

Tartu Ülikool
Sotsiaalteaduste valdkond
Psühholoogia instituut

Pilleriin Kupper

**AJUPIIRKONDADE ENERGEETILISE PÜSIAKTIIVSUSE KAARDISTAMINE
SEROTONIINIPUUDULIKKUSEGA HIIRTEL**

Magistritöö

Juhendajad: prof. Jaanus Harro, MD, PhD

Margus Kanarik, PhD

Jooksev pealkiri: Serotoniinipuudulike hiirte ajuaktiivsus

Tartu 2023

Ajupiirkondade energeetilise püsiaktiivsuse kaardistamine serotoniinipuudulikkusega hiirtel

Kokkuvõte

Kesknärvisüsteemis serotoniini sünteesiks vajaliku ensüümi, trüptofaani hüdroksülaas 2 (TPH2), toimetel on leitud seos paljude käitumuslike joonte ning psüühikahäiretega. Väljalülitatud *Tph2* geeniga loomkatsemudelid võimaldavad uurida serotoniinisüsteemiga seotud närviringeid ning täpsustada ajupiirkondi, mis on osalised erinevates psüühikahäiretes ning seisundites. Käesolevas katses mõõdeti tsütokroom c oksüdaasi histokeemia meetodil, mis näitab neuronite pikaajalist aktivatsiooni, 58 ajupiirkonna oksüdatiivset metabolismi *Tph2* ulukalleelsetel, heterosügootsetel ja täielikult välja lülitatud geeniga emastel ja isastel hiirtel ning hinnati ajupiirkondade funktsionaalset ühenduvust. Selgus, et emaste hiirte puhul mõjutas geeni väljalülitamine mustolluse, kõhtmise katendi ja ajuveejuhaümbrise hallaine energiametabolismi, isastel raphé-tuumade, mustolluse ja hipokampuse aktiivsust. *Tph2* väljalülitamise mõju funktsionaalsele ühenduvusele oli emastel vähemulatuslik kui isastel, mõlemal sool ilmes transgeensetel loomadel negatiivne seos hipokampuse ja habenula tuumade metaboolse aktiivsuse vahel.

Märksõnad: TPH2, serotoniin, *knock-out*, COX histokeemia

Mapping of long-term activity in brain regions of mice with serotonin-deficiency

Abstract

Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2), the rate-limiting enzyme of serotonin synthesis in the central nervous system, has been associated with many behavioral traits and psychiatric disorders. Transgenic *Tph2* animal models allow to study brain circuits related to serotonin system, and to specify brain regions involved in psychiatric disorders and states. The current experiment measured long-term neuronal activity by cytochrome c oxydase histochemistry in 58 brain regions of wild-type, heterozygous and knock-out female and male mice. In female mice the gene knock-out influenced energy metabolism in substantia nigra, ventral tegmental area and periaqueductal gray, in males raphé-nuclei, substantia nigra and hippocampus were affected. *Tph2* inactivation had a less widespread effect on brain functional connectivity in females compared to males, a negative correlation between hippocampal and habenular metabolic activity appeared in both sexes.

Keywords: TPH2, serotonin, knock-out, COX histochemistry

Sissejuhatus

Serotoniin

Serotoniin ehk 5-hüdroksütrüptamiin (5-HT) on närvisüsteemis laialt levinud monoamiinstruktuuriga neurotransmitter, mida sünteesitakse serotonergilistes neuronites kesknärvisüsteemis, vereliistakutes ning enterokromafiinrakkudes seedesüsteemis. Umbes 95% perifeersesest serotoniinist sünteesitakse ning säilitatakse enterokromafiinrakkudes, mis aga hematoentsefaalbarjääri tõttu KNS-i ei jõua ning ainult väike osa kogu keha serotoniinist toodetakse neuronites, mille kehad paiknevad ajutüve raphé tuumades (Jonnakuty & Gragnoli, 2008). Imetajate ajus sünteesib serotoniini vähem kui 0.1% neuronitest, inimesel umbes 450 000 neuronit (Baker et al., 1990; Baker et al., 1991; Halliday et al., 1988) 86 miljardist (Azevedo et al., 2009) ning rottidel ja hiirtel 20 000-26 000 neuronit (Ishimura et al., 1988; Jacobs & Azmitia, 1992).

Serotoniinisüsteem osaleb suure hulga käitumuslike, füsioloogiliste ja kognitiivsete funktsioonide regulatsioonil. Klassikaliselt seostatakse serotoniini meeleolu, une, söömise ja kehakaalu reguleerimise, agressiivse käitumise, kognitiivsete protsesside, bioloogiliste rütmide ja ärevusega (Jacobs & Azmitia, 1992). Serotoniini võib nii võimendada kui ka vähendada paljude käitumiste peenhäälestuseks tarvilikke neuronaalseid protsesse ning seega on tal oluline roll kõigi organismide kohanemisel (Bacqué-Cazenave et al., 2020).

Aju serotoniinisüsteem saab imetajatel alguse ajutüves paiknevatest raphé tuumadest, kus serotonergilised neuronid moodustavad rostrokaudaalsel teljel üheksa närvirakkude rühma, mida tähistatakse B1-9 (Jacobs & Azmitia, 1992). Need neuroniterühmad jagatakse rostraalseks ja kaudaalseks rühmaks, kus rostraalne rühm paikneb põhiliselt kaudaalses lineaarses tuumas (*caudal linear nucleus*), dorsaalses raphé tuumas (*dorsal raphé nucleus*; B6, B7) ja mediaanses raphé tuumas (*median raphé nucleus*, B9, B8, B5) (Jacobs & Azmitia, 1992). Need serotonergiliste neuronite grupid projitseeruvad peamiselt eesajju, kus nad innerveerivad ulatuslikult ja hajusalt peaaegu kõiki piirkondi (nt ajukoor, amügdala, hipokampus, basaalganglionid, taalamus, hüpotaalamus) (Lesch et al., 2012; Bacqué-Cazenave et al., 2020). Kaudaalne osa, mis projitseerub peamiselt seljaajju ning väikeajju jääb põhiliselt järgmiste tuumade piiridesse: *raphé pallidus* (B1), *raphé obscurus* (B2) ja *raphé magnus* (B3) (Bacqué-Cazenave et al., 2020; Lesch et al., 2012). See alasüsteem on seotud mootorika, valukontrolli ja autonoomse närvisüsteemi regulatsiooniga (Bacqué-Cazenave et al., 2020; Lesch et al., 2012). Imetajatel on kõige enam serotoniini mustolluses,

kõhtmises katendis, raphé tuumades, juttkehas, amügdalas, subtalaamilises tuumas, motoorses korteksis, *globus pallidus*-es, hipokampuses (Bacqué-Cazenave et al., 2020; Chagraoui et al., 2019; Fitoussi et al., 2013; Puginier et al., 2019).

Serotoniini süntees toimub asendamatust aminohappest trüptofaanist reaktsioonide jada kaudu (Jones et al., 2020; Jonnakuty & Gragnoli, 2008). Esmalt hüdroksüülitakse L-trüptofaan 5-hüdroksü-L-trüptofaaniks (5-HTP) ensüüm trüptofaani hüdroksülaasi (TPH) vahendusel (Boadle-Biber, 1993). See on reaktsiooni kiirust määrav etapp, kus kofaktoritena reaktsiooni toimumiseks on olulised ka hapnik (O₂) ning tetrahüdrobiopterin (BH₄) (Hasegawa & Nakamura, 2010). Serotoniiniks sünteesitakse 5-HTP ensüüm L-aminohapete dekarboksülaasi (AADC) abil (Boadle-Biber, 1993). 5-HT ei ole võimeline hematoentsefaalset barjääri läbima, kuid trüptofaan ning 5-HTP suudavad seda. Seega on peaaegu toodetava 5-HT kogus sõltuv trüptofaani pääsemisest ajju.

Peaaegu kõiki psüühikahäireid, sealhulgas depressioon, ärevushäired, obsessiiv-kompulsiivne häire, söömishäired ja sõltuvushäired on seostatud 5-HT düsfunktsiooniga ning samuti mõjutavad paljud psühhotroopsed ravimid rohkem või vähem otseselt 5-HT süsteemi tööd (Jonnakuty & Gragnoli, 2008; Marazziti, 2017). Selektiivsed serotoniini tagasihaarde inhibiitorid (SSRI) on ühed enim välja kirjutatavad ravimid ning neid peetakse psühhofarmakoloogia suureks edulooks (Andrade, 2010). Samuti on serotoniinisüsteemi düsfunktsiooniga seostatud negatiivset emotsionaalsust, agressiivsust ja antisotsiaalsust, mis on kompleksed omadused ilmnedes mitmete bioloogiliste, psühholoogiliste ning sotsiaalsete põhjuste koosmõjul (Lesch et al., 2012). Serotonergilise düsfunktsiooni tuum häirete puhul, kus seda on kirjeldatud, on veel üsna ebaselge, kuna võib tuleneda näiteks nii defektsest serotoniini sünteesist, vabanemisest, tagasihaardest, katabolismist või metabolismist või hoopis kõrvalekalletest ühe või mitme serotoniini retseptori töös 14-st (Blier & El Mansari, 2013; Marazziti et al., 2013).

Trüptofaani hüdroksülaas

Serotoniini sünteesiks vajalik ensüüm trüptofaani hüdroksülaas (TPH) kuulub aromaatsete aminohapete hüdroksülaaside superperekonda ja esineb kahes isovormis (Jones et al., 2020; Walther & Bader, 2003).

TPH1 abil toimub serotoniini süntees väljaspool kesknärvisüsteemi ning TPH2 abil toimub serotoniini süntees kesknärvisüsteemis. Kumbagi kodeerivad vastavad geenid (*TPH1* ja *TPH2*). TPH1 ning TPH2-l on sarnane (71% kattuvust inimesel) aminohapete järjestus, mis

on tõenäoliselt üheks põhjuseks, miks TPH2 avastamine toimus alles 2000ndate alguses (Walther & Bader, 2003). Suurim TPH2-geeni ekspressioon nii inimestel kui ka hiirtel on raphé tuumades (Gutknecht et al., 2009). Geen, mis kodeerib TPH2, paikneb inimesel 12. kromosoomil (12q21.1) ning hiirel 10. kromosoomil (10D1) (Lesch et al., 2012).

TPH2 geeni variatsioonidega on seostatud mitmeid inimese käitumuslike jooni ning neuroarengulisi ja neuropsühhiaatrilisi häireid (Lesch et al., 2012). Emotsionaalsusega seotud närvingeid on paljudel liikidel seostatud TPH2-ga (Waider et al., 2011) ning *TPH2* variantidel nii mittekodeerivates kui ka kodeerivates piirkondades näib olevat roll seisundites nagu depressioon, bipolaarne häire, suitsiid, ärevushäired, sõltuvus ja aktiivsustähelepanuhäire (Laas et al., 2017; Lesch et al., 2012).

Serotoniinisüsteemi täpsemaks uurimiseks ning selleks, et välja selgitada serotoniinidefitsiidi mõju, on loodud geneetiliselt *knock-out* (KO) hiired, kelle ajus seda ensüümi ei toodeta (*Tph2* KO) (Gutknecht et al., 2008). Kahe mittefunktsioneeriva alleeliga (*Tph2*^{-/-}; KO) loomadel on serotoniini tase minimaalne vähenedes näiteks rostraalses raphé-tuumas 94.8%, hipokampus 95.2%, frontaalses ajukoos 91.8% ja taalamuses 88.6% (Gutknecht et al., 2012). *Tph2* heterosügootsetel (*Tph2*^{+/-}; HET) hiirtel, kellel on üks funktsionaalne *Tph2* alleel, on ajus 30% vähem serotoniini võrreldes ulukalleelsete hiirtega (Gutknecht et al., 2012).

Tph2 KO-hiirtel ilmnevad iseloomulikud füsioloogilised, arengulised ning käitumuslikud muutused juba varajases eas (Lesch et al., 2012), mis kujundavad nende käitumist läbi elu.

***Tph2* KO-hiirte füsioloogilised eripärad**

Tph2^{-/-} hiirtel on leitud väiksem kaaluiv, mis tähendab, et nad ei võta tavapäraselt kaalus juurde (Gutknecht et al., 2012). Huvitaval kombel aga ilmneb heterosügootsetel emastel, kuid mitte isastel hiirtel alates kuuendast elukuust ülekaalulisus (Gutknecht, 2012). *Tph2*^{-/-} hiiri peetakse elujõulisteks neil ei esine enneaegset suremust (Gutknecht et al., 2008).

***Tph2* KO-hiirte aju eripärad**

Uuringud on näidanud 5-HT morfogeenset efekti neuronite proliferatsioonile, diferentseerumisele, migratsioonile ja ellujäämisele (Pino et al., 2004). Ontogeneesi ajal ilmneb 5-HT oluliselt enne raphé serotonergilisi neuroneid, mis viitab selle fundamentaalsele rollile embrüonaalses ja aju arengus (Lesch et al., 2012).

Neuroanatomilisi muutusi *Tph2* KO-hiirtel ei ilmne ning ajutüve piirkonnas säilitavad varasemalt serotonergilised neuronid endale omase aeglase toonilise laenglemismustri (Gutknecht et al., 2012). Teistes laborites loodud *Tph2* mudelites on põhjalikum serotonergiliste jätkete analüüs toonud esile ebanormaalsused serotonergiliste ringete loomisel (Pratelli & Pasqualetti, 2019). Täheldatud on muutusi aksoniterminalide arengus, täpsemalt raphést lähtuvate neuronite innervatsiooni vähenemist suprakiasmaatilises tuumas ja taalamuse paraventriculaarses tuumas ning suurenemist naalduvas tuumas ja hipokampuses (Mosienko et al., 2015).

Aju serotoniini puudumisest on mõjutatud ka teised neurotransmittersüsteemid. *Locus coeruleuses* on vähenenud noradrenaliini (NA) neuronite arv ning vähenenud on ka NA vabanemine erinevates ajupiirkondades (Lesch et al., 2012). Dopamiini (DA) neuronite arv nii kõhtmises katendis kui ka mustolluses on muutumatu, kuid on leitud kerge DA kontsentratsiooni vähenemine hipokampuses (Lesch et al., 2012; Mosienko et al., 2019). Gamma-aminovõihappe (GABA) kontsentratsioon hipokampuses on *Tph2* KO-hiirtel suurenenud, kuid *Tph2* HET-hiirte puhul oli GABA kontsentratsioon suurem amügdalas ning väiksem prefrontaalses ajukoos võrreldes *wild-type* ja *Tph2* KO-hiirtega (Mosienko et al., 2015, Waider et al., 2013).

***Tph2* KO-hiirte käitumuslikud eripärad**

Agressiivsus

Serotoniini seostatakse impulsiivse ning agressiivse käitumisega (Lesch & Merschdorf, 2000). Mitmeid ajupiirkondi eesajus ning vöökäärus, amügdalas, septumis, hüpotaalamuses ja ajuveejuhaümbris hallaines on peetakse osaks agressiivsuse närviringest (Lesch et al., 2012). Serotonergilised jätked projitseeruvad ulatuslikult kõigisse neisse piirkondadesse ning on hästi tõestatud, et nii agressiivsus kui ka suurenenud impulsiivsus on seotud aju serotoniini defitsiidiga (Ferrari et al., 2005; Lesch et al., 2012).

Tph2 KO-hiirtel ilmnevad käitumuslikult kõige selgemad tulemused agressiivse käitumise osas. Peamine leid on ülikõrge agressiivsus isastel (Mosienko et al., 2015). *Resident-intruder* katseparadigmas, kus närilise kodupuuri pannakse vöõras isend, ilmneb *Tph2*^{-/-} hiirtel kümme korda suurem agressiivsus, millele viitab suurem rünnakute arv, pikem rünnaku kestus ning vähenenud aeg, mis kulub vöõtluse alustamiseks võrreldes kontrollidega ning krooniline stress süvendab neid omadusi veelgi (Lesch et al., 2012; Mosienko et al., 2015).

Suurenenud agressiivsus ilmneb ka emastel hiirtel, näiteks on neil kirjeldatud ebatüüpiliselt kõrget agressiivsust ka peale mitmendat päeva ühes puuris viibimist (Kästner et al., 2019). Samuti ilmneb *Tph2* KO mudelis emaste emaste hiirte suur agressiivsuse oma järglaste suhtes, mis viib nende järglaste vähenenud ellujäämiseni (Alenina et al., 2009).

Ärevuselaadne käitumine

Funktsionaalseid *TPH2* variante on seostatud negatiivse emotsionaalsusega seotud isiksuseomaduste ning mitmete neuropsühhiaatriliste häiretega, mida iseloomustab emotsionaalne düsregulatsioon, nagu näiteks aktiivsus-tähelepanuhäire ja isiksusehäired (Fageera et al., 2021; Gutknecht et al., 2007; Lesch et al., 2012).

Tph2 KO-hiirtel on saadud vastakaid tulemusi ärevuselaadses käitumises. Mõnes uuringus on leitud erinevusi ärevuselaadses käitumises soost sõltuvalt, mõnes üleüldist ärevuselaadse käitumise vähenemist (Gutknecht et al., 2015; Lesch et al., 2012).

Tph2 KO-hiirtel on kirjeldatud suurenenud tingitud hirmu õppimist (Lesch et al., 2012; Waider et al., 2019). Pärast kroonilise mõõduka stressi kogemist näib *Tph2* KO-hiirte vastus hirmutekitavale signaalile muutuvat intensiivsemaks (Gutknecht et al., 2015; Lesch et al., 2012). 5-HT on ilmselt vajalik üleliigse hirmu õppimise inhibeerimiseks läbi närvingete, mis sisaldavad amügdalat ja muid struktuure nagu hipokampus, mediaalne prefrontaalne korteks, hüpotaalamus, terminaaljuti süngituum ja ajutüve tuumad nagu raphé-kompleks ja *locus coeruleus* (Waider et al., 2013).

Depressioonilaadne käitumine

Tph2 KO-hiirtel esineb rohkem kalduvust passiivseks toimetulekustrateegiaks sundujumise testis, millele viitab immobiilsuse varasem algus ning pikem kestus (Gutknecht et al., 2015; Lesch et al., 2012).

Heterosügootide käitumine

Ilma eksperimentaalse sekkumiseta ei ilmne *Tph2* HET-hiirtel samasuguseid muutusi käitumises nagu *Tph2* KO-hiirtel ning nad ei eristu käitumuslikult WT-hiirtest (Gorlova et al., 2020). Tekitades heterosügootsetele hiirtele aga stressi neid kiskjale eksponeerides olid *Tph2*+/- hiirte käitumuslikud muutused vastupidised *Tph2* WT-hiirtele (Strekalova et al., 2021). *Tph2* HET-hiirtel ilmneb stressile eksponeerides käitumuslik profiil, mis on sarnane

mitte-stressis olevatele *Tph2* KO-hiirtele ehk suurenenud agressiivne käitumine ja vähenenud stressist põhjustatud ärevus (Gorlova et al., 2020; Strekalova et al., 2021).

Uute raviviiside väljatöötamisel võib abi olla prekliinilistest loomudelitest, kus on vaatluse all spetsiifilised närviringed ning nendega seotud neurotransmitterid. Nii on võimalik välja selgitada spetsiifilised ajupiirkonnad, mis on vastava seisundi kujunemisel osalised (Harro et al., 2011). Antud töö on oluline selleks, et välja selgitada aju täpsem neurokeemia. Ajupiirkonnad talitlevad erinevalt ning selleks, et mõista, kuidas aju töötab on vaja esmalt mõista, kus mingid muutused aset leiavad.

Tsütokroom c oksüdaas (COX) ning COX histokeemia

COX histokeemia võimaldab kirjeldada võrdlemisi püsivat aju metaboolset aktiivsust (Harro et al., 2014), kuna COX-i talitus on otseselt seotud universaalse energia talitaja ja ülekandja ATP tootmisega ja peegeldab pikaajalisi energianõudluse trende (Sakata et al., 2005).

Tsütokroom c oksüdaas (COX) on mitokondriaalse hingamisahela toimimiseks vajalik ensüüm, mille aktiivsus peegeldab usaldusväärselt ajupiirkonda saabuvat sisendsignaali. COX on elektroni transpordiahela IV kompleksi terminaalne ensüüm, mis imetajate rakkudes koosneb 13 alaühikust (Gonzalez-Lima, 1998). COX katalüüsib elektronide transporti oma substraadilt tsütokroom c-lt hapnikule, nii et tekib vesi (Gonzalez-Lima, 1998). See viib adenosiintrifosfaadi (ATP) tootmiseni läbi protsesside nagu elektronide transport ja oksüdatiivne fosforülatsioon (Gonzales-Lima, 1998). See ensüüm on vajalik neuronitele, mis sõltuvad peaaegu ainult oksüdatiivsest metabolismist oma energia tarbimises ning ilma milleta on energia tootmine oluliselt häiritud ja neuronite ellujäämine ohus (Gonzalez-Lima, 1998).

Tihe seotus energia-metabolismi ja neuronaaalse aktiivsuse vahel teeb COX-st usaldusväärse neuronaaalse funktsionaalse aktiivsuse metaboolse markeri, milles kajastub neuronite laenglemine ja aeglased dendriitide depolariseerivad potentsiaalid ja lokaalne COX aktiivsus on korreleeritud iga piirkonna, raku või raku alaosa füsioloogilise aktiivsusega (Gonzalez-Lima, 1998). COX histokeemia võimaldab kvantifitseerida ajupiirkonna aktiivsust teisendades optilise tiheduse ühikud ensüümi aktiivsuse ühikuteks. COX aktiivsust on võimalik histokeemiliselt mõõta kasutades diaminobensidiini elektroni doonorina, et

redutseerida tsütokroom c. Värvimine tsütokeemilises reaktsioonis saavutatakse diaminobensidiini oksüdeerimisel indamiin polümeeriks (oksüdeeritud diaminobensidiin), mis visualiseerib COX aktiivsust.

Varasemalt on COX histokeemia meetodil uuritud näiteks ajupiirkondade pikaajalist aktiivsust skisofreenia ketamiini mudelis ning seisundites, mis on seotud depressiivsuse ning haavatavusega depressioonile ning sotsiaalsusega (Harro et al., 2011; Harro et al., 2014; Kanarik et al., 2008; Kanarik & Harro, 2018; Matrov et al., 2020). Samuti on COX histokeemia meetodil uuritud näiteks ruumilise õppimise närviringeid ja (Conejo et al., 2010) ja Alzheimeri tõvega seotud ajupiirkondi (Valla et al., 2013).

Töö eesmärk

Töö eesmärgiks on *Tph2* geeni väljalülitamisest tingitud serotoniinipuudulikkusega hiirte ajupiirkondade püsiaktiivsuse kaardistamine; võrdlused kontrollgrupi ja osalise serotoniinipuudulikkusega hiirte grupiga ning soolised erinevused. Samuti on töö eesmärgiks vaadata ajupiirkondadevahelist funktsionaalset ühenduvust korrelatsioonimaatriksite põhjal ning kirjeldada korrelatsioonidel põhinevat agressiivsuse närvivõrgustikku.

Uurimisküsimused

Kas ajupiirkondade püsiaktiivsuses ilmnevad erinevused kontrollgrupi (WT), heterosügootide (HET), täielikult serotoniinidefitsiitsete (KO) hiirte vahel?

Kas ajupiirkondade püsiaktiivsuses ilmnevad erinevused emaste ja isaste hiirte vahel?

Kas *Tph2* geeni väljalülitamine mõjutab ajupiirkondade funktsionaalset ühenduvust ning, kas see on soost sõltuv?

Autori panus töö valmimisse

Töö autor osales ajupiltide analüüsil, koostas kirjanduse ülevaate, viis läbi statistilised analüüsid ning kirjutas valmis lõpliku töö.

Materjalid ja meetodid

Loomad

COX histokeemia viidi läbi 78-1 hiirel Würzburgi Ülikooli laborist, kellest $n = 43$ olid emased ning $n = 35$ olid isased. Katseloomad olid *Tph2* geeni funktsionaalsuse alusel

jaotatud kolme gruppi: ulukalleelsed (*wild-type*; WT; +/+), heterosügootsed (üks funktsionaalne *Tph2* alleel; HET) ning null-alleelsed (pole funktsionaalset *Tph2* geeni; KO). Kokku moodustus loomadest kuus gruppi: HET/isased (n = 12); HET/emased (n = 16), KO/isased (n = 12), KO/emased (n = 11), WT/isased (n = 12), WT/emased (n = 15).

Analüüsitud ajupiirkonnad

AOD – Eesmine haistetuum (dors.)	VPL - Ventr. posterolat. taalamus
AOM - Eesmine haistetuum (med.)	VPM - Ventr. posteromed. taalamus
AOV - Eesmine haistetuum (ventr.)	PV - Paraventrikulaarne taalamus
AOL - Eesmine haistetuum (lat.)	VL - Ventrolat. taalamus
MO - Orbitaalkorteks (med.)	LDDM - Laterodors. taalamus (dorsomed.)
VO - Orbitaalkorteks (ventr.)	LDVL - Laterodors. taalamus (ventrolat.)
LO - Orbitaalkorteks (lat.)	MD - Mediodors. taalamus
DLO - Orbitaalkorteks (dorsolat.)	CM - Keskmise-mediaalne taalamus
FrA - Front. assotsiatsioonikorteks	AM - Anteromed. taalamus
M2 - Sekundaarne motoorne korteks	AD - Anterodors. taalamus
AI - Agranulaarne insulaarne korteks	AVDM - Anteroventr. taalamus (dorsomed.)
PrL - Prelimbiline korteks	AVVL - Anteroventr. taalamus (ventrolat.)
M1 - Primaarne motoorne korteks	Re - Reuniens tuum
CG1 - Vöökäär, ala 1	CA1 - Hipokampus, CA1 ala
CG2 - Vöökäär, ala 2	CA2 - Hipokampus, CA2 ala
CG/RS - Vöökäär/retrospleniaal-korteks	CA3 - Hipokampus, CA3 ala
RSA - Retrospleniaal-korteks (agranulaarne)	DG - Hammaskäär
RSG - Retrospleniaal-korteks (granulaarne)	MHb - Habenula (med.)
GP - <i>Globus pallidus</i>	LHb - Habenula (lat.)
Lent - Lat. entorinaalkorteks	SNr - Mustollus (retikulaarne)
Pir - Piriformne korteks	SNC - Mustollus (kompaktosa)
Ect - Ektorinaalkorteks	VTA - Kõhtmine katend
PH - Post. hüpotaalamuse ala	DRD - Dorsaalne raphé (dors.)
VMH - Ventromed. hüpotaalamus	DRV - Dors. raphé (ventr.)
MM/ML - Mammillaarkehad	DRL – Dors. raphé (lat.)
DM - Dorsomed. hüpotaalamus	PDR - Postero-dors. raphé
ZI - Zona incerta	MR - Mediaanne raphé
LPMR - Lat. post. taalamus (med. rostr.)	PAG - Ajuveejuhaümbrine hallaine
VM - Ventromed. taalamus	

Katseprotseduuri kirjeldus

Ajud külmutati kohe pärast eemaldamist isopentaanis kuival jääl ning säilitati $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures kuni lõigati krüo-mikrotoomil $50\text{ }\mu\text{M}$ paksusteks lõikudeks $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures ning lõigud säilitati kuni reaktsiooni läbi viimiseni. Reaktsiooni läbi viimise protseduuriks kasutati minimaalsete muudatustega Gonzalez-Lima (1998) kirjeldatud protokoll. Külmutatud ajulõigud fikseeriti 5 minuti jooksul $0,125\%$ glutaaraldehüüdi lahuses külmas puhvril ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Seejärel pesti lõigud neli korda (5 minutit kord) 10% sahharoosi sisaldusega puhverlahuses toatemperatuuril. Et märgistamise intensiivsust suurendada preinkubeeriti lõigud 10-ks minutiks $0,0275\%$ koobalkloriidi ja $0,5\%$ dimetüülsulfoksiidiga $0,05\text{M}$ Tris puhvril 10% sahharoosi sisaldusega (pH 7,4). Metallioonid eelmisest sammust eemaldati 5-minutilise pesuga puhverlahuses. Seejärel hoiti ajulõike tund aega inkubatsioonilahuses, mis koosnes $0,05\%$ diaminobensidiinist, $0,0075\%$ tsütokroom c-st, 5% sahharoosist, $0,002\%$ katalaasist ja $0,25\%$ DMSO-st naatriumfosfaadi puhvril. Mittespetsiifilise autooksidatsiooni vältimiseks viidi reaktsioon läbi pimedas, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Reaktsioon peatati pannes lõigud 30-ks minutiks $3,5\%$ formaliini ja 10% sahharoosi sisaldusega fosfaatpuhverisse. Ajulõigud dehüdreeriti etanoolis, puhastati ksüleenis ning kaeti katteklaasiga.

Ajulõikude preparaadid pildistati ühesuguste valgustingimuste juures mikroskoobi küljes oleva kaamera abil. Pildianalüüs viidi läbi kasutades Image J vabavara. Optilist tihedust mõõdeti 58-st ajupiirkonnast kasutades hiire aju atlast (Franklin & Paxinos, 2007). Iga looma iga ajupiirkonna kohta tehti kolm mõõtmist ning statistilistes analüüsis oli kasutusel kolme mõõtmise keskmine. Iga looma iga piirkonna puhul mõõdeti piirkonna optiline tihedus juhuslikult paremast või vasakust poolkerast.

Ensüümi aktiivsus saadi mõõdetud optilise tiheduse kaudu nii nagu on kirjeldatud Matrov et al. (2020). Optilise tiheduse väärtused teisendati ensüümi aktiivsuseks kasutades välist standardiseerimist: igasse inkubatsiooninõusse oli pandud ka aju homogenaat spektrofotomeetriliselt mõõdetud ensüümi aktiivsusega. Ensüümi aktiivsuse ühikuks on $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ koe kohta.

Statistilised analüüsid

Andmeanalüüsiks viidi läbi 2×3 dispersioonanalüüs. Statistilise olulisuse nivooks valiti $p < 0,05$. Sõltumatuteks muutujateks olid looma sugu ja genotüüp ning sõltuvaks muutujaks COX aktiivsus. Efektisuuruse näitajana kasutati eeta ruutu (η^2). Post-hoc testideks viidi läbi Fisher'i LSD test. Ajupiirkondade COX-i aktiivsuse korrelatsioone hinnati

Pearson'i korrelatsioonikordajaga r . Korrelatsioonanalüüsiks asendati puuduvad andmed (5,6%) ning imputeerimisel võeti aluseks sugu, genotüüp ja kõigi mõõdetud ajupiirkondade aktiivsus. Ajupiirkondadevaheliste korrelatsioonide esitamiseks gruppide lõikes tehti 6 korrelatsioonimaatriksit. Võrdlemiseks transformeeriti korrelatsioonid Fisher'i Z skaalale.

Tulemused

Dispersioonanalüüsi tulemused näitasid soo peaeffekti mitmes taalamuse piirkonnas (PV, VL, LDDM, LDVL, MD, CM, Am/Amv, AVDM), raphé-tuumades (DRD, DRV, DRL, PDR, MR), ajukoore (RSA, Cg/RS, FrA, DLO) aladel, hipokampuses (CA1, CA2, CA3, DG), haistetuumas (AOL), mustolluses (SNr), habenula tuumades (MHb, LHb) ja kõhtmises katendis (VTA) (vt Tabel 1). Genotüübi peaeffekt avaldus mustolluse (SNr ja SNc) tuumades, kõhtmises katendis (VTA), mammillaarkehades (MM/ML), ajuveejuhaümbrises hallaines (PAG) ning raphé-tuumades (DRD).

Post-hoc testid (vt Tabel 1) näitasid emaste hiirte statistiliselt oluliselt kõrgemat COX aktiivsuse taset võrreldes isaste ulukalleelsete (WT) hiirtega järgmistes piirkondades: anterioorne haistetuum (AOL), retrospleniaalkorteks (RSG), hipokampus (CA1, CA2, CA3, DG), kõhtmine katend ja dorsaalne raphé (DRD, DRV, DRL, PDR). Heterosügootsetel (HET) hiirtel ilmnes emastel kõrgem COX aktiivsus mitmetes taalamuse tuumades (VL, PV, LDDM, LDVL, MD, CM, Am/Amv, AD, AVDM, AVVL), hipokampuses (CA1, CA2, CA3) ja habenulas (MHb, LHb). KO-hiirtel avaldus emastel kõrgem COX aktiivsus vöökääru/retrospleniaalkorteksi (Cg/RS) ja mustolluse (SNr) piirkonnas. Mitmes piirkonnas ilmnes ka heterosügootsetel hiirtel statistiliselt oluliselt madalam COX aktiivsuse tase võrreldes KO-hiirtega. Emastel avaldus see mammillaarkehades (MM/ML), mustolluses (SNr, SNc), kõhtmises katendis (VTA) ja ajuveejuhaümbrises hallaines (PAG). Isastel heterosügootsetel hiirtel oli statistiliselt usaldusväärset madalam COX aktiivsuse tase *knock-out* hiirtest hipokampuses (CA2), mustolluses (SNc), raphé-tuumades (DRD, DRV, DRL, MR). Ulukalleelsete hiirtel tuli statistiliselt oluliselt madalam COX aktiivsus välja raphé-tuumades (DRD, DRV, DRL). Emastel heterosügootsetel hiirtel oli statistiliselt oluliselt madalam COX aktiivsus võrreldes ulukalleelsete hiirtega mustolluses (SNr, SNc) ja kõhtmises katendis.

Tabel 1*Ajupiirkondade COX aktiivsuse keskmised, standardvead ning ANOVA tulemused*

Piirkond	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) WT/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) HET/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) KO/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) WT/isased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) HET/isased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) KO/isased	ANOVA tulemus
AOD	295 ± 16	293 ± 15	286 ± 9	254 ± 18	272 ± 14	284 ± 12	
AOM	288 ± 16	285 ± 14	281 ± 9	245 ± 18	265 ± 13	280 ± 13	
AOV	287 ± 17	280 ± 15	276 ± 9	247 ± 19	264 ± 16	272 ± 11	
AOL	311 ± 16 *	303 ± 16	300 ± 9	263 ± 18	283 ± 16	290 ± 10	Fs (1,72) = 4,226, p = 0,043; $\eta^2 = 0,054$
MO	306 ± 15	299 ± 16	284 ± 9	261 ± 18	278 ± 15	284 ± 12	
VO	309 ± 16	305 ± 17	291 ± 8	271 ± 17	283 ± 15	289 ± 13	
LO	333 ± 17	329 ± 16	318 ± 8	293 ± 17	305 ± 16	308 ± 12	Fs (1,72) = 3,727, p = 0,057; $\eta^2 = 0,049$
DLO	302 ± 16	307 ± 16	293 ± 10	264 ± 19	279 ± 16	265 ± 9	Fs (1,72) = 5,975, p = 0,017; $\eta^2 = 0,076$
FrA	318 ± 17	316 ± 16	308 ± 10	277 ± 17	294 ± 15,	296 ± 12	Fs (1,71) = 4,021, p = 0,049; $\eta^2 = 0,053$
M2	327 ± 16	311 ± 16	320 ± 10	298 ± 18	294 ± 14	317 ± 13	
AI	305 ± 15	282 ± 14	298 ± 11	272 ± 20	271 ± 14	285 ± 10	
PrL	315 ± 16	300 ± 17	306 ± 13	279 ± 19	277 ± 13	308 ± 13	
M1	328 ± 14	316 ± 15	328 ± 16	299 ± 17	309 ± 16	314 ± 13	
CG1	306 ± 13	312 ± 14	305 ± 11	312 ± 18	267 ± 11	323 ± 16	
CG2	292 ± 12	292 ± 14	291 ± 12	294 ± 16	252 ± 10	303 ± 15	
Cg/RS	345 ± 16	351 ± 18	380 ± 20 *	323 ± 20	314 ± 15	326 ± 12	Fs (1,72) = 7,059, p = 0,010; $\eta^2 = 0,087$
RSA	342 ± 18	336 ± 14	346 ± 18	296 ± 25	300 ± 8	310 ± 21	Fs (1,61) = 6,978, p = 0,010; $\eta^2 = 0,102$
RSG	389 ± 19 *	375 ± 14	389 ± 16	334 ± 25	340 ± 10	350 ± 19	Fs (1,61) = 8,418, p = 0,005; $\eta^2 = 0,120$
GP	215 ± 8	220 ± 17	243 ± 16	206 ± 13	204 ± 7	215 ± 7	
Lent	248 ± 10	229 ± 11	254 ± 13	235 ± 16	229 ± 20	253 ± 10	
Pir	319 ± 13	295 ± 14	321 ± 16	280 ± 16	294 ± 16	303 ± 13	

Piirkond	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) WT/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) HET/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) KO/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) WT/isased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) HET/isased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) KO/isased	ANOVA tulemus
Ect	262 ± 11	268 ± 14	259 ± 19	249 ± 16	232 ± 10	250 ± 12	
PH	304 ± 13	267 ± 9	296 ± 29	280 ± 17	263 ± 9	299 ± 16	
VMH	343 ± 23	303 ± 12	315 ± 24	298 ± 23	287 ± 13	280 ± 13	Fs (1,61) = 4,070, p = 0,048; $\eta^2 = 0,060$
MM/ML	383 ± 18	341 ± 16 #	399 ± 20	337 ± 24	339 ± 17	391 ± 19	Fg (2,59) = 3,894, p = 0,026; $\eta^2 = 0,112$
DM	273 ± 13	270 ± 15	274 ± 17	269 ± 13	247 ± 9	282 ± 18	
ZI	366 ± 13	345 ± 14	371 ± 28	361 ± 17	332 ± 9	368 ± 17	
LPMR	358 ± 14	372 ± 15	375 ± 11	331 ± 28	318 ± 17	369 ± 21	Fs (1,62) = 3,687, p = 0,059; $\eta^2 = 0,053$
VM	317 ± 14	302 ± 7	309 ± 15	296 ± 23	279 ± 13	290 ± 15	
VL	304 ± 10	321 ± 20 *	336 ± 13	286 ± 22	269 ± 9	310 ± 13	Fs (1,68) = 5,728, p = 0,019; $\eta^2 = 0,073$
VPL	294 ± 12	278 ± 8	290 ± 17	262 ± 21	259 ± 18	269 ± 14	Fs (1,61) = 3,856, p = 0,054; $\eta^2 = 0,059$
VPM	379 ± 15	357 ± 9	370 ± 20	346 ± 22	341 ± 15	352 ± 16	
PV	290 ± 12	314 ± 18 **	299 ± 14	272 ± 20	254 ± 10	295 ± 13	Fs (1,68) = 4,551, p = 0,037; $\eta^2 = 0,059$
LDDM	374 ± 12	401 ± 21 **	408 ± 14	356 ± 27	329 ± 11	378 ± 19	Fs (1,68) = 6,392, p = 0,014; $\eta^2 = 0,081$
LDVL	340 ± 11	366 ± 21 *	368 ± 13	326 ± 26	303 ± 9	345 ± 16	Fs (1,68) = 5,147, p = 0,026; $\eta^2 = 0,067$
MD	334 ± 11	365 ± 21 **	352 ± 12	315.7 ± 23	297 ± 8	343 ± 16	Fs (1,68) = 5,125, p = 0,027; $\eta^2 = 0,065$
CM	304 ± 11	324 ± 19 *	311 ± 14	280 ± 21	268 ± 8	301 ± 12	Fs (1,68) = 5,016, p = 0,028; $\eta^2 = 0,066$
Am/Amv	282 ± 10	306 ± 19 *	320 ± 19	283 ± 18	262 ± 9	285 ± 10	Fs (1,72) = 4,364, p = 0,040, $\eta^2 = 0,054$
AD	405 ± 15	441 ± 21	433 ± 26	415 ± 27	379 ± 21	400 ± 22	
AVDM	377 ± 13	411 ± 23 *	411 ± 25	379 ± 25	345 ± 16	372 ± 17	Fs (1,72) = 4,277, p = 0,042; $\eta^2 = 0,054$
AVVL	344 ± 11	383 ± 23 *	388 ± 24	353 ± 22	325 ± 14	347 ± 15	Fs (1,72) = 3,762, p = 0,056; $\eta^2 = 0,047$
RE	296 ± 11	309 ± 17	312 ± 20	292 ± 22	261 ± 8	300 ± 11	
CA1	297 ± 13 **	278 ± 13 *	296 ± 9	247 ± 17	240 ± 10	269 ± 11	Fs (1,72) = 13,687, p < 0,001; $\eta^2 = 0,152$
CA2	307 ± 14 **	290 ± 13 *	310 ± 9	254 ± 19	244 ± 11 #	285 ± 14	Fs (1,72) = 12,635, p < 0,001; $\eta^2 = 0,140$
CA3	355 ± 201	335 ± 16 *	361 ± 11	297 ± 21	281 ± 13	311 ± 14	Fs(1,72) = 15.346, p < 0,001; $\eta^2 = 0,170$

Piirkond	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) WT/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) HET/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) KO/emased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) WT/isased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) HET/isased	Keskmine ± SE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) KO/isased	ANOVA tulemus
DG	374 ± 18 *	352 ± 16	381 ± 7	324 ± 21	316 ± 14	344 ± 16	Fs (1,72) = 9,302, p = 0,003, $\eta^2 = 0,110$
MHb	296 ± 11	315 ± 11 **	303 ± 7	272 ± 20	266 ± 15	286 ± 12	Fs (1,62) = 7,429, p = 0,008; $\eta^2 = 0,104$
LHb	358 ± 9	386 ± 12 **	375 ± 17	338 ± 21	334 ± 15	351 ± 14	Fs (1,62) = 7,243, p = 0,009; $\eta^2 = 0,101$
SNr	276 ± 8	232 ± 9 ###@@	306 ± 12 *	248 ± 21	236 ± 16	264 ± 14	Fs (1,61) = 4,298, p = 0,042; $\eta^2 = 0,052$ Fg (2,61) = 7,162, p = 0,002; $\eta^2 = 0,173$
SNC	295 ± 7	249 ± 10 ###@@	322 ± 13	264 ± 23	250 ± 17 #	295 ± 13	Fg (2,61) = 8,664, p < 0,001; $\eta^2 = 0,209$
VTA	264 ± 9 *	217 ± 9 ###@@@	283 ± 16	225 ± 22	216 ± 14	254 ± 9	Fs (1,61) = 4,398, p = 0,040, $\eta^2 = 0,054$ Fg (2,61) = 7,178, p = 0,002, $\eta^2 = 0,175$
DRD	312 ± 8 ***	288 ± 18	308 ± 13	251 ± 17 ###	253 ± 10 ###	316 ± 15	Fs (1,71) = 6,278, p = 0,015; $\eta^2 = 0,069$ Fg (2,71) = 4,231, p = 0,018; $\eta^2 = 0,093$ Fi (2,71) = 2,831, p = 0,066; $\eta^2 = 0,062$
DRV	341 ± 9 *	326 ± 20	337 ± 15	284 ± 19 #	287 ± 12 #	341 ± 14	Fs (1,71) = 5,557, p = 0,021; $\eta^2 = 0,066$
DRL	325 ± 10 *	307 ± 17	316 ± 14	274 ± 18 #	277 ± 13 #	324 ± 16	Fs (1,71) = 4,011, p = 0,049; $\eta^2 = 0,049$
PDR	383 ± 13 *	369 ± 22	372 ± 17	330 ± 23	327 ± 17	373 ± 16	Fs (1,71) = 4,216, p = 0,044; $\eta^2 = 0,053$
MR	301 ± 10	287 ± 21	300 ± 17	256 ± 18	248 ± 10 #	300 ± 10	Fs (1,71) = 4,257, p = 0,043; $\eta^2 = 0,053$
PAG	305 ± 9	272 ± 11 ###	328 ± 15	276 ± 21	274 ± 16	308 ± 14	Fg (2,61) = 4,973, p = 0,010, $\eta^2 = 0,134$
Keskmine	316 ± 10	314 ± 10 *	323 ± 12	288 ± 11	279 ± 11	305 ± 11	Fs (1,72) = 8,968, p = 0,004; $\eta^2 = 0,110$

Märkus. Fs – soo peaefekt, Fg – genotüübi peaefekt, Fi – soo ja genotüübi interaktsioon. *erinevus isastest; # HET/WT erinevus KO-st; @ HET erinevus WT-st. Üks märk – p < 0,05; kaks märki – p < 0,01; kolm märki – p < 0,005

Piirkondadevaheline funktsionaalne ühenduvus

Emastel KO-loomadel (Joonis 1c), erinevalt WT-hiirtest (Joonis 1a), korreleerub hipokampuse CA1-CA3 piirkondade (aga mitte hammaskääru) aktiivsus negatiivselt habenulaga (nt. CA1 ala ja lateraalse habenula korrelatsioonid $-0,53$ vs $0,16$, $p < 0,05$). CA1 ja CA2 piirkondade aktiivsuse nõrk positiivne korrelatsioon taalamuse tuumade aktiivsusega on *Tph2* väljalülitamise toimetel asendunud negatiivsega. Ulukalleelsete loomade mõõdukad positiivsed korrelatsioonid vöökääru ja teiste ajupiirkondade aktiivsuse vahel on KO-loomadel asendunud väga nõrkadega, retrospleniaalse koore, zona inserta, hipokampuse ja habenula korral KO-loomadel korrelatsioonid vöökääruga negatiivsed (nt. lateraalse habenula ja vöökääru korrelatsioonid $0,60$ vs $-0,07$, $p < 0,05$). Ulukalleelsete emaste loomade ventraalse posteromediaalse taalamuse (VPM) valdavalt negatiivsed korrelatsioonid teiste ajupiirkondadega on KO-loomadel asendunud peamiselt mõõdukalt positiivsetega.

Emaste heterosügootsete (Joonis 1b) loomade ajupiirkondade vaheline seosemuster on väga sarnane ulukalleelsete emaste seostele (Joonis 1a). WT-loomade nõrgad negatiivsed korrelatsioonid ventraalse posteromediaalse taalamuse ja ülejäänud ajupiirkondade, eelkõige frontaal-alade ja taalamuse, vahel on heterosügootidel asendunud enamasti nullilähedase seosega. Ulukalleelsetel emastel loomadel on lateraalse entorinaalkoore seosed teiste frontaalpiirkondadega väga nõrgad, heterosügootidel mõõdukad. Ulukalleelsetel loomadel korreleerub ektorinaalkoore aktiivsus frontaalalade ja taalamusega paremini kui heterosügootidel. Ulukalleelsetel emastel hiirtel on raphé-tuumade seosed hipokampusega tugevamad kui heterosügootidel (nt. CA3 korrelatsioon mediaanse raphéga $0,66$ vs $-0,02$, $p = 0,05$). Ventraalse taalamuse tuumade seos haistetuumade ja frontaalkoorega on ulukalleelsetel loomadel nõrgem kui heterosügootsetel.

Heterosügootsete emaste (Joonis 1b) ventraalse posteromediaalse taalamuse ja ektorinaalkoore väga nõrgad korrelatsioonid frontaalalade ja taalamusega on täielikult väljalülitatud *Tph2* emastel (Joonis 1c) mõõdukalt positiivsed. KO-loomadel leitud negatiivseid seosed hipokampuse/habenula ja mitmete vöökääru ja taalamuse osadega heterosügootidel ei esine, samuti ei ole heterosügootidel tugevalt negatiivseid seoseid habenula ja hipokampuse vahel (nt CA1 ja lateraalse habenula korrelatsioon $-0,53$ vs $0,23$, $p = 0,04$).

Erinevalt ulukalleelsete isaste (Joonis 1d) ajupiirkondade aktiivsuse mõõdukatest-tugevatest positiivsetest seostes, ilmes täielikult inaktiveeritud *Tph2* korral isastel hiirtel

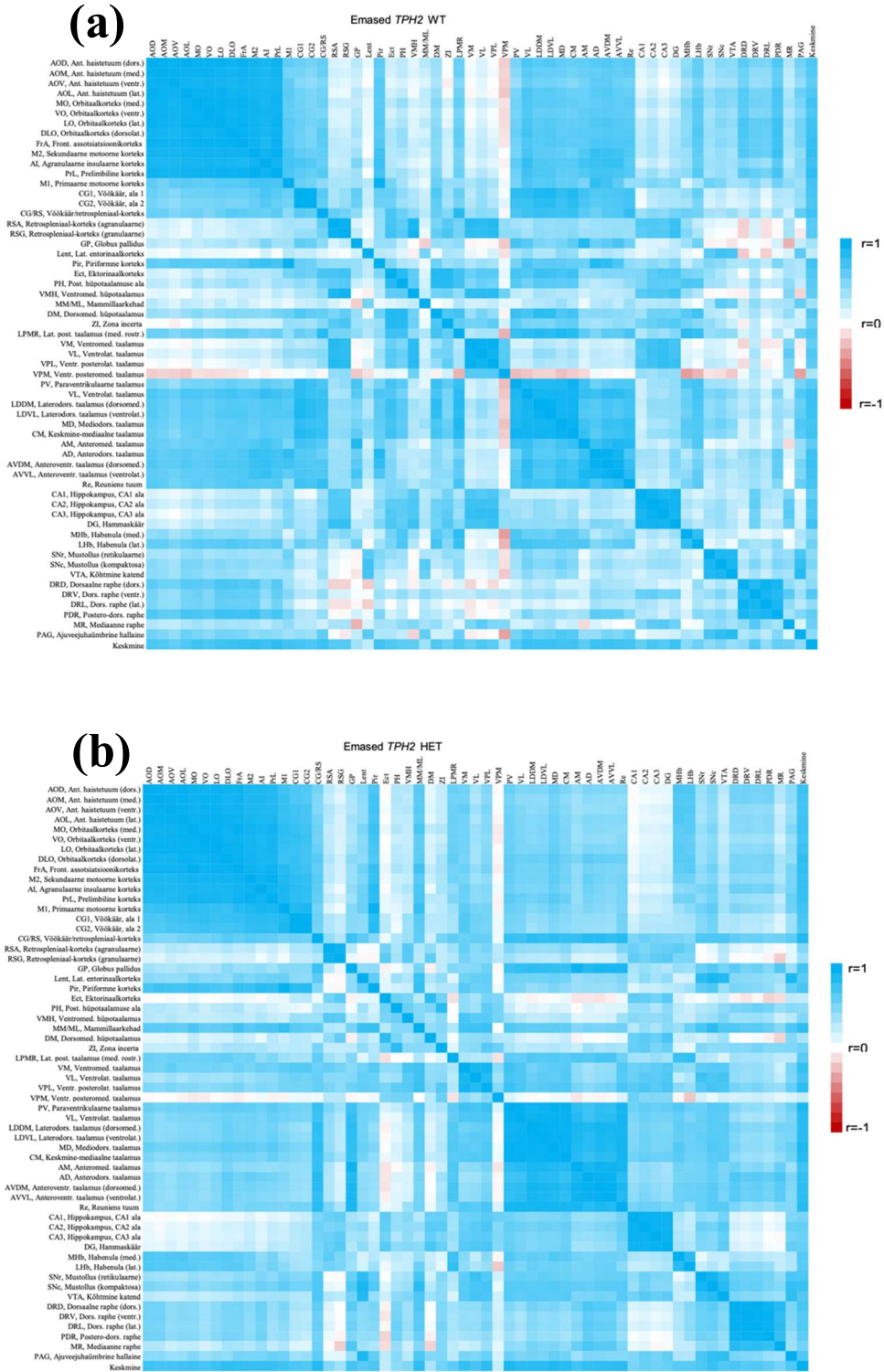
(Joonis 1f) mitmeid negatiivse korrelatsiooniga klastreid. Taalamuse piirkondade aktiivsus seostus negatiivselt haistetuumade, frontaalpiirkondade ja raphé-tuumade aktiivsusega (nt dorsaalse raphé dorsaalse alaosa seos paraventrikulaarse taalamusega $-0,23$ vs $0,57$, $p < 0,03$). Habenula aktiivsus korreleerub KO-loomadel negatiivselt haistetuumade ja frontaalkoor alade aktiivsusega. *Globus palliduse* puhul on KOloomadel näha negatiivseid korrelatsioone mitmete ajupiirkondadega taalamuses, hipokampuses, habenulas, samuti raphé-tuumadega (nt. *globus palliduse* ja lateraalse habenula korrelatsioon KO-loomadel $-0,61$, WT-loomadel $0,38$, $p < 0,01$)

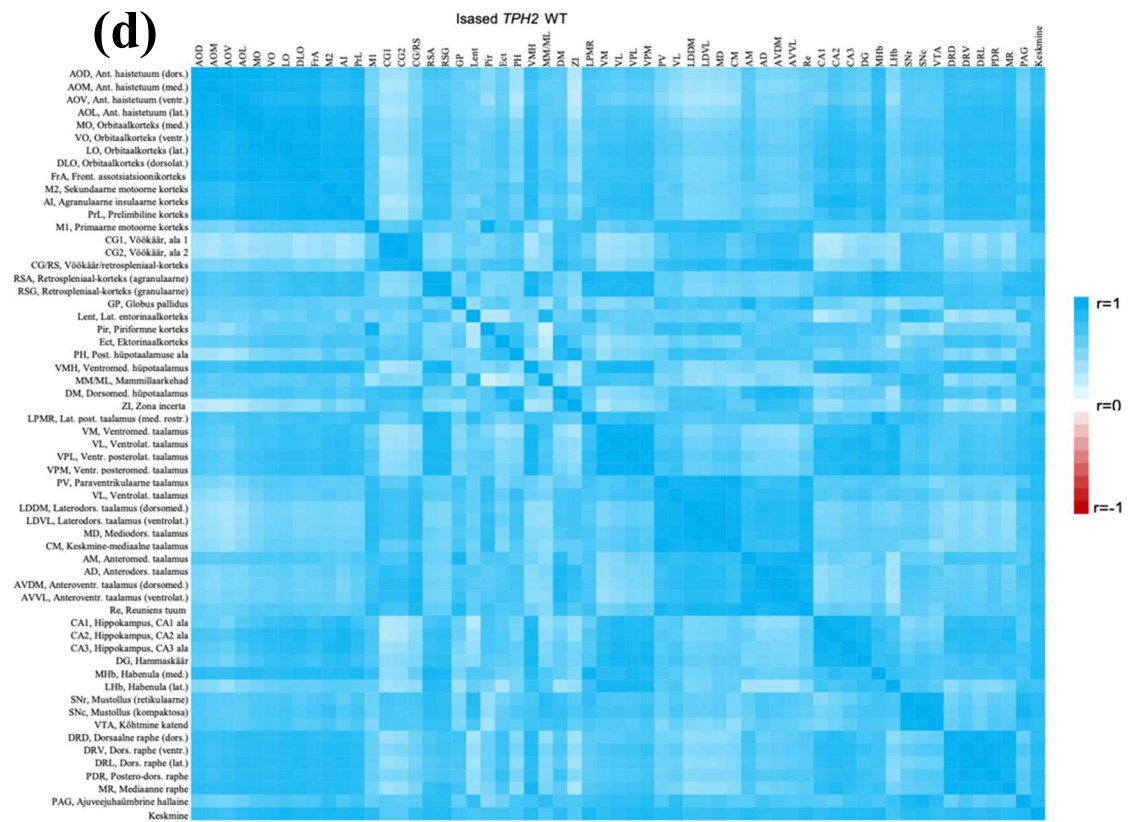
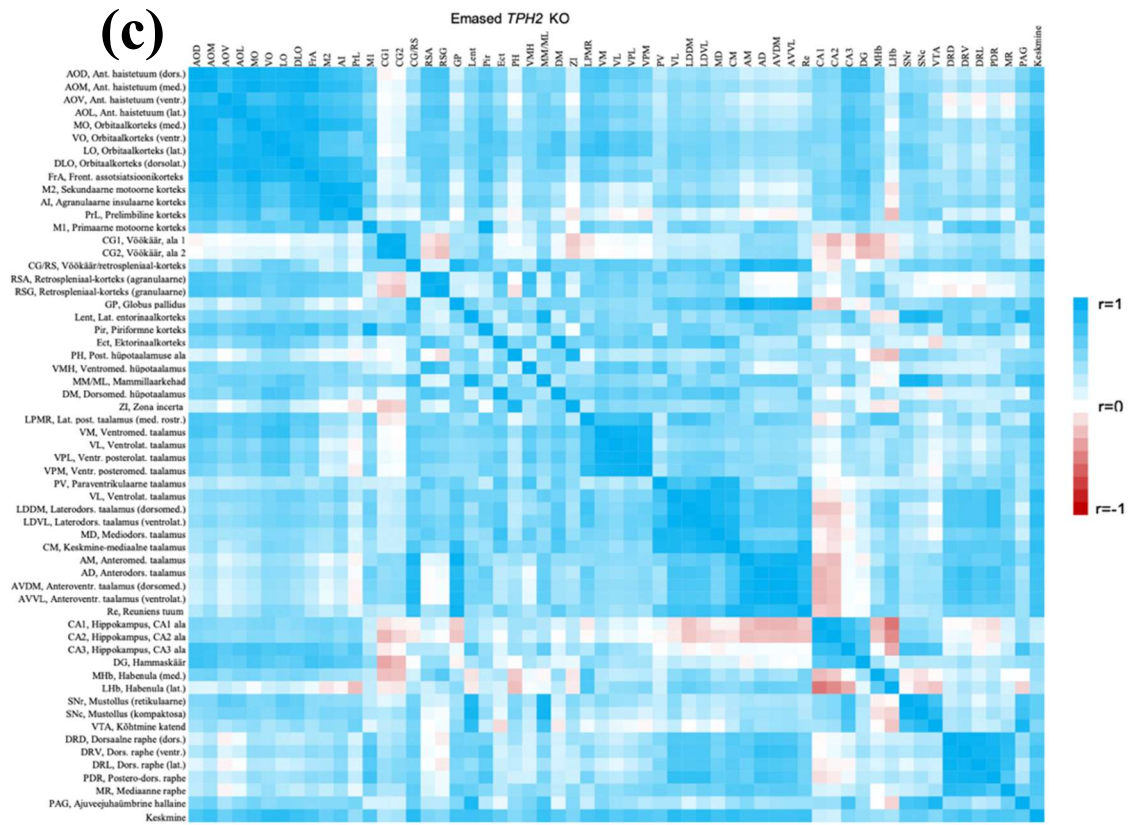
Erinevalt ulukalleelsetest isastest (Joonis 1d) loomadest, kelle ajupiirkondade aktiivsustevahelised korrelatsioonid olid kõik mõõdukalt-tugevalt positiivsed, on ühe *Tph2* alleeli inaktiveerimisega isastel hiirtel (Joonis 1e) negatiivseid korrelatsioone insulaarkoore ja *globus palliduse* ja mammilaarkehade ning ülejäänud ajupiirkondade, eelkõige taalamuse, hipokampuse ja habenula) vahel (nt. *globus palliduse* ja lateraalse habenula korrelatsioon $-0,76$ vs $0,38$, $p < 0,005$). Erinevalt ulukalleelsetest loomadest ilmneb heterosügootsetel isastel hiirtel hipokampuse ja habenula nõrk negatiivne korrelatsioon haistetuumade/frontaalpiirkondade aktiivsusega. Keskaju/ajutüve tuumade (raphé-tuumad, mustollus, kõhtmine katend, ajuveejuhaümbrine hallaine) aktiivsus on ulukalleelsetel loomadel teiste ajupiirkondadega mõõdukalt-tugevalt korreleeritud, heterosügootsetel isastel ilmnevad negatiivsed korrelatsioonid nende piirkondade ja hüpotaalamuse, taalamuse, hipokampuse ja habenula aktiivsusega (nt. kõhtmise katendi ja lateraalse habenula korrelatsioon $0,66$ vs $-0,26$, $p < 0,01$).

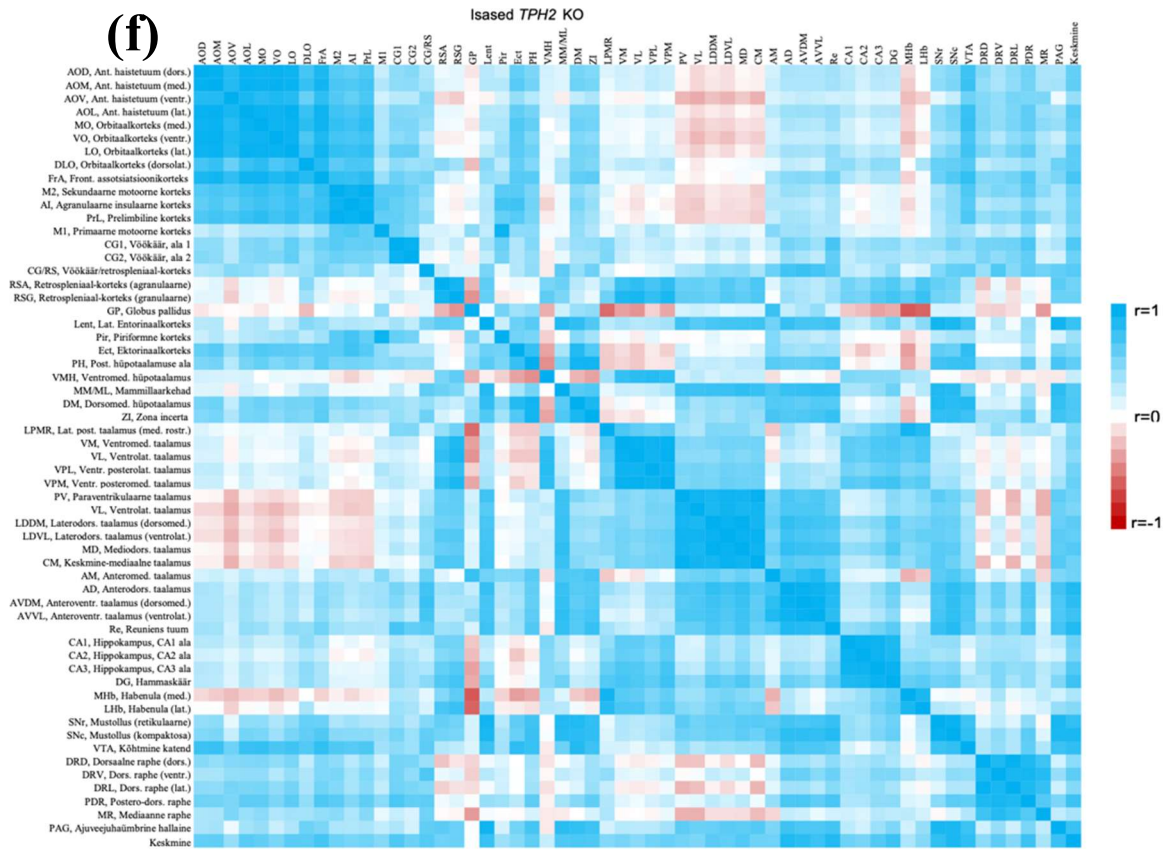
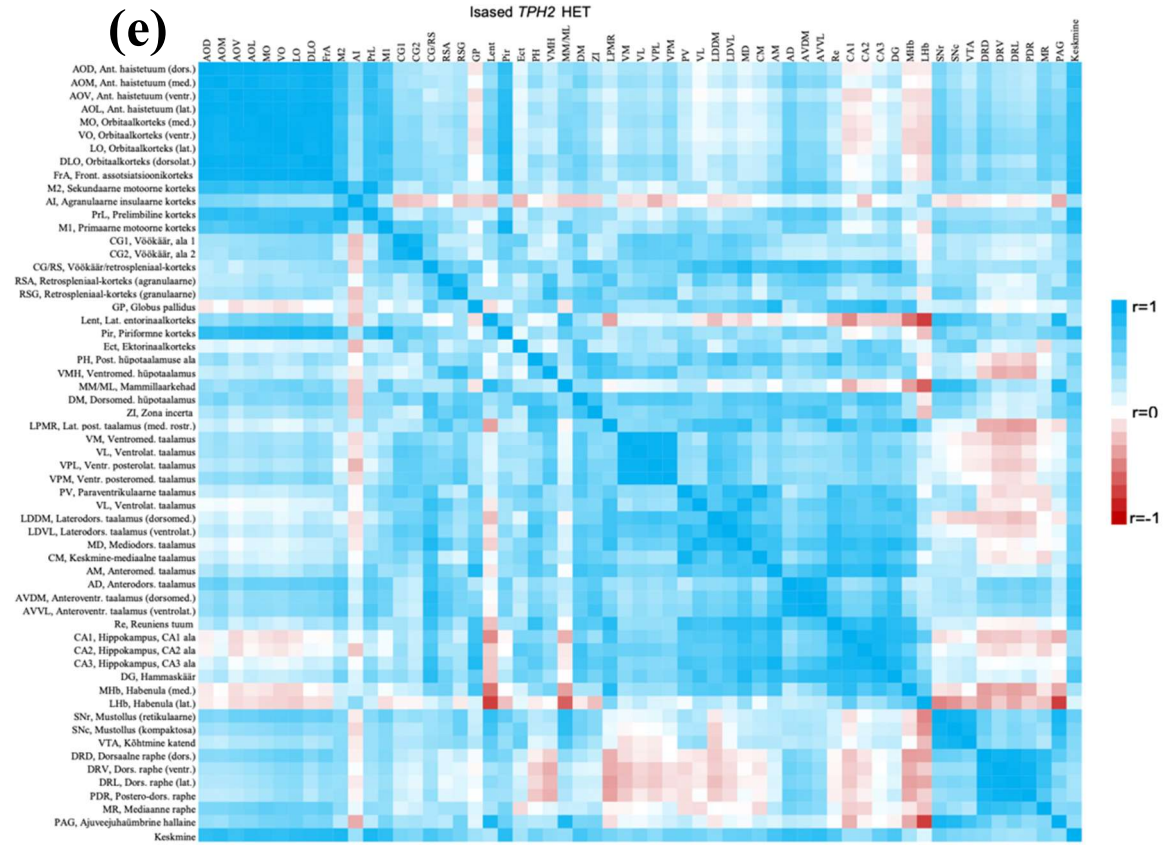
Täieliku *Tph2* inaktivatsiooni korral (Joonis 1f) isastel hiirtel ilmneb enam negatiivseid korrelatsioone frontaalpiirkondadega seoses, heterosügootsetel isastel (Joonis 1e) enam negatiivseid korrelatsioone keskaju/ajutüvepiirkondadega. Erinevalt heterosügootidest on KO-isastel negatiivsed seosed taalamuse tuumade ja haistetuumade-frontaalpiirkondade aktiivsuse vahel. Heterosügootid ja KO-hiired sarnanevad habenula aktiivsuse negatiivsete korrelatsioonide poolest haistetuumade ja frontaalpiirkondadega, erinevus genotüüpide vahel ilmneb keskajus/ajutüves, sealsed tuumad korreleeruvad heterosügootidel habenulaga negatiivselt. Keskaju/ajutüve negatiivsed korrelatsioonid taalamuse ja hipokampuse esinevad peamiselt heterosügootidel.

Joonis 1

Ajupiirkondade COX aktiivsuse korrelatsioonimaatriks emastel WT (a), HET (b), KO (c) ning isastel WT (d), HET (e) ja KO (f) hiirtel.







Agressiivsuse närviringe kirjeldus

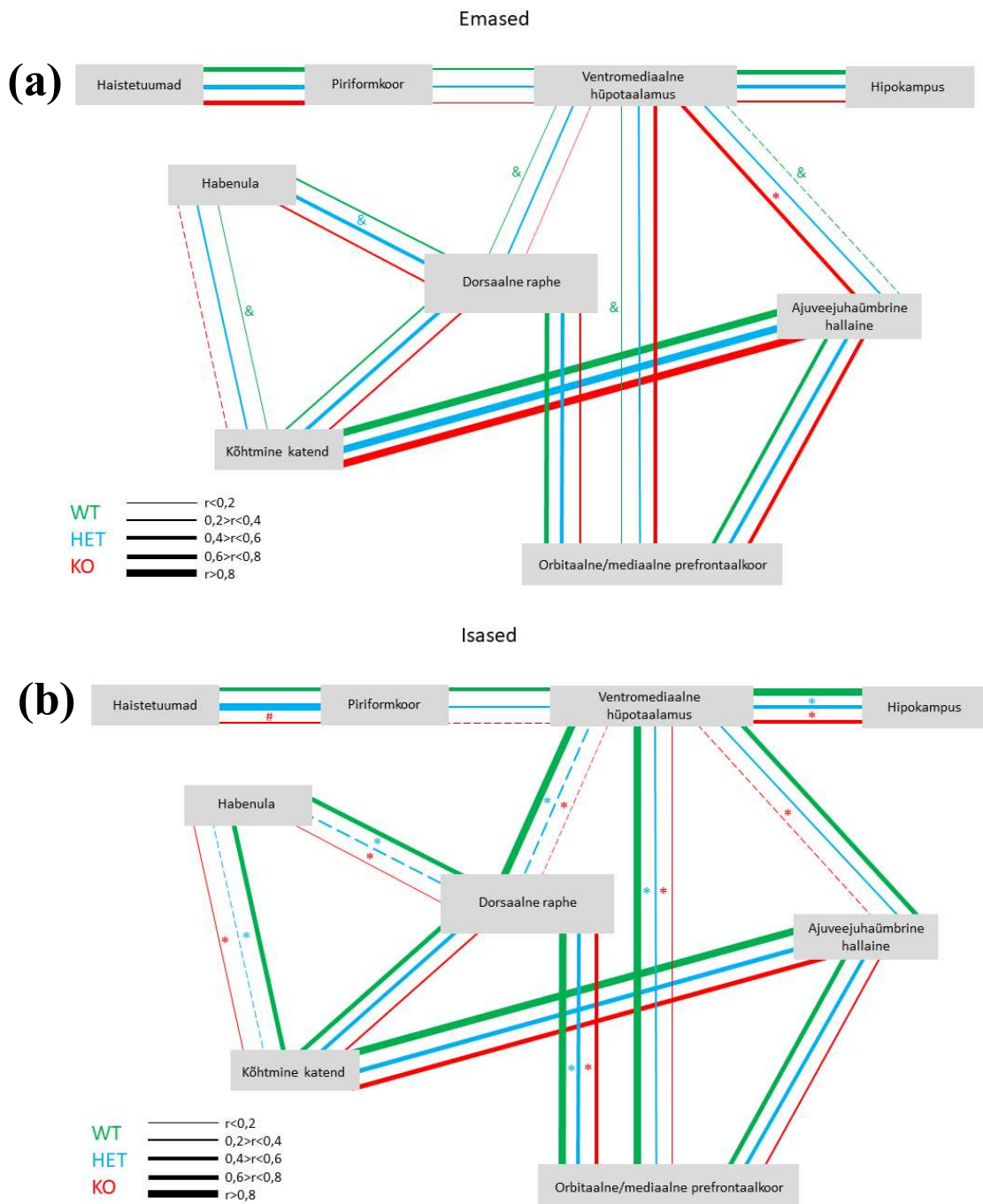
Kuna *Tph2* KO-loomadel on kalduvus agressiivsuseks, siis vaatlesime agressiivsuse närviringet lähemalt. Agressiivsuse neurobioloogia on kompleksne, kuid paljud autorid on üksmeelel, et mitmed piirkonnad nagu haistetuomad, piriformkoor, ventromediaalne hüpotaalamus, hipokampus, habenula, kõhtmine katend, dorsaalne raphé, orbitaalne/mediaalne prefrontaalkoor, ajuveejuhaümbrine hallaine võiksid olla sellest närviringest osa ning seetõttu valisime need ka oma ringesse (Di Giovanni et al., 2010; Gouveia & Ibrahim, 2022; Guthman & Falkner, 2022; Ko, 2017; Nelson & Trainor, 2007; Pierucci et al., 2014; Wei et al., 2021). Agressiivsusega seotud närviringe ajupiirkondade funktsionaalse ühenduvuse sõltuvus genotüübist ning soost on esitatud Joonisel 2 ja Tabelis 2. Emastel (Joonis 2a) ja isastel (Joonis 2b) hiirtel jäävad genotüübist sõltumatult tugevalt positiivseks korrelatsioonid VTA ja PAG-i vahel ning eesmistest haistetuomadest ja piriformkoore vahel. Samuti ei tundu mõõdukad korrelatsioonid orbitaalse/mediaalse prefrontaalkoore ja PAG-i vahel eriti *Tph2*-e välja lülitamisest mõjutatud olevat.

Emastel erinevad korrelatsioonid mõnede piirkondade funktsionaalsetes ühenduvustes isastest, milleks on WT-hiirtel dorsaalse raphé, orbitaalse/mediaalse prefrontaalkoore ja PAG-i ühenduvus VMH-ga, kusjuures PAG-i ja VMH funktsionaalne ühenduvus isastel WT-hiirtel on tugevalt positiivne ($r = 0,76$), kuid emastel on negatiivne ($r = -0,16$). Samuti on habenula ja VTA funktsionaalne ühenduvus emastel WT-hiirtel erinev isaste omast, kus isaste piirkondadevaheline ühenduvus on tugevalt positiivselt korreleeritud ($r = 0,71$) ning emastel nõrgalt positiivselt korreleeritud ($r = 0,17$). VMH ja PAGi puhul oli KO-emaste hiirte ühenduvus positiivselt korreleeritud, kuid WT-hiirtel nõrgalt negatiivselt korreleeritud ($r = -0,16$).

Isastel hiirtel on VTA ja dorsaalse raphé ühenduvus habenulaga KO- ja HET-hiirtel vähenenud võrreldes WT-hiirtega. Dorsaalse raphé ühendused VMH ja orbitaalse/mediaalse prefrontaalkoore ning VMH ühenduvus orbitaalse/mediaalse prefrontaalkoorega ning hipokampusega on samuti HET- ja KO- hiirtel vähenenud võrreldes WT-hiirtega. VMH ühenduvus on veel vähenenud PAG-ga KO-hiirtel võrreldes WT-hiirtega. Haistetuomadest ja piriformkoore vahel esineb KO-hiirtel oluline funktsionaalse ühenduvuse vähenemine võrreldes HET-hiirtega.

Joonis 2

Agressiivsusega seotud ajupiirkondade funktsionaalsed ühenduvused gruppide lõikes (a) emastel ja (b) isastel hiirtel



Märkus: Katkendjoon – negatiivne korrelatsioon; korrelatsioonide erinevused: * vs WT, # vs HET, & vs isased

Tabel 2*Ajupiirkondadevahelised COX aktiivsuse korrelatsioonid agressiivsuse ringes*

		Emased WT	Emased HET	Emased KO	Isased WT	Isased HET	Isased KO
Eesmised haistetuumad vs.	Piriformkoor	0,64*	0,73*	0,66*	0,48	0,83*	0,24
Ventromediaalne hüpotaalamus vs.	Piriformkoor	0,26	0,21	0,29	0,50	0,30	-0,18
	Hipokampus	0,72*	0,46	0,34	0,92*	0,44	0,49
	Dorsaalne raphé	0,08	0,39	0,16	0,86*	-0,27	-0,09
	Ajuveejuhaümbrine hallaine	-0,16	0,28	0,53	0,76*	0,29	-0,08
	Orbitaalne/mediaalne prefronaalkoor	0,17	0,24	0,49	0,85*	0,27	0,04
Habenula vs.	Kõhtmine katend	0,17	0,22	-0,17	0,71*	-0,14	0,12
	Dorsaalne raphé	0,24	0,41	0,26	0,66*	-0,36	0,31
Kõhtmine katend vs.	Dorsaalne raphé	0,28	0,49	0,29	0,63*	0,47	0,35
	Ajuveejuhaümbrine hallaine	0,85*	0,82*	0,90*	0,85*	0,75*	0,77*
Orbitaalne/mediaalne prefronaalkoor vs.	Dorsaalne raphé	0,63*	0,46	0,31	0,86*	0,47	0,48
	Ajuveejuhaümbrine hallaine	0,51	0,48	0,56	0,72*	0,51	0,38

* p<0,05

Dorsaalne raphé ühenduvus projektsioonialadega

Dorsaalne raphé metaboolse aktiivsuse dispersioonanalüüsi soo ja genotüübi interaktsiooniefekt oli statistilise olulisuse poolest üsna piiripealne ($p = 0,066$), siis otsustati lähemalt uurida selle piirkonna aktiivsuse korrelatsioone projektsioonialade aktiivsusega (vaata Tabel 3). Samuti on dorsaalne raphé serotonergilistest ülenevatest tuumadest kõige olulisem ning saadab ulatuslikke projektsioone eesajusse.

Isastel ilmnes mitmes piirkonnas HET-hiirte ajupiirkondade korrelatsioonide erinevus WT-hiirtest. Raphé ja frontaalkoore ($r = 0,25$ vs $r = 0,86$), *globus palliduse* ($r = 0,03$ vs $r = 0,75$), taalamuse tuumade ($r = 0,06$ vs $r = 0,69$) hipokampuse ($r = -0,03$ vs $r = 0,84$), habenula ($r = -0,36$ vs $r = 0,66$) ja kõigi piirkondade keskmise ühenduvus ($r = 0,36$ vs $r = 0,66$) oli

nendel gruppidel erinev. KO-hiirtel oli hipokampuse ($r = 0,41$ vs $r = 0,84$), taalamuse tuumade ($r = 0,18$ vs $r = 0,69$) ja *globus pallidus*-e ($r = -0,16$ vs $r = 0,75$) ühenduvus dorsaalse raphé-ga väiksem võrreldes WT-hiirtega.

Emastel ja isastel hiirtel olid erinevused raphé-tuumade ühenduvuses vöökääruga ($r = 0,13$ vs $r = 0,70$), *globus palliduse* ($r = 0,004$ vs $r = 0,75$), hipokampusega ($r = 0,37$ vs $r = 0,84$) WT-hiirtel, kus emastel oli nende piirkondade ühenduvus raphé-tuumadega väiksem ning habenulaga HET-hiirtel, kus emastel oli korrelatsioon dorsaalse raphé-ga positiivne ($r = 0,41$), kuid isastel negatiivne ($r = -0,36$).

Tabel 3

Dorsaalse raphé COX aktiivsuse korrelatsioonid teiste ajupiirkondadega

Dorsaalne raphé vs.	Genotüüp	Isased	Emased
Eesmised haistetuumad	WT	0,81**	0,54*
	HET	0,39	0,51*
	KO	0,47	0,17
Frontaalkoor	WT	0,86**	0,62*
	HET	0,25	0,49
	KO	0,49	0,44
Vöökäär	WT	0,70*	0,13
	HET	0,27	0,38
	KO	0,41	0,43
<i>Globus pallidus</i>	WT	0,75**	0,004
	HET	0,03	0,59*
	KO	-0,16	0,56
Entorinaalkoor (lat.)	WT	0,38	-0,12
	HET	0,46	0,47
	KO	0,13	0,52
Taalamuse tuumad	WT	0,69*	0,33
	HET	0,06	0,56*
	KO	0,18	0,70*
Hipokampus	WT	0,84**	0,37
	HET	-0,03	0,14
	KO	0,41	0,09
Habenula	WT	0,66*	0,24
	HET	-0,36	0,41
	KO	0,12	0,26
Mustollus	WT	0,60*	0,37
	HET	0,51	0,61*
	KO	0,27	0,26
Kõhtmine katend	WT	0,63*	0,28
	HET	0,47	0,49
	KO	0,36	0,30
Keskmine (58 piirkonda)	WT	0,85**	0,54*
	HET	0,36	0,69**
	KO	0,53	0,69*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; korrelatsioonide erinevused: rasvane kiri – vs WT ($p < 0,05$), allajoonitud - erinevus sooti ($p < 0,05$).

Arutelu ja järeldused

TPH2 defitsiiti ja ülejääki on seostatud mitmete psüühikahäiretega ning see ensüüm on lootustandev sihtmärk mitmete häirete ravis, nagu näiteks depressioon, ärevus ja patoloogiline agressiivsus (Kulikova & Kulikov, 2019). Ajupiirkondade püsiaktiivsuse kaardistamine COX histokeemia meetodil serotoniinidefitsiitsetel hiirtel annab teadmise, millistes ajupiirkondades serotoniini defitsiidi korral muutused toimuvad, ning sellest lähtuvalt on võimalik edasi uurida TPH2-e ning üldisemalt serotoniinisüsteemi rolli aju töös ning erinevates häiretes. Käesolevas uuringus mõõdeti COX histokeemia meetodil 58 ajupiirkonna aktiivsust emastel ning isastel hiirtel, et välja selgitada erinevate ajupiirkondade pikaajaline energeetiline aktiivsust ning funktsionaalne ühenduvus.

COX aktiivsuse erinevusi nii soo kui genotüübi alusel leidis rohkem kaudaalsetes, evolutsiooniliselt vanemates piirkondades. Emastel ulukalleelsetel hiirtel oli heterosügootsete hiirtega võrreldes kõrgem COX aktiivsus mustolluses ja kõhtmises katendis. Heterosügootsetel emastel oli madalam COX aktiivsus võrreldes KO-hiirtega mustolluses, kõhtmises katendis (VTA) ja ajuveejuhaümbrises hallaines (PAG). Isastel heterosügootidel on väiksem COX aktiivsus võrreldes *knock-out* hiirtega CA2, SNc ja dorsaalse raphé tuumades. VTA-sse ning mustollusesse saabub serotonergiline innervatsioon raphé tuumadest (Di Giovanni et al., 2010). Ajuveejuhaümbrise hallaine ning kõhtmise katendi suurem aktiivsus null-alleelsetel hiirtel läheb hästi kokku nende hiirte suurema agressiivsusega. Mõlemat ajupiirkonda peetakse oluliseks osaks agressiivsuse närviringetest. Näiteks leidsid Frye jt. (2014), et VTA toimimine vahendab emastel hiirtel agressiivsust. SN projitseerub neostriaatumisse, limbilisse süsteemi ning basaalganglionitesse, SN aktiivsuse regulatsiooni kaudu osaleb serotoniin mootorsete funktsioonide ja motivatsiooni regulatsioonis (Moukhles et al., 1997). Mustollusesse ja juttkehasse saabuv serotonergiline innervatsioon on inhibeeriv (Cragg et al., 2002), seega võib oletada, et serotoniini puudumisel on KO-hiirtel aktiivsus mustolluse piirkonnas suurem. Suurenenud dopamiini vabanemist eesajus seostatakse agressiivse käitumisega (Siever, 2008).

Ajupiirkondade korrelatsioonide põhjal VMH ja PAG-i ühenduvus suureneb geeni välja lülitamisega, muutudes nõrgast negatiivsest korrelatsioonist emastel WT-loomadel mõõdukalt positiivseks KO-l, see näitab transgeensetel loomadel hüpotalaamilise regulatsiooni muutust ajutüve käitumist vallandavale piirkonnale (PAG). Emastel

heterosügootsetel hiirtel on ulukalleelsetega võrreldes *globus palliduse* ja dorsaalse raphé ühenduvus oluliselt suurem, samas korrelatsioonikordaja alusel on heterosügootid väga sarnased KO-hiirtele.

Raphé funktsionaalsest ühenduvusest teiste ajupiirkondadega näib, et emased on isastega võrreldes oluliselt vähem mõjutatud geeni välja lülitamisest, isastel puhul on kõige suuremad erinevused ühenduvuses WT- ja HET-hiirte vahel. Isastel heterosügootsetel hiirtel on ajupiirkondadevaheliste korrelatsioonide põhjal haistetuumade ja piriformkoore ühenduvus ulukalleelsete hiirtega võrreldes suurem. Haistetuumad on näriliste jaoks väga olulisel kohal info töötlemisel, kuna haistmine mängib olulist rolli kiskjate, järglaste ja liigikaaslaste tuvastamises, emotsionaalsete vastuste, kaasa arvatud agressiivsuse, algatamises (Ashwell, 2012). Haistetuumadest jõuab info ühena mitmest sisendist piriformkoore ja sisend muudest struktuuridest, näiteks serotonergilistest jätketest dorsaalses raphés reguleerib haistetuumade aktiivsust (Ashwell, 2012).

VMH ühenduvus hipokampusega, orbitaalse/mediaalse prefrontaalkoore ja dorsaalse raphéga on tugevam ulukalleelsetel isastel hiirtel võrreldes nii heterosügootidega kui ka KO-loomadega. Ventromediaalselt hüpotaalamust on seostatud agressiivsuse ja kaitsereaktsioonidega mitmete eri kontekstis, mis viitab hüpotaalamuse olulisele rollile emotsionaalsete seisundite väljendamises (Kunwar et al., 2015). Optogeneetiline VMH neuronite stimuleerimine viib isased hiired nii emaste, isaste kui ka eluta olendite ründamiseni (Lin et al., 2011) Nii võib ka VMH funktsionaalse ühenduvuse vähenemine erinevate piirkondadega selgitada nende hiirte agressiivse käitumise muutusi. Matrov et al. (2019) analüüsisid oma töös neljas erinevas ärevuse ning meeleoluhäirete geneetilises mudelis ajupiirkondade oksüdatiivset metabolismi hiirtel ning ka nende töös kerkis esile VMH, mis oli üks piirkondadest, millel oli suurim panus depressioonimudelisse klassifitseerimisel mudeliteüleselt.

Habenula ja dorsaalse raphé ning kõhtmise katendi ühenduvus ning dorsaalse raphé ja orbitaalse/mediaalse prefrontaalkoore ühenduvus on väiksem nii KO-hiirtel kui heterosügootidel võrreldes ulukalleelsete hiirtega. Habenula ning dorsaalne raphé on anatoomiliselt tihedalt seotud ning nende omavahelised ühendused mõjutavad kognitsiooni, tasu, valu, une ja ööpäevarütmidega seotud aspekte (Zhao et al., 2015). Habenula piirkonnad mängivad võtmerolli dorsaalse raphé serotonergiliste neuronite aktiivsuse regulatsioonis ning, kuna habenulasse saabub ka limbilise süsteemi sisend,

ühendab habenula mitmed teised ajupiirkonnad dorsaalse raphéga (Zhao et al., 2015). Habenula reguleerib keskajust naalduvasse tuuma jõudvat signaali, ja on seega aju tasusüsteemi komponenet. Habenula osalus nii agressiivsuse kui ka tasu ringetes võib seletada, miks agressiivsus võib olla rahuldustpakkuv ja sõltuvusttekitav (Gouveia et al., 2022). Dorsaalse raphé metaboolse aktiivsuse korrelatsioonid *globus palliduse*, taalamuse tuumade ja hipokampuse aktiivsusega olid KO-loomadest ja heterosügootidel väiksemad ulukalleelsete hiirtega võrreldes. Dorsaalsest raphést projitseeruvad ulatuslikud jätked kesk- ja eesaju piirkondadesse, sh projektsioonid taalamuse tuumadesse, hipokampusse ja *globus pallidusesse* (Vertes, 1991).

Mitmed varasemad uuringud on kirjeldanud muutusi ajupiirkondade ühenduvuses näiteks depressioonile haavatavuse ja stressile eksponeerimise loomudelites (Harro et al., 2014). Uuring kinnitab, et *Tph2*-e välja lülitamine ei muuda astmeliselt COX aktiivsust, vaid aktiivsus on KO-l kõige kõrgem, keskmine WT-l ja madal HET-l. Selline dünaamika on kooskõlas serotoniinisüsteemi neurokeemilise denervatsiooni katsete tulemustega - osaline 5-HT närvilõpmete kahjustus tekitab käitumises kvalitatiivselt teistsuguse efekti kui peaaegu täielik kahjustus (Häidkind et al., 2004). Samalaadset fenomeni võib näha teise monoamiinisüsteemi, noradrenergilise süsteemi eri ulatuses kahjustamisel (Harro et al., 1999). Mitmed katsed on näidanud, et virgatsaine peaaegu täielikul puudumisel kujuneb närvisüsteemis välja teistlaadne kompensatsioon kui virgatsaine taseme vähenemisel. Võimalik, et see on geneetiliste heteroosiefektide ilmnemise aluseks.

Üks puuduolev või düsfunktsionaalne geen võib mõjutada mitmeid arengulisi protsesse läbi ontogeneesi ja esile kutsuda kompensatoorseid mehhanisme, seetõttu peab hoolikalt läbi mõtlema nende põhjal saadud tulemuste tõlgendamise (Lesch, 2012). Kuna on välja toodud, et serotoniin on oluline neuronite arenguks (Whitaker-Azmitia et al., 1996), siis ei tea me hetkel, milliste mehhanismide kaudu realiseerub *Tph2* täieliku või osalise puudumise mõju aju energiametabolismile ja ajupiirkondadevahelisele koostööle, ega ka seda, millisel arenguetapil see mõju avaldub. Tingimuslike (*conditional*) KO-tehnikate kasutus võib aga aidata teisele neist küsimustest vastata. Tingimusliku KO puhul on võimalik huvipakkuv geen inaktiveerida koespetsiifiliselt igal ajal ontogeneesi jooksul (Lesch et al., 2012). Teiselt poolt imiteerib kasutatud meetod paremini individuaalset arengut TPH2 koodiva geeni variatiivsuse alusel eriti heterosügootide näol, kuna see mõju toimubki läbi kogu arengu.

Kasutatud kirjandus

- Alenina, N., Kikic, D., Todiras, M., Mosienko, V., Qadri, F., Plehm, R., Boyé, P., Vilianovitch, L., Sohr, R., Tenner, K., Hörtnagl, H., & Bader, M. (2009). Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(25), 10332–10337.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0810793106>
- Allen, L. S., Richey, M. F., Chai, Y. M., & Gorski, R. A. (1991). Sex differences in the corpus callosum of the living human being. *Journal of Neuroscience*, *11*(4), 933–942.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-04-00933.1991>
- Allen, L. S., Hines, M., Shryne, J. E., & Gorski, R. A. (1989). Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. *Journal of Neuroscience*, *9*(2), 497–506.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-02-00497.1989>
- Andrade C. (2010). Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications. *Mens Sana Monographs*, *8*(1), 146–150.
<https://doi.org/10.4103/0973-1229.58825>
- Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M., & Thomson, J. A. (2015). Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *51*, 164–188.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.018>
- Ashwell, K. (2012). The Olfactory System. *The Mouse Nervous System*, 653–660.
 doi:10.1016/b978-0-12-369497-3.10026-3
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Jacob Filho, W., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *513*(5), 532–541.
<https://doi.org/10.1002/cne.21974>
- Bacqué-Cazenave, J., Bharatiya, R., Barrière, G., Delbecque, J.-P., Bouguiyou, N., Di Giovanni, G., Cattaert, D., & De Deurwaerdère, P. (2020). Serotonin in Animal Cognition and Behavior. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5), Art. 5.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051649>

- Baker, K. G., Halliday, G. M., & Törk, I. (1990). Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 301(2), 147–161.
<https://doi.org/10.1002/cne.903010202>
- Baker, K. G., Halliday, G. M., Halasz, P., Hornung, J.-P., Geffen, L. B., Cotton, R. G. H., & Törk, I. (1991). Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain. *Synapse*, 7(4), 301–320.
<https://doi.org/10.1002/syn.890070407>
- Blier, P., & El Mansari, M. (2013). Serotonin and beyond: Therapeutics for major depression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1615), 20120536. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0536>
- Boadle-Biber, M. C. (1993). Regulation of serotonin synthesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 60(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(93\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0079-6107(93)90009-9)
- Brivio, P., Sbrini, G., Peeva, P., Todiras, M., Bader, M., Alenina, N., & Calabrese, F. (2018). TPH2 Deficiency Influences Neuroplastic Mechanisms and Alters the Response to an Acute Stress in a Sex Specific Manner. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00389>
- Carlsson, M., & Carlsson, A. (1988). A regional study of sex differences in rat brain serotonin. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 12(1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(88\)90061-9](https://doi.org/10.1016/0278-5846(88)90061-9)
- Chagraoui, A., Whitestone, S., Baassiri, L., Manem, J., Di Giovanni, G., & De Deurwaerdère, P. (2019). Neurochemical impact of the 5-HT_{2C} receptor agonist WAY-163909 on monoamine tissue content in the rat brain. *Neurochemistry International*, 124, 245–255.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.01.019>
- Conejo, N. M., González-Pardo, H., Gonzalez-Lima, F., & Arias, J. L. (2010). Spatial learning of the water maze: Progression of brain circuits mapped with cytochrome oxidase histochemistry. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(3), 362–371.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.002>
- de Courten-Myers, G. M. (1999). The Human Cerebral Cortex: Gender Differences in Structure and Function. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58(3), 217–226. <https://doi.org/10.1097/00005072-199903000-00001>

- Di Giovanni, G., Esposito, E., & Di Matteo, V. (2010). Role of Serotonin in Central Dopamine Dysfunction. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *16*(3), 179–194. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00135.x>
- Ferrari, P. F., Palanza, P., Parmigiani, S., de Almeida, R. M. M., & Miczek, K. A. (2005). Serotonin and aggressive behavior in rodents and nonhuman primates: Predispositions and plasticity. *European Journal of Pharmacology*, *526*(1), 259–273. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.10.002>
- Fitoussi, A., Dellu-Hagedorn, F., & De Deurwaerdère, P. (2013). Monoamines tissue content analysis reveals restricted and site-specific correlations in brain regions involved in cognition. *Neuroscience*, *255*, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.059>
- Frye, C. A., Walf, A. A., Kohtz, A. S., & Zhu, Y. (2014). Progesterone-facilitated lordosis of estradiol-primed mice is attenuated by knocking down expression of membrane progesterin receptors in the midbrain. *Steroids*, *81*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.11.009>
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (2007). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (3rd ed.) Academic Press.
- Gonzalez-Lima F. (1998). *Cytochrome Oxidase in Neuronal Metabolism and Alzheimer's Disease*. Plenum Press.
- Gorlova, A., Ortega, G., Waider, J., Bazhenova, N., Veniaminova, E., Proshin, A., Kalueff, A. V., Anthony, D. C., Lesch, K.-P., & Strekalova, T. (2020). Stress-induced aggression in heterozygous TPH2 mutant mice is associated with alterations in serotonin turnover and expression of 5-HT₆ and AMPA subunit 2A receptors. *Journal of Affective Disorders*, *272*, 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.04.014>
- Gouveia, F. V., & Ibrahim, G. M. (2022). Habenula as a Neural Substrate for Aggressive Behavior. *Frontiers in Psychiatry*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2022.817302>
- Guthman, E. M., & Falkner, A. L. (2022). Neural mechanisms of persistent aggression. *Current Opinion in Neurobiology*, *73*, 102526. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102526>

- Gutknecht, L., Waider, J., Kraft, S., Kriegebaum, C., Holtmann, B., Reif, A., Schmitt, A., Lesch, K.-P. (2008). Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *Journal of Neural Transmission*, *115*(8), 1127–1132. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0096-6>
- Gutknecht, L., Kriegebaum, C., Waider, J., Schmitt, A., & Lesch, K.-P. (2009). Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: Convergent data from Tph2 knockout mice. *European Neuropsychopharmacology*, *19*(4), 266–282. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.12.005>
- Gutknecht, L., Araragi, N., Merker, S., Waider, J., Sommerlandt, F. M. J., Mlinar, B., Baccini, G., Mayer, U., Proft, F., Hamon, M., Schmitt, A. G., Corradetti, R., Lanfumey, L., & Lesch, K.-P. (2012). Impacts of Brain Serotonin Deficiency following Tph2 Inactivation on Development and Raphe Neuron Serotonergic Specification. *PLOS ONE*, *7*(8), e43157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043157>
- Gutknecht, L., Popp, S., Waider, J., Sommerlandt, F. M. J., Göppner, C., Post, A., Reif, A., van den Hove, D., Strelakova, T., Schmitt, A., Colaço, M. B. N., Sommer, C., Palme, R., & Lesch, K.-P. (2015). Interaction of brain 5-HT synthesis deficiency, chronic stress and sex differentially impact emotional behavior in Tph2 knockout mice. *Psychopharmacology*, *232*(14), 2429–2441. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-3879-0>
- Halliday, G. M., Li, Y. W., Joh, T. H., Cotton, R. G. H., Howe, P. R. C., Geffen, L. B., & Blessing, W. W. (1988). Distribution of monoamine-synthesizing neurons in the human medulla oblongata. *Journal of Comparative Neurology*, *273*(3), 301–317. <https://doi.org/10.1002/cne.902730303>
- Harro, J., Pähkla, R., Modiri A-R, null, Harro, M., Kask, A., & Oreland, L. (1999). Dose-dependent effects of noradrenergic denervation by DSP-4 treatment on forced swimming and beta-adrenoceptor binding in the rat. *Journal of Neural Transmission* (Vienna, Austria: 1996), *106*(7–8), 619–629. <https://doi.org/10.1007/s007020050184>
- Harro, J., Kanarik, M., Matrov, D., & Panksepp, J. (2011). Mapping patterns of depression-related brain regions with cytochrome oxidase histochemistry: Relevance of animal affective systems to human disorders, with a focus on resilience to adverse events. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(9), 1876–1889. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.016>

- Harro, J., Kanarik, M., Kaart, T., Matrov, D., Kõiv, K., Mällo, T., Del Río, J., Tordera, R. M., & Ramirez, M. J. (2014). Revealing the cerebral regions and networks mediating vulnerability to depression: Oxidative metabolism mapping of rat brain. *Behavioural Brain Research*, 267, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.019>
- Hasegawa, H., Nakamura, K. (2010). Tryptophan Hydroxylase and Serotonin Synthesis Regulation. In C. B. Müller & B. L. Jacobs (Eds.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin* (pp. 183-202). Elsevier.
- Haidkind, R.; Eller, M.; Kask, A.; Harro, M.; Rincken, A.; Orelund, L.; Harro, J. (2004). Increased behavioural activity of rats in forced swimming test after partial denervation of serotonergic system by parachloroamphetamine treatment. *Neurochemistry International*, 45(5), 721–732.
- Ishimura, K., Takeuchi, Y., Fujiwara, K., Tominaga, M., Yoshioka, H., & Sawada, T. (1988). Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neuroscience Letters*, 91(3), 265–270. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90691-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90691-X)
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1), 165–229. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
- Jones, L. A., Sun, E. W., Martin, A. M., & Keating, D. J. (2020). The ever-changing roles of serotonin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 125, 105776. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105776>
- Jonnakuty, C., & Gagnoli, C. (2008). What do we know about serotonin? *Journal of Cellular Physiology*, 217(2), 301–306. <https://doi.org/10.1002/jcp.21533>
- Kanarik, M., Matrov, D., Kõiv, K., Eller, M., Tõnissaar, M., & Harro, J. (2008). Changes in regional long-term oxidative metabolism induced by partial serotonergic denervation and chronic variable stress in rat brain. *Neurochemistry International*, 52(3), 432–437. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.08.003>
- Kanarik, M., & Harro, J. (2018). Sociability trait and regional cerebral oxidative metabolism in rats: Predominantly nonlinear relations. *Behavioural Brain Research*, 337, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.049>

- Kelly, S. J., Ostrowski, N. L., & Wilson, M. A. (1999). Gender Differences in Brain and Behavior: Hormonal and Neural Bases. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64(4), 655–664. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00167-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00167-7)
- Ko, J. (2017). Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns. *Frontiers in Neural Circuits*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2017.00041>
- Kulikova, E. A., & Kulikov, A. V. (2019). Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: Focus on animal models. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 23(8), 655–667. <https://doi.org/10.1080/1472822,2.2019.1634691>
- Kunwar, P. S., Zelikowsky, M., Remedios, R., Cai, H., Yilmaz, M., Meister, M., & Anderson, D. J. (2015). Ventromedial hypothalamic neurons control a defensive emotion state. *eLife*, 4, e06633. <https://doi.org/10.7554/eLife.06633>
- Kästner, N., Richter, S. H., Urbanik, S., Kunert, J., Waider, J., Lesch, K.-P., Kaiser, S., & Sachser, N. (2019). Brain serotonin deficiency affects female aggression. *Scientific Reports*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37613-4>
- Laas, K., Kiive, E., Mäestu, J., Vaht, M., Veidebaum, T., & Harro, J. (2017). Nice guys: Homozygosity for the TPH2 -703G/T (rs4570625) minor allele promotes low aggressiveness and low anxiety. *Journal of Affective Disorders*, 215, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.03.045>
- Lesch, K. P., & Merschdorf, U. (2000). Impulsivity, aggression, and serotonin: A molecular psychobiological perspective. *Behavioral Sciences & the Law*, 18(5), 581–604. [https://doi.org/10.1002/1099-0798\(200010\)18:5<581::AID-BSL411>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1099-0798(200010)18:5<581::AID-BSL411>3.0.CO;2-L)
- Lesch, K.-P., Araragi, N., Waider, J., van den Hove, D., & Gutknecht, L. (2012). Targeting brain serotonin synthesis: Insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1601), 2426–2443. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0039>
- Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., & Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, 470(7333), Article 7333. <https://doi.org/10.1038/nature09736>

- Marazziti, D., Landi, P., Baroni, S., Vanelli, F., Bartolommei, N., Picchetti, M., & Dell'Osso, L. (2013). The role of platelet/lymphocyte serotonin transporter in depression and beyond. *Current Drug Targets*, 14(5), 522–530. <https://doi.org/10.2174/1389450111314050003>
- Marazziti, D. (2017). Understanding the role of serotonin in psychiatric diseases. *F1000Research*, 6, 180. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10094.1>
- Matrov, D., Imbeault, S., Kanarik, M., Shkolnaya, M., Schikorra, P., Miljan, E., Shimmo, R., & Harro, J. (2020). Comprehensive mapping of cytochrome c oxidase activity in the rat brain after sub-chronic ketamine administration. *Acta Histochemica*, 122(3), 151531. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151531>
- Matrov, D., Kaart, T., Lanfumey, L., Maldonado, R., Sharp, T., Tordera, R. M., Kelly, P. A., Deakin, B., & Harro, J. (2019). Cerebral oxidative metabolism mapping in four genetic mouse models of anxiety and mood disorders. *Behavioural Brain Research*, 356, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.bb.2018.05.031>
- Mosienko, V., Beis, D., Pasqualetti, M., Waider, J., Matthes, S., Qadri, F., Bader, M., & Alenina, N. (2015). Life without brain serotonin: Reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis. *Behavioural Brain Research*, 277, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.005>
- Mosienko, V., Matthes, S., Hirth, N., Beis, D., Flinders, M., Bader, M., Hansson, A. C., & Alenina, N. (2014). Adaptive changes in serotonin metabolism preserve normal behavior in mice with reduced TPH2 activity. *Neuropharmacology*, 85, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.015>
- Moukhles, H., Bosler, O., Bolam, J. P., Vallée, A., Umbriaco, D., Geffard, M., & Doucet, G. (1997). Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience*, 76(4), 1159–1171. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00452-6)
- Nelson, R. J., & Trainor, B. C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrn2174>
- Olivier, B. (1977). *The ventromedial hypothalamus and aggressive behaviour in rats*. *Aggressive Behavior*, 3(1), 47–56. doi:10.1002/1098-2337(1977)3:1<47::aid-ab2480030105>3.0.co;2-h

- Pierucci, M., Chambers, S., Partridge, L., De Deurwaerdère, P., & Di Giovanni, G. (2014). Role of Central Serotonin Receptors in Nicotine Addiction. R. A. J. Lester (Toim), *Nicotinic Receptors* (1k 279–305). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1167-7_14
- Pino, G. D., Moessner, R., Lesch, K. P., Lauder, J. M., & Persico, A. M. (2004). Roles for Serotonin in Neurodevelopment: More than just Neural Transmission. *Current Neuropharmacology*, 2(4), 403–417.
- Pratelli, M., & Pasqualetti, M. (2019). Serotonergic neurotransmission manipulation for the understanding of brain development and function: Learning from Tph2 genetic models. *Biochimie*, 161, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.016>
- Puginier, E., Bharatiya, R., Chagraoui, A., Manem, J., Cho, Y. H., Garret, M., & De Deurwaerdère, P. (2019). Early neurochemical modifications of monoaminergic systems in the R6/1 mouse model of Huntington’s disease. *Neurochemistry International*, 128, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.05.001>
- Siever LJ. Neurobiology of aggression and violence. *American Journal of Psychiatry*. 2008 Apr;165(4):429-42. doi: 10.1176/appi.ajp.2008.07111774.
- Strekalova, T., Svirin, E., Waider, J., Gorlova, A., Cespuglio, R., Kalueff, A., Pomytkin, I., Schmitt-Boehrer, A. G., Lesch, K.-P., & Anthony, D. C. (2021). Altered behaviour, dopamine and norepinephrine regulation in stressed mice heterozygous in TPH2 gene. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 108, 110155. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110155>
- Vertes, R. P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 313(4), 643–668. <https://doi.org/10.1002/cne.903130409>
- Walther, D. J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., & Bader, M. (2003). Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science*, 299(5603), 76–76. <https://doi.org/10.1126/science.1078197>
- Waider, J., Araragi, N., Gutknecht, L., & Lesch, K.-P. (2011). Tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) in disorders of cognitive control and emotion regulation: A perspective.

Psychoneuroendocrinology, 36(3), 393–405.

<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.12.012>

Waider, J., Proft, F., Langlhofer, G., Asan, E., Lesch, K.-P., & Gutknecht, L. (2013). GABA concentration and GABAergic neuron populations in limbic areas are differentially altered by brain serotonin deficiency in Tph2 knockout mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 139(2), 267–281. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1029-x>

Wei, D., Talwar, V., & Lin, D. (2021). Neural circuits of social behaviors: Innate yet flexible. *Neuron*, 109(10), 1600–1620. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.02.012>

Whitaker-Azmitia, P. M., Druse, M., Walker, P., & Lauder, J. M. (1995). Serotonin as a developmental signal. *Behavioural Brain Research*, 73(1–2), 19–29.

[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00071-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00071-X)

Zhao, H., Zhang, B.-L., Yang, S.-J., & Rusak, B. (2015). The role of lateral habenula–dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness. *Behavioural Brain Research*, 277, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.016>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Pilleriin Kupper,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Ajupiirkondade energeetilise püsiaktiivsuse kaardistamine serotoniinipuudulikkusega hiirtel, mille juhendajad on Jaanus Harro ja Margus Kanarik

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 4.0, 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.

Pilleriin Kupper

15.05.2023