

Tartu Ülikool
Psühholoogia instituut

Richard Naar

**LIMBILISE SÜSTEEMIGA SEOTUD MEMBRAANVALKU
(LAMP) KODEERIVA *LSAMP* GEENI PUUDULIKKUSEGA
HIIRTE VALUTUNDLIKKUS**

Seminaritöö

Juhendaja: Jürgen Innos, füsioloogia instituudi teadur

Läbiv pealkiri: *Lsamp* puudulikkusega hiirte valutundlikkus

Tartu 2013

Sisukord

Kokkuvõte	3
Abstract	3
Sissejuhatus	4
Kirjanduse ülevaade	4
LAMP valk.....	4
<i>Lsamp</i> puudulikkusega hiired.	5
Lsamp geeni avaldumisega seotud häired inimesel.	5
Käesoleva töö eesmärk	6
Meetodid.....	7
Loomad ja nende elutingimused.....	7
Katsete üldine korraldus	7
Andmete analüüs	7
Kuuma plaadi katse (<i>hot plate</i>).....	8
Külma plaadi katse (<i>cold plate</i>).....	8
Saba termilise tundlikkuse katse (<i>tail flick</i>).....	8
Plantaaranalgeesia test (<i>plantar analgesia</i>)	8
Tulemused	9
Kuuma plaadi katse (<i>hot plate</i>).....	9
Külma plaadi katse (<i>cold plate</i>).....	9
Saba termilise tundlikkuse katse (<i>tail flick</i>).....	10
Plantaaranalgeesia (<i>plantar analgesia</i>)	11
Arutelu ja järeldused	12
Tänuavaldused.....	14
Kirjanduse loetelu	15

Kokkuvõte

Selle töö eesmärgiks on kirjeldada limbilise süsteemiga seotud membraanvalku (LAMP) kodeeriva *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte valutundlikkust. Hiirtel on *Lsamp* geeni mõju uuritud eelkõige seoses ärevuse, hirmu tingimise, sotsiaalse käitumise ja uudse keskkonnaga kohanemisega. Inimestel on leitud seoseid *Lsamp* geeni ja mitmete psühhiaatriliste haiguste ning sooritatud enesetappudega. Katseloomadena kasutati Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis loodud *Lsamp* geeni puudulikkusega isaseid hiiri. Viidi läbi katsed kolme enim kasutatava valutundlikkuse hindamise (kuuma plaadi, külma plaadi ja termilise tundlikkuse hindamise) meetodil. Neljandana kirjeldati Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis plantaaranalgeesia Hargreaves'i meetodil saadud tulemusi. Statistiliselt oluline muutus ilmnis plantaaranalgeesia katses, kus *Lsamp* $-/-$ hiirte valutundlikkus oli madalam kui *Lsamp* $+/-$ ja *Lsamp* $+/+$ pesakonnakaaslastel ($F(2,111)=8,56$; $p<0,0003$).

Märksõnad: *Lsamp* geen, valutundlikkus, ärevus

Abstract

The aim of this Seminar paper is to study the pain related behavior in Limbic System-Associated Membrane Protein (LAMP) gene (*Lsamp*) deficit mice. In mice, the *Lsamp* gene has been associated with, anxiety, fear reaction, social behaviour and adaptation in novel environment. Links have been found between the human *Lsamp* gene and several psychiatric disorders and completed suicide. *Lsamp* deficit male mice, bred at the Institute of Physiology, University of Tartu, were used in the experiments. Three of the most commonly used pain sensitivity tests (hot plate, cold plate, tail flick) were conducted. The study also describes the results of plantar analgesia (Hargreaves) method, carried out at the Institute of Physiology, University of Tartu. As statistically significant change was found in the plantar analgesia test. The pain sensitivity in *Lsamp* $-/-$ mice was lower compared to their *Lsamp* $+/-$ and *Lsamp* $+/+$ littermates ($F(2,111)=8,56$; $p<0,0003$).

Keywords: *Lsamp* gene, pain sensitivity, anxiety

Sissejuhatus

Limbilise süsteemiga seotud membraanvalku (LAMP) kodeeriva geeni puudulikkusega hiirte uurimine võimaldab heita pilgu limbilise süsteemiga seotud häiretele ja nende neuraalsetele alustele. Pärast valgu esmakirjeldamist, mis toimus pea kolmkümmend aastat tagasi, on avaldatud märkimisväärne hulk nii *Lsamp* puudulikkusega hiirte fenotüüpi kirjeldavaid kui ka molekulaarseid töid, mis lubavad aimata *Lsamp* geeni funktsioone inimesel ja hiirel. Vaatamata sellele, et *Lsamp* geeni puudulikkusega loomad sarnanevad motoorse ja sensoorse arengu poolest väga oma metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, esineb neil siiski arvestatavaid kõrvalekaldeid sotsiaalses ja ärevuskäitumises. *Lsamp* geeni erinevat avaldumismäära inimesel on seostatud mitmete psühhiaatriliste haigustega (sh skisofreenia, bipolaarsene häire, paanikahäire). Käesolev töö, mis uurib võimalikke muutusi *Lsamp* puudulikkusega homosügootsete (*Lsamp* $-/-$) ja heterosügootsete (*Lsamp* $+/-$) hiirte valutundlikkuses, on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on selle geeni puudulikkusega hiirte fenotüübi igakülgne iseloomustamine ja *Lsamp* geeni funktsiooni(de) väljaselgitamine. Sedalaadi geeniuuringud, mille lõppeesmärgiks on uute (psühhiaatriliste) ravimite väljatöötamine, eeldavad mõjutavate geenide ja närviradade funktsiooni võimalikult põhjalikku kirjeldamist, sest see aitab vältida uute ravimite ootamatuid kõrvaltoimeid. Töö eesmärgiks ongi kirjeldada üht kildu *Lsamp* geeni fenotüübist – valutundlikkust.

Kirjanduse ülevaade

LAMP valk. Limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (LAMP, *limbic system-associated membrane protein*) on 64-68 kilodaltoni (kDa) suurune rohkelt glükosüleeritud valk. LAMP valk kuulub immunoglobuliini superperekonda ja sellele on iseloomulik kolm immunoglobuliini (Ig) domääni ehk suhteliselt iseseisva struktuuri ja funktsiooniga üksust (Pimenta, Fischer, & Levitt, 1996). LAMP ekspresseerub neuronite kehadel ja proksimaalsetel dendriitidel (Zacco et al, 1990), kinnitades membraanile GPI-ankru (glükosüül-fosfatidüülinoositolankur) abil (Pimenta et al, 1995) ja seda eeskätt limbilises süsteemis, kuid ka frontaalkoores (Behan, Byrne, Dunn, Cagney, & Cotter, 2009), vähem kesk- ja tagaajus (Reinoso, Pimenta, & Levitt, 1996) ning neokorteksi sensorsetes süsteemides. Tõenäoliselt mängib LAMP olulist rolli neuronite jätkete kasvu reguleerimisel, eriti mitmesuguste juhteteede väljakujunemise perioodil (Philips et al, 2007; Pimenta et al,

1995). Katsed närvirakukultuuride ja prepareeritud koelõikudega on näidanud, et LAMP valk võib nii soodustada kui ka pärssida närvirakkude jätkete kasvu (Gil et al, 2002; Mann, Waternaux, Haas, & Malone, 1998). LAMP valgu aminohappeline järjestus on liikide vahel kõrgelt konserveerunud. Inimese ja hiire järjestuste kokkulangevus on 99%, seetõttu on hiir sobiv mudel selle geeni funktsiooni uurimiseks, sest võimaldab laiendada tulemusi mõõndustega ka inimestele (Pimenta et al, 1996).

Lsamp puudulikkusega hiired. Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis loodud *Lsamp* geeni puudulikkusega (*knockout*) hiirel tehtud katsed on näidanud, et *Lsamp* *-/-* loomad on normaalse sigivuse, väljanägemise, kuulmise, nägemise ja haistmisega. Seevastu on *Lsamp* *-/-* hiired uudse keskkonna uurimisel aktiivsemad ja vähem ärevad kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased, samuti esineb neil olulisi kõrvalekaldeid sotsiaalses käitumises (vurrude pügamise puudumine nooremas eas ja vähenenud agressiivsus), ujumiskiiruses ning hirmu tingimise ja -reaktsiooni katsetes (Innos et al, 2011). Lisaks on katsetulemused näidanud, et *Lsamp* *-/-* hiired on vähem tundlikud eraldatusest tingitud stressi suhtes kui *Lsamp* *+/+* pesakonnakaaslased. Eelnev viitab asjaolule, et LAMP valk on vajalik uue ja potentsiaalselt ähvardava keskkonna või stiimuliga kohanemiseks (Innos et al, 2012). Samuti on leitud, et *Lsamp* geeni väljalülitamine kutsub esile ulatuslikke muutusi keskses virgatsainesüsteemides, näiteks serotoniinisüsteemi aktiveerumise ja dopamiini transporteri ekspresioonitaseme vähenemise (Innos et al, 2013).

Lsamp geeni avaldumisega seotud häired inimesel. *Lsamp* geeni erinevat avaldumismäära ja selle iseloomu inimesel on seostatud mitmete psühhiaatriliste haigustega. *Lsamp* geeni polümorfismide ja paanikahäirete võimalikele seostele viitasid esimesena Tartu Ülikooli psühhiaatria osakonna teadlased koostöös kolleegidega Ottawa Ülikoolist (Koido et al, 2012). *Postmortem* uuringud on näidanud, et LAMP valgu hulk on nii skisofreenia kui ka bipolaarse häire diagnoosiga patsientidel otsmikusagaras tõusnud (Behan et al, 2009). *Lsamp* geeni väiksemat avaldumist, võrreldes terve koega, on leitud munasarjavähi koes (Ntougkos et al, 2005), seevastu neeruvähi koes on selle geeni ekspresioonitase kõrgem (Chen et al, 2003). Mitmes töös on leitud, et *Lsamp* geen käitub ka osteosarkoomis ehk luukasvajas tuumorsupressorgeeninina (Kresse et al, 2009; Pasic et al, 2010; Yen et al, 2009). *Lsamp* valgus nähakse ka suitsidaalse käitumise üht võimalikku geneetilist komponenti. Must et al (2008)

leidsid nimelt, et suitsiidi sooritanud ja tervete, kontrollgruppi kuulunud meeste vahel esineb statistiliselt olulisi erinevusi *Lsamp* geeni polümorfismides.

Käesoleva töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks on kirjeldada LAMP valku kodeeriva *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte valutundlikkust. Selleks viisin läbi katsed kolme enimkasutatava hiirte valutundlikkuse hindamise meetodil: kuuma plaadi (*hot plate*), külma plaadi (*cold plate*) ja saba termilise tundlikkuse mõõtmise (*tail flick*). Neljandana kirjeldan Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis plantaaranalgeesia (Hargreaves'i) meetodil saadud tulemusi (Sagalajev, 2011), milles osalesin vaatejana, sest neli nimetatud katset moodustavad temaatilise terviku. Tuginedes varasematele tähelepanekutele, mille kohaselt:

- *Lsamp* geeni puudulikkusega hiired piikuvad sabast tõstes sagedamini kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased, mis võib peegeldada nende kõrgemat valutundlikkust;
- *Lsamp* geeni seostatakse suitsidaalse käitumisega (Must et al, 2008) ja muutusi valuläves peetakse omakorda oluliseks suitsidaalset käitumist iseloomustavaks teguriks (Franklin, Hessel, & Prinstein, 2011);

sõnastasin hüpoteesi: *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte valutundlikkus on kõrgem, võrrelduna nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastega.

Meetodid

Loomad ja nende elutingimused

Kõikides katsetes kasutati F2 põlvkonna kolme kuu vanuseid isaseid hiiri. Kõiki loomi hoiti kaheksaliikmelistes gruppides standardsetes laboritingimustes 12-tunnise valgus/pimedus tsükliga ruumis (tuled põlema kell 07:00 ja kustu 19:00) ning pideva ligipääsuga toidule ja veele. Temperatuur loomade eluruumis hoiti vahemikus $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Kõigi katsete vahele jäi vähemalt nädal aega.

Katsete üldine korraldus

Esimeses kolmes katses kasutati kokku 48 hiirt (kõiki hiiri kõigis kolmes katses): 16 *Lsamp* puudulikkusega homosügootset (*Lsamp* -/-), 16 heterosügootset (*Lsamp* +/-) ning 16 metsiktüüpi pesakonnakaaslast (*Lsamp* +/+). Neljandas katses kasutati täiendavalt 48 (16+16+16) katses varem mitte osalenud homosügootset, heterosügootset ja metsiktüüpi hiirt. Vähemalt 60 minutit enne katse algust viidi loomad koos kodupuuriga katseruumi, et nad harjuksid katseruumi valguse, lõhnade ja helidega. Kõik katsed viidi läbi samadel kellaaegadel (kell 12:00 kuni 17:00), et vältida ööpäevarütmist tulenevaid võimalikke muutusi valutundlikkuses (Lai & Chan, 1982). Iga katse ajal ja pärast katset vaadeldi hoolikalt loomade käitumist, et välistada termilise stiimuliga kokkupuutest tingitud koekahjustusi. Katsete läbiviimiseks oli olemas loomkatse läbiviimise loakomisjonilt saadud luba.

Andmete analüüs

Tulemused on esitatud sekundites ja gruppide keskmise väärtusena koos standardveaga (keskmine \pm SEM). Kasutati vastavalt ühe või mitmesuunalist dispersioonanalüüsi (ANOVA/MANOVA). Sõltumatuks faktoriks oli käesolevas analüüsis hiirte genotüüp (*Lsamp* puudulikkusega homosügootne, heterosügootne või metsiktüüpi isane hiir) ja sõltuvaks faktoriks latents ehk aeg, mis kulus kokkupuutest stiimuliga uuritava käitumiseni (käparaputus või lakkumine ja hüpe). Statistiliselt oluliseks loeti p-väärtust alla 0,05. Katsete statistiliseks analüüsiks kasutati statistikaprogrammi Statistica 9.

Kuuma plaadi katse (*hot plate*)

Kuuma plaadi katses asetatakse hiired ükshaaval pleksiklaasist silindrisse (diameeter 20 cm; kõrgus 40 cm) kuumale alusele. Katseaparatuurina kasutati mudelit Stuart Scientific SH3D, U.K, mille temperatuur fikseeriti ($52\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) sisseehitatud digitaalse termomeetriga. Mõõdeti kaht latentsi (aega, mis kulus hiire plaadile asetamisest): käparaputuse või lakkumiseni ja esimese hüppeni. Katseloomad, kellel ei täheldatud 40 sekundi jooksul nimetatud käitumist eemaldati katsest, et vältida kuumusest tingitud koekahjustusi loomade nahal. Latentside mõõtmiseks kasutati stopperkella.

Külma plaadi katse (*cold plate*)

Külma plaadi katses, sarnaselt kuuma plaadi katsega, asetati hiired fikseeritud temperatuuriga alusele pleksiklaasist silindrisse (diameeter 20 cm; kõrgus 40cm). Katseaparatuurina kasutati mudelit Stuart Scientific SH3D, U.K, mille temperatuur fikseeriti ($0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) sisseehitatud digitaalse termomeetriga. Mõõdeti latentsi looma plaadile asetamisest esimese käparaputuse või lakkumiseni. Mõõtmiseks kasutati stopperkella.

Saba termilise tundlikkuse katse (*tail flick*)

Saba termilise tundlikkuse katse on laialdaselt kasutatav meetod valutundlikkuse hindamiseks hiirtel ja rottidel. Kuna näriliste puhul on näidatud valutundlikkuse erinevust distaalsel ja proksimaalsel sabaosal (Ness, Jones, & Gebhart, 1987), märgistati kõigi loomade saba keskkohad. Loom paigutati plastist tuubi ja saba keskkohast asetati soojust kiirgavale pinnale, misjärel spetsiaalne katseseade, TSE Systems (Saksamaa), mõõtis automaatselt latentsi sabale mõjuva kiirguse (50°C) algusest kuni saba äratõmbamiseni.

Plantaaranalgeesia test (*plantar analgesia*)

Plantaaranalgeesia katses asetati hiir pleksiklaasist kambrisse ja mõjutati hiire tagumise käpa talda infrapuna soojuskiirega, misjärel katseaparatuur (Ugo Basile, Itaalia) registreeris automaatselt käpa äratõmbamise latentsi. Test viidi läbi meetodi esmakirjeldaja (Hargreaves, Dubner, Brown, Flores, & Joris, 1988) eeskujul. Erinevalt saba termilise tundlikkuse katsest, milles kasutati samuti infrapunakiirt, said selles katses hiired vabalt liikuda. Hiir asetati ühte kolmest pleksiklaasist kambrisse (17 x 22 cm ja 13 cm kõrge), mille

vaheseinad olid läbipaistmatud, et katseloomad üksteist ei näeks. Kahandamaks uude keskkonna ja eksperimentaatori puudutustest tekkivat stressi, asetati iga hiir kolmel katsele eelnenud päeval 60 minutiks katsekeskkonda. Enne katse algust lubati kõigil hiirtel 30 minuti jooksul katsekeskkonnaga tutvuda. Alles seejärel mõjutati hiire tagajalga mobiilse, pleksiklaasist kambri põhja all asetseva, infrapunakiirega (50°C) ja registreeriti käpa äratõmbamise latents. Protseduuri korrati kuni neli korda ja seejärel arvutati keskmise latentsi pikkus ühe looma kohta. Kahe mõõtmise vahele jäi vähemalt kaheminutiline paus, sest on täheldatud, et reflektorset käitumist mõjutab harjumine, mis võib muuta vastuse kiiremaks või aeglasemaks (Groves & Thompson, 1970).

Tulemused

Kuuma plaadi katse (*hot plate*)

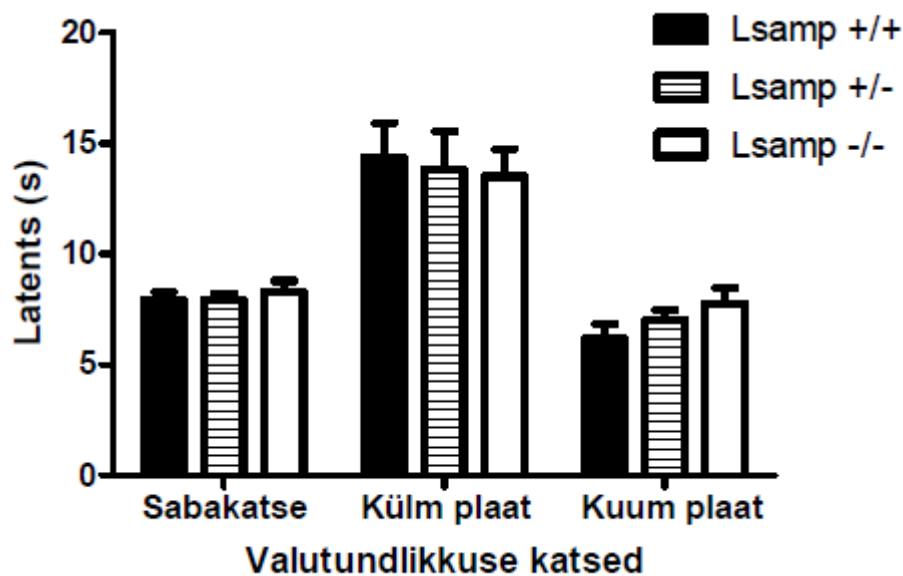
Kuuma plaadi katses ei tuvastatud statistiliselt olulist erinevust *Lsamp* geeni puudulikkusega homosügootsete (-/-), heterosügootsete (+/-) ja nende metsiktüüpi (+/+) pesakonnakaaslaste esimeste ehk käparaputuse latentside vahel: $F(2, 45)=,25975$, $p=0,77239$ (vt Joonis 1). Teise ehk hüppamise latentsi mõõtmisel ilmnes tugev laeefekt ja seetõttu neid tulemusi analüüsi ei kaasatud. Laeefekti vältimiseks oleksime saanud katseloomi pikemalt (kauem kui 40 sek) valustiimulile ($52\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) eksponeerida, kuid otsustasime seda eetilistel kaalutlustel mitte teha. Katsete järgsel vaatlusel ei täheldatud kuuma metallplaadiga kokkupuutest tekkinud koekahjustusi loomade sabal ja käppadel ega sellest tingitud käitumismuutusi. $N = 16$ kõigis katsetes ja kõigis gruppides.

Külma plaadi katse (*cold plate*)

Külma plaadi katses ei tuvastatud *Lsamp* geeni puudulikkusega homosügootsete (-/-), heterosügootsete (+/-) ja nende metsiktüüpi (+/+) pesakonnakaaslaste vahel statistiliselt olulist erinevust valutundlikkuses: $F(2, 45)=0,08425$, $p=0,91934$ (vt Joonis 1). Samuti ei täheldatud külma plaadiga kokkupuutest tingitud koekahjustusi. $N = 16$ kõigis katsetes ja kõigis gruppides.

Saba termilise tundlikkuse katse (*tail flick*)

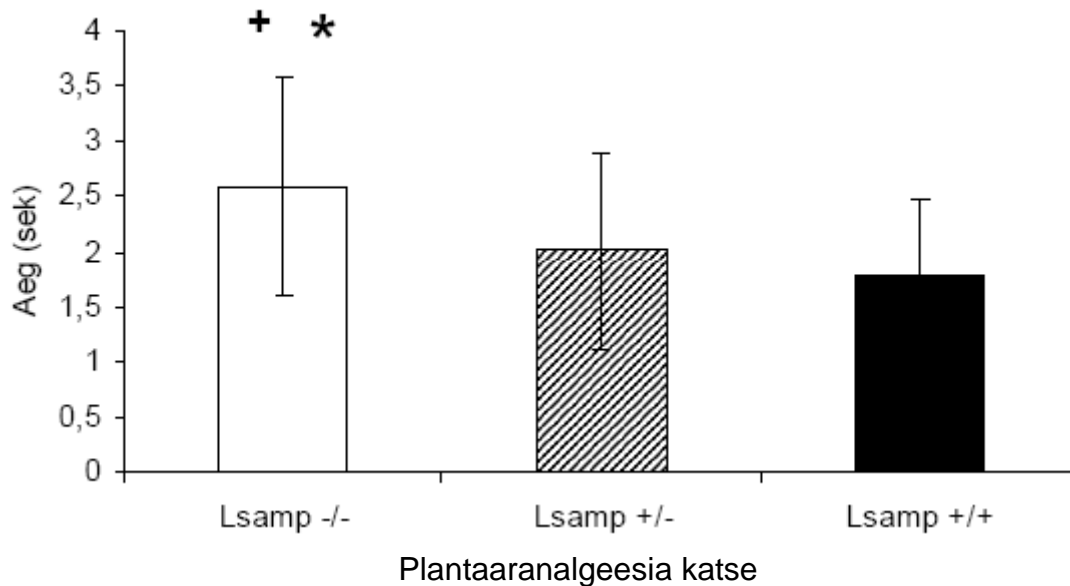
Ka saba termilise tundlikkuse katses ei ilmnenud *Lsamp* geeni puudulikkusega homosügootsete (-/-), heterosügootsete (+/-) ja nende metsiktüüpi (+/+) pesakonnakaaslaste vahel statistiliselt olulist erinevust: $F(2, 45)=1,4499$, $p=0,24533$ (vt Joonis 1). Koekahjustusi loomade sabal ei täheldatud. $N = 16$ kõigis katsetes ja kõigis gruppides.



Joonis 1. Valutundlikkuse katsed *Lsamp* geeni puudulikkusega homosügootsete (-/-) ja heterosügootsete (+/-) hiirte ning nende metsiktüüpi (+/+) pesakonnakaaslastega. ANOVA; $F(2, 45)=1,4499$, $p=0,24533$. $N = 16$ kõigis katsetes ja kõigis gruppides.

Plantaaranalgeesia (*plantar analgesia*)

Lsamp puudulikkusega homosügootsete hiirte reaktsiooniaeg oli pikem ($F(2,111)=8,56$; $p<0,0003$) võrrelduna *Lsamp* heterosügootsete ja metsiktüüpi pesakonnakaaslastega (vt Joonis 2) (Sagalajev, 2011).



Joonis 2. Plantaar-analgeesia katsed *Lsamp* geeni puudulikkusega homosügootsete (-/-) ja heterosügootsete (+/-) hiirtega ning nende metsiktüüpi (+/+) pesakonnakaaslastega, kus + tähendab statistiliselt olulist erinevust heterosügootsete (+/-) katseloomadega ja * tähendab statistiliselt olulist erinevust kontrollgrupiga (+/+). ANOVA; $F(2,111)=8,56$; $p<0,0003$. N = 16 kõigis katsetes ja kõigis gruppides.

Arutelu ja järeldused

Käesolev töö iseloomustab limbilise süsteemiga seotud membraanvalku (LAMP) kodeeriva *Lsamp* geeni mõju isaste hiirte valutundlikkusele. Varasemad tööd on näidanud, et kuigi *Lsamp* geeni puudulikkusega loomad sarnanevad motoorse ja sensoorse arengu poolest väga metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, esineb neil siiski arvestatavaid kõrvalekaldeid sotsiaalses ja ärevuskäitumises. Selleks, et uurida, kas *Lsamp* geeni puudulikkusega (homosügootsed ja heterosügootsed) hiired erinevad valutundlikkuse poolest oma metsiktüüpi pesakonnakaaslastest viidi läbi katsed kolme enim kasutatava valutundlikkuse (kuuma plaadi, külma plaadi ja termilise tundlikkuse hindamise) meetodil. Neljandana kirjeldati Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis plantaaranalgeesia Hargreaves'i meetodil saadud tulemusi. Katseloomadena kasutati Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis loodud *Lsamp* geeni puudulikkusega hiireliini.

Vastupidiselt uurimushüpoteesile, mille kohaselt *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte valutundlikkus on eeldatavasti kõrgem võrrelduna nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, statistiliselt olulist seost kolmes esimeses (kuuma plaadi, külma plaadi ja saba termilise tundlikkuse hindamise) katses ei täheldatud. Neljandana kirjeldatud plantaaranalgeesia katses küll ilmnes statistiliselt oluline seos, kuid üllatuslikult leiti, et *Lsamp* puudulikkusega hiirte reaktsiooniaeg valustiimulile oli hoopis pikem võrrelduna *Lsamp* heterosügootsete ja metsiktüüpi pesakonnakaaslastega. Miks esinesid statistiliselt olulised erinevused gruppide vahel ainult neljandas ja mitte kolmes esimeses katses? Teades vaatlusaluse hiireliini omapära, mille kohaselt *Lsamp* puudulikkusega hiired on uudses keskkonnas vähem ärevad kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased, võib eeldada vähenenud ärevust ka katsesituatsioonis. See omakorda on oluline, sest loomade katsesituatsiooni asetamine tekitab stressi ja ärevust, mis aktiveerib autonoomse närvisüsteemi sümpaatilise osa, millel on näidatud valu pärssivat mõju (Maier, Sherman, Lewis, Terman, & Liebeskind, 1983). Loomade eelnev katsesituatsiooni asetamine ja eksperimentaatori puudutustega harjutamine vähendavad katseloomade stressi ja ärevust reaalses katsesituatsioonis. Seevastu ainult neljandas katses lubati hiirtel eelnevalt mitmel päeval katsepuuriga tutvuda. Niisiis on võimalik, et *Lsamp* puudulikkusega hiired olid katse läbiviimisega kaasneva ärevuse ja stressi suhtes vähem vastuvõtlikud. Sellest tulenevalt oli nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastel esimeses kolmes katses eelis autonoomse närvisüsteemi sümpaatilise osa aktiveeritusest

tingitud analgeesia näol. Teiste sõnadega, kolmes esimeses katses võisid *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte metsiktüüpi pesakonnakaaslased olla ärevamad, mis võis pärssida nende valutundlikkust. Kuna *Lsamp* geeni puudulikkusega hiired olid vähem ärevad, siis avaldas ärevus eeldatavasti väiksemat mõju ka loomade valutundlikkusele. Seda käsitlust toetab kaudsetl ka Tartu Ülikooli füsioloogia laboratooriumis tehtud uurimus, mille kohaselt *Lsamp* geeni puudulikkusega hiired on vähem tundlikud eraldatusest tingitud stressi suhtes kui metsiktüüpi pesakonnakaaslased, eriti arvestades asjaolu, et LAMP valk mängib olulist rolli uue ja potentsiaalselt ähvardava keskkonna või stiimuliga kohanemisel (Innos et al, 2012).

Saadud tulemusi võib küll mitmeti tõlgendada, kuid käesoleva töö hüpoteesi need ei toeta, vaid peegeldavad vastupidist tendentsi. Vastust, miks *Lsamp* geeni puudulikkusega hiired sabast tõstes sagedamini piiksuvad tulemused ei anna. Küll aga lubavad teha järelduse, et see ei tulene *Lsamp* geeni puudulikkusega isaste hiirte kõrgemast valutundlikkusest. Teiseks järelduseks on, et *Lsamp* geeni puudulikkusega isastel hiirtel on madalam valutundlikkus vähendatud stressi tingimustes.

Käesoleva töö miinusena saab välja tuua asjaolu, et kahe meetodi puhul (kuum plaat ja külm plaat) mõõdeti latentse manuaalselt stopperiga ja ühe eksperimentaatori poolt. Meetodi valiidsust aidanuks tõsta teise vaatleja kaasamine või katsete filmimine. Ilmselt parim lahendus oleks olnud katsete filmimine, sest salvestuste hilisem vaatamine võimaldab määrata kindlaks käitumise toimumise täpse kestvuse ja isegi aastaid hiljem katsega seotud üksikasju täpsustada. Järgnevates töödes oleks huvitav uurida kuivõrd tähenduslik on loomade katsesituatsiooni ja eksperimentaatori puudutustega harjutamine *Lsamp* puudulikkusega hiirtel, võrrelduna nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, valutundlikkuse katsetes. Valutundlikkuse molekulaarsete põhjuste väljaselgitamiseks peaks tulevastes katsetes kasutama farmakoloogilist sekkumist, manustades valutundlikkust suurendavaid või vähendavaid farmakone.

Kuna antud töö on osa suuremast projektist, mille kaugem eesmärk on uute psühhiaatriliste ravimite väljatöötamine, võib aidata saadud teadmine, mille kohaselt on vähendatud stressi tingimustes *Lsamp* puudulikkusega hiirte valutundlikkus madalam võrrelduna *Lsamp* metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, vältida ravimite ootamatuid kõrvaltoimeid. Käesoleva töö valguses võib öelda, et valutundlikkus on aspekt, millega tuleb kindlasti arvestada tulevaste tööde planeerimisel ja tõlgendamisel.

Tänuavaldused

Täna seminaritöö juhendajat Jürgen Innot võimaluse eest osaleda Tartu Ülikooli füsioloogia instituudi töös ja võimaluse eest see seminaritööna realiseerida. Täna asjatundliku ja motiveeriva juhendamise eest. Täna Mari-Anne Philipsit ja Boriss Sagalajevit jagatud materjalide ning Mari-Liis Mägi vormistamisalaste nõuannete eest.

Kirjanduse loetelu

- Behan, A.T., Byrne, C., Dunn, M. J., Cagney, G., & Cotter, D. R. (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Molecular Psychiatry*, *14*(6), 601–13.
- Chen, J., Lui, W., Vos, M., Clark, G., Takahashi, M., Schoumans, J., ... Sugimura, J. (2003). The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Cell*, *4*(5), 405-13.
- Franklin, J. C., Hessel, E. T., & Prinstein, M. J. (2011). Clarifying the role of pain tolerance in suicidal capability. *Psychiatry Research*, *189*(3), 362-7.
- Gil, O. D., Zhang, L., Chen, S., Ren, Y. Q., Pimenta, A., Zanazzi, G., ... Salzer, J. L. (2002). Complementary expression and heterophilic interactions between IgLON family members neurotrimin and LAMP, *Journal of Neurobiolog*, *51*(3), 190– 204.
- Groves, P. M., & Thompson, R. F. (1970). Habituation: a dual process theory. *Psychological Review*, *77*(5), 419–450.
- Innos, J., Philips, M. A., Leidmaa, E., Heinla, I., Raud, S., Reemann, P., ... Vasar, E. (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in Lsamp-deficient mice. *Behavioral Brain Research*, *217*(1), 21–31.
- Innos, J., Philips, M.A., Raud, S., Lilleväli, K., Kõks, S., & Vasar, E. (2012). Deletion of the Lsamp gene lowers sensitivity to stressful environmental manipulations in mice. *Behavioural Brain Research*, *228*(1), 74– 81.
- Innos, J., Leidmaa, E., Philips, M.A., Sütt, S., Althoa, A., Harro, J., ... Vasar, E. (2013). Lsamp(-/-) mice display lower sensitivity to amphetamine and have elevated 5-HT turnover. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *430*(1), 413 - 418.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, *32*(1), 77– 88.
- Koido, K., Traks, T., Balõtshev, R., Eller, T., Must, A., Koks, S., ... Vasar, E. (2012). Associations between LSAMP gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. *Translational Psychiatry*, *2*(152), 1 – 5.
- Kresse, S. H., Ohnstad, H. O., Paulsen, E. B., Bjerkehagen, B., Shuzai, K., Serra, M., ... Meza-Zepeda, L. A. (2009). LSAMP, a novel candidate tumor suppressor gene in

- human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 48(8), 679–93.
- Lai, Y. Y., & Chan, S. H. H. (1982). Shortened pain response time following repeated algesiometric test in rats. *Physiological Behavior*, 28(6), 1111–1113.
- Maier, S. F., Sherman, J. E., Lewis, J. W., Terman, G. W., & Liebeskind, J. C. (1983). The opioid/nonopioid nature of stress-induced analgesia and learned helplessness. *Journal of Experimental Psychology Animal Behavior Processes*, 9(1), 80-90.
- Mann, J. J., Waternaux, C., Haas, G. L., & Malone, K. M. (1999). Toward a clinical model of suicidal behavior in psychiatric patients. *American Journal of Psychiatry*, 156(2), 181-189.
- Must, A., Tasa, G., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E., & Väli, M. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *BMC Medical Genetics*, 9, 34.
- Ness, J., T., Jones, L., S., Gebhart, F., G. (1987). Contribution of the site of heating to variability in the latency of the rat tail flick reflex. *Brain Research*, 426(1), 169-172.
- Ntougkos, E., Rush, R., Scott, D., Frankenberg, T., Gabra, H., Smyth, J. F., & Sellar, G. C. (2005). IgLON family in epithelial ovarian cancer: expression profiles and clinicopathologic correlates. *Clinical Cancer Research*, 11(16), 5764-68.
- Pasic, I., Shlien, A., Durbin, A. D., Stavropoulos, D. J., Baskin, B., Ray, P. N., ... Malkin, D. (2010). Recurrent focal copy-number changes and loss of heterozygosity implicate two noncoding RNAs and one tumor suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma. *Cancer Research*, 70(1), 160–71.
- Philips, M. A., Luuk, H., Heinla, I., Plaas, M., Kõks, S., & Vasar, E. (2007). LSAMP valku ekspresseerivad neuronid hiire kesknärvisüsteemis ei paikne üksnes limbilises süsteemis, vaid ka sensoorsetes süsteemides. *Eesti Arst*, 9, 700-701.
- Reinoso, B. S., Pimenta, A.F., & Levitt, P. (1996). Expression of the mRNAs encoding the limbic system-associated membrane protein (LAMP): I. Adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 375(2), 274–88.
- Pimenta, A. F., Zhukareva, V., Barbe, M. F., Reinoso, B.S., Grimley, C., Henzel, ... I., Levitt, P. (1995). The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axonal targeting. *Neuron*, 15(2), 287-297.

- Pimenta, A. F., Fischer, I., & Levitt, P. (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). *Gene*, 170(2), 189–95.
- Sagalajev, B. (2011). Limbilise süsteemi assotsiatiivse membraanivalgu (LAMP) ja volframiini valgu geenmutatsioonidega hiireliinide basaalse valutundlikkuse iseloomustus plantaar-analgeesia ja kuumplaadi katsetes ning morfiini analgeetilise toime uurimine neis hiirtes. [Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna proviisoriõppe uurimustöö]. Tartu Ülikool.
- Yen, C. C., Chen, T. H., Chen, T. H., Chen, W. Y., Chen, P. C., Chiou, H. J., ... Fletcher, J. A. (2009). Identification of chromosomal aberrations associated with disease progression and a novel 3q13.31 deletion involving LSAMP gene in osteosarcoma. *International Journal of Oncology*, 35(4), 775–88.
- Zacco, A., Cooper, V., Chantler, P. D., Fisher-Hyland, S., Horton, H. L., & Levitt, P. (1990). Isolation, biochemical characterization and ultrastructural analysis of the limbic system associated membrane protein (LAMP), a protein expressed by neurons comprising functional neural circuits. *Journal of Neuroscience*, 10(1), 73–90.

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

Olen nõus oma töö avaldamisega Tartu Ülikooli digitaalarhiivis DSpace.

Richard Naar