

# Kassilõhna tekitatud ärevuse mehhanismide käitumuslik ja neurogeneetiline uurimus närilistel. Doktoriväitekirja kokkuvõte

**Tarmo Areda** – TÜ närvikliinik, TÜ füsioloogia instituut, TÜ zooloogia ja hüdrobioloogia instituut

## ärevuse molekulaarsed mehhanismid, koletsüstokiniinide osa ärevuse regulatsioonis

**Mitmesugused ärevushäired on väga levinud patoloogia, seotud suurenenud haigestumuse ja kulutustega ravile. Tänapäeval kasutatakse ärevushäirete ravis peamiselt bensodiasepiine ning serotoniini tagasihaarde inhibiitoreid. Neil ravimel esineb ka olulisi kõrvaltoimeid. Sageli ei ordineerita neid õigete näidustustel, ka ravitulemused ei vasta tihti ootustele. Uute ja tõhusamate ravimite sünteesimiseks on vaja uusi andmeid, mis molekulaarsel tasemel selgitaksid ärevushäirete väljakujunemise mehhanisme.**

Huvi ärevuse mehhanismide vastu on seotud asjaoluga, et ärevushäired on rahvastikus laialt levinud ning seotud suurenenud haigestumuse ja suremusega, aga ka suurte majanduslike kulutustega. Kuni 25%-l inimestest esineb vähemalt korra elu jooksul mingi ärevushäire episood (1, 2). Ärevus on oma olemuselt küll normaalne kogemus, kuid liigne ja patoloogiline (s.o võimaliku ähvardava ohuolukorraga mitteseotud) ärevus põhjustab tõsiseid kannatusi ning tööga ja igapäevaeluga toimetuleku häirumist (3). Ehkki ärevuse ja teiste emotsioonide mehhanisme on uuritud aastakümneid, baseerub ärevuse ravi tänapäeval põhiliselt siiski vaid GABA<sub>A</sub> retseptorkompleksi afiinsust suurendavate bensodiasepiinide ning serotoniini ja noradrenaliini tagasihaarde inhibiitorite kasutamisel. Neil ravimitel on aga olulisi kõrvaltoimeid ning suur väärkasutamise risk. Sellest tingituna on tähtis selgitada uusi molekulaarseid sihtmärke (toimekohti uutele ravimitele), mis osalevad ärevuse regulatsioonis. Selliseid uuringuid on võimalik teha vaid katseloomadel, rakendades asjakohaseid ärevusemudeleid. Kindlasti on üheks kõige spetsiifilisemaks ja liigiomasemaks mudeliks närilistel kassilõhna poolt esile kutsutud ärevus (4).

### Uurimuse põhieesmärgid

Töö peamiseks eesmärgiks oligi selgitada uusi molekulaarseid sihtmärke ärevuse regulatsioonis.

Ärevuse esilekutsumiseks katseloomadel kasutati kassilõhna mudelit. Uuringu täpsemad eesmärgid olid järgmised:

1. Uurida täpsemalt koletsüstokiniini (CCK) ja endogeensete opioidide interaktsiooni laborirottidel kassilõhna poolt põhjustatud ärevuse mehhanismis, sealhulgas muutusi morfiini uudistamisaktiivsust suurendavas toimes. Suurem uudistamisaktiivsus peegeldab katseloomadel vähenenud ärevust ja vastupidi.
2. Uurida kassilõhna mõju uudistamisaktiivsusele ja CCK-opioidide interaktsioonile erineva ärevustasemega emastel hiirtel. Kassilõhna mõju uuriti CCK<sub>2</sub> retseptori puudulikkusega hiirtel ja muutmata genoomiga normaalsetel hiirtel. CCK<sub>2</sub> retseptori puudulikkusega hiiri kasutati nende vähenenud ärevuse tõttu.
3. Leida komplementaarse DNA (cDNA) diferentsiaalanalüüsi abil isaste Wistari liini rottide mandelkehas kassilõhna toimel suurenenud ekspressiooniga geene ja valida neist asjakohased edasisteks uuringuteks. cDNA on pöördtranskriptaasi abil küpsest mRNA-st sünteesitud DNA, genoomse DNAGA võrreldes sisaldab cDNA ainult RNAd kodeerivaid alasid. Mandelkeha kasuks otsustati, lähtudes varasemast informatsioonist selle rolli kohta ärevuse regulatsioonis ning samuti käesoleva töö esimeste katsete alusel, mis näitasid

suurimaid muutusi stressiga (ärevusega) seotud geeni – pro-opio-melanokortiini – ekspressioonis just mandelkehas.

### Katseloomad ja meetodid

Katseloomadeks olid isased Wistari liini rotid ning emased 129Sv/C57Bl6 taustaga CCK<sub>2</sub> retseptori puudulikkusega hiired ja viimaste „metsikut tüüpi” pesakonnakaaslased (s.t hiired, kel CCK<sub>2</sub> retseptor on alles ja muud geenid täpselt samad, mis CCK<sub>2</sub> puudulikul hiirel) (5).

Rotte eksponeeriti kiskjalõhnale, pannes kassilõhnaga riidetüki puuri kattevõrele, hiirte puhul pandi riidetükk puuri ühte nurka. Nii hiirtel kui ka rottidel hinnati samuti ekspositsiooniaegseid uudistamisaktiivsuse parameetreid, mis peegeldavad ärevust.

Ekspositsioonijärgset ärevust hinnati rottidel tõstetud null-puuri mudelis. Roti tõstetud null-puur on põrandast 50 cm kõrgusel asuv 10 cm laiune rõngas, mis on jaotatud neljaks võrdseks sektoriks. Kaks vastastikust sektorit on püstseintega, moodustades „suletud õlad”, ja nende vahele jäävad „avatud õlad”. „Avatud õlgadele” väljumiste arv ja seal viibimise kestus peegeldavad katselooma uudistamisaktiivsust. Rottidel hinnati ka morfiini toimet uudistamisaktiivsusele, süstides morfiini kõhuõõnde pärast ekspositsiooni kassilõhnale, seejärel uuriti loomade motoorset käitumist automatiseeritud jälgimissüsteemi abil. Hiirtel hinnati kassilõhnale eksponeerimise järgset ärevust tõstetud pluss-puuri mudelis. Hiirte tõstetud pluss-puur on põrandast 30 cm kõrgusel asuv neljast täisnurga all asuvast „õlast” 17,5 x 5 cm. Kaks vastastikku asuvat „suletud õlga” on külgedelt ja otsast ääristatud 14 cm kõrguse seinaga, nende vahele jäävad „avatud õlad”. „Avatud õlgadele” väljumiste arv ja seal viibimise kestus peegeldavad katselooma uudistamisaktiivsust.

Kassilõhnatekitatud ärevuse põhjustatud muutusi geeniekspressioonis uuriti rottidel mandelkehas, frontoparietaalses ajukoores, mesolimbilises alas ning juttkehas CCK, proopiomelanokortiini ning  $\mu$ -opioidretseptori geenide osas. Hiirtel olid vaatlusalusteks ajupiirkondadeks

otsmikukoor, mesolimbiline ala, oimusagar (sh mandeltoom) ja keskaju (sh ajuveejuha ümber olev hallaine) ning geenideks CCK; CCK<sub>1</sub> ja CCK<sub>2</sub> retseptorite; proopiomelanokortiini;  $\mu$ -,  $\delta$ -, ja  $\kappa$ -opioidretseptorite; pre-pro-enkefaliini; pre-pro-dünorfiini ning melanokortiin-3 ja -4 retseptorite geenid. Geeniekspressiooni hinnati kvantitatiivse reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qRT-PCR) meetodil suhtelise muutusena kontrollrühma suhtes.

Ärevusega varem seostamata geenide leidmiseks roti mandelkehas kasutati cDNA diferentsiaal-analüüsi (cDNA-RDA). Muutunud ekspressiooniga geenide muutuse suurus mõõdeti analüüsil.

### Peamised tulemused

Kassilõhnale eksponeerimine põhjustas nii hiirtel kui ka rottidel ärevust peegeldavate käitumisparameetrite statistiliselt olulise suurenemise, kuid Wistari liini rottidele oli kassilõhna anksioogeenne toime tugevam kui 129Sv/C57Bl6 taustaga hiirtele. Varem on näidatud ka, et C57Bl6 hiired on tundlikumad kassilõhna suhtes (6) ja et 129Sv liini hiired on suurenenud ärevusega (7). Meie laboris hiljuti tehtud avaldamata uuringud näitavad samuti 129Sv ja C57Bl6 hiire liinide erinevat reageerimist kassilõhnale, kuid hiirte reaktsioon kiskjalõhnale on neil võrreldes Wistari liini rottidega oluliselt vähem väljendunud.

Varasemast on teada, et anksioogenseid efekte saab uurida vähenenud ärevusega loomadel. Meie töörühm on tuvastanud CCK<sub>2</sub> retseptori puudulikkusega hiirte oluliselt suurenenud uudistamisaktiivsust võrreldes „metsikut tüüpi” pesakonnakaaslastega (8, 9), see oli nimetatud transgeensete hiirte töösse kaasamise peamiseks põhjuseks. CCK<sub>2</sub> retseptori puudulikkusega hiired näitasidki pärast kiskjalõhnale eksponeerimist tõstetud pluss-puuri mudelis üles vähenenud uudistamisaktiivsust, ehkki sellist mõju nende „metsikut tüüpi” pesakonnakaaslastel ei ilmnenud ning ka muutused geeniekspressioonis olid viimastel oluliselt tagasihoidlikumad. Suurim muutus CCK<sub>2</sub> retseptori puudulikkusega hiirtel oli proopiomelanokortiini geeni ligi viiekordne ülesregulatsioon oimusagaras (kus asub ka mandelkeha),

sarnane muutus esines kassilõhnale eksponeerimise järel ka Wistari rottide mandelkehas. Edasine analüüs näitas, et need muutused võivad olla seotud melanokortiinisüsteemi aktivatsiooniga.

Ülal toodud viited olid aluseks edasisele katsele leida uusi sihtmärke ärevuse regulatsioonis. Selleks tehti cDNA-RDA katse, et leida kiskjalõhnale eksponeerimise järgseid geeniekspressiooni muutusi roti mandelkehas. On tähelepanuväärne, et ühtegi qRT-PCR meetodil nähtud ekspressioonimuutust cDNA-RDA meetodiga ei tuvastatud. See on seletatav asjaoluga, et kindlat geeni uuriv qRT-PCR tuvastab juba mõne cDNA koopia, võrreldes suuremat hulka algmaterjali vajava poolkvantitatiivse cDNA-RDA-ga, viimane aga võimaldab see-eest leida erinevalt ekspresseerunud genee ilma neid eelnevalt fookustamata. Kõikide geenide ekspressioonimuutuste ükshaaval qRT-PCR meetodiga tuvastamine pole aga otstarbekas ning suure ressursikulu tõttu võimalikki.

Peamised edasisteks uuringuteks välja valitud geenid cDNA-RDA katsest on Wfs1, Lsamp ja Gamm1. Wfs1 geen kodeerib valku wolframiin ning mutatsioonid selles geenis on seotud depressiooni ja diabeediga. Meie tööühm on välja arendanud Wfs1 geeni puudulikkusega hiireliini ning esialgsed katsed näitavad selle hiireliini suurenenud ärevust. Gamm1 tundub olevat seotud naha pigmentatsiooniga, seos melanokortiinisüsteemi ja ärevusega vajab edasist uurimist. Lsamp geen on oluline limbilise süsteemi arengus, äsjased uuringud näitavad Lsamp geeni ülesregulatsiooni mandeltuumas ja ajuveejuhaümbrises hallaines vähese eksploratiivse aktiivsusega rottidel. See on kooskõlas käesoleva uuringuga, kus samuti suurenenud ärevus on seotud Lsamp geeni suurenenud ekspressiooniga mandelkehas.

## Järeldused

1. Isaste Wistari rottide eksponeerimine kassilõhnale tekitas rottidel suurenenud ärevust nii ekspositsiooni ajal kui ka järgnenud tõstetud null-puuri katses. Kassilõhna järgsed geeniekspressiooni muutused roti ajus olid kõige suuremad ärevusega (mandel-

keha – proopiomelanokortiin) ja motivatsioonidega (mesolimbiline ala – CCK, proopiomelanokortiin,  $\mu$ -opioidireseptor) seotud ajupiirkondades. Kaasnev morfiini uudistamisaktiivsust vähendava toime kadumine kassilõhnale eksponeerimise järel annab alust arvata, et proopiomelanokortiin muudetakse edasi  $\beta$ -endorfiiniks.

2. Emastel CCK<sub>2</sub> puudulikkusega hiirtel esines suurenenud uudistamisaktiivsus tõstetud pluss-puuris võrreldes „metsikut tüüpi“ pesakonnakaaslastega, sellega kaasnesid  $\mu$ -opioidireseptori geeni suurenenud ekspressioon otsmikukoos ja keskajus ning CCK<sub>1</sub> retseptori geeni suurenenud ekspressioon otsmikukoos ja keskajus.

3. Ekspositsioon kassilõhnale pärsib uudistamiskäitumist CCK<sub>2</sub> retseptori puudulikkusega hiirtel, kuid mitte nende „metsikut tüüpi“ pesakonnakaaslastel tõstetud pluss-puuri mudelis. Viimastel on ka vähem muutusi geeniekspressioonis: preproCCK geeni allaregulatsioon mesolimbilises alas ning melanokortiin-3 retseptori geeni ülesregulatsioon keskajus. CCK<sub>2</sub> retseptori puudulikkusega hiirtel esinesid kiskjalõhnale eksponeerimise järel ka olulised muutused geeniekspressioonis. Proopiomelanokortiini geeni märkimisväärne ülesregulatsioon oimusagaras, keskajus ja mesolimbilises alas ning melanokortiin-3 retseptori geeni ülesregulatsioon oimusagaras ja otsmikukoos aitavad tõenäoliselt kaasa kiskjalõhna ekspositsioonist tuleneva ärevuse tekkele.  $\delta$ -opioidireseptori ja pre-pro-enkefaliini geenide ülesregulatsioon oimusagaras on tõenäoliselt kompensatoorsed vastused suurenenud ärevusele.

4. cDNA diferentsiaalanalüüs tuvastas roti mandeltuumas hulga genee, mis olid kiskjalõhnale eksponeerimise järel üles reguleeritud. Nende hulgas oli nii närviülekanedega seotud kui ka närvi- ja gliiarakkude üldfunktsioone tagavaid genee. Suurim ekspressiooni tõus oli Gamm1 geenil, mis on seotud naha pigmentatsiooniga. Lisaks sellele valiti edasisteks uuringuteks Wfs1 geen, mis on seotud meeleoluhäirete ja diabeediga, ning Lsamp geen, mis vastutab limbilise süsteemi arengu eest.

## Kirjandus

1. Hettema JM, Neale MC, Kendler KS. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 2001;158:1568–78.
2. Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 1994;51:8–19.
3. Arikian SR, Gorman JM. A review of the diagnosis, pharmacologic treatment, and economic aspects of anxiety disorders. *Prim. Care Companion. J Clin Psychiatry* 2001;3:110–7.
4. Dielenberg RA, McGregor IS. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:597–609.
5. Nagata A, Ito M, Iwata N, et al. G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:11825–30.
6. Belzung C, El Hage W, Moindrot N, et al. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology* 2001;41:400–8.
7. Vöikar V, Kõks S, Vasar E, Rauvala H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 2001;72:271–81.
8. Raud S, Innos J, Abramov U, et al Targeted inactivation of CCK2 receptor gene induces anxiolytic-like action in light-dark exploration, but not in fear conditioning test. *Psychopharmacology* 2005;181:347–57.
9. Raud S, Rünkorg K, Verakšitš A, Reimets A, et al. Targeted mutation of CCK2 receptor gene modifies the behavioural effects of diazepam in female mice. *Psychopharmacology* 2003;168:417–25.

## Summary

### Behavioural and neurogenetic study of the mechanisms related to cat odour - induced anxiety in rodents

**Introduction.** Anxiety disorders are highly prevalent and are associated with high levels of morbidity and high great economic cost, These disorders affect up to 25% of population at some point in their lifetime. Anxiety can cause or aggravate many other diseases and diseases are more onerous in presence of anxiety.

**Aim of the study.** The general goal of the study was to establish new molecular targets implicated in the regulation of anxiety, because although effective treatments are available, they have a high abuse potential and serious adverse effects.

**Methods.** For this purpose, a model of innate anxiety based on exposure to cat odour was used. Male Wistar rats (Han/Kuo: WIST) as well as CCK2 receptor deficient mice and their wild-type littermates were exposed to cat odour cloth or clean cloth (control group). During and after cat odour exposure, the measures of the exploratory activity reflecting anxiety were assessed in

the animals. Thereafter, gene expression changes in the anxiety-related brain areas were studied as well using quantitative real-time PCR and cDNA Representational Difference Analysis.

**Results and conclusions.** Cat odour exposure induced several changes in the expression of the cholecystokinin and endogenous opioid systems. The biggest changes in gene expression were found in the temporal lobe, especially in the amygdala. The CCK2 receptor deficient mice showed a different gene expression profile and behavioural pattern compared to the wild-type littermates. It was established that a significant number of the genes previously unrelated to anxiety were differently expressed after cat odour exposure. Three of them were selected for further studies: *Gamm1* gene, which is related to skin pigmentation; *Wfs1* gene, which is linked to mood disorders and diabetes; and *Lsmp*, which is a gene responsible for development of the limbic system.

Tarmo.Areda@kliinikum.ee