

TARTU ÜLIKOOL

Arstiteaduskond

Füsioloogia instituut

URHO ABRAMOV

**ETANOOLI SOOST TINGITUD EFEKTID CCK₂ RETSEPTORI
PUUDULIKKUSEGA HIIRTELE**

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendaja: prof. E. Vasar

Tartu 2006

SISUKORD

LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. CCK ja selle retseptorid kesknärvisüsteemis	6
1.2. CCK2R puudulikkusega hiirte lühiiseloostus	7
1.3. CCK ja etanool	8
2. TÖÖ EESMÄRGID	9
3. MATERJALID JA MEETODID	10
3.1. Katseloomad	10
3.2. Etanool	10
3.3. Käitumise uurimine	11
3.4. Tõstetud pluss-puur	11
3.5. Liikumisaktiivsuse test	12
3.6. Püstumisrefleksi kadumise test	12
3.7. Etanooli tarbimise test	12
3.8. Maitse-eelistus	13
3.9. Vere etanooli kontsentratsioonid	13
3.10. Statistiline analüüs	14
4. TULEMUSED	15
4.1. Tõstetud pluss-puur	15
4.2. Liikumisaktiivsuse test	16
4.3. Püstumisrefleksi kadumise test	18
4.4. Vere etanooli kontsentratsioonid	19
4.5. Etanooli eelistus ja tarbimine	20
4.6. Vedeliku ja toidu tarbimine ning kehakaalu muutused etanooli tarbimise katse ajal	20
4.7. Maitse-eelistus	22
5. TULEMUSTE ARUTELU	23
JÄRELDUSED	27
ABSTRACT	29
KIRJANDUS	30
TÄNUAVALDUSED	35
Lisa 1 – publitseeritud artikli äratrük	36

LÜHENDID

CCK	Koletsüstokiniin (<i>cholecystokinin</i>)
CCK1R	Esimest tüüpi koletsüstokiniini retseptor
CCK2R	Teist tüüpi koletsüstokiniini retseptor
CCK-8(S)	Koletsüstokiniini oktapeptiid (sulfateeritud)
D2R	Dopamiini teist tüüpi retseptor
GABA	Gamma-aminovõihape
PCR	Polümeraasi ahelreaktsioon
SEM	Keskmete väärtuste standardviga (<i>standard error of the mean</i>)

SISSEJUHATUS

Koletsüstokiniin (CCK) on peptiidse struktuuriga neurohormoon, mis algselt avastati seedetraktis. CCK vabaneb kaksteistsõrmiksoole limaskestast endokriinrakkudest valku ja rasvu sisaldavate seedeproduktide mõjul. CCK toimet sapipõis tõmbub kokku ning toimub sapi eritumine soolde. Samuti põhjustab CCK kõhunäärme ensüümide rikka seedenõre eritumise ning CCK osaleb ka uitnärvi vahendusel küllastustunde tekkes.

Esmakordselt kirjeldati CCK imetajate kesknärvisüsteemis 1975. aastal (Vanderhaegen jt, 1975). Hiljem on selgunud, et koletsüstokiniin on üks levinuimaid neuropeptiide ajus. CCK on lineaarne peptiid, mille bioloogiliselt aktiivsed vormid sünteesitakse pre-proCCK-st. Pre-proCCK töödeldakse proteolüütiliselt ning selle tulemusel saadakse erineva pikkusega peptiide, millel on samasugune C-terminaalne osa. CCK peptiidide pikkused varieeruvad 4-st kuni 58 aminohappeni. Maksimaalse bioloogilise aktiivsuse avaldamiseks peab CCK C-terminaalselt seitsmes aminohape türosiini olema sulfateeritud. Kesknärvisüsteemis on levinuimaks vormiks sulfateeritud oktapeptiid (CCK-8S).

CCK avaldab mõju, toimides kahte tüüpi retseptoritele: CCK1R ja CCK2R. Mõlemad retseptorid kuuluvad G-valk seoseliste retseptorite perekonda ning omavad 7 transmembraanset domääni. CCK1R omab suurt afiinsust CCK-8s suhtes, teiste CCK-ga seotud peptiidide ja gastriini afiinsus nende retseptorite suhtes on oluliselt väiksem. CCK1R esinevad põhiliselt perifeersetes organites, valdavalt seedetraktis. Erinevalt CCK1 retseptoritest omavad CCK2 retseptorid suurt afiinsust erinevate CCK-ga seotud peptiidide ja gastriini suhtes. CCK2R leidub kõige rohkem kesknärvisüsteemis, kuid CCK2R on ka gastriini toimet vahendavaks retseptoriks maos (Noble jt, 1999).

CCK osaleb kesknärvisüsteemis mitmete käitumuslike protsesside regulatsioonis. On näidatud CCK osalust ärevuse, stressiga seotud käitumise, toitumise, valutundlikkuse, mälu ja naudinguga seotud käitumiste mehhanismides (Crawley ja Corwin, 1994; Dauge ja Lena, 1998; Rotzinger ja Vaccarino, 2003). CCK füsioloogilistes toimetes on olulisel kohal moduleeriv interaktsioon teiste klassikaliste neurotransmitteritega nagu dopamiin, GABA ja endogeensed opioidid (Crawley, 1995).

Käesolevas töös uuritakse akuutselt manustatud etanooli toimet CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirte käitumisele, samuti aga selle mutatsiooni efekti etanooli

tarbimisele. Käitumist uuritakse pluss-puuri testi, liikumisaktiivsuse testi ja püstamisrefleksi kaotamise testiga. Samuti mõõdetakse CCK2R puudulikkusega hiirtel etanooli vere kontsentratsioone. Kasutatakse nii emaseid kui isaseid katseloomi, kuna eelnevatest töödest on teada, et CCK2R geneetilise väljalülitamise poolt põhjustatud fenotüüp on sõltuv soost. Käesolev väitekiri baseerub artiklil „Gender specific effects of ethanol in mice, lacking CCK₂ receptors“, mis on kättesaadav alates 12. septembrist 2006.a. ajakirja Behavioural Brain Research interneti väljaandes.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. CCK ja selle retseptorid kesknärvisüsteemis

Imetajate kesknärvisüsteemis võib CCK leida enamikus aju piirkondades, välja arvatud väikeaju (Rehfeld jt., 1992). CCK leidub peentes närvilõpmetes kõigis neokorteksi 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. Mõõdukamalt esineb CCK-ergilisi neuroneid septumi lateraalsetes tuumades, periakveduktaalses hallaines, keskajus ja *area postrema* piirkonnas.

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.

CCK interakteerub kahte tüüpi retseptoritega – CCK1R ja CCK2R. Nii CCK1R kui ka CCK2R puhul on tegemist G-valk seoseliste retseptoritega. CCK1R rakusiseseid vahendussmekhanisme on uuritud peamiselt pankrease aatsinuse-rakkudel ja on leitud, et see retseptorvalk on seotud G_q , G_{11} või G_s valguga. CCK2R rakusisestest mekhanismidest on teada vähem, kuid on võimalik, et CCK2R on samuti seotud G_q , G_{11} või G_s valguga ja vastavate rakusiseste signalisatsiooniradadega (Noble jt, 1999).

Kesknärvisüsteemis esineb valdavalt CCK2R. CCK2R spetsiifiliste radioligandide sidumiskatsete järgi on teada, et CCK2R esineb näriliste eesaju sellistes struktuurides nagu haistmissibulad, haistmistuumad, mandelkeha (*amygdala*), neokorteksi III ja IV kiht, naalduv tuum (*nucleus accumbens*), juttkeha ning hipokampused. Vaheajus leidub CCK2R nii taalamuse kui ka hüpotaalamuse erinevates tuumades. Keskajus esineb CCK2R mustolluses (*substantia nigra*), ülemistes ja alumistes künkakestes (*colliculi superiores et inferiores*), selgmises õmbluses (*raphe dorsales*) ja ajuveejuha ümbritsevas hallaines (*substantia grisea periaqueductalis*).

CCK1R leidub kesknärvisüsteemis oluliselt vähem. CCK1R paiknemise kohtadeks on *area postrema*, *nucleus interpeduncularis*, *nucleus medialis tracti*

solitarii, *amygdala centralis* ja hüpotaalamus. CCK1R mRNA on muuhulgas leitud ka hipokampuses ning *nucleus accumbens*'is (Noble jt, 1999).

1.2. CCK2R puudulikkusega hiirte lühiiseloostus

CCK2R puudulikkusega hiired loodi Nagata ja kolleegide poolt homoloogse rekombinatsiooni teel, asendades CCK2R genoomses DNAs osa teist, kolmandat, neljandat ja viiendat eksonit (1996). Mutatsiooni tulemusena jääb alles 109 aminohappeline lõik CCK2R, mis aga ei ole funktsionaalne. 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 (+/+) pesakonnakaaslaste kehakaalust. Järgnevalt loetletud töödes on valdavalt uuritud mutatsiooni suhtes homosügootseid (-/-), kuid vahel ka heterosügootseid (+/-) CCK2R puudulikkusega hiiri. Kontrollrühmana on kasutatud samasoolisi ja samaealise mutatsioonita pesakonnakaaslast (+/+).

Homosügootsetel hiirtel (-/-) ei ole leitud CCK2R mRNA mao limaskestas, peaaegu koostes ega basaalganglionides. CCK1R mRNA tase ei ole selle mutatsiooni tõttu oluliselt mõjutatud. Radioligandi sidumiskatsetes on leitud, et homosügootsete hiirte (-/-) ajukoos ei sisaldu CCK-8 spetsiifilisi sidumiskohti.

Eelnevad uuringud on näidanud, et isastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel esineb suurenenud dopamiini D2R tundlikkus juttkehas ning dopamiinergiliste ainete efekt on modifitseeritud (Dauge jt, 2001; Kõks jt, 2001). CCK2R puudulikkusega isastel hiirtel on langenud dopamiini D2R mRNA ekspressioon ning D2R valk mesolimbilistes struktuurides (Rünkorg jt, 2006; Miyasaka jt, 2005). Samuti on CCK2R puudulikkusega isastel (-/-) hiirtel kirjeldatud muutust opioid-ergiliste ainete toimes, mille põhjuseks on muutused opioid-ergilises süsteemis (Dauge jt, 2001; Pommier jt, 2002; Rünkorg jt, 2003; Veraksits jt, 2003). Teisest küljest, emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-) on näidatud GABA-ergiliste ainete toime muutust ning muutusi GABA-ergilises süsteemis (Raud jt, 2003; 2005).

Miyasaka ja kolleegid (2005) kirjeldasid isaste CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirte alkoholi tarbimist, kuid ei leidnud erinevust võrreldes metsikut tüüpi pesakonnakaaslastega (+/+). Tasub märkida, et Abramov ja kolleegid (2004) näitasid, kasutades sotsiaalse isolatsiooni mudelit, et CCK2R geneetiline väljalülitamine põhjustab soost sõltuvat fenotüüpi.

1.3. CCK ja etanool

CCK on seotud hüvitusmehhanismide regulatsiooniga (Rotzinger ja Vaccarino, 2003). Mitmetes uuringutes on näidatud, et CCK vähendab närilistel alkoholi tarbimist ja eelistust (DiBattista jt, 2003; Geary jt, 2004; Kulkosky, 1996; Toth jt, 1990). On näidatud, et CCK avaldab alkoholi tarvitamist vähendavat toimet CCK1R kaudu (Crespi, 1998; Crespi jt, 1997; Miyasaka jt, 2005). CCK2R kohta käivad andmed seoses alkoholi tarvitamisega on olnud vastuolulised. Crespi (1998) andmetel CCK2R antagonistid ei mõjuta alkoholi joomist rottidel. Etanooli tarvitamist uuriti hiljuti isastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel ning ei leitud olulisi erinevuse võrreldes metsikut-tüüpi pesakonnakaaslastega (+/+) (Miyasaka jt, 2005). Samas Little ja kolleegid (1999) ning Croft ja kolleegid (2005) näitasid, et CCK2R antagonistid vähendavad stressist tingitud alkoholi eelistust hiirtel. Teisest küljest on näidatud ka, et krooniline etanooli tarvitamine põhjustab muutusi CCK-ergilises süsteemis (Harro jt, 1994; Weatherford jt, 1993) ning et CCK2R võivad mängida osa etanooli võõrutusega kaasnevas ärevuses ning krampides (Costall jt, 1991; Wilson ja Little, 1998; Wilson jt, 1998). Kui jätta kõrvale CCK toime etanooli tarbimisele, ei ole CCK ning akuutse etanooli manustamise interaktsiooni käitumisele süstemaatiliselt uuritud.

2. TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva uuringu eesmärgiks oli uurida CCK süsteemi toimet etanoolist tingitud käitumisele, kasutades selleks CCK2R puudulikkusega hiiri. Seejuures seati ülesandeks vastata järgmistele küsimustele:

1. Kuidas mõjutab CCK2R geneetiline väljalülitamine etanooli toimet katseloomade ärevusele?
2. Kuidas mõjutab CCK2R geneetiline väljalülitamine etanooli toimet katseloomade liikumisaktiivsusele?
3. Kuidas mõjutab CCK2R geneetiline väljalülitamine etanooli sedatiivset toimet katseloomadel?
4. Kuidas mõjutab CCK2R geneetiline väljalülitamine katseloomade etanooli tarbimist ning eelistamist?
5. Kas CCK2R geneetiline väljalülitamine mõjutab katselooma maitse-eelistust?
6. Kas CCK2R geneetiline väljalülitamine mõjutab katseloomal etanooli kineetikat?
7. Kas CCK2R geneetilise väljalülitamise mõju on eelloetletud funktsioonides katselooma soost sõltuv?

3. MATERJALID JA MEETODID

3.1. Katseloomad

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

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

Katsetes kasutati isaseid ja emaseid mutatsiooni suhtes homosügootseid (-/-) CCK2R puudulikkusega hiiri ning kontrollrühmana mõlemast soost metsikut tüüpi (+/+) hiiri, kes olid homosügootsete (-/-) loomade pesakonnakaaslased. Katseloomade vanus oli 90 päeva. Emaseid mutantseid hiiri ristati paljundamise käigus kuus korda C57Bl/6 hiireliinist pärit isastega, et vähendada 129sv liini geneetilist mõju. Igas katses kasutatud loomade täpne arv on toodud meetodite vastava osa kirjelduse juures.

Loomade eluruumis oli õhutemperatuur pidevalt $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, kasutati valge ja pimedada perioodi vaheldumise 12-tunnist tsüklit (valgus lülitati sisse 07:00 hommikul). Joogivesi tilgapudelitest ja granuleeritud spetsiaaltoit oli loomadele pidevalt piiramatul koguses kättesaadav. Kõik loomadega teostatud protseduurid olid heaks kiidetud Tartu Ülikooli Loomkatsete Eetika Komitee poolt, olles kooskõlas 24. novembril 1986.a. välja antud Euroopa Ühenduse direktiiviga 86/609/EEC.

3.2. Etanool

Käitumiskatsetes kasutatav etanooli lahus saadi 96 % etanooli vesilahuse lahustamisel steriilses, pürogeenivabas 0.9% NaCl lahuses (füsioloogiline lahus, *B. Braun Melsungen AG*). Annuste 0.5 ja 1.0 g/kg manustamiseks katseloomale kasutati 10 % etanooli lahust ning annuste 2.0 ja 4.0 g/kg manustamiseks kasutati 20 % etanooli lahust. Kontroll-lahusena kasutati füsioloogilist lahust. Lahused süstiti katseloomadele intraperitoneaalselt (i.p.) mahus 10 ml/kg (välja arvatud 5 ml/kg 0.5

g/kg ja 20 ml/kg 4.0 g/kg annuse korral). Alkoholi tarbimiskatses kasutatav etanooli lahus saadi 96 % etanooli lahustamisel katseloomade joogiveega 3, 6 või 10 % lahuseks.

3.3. Käitumise uurimine

Katseloomad toodi katseruumi kohanema 1 tund enne katse algust. Kõik katsed viidi läbi päeval kella 14:00 ja 19:00 vahel, katsed kestsid ~5 tundi järjest. Kõik uuringud toimusid randomiseeritult ning alati uuriti kontrollrühma (+/+) hiiri paralleelselt homosügootsete (-/-) hiirtega, samuti isaseid loomi paralleelselt emastega. Kõigis katsetes kasutati hiiri, kes polnud eelnevalt osalenud käitumiskspereimentides ega olnud eksponeeritud etanoolile. Etanooli tarbimise katses kasutati samuti hiiri, kes ei olnud osalenud käitumiskatsetes ega olnud kokku puutunud etanooliga. Erandiks oli maitse-eelistuse test, kus kasutati eelnevalt etanooli tarbimise katses osalenud loomi.

3.4. Tõstetud pluss-puur

Hiirte tõstetud pluss-puur on roti pluss-puuri (Handley ja Mithani, 1984) vähendatud koopia. Pluss-puur koosneb kahest seinteta avatud õlast (17.5 cm × 5 cm) ning kahest samamõõtmelisest suletud õlast, mis on külgedelt ja otsast ääristatud 14 cm kõrguse seinaga. Et hinnata katselooma uudistamisaktiivsust, jaotati avatud õlad joontega kolme võrdsesse ossa. Kogu pluss-puuri seade oli tõstetud 30 cm kõrgusele ning paigutatud eredalt valgustatud ruumi (valguse tugevus avatud õlgadel ~500 lux). Katsesessioonid salvestati videolindile. Selleks kasutati videokaamerat, mis oli riputatud 50 cm kõrgusele pluss-puuri kohale. Katse analüüsi teostas vaatleja, kes ei olnud teadlik katse tingimustest. Peale igat testi puhastati pluss-puur hoolikalt 5 % etanooli vesilahusega ning seejärel kuivatati. Standardse 5-minutilise jälgimisperioodi jooksul (Lister, 1987) mõõdeti järgmised parameetrid: avatud õlgadele väljumiste arv kordades, avatud õlgadel veedetud aeg (s), avatud ja suletud õlgade külastuste koguarv kordades, avatud õlgade ja kõigi õlgade külastuste suhe, avatud õlgadel pealangetamiste arv kordades, avatud õlgade joonte ületamiste arv kordades. Avatud õlgadel veedetud aeg, avatud õlgadele väljumiste arv ning avatud õlgadele väljumiste ja kõikide õlgade külastuste koguarvu suhe on tavalised ärevust peegeldavad parameetrid pluss-puuris (Lister, 1987). Kasutati kolme etanooli annust (0.5, 1.0 ja

2.0 g/kg). Etanool süstiti katseloomadele kõhuõõnde 20 min enne eksperimendi algust. Igas rühmas oli katseloomade arv 8-10.

3.5. Liikumisaktiivsuse test

Liikumisaktiivsuse hindamiseks kasutati spetsiaalset fotoelektrilist jälgimise süsteemi, mis oli ühendatud arvutiga (*TSE Technical & Scientific Equipment GmbH*, Saksamaa). Hiired asetati läbipaistvatesse pleksiklaasist kastidesse (448 mm × 448 mm × 450 mm), milles infrapunased kiired moodustasid kahe-tasapinnalise võrgustiku. Kiirte katkemise järgi toimus katselooma asukoha määramine ruumis ja ajas. Liikumisaktiivsuse parameetrid registreeriti automaatselt spetsiaalse arvutiprogrammi abil. Kastide sisemuses oli valguse tugevuseks ~400 lux. Peale igat testi, kui katseloom võeti kastist välja, puhastati kast hoolikalt 5 % etanooli vesilahusega ning seejärel kuivatati. 30 minutilise jälgimisperioodi jooksul mõõdeti järgmised liikumisaktiivsust iseloomustavad parameetrid: liikumisaeg (s), läbitud vahemaa (m), tagajalgadele tõusude arv kordades. Kasutati kolme etanooli annust (0.5, 1.0 ja 2.0 g/kg). Etanool süstiti katseloomadele kõhuõõnde 20 min enne eksperimendi algust. Igas rühmas oli katseloomade arv 10-12.

3.6. Püstumisrefleksi kadumise test

Katseloomadele süstiti intraperitoneaalselt etanooli annuses 4.0 g/kg. Etanoolist tingitud sedatsiooni tekkides (püstamisrefleksi kadumine) asetati katseloom selili asendis V-kujulisse paberrenni. Mõõdeti järgmised parameetrid: aeg püstumisrefleksi kadumiseni (s.) ning aeg püstumisrefleksi taastumiseni (min.). Püstumisrefleks loeti taastunuks, kui katseloom püstus kõigile neljale kápale 3 korda 30 s jooksul. Püstumisrefleksi taastumise hetkel võeti katselooma saba lateraalveenist vereanalüüs alkoholi verekontsentratsiooni määramiseks. Katseloomade arv igas rühmas oli 14-15.

3.7. Etanooli tarbimise test

Etanooli tarbimise ja eelistuse, kuid ka maitse-eelistuse mõõtmiseks kasutati 50-milliliitriseid plastmassist katseklaase, mille otsad olid ära lõigatud. Tuubide lekkekadu kontrolliti 7 päeva jooksul ning edasised arvutused olid vastavalt sellele kohandatud. Kogu katse vältel mõõdeti kogu vedeliku ja toidu tarbimine ning katseloomade kehakaalu muutused. Mõõtmised teostati 7 päevaste vahedega.

Katseloomade arv igas rühmas oli 15. Seitse päeva enne katse algust majutati loomad individuaalsetesse puuridesse ning neil lasti selle aja jooksul harjuda joomisega kahest tuubist, milles oli joogivesi. Seejärel vahetati ühes tuubis vesi alkoholilahuse vastu, nii et katseloomal oli ööpäevaringne ligipääs kahele tuubile, millest üks sisaldas puhast vett ning teine alkoholilahust. Etanoolilahuse kontsentratsiooni (maht/maht) suurendati iga 7 päeva vältel. Alustati 3 % alkoholilahusega, millele järgnes 6 % ning 10 % lahus. Tuubide asetused olid tasakaalustatud rühmade vahel ning asetust muudeti iga 2 päeva järel, et vältida asendieelistuse teket. Keskmise etanooli tarbimine (arvutatuna grammides kehakaalu kilogrammi kohta päevas) saadi iga etanooli lahuse kontsentratsiooni kohta, kui kaaluti tuube enne ekspositsiooni algust ja pärast selle lõppu. Etanooli eelistus saadi jagades tarvitatud etanooli lahuse hulk kogu tarvitatud vedeliku (vesi pluss etanooli lahus) hulga. Toidu tarbimist mõõdeti kord nädalas iga ekspositsiooni ajal erinevale etanooli lahusele ning seda arvutati grammides kehakaalu kilogrammi kohta päevas. Nähtavad toidukaod koguti, kaaluti ning saadud tulemusi kasutati edasistes kalkulatsioonides.

3.8. Maitse-eelistus

10 päeva pärast etanooli tarbimise testi lõppu võimaldati katseloomadele juurdepääs kahele pudelile, millest üks sisaldas tavalist joogivett ning teine sahharoosi või kiniini lahust. Maitseained esitati järgnevas järjestuses: sahharoosi lahus (esmaolt 1.7 %, siis 4.3 %), millele järgnes kiniini lahus (esmaolt 0.03 mM, siis 0.10 mM). Ekspositsioon igale lahusele kestis 48 tundi, lahuste asetused olid gruppide vahel tasakaalustatud ning pudelite asetust vahetati iga 24 tunni järel. Iga maitselahuse puhul mõõdeti eelistus tavalise joogivee suhtes (%).

3.9. Vere etanooli kontsentratsioonid

Vere etanooli kontsentratsioonide määramiseks võeti katselooma sabaveenist 5 mikrolitrit verd 30, 60, 120 ja 240 min. pärast etanooli süstimist kõhuõõnde. Erinevatele katserühmadele manustati etanooli annuses 2.0 või 4.0 g/kg. Vereproovid analüüsiti kohehelt ensümaatilise värvitesti teel (LKM 139), kasutades minifotomeetrit LP 20 (*Dr. Bruno Lange GmbH*, Saksamaa) vastavalt tootja juhistele. Igas rühmas oli 6 looma.

3.10. Statistiline analüüs

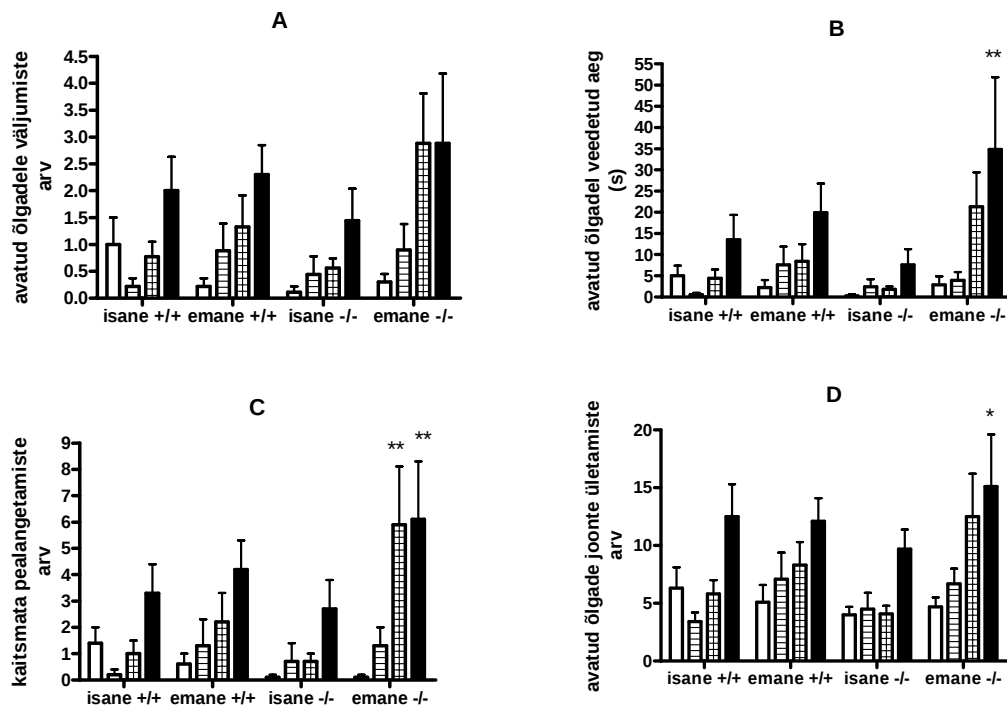
Tulemused väljendati keskmiste väärtustena ja nende standardveana ($\pm$ SEM). Plusspuuri ning liikumisaktiivsuse testi tulemusi analüüsiti kolmesuunalise sõltumatute rühmade variatsiooni analüüsiga (genotüüp $\times$ sugu $\times$ etanooli annus). Püstamisrefleksi kaotuse testi tulemusi analüüsiti kaheasuunalise sõltumatute rühmade variatsiooni analüüsiga (genotüüp $\times$ sugu). Etanooli tarbimise ja maitse-eelistuse testi tulemuste analüüsiks kasutati kolmesuunalist variatsiooni analüüsi (genotüüp $\times$ sugu $\times$ etanooli kontsentratsioon), kus genotüüp ning sugu olid katseloomade vahelised muutujad ning etanooli kontsentratsioon oli individuaalse katseloomaga seotud muutuja. Neljasuunalist variatsiooni analüüsi (genotüüp $\times$ sugu $\times$ etanooli annus $\times$ aeg), kus genotüüp, sugu ning etanooli annus olid katseloomade vahelised muutujad ning aeg individuaalse katseloomaga seotud muutuja, kasutati etanooli verekontsentratsioonide analüüsimiseks. Eri gruppide tulemuste *post hoc* võrdlus teostati *Tukey HSD* testiga (võrdse või ebavõrdse suurusega valimite jaoks) Windows'il põhineva *Statistica* tarkvara abil.

4. TULEMUSED

4.1. Tõstetud pluss-puur

1. *Avatud õlgadele väljumiste arv.* Kolmesuunaline variatsiooni analüüs näitas statistiliselt olulist etanooli ($F(3,129)=9.12$ $p<0.001$) ning soost tingitud ($F(1,129)=5.94$ $p<0.05$) efekti. *Post hoc* võrdlus ei näidanud olulisi erinevusi gruppide vahel, kuid emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-) esines tendents väljumiste arvu tõusu suunas doosides 1.0 g/kg ($p=0.09$) ja 2.0 g/kg ($p=0.09$) (Joonis 1A).
2. *Aeg avatud õlgadel.* Esines statistiliselt oluline etanooli manustamise ($F(3,129)=8.03$ $p<0.001$) ning soost tingitud ($F(1,129)=9.57$ $p<0.01$) efekt. Suurim kasutatud etanooli annus (2.0 g/kg) põhjustas statistiliselt olulise ($p<0.01$) avatud õlgadel viibitud aja pikenemise emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel. Sellist toimet ei ilmnenu üheski teises uuritud rühmas (Joonis 1B).
3. *Avatud ja suletud õlgade külastuste koguarv.* Kolmesuunaline variatsiooni analüüs näitas olulist soost tingitud ($F(1,129)=5.48$ $p<0.05$), kuid mitte etanooli efekti. Etanooli manustamine ei mõjutanud kõigi õlgade külastuste koguarvu üheski rühmas (andmeid ei ole esitatud).
4. *Avatud õlgade ja kõigi õlgade külastuste suhe.* Leiti oluline etanooli ($F(3,129)=10.92$ $p<0.001$) ja soost tingitud ($F(1,129)=4.50$ $p<0.05$) efekt, kuid *post hoc* võrdlus ei tuvastanud olulisi erinevusi rühmade vahel (andmeid ei ole esitatud).
5. *Avatud õlal pealangetamiste arv.* Ilmnes statistiliselt oluline etanooli manustamise ($F(3,129)=10.91$ $p<0.001$) ja soost tingitud ($F(1,129)=8.81$ $p<0.01$) efekt, ent samuti arvestatav tendents etanooli manustamine $\times$ soo interaktsiooni efekti puhul ($F(3,129)=2.62$ $p=0.053$). Etanooli manustamine oluliselt tõstis pealangetamiste arvu emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel annustes 1.0 g/kg ($p<0.01$) ja 2.0 g/kg ($p<0.01$). Sellist efekti ei esinenud teistes uuritud rühmades (Joonis 1C).
6. *Joonte ületamiste arv.* Leiti oluline etanooli manustamise ($F(3,129)=11.21$ $p<0.001$) ja soost tingitud ($F(1,129)=7.10$ $p<0.01$) efekt. Etanool annuses 2.0 g/kg põhjustas olulise ($p<0.05$) joonte ületamiste arvu suurenemise ainult emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-), kuid mitte nendel metsikut-tüüpi

pesakonnakaaslastel (+/+) ega kummagi genotüübi isastel katseloomadel (Joonis 1D).



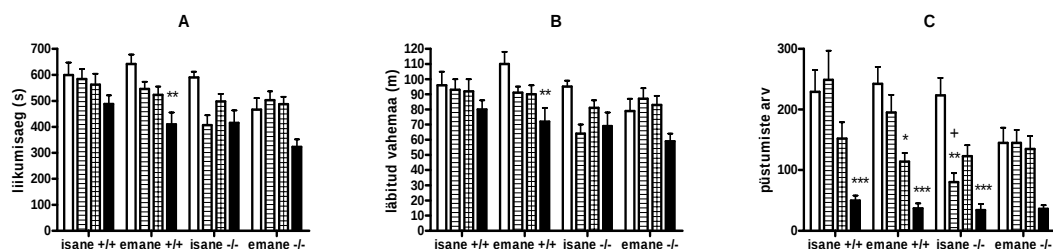
Joonis 1. Etanooli (0.5, 1.0 ja 2.0 g/kg) toime isaste ja emaste CCK2R puudulikkusega hiirte käitumisele tõstetud pluss-puuris (N=8-10 igas rühmas). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: *Tukey HSD* test, etanooli annuse toime võrreldes füsioloogilise lahusega vastavas rühmas. Valged tulbad: füsioloogiline lahus; triibulised tulbad: etanool 0.5 g/kg; viirutatud tulbad: etanool 1.0 g/kg; mustad tulbad: etanool 2.0 g/kg.

4.2. Liikumisaktiivsuse test

1. *Liikumisaeg*. Kolmesuunaline variatsiooni analüüs näitas statistiliselt olulist genotüübi ($F(1,167)=20.46$ $p < 0.001$), etanooli manustamise ($F(3,167)=13.85$ $p < 0.001$) ja genotüüp $\times$ sugu $\times$ etanooli manustamise interaktsiooni ($F(3,167)=2.82$ $p < 0.05$) efekti. Suurimas kasutatud annuses (2.0 g/kg) põhjustas etanool olulise motoorika pärssumise ainult emastel metsikut-tüüpi hiirtel (+/+) ($p < 0.01$). Tasub märkida, et emaste CCK2R puudulikkusega hiirte (-/-) füsioloogilist lahust saanud kontrollrühma aktiivsus kaldus olema madalam ($p = 0.07$) kui vastava rühma emaste metsikut-tüüpi (+/+) hiirte oma. Isastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-), erinevalt nende metsikut-tüüpi

pesakonnakaaslastest (+/+), põhjustas etanooli annuste 0.5 g/kg ja 2.0 g/kg manustamine tendentsi liikumisaja vähenemise suunas (vastavalt $p=0.08$ ja $p=0.07$) (Joonis 2A).

2. *Läbitud vahemaa*. Esinesid statistiliselt olulised genotüübi ($F(1,167)=15.50$ $p<0.001$), etanooli manustamise ($F(3,167)=9.49$ $p<0.001$) ja genotüüp $\times$ sugu $\times$ etanooli manustamise interaktsiooni ($F(3,167)=2.94$ $p<0.05$) efektid. Etanool annuses 2.0 g/kg vähendas oluliselt läbitud vahemaad emastel metsikut-tüüpi (+/+) hiirtel ($p<0.01$) (Joonis 2B). Jällegi, emaste CCK2R puudulikkusega hiirte (-/-) baasaktiivsus kaldus olema madalam kui nende metsikut-tüüpi pesakonnakaaslastel (+/+) ($p=0.09$). Isastel hiirtel, sõltumata genotüübist, etanooli manustamine ei mõjutanud oluliselt läbitud vahemaad.
3. *Tagajalgadele tõusude arv*. Kolmesuunaline variatsiooni analüüs näitas statistiliselt olulist genotüübi ($F(1,167)=12.76$ $p<0.001$), etanooli manustamise ($F(3,167)=35.40$ $p<0.001$), genotüüp $\times$ etanooli manustamise interaktsiooni ($F(3,167)=4.11$ $p<0.01$) ja genotüüp $\times$ sugu $\times$ etanooli manustamise interaktsiooni ($F(3,167)=3.22$ $p<0.05$) efekti. Etanooli manustamine annuses 2.0 g/kg põhjustas olulist tagajalgadele tõusude arvu langust kõigis rühmades, välja arvatud emased CCK2R puudulikkusega (-/-) hiired. Emastel metsikut-tüüpi hiirtel (+/+) ilmnes sama toime ka annusel 1.0 g/kg ($p<0.05$) ning isastel CCK2R puudulikkusega hiirtel annusel 0.5 g/kg ($p<0.01$) (Joonis 2C). Etanooli väikse annuse (0.5 g/kg) poolt põhjustatud tagajalgadele tõusude arvu langus isastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-) oli statistiliselt oluline võrreldes sama annust saanud isaste metsikut-tüüpi (+/+) hiirtega ($p<0.001$) (Joonis 2C).



Joonis 2. Etanooli (0.5, 1.0 ja 2.0 g/kg) toime liikumisaktiivsusele isastel ja emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (N=10-12 igas rühmas). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, ***

$p < 0.001$: *Tukey HSD* test, etanooli annuse toime võrreldes füsioloogilise lahusega vastavas rühmas. + $p < 0.001$: etanooli annuse 0.5 g/kg statistiliselt oluliselt erinev toime isastele metsikut-tüüpi (+/+) ja isastele CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtele. Valged tulbad: füsioloogiline lahus; triibulised tulbad: etanool 0.5 g/kg; viirutatud tulbad: etanool 1.0 g/kg; mustad tulbad: etanool 2.0 g/kg.

4.3. Püstumisrefleksi kadumise test

1. *Aeg püstumisrefleksi kadumiseni.* Kahesuunaline variatsiooni analüüs ei näidanud olulist genotüübi ega soo efekti püstumisrefleksi kadumisele.
2. *Aeg püstumisrefleksi taastumiseni.* Ajas püstumisrefleksi taastumiseni ei ilmnenud olulist genotüübi või soo efekti.
3. *Vere etanooli kontsentratsioonid püstumisrefleksi taastumishetkel.* Kahesuunalise variatsiooni analüüsiga leiti oluline genotüübi ($F(1,54)=22.82$ $p < 0.001$) ja genotüüp $\times$ sugu interaktsiooni efekt ($F(1,54)=4.47$ $p < 0.05$). Vere etanooli kontsentratsioonid ärkamishetkel olid oluliselt madalamad emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel, võrreldes nende metsikut-tüüpi pesakonnakaaslastega (+/+). Isastel hiirtel genotüübist tingitud erinevus puudus. Andmed on kokkuvõtvalt esitatud Tabelis 1.

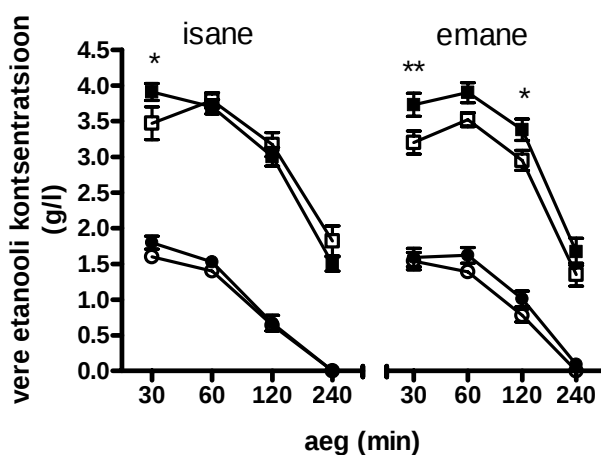
Rühm	Aeg püstamisrefleksi kadumiseni (s)	Aeg püstamisrefleksi taastumiseni (min)	Vere etanooli kontsentratsioon püstamisrefleksi taastumishetkel (g/l)
Isased (+/+)	74 ± 2.8	56 ± 7.9	3.36 ± 0.08
Emased (+/+)	75 ± 2.0	40 ± 4.4	3.57 ± 0.07
Isased (-/-)	75 ± 2.0	50 ± 7.4	3.19 ± 0.05
Emased (-/-)	79 ± 3.0	51 ± 7.9	$3.12 \pm 0.07^{***}$

Tabel 1. Aeg püstumisrefleksi kadumiseni (s), aeg püstumisrefleksi taastumiseni (min) ning vere etanooli kontsentratsioon püstumisrefleksi taastumishetkel (g/l) CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-) ning nende metsikut-tüüpi pesakonnakaaslastel. Etanooli manustati annuses 4.0 g/kg. Katseloomade arv rühmas N=14-15. ***

$p < 0.001$: *Tukey HSD* test, statistiliselt oluline erinevus emaste CCK2R puudulikkusega (-/-) ja nende metsikut-tüüpi pesakonnakaaslaste vahel (+/+).

4.4. Vere etanooli kontsentratsioonid

Neljasuunaline variatsiooni analüüs (genotüüp $\times$ sugu $\times$ etanooli annus $\times$ aeg) näitas järgmisi olulisi efekte: etanooli annus ($F(1,37)=671.53$ $p < 0.001$), aeg ($F(3,111)=943.84$ $p < 0.001$), genotüüp $\times$ aeg interaktsioon ($F(3,111)=5.33$ $p < 0.01$), doos $\times$ aeg interaktsioon ($F(3,111)=40.29$ $p < 0.001$), genotüüp $\times$ sugu $\times$ aeg interaktsioon ($F(3,111)=3.48$ $p < 0.05$) ning genotüüp $\times$ doos $\times$ aeg interaktsioon ($F(3,111)=3.35$ $p < 0.05$). Vere etanooli kontsentratsioonid olid oluliselt madalamad emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-) 30 ja 120 min pärast etanooli manustamist annuses 4.0 g/kg (vastavalt $p < 0.01$ ja $p < 0.05$) (Joonis 3). Isastel mutantsetel hiirtel (-/-) olid etanooli verekontsentratsioonid oluliselt madalamad võrreldes nende metsikut-tüüpi pesakonnakaaslastega (+/+) 30 min pärast etanooli manustamist (4.0 g/kg) ($p < 0.05$). Etanooli annuse 2.0 g/kg manustamise järgselt ei ilmnunud olulisi soost- või genotüübist tingitud erinevusi (Joonis 3).



Joonis 3. Vere etanooli kontsentratsioonid (g/l) CCK2R puudulikkusega hiirtel pärast etanooli manustamist annustest 4.0 ja 2.0 g/kg (katseloomade arv rühmas $N=6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: *Tukey HSD* test, metsikut-tüüpi (+/+) hiired võrrelduna CCK2R puudulikkusega hiirtega (-/-) vastaval ajahetkel, etanooli annus 4.0 g/kg. Mustad ruudud: metsikut-tüüpi hiired (+/+), etanooli annus 4.0 g/kg; valged ruudud: CCK2R

puudulikkusega hiired (-/-), etanooli annus 4.0 g/kg; mustad ringid: metsikut-tüüpi hiired (+/+), etanooli annus 2.0 g/kg; valged ringid: CCK2R puudulikkusega hiired (-/-), etanooli annus 2.0 g/kg.

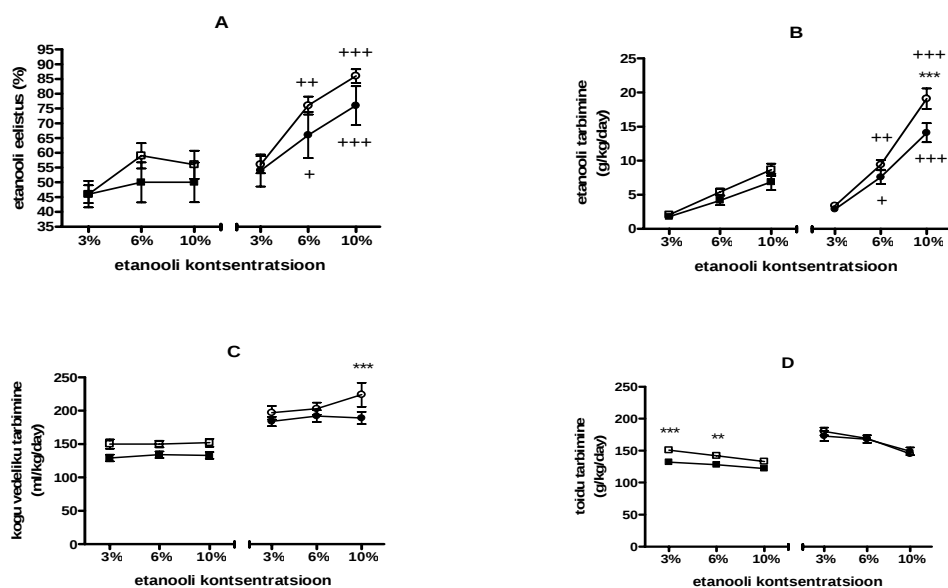
4.5. Etanooli eelistus ja tarbimine

1. *Etanooli eelistus.* Kolmesuunaline variatsioonianalüüs näitas olulist soo ($F(1,56)=15.34$ $p<0.001$), etanooli kontsentratsiooni ($F(2,112)=30.03$ $p<0.001$) ning soo $\times$ etanooli kontsentratsiooni interaktsiooni efekti ($F(2,112)=9.39$ $p<0.001$). Sõltumata genotüübist eelistasid emased katseloomad etanooli kontsentratsioonides 6 % ja 10 % oluliselt rohkem kui isased katseloomad (+/+ vastavalt: $p<0.05$ ja $p<0.001$; -/- vastavalt: $p<0.01$ ja $p<0.001$) (Joonis 4A). Genotüübi efekti etanooli eelistuses ei ilmnenu.
2. *Etanooli tarbimine.* Leiti statistiliselt olulised genotüübi ($F(1,56)=6.55$ $p<0.05$), soo ($F(1,56)=44.88$ $p<0.001$), etanooli kontsentratsiooni ($F(2,112)=212.28$ $p<0.001$), genotüüp $\times$ etanooli kontsentratsioon interaktsiooni ($F(2,112)=5.12$ $p<0.01$) ning sugu $\times$ etanooli kontsentratsioon interaktsiooni ($F(2,112)=34.34$ $p<0.001$) efektid. Emased hiired, sõltumata genotüübist, tarvitasid alkoholi märkimisväärselt rohkem kui isased (6 % etanool: $p<0.05$ metsikut-tüüpi (+/+) hiired ning $p<0.01$ CCK2R puudulikkusega (-/-) hiired; 10 % etanool: $p<0.001$ nii metsikut-tüüpi (+/+) kui ka mutantsed (-/-) hiired) (Joonis 4B). Emased CCK2R puudulikkusega katseloomad (-/-) tarvitasid 10 % etanooli statistiliselt oluliselt rohkem kui nende metsikut-tüüpi (+/+) pesakonnakaaslased ($p<0.001$) (Joonis 4B).

4.6. Vedeliku ja toidu tarbimine ning kehakaalu muutused etanooli tarbimise katse ajal

1. *Vedeliku tarbimine.* Kolmesuunalise variatsiooni analüüsiga leiti järgmised olulised efektid: genotüüp ($F(1,56)=6.64$ $p<0.05$), sugu ($F(1,56)=56.47$ $p<0.001$) ning etanooli kontsentratsioon ($F(2,112)=3.16$ $p<0.05$). Emased CCK2R puudulikkusega (-/-) tarvitasid vedelikku 10 % etanooli tarvitamise ajal oluliselt rohkem kui nende metsikut-tüüpi (+/+) pesakonnakaaslased ($p<0.001$) (Joonis 4C). Isastel hiirtel vedeliku tarbimine ei olnud genotüübist mõjustatud.

2. *Toidu tarbimine*. Esinesid olulised soo ($F(1,56)=52.28$ $p<0.001$), etanooli kontsentratsiooni ($F(2,112)=68.56$ $p<0.001$), genotüüp $\times$ etanooli kontsentratsioon interaktsiooni ($F(2,112)=3.46$ $p<0.05$) ning sugu $\times$ etanooli kontsentratsioon interaktsiooni ($F(2,112)=10.29$ $p<0.001$) efektid. Isaste mutantsete hiirte (-/-) toidu tarbimine oli oluliselt kõrgem, võrreldes isaste metsikut-tüüpi (+/+) hiirtega. Selline erinevus oli täheldatav etanooli kontsentratsioonidel 3 % ($p<0.001$) ja 6 % ($p<0.01$) (Joonis 4D). Emaste mutantsete hiirte toidu tarbimine ei erinenud nende metsikut-tüüpi pesakonnakaaslastest.
3. *Kehakaalu muutus*. Leiti olulised soo ($F(1,56)=158.11$ $p<0.001$) ja sugu $\times$ etanooli kontsentratsiooni interaktsiooni ($F(2,112)=16.29$ $p<0.001$) efektid. *Post hoc* rühmade võrdlusel ilmnesis olulised erinevused emaste ja isaste katseloomade kehakaalus, kuid seda ei mõjutanud CC2R puudulikkus (andmeid ei ole esitatud).



Joonis 4. Etanooli eelistus ja tarbimine ning samuti vedeliku ja toidu tarbimine CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel etanooli tarbimise katse käigus (N=15 igas rühmas). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$: *Tukey HSD* test, metsikut-tüüpi hiired (+/+) võrrelduna vastavast soost CCK2R puudulikkusega hiirtega (-/-) samal etanooli kontsentratsioonil. + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$: emased hiired võrrelduna vastava genotüübi isaste hiirtega samal etanooli kontsentratsioonil. Mustad ruudud: isased

metsikut-tüüpi (+/+) hiired; valged ruudud: isased CCK2R puudulikkusega (-/-) hiired; mustad ringid: emased metsikut-tüüpi (+/+) hiired; valged ringid: emased CCK2R puudulikkusega (-/-) hiired.

4.7. Maitse-eelistus

1. *Sahharoosi eelistus*. Kolmesuunaline variatsiooni analüüs näitas olulist sahharoosi kontsentratsiooni efekti ($F(1,56)=132.85$ $p<0.001$). Sahharoosi eelistus ei erinenud oluliselt genotüüpide ega sugude vahel.
2. *Kiniini eelistus*. Leiti oluline kiniini kontsentratsiooni efekt ($F(1,56)=47.77$ $p<0.001$). Sarnaselt sahharoosi eelistusele ei erinenud ka kiniini eelistus oluliselt genotüüpide ega sugude vahel. Andmed on esitatud Tabelis 2.

Rühm	Sahharoos 1.7 %	Sahharoos 4.3 %	Kiniin 0.03 mM	Kiniin 0.10 mM
Isased (+/+)	89 ± 1.6	97 ± 0.6	55 ± 4.7	43 ± 5.6
Emased (+/+)	89 ± 1.5	97 ± 0.5	55 ± 5.0	39 ± 5.2
Isased (-/-)	90 ± 1.1	97 ± 0.3	56 ± 4.1	42 ± 4.0
Emased (-/-)	90 ± 1.4	96 ± 0.5	61 ± 4.4	49 ± 5.8

Tabel 2. Sahharoosi ja kiniini eelistus CCK2R puudulikkusega hiirtel (N=15 igas rühmas). Olulisi erinevusi genotüüpide ega sugude vahel ei leitud.

5. TULEMUSTE ARUTELU

Käesolevas töös oleme näidanud, et etanooli toime on muutunud CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel ning et see muutus on soost sõltuv. Etanool vähendas oluliselt ärevuskäitumist emastel mutantsetel (-/-) hiirtel pluss-puuris (suurenes aeg avatud õlgadel, avatud õlgadel pealangetamiste ning joonte ületamiste arv). Sellist toimet avaldas etanool annustes 1.0 ja 2.0 g/kg, viidates tundlikkuse tõusule emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel. Samuti leiti, et emased mutantsed hiired on tundlikumad etanooli (4.0 g/kg) sedatiivsele toimele. Kuigi püstamisrefleksi kadumise ning taastumise aeg ei olnud emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel oluliselt muutunud, olid nende vere etanooli kontsentratsioonid püstamisrefleksi taastumise hetkel oluliselt madalamad kui emastel metsikut-tüüpi hiirtel (+/+). Võttes arvesse, et etanool avaldab mitmeid toimeid kesknärvisüsteemis läbi GABA-ergilise süsteemi (Criswell ja Breese, 2005; Davies, 2003), on meie käesolevad tulemused heas kooskõlas eelnevate uurimustega, mis viitavad GABA-ergilise süsteemi suuremale aktivatsioonile emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel (Raud jt, 2003; 2005). Raud koos kolleegidega (2003) näitasid, et emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel on madalam ärevuse tase, suurem tundlikkus diasepaamist tingitud motoorikahäiretele ning suurenenud GABA-ergilise süsteemi aktiivsus. Samuti leidsid Raud ja kolleegid (2005), et emaste mutantsete hiirteaju otsmikukoores on GABA-A retseptori $\alpha 2$ alaühiku geeniekspressioon tõusnud 1.6 korda. On leitud, et $\alpha 2$ alaühik vahendab diasepaami ärevusvastast toimet ning selle alaühiku geneetilise väljalülitamise tulemusel kaob diasepaami ärevusvastane toime (Löw jt, 2000; Möhler jt, 2002). Kuigi emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel esines tõusnud tundlikkus etanooli ärevusvastase ja sedatiivse toime suhtes, isastel mutantsetel hiirtel sellist muutust ei leitud.

Etanool annuses 2.0 g/kg põhjustas nii horisontaalse (läbitud vahemaa) kui ka vertikaalse (tagajalgadele tõusude arv) motoorse aktiivsuse pärssimise emastel metsikut-tüüpi (+/+) hiirtel. Sellist toimet ei ilmnenu emastel CCK2R (-/-) puudulikkusega hiirtel. Samas tuleb märkida, et emaste metsikut-tüüpi (+/+) baasaktiivsus kaldus olema kõrgem kui emastel mutantsetel hiirtel (-/-), tänu millele etanoolist tingitud liikumisaktiivsuse vähenemine ilmnis neil paremini. Isastel hiirtel põhjustas etanool genotüübist sõltuva vertikaalse (tagajalgadele tõusude arv), kuid mitte horisontaalse motoorse aktiivsuse pärssimise. Isastel CCK2R puudulikkusega (-

/-) hiirtel ilmnes etanooli mootorikat pärssiv toime annustes 0.5 ja 2.0 g/kg, samas kui nende metsikut-tüüpi pesakonnakaaslastel avaldus selline toime ainult annuses 2.0 g/kg. Blanchard ja kolleegid (1993) ning Budygin ja kolleegid (2001) on näidanud, et akuutne etanooli manustamine põhjustab väiksematel annustel juttkehas dopamiini vabanemise suurenemise, suurtel annustel aga vähenemise. Vastavalt meie eelnevatele uurimustele (Kõks jt, 2001; Abramov jt, 2004) esineb isastel erinevalt emastest CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtest muutus juttkeha dopamiini ülekandes. Samuti on isastel mutantsetel hiirtel muutunud dopamiinergiliste ainete toime (Kõks jt, 2001). Oleme oletanud, et isastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel esineb presünaptiliste D2R tundlikkuse tõus, mis võib seletada väikeste apomorfiini ja amfetamiini annuste mootorikat pärssivat toimet neile. Rünkorg ja kolleegid (2006) näitasid hiljaaegu dopamiini D2R ekspressiooni vähenemist isaste CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirte keskajus. Dopamiini D2R keskajus on dopamiini autoreptorid. Need retseptorid reguleerivad dopamiini vabanemist ning Pierce ja Kalivas (1997) on oletanud, et nende vähenenud tundlikkus soodustab dopamiini vabanemist. Tasub ka märkida, et Miyasaka ja kolleegid (2005) näitasid CCK2R puudulikkusega (-/-) isastel hiirtel dopamiini D2R valgu vähenemist naalduvas tuumas. Edasised uuringud on vajalikud, et selgitada seost muutunud dopamiinergilise ülekande ning etanooli mootorikat pärssiva toime vahel isastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel. Siinkohal tuleks toonitada, et käesolevas töös on etanooli mootorikat pärssiva toime modifikatsioon ainus muutus, mis ilmneb isastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-).

Vere etanooli kontsentratsioonid annuse 2.0 g/kg järgselt ei olnud oluliselt mõjutatud genotüübist või soost, mis tähendab, et käesolevas töös esitatud käitumistulemused ei ole mõjutatud muutunud etanooli metabolismi poolt. Olulised erinevused ilmnemise etanooli verekontsentratsioonides suurema annuse (4.0 g/kg) manustamise järgselt. Isastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel olid etanooli verekontsentratsioonid oluliselt madalamad kui nende metsikut-tüüpi (+/+) pesakonnakaaslastel 30 min pärast etanooli manustamist, samas kui emastel mutantsetel (-/-) hiirtel ilmnes selline erinevus 30 ja 120 min pärast süsti. Muutunud etanooli kineetika näib olevat avaldanud mõju püstumisrefleksi kadumise testile, kus kasutati etanooli annuses 4.0 g/kg. Kuigi püstumisrefleksi kadumise kestvus ei olnud oluliselt mõjutatud genotüübi ega soo poolt, esinesid emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel oluliselt madalamad vere etanooli kontsentratsioonid püstumisrefleksi taastumise hetkel. See leid ilmselt peegeldab emaste mutantsete hiirte (-/-) suurenenud

tundlikkust etanooli sedatiivsele toimele, kuid seda ei ole võimalik tuvastada püstumisrefleksi kadumise kestvuse suurenemisena, sest mutantsetel emastel hiirtel oli muutunud etanooli metabolism.

Käesolevas töös näitasime soo-spetsiifilist etanooli tarvitamise muutust emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel. Emased, kuid mitte isased mutantsed (-/-) hiired tarvitasid 10 % etanooli oluliselt rohkem kui nende metsikut-tüüpi (+/+) pesakonnakaaslased. See leid on heas kooskõlas Miyasaka ja kolleegide (2005) uurimusega, kes näitasid, et isaste CCK2R puudulikkusega hiirte alkoholi tarbimine ei ole oluliselt muutunud. Samas, 10 % alkoholi tarbimise tõusuga emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-) kaasnes oluliselt suurenenud vedeliku tarbimine, mistõttu alkoholi eelistus ei olnud oluliselt muutunud. Pidades silmas, et emased mutantsed (-/-) hiired on tundlikumad alkoholi ärevusvastasele ning sedatiivsele toimele, on suurenenud etanooli tarvitamine mõnevõrra ootamatu leid. Välistamaks muutusi maitse-eelistuses, mis võinuks mõjutada etanooli tarbimise katset, uuriti sahharoosi ja kiniini eelistust, kuid see ei olnud mõjutatud genotüübi või soo poolt. Edasised uuringud on soovitatavad, et selgitada, kas CCK2R puudulikkus mõjutab tolerantsuse teket etanoolile emastel hiirtel. Tasub ka märkida, et käesolevas töös kasutatud hiirte taustaliin on 129sv/C57BL/6, mida on 6 korda ristatud tagasi C57BL/6-ga. C57BL/6 hiireliinile on iseloomulik kõrge etanooli eelistus ja tarbimine (Belknap jt, 1993; Middaugh jt, 1999). Seega, fenotüüp, mida oleme käesolevas töös näidanud, võib olla iseloomulik meie poolt kasutatavale taustaliinile, kuid see võib erineda taustaliinides, mis tarbivad vähem etanooli.

Emased hiired, sõltumata genotüübist, eelistasid ning tarvitasid etanooli kontsentratsioonides 6 % ja 10 % oluliselt rohkem kui nende isased pesakonnakaaslased. See leid on vastavuses teiste uurimustega, kus on näidatud emaste näriliste suuremat etanooli eelistust (Lancaster ja Spiegel, 1992; Meliska jt, 1995; Middaugh jt, 1999), viidates nii emaste kui isaste katseloomade kasutamise otstarbekusele. Tuleb toonitada, et tuginedes meie eelnevale tööle (Abramov jt, 2004) ning käesolevatele tulemustele, näib, et mõlemast soost katseloomade kasutamine on eriti asjakohane CCK2R puudulikkusega hiirte uurimisel, kuna osa sellest mutatsioonist tingitud muutusi on sedastatav ainult isastel, teine osa aga ainult emastel loomadel.

Kokkuvõtteks, käesolevas töös demonstreeritakse, et nii isastel kui emastel CCK2R puudulikkusega hiirtel on etanooli käitumuslik toime muutunud. Emastel

CCK2R puudulikkusega hiirtel oli suurenenud tundlikkus etanooli ärevusvastasele ning sedatiivsele, kuid mitte motoorikat pärssivale toimele. Isastel CCK2R puudulikkusega hiirtel seevastu oli muutunud etanooli motoorikat mõjutav toime. Kuigi etanooli tarvitamine oli tõusnud emastel mutantsetel hiirtel, puudus selline genotüübist tingitud muutus isastel hiirtel. Need andmed kinnitavad soost-sõltuvat fenotüüpi, mida põhjustab CCK2R geneetiline väljalülitamine, ning viitavad mõlemast soost loomade kasutamise otstarbekusele transgeensete hiirte uurimisel. Isastel CCK2R puudulikkusega hiirtel (-/-) esinev etanooli käitumusliku toime muutus võib olla seotud muutustega dopamiinergilises süsteemis (Daugé jt, 2001; Kõks jt, 2001). Emastel mutantsetel hiirtel (-/-) esinev etanooli käitumuslike toimete muutus võib aga olla seletatav tõusnud GABA-ergilise süsteemi aktiivsusega (Raud jt, 2003; 2005).

JÄRELDUSED

1. Isastel katseloomadel CCK2R geneetiline väljalülitamine ei mõjutanud oluliselt etanooli ärevust vähendavat toimet, kuid emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel esines etanooli ärevusvastase toime tugevnemine.
2. Isastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel, erinevalt nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslastest, põhjustas etanooli väike annus 0.5 g/kg olulist vertikaalse motoorse aktiivsuse (tagajalgadele tõusude arv) langust. Emastel metsikut tüüpi (+/+) hiirtel põhjustas etanool nii horisontaalse kui vertikaalse motoorse aktiivsuse langust. Sellist toimet ei avaldunud emastel mutantsetel (-/-) hiirtel, kuid see võis olla seotud madalama baasaktiivsusega, võrreldes nende metsikut tüüpi (+/+) pesakonnakaaslastega.
3. Isastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel etanooli (4.0 g/kg) sedatiivne toime ei erinenud nende metsikut tüüpi (+/+) pesakonnakaaslastest. Emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel oli tõusnud tundlikkus etanooli sedatiivsele toimele, mis avaldus oluliselt madalamas vere etanooli kontsentratsioonis püstumisrefleksi taastumise hetkel.
4. Isastel katseloomadel CCK2R geneetiline väljalülitamine oluliselt ei mõjutanud etanooli tarbimist ega eelistust, kuid emased CCK2R puudulikkusega (-/-) hiired tarvitasid 10 % etanooli oluliselt rohkem võrreldes nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslastega (+/+). Etanooli eelistus ei olnud CCK2R geneetilise väljalülitamise poolt mõjutatud.
5. CCK2R geneetiline väljalülitamine ei mõjutanud oluliselt maitse-eelistust sahharoosile ega kiniinile ei emastel ega isastel katseloomadel.
6. Mutantsete (-/-) hiirte etanooli verekontsentratsioonid ei erinenud nende metsikut-tüüpi (+/+) pesakonnakaaslaste vastavatest näitajatest etanooli annuse 2.0 g/kg manustamise järgselt. Seevastu annuse 4.0 g/kg manustamise järgselt ilmnesisid olulised genotüübist ja soost sõltuvad erinevused. Võrreldes nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslastega olid isaste CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirte etanooli verekontsentratsioonid oluliselt madalamad 30 min pärast etanooli manustamist, emastel CCK2R puudulikkusega (-/-) hiirtel aga 30 ja 120 min pärast etanooli manustamist.
7. CCK2R geneetiline väljalülitamine modifitseerib isastel katseloomadel etanooli toimet liikumisaktiivsusele ning mõjutab ka etanooli (4.0 g/kg)

verekontsentratsioone, samas kui emastel katseloomadel selle mutatsiooni tulemusel etanooli toime liikumisaktiivsusele ei muutu, kuid oluliselt tugevneb etanooli ärevusvastane ja sedatiivne toime. Samuti põhjustab CCK2R puudulikkus emastel hiirtel suuremaid erinevusi vere etanooli kontsentratsioonides (4.0 g/kg) võrreldes isaste loomadega. Erinevalt isastest katseloomadest tarvitavad emased CCK2R puudulikkusega (-/-) hiired oluliselt rohkem 10 % etanooli võrreldes metsikut tüüpi (+/+) pesakonnakaaslastega.

ABSTRACT

Neuropeptide cholecystokinin (CCK) has been reported to suppress ethanol intake, but there is contradictory evidence about the role of CCK₂ receptors. In the present study anxiolytic, hypocomotor and sedative effects of acute ethanol administration, but also voluntary ethanol consumption were studied in male and female mice, lacking CCK₂ receptors (-/-). Ethanol (1.0 g/kg and 2.0 g/kg) induced a significant reduction of anxiety only in female homozygous mice (-/-). In male mice, lacking CCK₂ receptors (-/-), but not in their wild-type littermates (+/+), the suppression of vertical locomotor activity was caused by ethanol at a dose 0.5 g/kg. The highest dose of ethanol (2.0 g/kg) produced statistically significant reduction of horizontal locomotor activity only in female wild-type (+/+) mice, but this effect was related to increased basal activity when compared to female mutant (-/-) mice. Duration of the loss of righting reflex was not significantly affected by genotype or gender, but blood ethanol levels at regain of righting reflex were significantly lower in female homozygous mice (-/-) compared to their wild-type (+/+) littermates, indicating increased sensitivity to the sedative effect of ethanol. Ethanol intake, but not preference, at concentration 10 % was significantly increased in female mice, lacking CCK₂ receptors (-/-). The present study revealed an altered response to the acute effects of ethanol in CCK₂ receptor deficient mice (-/-). These changes are sex specific and could be attributed to the altered activity of dopaminergic system in male mice and increased activity of GABA-ergic system in female mice as established in our previous studies.

KIRJANDUS

1. Abramov U, Raud S, Kõks 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; 155:1-11.
2. Belknap JK, Crabbe JC, Young ER. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology*, 1993; 112:503-510.
3. Blanchard BA, Steindorf S, Wang S, Glick SD. Sex differences in ethanol-induced dopamine release in nucleus accumbens and in ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 1993; 17:968-973.
4. Budygin EA, Phillips PE, Robinson DL, Kennedy AP, Gainetdinov RR, Wightman RM. Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001; 297:27-34.
5. Costall B, Domeney AM, Hughes J, Kelly ME, Naylor RJ, Woodruff GN. Anxiolytic effects of CCK-B antagonists. *Neuropeptides*, 1991; 19:65-73.
6. Crawley JN. Interaction between cholecystokinin and other neurotransmitter systems. In: Bradwejn J, Vasar E (eds.). *Cholecystokinin and Anxiety: from Neuron to Behavior*. Austin, R.G. Landes Company; 1995; pp 101-126.
7. Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, 1994; 15:731-55.
8. Crespi F. The role of cholecystokinin (CCK), CCK-A or CCK-B receptor antagonists in the spontaneous preference for drugs of abuse (alcohol or cocaine) in naive rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1998; 20:679-697.
9. Crespi F, Corsi M, England T, Ratti E, Trist DG, Gaviraghi G. Spontaneous preference for ethanol in naive rats is influenced by cholecystokinin A receptor antagonism. *Alcohol*, 1997; 14:327-332.
10. Criswell HE, Breese GR. A conceptualisation of integrated actions of ethanol contributing to its GABAmimetic profile: a commentary. *Neuropsychopharmacology*, 2005; 30:1407-1425.
11. Croft AP, Brooks SP, Cole J, Little HJ. Social defeat increases alcohol preference of C57BL/10 strain mice; effect prevented by a CCKB antagonist. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2005; 183:163-170.

12. Daugé 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.
13. Daugé V, Lena I. CCK in anxiety and cognitive processes. *Neurosci Biobehav Rev*, 1998; 22:815-825.
14. Davies M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci*, 2003; 28:263-274.
15. DiBattista D, McKenzie TLB, Hollis-Walker L. Cholecystokinin reduces ethanol consumption in golden hamsters. *Alcohol*, 2003; 29:173-181.
16. Geary N, Wolfe A, Polidori C, Policani F, Massi M. Exogenous and endogenous CCK inhibit ethanol ingestion in Sardinian alcohol-preferring rats. *Peptides*, 2004; 25:1185-1194.
17. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1984; 327(1):1-5.
18. Harro J, Wahlstrom G, Orelund L. Cholecystokinin receptor binding after long-term ethanol treatment in rats. *Alcohol Alcohol*, 1994; 29:575-581.
19. Kõks S, Volke V, Veraksitš A, Rünkorg K, Sillat T, Abramov U, Bourin M, Huotari M, Mannisto PT, Matsui T, Vasar E. Cholecystokinin2 receptor-deficient mice display altered function of brain dopaminergic system. *Psychopharmacology (Berl)*, 2001;58:198-204.
20. Kulkosky PJ. Neuropeptidergic control of ethanol intake. *J Toxicol Toxin Rev*, 1996; 15:341-351.
21. Lancaster FE, Spiegel KS. Sex differences in patterns of drinking. *Alcohol*, 1992; 9:415-420.
22. Larsson LI, Rehfeld JF. Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Brain Res*. 1979; 165(2):201-218.
23. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987; 92(2):180-185.
24. Little HJ, O'Callaghan MJ, Butterworth AR, Wilson J, Cole J, Watson WP. Low alcohol preference among the "high alcohol preference" C57 strain of mice; preference increased by saline injections. *Psychopharmacology (Berl)*, 1999; 147:182-189.

25. Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Blüthmann H, Möhler H, Rudolph U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*, 2000; 290:131-134.
26. Meliska CJ, Bartke A, McGlacken G, Jensen RA. Ethanol, nicotine, amphetamine, and aspartame consumption and preferences in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995; 50:619-626.
27. Middaugh LD, Kelley BM, Bandy AL, McGroarty KK. Ethanol consumption by C57BL/6 mice: influence of gender and procedural variables. *Alcohol*, 1999; 17:175-183.
28. 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 Alcohol*, 2005; 40:176-180.
29. Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. A new benzodiazepine pharmacology. *Pharmacol Exp Ther*, 2002; 300:2-8.
30. 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(21):11825-11830.
31. 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.
32. Pierce RC, Kalivas PW. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev*. 1997; 25:192-216.
33. Pommier B, Beslot F, Simon A, Pophillat M, Matsui T, Daugé V, Roques BP, Noble F. Deletion of CCK2 receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. *J Neurosci*, 2002; 22:2005-2011.
34. Raud S, Innos J, Abramov U, Reimets A, Kõks S, Soosaar A, Matsui T, Vasar E. Targeted invalidation of CCK(2) receptor gene induces anxiolytic-like action in light-dark exploration, but not in fear conditioning test. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005; 181:347-357.
35. Raud S, Rünkorg K, Veraksitš A, Reimets A, Nelovkov A, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Volke V, Kõks S, Vasar E. Targeted mutation of CCK2 receptor gene

- modifies the behavioural effects of diazepam in female mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 2003; 168:417-425.
36. Rehfeld JF, Mogensen NW, Bardram L, Hilsted L, Monstein H. Expression, but failing maturation of procholecystokinin in cerebellum. *Brain Res.* 1992; 576(1):111-119.
 37. 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. Landes Company, 1995; pp 33-56.
 38. Rotzinger S, Vaccarino FJ. Cholecystokinin receptor subtypes: role in the modulation of anxiety-related and reward-related behaviours in animal models. *J Psychiatry Neurosci*, 2003; 28:171-181.
 39. Rünkorg K, Värnv S, Matsui T, Köks 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; 406:17-22.
 40. Rünkorg K, Veraksitš A, Kurrikoff K, Luuk H, Raud S, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Köks S, Vasar E. Distinct changes in the behavioural effects of morphine and naloxone in CCK2 receptor-deficient mice. *Behav Brain Res*, 2003;144:125-135.
 41. Toth P, Shaw C, Perlanski E, Grupp LA. Cholecystokinin octapeptide reduces ethanol intake in food- and water-sated rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1990; 35:493-495.
 42. Vanderhaegen JJ, Signeau JC, Gepts W. New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigestrin antibodies. *Nature*, 1975; 257:604-605.
 43. Veraksitš A, Rünkorg K, Kurrikoff K, Raud S, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Köks S, Vasar E. Altered pain sensitivity and morphine-induced anti-nociception in mice lacking CCK2 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 2003; 166:168-175.
 44. Weatherford SC, Figlewicz DP, Park CR, Woods SC. Chronic alcohol consumption increases sensitivity to the anorexic effect of cholecystokinin. *Am J Physiol*, 1993; 265:211-215.
 45. Wilson J, Little HJ. CCK(B) antagonists protect against some aspects of the ethanol withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav*, 1998; 59:967-973.

46. Wilson J, Watson WP, Little HJ. CCK(B) antagonists protect against anxiety-related behaviour produced by ethanol withdrawal, measured using the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 1998; 137:120-131.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma juhendajat prof. Eero Vasarat asjaliku toetuse ja nõuannete eest käesoleva töö planeerimisel, läbiviimisel ja kirjutamisel. Samuti võlgnen palju tänu Sulev Kõksile, kes on olnud toeks töö kavandamisel ja tulemuste analüüsimisel. Soovin ära märkida Eero Vasara ning Sulev Kõksi imetlusväärset pühendumist teadustööle, mis on olnud mulle eeskujuks nii käesoleva kui eelnevate tööde käigus. Loomulikult ei saa ma unustada oma kalleid töökaaslasi Tartu Ülikooli Füsioloogia instituudis, kes on loonud inspireeriva õhkkonna mitmekülgseks ja produktiivseks teadustööks. Eriline tänu kuulub Füsioloogia instituudi käitumiskatsete rühmale, kes on pakkunud loomingulist rõõmu katsete planeerimisel ja tulemuste interpretatsioonil. Samuti olen tänulik kolleegidele Tartu Ülikooli Kliinikumi psühhiaatriakliinikust, kes on mulle võimaldanud ajalist ressursi teadustööga tegelemiseks, ning oma perekonnale, kes on mind toetanud päevast päeva.

Lisa 1 – publitseeritud artikli äratrükk