

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Hipokampuse ja külgvatsakeste ruumala muutuse uurimine liraglutiidi
kroonilise manustamise järel Wolframi sündroomi rotimudelil**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Kaia Grete Kukker

Juhendaja MSc Kadri Seppa

Kaasjuhendajad PhD Mario Plaas, PhD Anton Terasmaa, PhD Tambet Tõnissoo

TARTU

2020

INFOLEHT

Hipokampuse ja külgvatsakeste ruumala muutuse uurimine liraglutiidi kroonilise manustamise järel Wolframi sündroomi rotimudelil

Wolframi sündroom (WS) on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mida põhjustavad mutatsioonid *WFS1* geenis. WSi iseloomustavad juveniilne suhkurdiabeet, optilise närvi atroofia, kurtus ja neurodegeneratsioon, mille tõttu surevad patsiendid keskmiselt kolmekümne aasta vanuselt. Neurodegeneratsiooni on WSi puhul vähe uuritud ning seetõttu keskendub käesolev töö WSi rotimudeli hipokampuses ja külgvatsakestes toimuvatele muutustele. WSi rotimudelil suurenesid kuus kuud kestnud katse jooksul nii hipokampuse kui ka külgvatsakeste ruumala. Ajuvatsakeste ruumala suurenemine kaasneb ka teiste neurodegeneratiivsete haigustega ja seega sobiks WSi rotimudelit kasutada ka neurodegeneratiivsete haiguste uurimiseks. Katse käigus ilmnes GLP-1 retseptori agonisti liraglutiidi neuroprotektiivne toime, mistõttu võiks see ravim pidurdada neurodegeneratsiooni ka WSiiga patsientidel.

Märksõnad: Wolframi sündroom, WFS1, neurodegeneratsioon, liraglutiid
CERCS kood: B640 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia

Volumetric changes in the hippocampus and lateral ventricles after chronic liraglutide treatment in a rat model of Wolfram syndrome

Wolfram syndrome (WS) is a rare autosomal recessive disorder caused by mutations in the *WFS1* gene. WS is characterized by diabetes mellitus, optic nerve atrophy, deafness, and neurodegeneration. Few studies have been conducted with a focus on neurodegeneration in the case of WS, which is why this study examines the changes that occur in the hippocampus and lateral ventricles in a rat model of WS. During a six-month experiment, increased volume was observed both in the hippocampus and lateral ventricles in a rat model of WS. Ventricular enlargement is associated with other neurodegenerative diseases as well; thus, a rat model of WS would also be suitable for studying these diseases. The GLP-1 receptor agonist liraglutide had a neuroprotective effect in the experiment, it could therefore slow down the progression of neurodegeneration in WS patients.

Keywords: Wolfram syndrome, WFS1, neurodegeneration, liraglutide
CERCS code: B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Wolframi sündroom.....	6
1.2. <i>WFS1</i> geen ja wolframiin	7
1.3. Wolframi sündroomiga kaasnev suhkurdiabeet	8
1.4. Wolframi sündroomiga kaasnev neurodegeneratsioon	8
1.5. Wolframi sündroomi rotimudel.....	10
1.6. Wolframi sündroomi kulgu pidurdavad teraapiad.....	12
2 EKSPERIMENTAALOSA	15
2.1. Töö eesmärgid	15
2.2. Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1. Katseloomad	16
2.2.2. Krooniline ravi liraglutiidiga.....	16
2.2.3. Andmete analüüs	16
2.2.4. <i>In vivo</i> magnetresonantstomograafia.....	17
2.3. Tulemused	19
2.3.1. Hipokampuse ruumala analüüs.....	19
2.3.2. Külgvatsakeste ruumala analüüs	20
2.4. Arutelu.....	22
KOKKUVÕTE	26
SUMMARY	27
TÄNUSÕNAD	29
KIRJANDUSE LOETELU.....	30
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	40
LIHTLITSENTS.....	41

KASUTATUD LÜHENDID

ANOVA	dispersioonanalüüs (ingl <i>analysis of variance</i>)
DIDMOAD	akronüüm ingliskeelsetest sõnadest <i>diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy</i> ja <i>deafness</i>
ER	endoplasmaatiline retiikulum
GLP-1	glükagoonilaadne peptiid-1
KO	nokaut (ingl <i>knock-out</i>)
MRT	magnetresonantstomograafia
NMDA	N-metüül-D-aspartaat
Lira	liraglutiid (GLP-1 retseptori agonist)
Sal	füsioloogiline lahus (ingl <i>saline</i>)
UPR	mittevoltunud valkude vastus (ingl <i>unfolded protein response</i>)
WFS1	wolframiin, ERI transmembraanne glükoproteiin (eri liikide kohta käivate lühendite kasutamisel on lähtunud kehtiva nomenklatuuri reeglitest)
<i>WFS1</i>	wolframiini kodeeriv geen
WS	Wolframi sündroom
WT	metsiktüüp (ingl <i>wild type</i>)

SISSEJUHATUS

Wolframi sündroom (WS) on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mille põhjuseks on mutatsioonid *WFS1* geenis. WSiga patsientidel sünteesitakse vigase *WFS1* geeni tõttu kas defektset WFS1 valku või degradeeritakse see täielikult. WSi iseloomustavad juveniilne suhkurdiabeet, nägemise ja kuulmise kadu, magediabeet ja neuroloogilised häired. WSi jaoks puudub ravi ning patsiendid surevad keskmiselt kolmekümne aasta vanuselt ajutüve atroofiast tingitud hingamispuudulikkusesse.

WSi fenotüübi kirjeldamiseks ja ravistrateegiate väljatöötamiseks on Tartu Ülikooli katseloomakeskuses loodud WFS1-puudulik rotimudel. Senised WSi rotimudeliga tehtud uuringud on keskendunud eelkõige WSiga kaasnevale diabeedile ning neurodegeneratsiooni on kirjeldatud vaid optilises närvis ning ajutüves. Mitmed teised WSiga kaasnevad sümptomid (pimedus, kurtus, ataksia, düsfaagia ja kognitiivsete võimete langus) on põhjustatud neuronite hävimisest ja seetõttu oleks vaja teha uuringuid selgitamiseks välja, missugused muutused toimuvad WFS1-puudulike rottide ajus ja kuidas neid ravida ning ennetada. WSiga kaasnevat kognitiivsete funktsioonide halvenemist, sh mälu- ja õppimishäireid, on kirjeldatud ka neurodegeneratiivsete haigustega (nt Alzheimeri tõbi ja Parkinsonism) patsientidel, kellel neid seostatakse hipokampuse atroofia ja aju külgvatsakeste ruumala suurenemisega. Sellest tulenevalt on tarvilik kontrollida, kas ka WSi rotimudelis toimuvad muutused nimetatud ajustruktuurides.

Käesoleva töö eesmärk on kirjeldada WSi rotimudelis toimuvaid muutusi hipokampuses ja aju külgvatsakestes. Lisaks sellele uuritakse WSi rotimudelis diabeedi sümptomeid leevendanud ravimi liraglutidi mõju nendele ajustruktuuridele. Töö tulemustest on võimalik teha järeldusi selle kohta, kas WSiga kaasneb ka teisi neurodegeneratiivseid haigusi iseloomustavaid sümptomeid, mis annaks põhjust kasutada WSi rotimudelit neurodegeneratsiooni uurimises laiemalt. Katsed liraglutiidiga annavad selgust, kas sel ravimil võiks olla efekt WSiga kaasneva neurodegeneratsiooni ärahoidmisele.

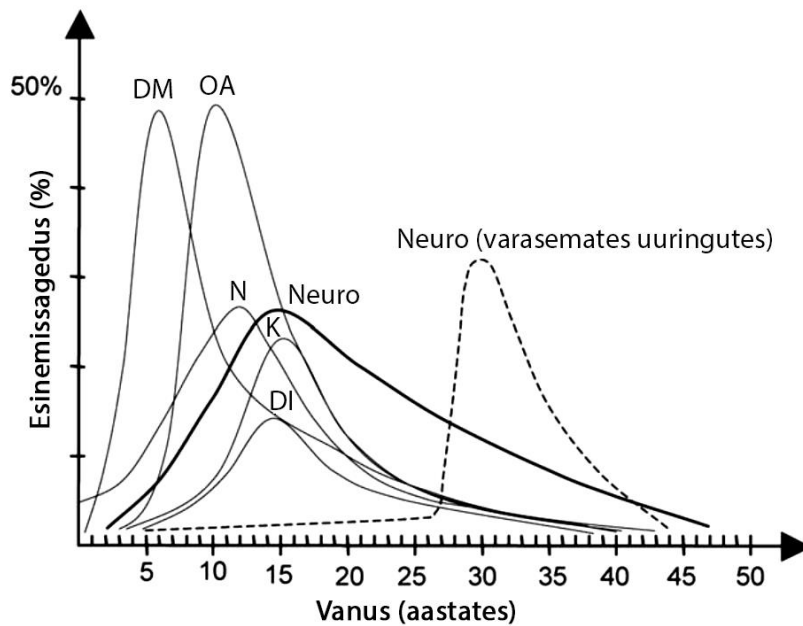
Töö koostati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuses.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Wolframi sündroom

Wolframi sündroom (WS) on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mida põhjustavad mutatsioonid *WFS1* geenis (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). *WFS1* geen kodeerib wolframiini-nimelist transmembraanset valku, mis reguleerib endoplasmaatilise retiikulumi (ER) tööd ja osaleb muuhulgas rakusisese kaltsiumitaseme reguleerimises (Takeda *et al.*, 2001; Takei *et al.*, 2006). WSi iseloomustavad mitmed sümptomid: juveniilne suhkurdiabeet (*diabetes mellitus*), nägemise kadu põhjustav optilise närvi atroofia, kurtus, magediabeet ja neuroloogilised häired (Barrett *et al.*, 1995; Wolfram, D. J. ja Wagener, H. P., 1938). WSi nimetamiseks kasutatakse ka kõige sagedamini esinevate sümptomite esitähedest koosnevat akronüümi DIDMOAD (*diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness*). WSi patsiendid elavad keskmiselt kolmekümne aasta vanuseks (Barrett *et al.*, 1995). Patsientide peamiseks surmapõhjuseks on ajutüve atroofiast tingitud hingamispuudulikkus (Barrett *et al.*, 1995; Hilson *et al.*, 2009; Urano, 2016).

WSile on iseloomulikud paljud erinevad sümptomid ja kõik neist ei pruugi WSi patsientidel esineda. WSi diagnostilisteks kriteeriumiteks on juveniilne suhkurdiabeet ja optilise närvi atroofia, sest need on WSi puhul kõige sagedamini koos avalduvad häired (Barrett *et al.*, 1995). Enne kahekümnendat eluaastat kujuneb tavaliselt välja magediabeet (*diabetes insipidus*) ja sensorineuraalne kurtus, mille puhul on kirjeldatud nii kõrgete kui ka madalate sageduste kuulmise häirimist (Barrett *et al.*, 1995; Bepalova *et al.*, 2001; Cremers *et al.*, 1977). Lisaks nimetatud sümptomitele võib WS põhjustada patsientidel neerutrakti laienemist, millega kaasneb urineerimissageduse tõus, kusepidamatus ja korduvad kuseteede infektsioonid (Barrett *et al.*, 1995; Rohayem *et al.*, 2011). Hilisemas eas, keskmiselt kolmekümnendates eluaastates ilmnevad WSi patsientidel neuroloogilised sümptomid, mille hulka kuuluvad koordinatsioonihäire (ataksia), neelamishäire (düsfaagia), uneapnoe, kognitiivsete võimete halvenemine ning maitse- ja lõhnataju kadumine (Barrett *et al.*, 1995; Cremers *et al.*, 1977; Urano, 2016). WSi võivad sageli kaasuda ka psühhiaatrilised häireid, millest levinuimad on depressioon, ärevushäire, psühhoos, orgaanilised psüühikahäired (nt dementsus) ning impulsiivne verbaalne ja füüsiline agressiivsus (Rohayem *et al.*, 2011; Swift *et al.*, 1990; Urano, 2016). WSi sümptomite esinemisaeg ja -sagedus on toodud välja joonisel 1.



Joonis 1. WSiga kaasnevate sümptomite esinemissagedus ja patsientide keskmine vanus sümptomite ilmnemisel (Chausseot *et al.*, 2011, kohandatud). Graafikul olevate joonte tipud tähistavad WSiga patsientide keskmist iga sümptomite ilmnemisel. Joonte lõikumispunktid x-teljega tähistavad WSiga patsientide vanuselist vahemikku. Katkendjoonega on näidatud WSiga patsientide keskmine vanus, mil neil ilmnesid esimesed neuroloogilised sümptomid Barrett *et al.*, 1995 järgi. Pidevjoonega tähistatud neuroloogiliste sümptomite aluseks on Chausseot *et al.*, 2011. DM – suhkurdiabeet (*diabetes mellitus*), DI – magediabeet (*diabetes insipidus*), OA – optilise närvi atroofia, K – kurtus, N – neerutrakti häired, Neuro – neuroloogilised sümptomid.

1.2. WFS1 geen ja wolframiin

WFS1 geen asub inimesel neljanda kromosoomi väikese õla positsioonis 16.1 (Collier *et al.*, 1996). Mutatsioonide tõttu WFS1 geenis sünteesitakse WSiga patsientidel kas defektset wolframiini ehk WFS1 valku (de Heredia *et al.*, 2013) või degradeeritakse see täielikult (Guo *et al.*, 2011). Puudulikust WFS1 valgust tulenevad komplikatsioonid on põhjuseks, miks patsientidel kujuneb välja WSile iseloomulik sümptomaatika.

WFS1 valku seostatakse ERI stressi maandamisega (Fonseca *et al.*, 2005, 2010). ERI stressiks nimetatakse olukorda, kus rakus on hakanud kuhjuma valesti voltunud või voltumata jäänud valgud. Vastuseks ERI stressile käivitatakse rakus mittevoltunud valkude vastus ehk UPR (ingl *unfolded protein response*) (Fonseca *et al.*, 2010). UPR on signaalirada, mille ülesandeks on ülesreguleerida valkude voltumises osalevate šaperonide ekspressiooni, vähendada valgusünteesi ja lagendada valesti voltunud valke eesmärgiga taastada rakus homöostaas (Ron ja Walter, 2007; Rutkowski ja Kaufman, 2007). WFS1 valku peetakse UPRi komponendiks, mis reguleerib ERI stressi maandamises osalevate geenide ekspressiooni (Fonseca *et al.*, 2010).

WSi puhul on tulenevalt puudulikust või defektsest WFS1 valgust ERi stressimarkerid ülesreguleeritud, UPR pidevalt aktiveeritud ning selle tulemusena võidakse suunata rakud apoptoosi (Fonseca *et al.*, 2010). Uuringud on näidanud, et WSiga kaasnev pankrease beeta-rakkude hävimine ja neuronite väärtalitlus on põhjustatud kõrgest ERi stressitasemest nendes rakkudes (Fonseca *et al.*, 2010; Kakiuchi *et al.*, 2006; Riggs *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006). Arvatakse, et ERi stress võib kutsuda esile retseptorite pidevast ülestimuleeritusest põhjustatud eksitotoksilisuse, mis lõppeb samuti rakkude apoptoosiga (Sokka *et al.*, 2007). ERi stressi ja sellest tingitud UPRi seostatakse ka neurodegeneratiivsete haigustega, Alzheimeri tõve (Hoozemans *et al.*, 2005) ja Parkinsonismiga (Hoozemans *et al.*, 2007). See annab alust arvata, et ka WSiga kaasnev neurodegeneratsioon võib olla põhjustatud nende haigustega sarnastest häiretest ERi funktsioneerimises.

1.3. Wolframi sündroomiga kaasnev suhkurdiabeet

WSiga patsientidel avaldub kõigepealt suhkurdiabeet, mille esimesed sümptomid ilmnevad keskmiselt kuuendal eluaastal ning haigusega toimetulemiseks vajavad nad elu lõpuni insuliini asendusravi (Barrett *et al.*, 1995) (joonis 1). Pankrease beeta-rakkudes, kus toimub insuliini biosüntees ja sekreteerimine, ekspresseeritakse ka WFS1 valku ja uuringud on näidanud, et WFS1 valgu tase tõuseb rakkudes ERi stressi korral (Fonseca *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2004). WSi puhul on aga beeta-rakkudes vähenenud WFS1 tase, mistõttu ei suudeta neis ERi stressi leevendada ja see võib omakorda käivitada rakkudes apoptoosiraja (Fonseca *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006). Pankrease beeta-rakkude hävimist kinnitab ka WSiga patsientide *post mortem* uuring (Karasik *et al.*, 1989).

1.4. Wolframi sündroomiga kaasnev neurodegeneratsioon

WSiga kaasnevad neuroloogilised sümptomid (nägemise ja kuulmise kadu, ataksia, düsfaagia, kognitiivsete võimete halvenemine ning ajutüve atroofia) on põhjustatud järk-järgult süvenevast neurodegeneratsioonist, mistõttu peetakse WSi progressiivseks neurodegeneratiivseks häireks (Barrett *et al.*, 1995; Hilson *et al.*, 2009; Urano, 2016). *WFS1* geen on ajus (nt ajutüves, hipokampuses, mandeltuumades (*amygdalae*) ja prefrontaalses korteksis), aga ka kuulmistes ja silma võrkkesta ganglionirakkudes ulatuslikult ekspresseeritud (Cryns *et al.*, 2003; Kawano *et al.*, 2009; Luuk *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2006).

WSile iseloomulikud nägemishäired on põhjustatud rakkude hävimisest nägemise juhteteedes. *Post mortem* lahangud kinnitavad, et WSiga patsientidel esineb atroofia optilises närvis ja nägemisnärvide kiasmis (Barrett *et al.*, 1997; Hilson *et al.*, 2009). WSiga patsientidel on vähenenud suuraju visuaalkoore ruumala (Lugar *et al.*, 2016). Samuti on kirjeldatud ganglionirakkude hävimist silma võrkkestas (Hilson *et al.*, 2009) ning talamuse ruumala kahanemist iseäranis selle posterioorses osas asuvates struktuurides (*pulvinar*, külgmise posterioorne ja külgmise genikulaat tuum), mille neuronid saavad ja võtavad vastu signaale nägemissüsteemist (Hilson *et al.*, 2009; Lugar *et al.*, 2019). Atroofia tõttu nägemise juhteteedes halveneb WSiga patsientidel järk-järgult värvitaju ja nägemisteravus ning lõpuks võidakse jääda pimedaks, nii et säilib üksnes võime eristada valgust ja pimedust (Barrett *et al.*, 1997). Lisaks nägemisdefektidele on WSiga patsientidel kirjeldatud horisontaalset silmavärinat ehk nüstagmi ja silmaläätse hägustumist ehk katarakti (Barrett *et al.*, 1997).

Keskajust, piklikajust ja ajusillast moodustunud ajutüvi vastutab organismi elutähtsade funktsioonide (hingamine, südame ja veresoonkonna töö) ning reflektorsete tegevuste (neelamine, oksendamine, köhimine jm) eest. WSiga patsientidel on kirjeldatud ulatuslikku ajutüve atroofiat (Barrett *et al.*, 1995), lisaks on neil vähenenud ajusilla, *tegmentumi*, keskaju ja piklikaju ruumala (Lugar *et al.*, 2016). Ajutüve atroofia tagajärjel kaob patsientidel kuulmis- ja maitsmismeel ning esineb uneapnoe ja düsfaagia (Urano, 2016). Neuronite hävimine ajutüve hingamiskeskuses on põhjuseks, mis enamik WSiga patsientidest hingamispuudulikkusesse sureb (Barrett *et al.*, 1995).

Wfs1 geeni ekspresseeritakse rottide ja hiirte hipokampuses (Luuk *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2001), aju limbilisse süsteemi kuuluvas struktuuris, mida seostatakse mälu ja emotsioonidega. Hipokampuse ruumala vähenemine korreleerub kognitiivsete võimete langusega (Apostolova *et al.*, 2012) ja on Alzheimeri tõvele iseloomulikuks sümptomiks (Barnes *et al.*, 2009; Dubois *et al.*, 2014; Henneman *et al.*, 2009; Jack *et al.*, 2004; Morra *et al.*, 2009; Pini *et al.*, 2016). WSiga patsientidel on kirjeldatud neurodegeneratiivsete haigustega kaasnevat mälu halvenemist, intellektuaalse võimekuse ja õppimisvõime langust (Chaussebot *et al.*, 2011; Swift *et al.*, 1990) ning see annab alust arvata, et WSiga kaasnev neurodegeneratsioon sarnaneb teiste neurodegeneratiivsete haigustega.

Hipokampuse atroofiat on täheldatud depressiooni (Arnone *et al.*, 2012; Bremner *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 2009) ja ärevushäiretega (Villarreal *et al.*, 2002) patsientidel. Ka WSiga patsientidel diagnoositakse sageli meeleoluhäireid, nt depressioon ja bipolaarne häire, ning ärevushäireid

(Swift *et al.*, 1990). Seega võib WSiga patsientide meeleoluhäiretega kaasneda samuti hipokampuse atroofia. Hipokampuse ruumala vähenemist on kirjeldatud vaid mõnel WSiga patsiendil (Zmyslowska *et al.*, 2014) ning edasised uuringud on vajalikud, et teha kindlaks, kas hipokampuse atroofia on WSile iseloomulik sümptom.

Lisaks hipokampuse atroofiale seostatakse kognitiivsete võimete langust aju külgvatsakeste laienemisega (Goukasian *et al.*, 2019) ning seda on täheldatud vananemise ja neurodegeneratiivsete haiguste, Alzheimeri tõve ja Parkinsonismi puhul (Chou *et al.*, 2009; Nestor *et al.*, 2008). WSiga patsientidel on samuti kirjeldatud kognitiivsete funktsioonide halvenemist, sh õppimiskäitumiseid, mälu- ja kõnehäireid (Chausselet *et al.*, 2011; Hardy *et al.*, 1999; Nickl-Jockschat *et al.*, 2008). Vastupidiselt varasematele tulemustele leiti ühes hiljutises uuringus, et nooremas eas WSiga patsientide kognitiivne seisund on hea (Bischoff *et al.*, 2015) ja seetõttu oleks vaja teha uuringuid selgitamiseks välja, millal hakkab WSiga patsientide vaimne võimekus halvenema. Kuna vaimse võimekuse halvenemist on WSiga patsientide hulgas siiski diagnoositud (Chausselet *et al.*, 2011; Hardy *et al.*, 1999; Nickl-Jockschat *et al.*, 2008) oleks vajalik uurida, kas selle võimalik põhjus – külgvatsakeste laienemine – leiab kinnitust ka WSiga patsientidel.

1.5. Wolframi sündroomi rotimudel

WSi ja selle võimalike ravimpreparaatide uurimiseks on Tartu Ülikooli katseloomakeskuses aretatud WFS1-puudulik rotimudel. Rottidel tekitati *Wfs1* geeni viiendas eksonis deletsioon, mille tulemusena ei sünteesita neil funktsioneerivat wolframiini valku ja areneb välja WSi iseloomustav sümptomaatika (Plaas *et al.*, 2017).

WSi kulgu WFS1-puudulikus rotis on kirjeldatud joonisel 2. WFS1-puudulikel rottidel ilmneb järk-järgult süvenev glükoositalumatus, mis lõppeb glükosuuria, hüperglükeemia, suhkurdiabeedi ja suure kaalulangusega. Pankrease beeta-rakkude kadumise tõttu väheneb mutantsetes rottides ka glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsioon. WSi rotimudelis on kirjeldatud ka ajutüve ruumala vähenemist, iseäranis oliivtuumade piirkonnas. WFS1-mutantsetel rottidel avaldub ka reetina gliosis ning optilise närvi atroofia ja selle müeliini deorganiseerimine. Piklikaju neurodegeneratsioonimuster on sarnane nii WFS1-puudulikel rottidel kui ka WSiga patsientidel. WSiga rottide haiguspilt ja sümptomite ilmnemine vastab inimese haiguskulule ja seetõttu sobib WS rotimudel selle haiguse uurimiseks ja võimalike ravimpreparaatide väljatöötamiseks (Plaas *et al.*, 2017).



Roti elukuud:



Joonis 2. WSi kulg WFS1-puudulikus rotis (Plaas *et al.*, 2017; Seppa *et al.*, 2019; Toots *et al.*, 2018, kohandatud, roti joonistuse autor Andre Uibos). Joonisel on toodud välja WFS1-puudulikus rotis kirjeldatud haigusnähtumid ja nende esinemisaeg.

1.6. Wolframi sündroomi kulgu pidurdavad teraapiad

WSi jaoks puudub ravi ja seetõttu keskenduvad ravistrateegiad eelkõige sümptomite leevendamisele ning haiguskulu pidurdamisele. Patsientide seisundit jälgitakse pidevalt, et hinnata haiguse progresseerumist ja kasutuses olevate ravimite mõju haigusnähtude leevendamisele (Rigoli *et al.*, 2018).

WSiga patsientide ravi fookuses on varakult algav suhkurdiabeet ning patsiendid vajavad eluaegset insuliini asendusravi (Rigoli *et al.*, 2018). WSiga loomudelites on diabeedirohtudena klassifitseeritavaid glükagoonilaadne peptiid-1 (GLP-1) retseptori agoniste edukalt katsetatud diabeedi ravimiseks ja ennetamiseks. GLP-1 retseptori agonist eksenatiid suurendas hiirtega tehtud katsetes insuliini sekretsiooni ja parandas veresuhkru taset (Kondo *et al.*, 2018; Sedman *et al.*, 2016). Katses homosügootsete WFS1-puudulike hiirtega selgus, et diabeedirohuna kasutataval ravimil pioglitazonil on diabeeti ennetav toime (Akiyama *et al.*, 2009). Üheks uueks potentsiaalseks ravimikandidaadiks on GLP-1 retseptori agonistide hulka kuuluv liraglutiid (Toots *et al.*, 2018). WFS1-puudulike rottidega tehtud uuringus näidati, et varakult alustatud ravikuur liraglutiidiga parandab glükoositaluvust, suurendab insuliini ning normaliseerib glükagooni sekretsiooni (Toots *et al.*, 2018). Liraglutiid vähendas rottidel ka ERI stressi ja põletikku insuliini tootvates Langerhansi saartes (Toots *et al.*, 2018).

Lisaks diabeedile kaasnevad WSiga mitmed teised haigused (nt kurtus, nägemise kadu ja neurodegeneratsioon, vt 1.4), mille jaoks puudub praegu efektiivne ravi. Optilise närvi atroofiast tingitud nägemisvõime kadumise taastamiseks testiti ühel WSiga patsiendil Leberi päriliku optilise neuropaatia ravis kasutatavat idebenooni, mille tulemusena patsiendi nägemine küll paranes, kuid põhjapanevate järelduste tegemiseks oleks vaja katset korrata suurema valimiga (Bababeygy *et al.*, 2012). Uuringus WFS1-puudulike rottidega ilmnes siiani vaid potentsiaalse diabeediravimina katsetatud (Toots *et al.*, 2018) GLP-1 retseptori agonisti liraglutiidi neuroprotektiivne toime (Seppa *et al.*, 2019). Mitu kuud kestnud ravi liraglutiidiga vähendas WSiga rottidel neuropõletikku ja ERI stressi ajutüve oliivtuumades ning hoidis ära optilise närvi aksonite ja reetina ganglionirakkude hävimise (Seppa *et al.*, 2019).

WFS1 valk osaleb ERI stressi reguleerimises (Fonseca *et al.*, 2010) ning ERI stressimarkereid on leitud WFS1-puudulike rottide reetinas, pankreases ja ajutüves (Plaas *et al.*, 2017). ERI stress võib omakorda põhjustada oksüdatiivset stressi (Zeeshan *et al.*, 2016) ning seetõttu võiks WSi võimalike ravimitena uurida nii oksüdatiivset kui ka ERI stressi mõjutavaid preparaate.

Wfs1 mRNA ekspressiooni ja ERi stressivastust reguleeriv valproehape (Kakiuchi *et al.*, 2009) parandas akuutsel manustamisel WFS1-puudulike hiirte glükoositolerantsust (Terasmaa *et al.*, 2011). Valproehape krooniline manustamine WFS1-puudulikele hiirtele andis aga vastupidise efekti ning katseloomade glükoositolerants hoopis halvenes (Punapart *et al.*, 2014). Sellest hoolimata on valproehape jõudnud ravimite kliinilise uuringu teise faasi ning seda testitakse WSiga patsientidel (Abreu ja Urano, 2019). Uurea tsükli häirete ravis kasutatav 4-fenüülbutüraat osaleb valkude voltumises ja vähendab seega vale konformatsiooniga valkude kuhjumisest põhjustatud ERi stressi (Kolb *et al.*, 2015). Transkriptsioonifaktorit CHOP seostatakse ERi stressist põhjustatud rakusurmaga ning katses valproehape ja 4-fenüülbutüraadiga leiti, et mõlemad ravimid alandasid WFS1-puudulikes rakukultuurides selle transkriptsioonifaktori taset ja kaitsesid seega rakke apoptoosi eest (Batjargal *et al.*, 2020).

WFS1 valgu üheks ülesandeks on rakusisese kaltsiumikontsentratsiooni reguleerimine (Takei *et al.*, 2006) ning seetõttu uuritakse potentsiaalsete ravimikandidaatidena ühendeid, mis mõjutavad ERi kaltsiumitaset. Kalpainen on kaltsiumist sõltuv proteaas, mille aktivatsiooni seostatakse beeta-rakkude väärtalitluse ja apoptoosiga (Huang *et al.*, 2010). Kalpainen taset maha suruv ravim dantroleen suutis WFS1-puudulikes rakukultuurides taastada kaltsiumi homöostaasi ja hoidis ära WSiga patsientide indutseeritud pluripotentsetest rakkudest loodud neuraalsete tüvirakkude surma (Lu *et al.*, 2014). See annab alust arvata, et dantroleenil võiks olla mõju WSiga kaasneva beeta-rakkude hävimise ennetamiseks ja neurodegeneratsiooni ravimiseks.

Lisaks tavapärasele sümptomaatilisele ravile loodetakse WSi puhul tulevikus kasutada ka regeneratiivmeditsiini, et parandada WSi tõttu kahjustunud kudesid, ja geeniteraapiat, millega suudetakse asendada vigane *WFS1* geen tervega (Abreu ja Urano, 2019). WSiga patsientide fibroblastidest on loodud indutseeritud pluripotentsed tüvirakud (Lu *et al.*, 2014), mida võiks tulevastes uuringutes suunata diferentseeruma nt pankrease beeta-rakkudeks või silma võrkkesta ganglionirakkudeks, et kasutada neid rakuteraapias WSi tõttu kahjustada saanud kudede taastamiseks (Abreu ja Urano, 2019). CRISPR-Cas9 tehnoloogia abil suudeti WSiga patsientidelt võetud beeta-rakkudes parandada *WFS1* geenis tekkinud mutatsioon ja selle tulemusena muutusid rakud uuesti võimeliseks sekreteerima insuliini (Maxwell *et al.*, 2020). Diabeedihaigetele hiirtele siirdati CRISPRiga parandatud beeta-rakud pankrease saarekestena ning selle tulemusena alanes katseloomadel veresuhkru tase, paranes glükoositolerants ja suurenes insuliini tase (Maxwell *et al.*, 2020).

WSi kulgu pidurdavaid ravistrateegiaid on püütud leida, kuid siiani puudub ravim, mis aitaks leevendada kõiki sündroomiga kaasnevaid sümptomeid. Samuti pole lõplikult teada praegu kasutatavate ravimite efektiivsus ja nende mõju WSist põhjustatud neurodegeneratsiooni, kurtuse ja pimedaksjäämise ennetamisele. WSi rotimudeliga tehtavatest katsetest võiks olla tulevikus abi, et töötada välja uusi potentsiaalseid ravimeid ka WSiga inimpatsientide jaoks.

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

WSiga kaasnev neurodegeneratsioon põhjustab patsientidele suurt elukvaliteedi langust ning on ka peamiseks surmateguriks. Neurodegeneratsiooni on WSi puhul vähe uuritud ja praegu puuduvad efektiivsed ravistrateegiad selle ennetamiseks ning ravimiseks. WSiga kaasnevaid neuroloogilisi sümptomeid on kirjeldatud ka teiste neurodegeneratiivsete haigustega (nt Alzheimeri tõbi ja Parkinsonism) patsientidel, kellel need võivad olla põhjustatud hipokampuse atroofiast ja ajuvatsakeste laienemisest (vt 1.4). Sellest tulenevalt on tarvilik uurida, kas ka WSi rotimudelil esineb muutusi nimetatud ajustruktuurides ja kas liraglutiid, mida on edukalt katsetatud WSiga kaasneva diabeedi ravis ning millel näib olevat neuroprotektiivne efekt, suudab hoida ära hipokampuse ruumala vähenemist ja külgvatsakeste laienemist.

Uurimistöö eesmärgid:

1. Selgitada välja, kas WSi rotimudelil väheneb kuue kuu jooksul hipokampuse ruumala.
2. Selgitada välja, kas WSi rotimudelil suureneb kuue kuu jooksul aju külgvatsakeste ruumala.
3. Uurida, kas krooniline ravi liraglutiidiga suudab WSi rotimudelil hoida ära hipokampuse ruumala vähenemist.
4. Uurida, kas krooniline ravi liraglutiidiga suudab WSi rotimudelil pidurdada külgvatsakeste ruumala suurenemist.
5. Selgitada välja, kas WSi rotimudeli neurodegeneratsioon sarnaneb teiste neurodegeneratiivsete haigustega (nt Alzheimeri tõbi ja Parkinsonism).

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Katseloomad

WFS1-puudulike (*Wfs1* 5. eksoni nokaut (KO)) rottide aretust ja fenotüüpi on kirjeldanud Plaas *et al.*, 2017. Katseloomade aretus ning genotüpiseerimine viidi läbi Tartu Ülikooli katseloomakeskuses. Käesolevas töös on kasutatud isaseid homosügootseid WFS1-puudulikke ja kontrollgruppi kuuluvaid metsiktüüpi (WT) rotte. Loomad olid paigutatud puuridesse kahekuni neljakaupa ning neid hoiti 12-tunnises hele/pime tsüklis (hele tsükkel algas kl 07.00). Rotid said sööki ja jooki tarbida piiramatult (*ad libitum*), kuid mitte katse toimumise ajal. Loomade toitmiseks kasutati Sniffi universaalset hiire- ja rotisööta (Sniff #V1534) ning joogiks pöördosmoosiga puhastatud vett. Loomadega tehti katseid ajavahemikus kl 09.00–17.00. Loomkatseid viis läbi vastava kategooria luba omav isik ning käesoleva töö autor tegutses koostöös juhendajaga. Loomkatsete protokollid on kinnitanud loomkatseprojekti loakomisjon (Nr 103, 22. mai 2017) ja kõik katsed on vastavuses 2010. aasta septembris vastu võetud Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiviga (2010/63/EL).

2.2.2. Krooniline ravi liraglutiidiga

Katseplaani on avaldatud täpsemalt Seppa *et al.* 2019. Kasutatud on samu katseloomi, kuid varem pole neil käesolevas töös analüüsitud ajustruktuure (hipokampus ja külgvatsakesed) uuritud.

Katset alustati kaheksa kuu vanuste rottidega. Rotid jaotati juhuslikult liraglutidi ja kontrollgruppidesse (WT Sal, n = 6; WT Lira, n = 7; KO Sal, n = 6; KO Lira, n = 8). Kuus kuud väldanud katse jooksul manustati liraglutidi gruppi kuuluvatele rottidele nahaaluselt ehk subkutaanselt 0,4 mg/kg liraglutidi (Novo Nordisk, Denmark) ja kontrollgruppi kuuluvatele loomadele samuti subkutaanselt 0,9% füsioloogilist lahust (Sal). 1 ml/kg süste tehti kord päevas ajavahemikus kl 08.00–11.00.

2.2.3. Andmete analüüs

Katses kogutud andmete analüüsimiseks kasutati GraphPad Prism 6. versiooni tarkvara (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistilise olulisuse määramiseks valiti p-väärtus väiksem kui 0,05 ($p < 0,05$). Katseandmed on esitatud kujul keskmine \pm SEM (ingl *Standard*

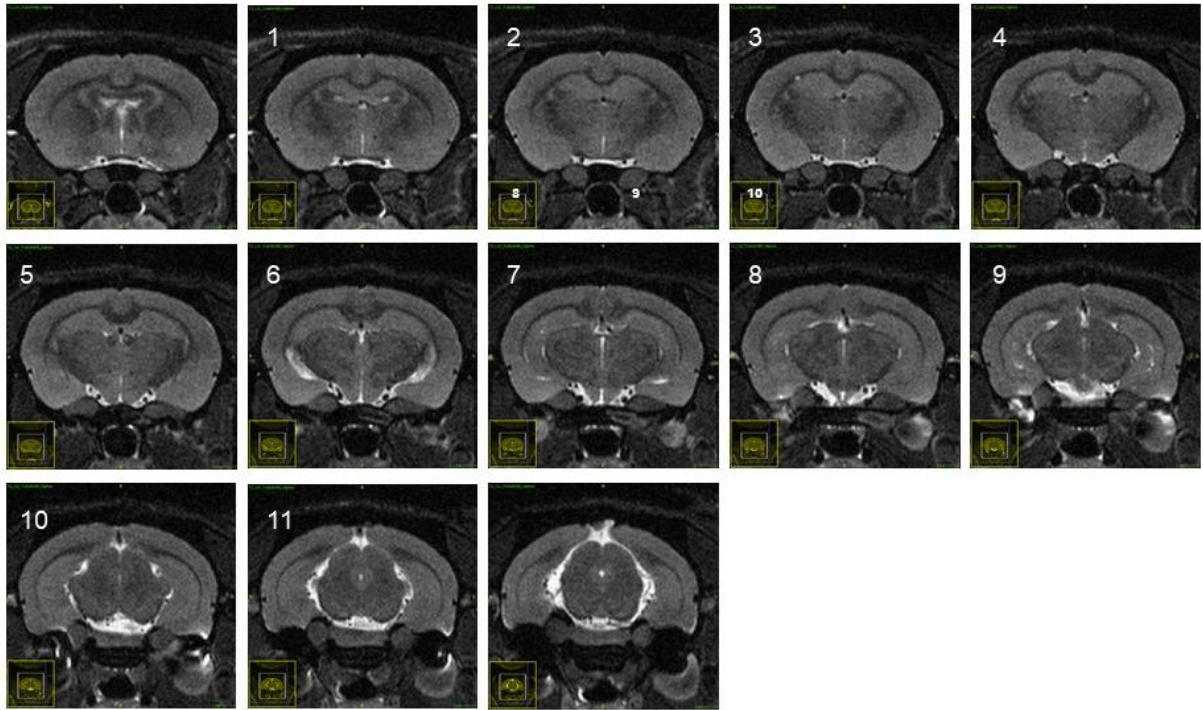
Error of the Mean) ning keskmiste võrdlemiseks kasutati kordusuuringu dispersioonanalüüsi (*Repeated Measures ANOVA*) ja *post hoc* testina Bonferroni testi. Statistilist olulisust võrreldi genotüüpide ja ravimeetodi vahel. Omavahel võrreldi järgmiste gruppide keskmisi: WT Sal ja KO Sal, WT Lira ja KO Lira, KO Sal ja KO Lira, WT Sal ja WT Lira.

2.2.4. *In vivo* magnetresonantstomograafia

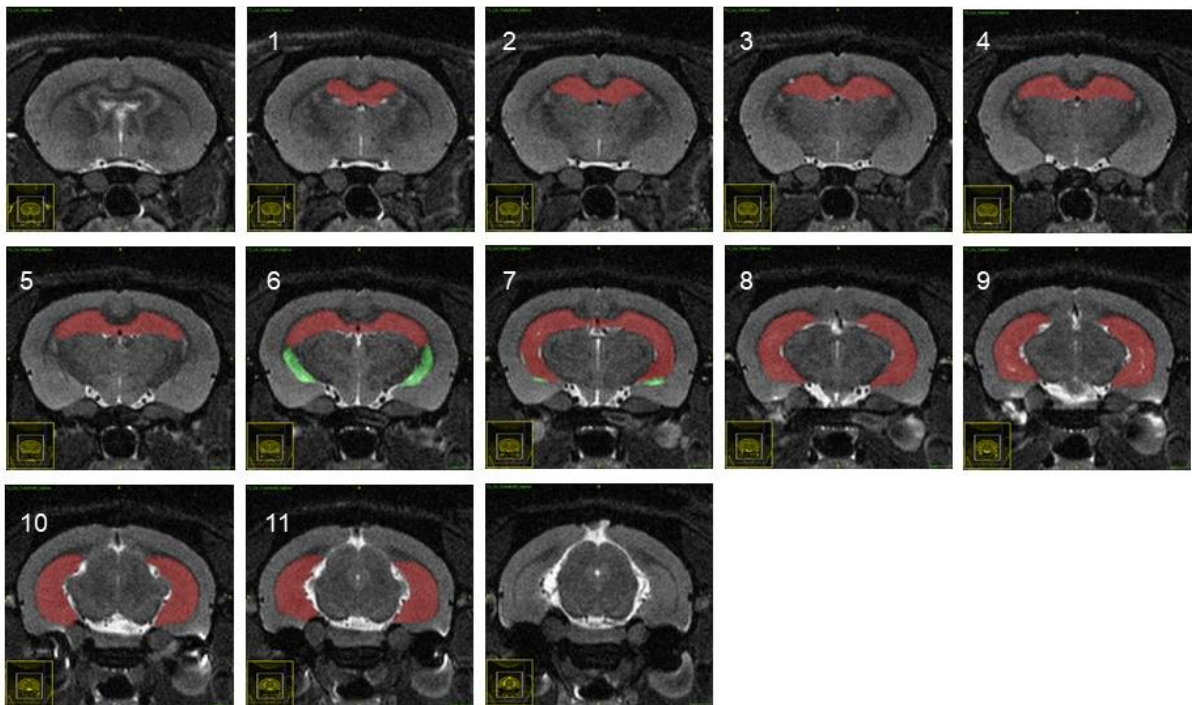
Kaheksa kuni neljateistkümne kuu vanused katseloomad, keda kirjeldatakse peatükis 2.2.1, anestesiseeriti isofluraaniga (1,5–2,5% isofluraani 1,5 l/min meditsiinilises hapnikus) ja neid hoiti kogu magnetresonantstomograafia (MRT) protseduuri ajal soojendatud loomapadjal. Skaneeringute tegemiseks kasutati 9,4 T Bruker BioSpec 94/20 USR süsteemi, mis on ühendatud 1 H tsirkulaarse polariseeritud transiivermähisega ja ParaVision 6.0.1® tarkvaraga (Bruker BioSpin Group, Bruker Corporations, Germany). Katseloomade hingamissagedust hoiti vahemikus 35–50 hingetõmmet minutis ning sageduse mõõtmiseks kasutati hingamispatja (SA Instruments Inc., Stony Brook, USA). Loomade kehatemperatuuri mõõdeti rektaalsondiga (SA Instruments Inc., Stony Brook, USA). Looma asendi ja anotoomiliste pidepunktide paikapanemiseks tehti enne lõplikke skaneeringuid kaks eri orientatsioonis pilootskaneeringut. Lõplik T2-kaalutud Turbo RARE sekvents viidi läbi kasutades järgmisi parameetreid: kordusaeg (ingl *repetition time*, TR) 6803 ms, kajaage (ingl *echo time*, TE) 33 ms, pöördnurk (ingl *flip angle*) 90 kraadi, keskmiste arv 5, kuvamismaatriks 320 x 320 x 65 ja ruumiline resolutsioon 0,16 x 0,16 x 0,5 mm.

Huvipakkuvate ajuosade segmenteerimiseks kasutati ITK-SNAP tarkvara (V3.6.0) (Yushkevich *et al.*, 2006) ja segmenteerimist teostav vaatleja ei teadnud rottide genotüüpe. Hipokampust ja külgvatsakesi segmenteeriti üheteistkümmel järjestikusel lõigul (joonis 3 ja 4). Hipokampust segmenteeriti kuni talamuse kaudaalse lõpposani lõikudel, mis asuvad bregma suhtes anterioorselt –1,45 mm kuni –5,82 mm. Külgvatsakeste segmenteerimisel lähtuti T2-kaalutud MR kuvanditel ilmnevast hüperintensiivsest vedeliku signaalist ja segmenteeritavad lõigud jäid bregma suhtes keskmiselt vahemikku –3,01 mm kuni –4,57 mm.

Segmenteerimise aluseks olevate anotoomiliste pidepunktide määramiseks kasutati Scalable Brain Atlast (Bakker *et al.*, 2015, Kjonigsen *et al.*, 2015, Papp *et al.*, 2014, Sergejeva *et al.*, 2015).



Joonis 3. T2-kaalutud MR kuvandite seeria (rostraalsest osast kaudaalseni), bregma vahemikus $-1,45$ mm kuni $-5,82$. Numbrid tähistavad hipokampuse ja külgvatsakeste ruumalade mõõtmiseks segmenteeritud lõike.

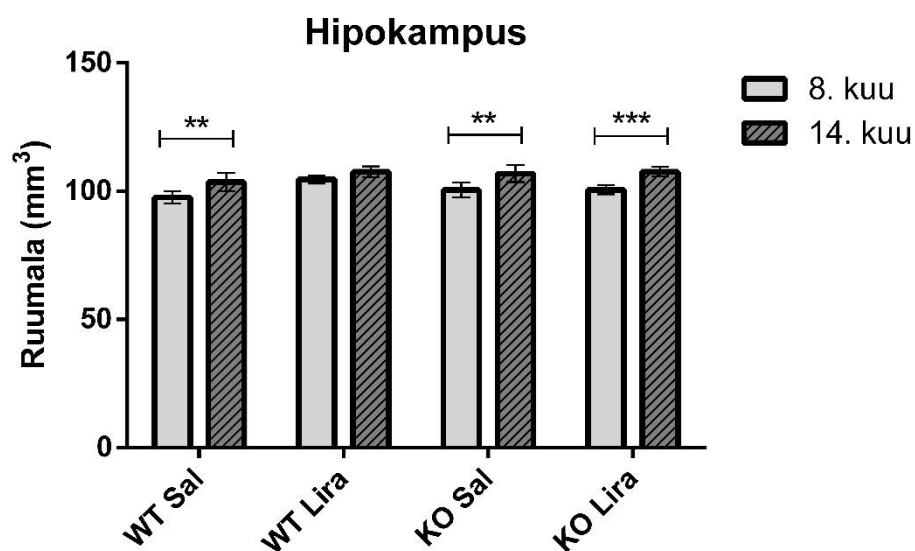


Joonis 4. T2-kaalutud MR kuvandite seeria koos näitlikustavate segmentatsioonidega. Punasega on märgitud hipokampus ning rohelisega külgvatsakesed. Numbrid tähistavad huvipakkuvate ajuosade ruumalade mõõtmiseks segmenteeritud lõike. Hipokampuse kvantitatiivne analüüs viidi läbi üheteistkümmel järjestikusel lõigul bregma vahemikus $-1,45$ mm kuni $-5,82$, külgvatsakeste puhul bregma vahemikus $-3,01$ mm kuni $-4,57$ mm.

2.3. Tulemused

2.3.1. Hipokampuse ruumala analüüs

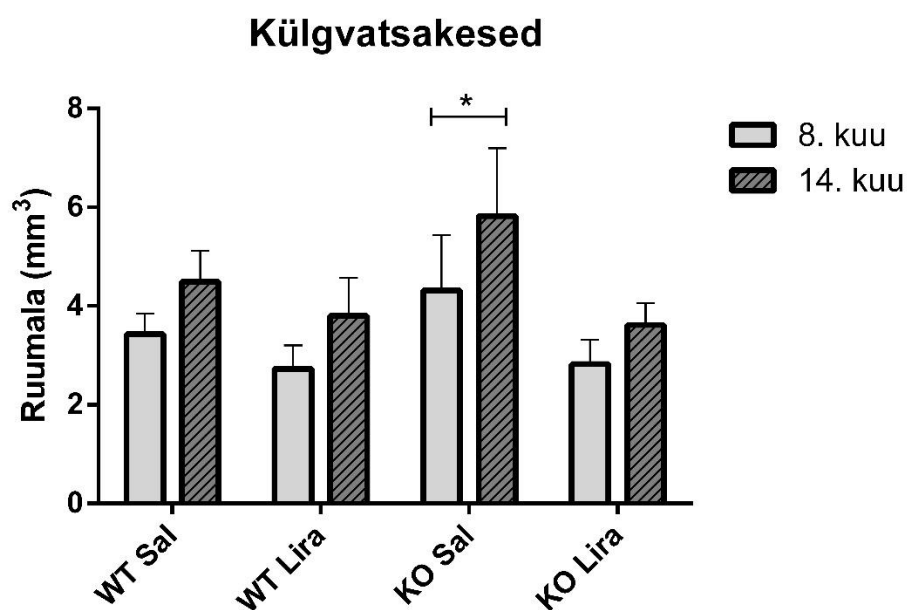
Katse alguses ja pärast kuus kuud kestnud ravi liraglutiidiga viidi läbi *in vivo* MRT. Hipokampuse kvantitatiivseks analüüsiks kasutati T2-kaalutud MR kuvandite seeria ühteteistkümnet järjestikust lõiku, mis asusid bregma suhtes vahemikus $-1,45$ mm kuni $-5,82$ (joonis 4). Bonferroni *post hoc* test näitas, et kontrollgruppi kuulunud WT rottidel (joonis 5) oli pärast kuus kuud kestnud katset hipokampuse ruumala suurenenud ($p < 0.01$). Liraglutiidiravi saanud WT loomade hipokampuse ruumala suurenemine ei olnud statistiliselt oluline ($p > 0,05$). Hipokampuse ruumala suurenes kuue kuu jooksul nii WFS1-puudulikel kontrollgruppi ($p < 0.01$) kui ka ravimit saanud grupi loomadel ($p < 0.001$).



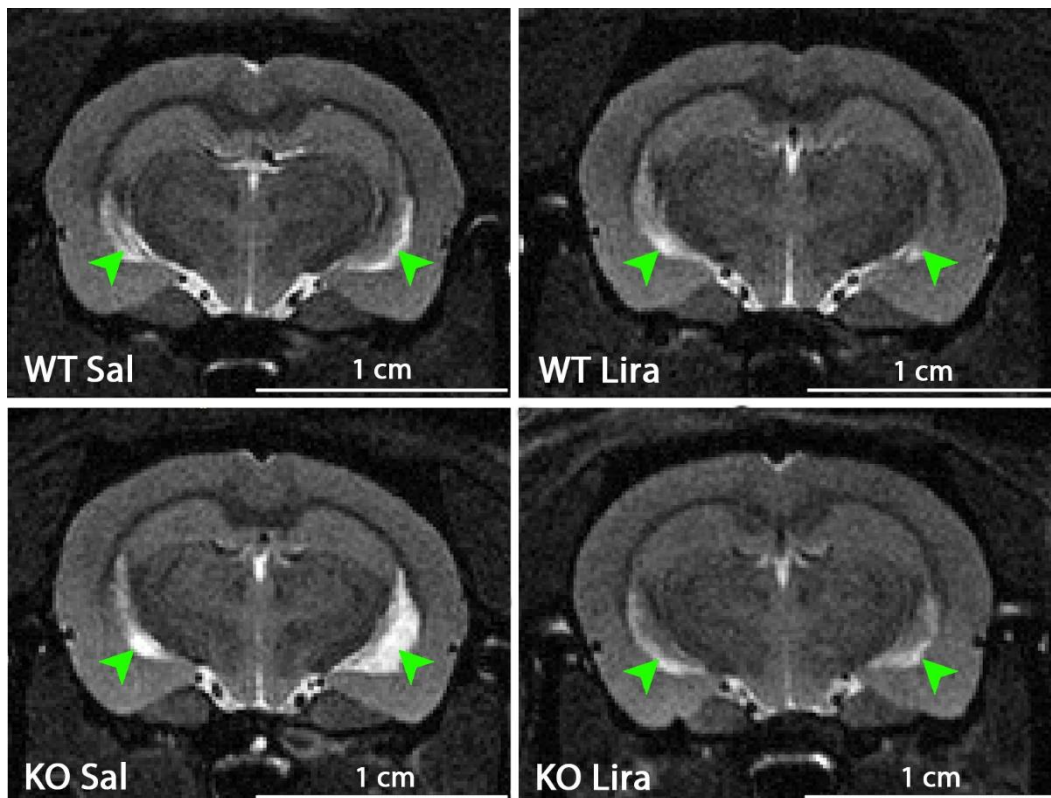
Joonis 5. Muutused rottide hipokampuse ruumalas pärast kuus kuud kestnud ravi liraglutiidiga. Analüüside tegemiseks võrreldi hipokampuse ruumalaid katseloomade 8. ja 14. elukuul. Ruumalade mõõtmiseks segmenteeriti ITK-SNAP tarkvaraga üksteist järjestikust T2-kaalutud MR kuvandit. Hipokampuse ruumala mõõtmiseks segmenteeritud lõigud asusid bregma suhtes vahemikus $-1,45$ mm kuni $-5,82$ mm. WT kontrollgruppi (WT Sal) ning WFS1-puuduliku kontroll- ja ravimigrupi (vastavalt KO Sal ja KO Lira) loomadel suurenes pärast kuus kuud kestnud katset hipokampuse ruumala. Liraglutiidiravi saanud WT grupi (WT Lira) hipokampuse ruumala suurenemine ei olnud statistiliselt oluline. Andmeanalüüsiks kasutati kordusuuringu dispersioonanalüüsi (*Repeated Measures ANOVA*) ja *post hoc* testina Bonferroni testi, kus ** $p < 0,01$ ja *** $p < 0,001$. Katseandmed on esitatud kujul keskmine \pm SEM ning valimimahud on järgmised: WT Sal, $n = 6$; WT Lira, $n = 7$; KO Sal, $n = 6$; KO Lira, $n = 8$.

2.3.2. Külgvatsakeste ruumala analüüs

In vivo MRT viidi läbi katse alguses ning pärast kuus kuud kestnud ravi liraglutiidiga. Külgvatsakeste kvantitatiivseks analüüsiks kasutati T2-kaalutud MR kuvandite seeria ühteteistkümnet järjestikust lõiku (joonis 4), mis asusid bregma suhtes keskmiselt vahemikus $-3,01$ mm kuni $-4,57$ mm. WFS1-puudulikel kontrollgrupi loomadel ilmnas pärast kuus kuud kestnud katset külgvatsakeste laienemine ja see erinevus on statistiliselt oluline ($p < 0,05$) (joonis 6). Kuus kuud liraglutiidiravi ravi saanud WT ja KO loomadel külgvatsakeste ruumala küll suurenes, ent tulemused ei olnud statistilised olulised (WT Sal $p > 0,05$, KO Lira $p > 0,05$). Kontrollgrupi WT loomade külgvatsakeste laienemine ei olnud samuti statistiliselt oluline ($p > 0,05$). Näitlikustavad kuvandid erinevatesse katsegruppidesse kuuluvate rottide külgvatsakestest on toodud välja joonisel 7.



Joonis 6. Muutused rottide külgvatsakeste ruumalas pärast kuus kuud kestnud ravi liraglutiidiga. Analüüside tegemiseks võrreldi külgvatsakeste ruumalasisid katseloomade 8. ja 14. elukuul. Ruumalade mõõtmiseks segmenteeriti ITK-SNAP tarkvaraga üksteist järjestikust T2-kaalutud MR kuvandit. Külgvatsakeste ruumala mõõtmiseks segmenteeritud lõigud asusid bregma suhtes keskmiselt vahemikus $-3,01$ mm kuni $-4,57$ mm. Pärast kuus kuud kestnud katset suurenes WFS1-puudulikel kontrollgrupi rottidel (KO Sal) külgvatsakeste ruumala. WT kontrollgrupi (WT Sal), WT liraglutiidiravi saanud grupi (WT Lira) ja WFS1-puudulike liraglutiidiravi saanud grupi (KO Lira) külgvatsakeste ruumala suurenemine ei olnud statistiliselt oluline. Andmeanalüüsiks kasutati kordusuuringu dispersioonanalüüsi (*Repeated Measures ANOVA*) ja *post hoc* testina Bonferroni testi, kus * $p < 0,05$. Katseandmed on esitatud kujul keskmine \pm SEM ning valimimahud on järgmised: WT Sal, $n = 6$; WT Lira, $n = 7$; KO Sal, $n = 6$; KO Lira, $n = 8$.



Joonis 7. Näitlikustavad T2-kaalutud MR kuvandid erinevatesse katsegruppidesse kuuluvate rottide külgvatsakestest. Joonisel on näidatud MR kuvandid WT kontrollgrupi (WT Sal), WT liraglutiidiravi saanud grupi (WT Lira), WFS1-puuduliku kontrollgrupi (KO Sal) ja WFS1-puuduliku liraglutiidiravi saanud grupi (KO Lira) rottide ajudest. Külgvatsakesed ilmnevad T2-kaalutud MR kuvanditel heleda regioonina koronaallõigu vasakul ja paremal pool. WFS1-puudulikul kontrollgrupil (KO Sal) on võrreldes teiste katsegruppidega näha ulatuslikumat külgvatsakeste laienemist. Joonisel on välja toodud MR kuvandite seeria kuues lõik, mis asub bregma suhtes ligikaudu $-3,32$ mm.

2.4. Arutelu

Käesolevas töös mõõdeti hipokampuse ruumala katseloomade 8. ja 14. elukuul ning selgus, et hipokampuse ruumala suurenes kuue kuu jooksul nii WT kui ka WFS1-puudulikel rottidel (vt 2.3.1). Need tulemused on kooskõlas WSiga patsientide MR kuvandite analüüsidega, mis kinnitavad samuti, et WSiga patsientide hipokampuse ruumala ei ole tervete patsientide omast väiksem (Hershey *et al.*, 2012; Lugar *et al.*, 2016). Hipokampuse normaalseid mõõtmeid näitab ka ühe täiskasvanud patsiendi *post mortem* uuring (Hilson *et al.*, 2009). Seni on üksnes kahel WSiga patsiendil tuvastatud hipokampuse atroofiat (Zmyslowska *et al.*, 2014).

Põhjus, miks WSi rotimudelil ei esinenud hipokampuse ruumala vähenemist, võis seisneda katseloomade vanuses. Käesoleva töö katses analüüsiti 8 ja 14 kuu vanuste rottide ajusid, kuid WSi rotimudelil on näidatud, et piklikaju atroofia ilmneb alles rottide 15. elukuul (Plaas *et al.*, 2017). Rottide vananemist uurivas katses võrreldi 14, 18, 23 ja 27 kuu rottide hipokampuste ruumalaid (Hamezah *et al.*, 2017). 14-kuuste rottide hipokampuste ruumalade keskmine, mis on võrreldav käesolevas töös leitud samas vanuses rottide tulemustega, oli suurem kui vanemate rottide oma (Hamezah *et al.*, 2017). Hipokampuse atroofiat seostatakse mälu halvenemisega ja katseloomade mälukatsetes tehtud soorituse põhjal saab teha järeldusi võimalike struktuursete muutuste kohta hipokampuses. Hipokampuse atroofia ja halvemad tulemused mälukatsetes on leidnud kinnitust rottidega tehtud uuringus (Driscoll *et al.*, 2006). Morrise veelabürindi katses kulus vanematel kui 14 kuu vanustel rottidel vee alla peidetud platvormi leidmiseks kauem aega kui noorematel, mis viitab sellele, et vanematel rottidel oli mälu halvenenud (Hamezah *et al.*, 2017). Ühtlasi korreleerus halvem sooritus Morrise veelabürindis väiksema hipokampuse ruumalaga (Hamezah *et al.*, 2017). Nendest tulemustest järeldub, et hipokampuse atroofia võib WSi rotimudelil alata seni arvatust hiljem ning selle kinnitamiseks peaks tegema edasisi katseid vanemate kui 14 kuuste rottidega.

Seos hipokampuse atroofia kui WSiga kaasneva patoloogia ja sellest tingitud kognitiivsete võimete languse vahel pole veel kinnitust leidnud. Uuringud näitavad, et valdavalt on WSiga patsientide hipokampuse ruumala normaalne (Hershey *et al.*, 2012; Hilson *et al.*, 2009; Lugar *et al.*, 2016), aga patsientidel esineb mälu halvenemist, õppimisraskuseid ja üldist kognitiivsete funktsioonide häirumist (Chausseot *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2018; Nickl-Jockschat *et al.*, 2008; Shannon *et al.*, 1999). Senised uuringud WSiga patsientide kognitiivse võimekuse kohta piirduvad üksikute patsientide kirjeldustega (Nickl-Jockschat *et al.*, 2008; Shannon *et al.*, 1999) ja tuginevad osaliselt varasematele, aastakümneid tagasi kogutud andmetele (Chausseot *et al.*,

2011). Patsientide vanused on uuringutes suuresti kõikuvad ja meetodite puhul pole antud mõista, kas vaadeldavate neuroloogiliste sümptomite hulka loeti lisaks enamlevinud ataksiale ja düsfaagiale ka kognitiivsete võimete langus (Chausseot *et al.*, 2011; Giuliano *et al.*, 2005). Hiljuti tehtud uuringus 7–27-aastaste WSiga patsientidega testiti nende verbaalset ja ruumilist intelligentsust, mälu ja tähelepanuvõimet ning vastupidiselt seni avaldatud tulemustele selgus, et WSiga patsientide kognitiivne võimekus on hea ning nende testitulemused kohati isegi paremad kui kontrollgrupil (Bischoff *et al.*, 2015). Edasised uuringud suurema valimi ja kvantitatiivsete tulemustega on vajalikud, et selgitada välja, kas ja millal ilmnevad WSiga patsientidel kognitiivsed häired. Kuna WSiga patsiendid ei pruugi elada vanuseni, kus neil jõuaks avalduda hipokampuse atroofia, siis võib WSiga kaasuvate kognitiivsete häirete põhjuseks olla miski muu kui neuronite hävimine hipokampuses.

Kuigi hipokampuse atroofia pole WSi puhul laialdast kinnitust leidnud (Hershey *et al.*, 2012; Hilson *et al.*, 2009; Lugar *et al.*, 2016), siis on WSiga patsiendi hipokampuses tuvastatud neuronite degeneratsioonile eelnevat seisundit ehk aksonite paisumist (Shannon *et al.*, 1999). Neuronite paisumist on kirjeldatud käesolevas töös kasutatud WSi rotimudeli KO loomadel (Seppa *et al.*, 2019). Neuronite paisumine on seotud glutamaatergiliste N-metüül-D-aspartaadi (NMDA) retseptoritega, mille aktiveerimisega kaasneb kationide (Na^+) sissevool rakku (Rungta *et al.*, 2015). Rakusisene kationide kontsentratsiooni tõus toob kaasa anioonide ja vee liikumise rakku, mille tulemusena suureneb rakus osmootne rõhk ja rakk paisub (Rungta *et al.*, 2015). Ülemäärane NMDA retseptorite aktivatsioon põhjustab eksitotoksilisust – patoloogilist seisundit, kus närvirakkude pidev üleerutus võib muutuda neile toksiliseks ja põhjustada apoptoosi (Dong *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2017). NMDA retseptorite üleaktiveeritus võib olla neurodegeneratiivseid haigusi põhjustava närvirakkude hävimise üks põhjustest, sest NMDA retseptori antagonistid kasutatakse neurodegeneratiivsete häirete raviks ja neil on tõestatud protektiivne toime glutamaadist põhjustatud eksitotoksilisuse vastu (Miguel-Hidalgo *et al.*, 2002; Moring *et al.*, 1994). Eksitotoksilisus on otseselt seotud ka WSiga: Wfs1-puudulikud *Drosophila* neuronid olid vastuvõtlikumad eksitotoksilisusele ja neurodegeneratsioonile, mida kinnitab Alzheimeri tõvele iseloomulike toksiliste valkude taseme tõus (Sakakibara *et al.*, 2018). Eksitotoksilisusest tingitud rakusurm võib olla seega WSiga kaasneva neurodegeneratsiooni üks põhjustest.

Külgvatsakeste ruumala suurenes käesolevas töös tehtud katse jooksul kõikidel katsegruppidel, enim aga WFS1-puudulikul kontrollgrupil. Need tulemused on kooskõlas uuringuga, kus leiti samuti, et külgvatsakeste ruumala suureneb rottide vanuse kasvades (Hamezah *et al.*, 2017).

Ülemäärane ajuvatsakeste laienemine on aga patoloogia, mida seostatakse kognitiivsete võimete halvenemisega nii Alzheimeri tõve (Jack *et al.*, 2004) kui ka Parkinsonismiga patsientidel (Alegret *et al.*, 2001; Dalaker *et al.*, 2011). Ajuvatsakeste laienemist on seni kirjeldatud vaid mõnel WSiga patsiendil, kellel esines ühes vatsakeste laienemisega ka kognitiivseid häireid (Duan *et al.*, 2018; Rouzier *et al.*, 2017). Morrise veelabürindi katse tulemusena selgus, et suuremate külgvatsakestega rottidel kulus veealuse platvormi leidmiseks kauem aega ja nad mäletasid platvormi täpset asukohta halvemini (Hamezah *et al.*, 2017). See osutab halvenenud töömälule, mis võib olla põhjustatud külgvatsakeste ruumala suurenemisest (Hamezah *et al.*, 2017). Külgvatsakeste laienemine, mis on ühtlasi nii WSi kui ka neurodegeneratsiooniga kaasnevaks sümptomiks, on leidnud nüüd kinnitust ka WSi rotimudelil ja see annab alust arvata, et seda mudelit sobiks kasutada mitte ainult WSi, vaid ka neurodegeneratiivsete haiguste uurimiseks.

Ajuvatsakeste laienemine on põhjustatud aju parenhüümi ehk ajurakkude (neuronite ja gliia) hävimisest (Fox *et al.*, 2000) ja seega saab vatsakeste ruumala suureneda üksnes mõne ümbritseva ajustruktuuri ruumala vähenemise arvelt. Alzheimeri tõve üheks peamiseks sümptomiks ja haiguskulgu iseloomustavaks mõõduks on hipokampuse atroofia (Dubois *et al.*, 2014; Henneman *et al.*, 2009; Jack *et al.*, 2013), mistõttu otsustati WSi rotimudelil uurida esmajoonel just seda osa ajust. Käesolevas töös tehtud analüüside tulemusena selgus, et WFS1-puudulikel rottidel hipokampuse ruumala ei kahanenud, aga külgvatsakesed olid laienenud, mis annab omakorda alust arvata, et ilmselt toimus ruumala vähenemine mõnes teises ajustruktuuris peale hipokampuse. Alzheimeri tõvega patsientidega tehtud uuringus tuvastati lisaks vatsakeste laienemisele muutusi ka neid ümbritsevate ajuosade ruumalas ja kujus, nt mõhnkehas (*corpus callosum*), mandeltuumades (*amygdalae*), talamuses ja sabatuumas (*nucleus caudatus*) (Ferrarini *et al.*, 2006). Talamuse atroofiat on täheldatud ka WSiga patsientidel (Hershey *et al.*, 2012; Lugar *et al.*, 2019), kuid mõhnkehas, mandeltuumades ja sabatuumas pole atrofeerumise märke leitud (Hershey *et al.*, 2012; Hilson *et al.*, 2009). WSiga rotimudelil kirjeldatud ajuvatsakeste laienemise põhjus on seega veel teadmata ning selle põhjuse väljaselgitamiseks tehtavad uuringud annaksid uut informatsiooni WSiga kaasnevate muutuste kohta ajus.

Käesolevas töös suurenesid külgvatsakesed enim WFS1-puudulikel kontrollgrupi loomadel. WFS1-puudulikel rottidel, kes said kuue kuu vältel liraglutiidiravi, püsis külgvatsakeste ruumala WT loomadega samal tasemel. Põhjus, mis liraglutiidiravi saanud WFS1-puudulike loomade külgvatsakeste ruumala ei suurenenud nii palju kui WFS1-puudulikul kontrollgrupil, kes ravimit ei saanud, võib seisneda selles, et liraglutiid hoidis ära neuronite degeneratsiooni

ning koos sellega ka vatsakeste laienemise. GLP-1 retseptori agonistil liraglutiidil on tõestatud neuroprotektiivne toime: WSi rotimudelil on näidatud, et ravi liraglutiidiga vähendab ajutüves neuronite põletikku ning ERI stressi ja hoiab ära optilise närvi atroofia (Seppa *et al.*, 2019). Alzheimeri tõve hiiremudelil suutis liraglutiid takistada hipokampuse neuronite hävimist ja pidurdada mälu halvenemist (Hansen *et al.*, 2015; McClean *et al.*, 2011). Liraglutiidi positiivset mõju mälu funktsioonide taastamisele ja õppimisvõime suurendamisele kinnitavad ka mitmed teised uuringud (Han *et al.*, 2013; Porter *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2019). GLP-1 retseptori agonistidega tehtud uuringute tulemusena on selgunud, et need kaitsevad neurodegeneratsiooni loomudelil hipokampuse neuroneid (Perry *et al.*, 2002) ja suudavad ennetada eksitotoksilisusest tingitud rakusurma (Li *et al.*, 2015). Liraglutiidil võiks seega olla mõju WSist põhjustatud neurodegeneratsiooni pärssimisele ning sellega kaasnevate sümptomite leevendamisele ja ennetamisele.

Käesoleva töö tulemusena näidati, et WSi rotimudelil suurenevad kuue kuu jooksul hipokampuse ja külgvatsakeste ruumala. Külgvatsakeste laienemine oli kõige ulatuslikum WFS1-puudulikul kontrollgrupil ning kuna see patoloogia iseloomustab ka neurodegeneratiivseid häireid võiks WSi rotimudelit kasutada edaspidi ka neurodegeneratiivsete haiguste uurimiseks. Liraglutiid suutis WFS1-puudulikel loomadel vähendada külgvatsakeste laienemist, mistõttu tuleks jätkata selle ravimiga tehtavaid uuringuid, et leida ravi nii WSi kui ka neurodegeneratiivsete haiguste vastu.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti hipokampuse ja külgvatsakeste ruumala muutust WSi rotimudelis. Lisaks ruumalade mõõtmisele analüüsiti GLP-1 retseptori agonisti liraglutidi mõju nendele ajustruktuuridele. Töö läbiviimiseks kasutati *in vivo* MRTd ning ruumalade mõõtmiseks segmenteeriti T2-kaalutud MR kuvanditelt huvipakkuvad regioonid manuaalselt.

Kuus kuud kestnud katse jooksul suurenes hipokampuse ruumala nii tervetel WT kui ka WFS1-puudulikel rottidel. See tähendab, et WSi rotimudelis ei esinenud hipokampuse atroofiat ning liraglutiidil puudus sellele mõju. Külgvatsakeste ruumala suurenes samuti kõigil katsegruppidel, kuid enim WFS1-puudulikel kontrollgrupi loomadel. WFS1-puudulikel rottidel, kes said kroonilist ravi liraglutiidiga, püsis külgvatsakeste ruumala WT loomadega võrreldaval tasemel. Liraglutiid suutis seega WSi rotimudeli WFS1-puudulikel loomadel hoida ära ajuvatsakeste laienemist.

Töö tulemusena kirjeldati WSi rotimudelis esimest korda hipokampuses ja külgvatsakestes toimuvaid muutusi. Hipokampuse atroofia kui teistele neurodegeneratiivsetele haigustele (nt Alzheimeri tõbi, Parkinsonism) iseloomulik sümptom ei leidnud käesoleva töö raames kinnitust. WFS1-puudulikel loomadel esines külgvatsakeste laienemine, mis on teine neurodegeneratiivsete haigustega kaasnev sümptom, ning seega võiks WSi rotimudel sobida neurodegeneratiivsete haiguste uurimiseks. Liraglutiid suutis WFS1-puudulikes rottides hoida ära külgvatsakeste laienemist ja seetõttu sobiks seda ravimit katsetada mitte ainult WSi kaasneva neurodegeneratsiooni, vaid neurodegeneratiivsete häirete ravivõime üldiselt.

SUMMARY

Volumetric changes in the hippocampus and lateral ventricles after chronic liraglutide treatment in a rat model of Wolfram syndrome

Kaia Grete Kukker

Wolfram syndrome (WS) is a rare autosomal recessive disorder characterized by diabetes mellitus, optic nerve atrophy, deafness, diabetes insipidus and neurological disorders. Several of the impairments associated with WS (vision and hearing loss, ataxia, dysphagia, cognitive decline and the main cause of mortality – respiratory failure resulting from brainstem atrophy) are caused by progressive neurodegeneration, which is why WS is considered to be a progressive neurodegenerative disorder. Although complications of neurodegeneration lead to a significant decline in patients' quality of life, few studies have been conducted on this topic.

The neurological and psychological symptoms associated with WS have also been described in relation to patients with other neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's and Parkinson's disease). Alzheimer's and Parkinson's disease have been associated with cognitive decline (incl. memory and learning disorders), which is also seen in patients with WS, as well as with hippocampal atrophy and ventricular enlargement. Therefore, it should be examined whether these symptoms are also confirmed in a rat model of WS, which would provide a basis for using this model not only in the case of WS, but for neurodegenerative disease research more broadly. The GLP-1 receptor agonist liraglutide, which has been successfully tested for treatment of diabetes in a rat model of WS, has a proven neuroprotective effect; thus, it is necessary to investigate its ability to prevent hippocampal neuronal destruction and ventricular enlargement.

The aim of this study was to analyse volumetric changes in the hippocampus and lateral ventricles in a rat model of WS. A six-month treatment was conducted and *in vivo* MRI analyses of hippocampus and lateral ventricles were performed. The regions of interest were manually segmented from the T2-weighted MR images.

During the six-month experiment, both the volume of hippocampus and lateral ventricles in the rat model of WS increased. Lateral ventricles were most enlarged in WFS1-deficient saline treated animals. Lateral ventricular enlargement of WFS1-deficient animals that were treated with liraglutide for six months remained at the same level as in the control group. Therefore, liraglutide prevented neuronal degeneration and the concomitant ventricular enlargement.

As a result of this study, changes in the hippocampus and lateral ventricles in a rat model of WS were described for the first time. Hippocampal atrophy as a pathological characteristic of other neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's and Parkinson's disease) was not confirmed in this study. WFS1-deficient animals exhibited increased lateral ventricle volume, which is another symptom associated with neurodegenerative diseases; the rat model of WS could therefore be used to study neurodegenerative diseases. Liraglutide was able to prevent lateral ventricular enlargement in WFS1-deficient rats and would therefore be suitable for testing for the prevention and treatment of neurodegeneration associated with WS.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajat Kadri Seppat ja kaasjuhendajaid Mario Plaasi, Anton Terasmaad ja Tambet Tõnissood.

Suur tänu ka kõikidele väikestele valgete neljajalgsetele sõpradele, kellel poleks saanud teoks ei see töö ega mitmed suured teadusavastused.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abreu, D. and Urano, F. (2019). Current Landscape of Treatments for Wolfram Syndrome. *Trends in Pharmacological Sciences* 40(10): 711–714.
- Akiyama, M., Hatanaka, M., Ohta, Y., ... Tanizawa, Y. (2009). Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in *Wfs1* knockout mice. *Diabetologia* 52(4): 653–663.
- Alegret, M., Junqué, C., Pueyo, R., Valldeoriola, F., Vendrell, P., Tolosa, E., and Mercader, J. M. (2001). MRI atrophy parameters related to cognitive and motor impairment in Parkinson's disease. *Neurologia* 16(2): 63–69.
- Apostolova, L. G., Green, A. E., Babakchanian, S., Hwang, K. S., Chou, Y.-Y., Toga, A. W., and Thompson, P. M. (2012). Hippocampal atrophy and ventricular enlargement in normal aging, mild cognitive impairment (MCI), and Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 26(1): 17–27.
- Arnone, D., McIntosh, A. M., Ebmeier, K. P., Munafò, M. R., and Anderson, I. M. (2012). Magnetic resonance imaging studies in unipolar depression: Systematic review and meta-regression analyses. *European Neuropsychopharmacology* 22(1): 1–16.
- Bababegy, S. R., Wang, M. Y., Khaderi, K. R., and Sadun, A. A. (2012). Visual Improvement With the Use of Idebenone in the Treatment of Wolfram Syndrome. *Journal of Neuro-Ophthalmology* 32(4): 386–389.
- Bakker, R., Tiesinga, P., and Kötter, R. (2015). The Scalable Brain Atlas: Instant Web-Based Access to Public Brain Atlases and Related Content. *Neuroinformatics* 13(3): 353–366.
- Barnes, J., Bartlett, J. W., van de Pol, L. A., Loy, C. T., Scahill, R. I., Frost, C., Thompson, P., and Fox, N. C. (2009). A meta-analysis of hippocampal atrophy rates in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 30(11): 1711–1723.
- Barrett, T. G., Bunday, S. E., Fielder, A. R., and Good, P. A. (1997). Optic atrophy in Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Eye (London, England)* 11 (Pt 6): 882–888.
- Barrett, T.G., Bunday, S.E., and Macleod, A.F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet (London, England)* 346(8988): 1458–1463.
- Batjargal, K., Tajima, T., Jimbo, E. F., and Yamagata, T. (2020). Effect of 4-phenylbutyrate and valproate on dominant mutations of *WFS1* gene in Wolfram syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*.

- Bespalova, I. N., Van Camp, G., Bom, S. J. H., ... Lesperance, M. M. (2001). Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Human molecular genetics* 10(22): 2501–2508.
- Bischoff, A. N., Reiersen, A. M., Buttlair, A., Al-Lozi, A., Doty, T., Marshall, B. A., Hershey, T., and Washington University Wolfram Syndrome Research Group. (2015). Selective cognitive and psychiatric manifestations in Wolfram Syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 10: 66.
- Bremner, J. D., Narayan, M., Anderson, E. R., Staib, L. H., Miller, H. L., and Charney, D. S. (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *The American Journal of Psychiatry* 157(1): 115–118.
- Chaussonot, A., Bannwarth, S., Rouzier, C., Vialettes, B., Mkaem, S. A. E., Chabrol, B., Cano, A., Labauge, P., and Paquis-Flucklinger, V. (2011). Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Annals of Neurology* 69(3): 501–508.
- Chou, Y.-Y., Leporé, N., Avedissian, C., ... Thompson, P. M. (2009). Mapping correlations between ventricular expansion and CSF amyloid and tau biomarkers in 240 subjects with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and elderly controls. *NeuroImage* 46(2): 394–410.
- Collier, D. A., Barrett, T. G., Curtis, D., Macleod, A., Arranz, M. J., Maassen, J. A., and Bunday, S. (1996). Linkage of Wolfram syndrome to chromosome 4p16.1 and evidence for heterogeneity. *American Journal of Human Genetics* 59(4): 855–863.
- Cremers, C. W., Wijdeveld, P. G., and Pinckers, A. J. (1977). Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, hearing loss, diabetes insipidus, atonia of the urinary tract and bladder, and other abnormalities (Wolfram syndrome). A review of 88 cases from the literature with personal observations on 3 new patients. *Acta Paediatrica Scandinavica. Supplement*(264): 1–16.
- Cryns, K., Thys, S., Van Laer, L., Oka, Y., Pfister, M., Van Nassauw, L., Smith, R. J. H., Timmermans, J.-P., and Van Camp, G. (2003). The WFS1 gene, responsible for low frequency sensorineural hearing loss and Wolfram syndrome, is expressed in a variety of inner ear cells. *Histochemistry and Cell Biology* 119(3): 247–256.
- Dalaker, T. O., Zivadinov, R., Ramasamy, D. P., Beyer, M. K., Alves, G., Bronnick, K. S., Tysnes, O.-B., Aarsland, D., and Larsen, J. P. (2011). Ventricular enlargement and mild cognitive impairment in early Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 26(2): 297–301.

- Dong, X., Wang, Y., and Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica* 30(4): 379–387.
- Driscoll, I., Howard, S. R., Stone, J. C., Monfils, M. H., Tomanek, B., Brooks, W. M., and Sutherland, R.J. (2006). The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139(4): 1173–1185.
- Duan, L., Li, Q., Tong, A.-L., Mao, J.-F., Yu, M., Yuan, T., Chai, X.-F., and Gu, F. (2018). Clinical Characteristics of Wolfram Syndrome in Chinese Population and a Novel Frameshift Mutation in WFS1. *Frontiers in Endocrinology* 9: 18.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., ... Cummings, J. L. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *The Lancet. Neurology* 13(6): 614–629.
- Ferrarini, L., Palm, W. M., Olofsen, H., van Buchem, M. A., Reiber, J. H. C., and Admiraal-Behloul, F. (2006). Shape differences of the brain ventricles in Alzheimer's disease. *NeuroImage* 32(3): 1060–1069.
- Fonseca, S. G., Fukuma, M., Lipson, K. L., Nguyen, L. X., Allen, J. R., Oka, Y., and Urano, F. (2005). WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280(47): 39609–39615.
- Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Oslowski, ... Urano, F. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *The Journal of Clinical Investigation* 120(3): 744–755.
- Fox, N. C., Jenkins, R., Leary, S. M., Stevenson, V. L., Losseff, N. A., Crum, W. R., Harvey, R. J., Rossor, M. N., Miller, D. H., and Thompson, A. J. (2000). Progressive cerebral atrophy in MS: a serial study using registered, volumetric MRI. *Neurology* 54(4): 807–812.
- Giuliano, F., Bannwarth, S., Monnot, S., Cano, A., Chabrol, B., Vialettes, B., Delobel, B., Paquis-Flucklinger, V., and French Group of WS. (2005). Wolfram syndrome in French population: characterization of novel mutations and polymorphisms in the WFS1 gene. *Human Mutation* 25(1): 99–100.
- Goukasian, N., Porat, S., Blanken, A., ... Apostolova, L. G. (2019). Cognitive Correlates of Hippocampal Atrophy and Ventricular Enlargement in Adults with or without Mild Cognitive Impairment. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra* 9(2): 281–293.

- Guo, X., Shen, S., Song, S., ... Zhang, L. (2011). The E3 ligase Smurf1 regulates Wolfram syndrome protein stability at the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 286(20): 18037–18047.
- Hamezah, H. S., Durani, L. W., Ibrahim, N. F., Yanagisawa, D., Kato, T., Shiino, A., Tanaka, S., Damanhuri, H. A., Ngah, W. Z. W., and Tooyama, I. (2017). Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. *Experimental Gerontology* 99: 69–79.
- Han, W.-N., Hölscher, C., Yuan, L., Yang, W., Wang, X.-H., Wu, M.-N., and Qi, J.-S. (2013). Liraglutide protects against amyloid- β protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Neurobiology of Aging* 34(2): 576–588.
- Hansen, H. H., Fabricius, K., Barkholt, P., Niehoff, M. L., Morley, J. E., Jelsing, J., Pyke, C., Knudsen, L. B., Farr, S. A., and Vrang, N. (2015). The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease* 46(4): 877–888.
- Hardy, C., Khanim, F., Torres, R., ... Barrett, T. (1999). Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *American Journal of Human Genetics* 65(5): 1279–1290.
- Henneman, W. J. P., Sluimer, J. D., Barnes, J., van der Flier, W. M., Sluimer, I. C., Fox, N. C., Scheltens, P., Vrenken, H., and Barkhof, F. (2009). Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease. *Neurology* 72(11): 999–1007.
- de Heredia, M. L., Clèries, R., and Nunes, V. (2013). Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 15(7): 497–506.
- Hershey, T., Lugar, H. M., Shimony, J. S., Rutlin, J., Koller, J. M., Perantie, D. C., Paciorkowski, A. R., Eisenstein, S. A., and Permutt, M. A. (2012). Early Brain Vulnerability in Wolfram Syndrome. *PLoS One* 7(7): e40604.
- Hilson, J. B., Merchant, S. N., Adams, J. C., and Joseph, J. T. (2009). Wolfram syndrome: a clinicopathologic correlation. *Acta Neuropathologica* 118(3): 415–428.
- Hoozemans, J. J. M., van Haastert, E. S., Eikelenboom, P., de Vos, R. A. I., Rozemuller, J. M., and Scheper, W. (2007). Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354(3): 707–711.

- Hoozemans, J. J. M., Veerhuis, R., Van Haastert, E. S., Rozemuller, J. M., Baas, F., Eikelenboom, P., and Scheper, W. (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 110(2): 165–172.
- Huang, C., Gurlo, T., Haataja, L., Costes, S., Daval, M., Ryazantsev, S., Wu, X., Butler, A. E., and Butler, P. C. (2010). Calcium-activated calpain-2 is a mediator of beta cell dysfunction and apoptosis in type 2 diabetes. *The Journal of Biological Chemistry* 285(1): 339–348.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., ... Permutt, M. A. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genetics* 20(2): 143–148.
- Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., ... Trojanowski, J. Q. (2013). Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet. Neurology* 12(2): 207–216.
- Jack, C. R., Shiung, M. M., Gunter, J. L., ... Petersen, R.C. (2004). Comparison of different MRI brain atrophy rate measures with clinical disease progression in AD. *Neurology* 62(4): 591–600.
- Kakiuchi, C., Ishigaki, S., Osowski, C. M., Fonseca, S. G., Kato, T., and Urano, F. (2009). Valproate, a Mood Stabilizer, Induces WFS1 Expression and Modulates Its Interaction with ER Stress Protein GRP94. *PLoS One* 4(1): e4134.
- Kakiuchi, C., Ishiwata, M., Hayashi, A., and Kato, T. (2006). XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* 97(2): 545–555.
- Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J. S., Kahn, C. R., and Herskowitz, R. D. (1989). Genetically Programmed Selective Islet β -Cell Loss in Diabetic Subjects With Wolfram's Syndrome. *Diabetes Care* 12(2): 135–138.
- Kawano, J., Fujinaga, R., Yamamoto-Hanada, K., Oka, Y., Tanizawa, Y., and Shinoda, K. (2009). Wolfram syndrome 1 (Wfs1) mRNA expression in the normal mouse brain during postnatal development. *Neuroscience Research* 64(2): 213–230.
- Kjonigsen, L. J., Lillehaug, S., Bjaalie, J. G., Witter, M. P., and Leergaard, T. B. (2015). Waxholm Space atlas of the rat brain hippocampal region: Three-dimensional delineations based on magnetic resonance and diffusion tensor imaging. *NeuroImage* 108: 441–449.
- Kolb, P. S., Ayaub, E. A., Zhou, W., Yum, V., Dickhout, J. G., and Ask, K. (2015). The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 61:4 5–52.

- Kondo, M., Tanabe, K., Amo-Shiinoki, K., Hatanaka, M., Morii, T., Takahashi, H., Seino, S., Yamada, Y., and Tanizawa, Y. (2018). Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. *Diabetologia* 61(10): 2189–2201.
- Li, Y., Bader, M., Tamargo, I., Rubovitch, V., Tweedie, D., Pick, C. G., and Greig, N. H. (2015). Liraglutide is neurotrophic and neuroprotective in neuronal cultures and mitigates mild traumatic brain injury in mice. *Journal of Neurochemistry* 135(6): 1203–1217.
- Lu, S., Kanekura, K., Hara, T., ... Urano, F. (2014). A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(49): E5292-5301.
- Lugar, H. M., Koller, J. M., Rutlin, J., Eisenstein, S. A., Neyman, O., Narayanan, A., Chen, L., Shimony, J. S., and Hershey, T. (2019). Evidence for altered neurodevelopment and neurodegeneration in Wolfram syndrome using longitudinal morphometry. *Scientific Reports* 9(1): 6010.
- Lugar, H. M., Koller, J. M., Rutlin, J., Marshall, B. A., Kanekura, K., Urano, F., Bischoff, A. N., Shimony, J. S., and Hershey, T. (2016). Neuroimaging evidence of deficient axon myelination in Wolfram syndrome. *Scientific Reports* 6: 21167.
- Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F., and Vasar, E. (2008). Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *The Journal of Comparative Neurology* 509(6): 642–660.
- Maxwell, K. G., Augsornworawat, P., Velazco-Cruz, L., Kim, M. H., Asada, R., Hogrebe, N. J., Morikawa, S., Urano, F., and Millman, J. R. (2020). Gene-edited human stem cell-derived β cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Science Translational Medicine* 12(540): eaax9106.
- McClellan, P. L., Parthasarathy, V., Faivre, E., and Hölscher, C. (2011). The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31(17): 6587–6594.
- Miguel-Hidalgo, J. J., Alvarez, X. A., Cacabelos, R., and Quack, G. (2002). Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Research* 958(1): 210–221.

- Moring, J., Niego, L. A., Ganley, L. M., Trumbore, M. W., and Herbette, L. G. (1994). Interaction of the NMDA receptor noncompetitive antagonist MK-801 with model and native membranes. *Biophysical Journal* 67(6): 2376–2386.
- Morra, J. H., Tu, Z., Apostolova, L. G., ... Thompson, P. M. (2009). Automated 3D Mapping of Hippocampal Atrophy and its Clinical Correlates in 400 Subjects with Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Elderly Controls. *Human brain mapping* 30(9): 2766–2788.
- Nestor, S. M., Rupsingh, R., Borrie, M., Smith, M., Accomazzi, V., Wells, J. L., Fogarty, J., and Bartha, R. (2008). Ventricular enlargement as a possible measure of Alzheimer's disease progression validated using the Alzheimer's disease neuroimaging initiative database. *Brain* 131(9): 2443–2454.
- Nickl-Jockschat, T., Kunert, H. J., Herpertz-Dahlmann, B., and Grözinger, M. (2008). Psychiatric symptoms in a patient with Wolfram syndrome caused by a combination of thalamic deficit and endocrinological pathologies. *Neurocase* 15(1): 47–52.
- Papp, E. A., Leergaard, T. B., Calabrese, E., Johnson, G. A., and Bjaalie, J. G. (2014). Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *NeuroImage* 97: 374–386.
- Perry, T., Haughey, N. J., Mattson, M. P., Egan, J. M., and Greig, N. H. (2002). Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302(3): 881–888.
- Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., Galluzzi, S., Marizzoni, M., and Frisoni, G. B. (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Research Reviews* 30: 25–48.
- Plaas, M., Seppa, K., Reimets, R., ... Vasar, E. (2017). Wfs1- deficient rats develop primary symptoms of Wolfram syndrome: insulin-dependent diabetes, optic nerve atrophy and medullary degeneration. *Scientific Reports* 7(1): 1–16.
- Porter, D. W., Kerr, B. D., Flatt, P. R., Holscher, C., and Gault, V. A. (2010). Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycaemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12(10): 891–899.
- Punapart, M., Eltermaa, M., Oflijan, J., ... Terasmaa, A. (2014). Effect of Chronic Valproic Acid Treatment on Hepatic Gene Expression Profile in Wfs1 Knockout Mouse. *PPAR Research* 2014: 349525
- Riggs, A. C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R. E., Herrera, P. L., and Permutt, M. A. (2005). Mice conditionally lacking

- the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 48(11): 2313–2321.
- Rigoli, L., Bramanti, P., Di Bella, C., and De Luca, F. (2018). Genetic and clinical aspects of Wolfram syndrome 1, a severe neurodegenerative disease. *Pediatric Research* 83(5): 921–929.
- Rohayem, J., Ehlers, C., Wiedemann, B., ... Wolfram Syndrome Diabetes Writing Group. (2011). Diabetes and neurodegeneration in Wolfram syndrome: a multicenter study of phenotype and genotype. *Diabetes Care* 34(7): 1503–1510.
- Ron, D. and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(7): 519–529.
- Rouzier, C., Moore, D., Delorme, C., ... Paquis-Flucklinger, V. (2017). A novel CISD2 mutation associated with a classical Wolfram syndrome phenotype alters Ca²⁺ homeostasis and ER-mitochondria interactions. *Human Molecular Genetics* 26(9): 1599–1611.
- Rungta, R. L., Choi, H. B., Tyson, J. R., Malik, A., Dissing-Olesen, L., Lin, P. J. C., Cain, S. M., Cullis, P. R., Snutch, T. P., and MacVicar, B. A. (2015). The cellular mechanisms of neuronal swelling underlying cytotoxic edema. *Cell* 161(3): 610–621.
- Rutkowski, D. T. and Kaufman, R. J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends in Biochemical Sciences* 32(10): 469–476.
- Sakakibara, Y., Sekiya, M., Fujisaki, N., Quan, X., and Iijima, K. M. (2018). Knockdown of *wfs1*, a fly homolog of Wolfram syndrome 1, in the nervous system increases susceptibility to age- and stress-induced neuronal dysfunction and degeneration in *Drosophila*. *PLoS genetics* 14(1): e1007196.
- Sedman, T., Rünkorg, K., Krass, M., Luuk, H., Plaas, M., Vasar, E., and Volke, V. (2016). Exenatide Is an Effective Antihyperglycaemic Agent in a Mouse Model of Wolfram Syndrome 1. *Journal of Diabetes Research* 2016: 9239530.
- Seppa, K., Toots, M., Reimets, R., ... Plaas, M. (2019). GLP-1 receptor agonist liraglutide has a neuroprotective effect on an aged rat model of Wolfram syndrome. *Scientific Reports* 9(1): 1–13.
- Sergejeva, M., Papp, E. A., Bakker, R., Gaudnek, M. A., Okamura-Oho, Y., Boline, J., Bjaalie, J. G., and Hess, A. (2015). Anatomical landmarks for registration of experimental image data to volumetric rodent brain atlasing templates. *Journal of Neuroscience Methods* 240: 161–169.
- Shannon, P., Becker, L., and Deck, J. (1999). Evidence of widespread axonal pathology in Wolfram syndrome. *Acta Neuropathologica* 98(3): 304–308.

- Sokka, A.-L., Putkonen, N., Mudo, G., Pryazhnikov, E., Reijonen, S., Khiroug, L., Belluardo, N., Lindholm, D., and Korhonen, L. (2007). Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27(4): 901–908.
- Strom, T. M., Hörtnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D., and Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Human Molecular Genetics* 7(13): 2021–2028.
- Swift, R. G., Sadler, D. B., and Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet (London, England)* 336(8716): 667–669.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K., and Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Human Molecular Genetics* 10(5): 477–484.
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y., and Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS letters* 580(24): 5635–5640.
- Terasmaa, A., Soomets, U., Oflijan, J., Punapart, M., Hansen, M., Matto, V., Ehrlich, K., Must, A., Kõks, S., and Vasar, E. (2011). Wfs1 mutation makes mice sensitive to insulin-like effect of acute valproic acid and resistant to streptozocin. *Journal of Physiology and Biochemistry* 67(3): 381–390.
- Toots, M., Seppa, K., Jagomäe, T., Koppel, T., Pallase, M., Heinla, I., Terasmaa, A., Plaas, M., and Vasar, E. (2018). Preventive treatment with liraglutide protects against development of glucose intolerance in a rat model of Wolfram syndrome. *Scientific Reports* 8(1): 1–10.
- Ueda, K., Kawano, J., Takeda, K., ... Tanizawa, Y. (2005). Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation. *European Journal of Endocrinology* 153(1): 167–176.
- Urano, F. (2016). Wolfram Syndrome: Diagnosis, Management, and Treatment. *Current Diabetes Reports* 16(1): 6.
- Villarreal, G., Hamilton, D. A., Petropoulos, H., Driscoll, I., Rowland, L. M., Griego, J. A., Kodituwakku, P. W., Hart, B. L., Escalona, R., and Brooks, W. M. (2002). Reduced hippocampal volume and total white matter volume in posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry* 52(2): 119–125.

- Wolfram, D. J. and Wagener, H. P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clinic Proceedings* (13): 715–718.
- Wu, J., Gao, L., Shang, L., ... Lin, R. (2017). Ecdysterones from *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) IJin reduce hippocampal excitotoxic cell loss and upregulate mTOR signaling in rats. *Fitoterapia* 119: 158–167.
- Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., ... Oka, Y. (2006). WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Human Molecular Genetics* 15(10): 1600–1609.
- Yamaguchi, S., Ishihara, H., Tamura, A., Yamada, T., Takahashi, R., Takei, D., Katagiri, H., and Oka, Y. (2004). Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325(1): 250–256.
- Yamamoto, H., Hofmann, S., Hamasaki, D. I., Yamamoto, H., Kreczmanski, P., Schmitz, C., Parel, J.-M., and Schmidt-Kastner, R. (2006). Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein expression in retinal ganglion cells and optic nerve glia of the cynomolgus monkey. *Experimental Eye Research* 83(5): 1303–1306.
- Yan, W., Pang, M., Yu, Y., ... Chen, L. (2019). The neuroprotection of liraglutide on diabetic cognitive deficits is associated with improved hippocampal synapses and inhibited neuronal apoptosis. *Life Sciences* 231: 116566.
- Yushkevich, P. A., Piven, J., Hazlett, H. C., Smith, R. G., Ho, S., Gee, J. C., and Gerig, G. (2006). User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage* 31(3): 1116–1128.
- Zeeshan, H. M. A., Lee, G. H., Kim, H.-R., and Chae, H.-J. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences* 17(3): 327.
- Zmyslowska, A., Malkowski, B., Fendler, W., Borowiec, M., Antosik, K., Gnys, P., Baranska, D., and Mlynarski, W. (2014). Central Nervous System PET-CT Imaging Reveals Regional Impairments in Pediatric Patients with Wolfram Syndrome. *PLoS One* 9(12): e115605.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://www.biosciencewriters.com/Guidelines-for-Formatting-Gene-and-Protein-Names.aspx>
(Külastatud 21.05.2020)

<https://scalablebrainatlas.incf.org/rat/PLCJB14> (Külastatud 11.05.2020)

<https://wiki.flybase.org/wiki/FlyBase:Nomenclature#1.2.2> (Külastatud 21.05.2020)

LIHTLITSENTS

Mina, Kaia Grete Kukker,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Hipokampuse ja külgvatsakeste ruumala muutuse uurimine liraglutiidi kroonilise manustamise järel Wolframi sündroomi rotimudelis”, mille juhendajaks on Kadri Seppa ja kaasjuhendajateks Mario Plaas, Anton Terasmaa ja Tambet Tõnissoo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kaia Grete Kukker

08.06.2020