

**CCK<sub>2</sub> retseptori geneetiline väljalülitamine ei mõjuta hiirte  
õppimisvõimet Morrise vesipuuris ja passiivse vältimise katses**

Jürgen Innos  
Magistritöö biomeditsiinis

Juhendajad: professor Eero Vasar  
vanemteadur Sulev Kõks

Tartu 2006

## Sisukord

Sissejuhatus.....	3
Kirjanduse ülevaade.....	5
CCK ja mälu .....	5
CCK ja valu.....	6
Töö eesmärgid.....	8
Meetodid .....	9
Katseloomad .....	9
Farmakoloogilised ained ja nende manustamine .....	9
Passiivne vältimine .....	9
Morrise vesipuur .....	10
Statistiline analüüs .....	12
Tulemused.....	13
Passiivne vältimine .....	13
Morrise vesipuur .....	16
Arutelu .....	18
Järeldused.....	22
Töös kasutatud lühendid .....	23
Töös kasutatud viidete nimekiri.....	24
Lühikokkuvõte .....	30
Abstract.....	31

## Sissejuhatus

Koletsüstokiniin (CCK) on üks levinumaid neuropeptiide närvisüsteemis. CCK avastati esmalt seedetraktis (Ivy ja Oldberg, 1928); algul nimetasid autorid seda „sekretiiniks“, kuid kui leidsid, et see aine põhjustab sapipõie kontraktsioone, otsustasid nimetada selle „koletsüstokiniiniks“ („see, mis stimuleerib või liigutab sapipõit“). Hiljem leidsid Harper ja Raper (1943), et CCK (teadmata, et tegemist on CCK-ga, nimetasid Harper ja Raper seda „uut“ ainet „pankreoosümiiniks“) stimuleerib pankrease ensüümide vabanemist. Esimesena kirjeldasid CCK struktuuri Mutt ja Jorpes (1968). CCK „taasavastati“ 1970-tel aastatel närvisüsteemis – roti osad ajupiirkonnad sisaldasid gastriini-sarnast immunoreaktiivsust; hiljem selgus, et tegu ei olnud mitte gastriiniga, vaid selle struktuuraalse ja funktsionaalse lähisugulase CCK-ga (Vanderhaeghen jt, 1975; Dockray ja Taylor, 1976). CCK on struktuurilt lineaarne ning tema bioloogiliselt aktiivsed vormid sünteesitakse pre-prohormoonist (pre-pro-CCK), mille proteolüütilise töötlemise järel vabanevad eri pikkusega peptiidid, millel on samasugune karboksüül-terminus. CCK pikkuseks võib olla 4–58 aminohapet, kuid lisaks peptiidahela pikkusele varieerub ka see, kas C-terminuse poolt lugedes seitsmes aminohape (türosiin) on sulfateeritud või mitte. Kesknärvisüsteemis on levinuimaks vormiks sulfateeritud oktapeptiid (CCK-8s). Kõige rohkem leidub CCK-d ajukoores, hipokampuses ja amügdalas (Dockray, 1976).

CCK avaldab mõju kahte tüüpi retseptorite – CCK1 ja CCK2 – kaudu. Mõlemal on seitse transmembraanset domääni ning mõlemad kuuluvad G-valk-seoseliste retseptorite perekonda. CCK1 retseptorid paiknevad peamiselt seedetraktis ja teistes perifeersetes organites, CCK2 retseptorid aga kesknärvisüsteemis (Moran jt, 1986; Noble ja Roques, 1999). CCK1 retseptor omab suurt afiinsust CCK-8s suhtes; teiste vormide ja gastriini suhtes on ta afiinsus väike. CCK2 retseptor on universaalsem, vahendades paljude erinevate CCK vormide mõju (ning näiteks ka gastriini toimet maos).

Loomudelite põhjal saadud tulemusi tõlgendades ja kliinilisse praktikasse üle kandes tuleb arvestada, et CCK1 ja CCK2 paiknemises ning hulgas esineb liikidevahelisi erinevusi. Näiteks inimeste ja primaatide ajus on CCK1 retseptoreid palju rohkem ja laialdasemalt kui närilistel.

CCK toimib neurotransmitterina ning avaldab moduleerivat mõju mitmetele klassikalistele neurotransmitteritele, nagu näiteks dopamiin, serotoniin, noradrenaliin, gamma-aminovõihape (GABA), glutamaat ja opioidid (Crawley ja Corwin, 1994; Daugé ja Roques, 1995). Näiteks kutsub CCK2 retseptori geneetiline väljalülitamine esile märkimisväärse opioidi (Pommier jt, 2002; Rünkorg jt, 2003), dopamiinergilise (Kõks jt, 2001; Daugé jt, 2001) ning tõenäoliselt ka GABAergilise süsteemi (Raud jt, 2003, 2005) aktiveerumise. CCK rohkuse tõttu kesknärvisüsteemis ei ole üllatav, et käitumuslike aspektide spekter, mida ta mõjutab, on väga lai. CCK reguleerib väga mitmeid füsioloogilisi funktsioone – ärevust, toitumist, valutundlikkust, mälu, õppimist, motivatsioone ja reaktsiooni stressile (Singh jt, 1991; Costall jt 1991; Harro ja Orelund, 1993; Crawley ja Corwin, 1994; Shlik jt, 1997).

Nagata jt (1996) poolt loodud hiired, kelle organismis CCK2 retseptor puudub, pakuvad head võimalust nende retseptorite ja CCK rolli lähemalt uurida. CCK2 retseptori puudulikkusega hiired elavad sama kaua kui nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslased ning ei erine viimastest ei kaalu ega ka välimuse poolest, samas on leitud mitmeid olulisi muutusi nende valutundlikkuses (Veraksitš jt, 2003; Kurrikoff jt, 2004) ning õppimisvõimes (Sebret jt, 1999; Daugé jt 2001). Käesolev töö keskendubki just CCK seostele valutundlikkuse ja õppimisega, nende funktsioonide omavahelistele seostele ning CCK süsteemi seostele opioidi süsteemiga, kasutades nende küsimuste uurimiseks CCK2 retseptori puudulikkusega isaseid hiiri, klassikalisi õppimisteste ning farmakoloogilist sekkumist.

## Kirjanduse ülevaade

### *CCK ja mälu*

Üha enam tõendeid viitab sellele, et CCK mängib mäluprotsessides olulist rolli. Mälufunktsioonidega seotud ajuosades (hipokampus, amügdala ja ajukoor) leidub rohkesti CCK-d, võib isegi öelda, et ajuosad, kus CCK tase on kõrgeim, on kõik seotud mälufunktsioonidega. Harro ja Oreland (1993) on viidanud võimalusele, et CCK1 ja CCK2 retseptorid mängivad õppimises ja mäluprotsessides vastupidist rolli – CCK1 retseptori kaudu toimiv signaal parandab mälu, CCK2 kaudu toimiv signaal pärsib mälujälje kinnistumist. Ka Lemaire jt (1992) on näidanud, et CCK1 retseptorite stimulatsioon parandab mälu, CCK2 retseptorite stimulatsioon aga halvendab mälu. Katsed CCK2 retseptori agonistidega on andnud siiski vastukäivaid tulemusi – mõned grupid on näidanud, et selektiivsed CCK2 retseptori agonistid (CCK-4 ja BC 264) halvendavad mälu (Katsuura ja Itoh, 1986; Daugé jt, 1992; Lemaire jt 1992; Derrien jt 1994), ühes katses need peptiidid aga hoopis parandasid mälu (Gerhardt jt, 1994). Daugé ja Roques (1995) demonstreerisid, et BC 264 suurendab ahvidel tähelepanu võimet ning rottide puhul torkab selle aine mõjul silma käitumuslik erutusseisund. Seega on üheks võimalikuks seletuseks, et CCK2 retseptorite stimulatsioon mõjub erutust tekitavalt ja tähelepanu aktiveerivalt ning see omakorda võib olenevalt õppimiskatse iseloomust tulemusi kas parandada või halvendada.

Katsetes inimestega on leitud, et CCK retseptorite mitteselektiivse agonisti tseruliini manustamine parandab tervete katseisikute selektiivset tähelepanu (Schreiber jt, 1995) ning parandab noorte, kuid mitte vanemate tervete katseisikute kognitiivse info töötlemise võimet (Dodt jt, 1996). Shlik jt (1998) leidsid, et selektiivse CCK2 retseptori agonisti CCK-4 manustamine halvendab kognitiivsetes testides äratundmist ja meenutamist, seega võib CCK-4 avaldada negatiivset mõju mälu konsolideerimisele ja hilisemale andmete mälust kättesaamisele.

CCK-8s ja CCK-4 manustamine hõlbustas augulaua (*hole board*) testis habitueerumist (Fink jt, 1998). CCK-8 manustamine amügdala vasakusse, aga mitte paremasse poolde, parandab rottidel õppimist ja mälu aktiivse vältimise katses

(Belcheva jt, 1994). CCK2 retseptorite selektiivse agonisti BC 264 süstimine kõhuõõnde parandas rottide mälu äratundmiskatses (Y-puuris), kusjuures see efekt tulenes hipokampuse CCK2 retseptorite stimulatsioonist, samuti ilmnes, et CCK2 retseptori puudulikkusega hiired uurisid Y-puuri uut õlga vähem kordi kui nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslased, mis viitab nende mälu ja/või tähelepanu halvenemisele (Sebret jt, 1999). Teine mehhanism, kuidas BC 264 tähelepanu ja/või mälu võib mõjutada, võib toimuda *nucleus accumbens*'i dopaminergiliste neuronite stimulatsiooni kaudu, sest BC 264 suurendab *nucleus accumbens*'i eesmisel osal ekstratsellulaarse dopamiini ja selle metaboliitide hulka (Ladurelle jt, 1997). Teiste CCK agonistide, nagu näiteks BC 197 ja CCK-4 mõju CCK retseptoritele on ebaspetsiifilisem ning nad tekitavad ärevust; seega võib katseloomade tulemuste halvenemine mälu testides pärast nende farmakonide manustamist tuleneda nende kõrgeenenud ärevusest, mitte aga tõeliste mälu protsesside halvenemisest (Daugé ja Léna, 1998).

Matsushita jt (2003) näitasid, et rotid, kellel puuduvad CCK1 retseptorid, õpivad nii Morrise vesipuuris kui ka passiivse vältimise katses normaalsetest loomadest kehvemini. Rex ja Fink (2004) leidsid, et CCK2 retseptorite agonisti Boc-CCK-4 manustamine parandab Morrise vesipuuri katses dopaminergilise süsteemi talitluse häirega hiirte õppimisvõimet.

### *CCK ja valu*

On leitud, et CCK manustamine vähendab opioidide valuvastast toimet (Faris, 1985; Itoh jt, 1985) ning et seejuures mängib põhirolli läbi CCK2 retseptorite vahendatav signaal (Noble ja Roques, 1999). Nii ajus kui seljaajus leidub valutundlikkust reguleerivates piirkondades nii CCK kui ka opioidide (enkefaliin,  $\beta$ -endorfiin, dünorfiin) retseptoreid (Baber jt, 1989). CCK manustamine vähendab morfiini poolt esile kutsutud analgeetilist mõju närilistel, CCK2 retseptori antagonistid suurendavad seda (Faris jt, 1983; Lavigne jt, 1992; Noble jt, 1995). CCK2 retseptori nukleotiidsel *antisense*-järjestusel manustamine suurendab morfiini valuvastast efekti (Vanderah jt, 1994) ning seljaajus esmasaferentsete närvirakkude lõpmetel paiknevad CCK ja opioidi retseptorid avaldavad neuronaaalsele talitlusele vastupidist toimet (Ghilardi jt, 1992; Stanfa jt, 1994). Seega võib järeldada, et CCK

avaldab läbi CCK2 retseptori anti-opioidset toimet. Et kesknärvisüsteemis on valdavaks CCK retseptorite teine alatüüp, siis sageli kõneldakse CCK- ja opioidisüsteemist kui antagonistlikest süsteemidest (Wiesenfeld-Hallin jt, 1999).

Katsetes CCK2 retseptori puudulikkusega hiirtega on leitud, et nende organismis on opioidisüsteem aktiveerunud (Pommier jt, 2002; Kurrikoff jt, 2004). Plantaaranalgeesia katses ilmneb nendel hiirtel kõrgem valutundlikkuse lävi (Veraksitš jt, 2003) ning von Frey testis ka alanenud mehaaniline tundlikkus (Kurrikoff jt, 2004).

## Töö eesmärgid

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli uurida CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte abil CCK-süsteemi võimalikku seotust õppimisvõime ja mälega klassikalistes õppimistestides (passiivne vältimine ja Morrise vesipuur). Meid huvitasid järgmised põhiküsimused:

- 1) Kas CCK2 retseptori väljalülitamine mõjutab hiirte õppimisvõimet ja/või mälu?
- 2) Kui CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte ja nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslaste õppimisvõimes ja/või mälus esineb erinevusi, siis milliste mehhanismidega seda põhjendada?
- 3) Kuidas mõjutab opioidi retseptorite antagonist naloksoon CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte ja nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslaste õppimistulemusi passiivse vältimise testis, mis tugineb valutundlikkusele?



## Meetodid

### *Katseloomad*

Katsetes kasutati Nagata jt (1996) poolt loodud, 129sv/C57BL6 taustast aretatud geneetiliselt muudetud hiiri, kelle CCK2 retseptor oli 2. eksoni osalise ning 3., 4. ja 5. eksoni täieliku asendamise teel välja lülitatud. Et vähendada 129sv mõju, ristati neid kuue põlvkonna vältel tagasi C57BL6 tausta. Katsetes kasutatud loomade genotüüpide analüüs viidi läbi Tartu Ülikooli Füsioloogia Instituudis polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodil (Kõks jt, 2001). Hiiri hoiti loomaruumis 9-11 kaupa pleksiklaasist kastides temperatuuril  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 tundi pime / 12 tundi valge tsükli juures (tuled süttisid hommikul kl 07:00), allapanuks kasutati saepuru. Vesi ja kuivtoidugraanulid olid hiirtele pidevalt vabalt kättesaadavad. Katsetes kasutati täiskasvanud isaseid homosügootseid hiiri ja nende metsikut tüüpi pesakonnakaaslast. Passiivse vältimise katses osalenud loomade vanus oli katse algul 3-5 kuud ning Morrise vesipuuri katses 6-7 kuud (kõik loomad osalesid ainult ühes katses). Kõik katsed viidi läbi vahemikus kl 12:00 kuni 19:00. Loomkatse protseduurid olid heaks kiidetud Tartu Ülikooli loomakaitse komitee poolt, vastavalt EÜ direktiivile 86/609/EMÜ 24. novembrist 1986.

### *Farmakoloogilised ained ja nende manustamine*

Opioidi retseptorite antagonisti naloksooni (*Sigma*) kasutati doosides 0,1 mg/kg, 1 mg/kg ja 10 mg/kg. Naloksoon lahustati füsioloogilises lahuses ning süstiti 15 minutit enne eksperimendi algust kõhuõõnde. Süstijärgseks 15 minutiks asetati loom kodupuuri, et vältida eraldatusest tingitud stressi.

### *Passiivne vältimine*

Passiivse vältimise katses kasutati klassikalist tingimisseadet (TSE, Technical & Scientific Equipment GMBH, Saksamaa), mis koosnes kahest kambri mõõtmetega

L=11 cm, P=14 cm, K=16 cm, mille põrandad moodustusid 3 mm jämedustest traatvarbadest (kahe varva vahe laius 6 mm). Kambrid olid üksteisest eraldatud vaheseinaga, millesse oli lõigatud allalastava klapiga suletav kaarjas uks (L=4 cm, K=4 cm). Vasakpoolse kambri seinad olid kaetud paksu musta paberiga ning kamber oli katse ajal pealt kaetud („pime“ kamber); parempoolse kambri seinad olid läbipaistvast pleksiklaasist ja katse ajal oli kamber pealt avatud („valge“ kamber). Esimesel päeval asetati hiir valgesse kambrisse, näoga tagumise parempoolse nurga poole. Kui hiir oli kõigi nelja käpaga pimedasse kambrisse sisenenud, fikseeriti sisenemise latents ning suleti kambritevaheline uks. 10 s pärast anti hiirele pimedas kambris traatvarbade kaudu 2 s vältav mittepulsseeriv elektrilöök, mille tugevus oli sõltuvalt katsest ja/või katsegrupist 0,2 kuni 0,7 mA. 15 s pärast elektrilööki võeti hiir pimedast kambrist välja ja asetati tagasi kodupuuri. Iga hiire testimise järel puhastati katseseadet 10% piirituselahusega immutatud pabersalvrätikuga. Kui hiir ei sisenenud pimedasse kambrisse 120 s jooksul, eemaldati ta eksperimendist. Teisel ja üheksandal päeval asetati hiir uuesti samal viisil valgesse kambrisse ning mõõdeti pimedasse kambrisse sisenemise latents. Kui hiir ei sisenenud pimedasse poolde 300 s jooksul, märgiti ta sisenemislantentsiks 300 s.

### *Morrise vesipuur*

*Katseseade.* Katseseade (TSE, Technical & Scientific Equipment GMBH, Saksamaa) koosnes basseinist, platvormist, videokaamerast ning arvutist. Basseini läbimõõduga 150 cm lasti 22-24°C vesi, mis muudeti mittetoksilise peeneteralise valge pahtliga läbipaistmatuks. Basseini ühe imaginaarse veerandi keskele, basseini seinast 20 cm kaugusele asetati 16 cm läbimõõduga ümmargune valge platvorm, mis jäi 1 cm sügavusele vee alla. Basseini kohale riputati arvutiga ühendatud videokaamera. Tarkvaraprogramm salvestas hiirte ujumistrajektoori. Katseruumi valgustasid basseini külgedele sümmeetriliselt paigutatud neli 25 W pirniga lampi, mis täitsid ruumi hämara valgusega (ca 40 luksit). Visuaalse orientiiri rolli täitsid seintel ripuvad eredavärvilised plakatid ja kujundid.

*1.-5. päev – ruumilise mälu treening.* Algne treeningperiood koosnes 20 katsest (5 päeva x 4 katset), mille vältel veealune platvorm paiknes esimese imaginaarse veerandi keskel (kellaosuti asend 07:30). Iga loom lasti iga päev ujuma

juhuslikus varieeruvast järjekorras neljast erinevast kohast (kellaosuti asendid 12:00, 03:00, 06:00 ja 09:00). Hiir asetati õrnalt vette, näoga basseini seina suunas. Iga katse puhul fikseeriti platvormi leidmise aeg. Platvormi leidmiseks loeti see, kui hiir ronis kõigi nelja käpaga platvormile ning jäi sellele vähemalt viieks sekundiks. Kui hiir 60 s jooksul platvormi ei leidnud, suunati ta platvormile ja lasti seal viibida 15 s (sama kaua lasti hiirel platvormil viibida ka selle leidmise järel). Hiirte veest väljavõtmiseks ja kodupuuri transportimiseks ning samuti platvormile suunamiseks (juhuks kui loom 60 s jooksul platvormi ei leidnud) kasutati metallist sõela, mida kõik hiired õppisid juba paari katse järel seostama „pääsemisega“, ujudes selle suunas ning üritades sellele ronida, kui see nende lähedusse asetati. Ühtlasi võimaldas sõel kontrollida, et katsesse ei satuks tähelepanu- ja või nägemishäiretega hiiri. Pärast katset viidi loom tagasi oma kodupuuri, mille ühe nurga kohal rippus infrapunalampe, mille soojuskiirgus kiirendas loomade karvkatte kuivamist. Lisaks mõõdeti hiirte ujumiskiirust ning stereotüüpsele käitumisele viitavat tiirutamist basseini seinte läheduses („tigmotaksis“ – basseini äärtes ehk välimises, basseini pindalast 30,6% moodustavas ringis veedetud aeg). Katsete vahele jäi umbes 1 h, seega jõudis loom enne uut ujumist täielikult kuivada ja rahuneda.

*6. päev – lühimälu kontroll.* Lühimälu kontrollkatseks eemaldati treeningperioodi vältel kogu aeg samas kohas paiknenud platvorm, hiir lasti vette platvormi vastaspositsioonist (kellaosuti asend 01:30) ning tal lasti 60 s vabalt ujuda. Õppimisvõime ning ruumilise mälu hindamiseks vaadeldi päevade 1-5 õppimiskõverat ning seda, mitu sekundit ujus hiir lühimälu kontrollkatse ajal veerandis, kus varem oli paiknenud platvorm.

*7.-10. päev. Paus.*

*11. päev – pikaajalise mälu kontroll nr 1.* Sel päeval testiti katseloomade pikaajalist mälu 6 päeva lõikes, kasutades selleks samasugust 60 s katset nagu 6. päeval.

*12.-14. päev – mälujälje värskendamine.* Samasugune treening, nagu päevadel 1-5, platvorm asendis 07:30. Vajalik selleks, et ühtlustada katseloomade baastaset enne ümberõppimise katset.

*15.-17. päev – ümberõppimine.* Ümberõppimise (*reversal training*) katse viidi läbi sarnaselt algsele treeningule (4 katset päevas), kuid platvorm asetati vastandasendisse (kellaosuti asend 01:30).

*18. päev – ümberõppimise kontroll.* 60 s katse ilma platvormita.

19.-24. päev – pikaajalise mälu katse treening. 24 treeningkatset (6 päeva x 4 katset), platvorm samas asendis, kus 15.-17. päeval. Seega õppisid katseloomad asendist 01:30 platvormi leidma 36 korral. Baastaseme määramiseks korraldati 24. päeval pärast 4. treeningkatset 60 s kontrollkatse ilma platvormita.

38. päev – pikaajalise mälu kontroll nr 2. Sel päeval testiti katseloomade pikaajalist mälu 14 päeva lõikes, kasutades selleks samasugust 60 s katset nagu 6. päeval.

### *Statistiline analüüs*

Morrise vesipuuri ja passiivse vältimise katsete tulemuste analüüsimiseks kasutati ühe- ja kahefaktorilist dispersioonanalüüsi (ANOVA) ja Fisheri LSD *post hoc* testi. Andmete töötlemiseks kasutati programmi *Statistica for Windows*.

## Tulemused

### *Passiivne vältimine*

*Tähelepanekud voolutugevuse osas.* Käesoleva katseseeria käigus selgus, et varasemates artiklites „mõõdukaks“ nimetatav elektrilöök 0,6 mA 2 s jooksul on enamikel juhtudel erinevuste leidmiseks liiga tugev ja kaldub andma laeefekti isegi 300 s latentsi piirmäära kasutamise puhul, rääkimata 180 s piirmäärast (suurema testimiskiiruse saavutamiseks kasutatakse enamasti 180 s latentsi piirmäära). Optimaalseks osutus elektrilöök tugevusega 0,4 mA 2 s jooksul. Ka harva kasutatav 0,2 mA 2 s jooksul andis väga informatiivseid tulemusi.

*Katse erineva vooluga I (0,5; 0,6 ja 0,7 mA 2 s jooksul).* Antud voolutugevuste juures (farmakoloogilist sekkumist kasutamata) tekkis elektrilöögi andmisele järgneval päeval pimedasse kambrisse sisenemise latentse mõõtes märgatav laeefekt (ligi pooled hiired ei sisenenud pimedasse kambrisse 300 s jooksul) ning genotüüpide õppimisvõimes erinevusi ei ilmnenud ( $n = 58$ ; 2 (genotüüp) x 3 (elektrilöök) katsegruppi, igas katsegrupis 9-10 looma; andmeid ei ole näidatud).

*Katse erineva vooluga II (0,2; 0,4 ja 0,6 mA 2 s jooksul).* Teises õppimiskatses erinevate voolutugevustega ( $n = 56$ ; 2 (genotüüp) x 3 (elektrilöök) katsegruppi, igas katsegrupis 9-10 looma) mõõdeti loomade pimedasse kambrisse sisenemise latents esimesel, teisel ja üheksandal päeval. Esimese päeva latentsid olid mõlemal genotüübil sarnased. Teisel päeval olid elektrilöövide 0,4 mA ja 0,6 mA puhul genotüüpide pimedasse kambrisse sisenemise latentsid sarnased; elektrilöögi 0,2 mA puhul oli homosügootsete CCK2 retseptori puudulikkusega (–/–) hiirte latents metsikut tüüpi (+/+) hiirte omast mõnevõrra madalam, kuid vahe ei ole statistiliselt oluline ( $p=0,12$ ). Mõõtes samade hiirte pimedasse kambrisse sisenemise latentse uuesti 9. katsepäeval, selgus, et kõige tugevama elektrilöögi (0,6 mA) saanud –/– hiirte pimedasse kambrisse sisenemise latents oli võrreldes teise päeva tasemega tõusnud (+43 s) ning ületas +/+ hiirte keskmist latentsi – mis oli pisut langenud (-17s) – ligikaudu 1,5-kordselt, see vahe ei ole aga statistiliselt oluline ( $p=0,14$ ) (vt Tabel 1). Kahefaktoriline dispersioonanalüüs: LAT1: genotüüp:  $F_{(1,50)} = 2,11$ ;  $p = 0,15$ ; elektrilöök:  $F_{(2,50)} = 0,9$ ;  $p = 0,41$ ; genotüüp x elektrilöök:  $F_{(2,50)} = 0,11$ ;  $p = 0,89$ ;

LAT2-LAT1: genotüüp:  $F_{(1,50)} = 1,67$ ;  $p = 0,2$ ; elektrilöök:  $F_{(2,50)} = 1,98$ ;  $p = 0,15$ ;  
 genotüüp x elektrilöök:  $F_{(2,50)} = 0,57$ ;  $p = 0,57$ . LAT9-LAT1: genotüüp:  $F_{(1,50)} = 0,25$ ;  
 $p = 0,62$ ; elektrilöök:  $F_{(2,50)} = 5,9$ ;  $p = 0,005$ ; genotüüp x elektrilöök:  $F_{(2,50)} = 1,07$ ;  $p = 0,35$ . Tulemused on esitatud Tabelis 1.

Grupp	Loomi (N)	LAT1 (s)	LAT2-LAT1 (s)	LAT9-LAT1 (s)
+/+ 0,2 mA	9	29±11	112±25	50±20
+/+ 0,4 mA	9	19±2	149±41	124±31
+/+ 0,6 mA	9	27±3	129±33	109±36
-/- 0,2 mA	10	34±5	44±25	36±24
-/- 0,4 mA	9	29±5	122±38	113±36
-/- 0,6 mA	10	34±6	126±23	171±30

**Tabel 1. Katse erineva vooluga 0,2; 0,4 ja 0,6 mA 2 s.** LAT1 = pimedasse kambrisse sisenemise latents 1. päeval; LAT2-LAT1 = pimedasse kambrisse sisenemise latents 2. päeval miinus 1. päeva latents; LAT9-LAT1 = pimedasse kambrisse sisenemise latents 9. päeval miinus 1. päeva latents; ± = keskmise standardviga.

*Katse naloksooniga I – elektrilöök 0,2 mA 2 s jooksul.* Esimeses katses naloksooniga kasutati kolme erinevat doosi (0,1 mg/kg, 1 mg/kg ja 10 mg/kg) ja elektrilööki tugevusega 0,2 mA 2 s jooksul. Latentse mõõdeti esimesel, teisel ja üheksandal päeval. Statistiliselt olulisi erinevusi genotüüpide vahel ega doosikõverat ei ilmnenud. Kahefaktoriline dispersioonanalüüs: LAT1: genotüüp:  $F_{(1,77)} = 0,06$ ;  $p = 0,81$ ; naloksoon:  $F_{(3,77)} = 1,25$ ;  $p = 0,3$ ; genotüüp x naloksoon:  $F_{(3,77)} = 0,24$ ;  $p = 0,87$ ; LAT2-LAT1: genotüüp:  $F_{(1,77)} = 0,04$ ;  $p = 0,84$ ; naloksoon:  $F_{(3,77)} = 1,44$ ;  $p = 0,24$ ; genotüüp x naloksoon:  $F_{(3,77)} = 0,09$ ;  $p = 0,96$ . LAT9-LAT1: genotüüp:  $F_{(1,77)} = 0,61$ ;  $p = 0,44$ ; naloksoon:  $F_{(3,77)} = 1,09$ ;  $p = 0,36$ ; genotüüp x naloksoon:  $F_{(3,77)} = 1,81$ ;  $p = 0,15$ . Tulemused on esitatud Tabelis 2.

Grupp	Loomi (N)	LAT1 (s)	LAT2-LAT1 (s)	LAT9-LAT1 (s)
+/+ FÜS	10	22±3	21±12	-3±5
+/+ NAL 0,1	11	27±6	22±13	-9±9
+/+ NAL 1	11	30±9	57±28	6±10
+/+ NAL 10	11	33±7	44±26	35±27
-/- FÜS	9	25±5	20±15	-12±5
-/- NAL 0,1	11	21±3	12±10	14±13
-/- NAL 1	11	33±5	40±27	-5±8
-/- NAL 10	11	30±6	60±25	1±13

**Tabel 2. Katse naloksooniga I – elektrilöök 0,2 mA 2 s jooksul.**

*Katse naloksooniga II – elektrilöök 0,4 mA 2 s jooksul.* Teises katses naloksooniga kasutati kolme erinevat doosi (0,1 mg/kg, 1 mg/kg ja 10 mg/kg) ja elektrilööki tugevusega 0,4 mA 2 s jooksul. Latentse mõõdeti esimesel, teisel ja üheksandal päeval. Ainsaks statistiliselt oluliseks tulemuseks osutus naloksooni efekt 1. päeval ( $p=0,02$ ), kuid käesoleva uurimuse seisukohast on see tulemus irrelevantne (eesmärgiks oli vaadelda naloksooni mõju õppimisele, s.t 2. ja 9. päeva tulemustele, mitte 1. päeva sisenemislattentsile). Samuti ei tohiks see mõjutada teiste tulemuste usaldusväärust, sest 2. ja 9. päeva tulemustest lahutati 1. päeva latents, mitte ei kasutatud 2. ja 9. päeva absoluutväärtust. Kahefaktoriline dispersioonanalüüs: LAT1: genotüüp:  $F_{(1,76)} = 1,65$ ;  $p = 0,2$ ; naloksoon:  $F_{(3,76)} = 3,62$ ;  $p = 0,02$ ; genotüüp x naloksoon:  $F_{(3,76)} = 1,47$ ;  $p = 0,23$ ; LAT2-LAT1: genotüüp:  $F_{(1,76)} = 0,46$ ;  $p = 0,5$ ; naloksoon:  $F_{(3,76)} = 0,11$ ;  $p = 0,95$ ; genotüüp x naloksoon:  $F_{(3,76)} = 1,41$ ;  $p = 0,25$ . LAT9-LAT1: genotüüp:  $F_{(1,76)} = 1,64$ ;  $p = 0,2$ ; naloksoon:  $F_{(3,76)} = 0,92$ ;  $p = 0,44$ ; genotüüp x naloksoon:  $F_{(3,76)} = 0,79$ ;  $p = 0,5$ . Tulemused on esitatud Tabelis 3.

Grupp	Loomi (N)	LAT1 (s)	LAT2-LAT1 (s)	LAT9-LAT1 (s)
+/+ FÜS	11	32±4	117±40	34±11
+/+ NAL 0,1	11	37±7	75±32	45±21
+/+ NAL 1	11	27±5	103±36	105±39
+/+ NAL 10	10	38±5	150±28	52±30
-/- FÜS	10	20±4	84±29	30±13
-/- NAL 0,1	11	26±4	134±37	29±22
-/- NAL 1	10	26±4	86±29	35±20
-/- NAL 10	10	45±7	77±33	50±37

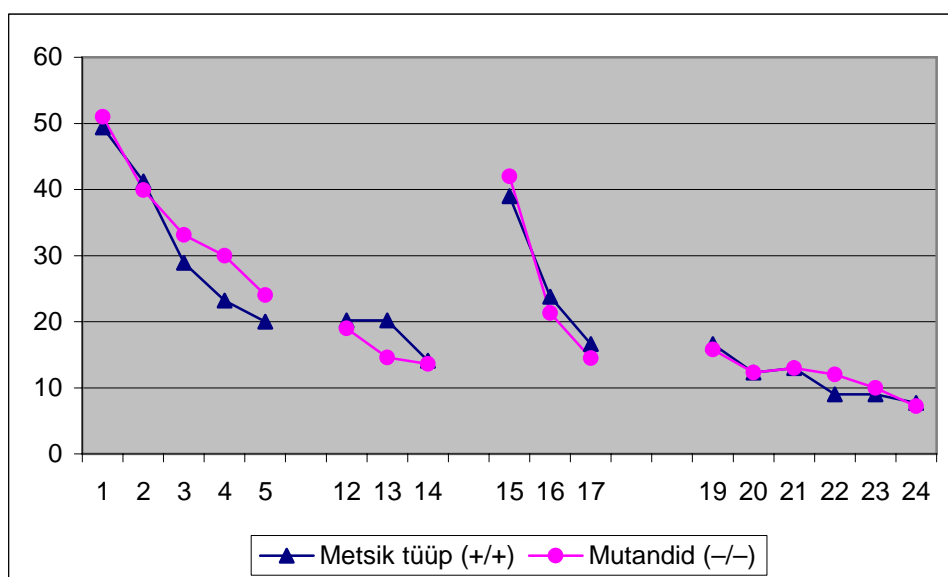
**Tabel 3. Katse naloksooniga I – elektrilöök 0,4 mA 2 s jooksul.**

## Morrise vesipuur

Morrise vesipuuri katses osales 24 metsikut tüüpi (+/+) ja 29 homosügootset CCK2 retseptori puudulikkusega (-/-) hiirt.

*Tigmotaksis ja ujumiskiirus.* Ujumiskiiruses genotüüpide vahel kogu katse vältel statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenud (+/+ kõigi päevade keskmine 18,2 cm/s; -/- kõigi päevade keskmine 18,0 cm/s). Tigmotaksist esines üksikutel loomadel mõlemast genotüübist vaid esimestel päevadel, hiljem taolist stereotüüpset käitumist enam praktiliselt ei ilmnenud (andmeid ei ole näidatud).

*Õppimiskõverad.* Mõlema genotüübi õppimiskõverad (vt Joonis 1) olid väga sarnased nii algsel treeningperioodil (1.-5. päev), mälujälje värskendamise päevadel (12.-14.), ümberõppimise perioodil (15.-17. päev) kui ka pikaajalise mälu treeningperioodil (19.-24. päev). Statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenud (vt Tabel 4, gruppidevaheline erinevus kõigil päevadel  $p > 0,3$ ).



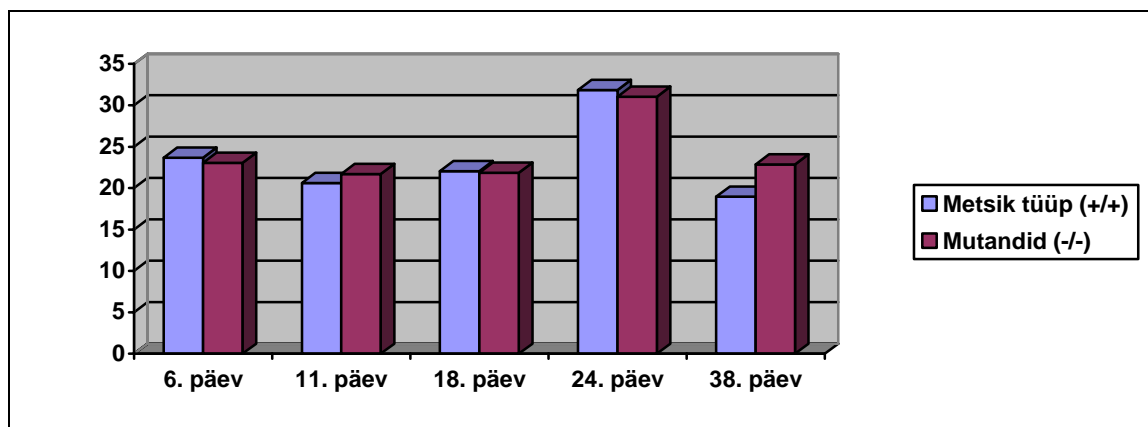
**Joonis 1. Morrise vesipuuri katse õppimiskõverad.** Graafikul on kujutatud iga päeva nelja katse keskmine platvormi leidmiseks kulunud aeg sekundites.



Päev	+/+	-/-	Päev	+/+	-/-	Päev	+/+	-/-
1	49±7	51±6	12	20±4	19±5	19	17±5	16±4
2	41±4	40±6	13	20±4	15±3	20	12±4	12±3
3	29±3	33±4	14	14±5	14±4	21	13±3	13±4
4	23±4	30±6	15	39±8	42±6	22	9±3	12±4
5	20±5	24±4	16	24±5	21±4	23	9±3	10±3
			17	17±4	15±4	24	8±2	7±3

**Tabel 4. Morrise vesipuuri õppisperiodide keskmised platvormi leidmise ajad koos keskmise standardveaga (±).**

*Proovikatsed ilma platvormita.* Joonisel 2 on toodud kõigi ilma platvormita tehtud 60 s proovikatsete tulemused. Statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenud ei algse õppimise tasemes (6. päev; +/+ 24±4, -/- 23±4), ümberõppimise tasemes (18. päev; +/+ 21±3, -/- 22±2) ega ka 6-päevase mälu katses (11. päev; +/+ 22±3, -/- 22±3) erinevusi ei ilmnenud. Teises pikaajalise mälu katses (38. päev – mälu 14 päeva lõikes) saavutasid -/- hiired oma metsikut tüüpi pesakonnakaaslastest mõnevõrra parema tulemuse, kuid vahe ei olnud siiski statistiliselt oluline (+/+ 19±2, -/- 23±2,  $p=0,179$ ). Seda, et see ligi 4-sekundiline vahe ei tulenenud baastaseme erinevusest, näitab 24. päeva katse (baastaseme mõõtmise katse) tulemuste võrdsus (+/+ 32±4, -/- 31±3).



**Joonis 2. Morrise vesipuuri katse 60 s platvormita katsed.** Tulbad väljendavad platvormi paiknemise veerandis ujutud aega sekundites; grupi keskmine tulemus üle 15 s annab tunnistust mäletamisest/õppimisest (juhuslik tulemus: 60 sekundit / 4 veerandit = 15 s).

## Arutelu

Käesolevas töös uuriti CCK2 retseptorite geneetilise väljalülitamise mõju hiirte õppimisvõimele passiivse vältimise ja Morrise vesipuuri katses ning üritati opioidisüsteemi konkureeriva antagonistina naloksooni manustamise abil selgitada seoseid CCK-ergilise ja opioidergilise süsteemi vahel.

Passiivse vältimise katses selgus, et „mõõdukaks“ peetav elektrilöök 0,6 mA 2 s jooksul kipub andma laeefekti. Seepärast ei ole ime, et Daugé jt (2001), kes kasutasid CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte valutundlikkuse mõõtmiseks voolutugevusi 0,72; 0,84; 0,96; 1,08 ja 1,2 mA, ei leidnud genotüüpide vahel mingeid erinevusi, sest nende katses andsid kõik voolutugevused peale 0,72 mA nii metsiktüüpi kui mutanthiirte puhul 100% laeefekti (s.t kõik hiired hüppasid ja/või häälitsetsid). Käesoleva katseseria tulemuste põhjal võib väita, et CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte puhul on passiivse vältimise (ja tõenäoliselt ka elektrilöögi abil testitava valutundlikkuse) katses optimaalne kasutada elektrilööke vahemikus 0,2 mA kuni 0,6 mA 2 s jooksul ning neid võiks nimetada järgnevalt: 0,2 mA „nõrk“; 0,4 mA „mõõdukas“; 0,6 mA „tugev“. Valutundlikkuse teatav – tõsi küll, statistiliselt ebaoluline – langus ilmnes ainult väga harva kasutatava 0,2 mA elektrilöögi puhul, mitte aga „tavalisemate“ voolutugevuste 0,4 või 0,6 mA puhul. Et varasemates töödes (Kurrikoff jt, 2004) on näidatud, et –/– hiirte valutundlikkus on alanenud, on see tendents igati loogiline. Uurimist vääraks genotüüpide käitumine veel nõrgema elektrilöögi (nt 0,1 mA) puhul. Seda, et see tendents tuleneb valutundlikkuse alanemisest, mitte aga õppimisvõime langusest, toetavad ka Morrise vesipuuri katse tulemused, kus genotüüpide vahel õppimises erinevusi ei ilmnenud. Passiivse vältimise katses ilmnenud valutundlikkuse alanemise tendents on aga vastuolus Pommieri jt (2002) andmetega, kes leidsid, et CCK2 retseptori puudulikkusega hiirtel esineb kuuma plaadi katses ülitundlikkus. Võimalikuks seletuseks võib olla see, et CCK2 retseptorid ei mõjuta erinevaid tundlikkuse tüüpe (mehaaniline, termiline, valu jne) päris sarnasel viisil.

Morrise vesipuuri katses kasutati pikka ja põhjalikku 38-päevast katseskeemi, mis võimaldas vaadelda nii õppimiskõverat, lühiajalist mälu, pikaajalist mälu 6 ja 14 päeva lõikes kui ka ümberõppimisvõimet. Enam-vähem sarnast pikaajalist ja

vaheldusrikast skeemi on varem kasutanud Frisch jt (2000). Ei õppimises ega ümberõppimises genotüüpide vahel erinevusi ei ilmnenud, kuid pikaajalise (14 päeva) mälu katses said CCK2 retseptori puudulikkusega hiired mõnevõrra parema tulemuse, kuid erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Et aga samasugune tendents ilmnes ka passiivse vältimise katses, kus 8 päeva pärast elektrilöögi saamist oli –/– hiirte latents võrreldes elektrilöögile järgnenud päevaga isegi tõusnud, +/+ hiirtel aga langenud, väärrib CCK2 retseptori väljalülitamise mõju pikaajalisele mälule edasist uurimist. Passiivse vältimise katse puhul tuleb arvesse ka võimalus, et see tendents tuleneb CCK2R mutanthiirte vähenenud valutaluvuse võimest, sest sarnasele võimalusele viitavad ka Veraksitši jt (2003) tulemused. Et aga Morrise vesipuuris, mis on küll seotud hiire jaoks enamasti ebameeldiva keskkonnaga (vesi), kuid mitte valuaistinguga, ilmnes samasugune tendents, võib selle efekti taga peituda mõni muutus mäluga seonduvates süsteemides. Üheks hüpoteesiks võib pidada muutusi CCK1 retseptori ekspressioonitasemes, nimelt näitasid Kurrikoff jt (2004), et CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte ajus on lisaks opioidi  $\delta$  ja  $\kappa$  retseptorite üleekspressioonile ka CCK1 retseptorite ekspressioonitase võrreldes metsikut tüüpi hiirtega ligi 2 korda suurenenud. Kuigi mõnes katses (Gerhardt jt, 2003) CCK2 retseptori selektiivsed agonistid parandasid mälu, näitab suurem osa katseid (Katsuura ja Itoh, 1986; Daugé jt, 1992; Lemaire jt 1992; Derrien jt 1994, Shlik jt, 1998), et CCK2 retseptori selektiivsed agonistid halvendavad mälu. Et aga mitmes katses (nt Winnicka ja Wisniewski, 2000; Itoh jt, 1992) on leitud, et CCK retseptorite mitteselektiivne agonist tseruliin parandab mälu, võib mälu parandava efekti ilmselt kirjutada CCK retseptorite esimese alatüübi arvele. CCK retseptorite roll õppimises/mälus väärrib seega edasist uurimist, seda enam et seniajani on uuritud peamiselt nende seost lühiajalise, mitte aga pikaajalise mäluga.

Käesoleva katseseeria tulemused näitavad, et CCK2 retseptori geneetiline väljalülitamine ei kahjusta loomade õppimisvõimet. Vastuolu Sebret jt (1999) ning Daugé jt (2001) Y-labürindi katsetega, kus CCK2 retseptori puudulikkusega hiirtel esines Y-labürindis vähem spontaanset vaheldumist (*alternation*) kui metsikut tüüpi hiirtel (märk tähelepanu- ja/või mäluprotsesside halvenemisest), on olemasolevate andmete põhjal võimatu ammendavalt selgitada. See võib tuleneda õppimiskatsete erinevast iseloomust ja stiimulite erinevusest. Teine võimalus on, et spontaanse vaheldumise vähenemine viitab pigem tähelepanuhäiretele, mitte õppimise ja mäluga seotud protsesside halvenemisele. Mis puutub käesoleva katse tulemuste võrdlemisse

CCK2 retseptori agonistide ja antagonistidega tehtud mäluksüsteemide tulemustega, siis paraku ei ole need hästi võrreldavad, sest tuleb silmas pidada, et CCK2 retseptori geneetiline väljalülitamine ei võrdu CCK2 retseptorite blokeerimisega antagonistide abil, sest CCK2 retseptori geneetiline väljalülitamine aktiveerib, erinevalt antagonistist, mitmed teised õppimisega seotud neurotransmitter-süsteemid, eelkõige dopaminergilise süsteemi (Köks jt, 2001; Daugé jt, 2001) ja CCK1 süsteemi (Kurrikoff jt, 2004), mis mõlemad on tihedalt õppimisega seotud.

Passiivse vältimise katses ilmnes, et CCK2 retseptori puudulikkusega hiired said kõige madalama voolu (0,2 mA 2 s) puhul kontrollgrupist mõnevõrra halvema tulemuse, kuid vahe ei olnud statistiliselt oluline. Mainitud tendents on kooskõlas varasemate töödega, mis on näidanud, et CCK2 retseptori väljalülitamine kõrgendab valutundlikkuse läve (Veraksitš jt, 2003) ja mehaanilise tundlikkuse läve (Kurrikoff jt, 2004). See efekt tuleneb omakorda CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte opioidisüsteemi aktiveerumisest (Pommier jt, 2002; Kurrikoff jt, 2004), sest geneetiliselt muudetud loomadel puudub CCK2 retseptori stimulatsiooni kaudu toimiv negatiivne tagasisidering, mis opioidisüsteemi aktiivsust piirab.

Naloksoon ei mõjutanud passiivse vältimise katses kummagi genotüübi käitumist statistiliselt oluliselt ning ka genotüüpide vahel erinevusi ei ilmnenud. Tulemus on teataval määral kooskõlas Pommieri jt (2002) katsega, kus naloksooni doos 0,1 mg/kg ei mõjutanud kuuma plaadi katses ühegi genotüübi käitumist (mainitud uurimuses suuremaid doose ei kasutatud). Et aga Kurrikoffi jt (2004) uuringus ilmnes naloksooni erinev mõju genotüüpide valutundlikkusele ning et käesolevas katses naloksoon genotüüpide käitumist ei mõjutanud, siis tuleks kontrollida hüpoteesi, mille järgi tuleks selleks, et näha naloksooni erinevat mõju  $-/-$  ja  $+/+$  hiirtele, kasutada tajuläve piiri peal olevat valustiimulit (nt elektrilöök 0,1 mA 2 s).

Kokkuvõtteks, käesolev uurimus näitab, et CCK2R puudulikkusega hiired ei erine passiivse vältimise ja Morrise vesipuuri katses õppimisvõime poolest harilikest hiirtest. See tulemus on vastuolus Sebret jt (1999) ning Daugé jt (2001) väitega, et CCK2R puudulikkusega hiirte õppimisvõime on langenud. Naloksoon ei avaldanud passiivse vältimise katses statistiliselt olulist mõju kummalegi genotüübile, mistõttu tuleks uurida ka naloksooni mõju veel nõrgemate elektrilöökide puhul. Morrise vesipuuri katse puhul ei ilmnenud genotüüpide vahel erinevusi ei õppimises ega ümberõppimises, kuid  $-/-$  hiirte mälujälj säilis kahe nädala lõikes metsikut tüüpi

hiirtest mõnevõrra paremini. Et sarnane (statistiliselt ebaoluline) tendents ilmnes 8 päeva lõikes ka passiivse vältimise katses, on tegemist edasist uurimist vääriva suunaga. Erilist tähelepanu tuleks pöörata pikaajalise mälu seostele CCK1 retseptoriga. Matsushita jt (2003) leidsid, et CCK1 retseptorita rotid õpivad normaalsetest loomadest kehvemini, seega võib käesolevas uurimuses CCK2 retseptori puudulikkusega hiirtel ilmnenu tendents pikaajalise mälu paranemisele tuleneda nende loomade CCK1 retseptori üleekspressioonist.

## Järeldused

1. CCK2 retseptori geneetiline väljalülitamine ei mõjuta õppimisvõimet ei valutundlikkusel põhinevas õppimiskatses (passiivne vältimine) ega ka ruumilise mälu katses (Morrisse vesipuur). Tulemus on vastuolus varasemate katsetega, kus on näidatud, et CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte õppimisvõime on langenud.
2. CCK2 retseptori puudulikkusega hiirtel ilmnes nõrk tendents alanenud valutundlikkuse suunas, mis on kooskõlas varasemate katsete tulemustega.
3. CCK2 retseptori geneetiline väljalülitamine võib parandada pikaajalist mälu. Ei passiivse vältimise ega ka Morrisse vesipuuri katses ei olnud efekt statistiliselt oluline, kuid mõlemas katses ilmnes samasuunaline tendents. Valustiimulil põhineva katse puhul võib see tuleneda –/– hiirte valutaluvuse alanemisest võrreldes metsikut tüüpi hiirtega. Hüpoteesina tuleb arvesse ka CCK1 ja/või dopaminergilise süsteemi aktivatsioonist tulenev pikaajalise mälu paranemine.
4. Vaatamata CCK2 retseptori puudulikkusega hiirte opioidisüsteemi aktiveerumisele on opioidireseptorite konkureeriva antagonisti naloksooni mõju –/– ja +/+ hiirtele sarnane. Võimalik, et erinevuse näitamiseks tuleks kasutada tajuläve piiri peal olevaid valustiimuleid (nt elektrilööki tugevusega 0,1 mA 2 s).

## Töös kasutatud lühendid

-/-	CCK2 retseptori puudulikkusega homosügootsed hiired
+/+	-/- hiirte metsikut tüüpi pesakonnakaaslased
ANOVA	Dispersioonanalüüs e. varieeruvuse analüüs
CCK	Koletsüstokiniin
CCK1	Koletsüstokiniini retseptori 1. alatüüp
CCK2	Koletsüstokiniini retseptori 2. alatüüp
CCK-4	Koletsüstokiniini tetrapeptiid
CCK-8s	Koletsüstokiniini sulfateeritud oktapeptiid
GABA	Gamma-aminovõihape
kg	Kilogrammi
mA	Milliamprit
mg	Milligrammi
PCR	Polümeraasi ahelreaktsioon
s	Sekundit
±	Keskmise standardviga

## **Töös kasutatud viidete nimekiri**

- Baber NS, Dourish CT, Hill DR (1989) The role of CCK caerulein, and CCK antagonists in nociception. *Pain* 39: 307-328.
- Belcheva I, Belcheva S, Petkov VV, Petkov VD (1994) Asymmetry in behavioral responses to cholecystokinin microinjected into rat nucleus accumbens and amygdala. *Neuropharmacology* 33: 995-1002.
- Costall B, Domeney AM, Hughes J, Kelly ME, Naylor RJ, Woodruff GN (1991) Anxiolytic effects of CCK-B receptors. *Neuropeptides*, 19S: 65-73.
- Crawley JN, Corwin RL (1994) Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, 15: 731-755.
- Daugé V, Derrien M, Blanchard JC, Roques BP (1992) The selective CCK-B agonist, BC 264 injected in the antero-lateral part of the nucleus accumbens, reduces the spontaneous alternation behaviour of rats. *Neuropharmacology* 31: 67-75.
- Daugé V, Roques BP (1995) Opioid and CCK systems in anxiety and reward. Teoses „Cholecystokinin and Anxiety: From Neuron to Behavior“, toim Bradwejn J, Vasar E, 151-171, RG Landes Company, Austin.
- Daugé V, Léna I (1998) CCK in anxiety and cognitive processes. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 815-825.
- Daugé V, Sebret A, Beslot F, Matsui T, Roques BP (2001) Behavioral profile of CCK2 receptor-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 25: 690-698.
- Derrien M, Daugé V, Blommaert A, Roques BP (1994) The selective CCK-B agonist, BC 264, impairs socially reinforced memory in the three-panel runway test in rats. *Behav Brain Res* 65: 139-146.



Dockray GJ (1976) Immunochemical evidence of cholecystokinin-like peptides in brain. *Nature* 264: 568-570.

Dockray GJ, Taylor IL (1976) Heptadecapeptide gastrin: measurement in blood by specific radioimmunoassay. *Gastroenterology* 71: 971-977.

Dotz C, Sarnighausen HE, Pietrowsky R, Fehm HL, Born J (1996) Ceruletide improves event-related potential indicators of cognitive processing in young but not in elderly humans. *J Clin Psychopharmacol* 16: 440-445.

Faris PL (1985) Opiate antagonistic function of cholecystokinin in analgesia and energy balance systems. *Ann N Y Acad Sci* 448: 437-447.

Faris PL, Komisaruk BR, Watkins LR, Mayer DJ (1983) Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia. *Science* 219: 310-312.

Fink H, Rex A, Voits M, Voigt JP (1998) Major biological actions of CCK – a critical evaluation of research findings. *Exp Brain Res* 123: 77-83.

Frisch C, Dere E, Silva MA, Gödecke A, Schrader J, Huston JP (2000) Superior water maze performance and increase in fear-related behavior in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum. *J Neurosci*, 20: 6694-6700.

Gerhardt P, Voits M, Fink H, Huston JP (1994) Evidence for mnemotropic action of cholecystokinin fragments Boc-CCK-4 and CCK-8S. *Peptides* 15: 689-697.

Ghilardi JR, Allen CJ, Vigna SR, McVey DC, Mantyh PW (1992) Trigeminal and dorsal root ganglion neurons express CCK receptor binding sites in the rat, rabbit, and monkey: possible site of opiate-CCK analgesic interactions. *J Neurosci* 12: 4854-4866.

Harper AA, Raper HS (1943) Pancreozymin, a stimulant of secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine. *J Physiol* 102: 115-125.

Harro J, Oreland L (1993). Cholecystokinin receptors and memory: A radial maze study. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 509-517.

Itoh S, Katsuura G, Yoshikawa K, Rehfeld JF (1985) Potentiation of beta-endorphin effects by cholecystokinin antiserum in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 181-183.

Itoh S, Takashima A, Maeda Y (1992) Protective effect of cerulein on memory impairment induced by protein synthesis inhibitors in rats. *Peptides* 13: 1007-1012.

Ivy AC, Oldberg E (1928) A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am J Physiol* 65: 599-613.

Katsuura G, Itoh S (1986) Passive avoidance deficit following intracerebroventricular administration of cholecystokinin tetrapeptide amide in rats. *Peptides* 7: 809-814.

Kurrikoff K, Kõks S, Matsui T, Bourin M, Arend A, Aunapuu M, Vasar E (2004) Deletion of the CCK2 receptor gene reduces mechanical sensitivity and abolishes the development of hyperalgesia in mononeuropathic mice. *Eur J Neurosci*, 20: 1577-1586.

Kõks S, Volke V, Veraksitš A, Rünkorg K, Sillat T, Abramov U, Bourin M, Houtari M, Männistö PT, Matsui T, Vasar E (2001). Cholecystokinin2 receptor-deficient mice display altered function of brain dopaminergic system. *Psychopharmacology*, 158: 198-204.

Ladurelle N, Keller G, Blommaert A, Roques BP, Daugé V (1997) The CCK-B agonist, BC 264, increases dopamine in the nucleus accumbens and facilitates motivation and attention after peripheral intraperitoneal injection in rats. *Eur J Neurosci* 9: 1804-1814.

Lavigne GJ, Millington WR, Mueller GP (1992) The CCK-A and CCK-B receptor antagonists, devazepide and L-365,260, enhance morphine antinociception only in non-acclimated rats exposed to a novel environment. *Neuropeptides* 21: 119-129.

Lemaire M, Piot O, Roques BP, Böhme AG, Blanchard JC (1992) Evidence for endogenous cholecystokinergic balance in social memory. *Neuroreport* 3: 925-932.

Matsushita H, Akiyoshi J, Kai K, Ishii N, Kodama K, Tsutsumi T, Isogawa K, Nagayama H (2003) Spatial memory impairment in OLETF rats without cholecystokinin-a receptor. *Neuropeptides* 37: 271-276.

Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, McHugh PR (1986) Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Res* 362: 175-179.

Mutt V, Jorpes JE (1968) Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin. *Eur J Biochem* 6: 156-162.

Nagata A, Ito M, Iwata N, Kuno J, Takano H, Minowa O, Chihara K, Matsui T, Noda T (1996) G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11825-11830.

Noble F, Blommaert A, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1995) A selective CCKB receptor antagonist potentiates, mu-, but not delta-opioid receptor-mediated antinociception in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 273: 145-151.

Noble F, Roques BP (1999) CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Prog Neurobiol* 58: 349-379.

Pommier B, Beslot F, Simon A, Pophillat M, Matsui T, Daugé V, Roques BP, Noble F (2002) Deletion of CCK2 receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. *J Neurosci*, 22: 2005-2011.

Raud S, Rünkorg K, Veraksitš A, Reimets A, Nelovkov A, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Volke V, Kõks S, Vasar E (2003) Targeted mutation of CCK2 receptor gene modifies the behavioural effects of diazepam in female mice. *Psychopharmacology*, 168: 417-425.

Raud S, Innos J, Abramov U, Reimets A, Kõks S, Soosaar A, Matsui T, Vasar E (2005) Targeted invalidation of CCK2 receptor gene induces anxiolytic-like action in light-dark exploration, but not in fear conditioning test. *Psychopharmacology*, 181: 347-357.

Rex A, Fink H (2004) Cholecystokinin tetrapeptide improves water maze performance of neonatally 6-hydroxydopamine-lesioned young rats. *Pharmacol Biochem Behav* 79: 109-117.

Rünkorg K, Veraksitš A, Kurrikoff K, Luuk H, Raud S, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Kõks S, Vasar E (2003) Distinct changes in the behavioural effects of morphine and naloxone in CCK2 receptor-deficient mice. *Behav Brain Res*, 144: 125-135.

Schreiber H, Stolz-Born G, Pietrowsky R, Kornhuber HH, Fehm HL, Born J (1995) Improved event-related potential signs of selective attention after the administration of the cholecystokinin analog ceruletide in healthy persons. *Biol Psychiatry* 37: 702-712.

Sebret A, Léna I, Crété D, Matsui T, Roques BP, Daugé V (1999) Rat hippocampal neurons are critically involved in physiological improvement of memory processes induced by cholecystokinin-B receptor stimulation. *J Neurosci* 19: 7230-7237.

Shlik J, Vasar E, Bradwejn J (1997) Cholecystokinin and psychiatric disorders. *CNS Drugs*, 8: 134-152.

Shlik J, Koszycki D, Bradwejn J (1998) Decrease in short-term memory function induced by CCK-4 in healthy volunteers. *Peptides* 19: 969-975.

Singh L, Lewis AS, Field MJ, Hughes J, Woodruff GN (1991) Evidence for an involvement of the brain cholecystokinin B receptor in anxiety. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 1130-1133.

Stanfa L, Dickenson A, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z (1994) Cholecystokinin and morphine analgesia: variations on a theme. *Trends Pharmacol Sci* 15: 65-66.

Vanderah TW, Lai J, Yamamura HI, Porreca F (1994) Antisense oligodeoxynucleotide to the CCKB receptor produces naltrindole- and [Leu5] enkephalin antiserum-sensitive enhancement of morphine antinociception. *Neuroreport* 5: 2601-2605.

Vanderhaeghen JJ, Signeau JC, Gepts W (1975) New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature* 257: 604-605.

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

Wiesenfeld-Hallin Z, de Araujo L, Alster P, Xu XJ, Hökfelt T (1999) Cholecystokinin/opioid interactions. *Brain Res* 848: 78-89.

Winnicka MM, Wisniewski K (2000) Bilateral 6-OHDA lesions to the hippocampus attenuate the facilitatory effect of CCK-8US and caerulein on memory in rats. *Pharmacol Res* 41: 347-353.

## Lühikokkuvõte

SISSEJUHATUS. Koletsüstokiniin (CCK) on üks levinumaid neuropeptide närvisüsteemis, mis avaldab mõju kahte tüüpi retseptorite – CCK1 ja CCK2 – kaudu. CCK toimib neurotransmitterina ning avaldab moduleerivat mõju näiteks dopamiini, serotoniini, noradrenaliini, gamma-aminovõihappe, glutamaadi ja opioidide süsteemile. CCK reguleerib mitmeid füsioloogilisi funktsioone, nagu näiteks ärevust, toitumist, valutundlikkust, mälu, õppimist, motivatsioone ja stressireaktsioone. Käesolev töö keskendus CCK seostele valutundlikkuse ja õppimisega, nende funktsioonide omavahelistele seostele ning CCK süsteemi seostele opioidi süsteemiga. MEETODID. CCK2 retseptori puudulikkusega hiiri (–/–) ja nende metsikut tüüpi (+/+) pesakonnakaaslasid testiti passiivse vältimise ja Morrise vesipuuri katses. Lisaks manustati neile passiivse vältimise katses opioidi retseptorite antagonistid naloksooni. TULEMUSED. Passiivse vältimise katses ei ilmnenud –/– ja +/+ hiirte õppimisvõimes muid erinevusi peale selle, et nõrgima voolu puhul olid –/– hiirte latentsid teisel päeval mõnevõrra lühemad. Kõige tugevama elektrilöögi puhul oli –/– hiirte mälujälg nädal hiljem tugevnenud, +/+ loomadel aga nõrgenenud (statistiliselt ebaolulised tendentsid). Naloksoon mõjus mõlemale genotüübile sarnaselt ning doosikõverat ei ilmnenud. Morrise vesipuuri katses genotüüpide õppimise ja õmberõppimise võimes erinevusi ei ilmnenud, kuid sarnaselt passiivse vältimise katsele ilmnis, et –/– hiirte pikaajaline mälujälg säilis mõnevõrra paremini (statistiliselt ebaoluline). JÄRELDUSED. Tendentsi, et nõrga voolu puhul said –/– hiired vältimiskatses pisut kehvema tulemuse, võib tõenäoliselt kirjutada alanenud valutundlikkuse arvele, mis on kooskõlas varasemate artiklitega. Et õppimisvõimes ei leitud erinevusi ei vältimiskatses ega ka Morrise vesipuuris, siis ei kinnita käesolev uurimus varasemate artiklite tulemusi, kus leiti, et –/– hiired õpivad +/+ hiirtega võrreldes kehvemini. Et leida genotüüpidevahelisi erinevusi naloksooni toimes, tuleks tõenäoliselt kasutada tajuläve piiril olevaid valustiimuleid. Asjaolu, et –/– hiirtel ilmnis pikaajalise mälujälje tugevnemise tendents mõlemas katses, võib viidata nende pikaajalise mälu paranemisele (näiteks CCK1 retseptorite üles-reguleerumise tõttu) või nende alanenud valutaluvusele (eelkõige passiivse vältimise katses).

## Abstract

**INTRODUCTION.** Cholecystokinin (CCK) is one of the most abundant neuropeptides in the neural system that exerts influence through two types of receptors, CCK1 and CCK2. CCK acts as a neurotransmitter and modulates several other systems like the dopamine, serotonin, noradrenaline, gamma-aminobutyric acid, glutamate and opioid system. CCK regulates many physiological functions like anxiety, feeding, pain sensitivity, memory, learning, motivation and stress reactions. In this study, we explored the role of CCK in the modulation of pain sensitivity and learning, their interrelations and the connections between the CCK and the opioid system.

**METHODS.** Male CCK2 receptor deficient mice ( $-/-$ ) and their wild type ( $+/+$ ) littermates were tested in the passive avoidance and Morris watermaze paradigms. Also, in the passive avoidance test, naloxone, an antagonist of the opioid receptors, was administered.

**RESULTS.** In the passive avoidance test, no differences were established between the genotypes with one exception: in case of the weakest shock (0.2 mA 2 s), the latencies of  $-/-$  mice were somewhat shorter on the second day. In case of the strongest shock, a week later the memory imprint of  $-/-$  mice had intensified, the memory of  $+/+$  animals had weakened, however (statistically insignificant effects). Naloxone exerted a similar influence on both genotypes and no dose curve was observed. In Morris watermaze, no differences in the learning or relearning ability of the genotypes were found, however, in the long-term memory test  $-/-$  mice showed somewhat better results (statistically insignificant).

**CONCLUSIONS.** The tendency of  $-/-$  mice towards shorter latencies in case of the weakest electric shock can probably be ascribed to their lower pain sensitivity. This conclusion is in accordance with previous articles. Considering that in neither the Morris watermaze nor on passive avoidance test no differences in learning abilities were found, the present study does not support earlier articles claiming that  $-/-$  mice have a learning deficiency compared to  $+/+$  animals. To establish a difference between the genotypes in the action of naloxone, probably nearly sub-threshold pain stimuli should be used. The fact that the long-term memory imprint of  $-/-$  mice was somewhat stronger in both tests can indicate an improvement in their long-term memory (e.g. due to the upregulation of CCK1 receptors) or a lower pain sensitivity (especially in the passive avoidance test).