustes: 0,01mg/kg, 0,1mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg lahustatuna füsioloogilises lahuses) või rimonabanti (SR141716, Sanofi-Aventis, Prantsusmaa) (annustes: 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg lahustatuna 5% DMSO lahuses ning lahustamiseks lisati mõni tilk Tween-80). Rimonabanti ja naloksooni süstiti intraperitoneaalselt 30 min enne stressi esilekutsumist.

3. Elektrivalu stressi esilekutsumine

Käesolevas uuringus kasutati stressi esilekutsumiseks meetodit, mida on kirjeldanud Hohmann et al. (2005). Stress kutsuti esile kambris, mida kasutatakse passivse ja aktiivse vältimise katsete läbiviimiseks (TSE GmbH, Saksamaa). Selle kambri põrand on metallist võrest, mis võimaldab täpselt doseerida hiirtele jalgade kaudu antavaid elektrilööke. Antud kambris hoiti katseloomi kolm minutit ja selle vältel said nad erineva voolutugevusega stiimuleid (0.2 mA, 0.4 mA, 0.6 mA, 0.9 mA). Metsikut tüüpi ja homosügootsete CCK2 retseptori puudulikkusega katseloomade kontrollrühmi ei mõjustatud elektrilöökidega. Vahetult peale stressi mõõdeti hiirte saba termilist tundlikkust (katse kirjeldus on esitatud üleval).

4. Geeniekspressioon

Geeniekspressiooni analüüsiks kasutatud hiiri mõjustati elektrilöökidega, mille tugevus oli 0.6 mA. Hiired surmati peale saba termilise tundlikkuse mõõtmist tservikaalse dislokatsiooniga. See toimus 20 minutit peale katseloomadele jalgade kaudu elektrilöökide andmist. Hiired dekapiteeriti ja aju eraldati kiiresti koljust. Kontrollgrupi loomi stressile ei eksponeeritud. Ajustruktuurid prepareeriti alusklaasil, mis oli asetatud jää peale. Igalt hiirelt eraldati seljaaju lumbaalosa, ajutüvi, keskaju, mesolimbilised struktuurid (*nucleus accumbens*, *tuberculum olfactorium*, Calleja saarekesed), juttkeha. Nimetatud struktuurid külmutati kiiresti vedelas lämmastikus ja säilitati enne RNA eraldamist -80°C külmkapis. Kudedest eraldati mRNA kasutades *Rneasy midi kit*'i (Qiagen) vastavalt tootja protokollile. Esimese ahela cDNA sünteesiti kasutades *First Strand cDNA Synthesis Kit*'i (Fermentas). Kvantitatiivse reaalaja PCR(ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System equipment, PE Applied Biosystems, USA) viidi läbi Taqman™ süsteemis; kasutasime TaqMan® Universal PCR master mix'i (*Applied Biosystems*) ja Sybr Green I süsteemis; kasutasime qPCR™ Core Kit (*Eurogentec*). Kõik RNA eraldamised, cDNA sünteesid ja PCR reaktsioonid viidi läbi iga indiviidi ja iga koe jaoks eraldi. Praimerid katsetati eelnevalt läbi cDNA lahjenduste seeriatega. Praimeri dimeeride ja mittespetsiifiliste produktide esinemise kontrollimiseks kasutasime kogu eksperimendi vältel sulamiskõvera (*melting curve*) analüüsi. Iga reaktsioon viidi läbi 4 paralleelses korduses ning nendest arvutasime keskmise lävitsükli (*threshold cycle*, Ct).

Geeniekspressioonitasemeid analüüsiti võrreldes ΔCt (uuritava geeni lävitsükkel – sisemise referentsgeeni lävitsükkel) väärtuseid, kasutades ANOVA ja Tukey HSD *post hoc* testi. Sisemiseks referentsgeeniks kasutasime hüpoksantiini fosforibosüültransferaasi (HPRT). Parema võrreldavuse tagamiseks ning paremini visualiseerimiseks graafikul arvutati ΔCt väärtused lineaarskaalale ($2^{-\Delta Ct}$). Geeniekspressioonigraafikutel on näidatud suhtelised ekspressioonitasemed võrreldes kontrollrühma loomadega (ekspressioonitase = 1). Praimerid disainiti (Primer Express software, PE Applied Biosystems, USA) eksonite ühenduskohtadesse, et välistada proovidesse jäänud genoomse DNA amplifitseerumist. Kasutatud praimerite nimekiri on ära toodud tabelis 1.

5. Statistiline analüüs

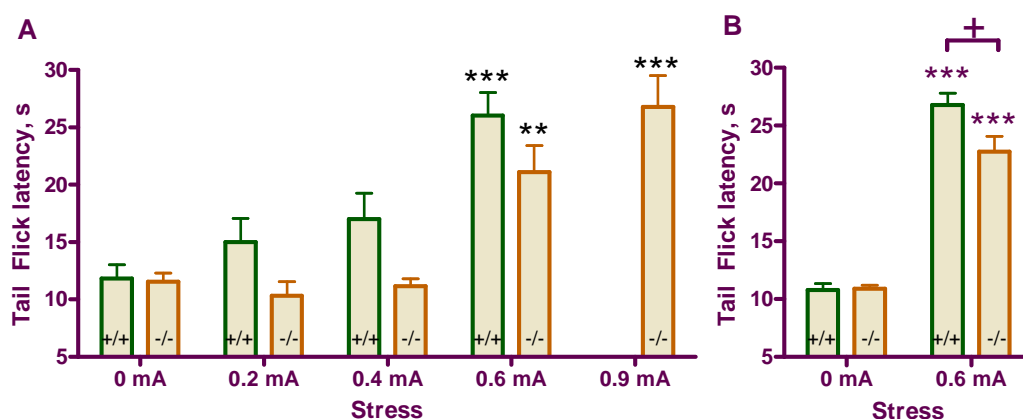
Kõik andmed on väljendatud keskmise väärtusena \pm SEM. Stressi ja manustatud ainete mõju statistilist olulisust on käitumiskatsetes kinnitatud kasutades 2 sõltumatu faktoriga ANOVA testi (genotüüp ja stress ning genotüüp ja manustatud aine annus kui sõltumatud muutujad) ja Tukey HSD *post hoc* testi.

Tabel 1. Geeni ekspressiooni analüüsiks kasutatud praimerite järjestused või Applied Biosystems'ist (AB) hangitud praimerite koodid.

| Geen | Forward | Reverse | AB praimerite koodid |
|----------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| Cck | | | Mm_0446170_m1 |
| Cckbr | | | Mm_00432329_m1 |
| Cb1 | CGTGTTCACCGCAAAGATA | CCCACCCAGTTTGAACAGAAA | |
| Dagla | | | Mm_01701557_m1 |
| Daglb | CGCTTATCCTAGGGATGGATGT | CCATGTTGGTCACACTTAACCTG | |
| Nape-pld | GCCATTCCTATCGGAGC | ATGCTGGTATTTCATAAACACCTT | |
| Magl | TGTCCTGCCAAATATGACCTTG | GGTCAACCTCCGACTTGTTC | |
| Faah | | | Mm_01191808_m1 |
| Oprm | AACACCCCTCCACGGCTAAT | GGGTTGGCTGGTGGTTAGTTC | |
| Oprd | TTGGCATCGTCCGGTACAC | AGATGTAGATGTTGGTGGCGG | |
| Oprk | GCAGCCTGAATCCTGTTCTC | TCATCCCTCCACATCTCTC | |
| Pomc | CTTTGTCCCAGAGAGCTGC | AACAAGATTGGAGGGACCCC | |
| Penk | ATGCAGCTACCGCCTGGTT | GTGTGCACGCCAGGAAATT | |
| Pdyn | TTGGCAACGGAAAAGAATCTG | TGTGCGGCTTCATCATTAT | |
| Hprt | GCAGTACAGCCCCAAAATGG | AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA | |

Tulemused

1. Stress põhjustas doosist sõltuva analgeesia mõlema genotüübiga hiirtel

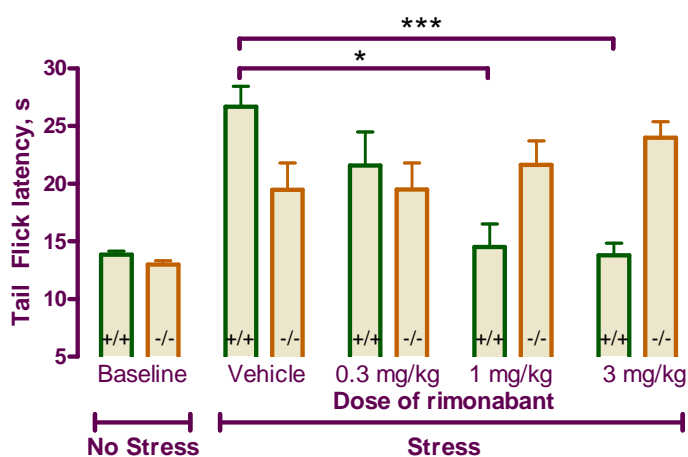


Joonis 1. A. Erineva intensiivsusega stressi mõju SIA väljakujunemisele metsikut tüüpi ja CCK₂^{-/-} hiirtel. 0.6 mA stress oli piisava tugevusega, et tekitada oluline SIA nii metsiktüüpi loomadel (tulpadel märgitud +/+) ja CCK₂^{-/-} loomadel (tulpadel märgitud -/-). B. CCK₂^{-/-} loomadel tekkis väiksem analgeesia vastuseks 0.6 mA stressile, kui kombineerida tail flick latentsid kolmest katsest. Tärnid näitavad Tukey post-hoc võrdlusi 0 mA stressigrupiga (** p < .01, *** p < .001). Rist näitab Tukey post-hoc genotüübi võrdlust (+ p < .05).

Erinevatel loomagrupidel mõõdeti 0.2, 0.4, 0.6 ja 0.9 mA elektrivalu stressi mõju notsitseptiivsele tundlikkusele. *Tail flick* baastaseme väärtused ja 0 mA *tail flick* väärtused (loomad asetati metallvarraste peale, kuid varrastesse elektrit ei lastud) ei erinenud. 0,6 mA stress põhjustas statistiliselt olulise analgeesia nii metsiktüüpi kui ka CCK₂^{-/-} loomadel. 0.9 mA stressi intensiivsus kaasati uuringusse ainult selleks, et kindlaks teha, et kas CCK₂^{-/-} loomadel on analgeesia suurus sõltuv stressi suuruselt. Metsiktüüpi loomi 0.9 mA stressigruppi ei kaasatud. CCK₂^{-/-} loomadel olid analgeesia tekkimiseks vajalikud suurema tugevusega elektri ärritused võrreldes metsiktüüpi loomadega (jättes välja 0.9 mA grupi, genotüübi peaefekt $F(1,66)=16.7$, $p<0.001$), kuigi metsiktüüpi ja CCK₂^{-/-} loomadel ei olnud statistilisi erinevusi ühelgi stressitasemel eraldi vaadatuna (0.2, 0.4, ja 0.6 mA). 0.6 mA stress põhjustas SIA mõlemal genotüübil ja seda intensiivsust kasutati järgnevates eksperimentides. Saamaks lisakinnitust, et CCK₂^{-/-} loomadel tekib nõrgem analgeesia vastuseks stressile, kombineerisime andmed käesolevast ja järgnevatest eksperimentidest (joonis 1B) ning võrdlesime *tail flick* vastuseid stressigrupis (0.6 mA) ja kontrollgrupis. Kahefaktoriline ANOVA näitas olulist genotüüp-stress interaktsiooni ($F(1, 112)=4.74$, $p<0.05$). Ka *post-hoc* analüüs kinnitas genotüübi efekti 0.6 mA stressi juures ($p<0.05$).

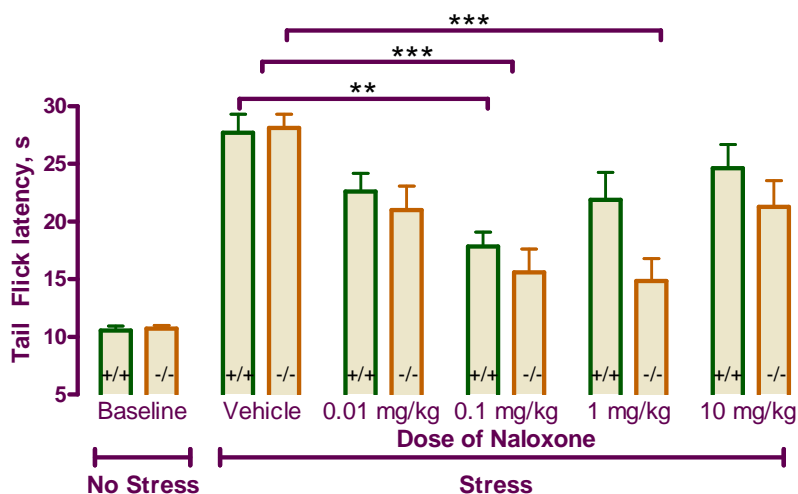
2. CB1 retseptorite antagonist rimonabant ei mõjutanud SIA CCK₂^{-/-} loomadel

Loomadel mõõdeti CB1 antagonisti rimonabandi (0,1, 1 ja 3 mg/kg) mõju SIA väljakujunemisele. CCK₂^{+/+} loomadel pärssis CB1 blokeerimine SIA teket doosist sõltuvalt (Joon 2). CCK₂^{-/-} loomadel aga rimonabandi manustamine SIA-t ei mõjutanud. Kahefaktorilise ANOVA analüüs andis tulemuseks märkimisväärse interaktsiooni genotüübi ja manustatud aine doosi vahel ($F(3,77)=6.82, p<0.001$).



Joonis 2. CB1 antagonisti rimonabandi efekt SIA tekkele. SIA tekkimine on näidatud graafiku „Stress“ osas. Rimonabant blokeeris SIA metsiktüüpi loomadel (tulpadel märgitud +/+). CCK₂^{-/-} loomad (tulpadel märgitud -/-) olid tundetud rimonabandi manustamisele, sest nende SIA väärtused ei muutunud. Tärnid näitavad Tukey *post-hoc* võrdlusi kontrolllahuse manustamisega. * $p < .05$, *** $p < .001$.

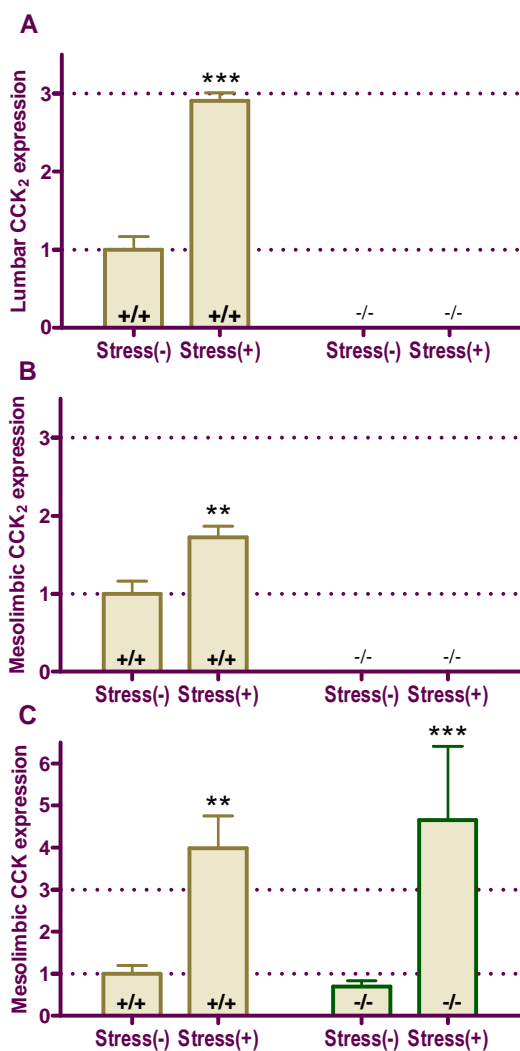
3. Opioidi antagonist naloksoon antagoniseeris SIA mõlema genotüübiga hiirtel



Joonis 3. Naloksooni efekt SIA tekkele. SIA tekkimine on näidatud graafiku „Stress“ osas. Naloksoon antagoniseeris SIA tekke nii metsiktüüpi (tulpadel märgitud +/+) kui ka CCK₂^{-/-} loomadel (tulpadel märgitud -/-). Tärnid näitavad Tukey *post-hoc* võrdlusi kontrolllahuse manustamisega. ** p < .01; *** p < .001.

Opioidide antagonistina naloksooni (0.001, 0.1, 1 ja 10 mg/kg) manustamine blokeeris stressist põhjustatud analgeesia tekkimise nii metsiktüüpi kui ka CCK₂^{-/-} loomadel (kahefaktoriline ANOVA doosiefekt F(4,87)= 9.97, p<0.001). Naloksooni manustamine põhjustas U-kujulise vastus-kõvera mõlemal genotüübil, millest lähtub, et nii naloksooni väiksemad kui ka suuremad doosid SIA teket ei mõjuta. CCK₂^{+/+} hiirtel omas SIA blokeerivat toimet ainult keskmine (0,1 mg/kg). CCK₂^{-/-} loomadel omasid SIA blokeerivat toimet 0.1 ja 1 mg/kg annused.

4. Stress põhjustas lumbaalses ja mesolimbilises koes CCK ja CCK2 retseptori mRNA ülesregulatsiooni
Metsiktüüpi loomadel põhjustas stress CCK süsteemiga seotud geenide ülesregulatsiooni kahes kesknärvisüsteemi piirkonnas: seljaaju lumbaalses ja mesolimbilistes piirkonnas (joonis 4). Mõlemas struktuuris suurenes CCK₂ retseptori mRNA kontsentratsioon (p<0.001 ja p<0.01, vastavalt joonised 4A ja 4B, sõltumatute gruppidega T test). Lisaks suurenes CCK mRNA kontsentratsioon mesolimbilises alas (joonis 4c). CCK₂^{-/-} loomadel oli sarnaselt metsiktüüpi loomadega CCK mRNA süntees ülesreguleeritud mesolimbilises alas (ANOVA stressi efekt F(1,20)=17.05, p<0.001).



Joonis 4. Stressi toime CCK ja CCK2 retseptori ekspressioonile lumbaalses ja mesolimbilises piirkonnas. Suhtelised geeniekspressiooni väärtused on mõõdetud stressi puudumisel [Stress(-)] ja pärast stressi rakendamist [Stress(+)] metsiktüüpi loomadel (tulpadel märgitud +/+) ja CCK₂^{-/-} loomadel (tulpadel märgitud -/-). Stressi tagajärjel suurenes CCK₂ retseptori geeni ekspressioon metsiktüüpi loomadel nii seljaaju lumbaalses (A) kui ka mesolimbilises piirkonnas (B). Lisaks sellele põhjustas stress CCK geeni ülesregulatsiooni mesolimbilises piirkonnas nii metsiktüüpi kui ka CCK₂^{-/-} loomadel (C). Tärnid näitavad stressi efekte, st võrdlusi vastava [Stress(-)] rühmaga. ** p < 0.01, *** p < 0.001.

5. Stress põhjustas enokannabinoidse aktivatsiooni lumbaalses ja mesolimbilises alas metsiktüüpi, kuid mitte CCK₂^{-/-} loomadel.

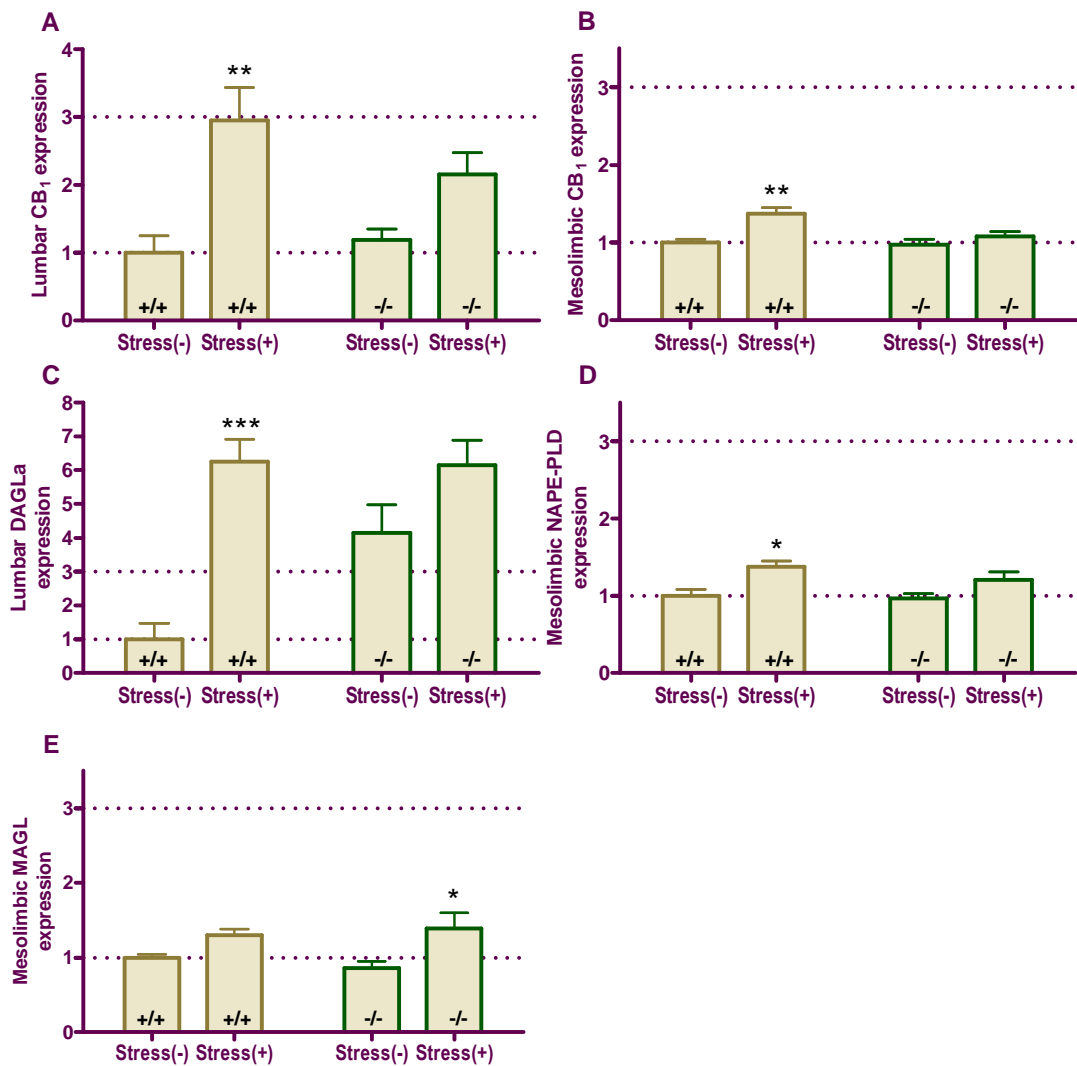
Stress põhjustas endokannabinoidide süsteemi aktivatsiooni kahes kesknärvisüsteemi piirkonnas: seljaaju lumbaalses osas ja mesolimbilises alas (joonis 5). Esiteks suurenes stressi tulemusena mõlemas nimetatud struktuuris CB₁ retseptori mRNA kontsentratsioon (ANOVA stressi efekt

$F(1,20)=19.17$, $p<0.001$ lumbaalses koes (joonis 5A) ja $F(1,20)=11.42$, $p<0.01$ mesolimbilistes struktuurides (joonis 5B)). Stressist põhjustatud ülesregulatsioon oli statistiliselt oluline ainult metsiktüüpi hiirtel (võrdlusel stressiga ja stressita $CCK_2^{+/+}$ loomadel $p<0,01$ mõlema struktuuri puhul, Tukey HSD *post-hoc*).

Teiseks, seljaaju lumbaalses osas toimus stressist tingituna 2-AG sünteesiva ensüümi DAGLa mRNA ülesregulatsioon (joonis 5C) metsiktüüpi hiirtel (stressi ja genotüübi interaktsioon $F(1,2)=5.12$, $p<0.05$, Tukey HSD *post-hoc* $p<0.001$). $CCK_2^{-/-}$ genotüübi puhul oli stressi mittesaanud loomadel basaalselt DAGLa geeni ekspressioonitase kõrgem (metsiktüüpi loomade baastase võrrelduna $CCK_2^{-/-}$ loomade baastasemega, $p<0.01$, Tukey HSD *post-hoc*), viidates kõrgemale 2-AG sünteesile nendel loomadel.

Kolmandaks, anandamiidi sünteesiva ensüümi NAPE-PLD mRNA kontsentratsioon suurenes stressi tulemusena mesolimbilistes struktuurides (joonis 5D; ANOVA stressi efekt $F(1,20)=15.52$, $p<0.001$). Sarnaselt DAGLa sünteesi ülesregulatsioonile, toimus ka NAPE-PLD sünteesi aktivatsioon ainult metsiktüüpi hiirtel ($p<0.05$, Tukey HSD *post-hoc*).

Neljandaks, 2-AG lagundava ensüümi MAGL süntees oli stressi tulemusena ülesreguleeritud mesolimbilistes struktuurides (joonis 5E; ANOVA stressi efekt $F(1,20)=12.16$, $p<0.01$). See efekt oli statistiliselt oluline ainult $CCK_2^{-/-}$ loomadel ($p<0.05$, Tukey HSD *post-hoc*).

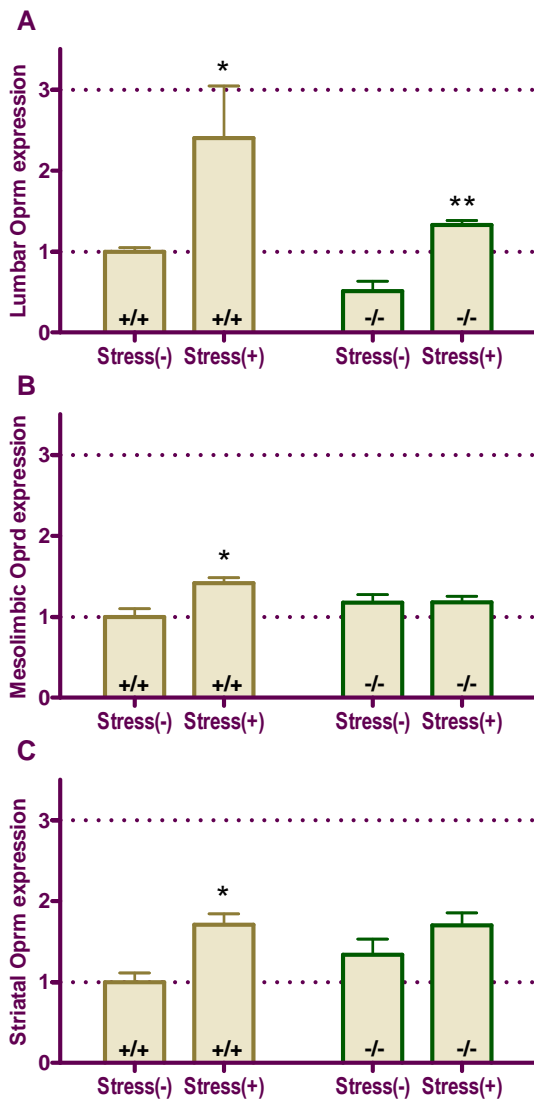


Joonis 5. Stressi efektid CB₁ retseptori, 2-AG sünteesiva ensüümi DAGLa, anandamiidi sünteesiva ensüümi NAPE-PLD ja 2-AG lagundava ensüümi MAGL geenide ekspressioonile seljaaju lumbaalsos ja mesolimbilises piirkonnas. Suhtelised geeniekspressiooni väärtused on mõõdetud stressi puudumisel [Stress(-)] ja pärast stressi rakendamist [Stress(+)] metsiktüüpi loomadel (tulpadel märgitud +/+) ja CCK₂^{-/-} loomadel (tulpadel märgitud -/-). Stressi tagajärjel toimus mitmete geenide ülesregulatsioon metsiktüüpi loomadel: CB₁ retseptor lumbaarselt (A) ja mesolimbilises alas (B), DAGLa lumbaarsos (C) ja NAPE-PLD mesolimbilises osas (D). Stressi tagajärjel suurenes MAGL ekspressioon CCK₂^{-/-} loomade mesolimbilises osas (E). Tärnid näitavad stressi efekte, st võrdlusi vastava mitte-stress [Stress(-)] rühmaga. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

6. Stress põhjustas opioidi retseptorite geenide ülesregulatsiooni lumbaalses koes, mesolimbilistes struktuurides ja striatumis

Stress põhjustas Oprm ja Oprd retseptorite geenide ülesregulatsiooni seljaaju lumbaalses ja mesolimbilistes struktuurides. Lisaks esines stressist tingitud Oprm ülesregulatsioon ka striatumis. Enamus nendest efektidest esines metsiktüüpi loomadel, kuid mitte CCK₂^{-/-} loomadel. Oprm retseptori stressist tingitud ülesregulatsioon lumbaalses koes esines mõlemal genotüübil (joonis 6A; ANOVA stressi efekt $F(1,20)=20.77$, $p<0.001$). CCK₂^{-/-} loomadel esines basaalselt madalam Oprm mRNA kontsentratsioon seljaaju lumbaalses osas (võrdlus stressita metsiktüüpi ja CCK₂^{-/-} loomade vahel, $p<0.05$, Tukey HSD *post-hoc test*).

Oprm retseptori geeni stressist tingitud ülesregulatsioon striatumis (joonis 6C; ANOVA stressi efekt $F(1,20)=11.68$, $p<0.01$) oli märkimisväärne ainult metsiktüüpi hiirtel ($p<0.05$, Tukey HSD *post-hoc test*). Samuti toimus stressi tulemusena Oprd retseptori mRNA ülesregulatsioon mesolimbilistes struktuurides (joonis 6B). Antud juhul täheldasime märkimisväärse interaktsiooni genotüübi ja stressi vahel (ANOVA $F(1,20)= 5.49$, $p<0.05$), sest ainult metsiktüüpi hiirtel toimus geeni ülesregulatsioon.



Joonis 6. Stressi tagajärjel toimunud muutused opioidireseptorite Oprm ja Oprd geenide ekspressioonis. Suhtelised geeniekspressiooni väärtused on mõõdetud stressi puudumisel [Stress(-)] ja pärast stressi rakendamist [Stress(+)] metsiktüüpi loomadel (tulpadel märgitud +/+) ja CCK₂^{-/-} loomadel (tulpadel märgitud -/-). Stressi tagajärjel suurenes Oprm ekspressioon lumbaalselt (A) ja striatumis (C) ja Oprd mesolimbilises piirkonnas (B) metsiktüüpi loomadel. Üks nimetatud muutustest esines ka CCK₂^{-/-} loomadel, Oprm ekspressiooni suurenemine lumbaalses (A). Tärnid näitavad stressi efekte, võrdlusi vastava [Stress(-)] rühmaga. * p < .05, ** p < .01.

Arutelu

Selles töös kasutasime CCK₂ retseptori puudulikkusega hiiri ning CB1 ja opioidi retseptorite antagonistide uurimaks, kas CCK süsteemi muutunud funktsioon mõjutab kahte SIA komponenti – endokannabinoidide ja opioidi peptiide.

Esiteks, me näitasime, et stress põhjustab doosist sõltuva analgeesia nii metsiktüüpi kui ka CCK₂^{-/-} hiirtel. Me kasutatud stressi parameetreid (0.6 mA, 3 min) on tihti kasutatud sarnastes uuringutes. 0.6 mA oli piisav voolutugevus põhjustamaks analgeesiat nii metsiktüüpi kui ka CCK₂^{-/-} hiirtel ja seetõttu kasutasime järgnevates katsetes stressi tekitamiseks seda voolutugevust. Jälgides SIA tekkimist erinevatel voolutugevustel, selgus, et CCK₂^{-/-} loomadel tekkis vastusena stressile nõrgem analgeesia kui metsiktüüpi loomadel. Samas, analüüsides erinevate voolutugevuste (0.2, 0.4 0.6 mA) tulemusena tekkinud analgeesiat, selgub, et ükski kasutatud voolutugevus ei põhjusta metsiktüüpi ja CCK₂^{-/-} hiirtel statistiliselt erinevat SIA. Siiski erinevate katsete tulemuste kombineerimine näitab, et metsiktüüpi hiirtel on tugevam analgeesia võrreldes mutantsete pesakonnakaaslastega.

Näidatud genotüübiline erinevus ei ole tõenäoliselt seotud muutunud valutundlikkusega CCK₂^{-/-} hiirtel. Vähenenud valutundlikkus nendel hiirtel on küll näidatud (Veraksits et al., 2003), kuid *tail flick* testiga mõõdetud basaalne tundlikkus oli metsiktüüpi ja CCK₂^{-/-} hiirtel sama, mistõttu mõõdetud erinevus SIA tasemes iseloomustab loomade reaktsiooni stressile. Lisaks kõrgem valulävi põhjustaks suurenenud, mitte vähenenud analgeesiat. Seega CCK₂^{-/-} hiirtel reageerivad natukene vähem stressile, sest sama atressi puhul areneb neil välja väiksem analgeesia.

Meie manustasime farmakoloogilisi aineid enne loomade stressogeensesse keskkonda viimist. Asjaolu, et CCK₂^{-/-} hiirtel oli analgeesia mõnevõrra nõrgem, võib mõjutada farmakonide manustamisest tingitud efektide avaldumist. Samas meie eesmärk oli uurida kas valitud farmakon takistab analgeesia arengut, mitte võrrelda kas kindel farmakon mõjub ühe genotüübiga hiirtele rohkem kui teise genotüübiga hiirtele. Seega ei olnud esialgse analgeesia tugevus järgnevates farmakoloogilistes katsetes olulisim küsimus meie jaoks.

Teiseks, me manustasime naloksooni stressile eelnevalt. Opioidi peptiidide osalus SIA tekkimisel on näidatud ammu. Seega oli naloksooni poolt oodata SIA tekkimise antagoniseerimist. Varasemates uurimustes on näidatud opioidse SIA üleminekut mitteopioidseks seoses stressi tugevusega (Terman et al., 1986). On näidatud, et 3 min, 0.9 mA valuärritus põhjustab analgeesia, mis ei olnud mõjutatav naloksooni manustamisega hiirtele (Terman et al., 1986). Kuid sellistes tingimustes tekkiv analgeesia oli mõjutatav CB1 antagonisti rimonabandi

manustaminega (Hohmann et al., 2005). Meie katsetes, kus kasutasime 3 min, 0.6 mA stressi, oli SIA põhjustatud nii opioididest kui ka endokannabinoididest.

On leitud, et CCK₂ retseptorite geneetilise väljalülitamise tulemusena toimuvad muutused opioidide süsteemis. Nimelt suureneb opioidide retseptorite sidumiskohtade arv ja afiinsus corpus striatum'is ja ajukooses (Runkorg et al., 2003) ning suureneb mitmete opioidide retseptorite ja nende ligandite eellasmolekulide geeniekspressioon (Kurrikoff et al., 2004). Seega me eeldasime, et opioidide retseptorite blokeerimine mõjutab erinevalt analgeesia tekkimist metsiktüüpi ja CCK₂^{-/-} loomadel. Samas naloksoon antagoniseeris stressist tingitud analgeesiat nii metsiktüüpi kui ka CCK₂^{-/-} hiirtel, kuigi ei põhjustanud doosist sõltuvat efekti suurust. Farmakoni manustamine põhjustas hoopis U-kõvera kujulise efekti, kus SIA tekkimist antagoniseerisid ainult naloksooni keskmised annused. See tulemus viitab võimalusele, et naloksooni toimes osalevad erinevad opioidi süsteemid. Tõepoolest naloksoon on madalates annustes μ opioidi retseptorite spetsiifiline, samas kui kõrgemates annustes ta interakteerub ka δ ja κ opioidi retseptoritega. Sellest tulenevalt on taolise U-kujulise efekti põhjuseks tõenäoliselt naloksooni mittevalikuline toime opioid retseptoritele. Kuigi mõlemal genotüübil oli naloksooni toimest põhjustatud toime põhimõtteliselt sarnase kujuga (U-kõver), omas naloksoon siiski tugevamat toimet CCK₂^{-/-} loomadele (kõver oli nihutatud). Naloksooni tugevamat toimet CCK₂^{-/-} loomadel võib seletada asjaoluga, et nende katseloomade ajus on μ opioidi retseptorite arv ja afiinsus suuremad võrreldes metsiktüüpi pesakonnakaaslastega (Runkorg et al 2003).

Kolmandaks, uurisime me kannabinoidide osalust stressist põhjustatud analgeesia mehansimides. Me manustasime hiirtele enne stressi esilekutsumist rimonobanti, mis on CB₁ retseptorite antagonist. On näidatud, et endokannabinoidid osalevad SIA tekkimisel (Hohmann et al, 2005). Kahe paralleelse süsteemi – opioidide ja kannabinoidide – olemasolu tähendusele antinotsitseptiivse vastuse kujunemisel ei ole kujunenud ühist arusaama. Üks võimalik seletus on, et endokannabinoidid võimaldavad kiire reageerimist kahjustavatele teguritele, sest neid ligandeid ei talletata, vaid sünteesitakse vajaduse tekkimisel. Ühte näidet kiirest reageerimisest stressile demonstreerisid Hohmani ja kaasautorid (2005), kus stressist põhjustatud 2-AG kontsentratsiooni tõus saavutas maksimaalse taseme 2 minutit peale loomade stressogeenset keskkonnast eemaldamist ning baastasemeni jõudis 2-AG kontsentratsioon 13 minutit hiljem. Endokannabinoidide versus opioidide süsteemi osalemist näib mõjutavat stressitingimuste tüüp ja stressi parameetrid (Akil, Mayer, 1972; Terman et al, 1986). Rimonabant blokeeris meie katses oodatult SIA tekkimise metsiktüüpi hiirtel. Samas CCK₂^{-/-} loomadel ei mõjutanud rimonabant SIA tekkimist. Sellest võib järeldada, et SIA tekkimine CCK₂^{-/-} loomadel ei ole tõenäoliselt endokannabinoidide poolt vahendatud mehansim. Tundub, et CCK₂ retseptori töö häirimisega lülitub välja ka vähemalt osa endokannabinoidide funktsioonist SIA aktiveerimisel. Sellest

järelduvalt on CCK₂ retseptorite geneetilise väljalülitamise tulemusena SIA fenotüüp vahendatud opioidide poolt.

Lisaks on huvitav mainida, et närilistel on hiljuti kindlaks tehtud CCK ja CB₁ retseptori koosinemine mitmete kesknärvisüsteemi struktuuride neuronites (Marsicano and Lutz, 1999). Siiski ei ole veel selge nimetatud kolokalisatsiooni funktsionaalne roll või selle tähtsus käitumisega seotud mehhanismides. Sellest tulenevalt oli järgnevas plaaniks kindlaks teha need kesknärvisüsteemi piirkonnad, kus kirjeldatud interaktsioon aset leiab. Täpsemalt, me tahtsime kindlaks teha kesknärvisüsteemi piirkonnad, milles CCK₂^{-/-} loomadel esineb peale stressi esilekutsumist metsiktüüpi hiirtest erinevad muutused endokannabinoidide geenide ekspressioonis. Need regioonid osalevad tõenäoliselt endokannabinoididest sõltuvates analgeesia mehhanismides.

Geeniekspressioonikatsetes uurisime retseptorite, ligandite ja ligandeid sünteesivate ensüümide geeniekspressiooni endokannabinoidide, opioidide ja CCK süsteemides. Kokkuvõttes meie akuutse stressi mudel andis tulemuseks selge geeniekspressiooni muutuste mustri teatud kesknärvisüsteemi piirkondades. Stress aktiveeris metsiktüüpi loomadel endokannabinoidide ja CCK süsteemid kahes kesknärvisüsteemi piirkonnas: lumbaalne seljaaju ja mesolimbiline struktuur (*nucleus accumbens, tuberculum olfactorium*). Metsiktüüpi hiirtel oli stressi mõjul täheldatav CCK ja CCK₂ retseptorite geenide ülesregulatsioon mesolimbilises struktuuris ning lumbaalses osas suurenes CCK₂ retseptorite mRNA sisaldus. Endokannabinoidide süsteemis toimus CB₁ retseptori ja ligandeid sünteesivate ensüümide geenide ülesregulatsioon. Lumbaalne DAGLa sünteesi suurenemine peale stressi on kooskõlas varasemate uuringutega (Suplita et al., 2006), kus mõõdeti LC/MC abil 2-AG suurenenud kontsentratsioon roti seljaaju lumbaalses piirkonnas. Kirjeldatud tulemused viitavad metsiktüüpi loomadel toimuvale endokannabinoidide süsteemi aktivatsioonile stressi tulemusena.

CCK₂^{-/-} loomadel ei esinenud paljusid metsiktüüpi hiirtele iseloomulikke stressist tingitud muutuseid. Stressist tingitud CCK ekspressiooni suurenemine oli sarnane metsiktüüpi hiirtele, kuid CCK₂ retseptori ekspressioonis muutusi ei täheldatud, sest hiirtel nimetatud retseptor puudub. Me ei leidnud, et stress suurendaks CCK₂^{-/-} loomadel endokannabinoidide süsteemi geenide ekspressiooni suurenemist. Samas esines nendel hiirtel 2-AG lagundava ensüümi MGLL ülesregulatsioon, mis viitab endokannabinoidide süsteemi vähenenud aktiivsusele CCK₂^{-/-} loomadel. Kirjeldatud andmete põhjal võib väita, et stress põhjustab selge ekspressioonimuutuste mustri metsiktüüpi hiirtel, viidates suurenenud CCK ja endokannabinoidide süsteemide aktiivsusele mesolimbilistes struktuurides ja seljaaju lumbaalses osas. Nende tulemuste juures oleks huvitav teada, miks CCK₂ retseptori väljalülitamine hoiab ära endokannabinoidide süsteemi

aktivatsiooni. Üheks võimalikuks seletuseks on, et stressi puhul toimub rakulisel tasemel CCK ja endokannabinoidide vaheline koostoime. Meie leidsime, et stress põhjustab nii CCK kui ka kannabinoidide süsteemi geenidel ekspressiooni muutuseid. Beinfeld ja kaasautorid (2001) demonstreerisid, et CB₁ retseptori aktivatsioon võib pidudada roti hipokampuse neuronites CCK vabastamist. See viitab võimalusele, et endokannabinoidid moduleerivad CCK aktiivsust ajus. Samas meie uurimistöö viitab võimalusele, et CCK omab tähtsust endokannabinoidide süsteemi aktivatsioonis. Eespool viitasime, et CB₁ retseptorid paiknevad CCK sisaldavatel närvirakkudel. Seega peavad neile lähedalolevad neuronid sisaldama CCK₂ retseptoreid (peamine CCK retseptor kesknärvisüsteemis) ja endokannabinoidide sünteesivaid ensüüme. CCK₂ retseptorite aktiveerimine käivitab fosfolipaaas C-(PLC)-sõltuva signaaliraja (Noble, Roques, 1999), mille tulemusena sünteesitakse inositoll trifosfaati (IP3) ja diatsüül-glütserooli (DAG) ning suureneb rakusisene Ca²⁺ kontsentratsioon. DAG hüdrolyüsitakse 2-AG DAG lipaaside abil. PLC kaskaadi aktiveerimine võib olla vajalik 2-AG sünteesimiseks roti ajus (Sugiura, Waku, 2000). Seega on olemas võimalus, et CCK₂ retseptorite aktiveerimise tulemusel suureneb endokannabinoidide tase ajus.

Me mõõtsime ka opioidide geenide ekspressioonitasemeid. Stressist tingitud opioidide ekspressioonitaseme muutused ei andud nii selget mustrit kui me täheldasime endokannabinoidide puhul. Metsiktüüpi hiirtel toimusid stressi tulemusena mitmete opioidide retseptorite ekspressioonitaseme muutused erinevates kesknärvisüsteemi piirkondades. Stressi tulemusena toimuv Opm retseptori geeni ülesregulatsioon seljaaju lumbaalses osas võib olla seotud opioidide poolt vahendatud SIA. Metsiktüüpi loomadel täheldasime stressi tulemusena suurenes Opm retseptorite mRNA *corpus striatum*'is ja Opd retseptorite mRNA mesolimbilises struktuurides. Nendes aju osades mõjutab opioidi retseptorite aktivatsioon dopamiini vabanemist (Spanagel *et al.*, 1992). Samas on mesolimbilise dopamiiniga seostatud käitumuslikku aktivatsiooni, liikumisaktiivsust ja motivatsioonilisi protsesse, mis kõik on olulised stressiga toimetulekul. Seega stressist tingitud muutused Opm ja Opd retseptorite geenide ekspressioonis mesolimbilises struktuurides on tõenäoliselt normaalse stressireaktsiooni komponendid. Huvitaval kombel täheldasime CCK₂^{-/-} loomadel taaskord väiksemaid stressist tingitud muutusi. Lumbaalne Opm retseptori geeni ülesregulatsioon oli mõlemal genotüübil sarnane ning seda muutust saab arvatavasti seostada stressist tingitud analgeesiaga. Samas opioidi retseptorite ülesregulatsioon mutantsete hiirte mesolimbilises struktuurdes ja *corpus striatum*'is puudus.

Kokkuvõtteks leidsime, et CCK₂ retseptori geeni geneetilise väljalülitamine kõrvaldas endokannabinoididest tingitud analgeesia. Arvestades, et nendel loomadel on stressimehansmid kahjustunud ja eeldades, et stressi mehansmid on olulised evolutsiooni seisukohast, võib oodata nendel katseloomadel tõsisid häireid stressitingimustega kohanemisel. Selle väite kinnituseks on

varasemad tulemused, et hiired, kellel puuduvad CCK₂ retseptorid, omavad väiksemat kohanemisvõimet kui metsiktüüpi hiired. Näiteks omasid CCK₂^{-/-} isased loomad kolm päeva kestnud liikumisaktiivsuse uurimise eksperimendis väiksemat motoorse aktiivsuse vähenemist võrreldes metsiktüüpi loomadega (Runkorg et al., 2003). Liikumise vähenemine tundub keskkonnas iseloomustab katseloomade kohanemisvõimet. Veraksitš ja kaasautorid (2003) leidsid, et CCK₂^{-/-} loomadel kulus, võrreldes metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, kuuma plaadi testis käpa äratõmbamiseks kauem aega. Samas käpa äratõmbamiseni kuluv aeg lühenes metsiktüüpi loomade tasemele peale ühekordset või korduvat füsioloogilise lahuse süstimist nendele loomadele. Tundub, et CCK₂^{-/-} loomadel on kohanemisprotsessi käivitumiseks vajalik tugevam stress. Kokuvõtteks pakub käesolev töö, kasutades käitumuslikke- ja geeniekspressioonikatseid, tõestuse, et CCK₂ retseptorite aktivatsioon on vajalik endokannabinoidide poolt vahendatava analgeesia käivitumiseks. Selleks, et selgitada selle interaktsiooni täpsemaid molekulaarseid mehhanisme, tuleb teostada edaspidiseid uuringuid.

Järeldused

1. Elektrivalu stress põhjustab ärrituse tugevusest sõltuva analgeesia nii metsiktüüpi kui ka $CCK_2^{-/-}$ hiirtel. Jälgides stressist tingitud analgeesia (SIA) tekkimist erinevatel voolutugevustel, selgus, et $CCK_2^{-/-}$ loomadel tekkis vastusena stressile nõrgem analgeesia kui metsiktüüpi pesakonnakaaslastel.
2. Opioidi antagonist naloksoon kõrvaldas SIA nii metsiktüüpi kui ka mutantsetel hiirtel. Naloksooni efekt oli täheldatav kindlates doosides ja oli U-kujuline. Naloksooni analgeesiat kõrvaldav toime oli enam väljendunud $CCK_2^{-/-}$ hiirtel võrreldes metsiktüüpi pesakonnakaaslastega.
3. $CB1$ retseptorite antagonist rimonabant kõrvaldas annusest sõltuvalt analgeesia metsiktüüpi hiirtel, aga ei avaldanud mingit mõju stressist tingitud reaktsioonile $CCK_2^{-/-}$ loomadel.
4. Stressi mõjul esinesid olulised muutused endokannabinoidide ja CCK geenide ekspressioonis metsiktüüpi hiirte mesolimbilistes struktuurides ja seljaaju lumbaalses osas. Vastavad muutused puudusid või olid oluliselt väiksemad mutantsete hiirte ajus.
5. Erinevalt metsiktüüpi hiirtest puudub $CCK_2^{-/-}$ loomadel endokannabinoididest tingitud analgesia. CCK_2 retseptorite vahendusel toimub endokannabinoidide süsteemi aktivatsioon stressi puhul.

Kirjanduse loetelu

Akil H, Mayer DJ. (1972) Antagonism of stimulation-produced analgesia by p-CPA, a serotonin synthesis inhibitor. *Brain Research*, 29, 692-7.

Baraka A, Noueihid R, Hajj S (1981) Intrathecal injection of morphine for obstetric analgesia. *Anesthesiolog*, 54, 136-40.

Beinfeld, M.C., Connolly, K. (2001) Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystokinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. *Neuroscience Letters*, 301, 69-71

Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A. (2000) Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *European Journal of Pharmacology*, 396, 141-9.

Faris, P.L., Komisaruk, B.R., Watkins, L.R., Mayer, D.J. (1983) Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia. *Science*, 219, 310-312.

Faris, P.L., McLaughlin, C.L., Baile, C.A., Olney, J. (1984) Morphine analgesia potentiated but tolerance not affected cholecystokinin. *Science*, 226, 1215-1217.

Fride, E. (2005) Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Current Drug Targets*, 4, 633-642.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry*, 232, 54-61

Ghilardi JR, Allen CJ, Vigna SR, McVey DC, Mantyh PW. (1992) Trigeminal and dorsal root ganglion neurons express CCK receptor binding sites in the rat, rabbit, and monkey: possible site of opiate-CCK analgesic interactions. *Journal of Neuroscience*, 12, 4854-66.

Goodman RR, Snyder SH, Kuhar MJ, Young WS 3rd. (1980) Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A.*, 77, 6239-43.

Hohmann AG, Martin WJ, Tsou K, Walker JM. (1995) Inhibition stimulus-evoked activity of spinal cord dorsal horn neurons by the cannabinoid WIN 55,212-2. *Life Sciences*, 56, 2111-8.

Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. (1998) Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2. *Neuroscience Letters*, 257, 119-22.

Hohmann AG, Herkenham M. (1999) Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience*, 90, 923-31.

Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J.F., Walker, J.M., Holmes, P.V., Crystal, J.D., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D. (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, 435, 1108-1112.

Kandel ER, Squire LR. (2000) Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science*, 290, 1113-20.

- Kurrikoff, K., Koks, S., Matsui, T., Bourin, M., Arend, A., Aunapuu, M., Vasar, E. (2004) Deletion of the CCK2 receptor gene reduces mechanical sensitivity and abolishes the development of hyperalgesia in mononeuropathic mice. *The European Journal of Neuroscience*, 20, 1577-1586.
- Lavigne GJ, Millington WR, Mueller GP. (1992) The CCK-A and CCK-B receptor antagonists, devazepide and L-365,260, enhance morphine antinociception only in non-acclimated rats exposed to a novel environment. *Neuropeptides*, 21, 119-29.
- Loh HH., Smith AP., (1989) Molecular characterization of opioid receptors, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 123–147.
- Mansour, A., Watson SJ, (1993) Anatomical distribution of opioid receptors in mammalian: an overview. In A.Hertz (ed.), *Opioids I*, 104/1 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 79–105.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-4.
- Marsicano, G., Lutz, B. (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *The European Journal of Neuroscience*, 11, 4213-4225.
- Martin WJ, Hohmann AG, Walker JM. (1996) Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: correlation between electrophysiological and antinociceptive effects. *Journal of Neuroscience*, 16, 6601-11.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-5.
- Nagata, A., Ito, M., Iwata, N., Kuno, J., Takano, H., Minowa, O., Chihara, K., Matsui, T., Noda, T. (1996) G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 11825-11830.
- Noble F, Blommaert A, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. (1995) A selective CCKB receptor antagonist potentiates, mu-, but not delta-opioid receptor-mediated antinociception in the formalin test. *European Journal of Pharmacology*, 273, 145-51.
- Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP (1999). International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacological Reviews*, 51, 745-81.
- Noble, F., Roques, B.P. (1999) CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Progress in Neurobiology*, 58, 349-379.
- Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews in Neurosciences*, 4, 873-84.
- Pommier, B., Beslot, F., Simon, A., Pophillat, M., Matsui, T., Dauge, V., Roques, B.P., Noble, F. (2002) Deletion of CCK2 receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. *Journal of Neuroscience*, 22, 2005-2011.
- Runkorg, K., Veraksits, A., Kurrikoff, K., Luuk, H., Raud, S., Abramov, U., Matsui, T., Bourin, M., Koks, S., Vasar, E. (2003) Distinct changes in the behavioural effects of morphine and naloxone in CCK2 receptor-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, 144, 125-135.

Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 142, 278-87.

Spanagel, R., Herz, A., Shippenberg, T.S. (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 2046-2050.

Stanfa, L., Dickenson, A., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z. (1994) Cholecystokinin and morphine analgesia: variations on a theme. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15, 65-66.

Sugiura, T., Waku, K. (2000) 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chemistry and physics of lipids*, 108, 89-106.

Suplita, R.L., 2nd, Gutierrez, T., Fegley, D., Piomelli, D. & Hohmann, A.G. (2006) Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia. *Neuropharmacology*, 50, 372-379.

Takagi H, Satoh M, Akaike A, Shibata T, Kuraishi Y. (1977) The nucleus reticularis gigantocellularis of the medulla oblongata is a highly sensitive site in the production of morphine analgesia in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 45, 91-2.

Terman, G.W., Lewis, J.W., Liebeskind, J.C. (1986) Two opioid forms of stress analgesia: studies of tolerance and cross-tolerance. *Brain Research*, 368, 101-106.

Tsou K, Lowitz KA, Hohmann AG, Martin WJ, Hathaway CB, Bereiter DA, Walker JM. (1996) Suppression of noxious stimulus-evoked expression of Fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord by a selective cannabinoid agonist. *Neuroscience*, 70, 791-8.

Vanderah TW, Lai J, Yamamura HI, Porreca F. (1994) Antisense oligodeoxynucleotide to the CCKB receptor produces naltrindole- and [Leu5]enkephalin antiserum-sensitive enhancement of morphine antinociception. *Neuroreport*, 5, 2601-5.

Veraksitš, A., Runkorg, K., Kurrikoff, K., Raud, S., Abramov, U., Matsui, T., Bourin, M., Koks, S., Vasar, E. (2003) Altered pain sensitivity and morphine-induced antinociception in mice lacking CCK2 receptors. *Psychopharmacology*, 166, 168-175.

Walker, J.M., Hohmann, A.G. (2005) Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 509-554.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*, 96, 5780-5.