

KIRJALLISUUSKATSAUS

SKITSOFRENIAN KOGNITIIVISTEN OIREIDEN MALLINTAMINEN  
JYRSIJÖILLÄ GLUTAMAATIN N-METYYLI-D-ASPARTAATTI -RESEPTORI-  
ANTAGONISTIEN AVULLA

KOKEELLINEN OSA

KOGNITIIVISTA JOUSTAVUUTTA MITTAAVA TESTI HIIRILLE  
(ATTENTIONAL SET SHIFTING TASK)

Marja Törnävä  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja toksikologian  
osasto  
Kesäkuu 2012

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty <b>Farmasia</b>		Laitos — Institution — Department <b>Farmakologia ja toksikologia</b>	
Tekijä — Författare — Author <b>Marja Törnävä</b>			
Työn nimi — Arbetets titel — Title <b>Kirjallisuuskatsaus: Skitsofrenian kognitiivisten häiriöiden mallintaminen jrsijöillä glutamaatin N-metyyli-D-aspartaatti-reseptori-antagonistien avulla <b>Kokeellinen osa: Kognitiivista joustavuutta mittaava testi hiirille, Attentional set shifting task</b></b>			
Oppiaine — Läroämne — Subject <b>Farmakologia</b>			
Työn laji — Arbetets art — Level <b>Pro-Gradu</b>		Aika — Datum — Month and year <b>Kesäkuu 2012</b>	Sivumäärä—Sidoantal- Number of pages <b>71</b>
Tiivistelmä — Referat — Abstract <b>Kirjallisuuskatsaus:</b> Skitsofrenian kognitiiviseen oireistoon kuuluvat häiriöt toiminnanohjauksessa, tarkkaavaisuudessa, työmuistissa ja informaation prosessoinnissa. Kognitiivisten häiriöiden taustalla olevan neurobiologian syvempi ymmärtäminen on perusta uusien lääkeainnovatioiden kehittämiseksi. Siksi tarvitaan uusia luotettavia eläinmalleja. Skitsofrenian glutamaattihypoteesi perustuu havaintoon, jossa N-metyyli-D-aspartaatti-reseptoreita (NMDAR) salpaavien lääkeaineiden havaittiin aiheuttavan skitsofreniaa muistuttavan oireiston. Kirjallisuuden perusteella NMDAR-antagonistit ovat hyvä menetelmä skitsofrenian kognitiivisten häiriöiden farmakologiseen mallintamiseen eläimillä. Kirjallisuuskatsauksessa esitellään skitsofrenian kognitiivisia eläinmalleja sekä tarkastellaan NMDAR-antagonistien akuutin ja kroonisen annostelun eroja niiden aikaansaamiin häiriöihin kognitiivisissa. <b>Kokeellinen osa:</b> Ns. attentional set shifting task (ASST) on kognitiivinen eläinmalli, jonka avulla voidaan tutkia eläimen kognitiivista joustavuutta eli kykyä muodostaa sääntöjä ja vaihtaa niitä tarvittaessa. ASST on yksi mahdollinen eläinmalli kuvaamaan skitsofreniassa esiintyviä kognitiivisia häiriöitä. ASST suorittamista on kokeiltu hiirillä, tosin vaihtelevin tulokset. Tämän erikoistyön ensisijaisena tavoitteena oli tutkia, voidaanko ASST:ä suorittaa ulkosiittoisilla ICR-kannan hiirillä. Tutkimus ei onnistunut osoittamaan ICR-hiirikannan soveltuvuutta ASST:iin. Hiiret kuitenkin oppivat tehtävän teknisen suorittamisen. Erikoistyöni farmakologisena painopisteenä oli tutkia, miten NMDAR-antagonisti ditsosilpiini (MK-801) vaikuttaa subkroonisesti annosteltuna (0,03–0,1 mg/kg 10–14vrk i.p.) hiirten kognitiiviseen joustavuuteen. Koejärjestelyllä ei onnistuttu mittaamaan hiirten kognitiivista joustavuutta, joten MK-801:n vaikutuksista tähän kognition osa-alueeseen ei voitu tehdä johtopäätöksiä. MK-801-ryhmän ja kontrolliryhmän välillä ei havaittu merkitsevää eroa millään mitatulla parametrimillä, missään testin vaiheissa. Tulosten perusteella em. MK-801-annostus ei vaikuttanut hiirten motivaatioon tai motoriikkaan, eikä myöskään niihin kognitiivisiin kykyihin joita tarvitaan testin läpiviemiseen. ASST:n suorittaminen hiirillä vaatii lisää tutkimuksia, joiden tulisi keskittyä tarkastelemaan testin koejärjestelyn vaikutusta testin toimivuuteen.			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords <b>ASST, hiiri, kognitiiviset oireet, MK-801, NMDAR-antagonisti, skitsofrenia</b>			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited <b>Farmakologian ja toksikologian osasto</b>			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information <b>Ohjaaja: FaT, Dos. Anni Maija Linden, Biolääketieteen laitos, Farmakologia, Helsingin Yliopisto</b>			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Pharmacy		Laitos — Institution — Department Division of Pharmacology and Toxicology	
Tekijä — Författare — Author Marja Törnävä			
Työn nimi — Arbetets titel — Title <b>Literature review: Modeling cognitive deficits in schizophrenia using N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antagonists in rodents</b> <b>Experimental part: An animal model for cognitive flexibility in mice, Attentional set shifting task</b>			
Oppiaine — Läroämne — Subject Pharmacology			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's Thesis		Aika — Datum — Month and year June 2012	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 71
Tiivistelmä — Referat — Abstract <b>Literature review:</b> Cognitive deficits of schizophrenia include disturbances in executive functions, working memory, attention and information processing. Improved understanding of the neurobiology of these deficits depends on the availability of reliable and carefully validated animal models, which can assist the development of novel pharmacotherapies. The glutamate hypothesis of schizophrenia arises from observations that substances which block a type of glutamate receptor known as N-methyl-D-aspartate-receptor (NMDAR) induces schizophrenia-like condition. The evidence strongly supports the use of NMDAR antagonists to model schizophrenia in animals. In this literature review various cognitive animal models of schizophrenia are presented. Also heterogeneity in the effects of NMDAR antagonists, at the cognitive level, following single-dose or long-term exposure is reviewed and discussed. <b>Experimental part:</b> Attentional set shifting task (ASST) is a cognitive animal model, which models animal's cognitive flexibility or ability to shift attentional set. The ASST has been modified for use with mice. Validation of the test in mice is still inadequate. The main purpose of this study was to investigate whether ASST is suitable for an outbred ICR mouse strain. The current study failed to demonstrate the suitability of ICR mice in this test. Though results did prove that ICR mice are capable of performing the technical requirements of the test. The pharmacological focus of this study was to investigate in mice how a subchronically administered NMDAR antagonist dizocilpine (MK-801) (0.03–0.1 mg/kg, 10–14 d, i.p.) influences the ability to shift attentional set. With our experimental design we could not measure the ability to shift attentional set thus we cannot conclude whether or not MK-801 influenced this cognitive domain. Results did reveal that MK-801, as administered above, did not alter the motivation or motor functions in ICR mice. According to literature and this current study it is obvious that more research is needed to clear ASST suitability for mice. Future studies should focus to investigate how the components of the experimental arrangement in ASST affect the test performance.			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords ASST, mice, cognitive deficits in schizophrenia, NMDAR antagonists, MK-801			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Division of Pharmacology and Toxicology			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisor: Ph.D., Dos. Anni Maija Linden, Institute of Biomedicine, Pharmacology, University of Helsinki			

## LYHENTEET

5CSRTT	Tarkkaavaisuuden ylläpitämisen testi (engl. 5 choice serial reaction time test)
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroksi-5-metyyli-isoksatsoli-4-propionihappo
ANOVA	Varianssianalyysi (engl. analysis of variance)
ASST	Kognitiivista joustavuutta mittaava testi (engl. attentional set shifting task)
CD	Monimuotoinen erottelukoe (engl. compound discrimination)
CDR	Monimuotoinen käänteinen erottelukoe (engl. compound discrimination reversal)
COMT	Katekoli-O-metyylitransferaasientsyymiä koodaava geeni (engl. <i>catechol-O-methyltransferase</i> )
COMT	Katekoli-O-metyylitransferaasientsyymi
CPT	”Pitkäkestoinentehtävä”-testi (engl. continuous performance task)
C57BL/6j	Musta sisäsiittoinen hiirikanta
D2	Dopamiinin D2-reseptori
DBA/2	Sisäsiittoinen hiirikanta
DISC1	<i>Disrupted-in-schizophrenia-1</i> -geeni
ED	Määritteen ulkoinen vaihdos (engl. extradimensional shift)
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
GABA	Gamma-aminovoihappo
GAD1	Glutamaatti-dekarboksylaasi-1 -geeni
Gly	Glysiini
Hab	Totuttelujakso (engl. habituation)
ICR	Ulkosiittoinen International Cancer Research -hiirikanta
ID	Määritteen sisäinen vaihdos (engl. intradimensional shift)
IDR	Käänteinen määritteen sisäinen vaihdos (engl. intradimensional reversal)
IDrep	Toistettu määritteen sisäinen vaihdos (engl. intradimensional shift repetition)
i.p.	Vatsakalvon sisäisesti
i.v.	Laskimon sisäisesti
LTP	Synaptisen toiminnan pitkäkestoinen vahvistuminen

	(engl. long term potentiation)
M	Materiaali (engl. material)
mGLUR	Metabotrooppinen glutamaattireseptori
MK-801	Ditsosilpiini
NAc	Accumbes tumake
NMDAR	N-metyyli-D-aspartaatti reseptori
<i>NRG1</i>	<i>Neuregulin-1</i> -geeni
NOR	Uusien esineiden tunnistamistesti (engl. novel object recognition)
O	Haju (engl. odor)
PFC	Prefrontaalinen aivokuori (engl. prefrontal cortex)
PCP	Fensyklidiini (engl. 1-(1-phenylcyclohexyl)piperidine)
PPI	Aivojen hälysuodatuksen testi (engl. prepulse inhibition)
RAM	Säteittäinen sokkelotesti (engl. radial arm maze)
RELN	Reelin glykoproteiinia koodaava geeni
SD	Yksinkertainen erottelukoe (engl. simple discrimination)
SDrep	Toistettu yksinkertainen erottelukoe (engl. simple discrimination repetition)
SEM	Keskiarvon keskivirhe (engl. standard error of the mean)
TM	T-sokkelo (engl. T-maze)
VTA	Ventraalinen tegementaalinen alue
WCST	Wisconsin korttien lajittelutesti (engl. Wisconsin card sorting task)
YM	Y-sokkelo (engl. Y-maze)

KIRJALLISUUSKATSAUS

SKITSOFRENIAN KOGNITIIVISTEN OIREIDEN MALLINTAMINEN  
JYRSIJÖILLÄ GLUTAMAATIN N-METYyli-D-ASPARTAATTI-RESEPTORI-  
ANTAGONISTIEN AVULLA

Marja Törnävä  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja toksikologian  
osasto  
Kesäkuu 2012

## SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO.....	1
2	SKITSOFRENIA.....	2
2.1	Etiologia.....	3
2.2	Kognitiiviset häiriöt skitsofreniassa.....	4
2.3	Neurobiologia.....	6
2.3.1	Dopamiinihypoteesi.....	6
2.3.2	Glutamaattihypoteesi.....	8
3	NMDAR-ANTAGONISTIT.....	11
3.1	Kilpailemattomat NMDAR-antagonistit.....	13
3.2	NMDAR-antagonistien akuutin ja toistetun annostelun erot.....	14
4	SKITSOFRENIAN KOGNITIIVISET ELÄINMALLIT.....	17
4.1	Informaation käsittelyyn perustuva eläinmalli.....	18
4.2	Työmuistin mallit.....	19
4.2.1	Uusien esineiden tunnistamistesti.....	19
4.2.2	Sokkelotestit.....	20
4.3	Tarkkaavaisuuden ja kognitiivisen joustavuuden eläinmallit.....	21
4.3.1	Tarkkaavaisuuden ylläpitämisen testi.....	22
4.3.2	Kognitiivista joustavuutta mittaava testi.....	24
5	YHTEENVETO.....	30

## 1 JOHDANTO

Skitsofrenia on monimuotoinen psyykkinen sairaus, jota sairastaa noin 1 % väestöstä. Taudin oireet voidaan jakaa positiivisiin ja negatiivisiin oireisiin sekä kognitiivisiin häiriöihin (Crow 1980). Skitsofrenian kognitiiviseen oireistoon kuuluvat häiriöt toiminnanohjauksessa, tarkkaavaisuudessa, työmuistissa ja informaation prosessoinnissa (Rund 1998). Kognitiiviset oireet aiheuttavat vaikeuksia jokapäiväisissä arkitoiminnoissa, sosiaalisissa suhteissa ja kuntoutumisessa, heikentäen skitsofreniapotilaiden elämänlaatua (Bellack ym. 1999). Nykyisten skitsofrenian hoidossa käytettävien antipsykoottien teho taudin positiivisiin oireisiin on hyvä, mutta kognitiivisiin ja negatiivisiin oireisiin heikko (Keefe ym. 1999; Davis ym. 2003; Keefe ym. 2007). Uusien tehokkaiden farmakoterapioiden tarve on siis suuri. Lääkeinnovaatioiden kehittämiseksi skitsofrenian neurobiologinen tutkimus painottuu yhä enemmän kognitiivisten häiriöiden kliiniseen ja prekliiniseen tutkimukseen.

Skitsofrenian taustalla olevasta neurobiologiasta on vallalla useita hypoteeseja koskien eri välittäjäainejärjestelmiä. Tutkituimpia ovat dopamiini- ja glutamaattihypoteesit. Glutamaattihypoteesi perustuu havaintoon, jossa psykomimeettisten, N-metyyli-D-aspartaatti-reseptoreita (NMDAR) salpaavien lääkeaineiden havaittiin aiheuttavan ihmisillä ja eläimillä skitsofrenian kaltaisen tilan (Luby ym. 1959; Javitt ja Zukin 1991). Näissä kokeissa havaittiin skitsofrenialle tyypilliset positiiviset, negatiiviset ja kognitiiviset oireet. Skitsofrenian kognitiivisten häiriöiden mallintamiseksi on kehitetty useita koe-eläinmalleja. Glutamaattihypoteesiin perustuen näissä eläinmalleissa käytetään usein NMDAR-antagonisteja eli reseptorisalpaajia aiheuttamaan eläimille skitsofrenian kaltaisen oireiston.

Uusien lääkeinnovaatioiden kehittämiseksi tarvitaan luotettavia eläinmalleja, jotka ovat helposti toteutettavia ja kustannustehokkaita. Niiden tulisi olla valideja niin, että ne kuvastavat mahdollisimman laajasti skitsofrenian kliinistä rakennetta ja käyttäytymisominaisuuksia, olisivat herkkiä tunnetuille farmakoterapioille ja samalla ennustaisivat uusien tuntemattomien farmakoterapioiden tehoa tai vastetta. Kirjallisuuskatsauksessa esitellään skitsofrenian kognitiivista oireistoa ja näitä oireita



kuvaavia, yleisesti käytettyjä kognitiivisia eläinmalleja. Glutamaattihypoteesiin pohjautuen katsauksessa keskitytään eläinmalleihin, joissa kognitiiviset häiriöt aiheutetaan farmakologisesti NMDAR-antagonistien avulla. Kirjallisuuskatsaus ja työn kokeellinen osa esittelevät eriäviä tuloksia NMDAR-salpaajan valinnasta ja annostelutavasta riippuen.

## 2 SKITSOFRENIA

Skitsofrenia on monimuotoinen psykiatrinen sairaus, joka puhkeaa usein nuorena aikuisiässä. Suomalaistutkimuksen mukaan Suomessa skitsofreniaa sairastaa noin 1,3 % väestöstä (Lehtinen ym. 1990; Perälä ym. 2007). Skitsofrenian oireet jaetaan perinteisesti positiivisiin ja negatiivisiin oireisiin (Crow 1980; Hughes ym. 2003). Positiivisia oireita ovat muun muassa aistiharhat, harhaluulot sekä puheen ja käyttäytymisen hajanaisuus. Negatiivisia oireita ovat tunteiden ja tunneilmaisun latistuminen, puheen köyhtyminen, tahdottomuus sekä kyvyttömyys tuntea mielihyvää. Oleellisena osana skitsofrenian taudinkuvaan kuuluvat myös erilaiset kognitiiviset häiriöt (Rund 1998). Skitsofreniaa hoidetaan pääasiassa antipsykooteilla, jotka voidaan jakaa tyypillisiin (ns. neurolepteihin) ja uudempisiin atyyppisiin antipsykootteihin. Antipsykoottien on osoitettu olevan tehokkaita taudin positiivisten oireiden hoidossa sekä uusien psykoosivaiheiden estossa (Davis ym. 2003). Neurolepteillä ei ole tehoa kognitiivisiin oireisiin. Myös atyyppisten antipsykoottien vaikutuksia kognitiivisiin toimintoihin on tutkittu melko paljon, joskin tutkimustulokset ovat ristiriitaisia (Keefe ym. 1999; Keefe ym. 2007). Useimmiten näilläkin lääkeaineilla ei saavuteta hyvää vastetta kognitiivisiin oireisiin. Positiivisten tulosten kohdalla ei ole selvää onko atyyppisillä antipsykooteilla kognitiivisia toimintoja parantavaa vaikutusta vai onko kyse siitä, että ne eivät heikennä kognitiota kuten vanhemmat neuroleptit.

## 2.1 Etiologia

Skitsofrenian etiologia eli syy on edelleen tuntematon. Perhe-, kaksos- ja adoptiotutkimusten mukaan skitsofrenian puhkeamisen saavat ilmeisesti aikaan sekä perinnöllisyys että ympäristötekijät yhdessä (Hovatta ym. 1997).

Mahdollisia skitsofrenian puhkeamiseen liittyviä ympäristötekijöitä on esitetty useita (Suvisaari 2010). Ympäristötekijöillä voi olla sairastumiselta suojaava tai sairastumisriskiä lisäävä vaikutus. Skitsofreniariskiä lisääviksi ympäristötekijöiksi voidaan katsoa esimerkiksi äidin raskaudenaikainen aliravitseminen, raskaudenaikaiset infektiot ja varhaislapsuuden kasvuympäristön ongelmat. Ympäristötekijöiden vaikutus skitsofreniassa saattaa selittyä epigeneettisillä mekanismeilla (Rutten ja Mill 2009). Epigeneettinen säätely on esimerkki siitä, miten ympäristö muokkaa geenien vaikutusta. Myös huumausaineiden, muun muassa amfetamiinin ja kannabiksen käytön vaikutusta skitsofrenian puhkeamiseen on tutkittu paljon. Niiden on todettu lisäävän taudin puhkeamisen riskiä varsinkin, jos potilailla on geneettinen alttius skitsofreniaan (Chen ym. 2005; Arendt ym. 2008).

Yleinen riski sairastua skitsofreniaan on noin 1 %, mutta skitsofreniapotilaan ensimmäisen asteen sukulaisilla riski sairastua on 5–10-kertainen (Kendler ym. 1993). Identtisillä kaksosilla tehtyjen tutkimusten mukaan toisen kaksosen sairastaessa skitsofreniaa toisella kaksosista on noin 50 %:n riski sairastua samaan tautiin (Tsuang 2000). Geneettinen alttius skitsofreniaan on siis olemassa. Skitsofrenian geneettinen etiologia näyttää olevan heterogeenistä, eikä yhdestä geenistä riippuvaa. Skitsofreniaan altistavia ehdokasgeenejä on kuitenkin pystytty tunnistamaan useita (Allen ym. 2008). Vahvasti skitsofrenialle altistaviksi geneiksi ovat osoittautuneet muun muassa *DISC1* (engl. *disrupted-in-schizophrenia-1*) ja *NRG1* (engl. *neuregulin-1*) (St Clair ym. 1990; Norton ym. 2006). Geenejä, jotka näyttävät säätelevän skitsofrenian patofysiologisia mekanismeja aivojen välittäjäainesyysteemeissä, ovat esimerkiksi *GADI* (engl. *glutamate decarboxylase 1*), *COMT* (engl. *catechol-O-methyltransferase*), ja *RELN* (engl. *reelin*) (Waddington ym. 2001; Roth ym. 2009).

## 2.2 Kognitiiviset häiriöt skitsofreniassa

Kognitiolla tarkoitetaan vastaanotetun tiedon prosessointia, varastointia ja muokkaamista. Neurokognitiivisesta näkökulmasta voidaan ajatella, että skitsofrenia on aivojen kehityshäiriö, jossa tiedonsiirto ja -käsittely eri aivoalueiden välillä on häiriintynyt (Cornblatt ym. 1997).

Skitsofreniapotilailla havaitaan kognitiivisia häiriöitä usein toiminnanohjauksessa, tarkkaavaisuuden ylläpitämisessä, lyhytkestoisessa eli työmuistissa, sekä tiedon vastaanottamisessa ja käsittelyssä (Rund 1998). Kaikki skitsofreniaa sairastavat eivät kuitenkaan kärsi näistä ongelmista. Mikään näistä häiriöistä ei myöskään ole ominainen ainoastaan skitsofrenialle, vaan niitä esiintyy myös monissa muissa psykiatrisissa sairauksissa. Voimakkaimmin kognitiiviset häiriöt tulevat ilmi taudin negatiivisten oireiden ollessa vallalla, mutta häiriöt eivät kuitenkaan ole niistä riippuvaisia (Rund 1998; Rund ym. 2004). Kognitiivisia häiriöitä työmuistissa ja toiminnanohjauksessa voidaan pitää skitsofrenian endofenotyyppinä (Tuulio-Henriksson ym. 2000; Allen ym. 2009). Endofenotyyppillä tarkoitetaan sellaista periytyvää, mitattavissa olevaa ominaisuutta, jota ei voida suoraan havaita. Endofenotyyppi voi olla neuro- tai patofysiologinen, neuroanatominen, biokemiallinen tai kognitiivinen ominaisuus, jonka tulee täyttää seuraavat ehdot: sen tulee liittyä tutkittavaa sairauteen, sen tulee olla periytyvä ja sairauden tilasta riippumaton sekä sen tulee ilmetä tautia sairastavan terveillä sukulaisilla useammin kuin muussa väestössä (Gottesman ja Gould 2003).

Toiminnanohjaus on neuropsykologinen yläkäsite. Sillä tarkoitetaan kognitiivisten perustaitojen koordinoitua ja kontrolloitua tavoitteen saavuttamiseksi (Velligan ja Bow-Thomas 1999). Toiminnanohjaus mahdollistaa kyvyn jäsentää tilanteita, olla huomaamatta tehtävän kannalta häiritseviä ärsykejä, tehdä suunnitelmia, toimia suunnitelmien mukaisesti ja muuttaa toimintaa tarvittaessa päämäärään pääsemiseksi. Toiminnanohjaus voidaan jakaa alakäsitteisiin, kuten kognitiiviseen joustavuuteen, tarkkaavaisuuden kontrollointiin sekä työmuistiin (O'Grada ja Dinan 2007). Kognitiivinen joustavuus tarkoittaa kykyä mukauttaa opittua toimintaa ympäristön ärsykkeiden muutosten mukaan. Useilla lajeilla, kuten ihmisellä ja jyrsijöillä, nämä

toiminnot ovat riippuvaisia otsalohkojen toiminnasta (Goldman-Rakic 1996). Otsalohkojen toimintaa, toiminnanohjausta ja kognitiivista joustavuutta voidaan mitata Wisconsin korttien lajittelutestillä (engl. Wisconsin card sorting task, WCST) (GRANT ja BERG 1948). Testissä mitataan koehenkilön kykyä muodostaa abstrakteja mielleyhtymiä ja kykyä muuttaa tai ylläpitää niitä. Testissä koehenkilön tulee lajitella kortteja kolmen määritteen perusteella (kortin kuvioiden muoto, väri ja lukumäärä). Koehenkilön täytyy itse päätellä lajittelusääntö testiaan antaman palautteen mukaisesti. Lajittelusääntö muuttuu kokeen edetessä varoittamatta. WCST voidaan jakaa osiin, jotka kuvastavat eri kognitiivisia osa-alueita (Roberts ym. 1988). Useissa psykiatrisissa taudeissa, kuten myös skitsofreniassa, WCST-testissä suoriutuminen on heikentynyt (Fey 1951). Skitsofreniapotilaiden on havaittu suoriutuvan terveitä vapaaehtoisia heikommin myös muista toiminnanohjausta ja kognitiivista joustavuutta mittaavissa testeissä (Elliott ym. 1995; Allen ym. 2009; Amitai ja Markou 2010). Skitsofreniaa sairastavilla potilailla havaitut toiminnanohjauksen häiriöt ilmenevät usein tarkkaavaisuuden siirtämisessä ja palautteeseen reagoinnissa (Gold ym. 1997). Palautteeseen reagoimattomuus ilmenee usein perseveraatiotaipumuksena. Perseveraatiolla tarkoitetaan kyvyttömyyttä vastaanottaa negatiivista palautetta ja muuttaa toimintaa sen perusteella.

Työmuistin häiriöt ovat yksi skitsofrenian keskeinen kognitiivinen oireryhmä ja endofenotyyppi (Goldman-Rakic 1994; Allen ym. 2009). Työmuistilla tarkoitetaan kykyä pitää mielessä uutta tietoa muutaman sekunnin ajan samalla kun aivot muokkaavat sitä (Baddeley 2003). Työmuistin heikkoudet ilmenevät käytännössä keskittymisen vaikeutumisena, herkistymisenä erilaisille häiriötekijöille ja vastaanotetun tiedon nopeana pois pyyhkiytymisenä. Työmuistin häiriöt voivat johtua otsalohkojen ja aivokuoren toiminnanhäiriöistä tai vaurioista (Goldman-Rakic 1994; Goldman-Rakic 1996; Baddeley 2003). Useiden tutkimusten mukaan skitsofreniaa sairastavien ja heidän ei-sairastavien omaisten on huomattu suoriutuvat työmuistia mittaavista tehtävistä verrokkeja huonommin (Barch ym. 2003; Tuulio-Henriksson ym. 2003; Allen ym. 2009). Eräiden tutkimusten mukaan skitsofreniaa sairastavat kärsivät muun muassa ajatusten hajanaisuudesta sekä muisti- ja päättelytoimintojen heikkenemisestä nimenomaan työmuistin häiriöiden takia (Silver ym. 2003).

Tarkkaavaisuuden suuntaaminen ja ylläpitäminen on kykyä keskittää huomio tilanteen kannalta tärkeisiin kohteisiin (Posner ja Petersen 1990). Se on myös kykyä seuloa pois tarpeettomat ja häiritsevät ärsykkeet. Skitsofrenian taudinkuvaan kuuluu usein erilaisia tarkkaavaisuuden suuntaamisen ongelmia (Cornblatt ym. 1997; Laurent ym. 1999; Allen ym. 2009). Tarkkaavaisuus vaatii useiden aivoalueiden yhteistyötä (Fan ym. 2005). Tarkkaavaisuuden suuntaamista ja ylläpitämistä voidaan tutkia ns. pitkäkestoinen tehtävä -testillä (engl. continuous performance task, CPT) (Beck ym. 1956). Testissä koehenkilö suorittaa useita minuutteja kestäviä toistettuja tehtäviä, joissa tarkkaavaisuus tulee säilyttää koko testin ajan. Skitsofreniaa sairastavat suoriutuvat tästä testistä ja sen muunnoksista verrokeita heikommin (Earle-Boyer ym. 1991).

## 2.3 Neurobiologia

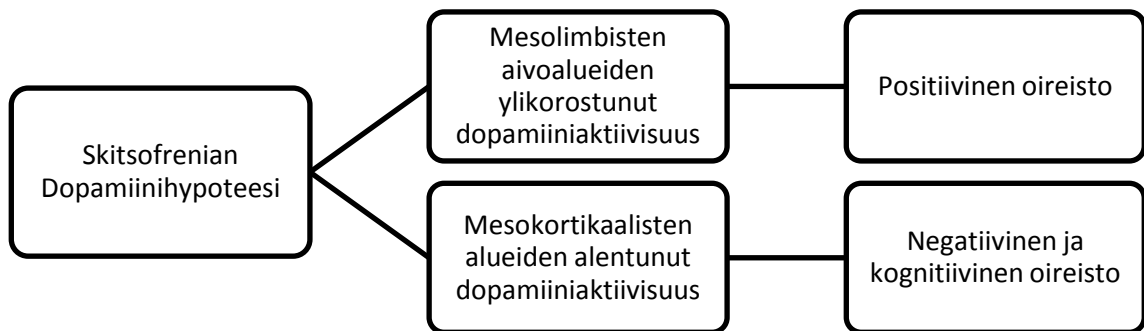
Skitsofrenian neurobiologiasta on esitetty useita hypoteeseja, koskien eri välittäjäainejärjestelmiä. Hypoteesit pyrkivät selittämään neurokemiallisesti, miten tauti kehittyy ja miksi sen oireet ilmenevät. Tässä työssä esitellään skitsofrenian dopamiini- ja glutamaattihypoteesit.

### 2.3.1 Dopamiinihypoteesi

Hallitsevin skitsofrenian välittäjäainejärjestelmiin liittyvistä hypoteeseista on dopamiinihypoteesi (van Rossum 1966). Yleisesti tämän teorian mukaan dopamiinin liiallinen aktiivisuus aiheuttaa taudin positiivisia oireita kuten harhaluuloja, aistiharhoja sekä ajatushäiriöitä, kun taas dopamiinin alhainen aktiivisuus saa aikaan taudin negatiivisen ja kognitiivisen oireiston.

Ensimmäinen farmakologinen dopamiinihypoteesia tukeva todiste oli havainto siitä, että psykostimulantit kuten amfetamiini ja kokaiini lisäävät dopamiinin pitoisuuksia synapsiraossa ja voivat aiheuttaa skitsofreniapsykoosin kaltaisen tilan (Snyder 1976). Stimulanttippsykoosia onkin usein pidetty mallipsykoosina paranoidiselle skitsofrenialle.

Amfetamiini ja muut stimulantit nostavat aivojen mesolimbisten alueiden dopamiinipitoisuutta, joten on ajateltu, että juuri mesolimbisten alueiden dopamiinin yliaktiivisuus aiheuttaisi taudin positiivisen oireiston (Kuva 1) (Meltzer ja Stahl 1976; Stahl 2007). Stimulantit eivät kuitenkaan aiheuta skitsofreniaa muistuttavaa tilaa ajattelun häiriöiden, kuulohallusinaatioiden ja negatiivisten- tai kognitiivisten oireiden osalta.



Kuva 1. Skitsofrenian oireiston mesolimbisen ja mesokortikaalinen dopamiinihypoteesi. Ylikorostuneen dopamiiniaktiivisuuden aivojen mesolimbisillä alueilla on ajateltu aiheuttavan skitsofrenian positiivisen oireiston. Aivojen mesokortikaalisten alueiden alentuneen dopamiiniaktiivisuuden uskotaan aiheuttavan taudin negatiiviset ja kognitiiviset oireet (Stahl 2007).

Dopamiinin tiedetään vaikuttavan useisiin eri aivotoimintoihin kuten tarkkaavaisuuteen, toiminnanohjaukseen ja mielihyvämekanismiin (Weinberger ym. 2001). Etuaivokuoren dopamiinitasojen tiedetään säätelevän kognitiivisia prosesseja ja käyttäytymistä (Goldman-Rakic ym. 2000). Näin ollen oletetaan dopamiinin liian alhaisen pitoisuuden mesokortikaalisilla aivoalueilla aiheuttavan skitsofrenian kognitiivisen ja negatiivisen oireiston (Kuva 1) (Davis ym. 1991; Goldman-Rakic ym. 2000; Stahl 2007). Havaintoja on tehty myös aivojen tyvitumakkeiden dopamiinin tuotannon vaihteluista taudinkuvan mukaan (Dao-Castellana ym. 1997; Hietala ym. 1999). Kvantamistutkimusten perusteella dopamiinin tuotto näillä alueilla olisi positiivisten oireiden ollessa vallalla suuri, mutta negatiivisten oireiden ollessa vallalla pieni. Tyvitumakkeet, eli basaaligangiot, sijaitsevat etuaivoissa. Niiden normaali toiminta on tärkeää esimerkiksi motoriikan ja oppimisen kannalta.

Tärkeä farmakologinen dopamiinihypoteesia tukeva havainto on, että kaikki skitsofrenian hoidossa yleisesti käytettävät antipsykootit salpaavat dopamiinin D2-reseptoreita (Creese ym. 1976; van Rossum 1966; Abi-Dargham ja Laruelle 2005). D2-reseptorisalpaus on välttämätöntä lääkeaineiden antipsykoottiselle vaikutukselle. Tyypilliset neuroleptit, kuten haloperidoli ja atyyppiset antipsykootit kuten klotsapiini, ovat tehokkaita varsinkin skitsofrenian positiivisten oireiden hoidossa (Davis ym. 2003). D2-reseptorisalpaus ei kuitenkaan yksin vaikuta taudin negatiiviseen oireistoon tai lievitä taudin kognitiivisia häiriöitä (Harvey ja Keefe 2001; Keefe ym. 2007). Atyypiset antipsykootit vaikuttavat huomattavasti tyypillisiä neuroleptejä voimakkaammin myös muihin välittäjäainejärjestelmiin kuin dopamiinijärjestelmään (Seeman 1990; Seeman 2002). Niillä on havaittu jonkinasteista positiivista tehoa myös taudin negatiiviseen ja kognitiiviseen oireistoon, joskin tulokset ovat ristiriitaisia (Keefe ym. 2007).

Dopamiinihypoteesille on pyritty löytämään myös geneettisiä todisteita. Dopamiinitasoja sääteleviä geenialueita onkin tutkittu paljon. COMT-entsyymi on dopamiinia metaboloiva entsyymi, joten sitä koodaavaa *COMT*-geeniä on tutkittu skitsofrenian perinnöllisyystutkimuksessa (Axelrod ja Tomchick 1958). *COMT* sijaitsee geenijaksossa, jonka häiriöiden tiedetään aiheuttavan skitsofrenian kaltaisia oireita (Roth ym. 2009).

### 2.3.2 Glutamaattihypoteesi

Glutamaatti on aivojen tärkein eksitatorinen eli kiihottava välittäjäaine (Cotman ja Iversen 1987). Sen vaikutukset välittyvät ionotrooppisten NMDA-, kainaat- ja AMPA- ( $\alpha$ -amino-3-hydroksi-5-metyyli-isoksatsoli-4-propionihappo), sekä metabotrooppisten mGluR1-8-reseptorien kautta (Conn ja Pin 1997; Dingledine ym. 1999).

Glutamaattineurotransmissio liittyy oleellisesti myös neurokognitiivisiin prosesseihin kuten oppimiseen ja muistiin (Riedel ym. 2003). Glutamaattia ja varsinkin NMDAR-toimintaa tarvitaan hermosolun pitkäkestoiseen vahvistumiseen (engl. long term

potentiation, LTP) (Collingridge 1987). LTP mahdollistaa uuden informaation ja opitun tallentumisen muistiin myöhempää käyttöä varten.

Yhteyden skitsofrenian ja glutamaatin välillä esitteli ensimmäisen kerran Kim (1980) tutkimusryhmineen. He havaitsivat skitsofreniapotilaiden selkädinnesteen glutamaattitasojen olevan alhaisemmat kuin terveillä verrokeilla. Jo ennen kuin glutamaatin tiedettiin olevan yksi aivojen välittäjäaineista, Luby ym. (1959) havaitsivat yksittäisten matalien fensyklidiini (engl. 1-(1-phenylcyclohexyl) piperidine, PCP) -annosten aiheuttavan skitsofrenian kaltaisen oireiston terveillä vapaaehtoisilla. Myöhemmin PCP:n, ja sen kaltaisten aineiden kuten ketamiinin, havaittiin salpaavan NMDAR:a (Thomson ym. 1985). NMDAR:en salpaus PCP:llä ja sen johdannaisella ketamiinilla aiheuttaa terveillä vapaaehtoisilla tilan, joka muistuttaa skitsofrenian positiivista ja negatiivista oireistoa sekä kognitiivisia häiriöitä (Javitt ja Zukin 1991; Krystal ym. 1994; Lahti ym. 1995; Adler ym. 1999). Myös skitsofreniaa sairastavien oireet voimistuvat matalan ketamiiniannoksen jälkeen (Lahti ym. 1995).

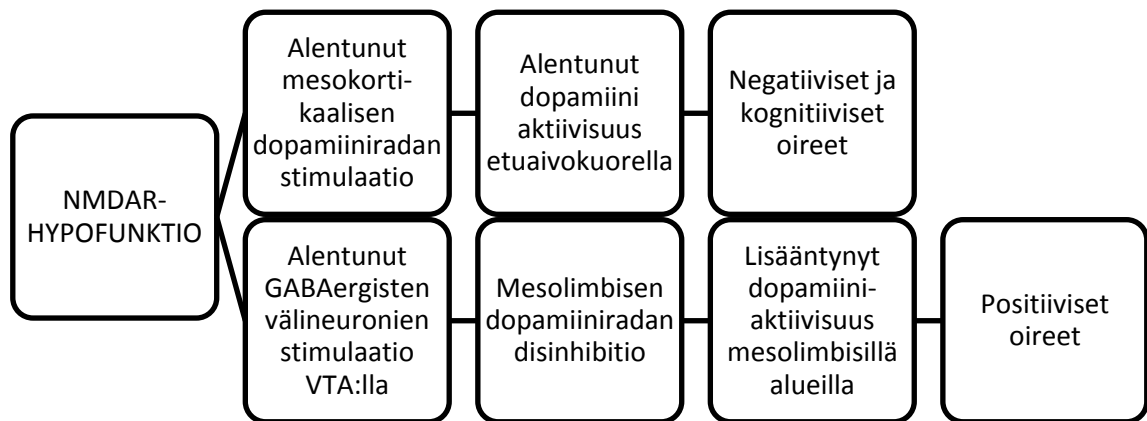
NMDAR:n salpauksen aiheuttama skitsofrenian kaltainen tila on saanut tutkijat päättämään NMDAR:en toimivan vaillinaisesti ja aiheuttavan näin skitsofrenian negatiivisen, positiivisen ja kognitiivisen oireiston (Olney ja Farber 1995; Olney ym. 1999). Tämä lähestymistapa on nimetty NMDAR-vajaatoimintahypoteesiksi. Ei kuitenkaan ole tiedossa miten tämä hypoteesi todellisuudessa ilmenee, vaikka teorioita onkin useita. Useissa hypoteeseissa on kuitenkin esitetty, että NMDAR:en vajaatoiminta olisi tärkeä tekijä skitsofrenian etiologiassa (Olney ja Farber 1995; Olney ym. 1999; Coyle 2006; Homayoun ja Moghaddam 2007; Stahl 2007).

Glutamaatti vaikuttaa useisiin eri välittäjäainejärjestelmiin. Se ei toimi ainoastaan suoraan eksitatorisena välittäjäaineena, vaan säätelee välillisesti neurotransmissiota saaden aikaan myös inhibitorisia vasteita (Olney ym. 1999). Glutamaatti aktivoi gamma-aminovoihappo- (GABA), serotonergisten tai noradrenergisten neuronien toimintaa, niissä sijaitsevien NMDAR:en välityksellä. Normaalisti näiden neuronien aktivaatio aiheuttaa estävän eli inhibitorisen vasteen eksitatorisiin hermoratoihin, jotka hermottavat neuroneita kortikaalisilla ja limbisillä aivoalueilla. Näillä alueilla sijaitsevat glutamatergiset neuronit säätelevät omaa toimintaansa inhibitoristen GABAergisten välineuronien välityksellä. NMDAR:n toimiessa vaillinaisesti, glutamaatin ylläpitämä



inhibitoristen hermosolujen aktivaatio estyy ja neuronien itsesääteily häiriintyy. Syntyy monimutkainen disinhibiatio, jossa eksitatoristen hermoratojen toiminta ei inhiboidu. Tämän mekanismin kautta NMDAR:en vajaatoiminta saattaa johtaa esimerkiksi limbisten ja kortikaalisten aivoalueiden tasapainon häiriintymiseen. Näiden aivoalueiden epätasapainotila saattaa selittää osittain skitsofrenian psykoottiset, negatiiviset ja kognitiiviset oireet (Olney ym. 1999; Coyle ym. 2010).

Dopamiini- ja glutamaattihypoteeseja on pyritty yhdistämään toisiinsa NMDAR- vajaatoimintateorian pohjalta (Kuva 2) (Goff ja Coyle 2001; Coyle ym. 2003; Stahl 2007). Laskevat glutamatergiset radat kulkevat aivokuoren pyramidineuroneista ventraalisella tegmentaalisella alueella (VTA) sijaitseviin GABAergisiin välineuroneihin. Normaalisti tämä laskeva glutamaattivälitteinen rata toimii jarruna mesolimbiselle dopamiiniradalle, GABAergisten inhibitoristen välineuronien välityksellä. Välineuroneissa sijaitsevien NMDAR:en toimiessa vaillinaisesti, niiden aktivaatio ei lisää GABA:n vapautumista. Välineuronin aktivaation alentuessa, GABA:n välittämä inhibiatio dopamiinineuronia kohtaan vähenee. Tätä kutsutaan disinhibitioksi. Disinhibiatio voisi selittää mesolimbisten alueiden dopamiiniaktiivisuuden nousua ja täten skitsofrenian positiivisen oireiston (Olney ja Farber 1995; Olney ym. 1999; Homayoun ja Moghaddam 2007; Stahl 2007). NMDAR, jotka säätelevät VTA:lla mesokortikaalisen radan dopamiinineuroneita, eksitoivat niitä suoraan. Dopaminergissä neuroneissa sijaitsevien NMDAR:en toimiessa vajaasti, glutamaatin välittämä eksitaatio dopamiinisoluja kohtaan vähenee ja dopamiiniaktiivisuus etuaivokuorella laskee. Tämä puolestaan voisi selittää skitsofrenian kognitiivista ja negatiivista oireistoa.



Kuva 2. Yksinkertaistettu kaavakuva NMDAR-vajaatoimintahypoteesin mahdollisesta yhteydestä dopamiinihypoteesiin ja skitsofrenian oireisiin (Coyle ym. 2003; Goff ja Coyle 2001; Stahl 2007).

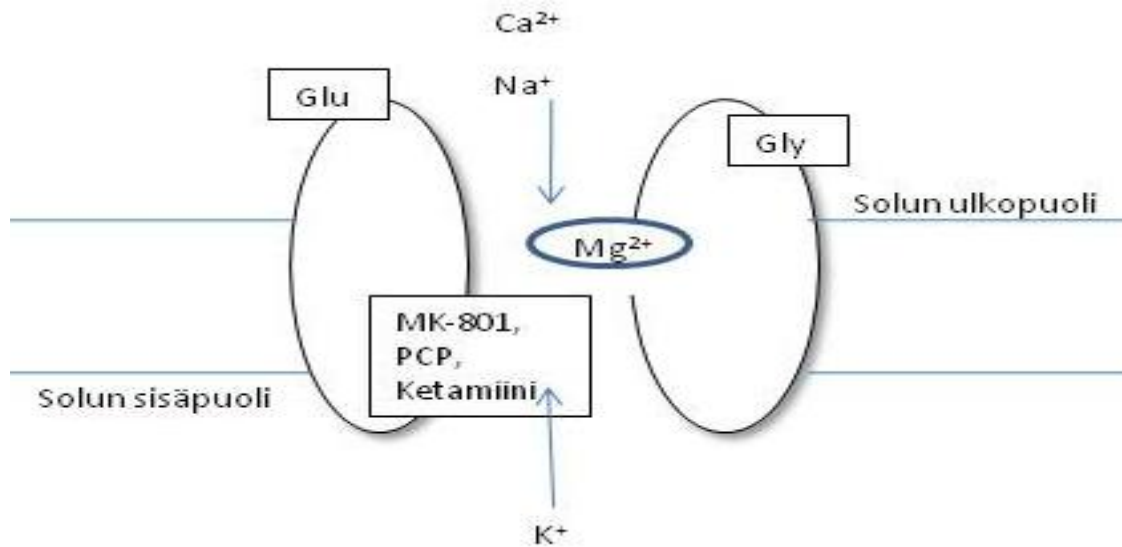
Osan skitsofrenialle altistavien geenien tiettyjen polymorfioiden tiedetään vaikuttavan glutamaattireseptoreiden toimintaan (Harrison ja Owen 2003). Yksi näistä geneistä on *NRG1*. Häiriöt tämän geenin toiminnassa vaikuttavat muun muassa NMDAR:en toimintaan ja ilmentymiseen (Stefansson ym. 2004). Myös skitsofreniapotilaiden aivojen *postmortem*-tutkimukset osoittavat muutoksia NMDAR-sitoutumisessa, transkriptiossa ja reseptorialayksiköiden proteiinirakenteessa varsinkin etuaivokuorella, talamuksessa ja hippokampuksessa (Clinton ja Meador-Woodruff 2004). Nämä havainnot tukevat glutamaatin merkitystä skitsofreniassa.

### 3 NMDAR-ANTAGONISTIT

NMDAR-antagonistien tiedetään aiheuttavan niin ihmisillä kuin eläimilläkin skitsofrenian oireiston kaltaisen tilan mukaan lukien taudin positiiviset, negatiiviset ja

kognitiiviset oireet (Javitt ja Zukin 1991; Krystal ym. 1994; Malhotra ym. 1996). Näiden aineiden on lisäksi havaittu aiheuttavan oireiden korostumista skitsofreniaa sairastavilla (Krystal ym. 1994; Lahti ym. 1995). Nykyisten skitsofreniassa käytettyjen atyyppisten antipsykoottien on havaittu osittain lievittävän NMDAR-salpaajien aikaansaamia oireita vapaaehtoisilla (Krystal ym. 1999). NMDAR-salpaajia käytetään eläinmalleissa jäljittelemään skitsofrenian oireistoa. Tutkimuksen suunnittelussa on pohdittava NMDAR-salpaajan valintaa ja käytetyn yhdisteen annostelua, jotta kyseinen farmakologinen manipulaatio kuvaisi mahdollisimman hyvin haluttua, mallinnettavaa skitsofrenian oiretta.

NMDAR:t välittävät glutamaatin vaikutuksia pääasiassa keskushermostossa. Ne ovat ligandikytkentäisiä, jänniteriippuvaisia ionikanavareseptoreita (Dingledine ym. 1999). Aktivoituakseen NMDAR vaatii glutamaatin sekä glysiinin sitoutumisen (Kuva 3) (Kleckner ja Dingledine 1988). Reseptorin toimintaa säätelee myös ionikanavan salpaava, jännitteestä riippuvainen magnesiumioni  $Mg^{2+}$ , joka solukalvon ollessa lepopotentiaalissa estää ionien virtausta reseptorin kanavan läpi (Dingledine ym. 1999). Presynaptisesta hermosolusta vapautuva glutamaatti aktivoi ensin AMPA-reseptorit, joiden läpi virtaavat Na-ionit depolarisoivat postsynaptisen membraanin niin että,  $Mg^{2+}$ -ioni irtoaa, ja  $Ca^{2+}$ - ja  $Na^{+}$ -ionit pääsevät virtaamaan NMDA-reseptorikanavan kautta soluun. NMDAR:en toiminta on tärkeää muistin ja oppimisen kannalta (Riedel ym. 2003). Näiden reseptoreiden toiminta on yhteydessä aivojen pitkäaikaisvahvistumiseen (LTP) ja sen muokkaamaan muistiin (Collingridge 1987).



Kuva 3. Yksinkertaistettu kaavakuva NMDAR:sta ja kilpailemattomien antagonistien sitoutumiskohdasta. Glu = glutamaatti, Gly = glysiini, PCP = fensyklidiini, MK-801 = ditsosilpiini.

### 3.1 Kilpailemattomat NMDAR-antagonistit

Kilpailemattomat NMDAR-antagonistit kuten ditsosilpiini (MK-801), PCP ja ketamiini kiinnittyvät NMDAR:n ionikanavaan, estäen ionien virtauksen soluun (Kuva 3) (Thomson ym. 1985; Wong ym. 1986). Näiden antagonistien toiminta on riippuvaista reseptoriaktivaatiosta eli ionikanavan tulee olla auki, jotta molekyyli voi kiinnittyä kanavaan (Dingledine ym. 1999). Koska kanavansalpaajat estävät ylimääräisen Ca<sup>2+</sup>-virtauksen soluun, on niillä päätelty olevan hermostoa suojaavia ominaisuuksia esimerkiksi aivohalvauksen tai epilepsia-kohtauksen yhteydessä (Lipton 1993). NMDAR-antagonisteilla on anesteettisia sekä kouristuskyynnystä nostavia vaikutuksia (Willetts ym. 1990). Näiden lääkeaineiden kuitenkin havaittiin aiheuttavan patologisia muutoksia aivokudoksessa, minkä takia niiden kliininen käyttö on pääasiassa lopetettu (Olney ym. 1989). Ketamiini on tästä poikkeus ja sitä käytetään edelleen anestesia-aineena sen lyhyestä puoliintumisajasta johtuen. Myös heikosti NMDAR:n inoikanavaan sitoutuvaa memantiinia käytetään Alzheimerin taudin hoidossa (Witt ym. 2004). MK-801 on erittäin potenti ja selektiivinen NMDR:a kohtaan, mutta se sitoutuu matalalla affiniteetillä myös muihin reseptoreihin, kuten sigma- ja nikotiinireseptoreihin sekä amiinitransporttereihin (Ramoja ym. 1990; Clarke ja Reuben 1995; Ault ja Werling

1999). MK-801:n puoliintumisaika plasmassa on lyhyt, mutta se sitoutuu ionikanavaan tiukasti, jolloin sen puoliintumisaika ionikanavassa on huomattavasti pidempi (Javitt ja Zukin 1989). PCP on vähemmän selektiivinen NMDAR:a kohtaan kuin MK-801. PCP:nkin tiedetään sitoutuvan myös muihin reseptorityyppeihin kuten sigmareseptoreihin,  $K^+$ -ionikanaviin, ja amiinitransporttereihin suuremmalla affiniteetillä kuin MK-801 (Lodge ja Johnson 1990). Verrattuna MK-801:een ja PCP:iin, ketamiinilla on vähiten affiniteetia NMDAR:ta kohtaan. Sen tiedetäänkin sitoutuvan NMDAR lisäksi myös opioidi-, muskariini- ja sigmareseptoreihin (Hustveit ym. 1995).

### 3.2 NMDAR-antagonistien akuutin ja toistetun annostelun erot

Jyrsijöillä PCP:n, ketamiinin ja MK-801:n akuutti annostelu aiheuttaa annosvasteisesti stereotyyppistä käytöstä, kuten lisääntynyttä motorista aktiivisuutta, pyörimistä, pään horisontaalista heiluttelua ja ataksiaa eli liikkeiden koordinaation häiriötä (Taulukko 1) (Tricklebank ym. 1989; Willetts ym. 1990). Annoksen kasvaessa ne aiheuttavat lopulta sedaation eli lamautumisen. Nämä oireet voivat vaikeuttaa eläinten suoriutumista esimerkiksi kognitiota mittaavista kokeista vaikuttamalla motoriseen suorituskykyyn. Eräässä tutkimuksessa Åhlander ym. (1999) tarkastelivat muunnellulla Morrisin vesisokkelotehtävän avulla aiheuttaako MK-801:n akuutti annostelu (0,01–0,1 mg/kg s.c. 30 min ennen koetta) työmuistin heikentymistä hiirillä. He tarkastelivat myös MK-801:n mahdollisesti aiheuttamia motorisia häiriöitä. Näitä häiriöitä arvioitiin kokeen alussa tarkastellun käyttäytymisen ja uintisuorituksen perusteella. He halusivat myös tarkastella voidaanko mahdollista työmuistin heikentymistä ja motorisia häiriöitä erottaa tässä testissä toisistaan. Tässä tutkimuksessa näitä kahta asiaa eli työmuistin häiriötä ja motorisia häiriöitä ei voitu erottaa toisistaan. Yksittäinen tutkimus ei kuitenkaan todista akuutin annostelun sopimattomuutta skitsofrenian kognitiivisten häiriöiden mallintamiseen. Tutkimuksen painoarvo onkin se, että NMDAR-antagonistien sivuvaikutusten takia tutkimuksen suunnittelussa annoksen, annosteluajankohdan ja annostelujakson pituuden valinta on tärkeää. Jos valitun annostelun tarkkaa vaikutusta käytettyyn eläinlajiin tai kantaan ei tunneta, mahdolliset

sivuvaikutukset on poissuljettava esikokeilla. Jos sivuvaikutusten epäillään vaikuttaneen testin suoritukseen, lisätutkimukset saattavat olla tarpeen systemaattisen virheen poissulkemiseksi.

Taulukko 1. Ei-kilpailevien NMDAR-antagonistien, PCP:n ja MK-801:n, aiheuttamien stereotyyppisten sivuvaikutusten annosvasteinen esiintyminen hiirillä (Tricklebank ym. 1989). MK-801 = ditsosilpiini, PCP = fensyklidiini. 0 = Ei havaittu eroa kontrolliryhmään; + = havaittiin ero, mutta ero kontrolliryhmään verrattuna ei ollut tilastollisesti merkitsevä. ++ = Havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero kontrolliryhmään ( $p < 0,05$ ).

Lääkeaine	Annos mg/kg i.v.	Päänliikkeet	Pyöriminen	Ataksia
MK-801	0,0625	+	0	0
	0,125	++	+	++
	0,25	++	+	++
	0,5	++	++	++
	1,0	++	++	++
PCP	0,3	0	0	0
	1,0	0	0	0
	2,0	0	0	0
	3,0	+	+	++
	10	++	++	++

Sekä toistettuna että akuutin NMDAR-salpaajan annostelun on osoitettu aiheuttavan eläimille useita skitsofreniaoireiden kaltaisia häiriöitä, vaikka annostelutavoilla onkin eroja. Taulukossa 2 on esitelty PCP:n kroonisen ja akuutin annostelun aiheuttamia vaikutuksia jyrksijöiden käyttäytymiseen. Sopivaa annostelua on pohdittu useissa katsauksissa, mutta päätelmät ovat ristiriitaisia (Jentsch ja Roth 1999; Manahan-Vaughan ym. 2008; Neill ym. 2010; Adell ym. 2011). Kognitiivisia oireita mallinnettaessa toistettu annostelu näyttää kuvastavan näitä häiriöitä akuuttia annostelua paremmin. Akuutin PCP:n tai ketamiinin annostelun on havaittu lisäävän etuaivokuoren dopaminergistä transmissiota jyrksijöillä (Verma ja Moghaddam 1996; Jentsch ym. 1997), kun taas toistettuna annostelun on osoitettu aiheuttavan alentunutta dopaminergistä

transmissiota etuaivojen alueella (Jentsch ym. 1997). Koska skitsofrenian kognitiivisten häiriöiden on ajateltu liittyvän alentuneeseen dopamiiniaktiivisuuteen etuaivojen alueella, voidaan olettaa toistetun annostelun kuvastavan skitsofrenian kognitiivista oireistoa akuuttia annostelua todenmukaisemmin (Davis ym. 1991; Jentsch ja Roth 1999). Akuutin annostelun on päätelty kuvaavan akuuttia psykoositilaa, kun taas toistettu annostelu näyttäisi kuvaavan paremmin skitsofrenian kaltaista kroonista oireistoa, niin kognitiivisen oireiston kuin neuropatologiainkin kannalta (Jentsch ym. 1997; Jentsch ym. 1998; Jentsch ja Roth 1999).

Taulukko 2. Akuutin ja toistetun PCP:n annostelun vaikutus jyrksijöiden käytökseen (Jentsch ja Roth 1999, muokattu).

<b>Vaikutus</b>	<b>Akuutti annostelu</b>		<b>Toistettu annostelu</b>	
Etuaivokuoren toiminta (Kognitio, oppiminen, muisti)	Häiriintyy	(Verma ja Moghaddam 1996)	Häiriintyy	(Jentsch ym. 1997)
Informaation suodatuskyky (P50, PPI)	Häiriintyy	(Geyer ym. 2001)	Häiriintyy	(Geyer ym. 2001; Egerton ym. 2008)
Motorinen toimintakyky	Häiriintyy	(Tricklebank ym. 1989)	Säilyy	(Jentsch ym. 1997)
Motivaatio	Häiriintyy	(Hoehn-Saric ym. 1991)	Säilyy	(Jentsch ym. 1997)
Lokomotoriikka (positiivinen oireisto)	Lisääntyy	(Steinpreis ja Salamone 1993)	Herkistyy erilaisille häiriötekijöille kuten stressille	(Jentsch ym. 1998)
Sosiaalinen käytös (negatiivinen oireisto)	Häiriintyy	(Sams-Dodd 1996)	Häiriintyy	(Sams-Dodd 1996)

Kaikki NMDAR-antagonistit eivät aiheuta samanlaisia kognitiivisia häiriöitä. Mahdollisesti erot näiden aineiden reseptorisitoutumisessa voivat vaikuttaa niiden indusoimiin eroihin kognitiossa (Seillier ja Giuffrida 2009). Seillierin ja Giuffridan tutkimuksessa tarkasteltiin aiheuttavatko MK-801 ja PCP samankaltaisia kognitiivisia häiriöitä rotilla kun niitä annostellaan toistetusti, toisiaan vastaavilla annoksilla (PCP 5 mg/kg ja MK-801 0,5 mg/kg kaksi kertaa päivässä, seitsemän vuorokauden ajan, testit suoritettiin 36 h viimeisen annoksen jälkeen). Tutkimuksessa tutkittiin työmuistia T-sokkelon avulla. Tulokset osoittivat, että PCP toistetusti annosteltuna heikensi rottien työmuistia. Vastaava annos MK-801:a ei aiheuttanut tilastollisesti merkitsevää heikentymistä työmuistiin. Tässä tutkimuksessa oletettiin juuri erojen lääkeaineiden reseptorisitoutumisessa vaikuttaneen havaittuun eroon. Tämän yksittäisen tutkimuksen perusteella ei kuitenkaan voida tehdä johtopäätöksiä NMDAR-antagonistien eroista. Voidaan myös epäillä olivatko tutkimuksessa käytetyt MK-801- ja PCP-annokset toisiaan vastaavia. Annosten vastaavuutta perusteltiin näiden aineiden IC<sub>50</sub>-arvoilla. Kuitenkin tutkimus osoittaa, että NMDAR-antagonistien välillä saattaa olla eroja niiden vaikutuksessa kognitioon. Näin ollen tutkimuksen suunnittelussa tärkeää ei ole pelkästään oikean annoksen tai annostelujakson pituuden valinta, vaan myös tutkimuksen kannalta oleellisen NMDAR-salpaajan valinta

#### 4 SKITSOFRENIAN KOGNITIIVISET ELÄINMALLIT

Skitsofreniaa, kuten muitakin ihmisille ominaisia psykiatrisia sairauksia, on vaikeaa mallintaa eläimillä kokonaisuutena. Eläinmallit kuvastavatkin yleensä vain yhtä taudin ominaispiirrettä. Jotta eläinmalli kuvaisi mahdollisimman luotettavasti tutkittavaa taudinkuvaa, tulisi sen muistuttaa taudin kliinistä tilaa niin etiologialtaan, patofysiologialtaan kuin myös geneettiseltä perustaltaan. Tällöin mallin rakenteellinen validiteetti on hyvä. Mallin tulee kuvata myös tutkittavan taudin käyttäytymisominaisuuksia, jolloin mallilla voidaan katsoa olevan hyvä tunnistettava validiteetti. Luotettava eläinmalli on myös herkkä tunnetuille, kliinisesti tehokkaille



farmakoterapioille ja samalla sen pitäisi myös pystyä ennustamaan uusien tuntemattomien farmakoterapioiden tehoa tai vastetta. Tätä ominaisuutta kutsutaan mallin ennustavaksi validiteetiksi.

#### 4.1 Informaation käsittelyyn perustuva eläinmalli

Skitsofrenian endofenotyyppeihin kuuluvat osa aivojen informaation prosessoinnissa tapahtuvista häiriöistä, kuten häiriöt aivojen hälysuodatuksessa (engl. prepulse inhibition, PPI) (Allen ym. 2009). Nämä häiriöt informaation prosessoinnissa yhdistetään usein kognitiivisiin häiriöihin (Turetsky ym. 2007). Kliinisesti PPI-testillä arvioidaan potilaan kykyä käsitellä tietoa tarkastelemalla henkilöiden reaktiota peräkkäisiin ääniin. PPI on usein heikentynyt skitsofreniaa sairastavilla ja heidän terveillä sukulaisillaan (Braff ym. 1978; Kumari ym. 2005). Hiljaisempi esiääniärsyke ei vaikuta siihen miten skitsofreniapotilaiden aivot käsittelevät sitä pian seuraavaa voimakkaampaa sensorista ärsykettä, mikä viittaa kyvyttömyyteen suodattaa tietoa. Terveillä yksilöillä ensimmäistä ääntä seuraava ääni aiheuttaa heikentyneen reaktion, kun taas skitsofreniaa sairastavilla reaktio ei heikkene. PPI on siis skitsofreniaa sairastavilla heikentynyt. Ihmisillä PPI:n vasteena mitataan yleensä silmien räpsähdysrefleksiä.

Eläimillä PPI-testi toteutetaan äänikammiossa. Ensin eläin totutetaan koeympäristöön, minkä jälkeen se altistetaan ennakkoäänelle. Ennakkoääntä seuraa noin 30–300 ms kuluttua hieman voimakkaampi testiääni. Testissä mitataan eläimen hätkähdysrefleksin fyysisen vasteen voimakkuutta testiääneen. Tulosta verrataan hätkähdysrefleksiin silloin, kun eläin altistetaan testiäänelle ilman ensimmäistä ennakkoääntä. Vasteen voimakkuutta mitataan yleensä anturin avulla. Geyer ym. (2001) ovat koonneet kattavan katsauksen NMDAR-antagonistien vaikutuksesta rottien PPI:een. Lähes kaikki tulokset ovat samansuuntaisia; NMDAR-antagonistien, varsinkin PCP:n (0,1–10 mg/kg) ja MK-801:n (0,05–3,0 mg/kg) akuuttiannostelu heikensi PPI:ta rotilla. Tyypilliset antipsykootit eivät lievitä NMDAR-salpaajien aiheuttamaa PPI:n heikentymistä (Geyer ym. 2001), kun taas osan atyyppisten antipsykoottien, kuten klotsapiinin, on havaittu vähentävän PPI:en heikentymistä. PPI-testin rakenteellinen ja kuvaava validiteetti ovat

vahvoja, minkä lisäksi sillä näyttää olevan myös jonkinasteista ennustavaa validiteettia. Eläinmallina PPI on helposti toteutettava, toistettava ja lähes automatisoitavissa. Sitä ei kuitenkaan voida pitää suoranaisena kognitiivisena eläinmallina.

## 4.2 Työmuistin mallit

Työmuistin häiriöiden tiedetään kuuluvan osana skitsofrenian kognitiivisiin oireisiin (Goldman-Rakic 1994; Saperstein ym. 2006). Näitä häiriöitä voidaan pitää myös yhtenä skitsofrenian endofenotyypinä (Saperstein ym. 2006). Lyhytkestoisen työmuistin tiedetään olevan riippuvaista etuivokuoren toiminnasta (Goldman-Rakic 1996). Eläimillä työmuistia mallinnetaan esimerkiksi uusien esineiden tunnistamistestillä, erilaisilla sokkelotehtävillä ja näiden muunnoksilla.

### 4.2.1 Uusien esineiden tunnistamistesti

Uusien esineiden tunnistamistestin (engl. novel object recognition, NOR) katsotaan mittaavan eläimen visuaalista lyhytkestoista työmuistia. Se ei perustu palkitsemiseen vaan eläimen luontaiseen taipumukseen kiinnittää huomionsa uusiin asioihin elinympäristössään. Testissä tarkastellaan eläimen käyttäytymisen eroa aikaisemmin esitetyn objektin ja uusien objektien välillä. Ennaceur ja Delacour (1988) kehittivät NOR-testin jyrksijöille. Testi voidaan toteuttaa esimerkiksi siten, että koealueelle asetetaan kolme erilaista esinettä, joita eläimen annetaan tutkia. Esineet poistetaan hetken kuluttua, ja tilalle asetetaan kaksi esinettä, joista yksi on eläimelle uusi ja yksi jo aikaisemmin esitelty. Testissä voidaan vaihdella aikaa esineiden ensimmäisen ja toisen esittelykerran välillä. Työmuistia arvioitaessa väliaika on yleensä muutamia minuutteja. Testissä mitataan tutkintakertojen suhdetta, jonka eläin viettää tutun esineen parissa verrattuna uuteen esineeseen.

NMDAR-antagonistien on osoitettu useissa tutkimuksissa heikentävän jyrksijöiden työmuistia NOR-testillä arvioituna (Young ym. 2009; Neill ym. 2010). Esimerkiksi PCP:n toistettu annostelu (2 mg/kg kaksi kertaa päivässä, seitsemän vuorokauden ajan,

seitsemän vuorokauden lääkkeetön jakso ennen koetta) rotille aiheutti selvästi havaittavan työmuistin häiriön NOR-testissä (Grayson ym. 2007). Rotat eivät enää tunnistanee uuden ja tutun esineen eroa. PCP:n aiheuttamaa kognitiivista heikentymistä voitiin vähentää annostelemalla rotille atyyppisiä antipsykootteja, kuten klotsapiiniä (Grayson ym. 2007). Tyypilliset neuroleptit, kuten haloperidoli, eivät kuitenkaan vähentäneet PCP:n vaikutusta. Samansuuntaisia tuloksia on saatu hiirillä annosteltaessa PCP:ä toistetusti (10 mg/kg kerran päivässä, 10 vuorokauden ajan) (Hashimoto ym. 2005). Tässäkin tutkimuksessa klotsapiini vähensi PCP:n aiheuttamaa kognitiivista häiriötä, kun taas haloperidoli ei. NOR-testi on siis jyrksijöillä herkkä NMDAR-salpaajien aiheuttamille häiriöille. Koska NMDAR-antagonistien indusoima työmuistin heikentyminen on poistettavissa nykyisillä skitsofrenian farmakoterapioilla, varsinkin atyyppisillä neurolepteilla, voidaan mallin validiteettia pitää ennustavana. Mallin heikkous on kuitenkin se, että sitä ei voida suorittaa eläimillä toistetusti vain ainoastaan kerran tai kaksi eläintä kohden. Kaiken kaikkiaan NOR-testiä voidaan pitää hyvänä koe-eläinmallina skitsofrenian kognitiivisten työmuistin häiriöiden mallintamiseen.

#### 4.2.2 Sokkelotestit

Sokkelotehtävillä voidaan mitata spatiaalista, eli paikkaan liittyvää, lyhytkestoista työmuistia eläimillä. Sokkelotesteissä jyrksijän oletetaan muistavan tietty paikka tai paikat ja osoittavan se lähestymällä tai välttämällä kyseisiä sokkelon osia. Usein testeissä koesokkeloon on piilotettu yksi tai useita ruokapalkintoja. Eläimen tulee muistaa joko vihjeiden avulla tai ilman niitä, missä palkinto oli. Testit perustuvat jyrksijöiden luontaiseen mieltymykseen tutkia ja etsiä ruokaa sokkeloisista kapeista paikoista (Dudchenko 2004). Yleisimmin käytettyjä sokkelotestejä ovat säteittäinen sokkelo (engl. radial arm maze, RAM), T-sokkelo (engl. T-maze, TM) ja Y-sokkelo (engl. Y-maze, YM). Testi voi perustua eläimen spontaaniin vuorottelutaipumukseen tai vahvistuksena käytetään ruokapalkkiota. RAM-testissä käytetään usein kahdeksansakaraista sokkeloa, jossa ruokapalkinto asetetaan jokaisen sakaran päähän (Olton ja Werz 1978). Testi päättyy kun eläin on käynyt jokaisessa sakarassa ja löytänyt kaikki palkinnot. Testissä mitataan yleensä kertoja, kuinka usein eläin menee uuteen

sakaraan. Jotta eläin suorittaisi tehtävän virheettömästi, sen tulisi käydä jokaisessa sokkelon osassa vain kerran. Jos eläin menee jo käymiinsä sakaroihin, voidaan eläimen työmuistin tulkita heikentyneen.

NMDAR-antagonistien vaikutusta erilaisten työmuistia mittaavissa tehtävissä suoriutumiseen on tutkittu paljon. Riippuen käytetystä NMDAR-antagonistista, annoksesta, annostelutavasta ja suoritettavasta sokkelotehtävästä tulokset ovat olleet ristiriitaisia (Brosnan-Watters ym. 1996; Young ym. 2009). Esimerkiksi RAM-testillä mitattuna PCP:n kroonisen tai akuutin annostelun ei havaittu aiheuttavan häiriöitä rottien työmuistiin (Li ym. 2003). MK-801:n akuutin annostelun on kuitenkin havaittu heikentävän rottien suoriutumista RAM-testissä (Carboni ym. 2004; Marcus ym. 2005). Atyyppisen antipsykootti klotsapiinin on osoitettu estävän NMDAR-salpaajan indusoima työmuistin häiriö (Carboni ym. 2004; Marcus ym. 2005; Young ym. 2009). Sokkelotehtävien suorittaminen näyttää jyrksijöillä vaativan etuaivolohkojen sekä hippokampuksen yhteistyötä kun taas ihmisillä vastaavat lyhytkestoiset spatiaalista työmuistia mittaavat tehtävät riippuvat otsa- ja etuaivolohkojen toiminnasta (Young ym. 2009). Nämä erot eivät tue mallin rakenteellista validiteettia ja voivat vaikuttaa myös mallin ennustavaan validiteettiin. Sokkelotehtäviä on hyvin erilaisia ja niiden tuloksia on vaikea verrata toisiinsa. Sokkelotehtävillä näyttää siis olevan jonkin verran ennustavaa validiteettia, mutta ne eivät kuitenkaan muilta validiteeteiltään kohtaa skitsofrenian taudinkuvaa. Edelleen tarvitaankin lisää tutkimusta siitä, miten sokkelotehtävät kuvaavat skitsofrenian oireistoa mallinnettaessa niitä NMDAR-salpaajien avulla.

#### 4.3 Tarkkaavaisuuden ja kognitiivisen joustavuuden eläinmallit

Skitsofreniaa sairastavilla tarkkaavaisuuden ylläpitäminen ja kognitiivinen joustavuus ovat usein häiriintyneet (Laurent ym. 1999; Hughes ym. 2003). Näitä kognition osalueita voidaan tutkia kliinisesti esimerkiksi CPT- ja WCST-testien avulla (Beck ym. 1956; Grant ja Berg 1948). Eläimillä tarkkaavaisuuden ylläpitämistä ja kognitiivista joustavuutta voidaan tutkia ns. 5 choice serial reaction time -testillä (5CSRTT), joka

vastaa osittain ihmisten CPT-testiä, tai ns. attentional set shifting-testillä (ASST), joka vastaa kliinistä WSCT-testiä (Birrell ja Brown 2000; Young ym. 2009).

#### 4.3.1 Tarkkaavaisuuden ylläpitämisen testi

5CSRTT-testi on suunniteltu rotille, mutta sitä on muokattu soveltuvaksi myös hiirille (Carli ym. 1983; Humby ym. 1999). 5CSRTT-testissä eläin asetetaan koelaitteistoon, jossa se pystyy seuraamaan viittä seinässä toisistaan erillään olevaa reikää. Reikiin voi syttyä valo missä järjestyksessä tahansa. Ruokapalkinnon avulla eläin opetetaan painamaan nenällään reikää valon syttyä. Kokeen suorittamiseksi eläimen tulee säilyttää tarkkaavaisuutensa ja osata kohdistaa se useaan kohteeseen yhtä aikaa. Sen tulee myös kyetä vaihtamaan tarkkaavaisuutensa kohdetta reikien välillä. Saadakseen ruokapalkinnon eläimen tulee painaa oikeaa reikää lyhyen ajan kuluessa. Eläimen tehdessä väärän valinnan palkintoa ei tule. Väärä valinta osoitetaan lyhyellä katkolla, jolloin esimerkiksi koelaitteiston valo muuttuu. Vääriksi valinnoiksi tai epäonnistuneiksi yrityksiksi lasketaan ylimääräiset painallukset katkon aikana, ennenaikaiset painallukset ennen valon syyttymistä ja jatkuvat eli perseveratiiviset painallukset oikean valinnan jälkeen. Kokeessa tarkastellaan myös aikaa, joka kuluu valon syttyä oikean tai väärän painalluksen tekemiseen.

Parhaiten tarkkaavaisuutta kuvaava parametri on valintojen tarkkuus, eli oikeiden valintojen prosenttiosuus kaikista painalluksista. Tämä parametri on herkkä testin häiriöille, kuten sedaatiolle, liikeaktiivisuuden häiriöille tai motivaation puuttumiselle. Perseveratiivisten painallusten ajatellaan kuvaavan kognitiivista joustamattomuutta koska se kuvaa perseveratiivista taipumusta pitäytyä alun pitäen palkitussa käytöksessä, vaikka palkkiota ei enää tule (Amitai ja Markou 2010). Perseveraatiotaipumus on kognitiivisen joustavuuden erään osa-alueen häiriö, jota esiintyy skitsofreniaa sairastavilla (Fey 1951).

NMDAR-antagonisten kuten PCP:n ja MK-801:n akuutin ja toistetun annostelun on havaittu vaikeuttavan testin suorittamista rotilla (Taulukko 3). Atyyppisten antipsykoottien, kuten klotsapiinin, on osoitettu vähentävän NMDAR-antagonistien indusoimaa heikentymistä testin suorittamisessa (Amitai ym. 2007; Paine ja Carlezon 2009). Näin ollen 5CSRTT voi tarjota hyvän mallin skitsofrenian kognitiivisten

häiriöiden, kuten tarkkaavaisuuden ylläpitämisen ja kognitiivisen joustavuuden mallintamiseksi. Testin heikkoutena ovat sen vaatima erityinen testilaitteisto ja pitkät harjoittelujaksot ennen testin suorittamista. Mallissa yhdistyvät ennustava, tunnistettava ja rakenteellinen validiteetti.

Taulukko 3. NMDAR-antagonistien annostelun vaikutus rottien tarkkaavaisuuteen ja kognitiiviseen joustavuuteen ns. 5 choice serial reaction time (5CSRTT) -testissä. + = vaikutusta, 0 = ei vaikutusta, – = ominaisuutta ei tutkittu. PCP = fensykliidiini, MK-801 = ditsosilpiini ( $p < 0,05$ ).

<b>NMDAR-antagonisti</b>	<b>Annos</b>	<b>Akuutti / toistettu</b>	<b>Alentunut tarkkuus (Häiriö tarkkaavaisuudessa)</b>	<b>Lisääntyneet l. perseveratiiviset painallukset (Kognitiivinen joustamattomuus)</b>	<b>Viite</b>
PCP	1–2,5 mg/kg	Akuutti	+	–	(Auclair ym. 2009)
	1,5; 2,25; ja 3 mg/kg	Akuutti	+	0	(Amitai ym. 2007)
	2 mg/kg s.c.	Toistettu 7 vrk ajan	+	0	(Amitai ym. 2007)
MK-801	0,05–0,06 mg/kg	Akuutti	+	+	(Grottick ja Higgins 2000)
	≤ 0,03 mg/kg	Akuutti	0	+	(Higgins ym. 2003)
	0,25 mg/kg	Akuutti	+	–	(Paine ym. 2007)
	0,5 mg/kg	Toistettu	+	–	(Higgins ym. 2003; Paine ja Carlezon 2009)

#### 4.3.2 Kognitiivista joustavuutta mittaava testi

ASST on kognitiivinen eläinmalli, jonka avulla voidaan tutkia eläimen kognitiivista joustavuutta: kykyä muodostaa sääntöjä ja vaihtaa niitä tarvittaessa. Kliinisesti vastaava testi on WCST. Rotille ASST:n kehittivät Birrell ja Brown (2000) Myöhemmin testi on muokattu myös hiirille (Bissonette ym. 2008; Colacicco ym. 2002). ASST:ä pidetään yhtenä mahdollisena eläinmallina kuvaamaan skitsofreniassa esiintyviä kognitiivisia häiriöitä (Young ym. 2009). ASST koostuu erilaisista tehtävistä, joiden avulla voidaan tutkia kognitiivisen joustavuuden eri osa-alueita (Bushnell ja Strupp 2009). Nämä kognitiiviset osa-alueet ovat riippuvaisia jyrsijöiden etuaivokuoren eri alueiden toiminnasta (Birrell ja Brown 2000; Bissonette ym. 2008; Floresco ym. 2009). ASST:ssä käytetään hyväksi jyrsijöiden luontaista taipumusta etsiä ruokaa kaivamalla. Eläimet opetetaan etsimään ruokapalkkiota kaivuukupeista erilaisten vihjeiden perusteella. Eläimen tulee muodostaa itselleen sääntö siitä, minkä määritteen sisältämien vihjeiden avulla palkinto löytyy. Ruokapalkinto toimii vahvisteena säännön oppimiselle. ASST kokeessa käytettävät määritteet ovat haju, kaivuumateriaali ja kaivuukupin materiaali (Birrell ja Brown 2000). Hiirillä testi toteutetaan yleensä vain kahden määritteen, hajun ja kaivuumateriaalin avulla (Colacicco ym. 2002).

Testin ensimmäinen koevaihe on yksinkertainen erottelukoe (engl. simple discrimination, SD), jossa hiirelle esitellään kaksi kuppia, joissa kummassakin on esimerkiksi sama kaivuumateriaali mutta eri hajut (haju 1, haju 2). Haju 1 merkitsee palkintoa ja haju 2 ”ei palkintoa”. Seuraavaksi suoritetaan monimuotoinen erottelukoe (engl. compound discrimination, CD), jossa kaivuukupeissa on kaksi eri kaivuumateriaalia (materiaali 1, materiaali 2) sekä edellisessä koevaiheessa esitellyt kaksi hajua (haju 1, haju 2). Kumpikin kuppi on varustettuna eri kaivuumateriaaleilla ja eri hajulla. Edellisessä koevaiheessa palkintoa merkinnyt haju 1 merkitsee edelleen palkintoa mutta hiiren tulee olla huomioimatta kokeen toista määritettä eli kaivuumateriaalia. Määritteiden sisäisissä vaihdoksissa (engl. intradimensional shift, ID) tärkeä, oleellinen määrite (esim. haju) pysyy samana mutta vihjeet määritteiden sisällä muuttuvat (esim. haju 3: palkinto, haju 4: ”ei palkintoa”). Eläimen tulee muodostaa sääntö siitä, minkä määritteen avulla palkinto löytyy, huolimatta muuttuvista vihjeistä määritteen sisällä. Jos eläin pystyy muodostamaan säännön oikeasta

määritteestä, eläin ns. muodostaa säännön tarkkaavaisuuden kohteesta (engl. attentional set). Määritteiden ulkoisessa vaihdoksessa (engl. extradimensional shift, ED) oleellinen määrite muuttuu. Eläimen täytyy kyetä siirtämään tarkkaavaisuuteensa aikaisemmin oleellisesta määritteestä toiseen, ennen epäoleelliseen määritteeseen (esimerkiksi hajusta kaivuumateriaaliin). Tätä kykyä pystyy muuttamaan tarkkaavaisuuden kohdetta määritteiden välillä kutsutaan tarkkaavaisuuden muutoskyvyksi (engl. set shifting ability). ID-vaihdosten aikana eläin muodostaa säännön tarkkaavaisuuden kohteesta. ED-vaihdoksessa eläin muuttaa tämän tarkkaavaisuuden kohteen määritteiden välillä ja muodostaa uuden säännön palkkion löytämiseksi. Käänteisessä vaihdoksessa (engl. intradimensional reversal, IDR) aikaisemmin opittu määrite pysyy samana mutta sen sisältämä oikea vihje muuttuu vääräksi ja päinvastoin (aiemmin haju 1 on merkinnyt palkintoa ja haju 2 ”ei palkintoa”, nyt päinvastoin eli haju 1 ”ei palkintoa” ja haju 2 palkinto). Käänteisten koevaiheiden avulla voidaan mitata perseveratiivista taipumusta eli taipumusta pitäytyä alun pitäen palkitussa käytöksessä, vaikka palkintoa ei enää tule. Eläin siirtyy tehtävästä toiseen aina kun se on tehnyt ennalta määrätyn lukumäärän oikeita valintoja. Valintansa se osoittaa kaivamalla. Testissä mitattavat parametrit ovat yleensä: aika, joka kuluu siihen kunnes eläin tekee valintansa ja alkaa kaivaa, etsintäkertojen lukumäärä ja virheellisten valintojen lukumäärä ennen kuin eläin saavuttaa vaadittavan määrän oikeita valintoja.

Kun halutaan tutkia eläimen kykyä muuttaa tarkkaavaisuuden kohdetta, eläimen ED-vaihdon suoritusta verrataan tätä edeltävään ID-vaihdoon. Mikäli havaitaan tilastollinen ero etsintäkertojen tai virheiden lisääntymisenä, on eläin muodostanut säännön tarkkaavaisuuden kohteesta. Samalla eläin on osoittanut, että se pystyy myös muuttamaan kyseisen säännön. Kognitiivisen joustavuuden häiriöissä ED-vaihdon suorittaminen vaikeutuu verrattuna kontrolliryhmään. Leesiotutkimusten perusteella rotilla ja hiirillä säännön muodostamis- ja muuttamiskyky on riippuvaista mediaalisen etuaivokuoren toiminnasta (Birrell ja Brown 2000; Bissonette ym. 2008). Perseveraatiotaipumus puolestaan lisääntyy leesioiden sijaitessa orbitofrontaalisen aivokuorella ja se havaitaan heikentyneenä suorituksena testin käänteisissä koevaiheissa verrattuna leesioimattomiin eläimiin (Birrell ja Brown 2000; Bissonette ym. 2008). Tämä pätee myös ihmisiin. Käänteisten koevaiheiden ja määritteiden sisäisten ja



ulkoisten vaihdosten on todettu olevan riippuvaisia etuaivokuoren eri osien toiminnasta (Pantelis ym. 1999; Rogers ym. 2000).

NMDAR-antagonistien on havaittu heikentävän testin ED-vaihetta rotilla (Taulukko 4) (Egerton ym. 2005; Rodefer ym. 2005; Egerton ym. 2008; McLean ym. 2008; Goetghebeur ja Dias 2009). Myöhemmin kaksi tutkimusryhmää on saanut samansuuntaisia tuloksia myös hiirillä (Laurent ja Podhorna 2004; Kos ym. 2010). Laurentin ja Podhornan tulos ei kuitenkaan ole luotettava, koska tässä tutkimuksessa kontrolliryhmän hiirillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa ID- ja ED-vaihdosten välillä. Joidenkin antipsykoottien, kuten risperidonin ja klotsapiinin, mutta ei haloperidolin, on osoitettu lievittävän NMDAR-antagonistien indusoimia häiriöitä tämän testin suorittamisessa rotilla (McLean ym. 2008; Goetghebeur ja Dias 2009). Samansuuntaisia tuloksia on saatu hiirillä käytettäessä atyyppistä antipsykoottia, sertindolea (Kos ym. 2010).

Taulukko 4. PCP:n ja ketamiinin vaikutus ns. attentional set shifting -testin (ASST) ED (extradimensional shift) -vaihdokseen hiirillä ja rotilla. ED-vaihdoksen heikentyminen ID (intradimensional shift) -vaihdokseen nähden kontrolliryhmään verrattuna kuvaa NMDAR-antagonistin aiheuttamaa häiriötä kognitiivisessa joustavuudessa. + = Tilastollisesti merkitsevä ero ( $p < 0,05$ ). - = ei tilastollisesti merkitsevää eroa. \* = PCP heikensi suoritusta, mutta kontrolliryhmällä ei havaittu tilastollista eroa.

NMDAR-antagonisti	Annos i.p.	Akuutti/toistettu	ED-vaihdos heikentynyt ID-vaihdokseen verrattuna	Eläinlaji ja sukupuoli	Viite
PCP	2 mg/kg	Toistettu 2x vrk 7vrk ajan, +7vrk tauko	+	Rotta ♀, Hooded- Lister	(McLean ym. 2008)
PCP	5 mg/kg	Toistettu 2x vrk 7vrk ajan, +10vrk tauko	+	Rotta ♂, Long Evans	(Rodefer ym. 2005)
PCP	2,6 mg/kg.	Akuutti	+	Rotta ♂, Long Evans	(Egerton ym. 2005)
PCP	2,6 mg/kg	Toistettu/ajoittainen 1x vrk 5vrk ajan, sitten joka 2. vrk 1 kk ajan	+	Rotta ♂, Long Evans	(Egerton ym. 2005; Egerton ym. 2008)
PCP	5 mg/kg	Toistettu 1x vrk 7vrk ajan, + 7vrk tauko	+	Rotta ♂, Hooded- Lister	(Goetghebeur ja Dias 2009)
Ketamiini	10 mg/kg	Kerta-annos 50 min, 3 h, 24 h ennen koetta	+ - -	Hiiri ♂, C57Bl/6J	(Kos ym. 2010)
Ketamiini	20 mg/kg	Kerta-annos 50min, 3h, 24h ennen koetta	+ - -	Hiiri ♂, C57Bl/6J	(Kos ym. 2010)
PCP	0,63 mg/kg	Toistettu 1x vrk 10vrk ajan, kokeen kuluessa	-	Hiiri ♂, C57Bl/6J	(Laurent ym. 2004)
PCP	1,3 mg/kg	Toistettu 1x vrk 10vrk ajan, kokeen kuluessa	+*	Hiiri ♂, C57Bl/6J	(Laurent ym. 2004)

On havaittu, että hiirten on vaikeampi muodostaa sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta kuin rottien (Garner ym. 2006; Bissonette ym. 2008). Onkin epäilty pystyvätkö hiiret ylipäättään muodostamaan luotettavasti sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta. Joidenkin tutkimusten perusteella tämä on kuitenkin mahdollista (Garner ym. 2006; Bissonette ym. 2008; Papaleo ym. 2008; Kos ym. 2010). Hiirille ei ole ASST:ssä vakiintunutta koejärjestelyä (Taulukko 5). Testin suorittamisessa hiirillä on ollut vaikeaa määrittää, miten testin eri tehtävien lukumäärä ja niiden sijoittaminen testin eri vaiheisiin vaikuttavat hiirten kykyyn muodostaa sääntö tarkkaavaisuuden kohteesta. Kaikkien onnistuneiden tutkimusten koeasetelmissa on ollut yhteistä: vähintään kuusi koevaihetta ennen ED-vaihdosta, joista vähintään yksi on ollut käännteinen koevaihe, sekä kriteerinä kahdeksan peräkkäistä tai kahdeksan oikeaa valintaa kymmenestä (8/10).

Koejärjestelyn merkitystä tarkastellaan tämän erikoistyön kokeellisessa osassa. Tällä hetkellä ASST:n voidaan katsoa tarjoavan mielenkiintoisen ja hyväksyttävän mallin kognitiivisen joustavuuden mallintamiseksi, ainakin rotilla. Rotilla suoritettuna ASST:llä näyttää olevan niin ennustavaa, rakenteellista kuin tunnistettavaakin validiteettiä. Nähtäväksi jää onko tämä eläinmalli muokattavissa luotettavaksi myös hiirille.

Taulukko 5. Eri tutkimuksissa käytettyjen ASST-koejärjestelyiden vertailua. K = kriteeri.

Hiirikanta ja sukupuoli	Käänteisten erottelutehtävien lkm ennen ED-vaihdosta	ED-vaihdosta edeltävien tehtävien lkm	ID-vaihdosten lkm	Testin sisältämät tehtävien toistot	K	Tilastoll. merk. ID/ED- ero	Viite
DR2 knockout C57 ja villityyppi ♂	0	3	1	Ei	6	–	(DeSteno ja Schmauss 2008)
DR2 /DR3 knockout C57 ja villityyppi ♂	1	4	1	Ei	6	–	(Glickstein 2005)
129/SvEv, C57, näiden F1-jälkeläiset ♂	1	6	1	Ei	6	–	(Colacicco ym. 2002)
C57 ♂	2	8	1	Kyllä	6	– Kontrolli + PCP (1,3mg/kg)	(Laurent ja Podhorna 2004)
Comt-val-tg C57 Controls ♂	3	7	2	Ei	8/10	+	(Papaleo ym. 2008)
C57 ♂	3	7	2	Ei	8/10	+	(Kos ym. 2010)
C57 ♂♀	2	6	1	Kyllä	8/10	+	(Garner ym. 2006)
C57 ♂	1-2	7	4-6	Kyllä	8	+	(Bissonette ym. 2008)

## 5 YHTEENVETO

Nykyiset skitsofrenian hoidossa käytettävät farmakoterapiat eivät luotettavasti lievitä taudin kognitiivisia häiriöitä eivätkä tältä osin paranna skitsofreniaa sairastavien elämänlaatua (Keefe ym. 1999; Keefe ym. 2007). Uusien lääkeinnovaatioiden kehittämiseksi tarvitaan lisää tietoa skitsofrenian kognitiivisten häiriöiden taustalla olevista neurobiologisista mekanismeista. Luotettavien ja validien kognitiivisten eläinmallien avulla näitä mekanismeja voidaan ymmärtää paremmin. NMDAR-antagonistit näyttävät tarjoavan hyvän menetelmän skitsofrenian kognitiivisten häiriöiden farmakologiseen mallintamiseen eläimillä. NMDAR-antagonistien annostelun erojen vaikutuksista niiden indusoimiin kognition häiriöihin on tehty jonkin verran yhteenvetotutkimuksia. Toistetun annostelun katsotaan kuvaavan skitsofrenian kognitiivista oireistoa akuuttia annostelua paremmin. Toistettu annostelu mahdollistaa myös lääkkeettömän jakson ennen koetta, jolloin NMDAR-antagonistien mahdolliset stereotyyppiset, motoriset ja sedatoivat vaikutukset eivät vaikuta kokeen motoriseen suorittamiseen ja tuloksiin. Tutkimuksen suunnittelussa tulee tarkastella NMDAR-antagonistin valintaa, annosta ja annostelua riippuen siitä, mitä kognitiivista häiriötä halutaan tutkia ja millä menetelmällä. Annoksen valinnassa tulee ottaa huomioon myös NMDAR-salpaajien aiheuttamat stereotyyppiset vaikutukset. Jatkossa on syytä tarkastella lähemmin NMDAR-antagonistien välisiä eroja niiden indusoimissa kognitiivisissä häiriöissä ja edelleen pohtia mistä nämä erot johtuvat.

KOKEELLINEN OSA  
KOGNITIIVISTA JOUSTAVUUTTA MITTAAVA TESTI HIIRILLE  
(ATTENTIONAL SET SHIFTING TASK)

Marja Törnävä  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja toksikologian  
osasto  
Kesäkuu 2012

## SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO JA TYÖN TARKOITUS .....	33
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	35
2.1 Eläimet ja lääkeaine .....	35
2.2 Välineet .....	36
2.3 Koejärjestely .....	39
2.3.1 Totuttelujakso ja ruokarajoitus .....	40
2.3.2 Harjoittelujakso .....	41
2.3.3 Testi .....	41
3 TULOKSET .....	45
3.1 Erä 1 .....	45
3.2 Erä 2 .....	46
3.3 Erät 3 ja 4 .....	47
4 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA.....	50
4.1 ICR-hiirikannan soveltuminen testiin .....	50
4.2 MK-801:n subkrooninen vaikutus hiirten kognitiiviseen joustavuuteen .....	51
4.3 Testin koejärjestelyn merkitys .....	54
5 YHTEENVETO .....	58
KIITOKSET.....	60
KIRJALLISUUSLUETTELO .....	61
LIITTEET	

## 1 JOHDANTO JA TYÖN TARKOITUS

Toiminnanohjauksen häiriöt, kuten kognitiivinen joustamattomuus, ovat osa skitsofrenian kognitiivista oireistoa (Rund 1998). Nykyisten skitsofrenian hoidossa käytettävien lääkkeiden teho kognitiivisiin häiriöihin on riittämätön (Keefe ym. 1999; Keefe ym. 2007), joten uusien tehokkaiden farmakoterapioiden tarve on suuri. Niiden kehittämiseksi tarvitaan uusia, mahdollisimman luotettavia eläinmalleja.

Kognitiivisia oireita, kuten kognitiivista joustamattomuutta, voidaan pitää yhtenä skitsofrenian endofenotyypeistä (Allen ym. 2009). Kognitiivinen joustavuus heikentyy useissa muissakin psykiatrisissa taudeissa ja otsalohkojen häiriöissä (Pantelis ym. 1999). Otsalohkojen häiriötä osoittavan kliinisen Wisconsinin korttien lajittelutestin (WCST) avulla voidaan mallintaa kognitiivisen joustavuuden eri osa-alueita (Grant ja Berg 1948; Roberts ym. 1988). Kognitiivinen joustamattomuus havaitaan ongelmina erilaisten sääntöjen tai strategioiden muuttamisessa ja palautteeseen reagoinnissa (Gold ym. 1997). Attentional set shifting task (ASST) on kognitiivinen eläinmalli, jota voidaan pitää WCST:n vastineena. Sen avulla voidaan tutkia eläimen kognitiivista joustavuutta, eli kykyä muodostaa sääntöjä ja vaihtaa niitä tarvittaessa. ASST:n tieteellinen perusta ja suoritus on kuvattu kirjallisuuskatsauksessa sivuilla 24-25.

Rotille ASST:n kehittivät Birrell ja Brown (2000). Tällä eläinlajilla testiä on suoritettu onnistuneesti (Rodefer ym. 2005; Egerton ym. 2008; McLean ym. 2008; Goetghebeur ja Dias 2009). ASST on muokattu myös hiirille (Colacicco ym. 2002; Bissonette ym. 2008). Vaikka hiiret ovat pystyneet suorittamaan testiä, suurin osa tutkimuksista on epäonnistunut osoittamaan testin toimivuuden nimenomaan testin ID-ED-vaihdoksissa, joissa eläimen tulee pystyä muuttamaan tarkkaavaisuuden kohdetta määritteiden välillä. Ainoastaan neljä tutkimusryhmää ovat onnistuneet saamaan merkitsevän eron ID-ED-vaihdosten välille ja näin ollen todistamaan hiirten kykenevän muodostamaan säännön tarkkaavaisuuden kohteesta (Garner ym. 2006; Bissonette ym. 2008; Papaleo ym. 2008; Kos ym. 2010). Jokainen näistä neljästä tutkimusryhmästä on käyttänyt hyvin erilaisia koejärjestelyjä, joten on hyvin vaikea päätellä, mitkä tekijät tutkimusmenettelyssä ovat vaikuttaneet kokeen onnistumiseen.



Yleisesti tiedetään, että hiirikantojen välillä on eroja oppimisessa, muistissa ja myös muissa kognitiivisissa taidoissa. Tämän erikoistyön ensisijaisena tavoitteena oli tutkia ovatko villityypin ICR-kannan (engl. International Cancer Research) hiiret soveltuvia ASST:iin. Työssä tutkittiin oppivatko hiiret testin suorituksen ja kykenevätkö ne muodostamaan säännön tarkkaavaisuuden kohteesta. ASST-testiä ei ole koskaan aiemmin suoritettu kyseisellä hiirikannalla. Mikäli testi on suoritettavissa ICR-hiirien avulla, lisää se testin luotettavuutta ja yleistettävyyttä. Kirjallisuudessa on viitteitä siitä, että hiirikantojen välillä on eroja tämän mallin suorittamisessa (Colacicco ym. 2002). Jos ICR-kannan hiiret pystyvät muodostamaan säännön tarkkaavaisuuden kohteesta ja muuttamaan sitä, havaitaan se tilastollisesti merkitsevästä erona ID-ED-vaihdosten välillä.

Glutamaatin N-metyyli-D-aspartaatti-reseptorin (NMDAR) -antagonisteja käytetään usein mallintamaan skitsofrenian oireistoa eläimillä. NMDAR-antagonisti ketamiinin akuutin annostelun on osoitettu heikentävän WCST:n suorittamista terveillä vapaaehtoisilla (Krystal ym. 2000). Edellä mainitun lisäksi NMDAR-antagonisti PCP:n subkroonisen annostelun on havaittu heikentävän nimenomaan ASST:n ED-vaihdosta rotilla (Taulukko 4) (Rodefer ym. 2005; Egerton ym. 2008; McLean ym. 2008; Goetghebeur ja Dias 2009) ja hiirillä (Laurent ja Podhorna 2004). Tämän erikoistyön farmakologisena painopisteenä oli tutkia miten NMDAR-antagonisti ditsosilpiini (MK-801) vaikuttaa hiirten kognitiiviseen joustavuuteen subkroonisesti annosteltuna eri annoksilla ja eri annostelujakson pituuksilla. MK-801:n vaikutusta ASST:ssä ei ole tutkittu aiemmin. Aiempien NMDAR-antagonisteilla tehtyjen tutkimusten valossa MK-801:n oletettiin heikentävän ASST:n ED-vaihdoksen suoritusta ID-vaihdokseen verrattuna.

Hiirille ei ole ASST:ssä vakiintunutta koejärjestelyä. On havaittu, että hiirten on vaikeampi muodostaa sääntö tarkkaavaisuuden kohteesta kuin rottien (Garner ym. 2006; Bissonette ym. 2008). Tämän vuoksi on kiinnitetty paljon huomiota kokeen eri tehtävien määrän ja järjestyksen vaikutukseen. Kirjallisuuden perusteella hiirillä ID-vaihdosten lisääminen tai toistaminen sekä käänteisten tehtävien sisältyminen testiin vahvistaa jyrksijöiden tarkkaavaisuuden kohteen säännön muodostumista (Garner ym.

2006; Bissonette ym. 2008). Tässä tutkimuksessa pohdittiin myös testin eri tehtävien määrän ja järjestyksen vaikutusta testin toimivuuteen ja luotettavuuteen.

## 2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 2.1 Eläimet ja lääkeaine

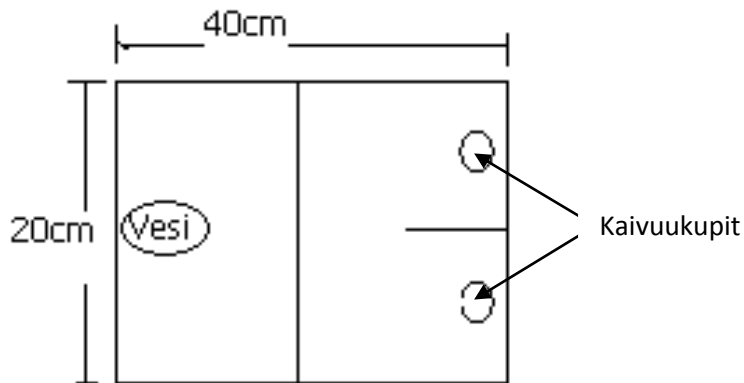
Testissä käytetyt eläimet olivat villityypin ICR-kannan uroshiiriä (Harlan B.V., Horst, Alankomaat). Testien aikana hiiret olivat 9–12-viikon ikäisiä ja painoivat 35–50 g. Hiiriä pidettiin alunperin kahdeksan yksilön ryhmissä, jotka jaettiin ennen kokeen alkua neljän yksilön häkkeihin. Eläimet asutettiin 12/12 h valosykleissä (valot päällä klo 6.00–18.00). Lämpötila ja ilmankosteus olivat kontrolloituja ( $20\pm 1$  °C,  $50\pm 10$  %). Ruokapellettejä (Harlan B.V., Horst, Alankomaat) ja vettä oli saatavilla *ad libitum* ennen ruokarajoituksen alkamista. Häkeissä oli virikkeitä, muun muassa pesänrakennusmateriaalia. Ruokarajoituksen tarkoituksena oli ensin pudottaa ja sen jälkeen ylläpitää hiirten paino noin 85 %:ssa alkuperäisestä painosta. Ruokarajoitusta jatkettiin koko kokeen ajan. Koe suoritettiin Suomen koe-eläinlakia noudattaen ja FELASA:n määräysten mukaisesti. Kokeeseen tarvittava lupa sisältyi koe-eläinlupa-ESLH-2009-06823/Ym-23. Jokaisessa koe-erässä aloitti kahdeksan hiirtä. Koko työssä käytettyjen eläinten lukumäärä oli 32.

Kokeessa käytetty lääkeaine ditsosilpiinimaleaatti, MK-801 (TOCRIS Bioscience, Iso-Britania, erä 7c/67939) liuotettiin fysiologiseen suolaliuokseen (0,9 % NaCl). Tätä fysiologista suolaliuosta käytettiin myös kontrolliaineena. Lääkeaine sekä kontrollina käytetty saliini annosteltiin hiirille 10 ml/kg i.p. Kantaliuos pakastettiin ja sitä laimennettiin edelleen käytettäväksi päivittäin ennen koetta. Liuokset sokkoutettiin jo kantaliuosvaiheessa. Hiiret saivat lääkettä toistetusti, koe-eristä riippuen, annoksilla 0,03 mg/kg tai 0,1 mg/kg yhteensä 10 tai 14 vuorokauden ajan. MK-801-annostus valittiin siten, että se ei aiheuttaisi hiirillä ataksiaa, eikä näin ollen vaikeuttaisi testin

motorista suorittamista. MK-801:n on todettu aiheuttavan hiirille ataksiaa annosteltuna i.v. DBA/2 viisi minuuttia annostelun jälkeen, mikäli annos on suurempi kuin 0,125 mg/kg (Tricklebank ym. 1989).

## 2.2 Välineet

Koelaitteistona käytettiin läpinäkyvää 20×40×18 cm muovilaatikkoa (Tecniplast, Buguggiate, Italia) (Kuva 4). Laatikon sivut peitettiin pahvilla siten, että hiiri ei nähnyt ulos laatikosta. Laitteisto oli muunneltu versio Collacion ryhmiseen kehittämästä ASST-laitteistosta hiirille (Colacicco ym. 2002). Laatikko jaettiin kahtia seinällä, joka voitiin asettaa paikalleen tai nostaa kokonaan pois. Seinän tarkoituksena oli estää hiirtä pääsemästä kaivuukupeille tarpeettomasti. Laatikon toista puolta käytettiin odotustilana, jossa hiirillä oli saatavilla vettä *ad libitum*. Toinen puoli laatikosta oli itse koetila.



Kuva 4. Kaavakuva koelaatikosta.

Koetilaan sijoitettiin kaksi kuppia, joita hiirten oli tarkoitus löytää sinne piilotettu palkinto. Kupit erotettiin seinällä. Palkkiona toimi pieni pala Cheerio-muroa (Nestle Honey Cheerios, Yhdysvallat). Palkinto sijoitettiin kuppiin noin kahden senttimetrin syvyyteen. Kaivuukupit olivat läpinäkymätöntä ruskeaa muovia (3×4×5 cm; Jacky-makupalat, FelixAbba).

Kokeessa kupit täytettiin hajustetuilla kaivuumateriaaleilla. Materiaaleina käytettiin puhtaita askartelumateriaaleja, joita hiirten oli helppo kaivaa, ja hajuina tavallisia mausteita. Käytetyt materiaalit ja hajut vaihtelivat Taulukon 6 mukaisesti. Hajujen ja materiaalien soveltuvuutta testiin oli kokeiltu aikaisemmissa kokeissa (Linden AM, henkilökohtainen tiedonanto, 2010). Kaivuumateriaalit valmisteltiin ja hajustettiin mausteilla vähintään kaksi vuorokautta ennen koetta, jotta voitiin varmistaa hajun leviäminen koko materiaaliin. Materiaalit hajuineen sekoitettiin hyvin ennen niiden asettelua kaivuukuppeihin. Hajuina toimivia mausteita lisättiin kuppeihin aina kun yksi hiiri oli suorittanut tehtävän sekä tarvittaessa. Laatikko puhdistettiin aina koevaiheiden välillä mahdollisen hajujen sekoittumisen estämiseksi. Palkintona toimiva muron palanen laitettiin mahdollisimman varovasti kuppeihin siten, että siitä ei jäisi hajujälkeä. Kuppiin, johon ei laitettu palkkiota, koskettiin murolla, jotta kuppeja olisi käsitelty mahdollisimman samalla tavoin. Käytetyt haju- ja materiaalivihjeet on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 6. Koejärjestelyä kuvaava taulukko, jossa esitettynä haju- ja materiaalivihjeparin yhdistelmien käyttö eri koevaiheissa (materiaali- ja hajuvihjeparit, ks. Taulukko 7). SDrep on toistettu SD ja ID3rep ovat täysin samoja kuin ID3. K = koepäivä, T = tehtävä, O = haju (engl. odour), M = materiaali (engl. material).

K	T	Haju-Materiaali				Materiaali-Haju			
		a		b		c		d	
		Oikein	Väärin	Oikein	Väärin	Oikein	Väärin	Oikein	Väärin
1	SD	<b>O1M1</b>	O2M1	<b>O2M1</b>	O1M1	<b>O1M1</b>	O1M2	<b>O1M2</b>	O1M1
2	SDrep	<b>O1M1</b>	O2M1	<b>O2M1</b>	O1M1	<b>O1M1</b>	O1M2	<b>O1M2</b>	O1M1
2	CD	<b>O1M1</b>	O2M1	<b>O2M1</b>	O1M1	<b>O1M1</b>	O1M2	<b>O1M2</b>	O1M1
		<b>O1M2</b>	O2M2	<b>O2M2</b>	O1M2	<b>O2M1</b>	O2M2	<b>O2M2</b>	O2M1
3	CDR	<b>O2M1</b>	O1M1	<b>O1M1</b>	O2M1	<b>O1M2</b>	O1M1	<b>O1M1</b>	O1M2
		<b>O2M2</b>	O1M2	<b>O1M2</b>	O2M2	<b>O2M2</b>	O2M1	<b>O2M1</b>	O2M2
3	ID1	<b>O3M3</b>	O4M3	<b>O4M3</b>	O3M3	<b>O3M3</b>	O3M4	<b>O3M4</b>	O3M3
		<b>O3M4</b>	O4M4	<b>O4M4</b>	O3M4	<b>O4M3</b>	O4M4	<b>O4M4</b>	O4M3
3	ID2	<b>O5M5</b>	O6M5	<b>O6M5</b>	O5M5	<b>O5M5</b>	O5M6	<b>O5M6</b>	O5M5
		<b>O5M6</b>	O6M6	<b>O6M6</b>	O5M6	<b>O6M5</b>	O6M6	<b>O6M6</b>	O6M5
3	ID3	<b>O7M7</b>	O8M7	<b>O8M7</b>	O7M7	<b>O7M7</b>	O7M8	<b>O7M8</b>	O7M7
		<b>O7M8</b>	O8M8	<b>O8M8</b>	O7M8	<b>O8M7</b>	O8M8	<b>O8M8</b>	O8M7
4	ID3rep	<b>O7M7</b>	O8M7	<b>O8M7</b>	O7M7	<b>O7M7</b>	O7M8	<b>O7M8</b>	O7M7
		<b>O7M8</b>	O8M8	<b>O8M8</b>	O7M8	<b>O8M7</b>	O8M8	<b>O8M8</b>	O8M7
4	ID4	<b>O9M9</b>	O10M9	<b>O10M9</b>	O9M9	<b>O9M9</b>	O9M10	<b>O9M10</b>	O9M9
		<b>O9M10</b>	O10M10	<b>O10M10</b>	O9M10	<b>O10M9</b>	O10M10	<b>O10M10</b>	O10M9
4	ED	<b>O11M11</b>	O11M12	<b>O11M12</b>	O11M11	<b>O11M11</b>	O12M11	<b>O12M11</b>	O11M11
		<b>O12M11</b>	O12M12	<b>O12M12</b>	O12M11	<b>O11M12</b>	O12M12	<b>O12M12</b>	O11M12

Taulukko 7. Kokeessa käytetyt vihjeparit. Vihjeparit yhdistettiin koevaiheissa Taulukon 6. mukaisesti. O = haju (engl. odour), M = materiaali (engl. material).

<b>Hajut (O)</b>	<b>Materiaalit (M)</b>
O1. Basilika	M1. Paperisilppu
O2. Kumina	M2. Kivet
O3. Rosmariini	M3. Huopa
O4. Neilikka	M4. Olki
O5. Kahvi	M5. Muovihelmet
O6. Korianteri	M6. Eppendorffputkien kannet
O7. Paprika	M7. Pumpulipallot
O8. Timjami	M8. Alumiinifoliopallot
O9. Kaneli	M9. Paperipallot
O10. Tilli	M10. Muoviset narunpätkät
O11. Sipuli	M11. Pahvineliöt
O12. Salvia	M12. Styrox-palat

### 2.3 Koejärjestely

Koejärjestely oli muunneltu versio Birrellin ja Brownin (2000) kehittämästä ASST-kokeesta rotille sekä Colaciccon (2002) ja Bissonetten (2008) tutkimusryhmien kehittämistä versiosta hiirille. Kokeessa kaikki koesarjat käsittivät kolmen vuorokauden habituaatio- eli totuttelujakson ja yhden vuorokauden harjoittelujakson. Itse testin pituus vaihteli koesarjojen välillä. Kaikissa koesarjoissa hiiret satunnaistettiin saamaan sokkoutetusti joko tutkittavaa lääkeainetta MK-801:a tai suolaliuosta (i.p.). MK-801:n annos ja altistusaika vaihtelivat koesarjojen välillä.

### 2.3.1 Totuttelujakso ja ruokarajoitus

Koesarjat aloitettiin totuttelujaksolla, jonka tarkoituksena oli totuttaa hiiret kokeessa käytettäviin materiaaleihin, ruokapalkintoon, koetilaan, testiolosuhteisiin ja käsittelyyn. Ennen ensimmäistä totuttelupäivää hiirille oli annettu palkintona käytettyjä muroja kotihäkkeihin kahden vuorokauden ajan. Totuttamisjakso toistettiin kolmena peräkkäisenä päivänä. Jokaisena päivänä hiiriä käsiteltiin vähintään viiden minuutin ajan, jonka jälkeen ne siirrettiin itse koelaatikkoon. Laatikossa olevat kupit täytettiin sahanpurulla, jota käytettiin myös häkkien pohjamateriaalina. Purun seassa ja päällä oli palkkioina käytettyjä muron palasia. Hiiret olivat koelaatikossa kahdesti 20 min ajan. Neljän minuutin välein laatikon väliovi suljettiin ja hiiret siirrettiin laatikon odotustilaan. Hiiret saivat kaivaa kuppeja vapaasti ja syödä löytämiään palkkioita. Totuttamispäivien päätteeksi hiiret palautettiin kotihäkkeihin, joihin oli laitettu kokeessa käytettäviä materiaaleja sekä hajuja satunnaistetussa järjestyksessä, jotta hiiret tottuisivat niihin. Häkkeihin sijoitettiin kaivuukuppi ja pehmennettyä pellettiä.

Viimeisen totuttamispäivän jälkeen hiirillä aloitettiin ruokarajoitus. Ruokarajoituksen tarkoituksena oli pudottaa hiirten painoa noin 85 %:iin niiden alkuperäisen painosta, minkä oletettiin lisäävän hiirten motivaatiota kokeen suorittamiseen. Ruokarajoituksen aikana hiiret punnittiin päivittäin ja niille annettiin runsaasti sekä pehmennettyä että kovaa pellettiä rajoitetun ajan (45 min – yön yli), suhteutettuna painonmuutokseen. Painon ollessa 100–85 % alkuperäisestä ruokaa oli tarjolla 45 min ajan. Jos paino oli pudonnut 85–82 % alkuperäisestä, hiiret ruokailivat 60 min ajan. Jos paino oli pudonnut 82–80 %:iin alkuperäisestä ne saivat ruokaa 90 min ajan. Hiirten painon ollessa noin 80 % alkupainostaan ne saivat ruokailla 3–5 h ajan. Jos hiiret olivat laihtuneet yli 1 g tai alle 80 % alkupainosta, ne saivat ruokailla vapaasti yön yli. Vettä hiirillä oli aina saatavilla *ad libitum*.

### 2.3.2 Harjoittelujakso

Ruokarajoituksen kestänyt kaksi vuorokautta, aloitettiin hiirten harjoittaminen testin suorittamiseen. Harjoittelun tarkoituksena oli varmistaa se, että hiiret osasivat kaivaa kuppeja oikein. Harjoituksessa kupit täytettiin vähitellen häkkien pohjamateriaalina käytetyllä sahanpurulla. Harjoitus käsitti neljä vaihetta. Jokaisessa vaiheessa kupeissa olevaa sahanpurumäärää lisättiin. Alussa palkinto oli purujen päällä mutta jokaisessa vaiheessa sitä siirrettiin aina syvemmälle kuppiin siten, että se oli vaikeampi löytää. Lopussa palkkio piilotettiin lähes kupin pohjalle kuten oikeassa kokeessa. Jos hiiret eivät suorittaneet tätä vaihetta oikein, harjoitus toistettiin seuraavana päivänä. Lähes kaikki hiiret oppivat kaivamaan kuppeja jo ensimmäisen harjoituksen aikana.

### 2.3.3 Testi

Kokeen ensimmäinen vaihe, yksinkertainen erottelukoe (engl. simple discrimination, SD) suoritettiin harjoittelun jälkeisenä päivänä. Tässä vaiheessa vain toinen määrite, haju tai materiaali vaihteli ja toinen määrite pysyi samana. Testi tasapainotettiin siten, että 50 %:lla hiiristä vaihteleva määrite oli haju ja 50 %:lla hiiristä materiaali. Hiirten suoriutumiseksi ensimmäisestä ja kaikista seuraavista koevaiheista, niiden oli tehtävä koe-erästä riippuen joko kahdeksan tai kuusi peräkkäistä oikeaa valintaa. Mikäli hiiri teki väärän valinnan, oikeiden valintojen laskeminen aloitettiin alusta. Koe ja ajanotto aloitettiin nostamalla laatikkoa jakava seinä ylös, jolloin hiirelle avautui vapaa pääsy kupeille. Jokaisen valinnan jälkeen hiiri palautettiin odotustilaan sulkemalla väliseinä. Koesuoritusten aikana mitattiin seuraavat parametrit:

- 1) Palkinnon löytymiseen kulunut keskimääräinen aika (*etsintäaikojen keskiarvo*)
- 2) *Yrityskertojen lukumäärä* kunnes eläin saavuttaa vaadittavan määrän oikeita valintoja
- 3) *Virheellisten valintojen lukumäärä* ennen kuin eläin saavuttaa vaadittavan määrän oikeita valintoja



Ajat mitattiin ajanottokellolla. Mitattavat parametrit merkittiin tuloskorttiin (Liite 1). Korteihin kirjattiin myös mahdolliset poikkeamat ja havainnot.

Testin toisena päivänä hiiret suorittivat monimuotoisen erottelukokeen (engl. compound discrimination, CD) ja käänteisen monimuotoisen erottelukokeen (engl. compound discrimination reversal, CDR). Koe-erissä 2, 3 ja 4 tämän koepäivän alkuun lisättiin edellisen koevaiheen toisto, eli yksinkertaisen erottelun toisto (engl. simple discrimination repetition, SDrep) (Kuva 5; b ja c). CD-erottelukokeessa käytettiin edelleen samaa vihjettä (haju tai materiaali), kuin edellisäkin koevaiheessa SD. Tässä vaiheessa testiin lisättiin toinen määrite. CDR-vaiheessa CD-kokeessa opittu oikea vihje muuttui vääräksi ja väärä oikeaksi. Tässä vaiheessa hiiren piti osata kääntää aiemmin muodostettu sääntö päinvastaiseksi oleellisen määritteen pysyessä samana. Kolmantena koepäivänä hiiret suorittivat määritteen sisäisen vaihdoksen kokeita (engl. intradimensional shift 1, 2, 3; ID1, ID2 ID3), joissa jokaisessa oli mukana eri vihjeet (Taulukko 6).

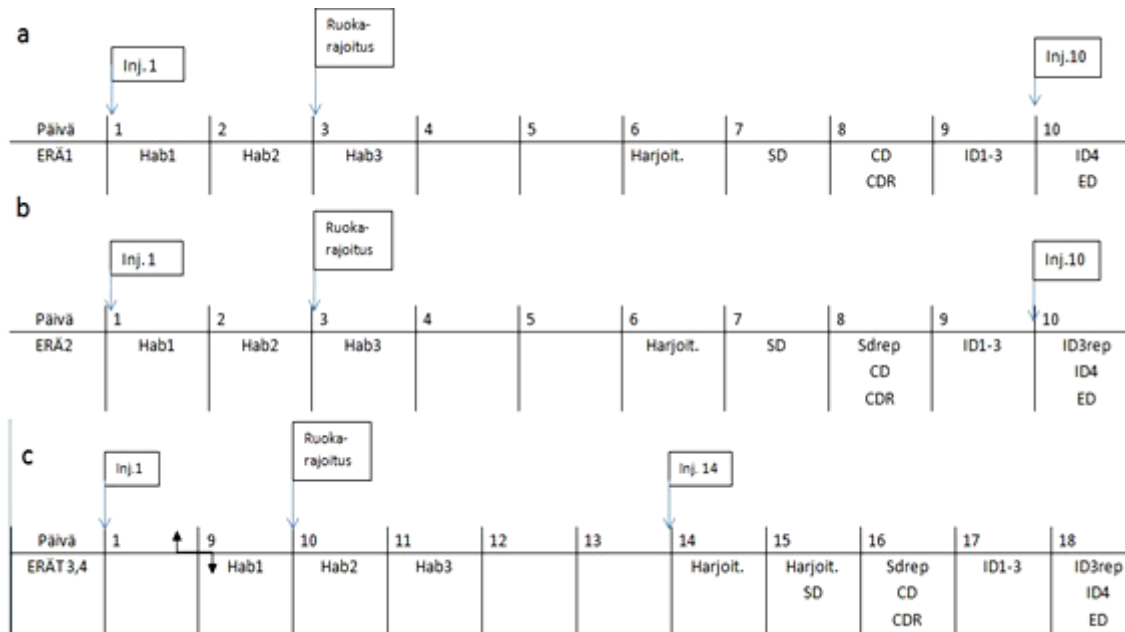
Neljäntenä koepäivänä hiiret suorittivat vielä yhden määritteen sisäisen vaihdoksen kokeen (ID4) sekä määritteen ulkoisen vaihdoksen kokeen (engl. extradimensional shift, ED). Koe-erissä 2, 3 ja 4 tälle päivälle lisättiin edellisen koevaiheen toisto eli ID3rep. ED-vaihdoksessa eläimen oli tarkoitus siirtää tarkkaavaisuutensa kohde ennen oleellisesta määritteestä toiseen ennen epäoleelliseen määritteeseen, esimerkiksi hajusta materiaaliin.

Tutkimuksessa suoritettiin neljä erillistä koe-erää 1, 2, 3 ja 4 (Kuva 5; a, b ja c). Erät 3 ja 4 suoritettiin identtisesti, ja niiden tulokset yhdistettiin. Jokaisessa koe-erässä hiiret suorittivat seitsemän erilaista erottelutehtävää tai vaihdosta ennen testin ED-vaihdosta. Kaikki koe-erät sisälsivät yhden käänteisen erottelutehtävän (CDR). Erissä 2, 3 ja 4 hiiret suorittivat kaksi toistettua koevaihetta SDrep:n ja ID3rep:n (Kuva 5; b ja c). Erässä 1 hiirten tuli tehdä kahdeksan oikeaa valintaa ennen seuraavaan koevaiheeseen siirtymistä. Erissä 2, 3 ja 4 hiirten tuli tehdä kuusi oikeaa valintaa ennen seuraavaan koevaiheeseen siirtymistä.

Lääkeaineen annos ja annostelujakson pituus vaihtelivat koe-erien välillä (0,03–0,1 mg/kg, 10–14 vuorokauden ajan) (Kuva 5; a, b ja c). Erässä 1. MK-801:a

annosteltiin 0,03 mg/kg (i.p.) 10 vuorokauden ajan. Annostelu tapahtui kaksi tuntia ennen kokeen tai totuttamisjakson alkua. Erissä 2, 3 ja 4 annos oli 0,1 mg/kg (i.p.). Erässä 2 annostelu ajoittui 1 h ennen kokeen tai totuttamisjakson alkua ja lääkettä annosteltiin 10 vuorokauden ajan. Erissä 3 ja 4 annostelujakson pituus oli 14 vuorokautta, annostelu lopetettiin vuorokautta ennen kokeen alkua. Erissä 1 ja 2 koevaiheet suoritettiin peräkkäin, kun taas erissä 3 ja 4 kaikkien koevaiheiden välillä pidettiin tunnin mittainen tauko.

Eriin 3 ja 4 lisättiin yksi harjoitteluvaihe (ns. training) jossa tämän vaiheen viimeisen osion, palkinnon kaivaminen syvältäpuruista, tuli onnistua kuusi kertaa peräkkäin. Harjoitusmäärän kasvattamisen tarkoituksena oli lisätä testin luotettavuutta siten, että hiiret osoittaisivat valintansa juuri kaivamisen perusteella. Kaikki koe-erät tasapainotettiin määritteiden perusteella. Lisäksi vihjeparit tasapainotettiin erien kesken ID4-ED-vaihdoksissa siten, että osalle eläimistä materiaali ja hajupari olivat ID4-vaiheessa samat kuin ne olivat osalle eläimistä ED-vaihdoksessa (Taulukko 6).



Kuva 5. Eräkohtainen kokeen suoritus, Hab = totuttelujakso **a)** Erä 1: Hiiret saivat lääkeainetta tai saliinia yhteensä 10 vrk ajan 0,03 mg/kg (i.p.). Annostelu tapahtui 2 h ennen kokeen tai totuttamisjakson alkua. Hiiret suorittivat seitsemän tehtävää (SD-ID4) ennen ED-vaihdosta. Tehtäviin sisältyi yksi käänteinen koevaihe (CDR). **b)** Erä 2: Hiiret saivat lääkeainetta tai saliinia yhteensä 10 vrk ajan 0,1 mg/kg (i.p.). Annostelu tapahtui 1 h ennen kokeen tai totuttamispäivien alkua. Hiiret suorittivat yhdeksän tehtävää (SD-ID4) ennen ED vaihdosta. Tehtäviin sisältyi kaksi toistettua tehtävää (SDrep ja ID3rep) ja yksi käänteinen koevaihe (CDR). **c)** Erät 3 ja 4 suoritettiin identtisesti. Hiiret saivat lääkeainetta tai saliinia yhteensä 14 vrk ajan 0,1mg/kg (i.p.). Annostelu lopetettiin päivää ennen kokeen alkua. Hiiret suorittivat yhdeksän tehtävää (SD-ID4) ennen ED-vaihdosta. Tehtäviin sisältyi kaksi toistettua tehtävää (SDrep ja ID3rep) ja yksi käänteinen koevaihe (CDR). Kaikissa ryhmissä kokeet suoritettiin neljän vuorokauden aikana.

### 3 TULOKSET

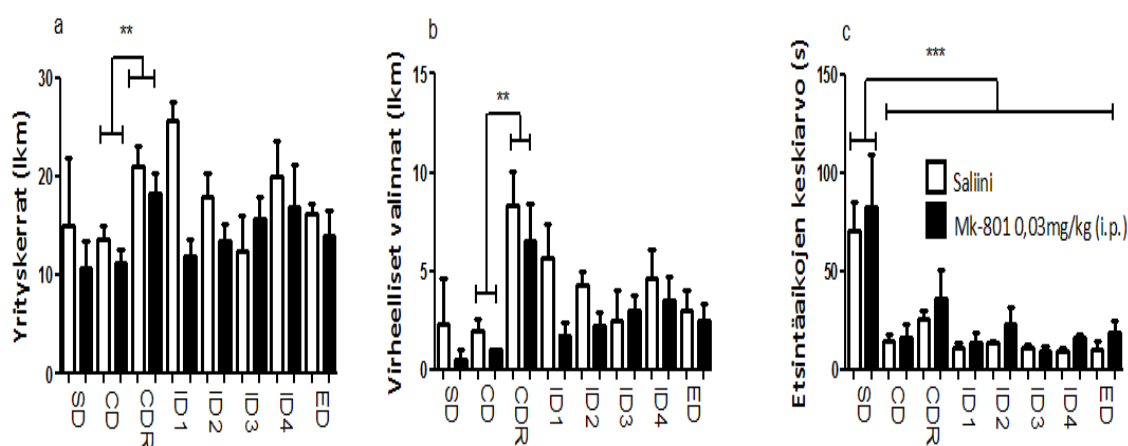
Kaikissa koeryhmissä tarkasteltiin seuraavia parametrejä: yrityskertojen ja virheellisten valintojen lukumäärä sekä etsintäaikojen keskiarvo. Tulokset analysoitiin SPSS-ohjelmalla. Tuloksia tarkasteltiin myös jatkotestien GraphPad Prism 4 -ohjelman avulla. Tilastollisina testeinä käytettiin yksisuuntaista toistuvien mittausten varianssianalyysiä (ANOVA). Tulokset jatkotestattiin t-testillä, sekä Newman-Keuls- ja Dunnett's Multiple Comparison -testeillä (luottamusväli 95 %). Parametrit ilmoitettu (keskiarvo  $\pm$  SEM).

#### 3.1 Erä 1

Kaikki kokeen aloittaneet hiiret pystyivät suorittamaan testin jokaisen vaiheen siten, että ne saavuttivat kahdeksan peräkkäistä oikeaa valintaa ja siirtyivät seuraavaan testin vaiheeseen ( $n_{\text{saliini}}=3$ ,  $n_{\text{MK-801}}=4$ ). Tilastollisesti merkitseviä eroa saliini- ja MK-801-ryhmien välillä ei havaittu millään tarkastellulla parametrilla (toistuvien mittausten ANOVA).

Koska ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa, käsittelyryhmien tulokset yhdistettiin ( $n=7$ ) ja tarkasteltiin tarkemmin koevaiheita CD-CDR ja ID4-ED. Yrityskertoja ja virheellisten valintojen lukumäärää tarkastelemalla havaittiin, että CDR-vaihe oli merkitsevästi ( $p<0,01$ ) vaikeampi suorittaa kuin CD-vaihe (Kuva 6; a ja b). Yrityskertojen tai virheellisten valintojen lukumäärää tarkastelemalla ryhmien yhdistetyissä tuloksissa ei havaittu eroa ID4- ja ED-vaihdosten välillä.. Kuvasta 6 (b) nähdään, että molemmat ryhmät tekivät ID4-vaihdoksessa hieman enemmän virheellisiä valintoja kuin kokeen ED-vaihdoksessa. Kokeen toimiessa tilanne pitäisi olla päinvastoin. Ero ei ollut kuitenkaan tilastollisesti merkitsevä. Hiiret eivät siis muodostaneet sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta.

Tarkasteltaessa etsintäaikojen keskiarvoja havaittiin, että kokeen SD-vaihe vei hiiriltä merkitsevästi ( $p<0.0001$ ) enemmän aikaa kuin kokeen muut vaiheet (Kuva 6; c).



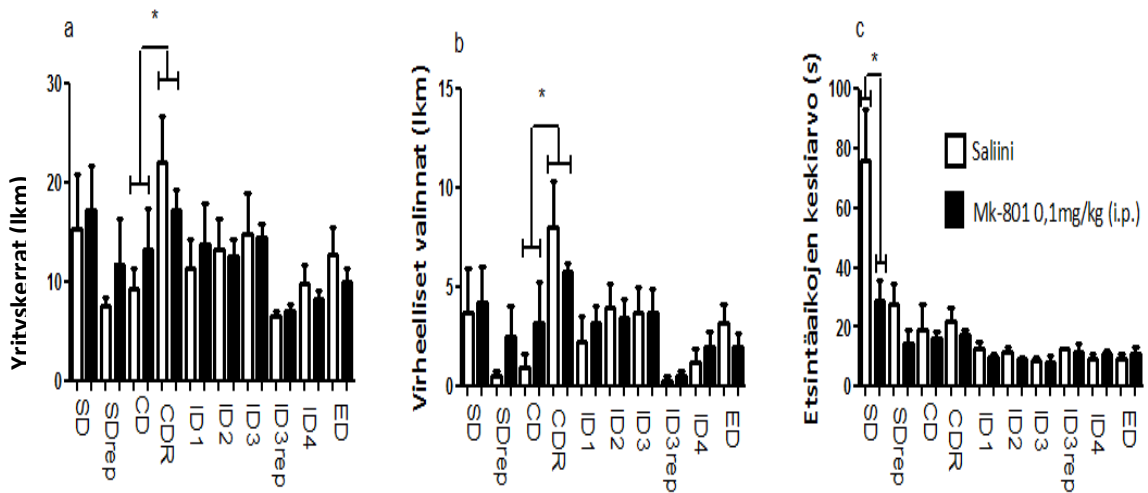
Kuva 6. Erä 1. Hiiret ( $n_{\text{saliini}}=3$ ,  $n_{\text{MK-801}}=4$ ) eivät muodostaneet sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta, eikä MK-801:n annostelu 10 vrk:n ajan annoksella 0,03 mg/kg (i.p., annostelu 2 h ennen kokeen alkua) vaikuttanut testissä suoriutumiseen verrattuna kontrolliryhmään. **a)** Yrityskertojen lukumäärä **b)** Virheellisten valintojen lukumäärä. **c)** Etsintäaika keskiarvo. Analyysit: yksisuuntainen toistuvien mittausten varianssianalyysi (ANOVA), jatkotestinä t-testi, Dunnett, parametrit ilmoitettu (keskiarvo  $\pm$  SEM). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.2 Erä 2

Kaikki hiiret suorittivat kokeen alusta loppuun. Hiiret tekivät kuusi peräkkäistä oikeaa valintaa kokeen jokaisessa vaiheessa ( $n_{\text{saliini}}=4$ ,  $n_{\text{MK-801}}=4$ ). Varianssianalyysillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja yrityskertojen tai virheellisten valintojen lukumäärässä saliini- ja MK-801-ryhmien välillä (toistuvien mittausten ANOVA).

Koska ryhmien välillä ei havaittu eroa, tulokset yhdistettiin ( $n=8$ ). Yhdistettyjen tulosten perusteella CDR-vaihe vaati merkitsevästi enemmän yrityskertoja sekä virheellisiä valintoja kuin ( $p < 0,05$ ) kuin CD-koevaihe (Kuva 7; a ja b). ID4- ja ED-vaihdosten välillä ei havaittu eroa yrityskertojen tai virheellisten valintojen lukumäärässä. Kuvasta 7 (a ja b) nähdään, että testin ED-vaihdos on vaatinut molemmilta ryhmiltä hieman enemmän yrityksiä sekä virheellisiä valintoja kuin ID4-vaihdos. Ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä, joten hiiret eivät muodostaneet sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta.

Tarkasteltaessa etsintäaikojen keskiarvoja havaittiin MK-801:lla olevan vaikutusta suoritusnopeuteen (ANOVA,  $p < 0,001$ ). MK-801- ja saliiniryhmän ero on huomattavin kokeen SD-vaiheessa (Kuva 7; c). Saliiniryhmän SD-vaihe on merkitsevästi hitaampi kuin MK-801-ryhmän SD-vaihe ( $p < 0,05$ ). Muissa koevaiheissa ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa.



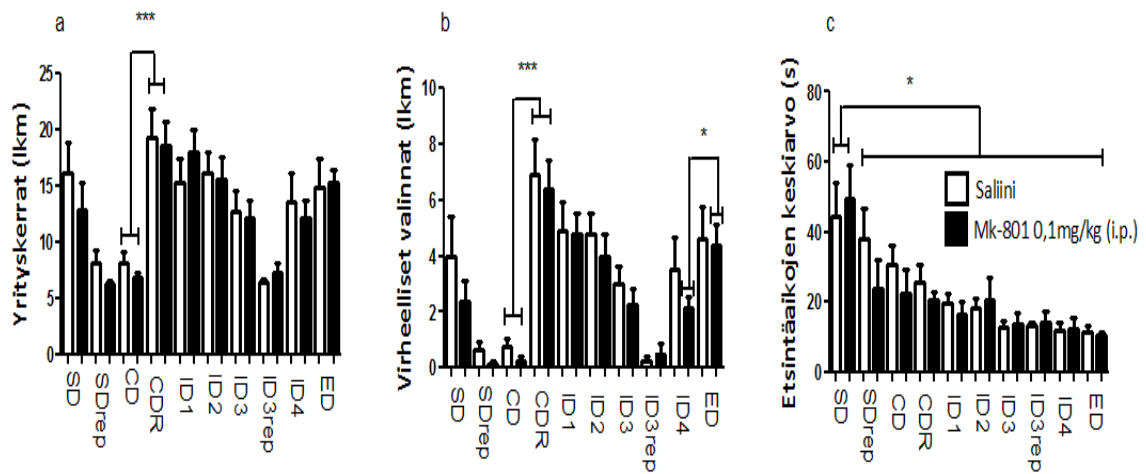
Kuva 7. Erä 2. Hiiret eivät muodostaneet sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta. MK-801:n annostelu 10 vrk:n ajan annoksella 0,1 mg/kg (i.p., annostelu 1 h ennen kokeen alkua) vaikutti hiirten ( $n_{\text{saliini}}=3$ ,  $n_{\text{MK-801}}=4$ ) suoriutumiseen testin alussa lisäämällä SD-vaiheen suoritusnopeutta saliiniryhmään verrattuna. MK-801 ei kuitenkaan ilmeisesti vaikuttanut hiirten kognitiivisiin kykyihin, joita tarvittiin testin läpiviemiseen. **a)** Yrityskertojen lukumäärä. **b)** Virheellisten valintojen lukumäärä. **c)** Etsintäaikojen keskiarvo. Analyysit: yksisuuntainen toistuvien mittausten varianssianalyysi (ANOVA), jatkotesti t-test, parametrit ilmoitettu (keskiarvo  $\pm$  SEM)\* $p < 0,05$ .

### 3.3 Erät 3 ja 4

Kaikki kokeen aloittaneet hiiret pystyivät suorittamaan testin jokaisen vaiheen siten, että ne saavuttivat kuusi peräkkäistä oikeaa valintaa ja siirtyivät testin seuraavaan vaiheeseen ( $n_{\text{saliini}}=8$ ,  $n_{\text{MK-801}}=8$ ). Tilastollisesti merkitsevää eroa salii- ja MK-801-ryhmien välillä ei havaittu millään tarkastellulla parametrilla (toistuvien mittausten ANOVA).

Koska varianssianalyysillä ei havaittu eroa käsittelyryhmien välillä, ryhmien tulokset voitiin yhdistää ja tarkastella CDR- ja CD-vaiheita tarkemmin (n=16). CDR-vaihe vaati enemmän yrityskertoja kuin CD-vaihe (Kuva 8; a;  $p < 0,001$ ), mikä havaittiin myös molemmilla ryhmillä erikseen (saliini  $p < 0,001$ , MK-801  $p < 0,01$ ). Tarkasteltaessa CD- ja CDR-vaiheita virheellisten valintojen perusteella, havaittiin CDR-vaiheen vaatineen merkitsevästi enemmän virheellisiä valintoja kuin CD-vaihe (Kuva 8; b;  $p < 0,001$ ). Hiiret tekivät CDR-vaiheessa enemmän virheellisiä valintoja CD-vaiheeseen verrattuna myös tarkasteltaessa molempia ryhmiä erikseen (saliini  $p < 0,001$  ja MK-801  $p < 0,001$ ).

Yrityskertojen lukumäärää tarkastelemalla ei havaittu eroa ID4-ED-vaihdosten välillä. Kuvasta 8 (b) nähdään, että MK-801-ryhmän kohdalla ED-vaihdos vaati merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) enemmän virheellisiä valintoja kuin ID4-vaihdos. Merkitsevää eroa ID4-ED vaihdosten välille ei saatu näkyviin saliiniryhmän kohdalla eikä myöskään kun ryhmät yhdistettiin. Tätä eroa ei havaittu myöskään ryhmien välillä. Jotta testin voisi sanoa toimivan, tämä tulos olisi pitänyt saada esiin myös saliiniryhmän kohdalla. Hiiret eivät siis muodostaneet sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta. Etsintäaikoja tarkastelemalla havaittiin, että kokeen SD-vaihe vei hiiriltä merkitsevästi ( $p < 0,0001$ ) enemmän aikaa kuin kokeen muut vaiheet (Kuva 8; c).



Kuva 8. Erät 3 ja 4. Hiiret ( $n_{\text{saliini}}=3$ ,  $n_{\text{MK-801}}=4$ ) eivät muodostaneet sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta. MK-801:n annostelu 14 vrk:n ajan annoksella 0,1 mg/kg (i.p., viimeinen annos 24 h ennen SD-vaihetta) vaikutti testissä suoriutumiseen testin ED-vaihdoksessa, jossa hiiret tekivät enemmän virheellisiä valintoja testin ID4-vaihdokseen verrattuna ( $p<0,05$ ). Tilastollista eroa kontrolliryhmän kohdalla ei havaittu. MK-801 ei vaikuttanut hiirten motoriikkaan tai motivaatioon. **a)** Yrityskertojen lukumäärä. **b)** Virheellisten valintojen lukumäärä **c)** Etsintäaikojen keskiarvo. Analyysit: yksisuuntainen toistuvien mittausten varianssianalyysi (ANOVA), jatkotestinä Dunnet tai t-test, parametrit ilmoitettu (keskiarvo  $\pm$  SEM), \* $p<0,05$ . \*\*\* $p<0,001$ .



## 4 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Tässä tutkimuksessa ICR-kannan hiiret eivät pystyneet muodostamaan sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta. ICR-kannan hiiret kykenivät kuitenkin oppimaan tehtävän teknisen suorituksen. MK-801-ryhmän ja kontrolliryhmän välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa millään mitatulla parametrilla, missään testin vaiheissa. MK-801 (0,3–0,1 mg/kg 10–14 vuorokauden ajan i.p.) ei siis aiheuttanut hiirille sellaisia häiriöitä motivaatiossa, motoriikassa tai kognitiossa, jotka olisivat vaikuttaneet niiden suoriutumiseen ASST:ssä.

### 4.1 ICR-hiirikannan soveltuminen testiin

Tutkimuksen ensisijaisena tarkoituksena oli tutkia voidaanko ASST:ä suorittaa ICR-kannan hiirillä eli kykenevätkö ne muodostamaan säännön tarkkaavaisuuden kohteesta ja vaihtamaan tarkkaavaisuuden kohdetta määritteiden välillä. Säännön muodostuminen ilmenee ASST:ssä eläinten suoriutuessa testin ID4-vaihdoksesta pienemmällä virhemäärällä ja vähemmällä yrityskerroilla kuin testin ED-vaihdoksesta. Kontrolliryhmällä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa ID4- ja ED-vaihdosten välillä. Tämä ei kuitenkaan todista sitä, etteivätkö ICR-kannan hiiret soveltuisi käytettäväksi ASST:ssä, sillä koeasetelmasta puuttui positiivinen kontrolli. Kontrollin puuttuessa ei voitu varmistua oikeasta mittaustuloksesta. Kirjallisuuden perusteella mahdollinen positiivinen kontrolli saattaisi olla hiirikanta C57BL/6j (C57), joka näyttää soveltuvan testiin suhteellisen luotettavasti (Garner ym. 2006; Bissonette ym. 2008; Papaleo ym. 2008; Kos ym. 2010). Vertailumateriaalia ei ollut, koska ICR-hiirikantaa ei ole käytetty aiemmin ASST:n suorittamiseen. Jotta voitaisiin tutkia ICR-kannan soveltuvuutta testiin, koeasetelma olisi luotava siten, että kahden eri hiirikannan suoritusta verrataan toisiinsa. Positiiviseksi kontrolliryhmäksi tulisi valita C57-hiirikanta ja verrata sen suoritusta ICR-hiirikannan suoritukseen. Ongelmaksi muodostuu edelleen se, ettei hiirille ole olemassa vakiintunutta koejärjestelyä.

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella ICR-kannan hiirillä ei oletettavasti ollut motivaatio- tai motorisia ongelmia suorittaa koetta. Eläinten stressi, motoriset häiriöt tai

alentunut motivaatio olisi havaittu pitkänä etsintäaikoina tai etsintäaikojen kasvuna kokeen edetessä. Etsintäaikojen keskiarvot laskivat SD-vaiheen jälkeen kokeen edetessä kaikissa erissä, mikä viittaa hiirten motoriikan ja motivaation säilyneen. Tämä voi selittyä osin sillä, että hiirten stressi ja mahdollinen pelokkuus testiä kohtaan oli testin alussa korkeimmillaan ja väheni ensimmäisen koevaiheen jälkeen. Etsintäaikojen keskiarvojen lasku voi antaa viitteitä myös siitä, että testin tässä vaiheessa hiiret edelleen opettelivat testin suorittamista.

Hiiret suorittivat kokeen alusta loppuun, mikä osoitti sen, että hiiret kykenivät testin tekniseen suorittamiseen. On epätodennäköistä, että hiirten kykenemättömyys muodostaa sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta olisi johtunut hiirten motivaatio- tai motorisista ongelmista, tai testiympäristön aiheuttamasta stressistä.

#### 4.2 MK-801:n subkrooninen vaikutus hiirten kognitiiviseen joustavuuteen

NMDAR-salpaajien tiedetään aiheuttavan jyrksijöille kognitiivisia häiriöitä, jotka ovat samankaltaisia kuin skitsofreniaa sairastavilla. NMDAR-antagonistien PCP:n ja ketamiinin on havaittu heikentävän hiirten suoriutumista ASST:n eri vaiheissa (Laurent ja Podhorna 2004; Kos ym. 2010).

Kontrolliryhmällä ED-vaihdos ei vaatinut enempää virheellisiä valintoja tai yrityskertoja ID4-vaihdokseen verrattuna. Erissä 3 ja 4 MK-801:a (0,1 mg/ml i.p. 14 vuorokauden ajan, annostelu lopetettiin 24 h ennen SD-vaiheen alkua) saaneen ryhmän kohdalla sen sijaan havaittiin merkitsevä ero ID4- ja ED-vaihdosten välillä. ED-vaihdos oli siis merkitsevästi vaikeampi. Koska tätä eroa ei havaittu kontrolliryhmän kohdalla, ei voida sanoa hiirten muodostaneen sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta. Jos lääkeaine olisi vaikuttanut hiirten kognitioon siten, että tarkkaavaisuuden säännön muodostamiskyky olisi heikentynyt, olisi molemmissa käsittelyryhmissä havaittu ID4-vaihdoksen vaatineen vähemmän yrityskertoja ja vähemmän virheellisiä valintoja kuin kokeen ED-vaihdoksen. Eron olisi pitänyt olla merkitsevästi suurempi lääkeainetta saaneella ryhmällä. Tulosten perusteella kontrolliryhmällä ei siis havaittu niitä kognitiivisia kykyjä, joita halusimme mitata, joten emme voi vetää varmoja

johtopäätöksiä siitä vaikuttiko MK-801:n hiirten kognitiiviseen joustavuuteen. Koska MK-801 kuitenkin aiheutti odotetun muutoksen hiirten testissä suoriutumiseen voisi testin olettaa toimivan myös kontrolliryhmän kohdalla kunhan koejärjestely saataisiin optimoitua toimivaksi.

NMDAR-antagonistien (PCP ja ketamiini) vaikutusta hiirillä ASST-tesissä on tutkittu myös aiemmin (Taulukko 4). Sekä Kos ym. (2010) että Laurent ym. (2004) havaitsivat käytetyn NMDAR-antagonistin heikentäneen ED-vaihdon suorittamista verrattuna ID4-vaihdon suorittamiseen. Kosin ym. mukaan ketamiini heikensi ED-vaihdon suorittamista verrattuna kontrolliryhmään. Tämän perusteella ketamiini heikensi hiirten tarkkaavaisuuden siirtokykyä. Laurentin ryhmän tulos oli samansuuntainen oman tutkimuksemme kanssa; kummassakin tutkimuksessa NMDAR-antagonistin havaittiin heikentäneen ED-vaihdon suoritusta ID-vaihdon suorittamiseen verrattuna, mutta kummankaan tutkimuksen kontrolliryhmässä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa ID4- ja ED-vaihdon välillä. Mikäli positiivinen kontrolliryhmä ei näytä haluttua tulosta, ei koejärjestely ole luotettava. Näin ollen kummankaan tutkimuksen ei voida katsoa mitanneen hiirten kykyä muuttaa tarkkaavaisuuden kohdetta. Laurentin ym. kokeessa PCP:n ei voida sanoa vaikuttaneen hiirten tarkkaavaisuuden siirtokykyyn.

Lääkeaineen aiheuttaessa sellaisia kognitiivisia häiriöitä, jotka johtavat perseveraatiotaipumukseen, eli pitäytymiseen aikaisemmin opitussa säännössä, näkyisi se heikentyneenä suorituksena kokeen CDR-vaiheessa kontrolliryhmään verrattuna (Birrell ja Brown 2000; Bissonette ym. 2008). Laurent ja Podhornan (2004) tutkimuksessa PCP:n (1,3 mg/kg i.p. 10 vuorokauden ajan) havaittiin aiheuttavan hiirille perseveraatiotaipumusta. Kosin ym. (2010) mukaan ketamiinin akuuttien (10 ja 20 mg/kg i.p.) annosten sen sijaan ei havaittu aiheuttavan hiirille perseveraatiotaipumusta (Kos ym. 2010). Nyt suoritettussa tutkimuksessa havaittiin CDR-vaiheen vaatimien yleisesti enemmän yrityskertoja ja virheellisiä valintoja kuin CD-vaihe. MK-801:ä saaneen ryhmän suoritus ei kuitenkaan heikentynyt kontrolliryhmään verrattuna. MK-801 (0,3–0,1 mg/kg 10–14 vuorokauden ajan i.p.) ei siis aiheuttanut hiirillä perseveraatiotaipumusta. Tässä suhteessa Kosin tulokset tukevat nyt saatuja havaintoja.

NMDAR-antagonistien tiedetään aiheuttavan annosvasteisia häiriöitä eläinten motoriikassa (Tricklebank ym. 1989). Lääkeaineen vaikutus testin motoriseen suoritukseen tai eläimen motivaatioon näkyisi lääkeaineryhmän heikentyneenä suorituksena kaikissa koevaiheissa verrattuna kontrolliryhmän suoritukseen virheellisten valintojen ja etsintäkertojen lukumäärällä mitattuna (Bushnell ja Strupp 2009). Nyt toteutetun tutkimuksen perustella MK-801:a saaneen ryhmän suoriutuminen testissä ei ollut heikentynyt missään testin vaiheessa verrattuna kontrolliryhmään arvioituna virheellisten valintojen tai etsintäkertojen lukumäärällä. Etsintäaikojen keskiarvoissa ei havaittu merkitseviä eroja ryhmien kesken erissä 1, 3 ja 4. Näissä erissä etsintäajat laskivat SD vaiheen jälkeen. MK-801:n annostelu 0,03–0,1 mg/kg 10–14 vuorokauden ajan ei siis todennäköisesti aiheuttanut hiirille sellaisia motorisia tai motivaatiohäiriöitä, jotka olisivat vaikuttaneet testin suorittamiseen. Erässä 2 MK-801:a (0,1 mg/kg 10 vuorokauden ajan, annostelu 1 h ennen kokeen alkua) saaneiden hiiret suoriutuivat testin SD-vaiheesta merkitsevästi kontrolliryhmää nopeammin. Tässä erässä lääkeaine annosteltiin tuntia ennen kokeen alkua, jolloin ensimmäisessä koevaiheessa (SD) saattoi olla mukana lääkeaineen akuuttia vaikutusta. NMDAR-antagonistien tiedetään lisäävän eläinten liikeaktiivisuutta akuutin annostelun jälkeen (Steinpreis ja Salamone 1993; Tricklebank ym. 1989; Jentsch ym. 1998).

Kirjallisuudesta löytyy viitteitä eri NMDAR-salpaajien heterogeenisestä vaikutuksesta hiirten ja rottien kognitioon (Jentsch ja Roth 1999; Floresco ym. 2009; Seillier ja Giuffrida 2009). Vaikutusten heterogeenisyys johtuu ilmeisesti eroista NMDAR-salpaajien reseptorisitoutumisessa ja farmakokinetiikassa. NMDAR-antagonistien erilaiset annokset ja annostelujaksojen pituudet johtavat hyvin erilaisiin tuloksiin (Taulukko 2) (Jentsch ja Roth 1999). NMDAR-antagonistit vaikuttavat hiirten kognitioon vaihtelevasti, erityisesti ASST-testissä. Esimerkiksi aiemmissä tutkimuksissa PCP on aiheuttanut perseveraatiotaipumusta, mutta ketamiini ei (Laurent ja Podhorna 2004; Kos ym. 2010). Lisäksi NMDAR-antagonistien tiedetään vaikuttavan eri hiirikantoihin eri tavoin (Brosnan-Watters ym. 2000; Mouri ym. 2011). MK-801:a ei ole aikaisemmin käytetty ICR-kannan hiirillä sellaisissa eläinmalleissa, joissa mitataan hiirten kykyä muodostaa sääntö tarkkaavaisuuden kohteesta. Ei ole ennestään tiedossa, pitäisikö MK-801:n vaikuttaa ICR-kannan hiirillä tähän kognitiiviseen osa-alueeseen. Mahdollisissa jatkotutkimuksissa tuleekin kiinnittää huomiota käytettyyn hiirikantaan,

annokseen, annostelujakson pituuteen ja itse koeasetelmaan. Jatkossa tulisi tarkastella MK-801:n kognitiivisia vaikutuksia eri hiirikantoihin vaihtelevilla annoksilla ja annostelujaksoilla.

#### 4.3 Testin koejärjestelyn merkitys

ASST:ä on aiemmin suoritettu hiirillä vaihdellen testin koevaiheiden määrää ja järjestystä, sillä hiirille ei ole olemassa vakiintunutta koejärjestelyä. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli pohtia testin koejärjestelyn vaikutusta hiirten tarkkavaisuuden säännön muodostuskykyyn. Eri tutkimuksissa käytettyjä ASST-koeolosuhteita ei ole aiemmin koottu yhteen (Taulukko 5). Vain muutamassa aiemmin toteutetussa tutkimuksessa on saatu näkyviin tilastollisesti merkitsevä ero ID- ja ED-vaihdosten välille, ja siten todistettu hiirten kykenevän muodostamaan säännön tarkkaavaisuuden kohteesta (Garner ym. 2006; Bissonette ym. 2008; Papaleo ym. 2008; Kos ym. 2010). Kaikissa näissä tutkimuksissa on ollut vähintään kuusi koevaihetta ennen ED-vaihdosta, joista vähintään yksi on ollut käänteinen koevaihe, sekä kriteerinä kahdeksan peräkkäistä tai kahdeksan oikeaa valintaa kymmenestä (8/10). Kaikissa tutkimuksissa käytetty hiirikanta oli C57. Nyt toteutettu tutkimus erosi onnistuneiden ryhmien kokoonpanosta lähinnä hiirikannan ja kriteerin osalta (Taulukko 8).

Taulukko 8. Tärkeiksi havaittujen koevaiheiden määrän ja järjestyksen sekä kriteerin vaikutus ID/ED eroon.

	<b>ERÄ 1</b>	<b>Erä 2</b>	<b>Erät 3 ja 4</b>
<b>MK-801 annos (i.p.)</b>	<b>0,03 mg/kg, 10 vrk, 2h ennen kokeen alkua</b>	<b>0,1 mg/kg, 10 vrk, 1h ennen kokeen alkua</b>	<b>0,1 mg/kg, 14 vrk, viimeinen annos 24h ennen SD-vaihetta</b>
<b>Käänteisten erottelutehtävien lkm</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>ED-vaihdosta edeltäneiden tehtävien lkm</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>ID-vaihdosten lkm</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Tehtävien toistot</b>	<b>Ei</b>	<b>Kyllä</b>	<b>Kyllä</b>
<b>Kriteeri</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>Tilastoll. merk. ID/ED- ero</b>	<b>–</b>	<b>–</b>	<b>– Kontrolli + MK-801</b>

Käänteisten koevaiheiden sisällyttäminen testiin näyttää olevan pakollista, jotta hiiret pystyvät muodostamaan säännön tarkkaavaisuuden kohteesta. Bissonetten ym. (2008) ja Garnerin ym. (2006) mukaan testiin tulee sisältyä ainakin yksi käänteinen koevaihe, jotta hiiri pystyy muodostamaan säännön siitä, mikä määrite on oleellinen. Bissonette ym. havaitsivat, että useampien kuin yhden käänteisen koevaiheen lisäämisellä ei ollut merkitystä ID-ED-eron kannalta. Kaikissa onnistuneissa tutkimuksissa (paitsi Bissonette ym.) testiin sisällytettiin enemmän kuin yksi käänteinen koevaihe (Taulukko 5). Tässä erikoistyössä toteutettuun tutkimukseen sisältyi yksi käänteinen koevaihe, mutta merkitsevää eroa ID4-ED-vaihdosten välillä ei silti saatu näkyviin. Tämä havainto poikkeaa aiemmista tutkimuksista. Kaikkiin koe-eriin sisältyi myös yksi käänteinen koevaihe, joten nyt ei voida tehdä päätelmiä siitä miten tämä käänteinen koe-vaihe vaikutti tuloksiin.

Bissonnetten ym. (2008) mukaan hiiret tarvitsevat vähintään seitsemän tehtävää ennen ED-vaihdosta, jotta ne pystyvät muodostamaan säännön tarkkaavaisuuden kohteesta Tehtävien toistojen (IDrep) ei havaittu vaikuttavan säännön muodostumiseen, mutta sen havaittiin vahvistavan sääntöä siten, että ID-ED-ero korostui. Garner ym. (2006) puolestaan havaitsivat, että erottelutehtävien toistoilla oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus säännön muodostumiseen. Tärkeintä heidän havainnoissaan oli se, että tarvitaan vähintään yksi käänteinen erottelutehtävä, jotta hiiret muodostaisivat säännön tarkkaavaisuuden kohteesta. Jos tätä käänteistä vaihetta ei ollut, IDrep ei yksin riittänyt vahvistamaan sääntöä siitä, mikä määrite oli aluksi oleellinen. Garnerin ym. tutkimuksessa saatiin ID- ja ED-vaihdosten välille merkitsevä ero ilman ED-vaihdosta edeltävää seitsemää tehtävää silloin, kun mukana oli yksikin koevaiheen toisto. Kyseisessä tutkimuksessa kuusi tehtävää ennen ED-vaihdosta oli riittävä. Bissonette ym. (2008) eivät sen sijaan saaneet merkitsevää eroa ID- ja ED-vaihdosten välille silloin, jos ED-vaihdosta edelsi vain viisi tehtävää ja yksi koevaiheentoisto IDrep. Kos ym. (2010) puolestaan saivat merkitsevän eron ID- ja ED-vaihdosten välille ilman tehtävien toistoja. Bissonnetten ym. havainnoista poiketen Kosin ym. tutkimuksessa käytettiin useita käänteisiä koevaiheita, jotka ilmeisesti vahvistivat hiirten säännön oppimista.

Tässä erikoistyössä toteutetun tutkimuksen koeasetelma oli puutteellinen, sillä erässä 1 käytettiin eri kriteeriä eriin 2, 3 ja 4 verrattuna. Erässä 1 ei käytetty tehtävien toistoja, kun taas muissa koe-erissä käytettiin. Erän 1 tuloksia ei voida täysin verrata muiden erien tuloksiin. Tämän vuoksi ei voida osoittaa, vahvistivatko tehtävien toistot hiirten tarkkaavaisuuden kohteen säännön oppimista tässä tutkimuksessa. Erissä 2, 3 ja 4, joihin sisältyi tehtävien toistoja SDrep, ID3rep, havaittiin kuitenkin suurempi ero ID4- ja ED- vaihdosten välillä kuin erässä 1 (Kuvat 6; a ja b; 7; a, ja b; 8; a ja b). Tämä saattaa antaa viitteitä siitä, että tehtävien toistoilla olisi merkitystä.

Tärkeä ero onnistuneisiin tutkimusryhmiin verrattuna – hiirikannan lisäksi – oli kriteeri oikeiden valintojen määrästä. Kriteerin tuli täytyä ennen kuin hiiret pääsivät siirtymään seuraavaan koevaiheeseen. Onnistuneissa tutkimuksissa kriteeri oli kahdeksan peräkkäistä tai kahdeksan oikeaa valintaa kymmenestä (8/10). Ensimmäisessä erässä kriteeri oli kahdeksan peräkkäistä oikeaa valintaa. Hiirillä kesti kuitenkin pitkään ennen

kuin ne pystyivät suorittamaan tehtävät loppuun asti, mikä havaittiin korkeina yrityskertojen lukumääränä erässä 1 (Kuva 6 a). Hiiret toimivat testin edetessä siten, että ne näyttivät oppineen tehtävän suorittamisen, mutta tehtyään esimerkiksi viisi tai kuusi peräkkäistä oikeaa valintaa ne tekivätkin virheellisen valinnan, johon ei näyttänyt olevan selvää syytä. Tämän vuoksi kriteeri muutettiin kahdeksasta peräkkäisestä kuuteen erissä 2, 3 ja 4. Myös alkuperäisessä rotilla tehdyssä tutkimuksessa kriteerinä käytettiin kuutta peräkkäistä oikeaa (Birrell ja Brown 2000), kuten ensimmäisessäkin hiiritutkimuksessa (Colacicco ym. 2002). Kriteeri voi vaikuttaa kuitenkin testin herkkyuteen ja tarkkuuteen. Garnerin (2006) mukaan eläimet oppivat nopeammin ja varmemmin jokaisen tehtävän ja muodostivat nopeammin myös säännön tarkkaavaisuuden kohteesta silloin, kun käytettiin kriteeriä 8/10. Kriteeri 8/10 antaa hiirille mahdollisuuden myös satunnaisiin virheisiin. Kriteerin valinta voi olla yksi syy siihen, että hiiret eivät luotettavasti pystyneet muodostamaan sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta nyt toteutetussa tutkimuksessa. Kriteerin vaikutusta kokeeseen voidaan testata suorittamalla koe sellaisella koeasetelmalla, jossa positiivinen kontrolliryhmä suorittaisi kokeen käyttäen kriteeriä 8/10 ja kaksi muuta ryhmää kriteereillä kahdeksan peräkkäistä tai kuusi peräkkäistä oikeaa valintaa. Ongelmaksi edelleen jää se, ettei voida varmasti sanoa, mikä koejärjestely olisi luotettavin.

Myös ASST:n eri erottelutehtävien ja vaihdosten ajoittaminen toisiinsa nähden saattaa vaikuttaa testin toimivuuteen. Useimmista aiemmista tutkimuksista ei käy ilmi miten koevaiheet on ajoitettu toisiinsa nähden. Nyt toteutetussa tutkimuksessa ID4- ja ED-vaihdokset toteutettiin samana päivänä. Erissä 1 ja 2 koevaiheet suoritettiin peräkkäin, kun taas erissä 3 ja 4 kaikkien koevaiheiden välillä pidettiin 1 h tauko. SDrep ja ID3rep suoritettiin seuraavana koepäivänä, kuin niitä vastanneet alkuperäiset koevaiheet (Kuva 5). Tämän ajoitusmallin tarkoituksena oli ”muistuttaa” hiiriä siitä, mitä edellisellä kerralla tehtiin ja vahvistaa sääntöä siitä, mihin määritteeseen tarkkuus oli alunperin tarkoitus kohdistaa. Jatkotutkimuksissa kannattaa komponenttien ajoitusta ja järjestystä vaihdella, jotta voitaisiin päätellä miten tehtävien ajoitus ja järjestys mahdollisesti vaikuttavat testin toimivuuteen. Useimmista aiemmista tutkimuksista ei käy ilmi miten pitkään kukin koe kesti, monelleko päivälle kokeet jaettiin tai montako hiirtä tutkittiin yhden koepäivän aikana. Garner (2006) totesi, että testi on erittäin hidas suorittaa. Kos ym. (2010) taas toteavat, että testi on nopea suorittaa hiirillä ja koko testi



olisi mahdollista toteuttaa kokonaisuudessaan kahden päivän aikana Tässä erikoistyössä toteutetun koejärjestelyn läpivienti vaati neljä työpäivää, kun totuttamis- ja harjoitteluvaiheita ei lasketa mukaan. Aiempien tutkimusten suorituksia on ollut vaikea verrata toisiinsa koejärjestelyjen kuvauksen vaihtelevan tarkkuuden vuoksi. Tutkimusryhmät ovat mahdollisesti käyttäneet samoja hiiriä yhä uudelleen testin suorittamisessa. Nyt toteutetussa tutkimuksessa, hiiret olivat naiiveja testin suorittamiseen. Testin luotettavuuden vuoksi näin tuleekin olla.

Tässä tutkimuksessa toteutuivat kaikki kirjallisuudessa mainitut ja tärkeiksi havaitut kokeen komponentit (Taulukot 5 ja 8). Tutkimuksessa käytettiin yhtä käänteistä erottelutehtävää CDR. Erissä 2, 3 ja 4 kokeeseen sisältyi kaksi koevaiheiden toistoa: SDrep ja ID3rep. Koejärjestelyn perusteella kokeen olisi pitänyt pystyä osoittamaan ero ID- ja ED-vaihdosten välillä. Suurin ero aiempiin – niin onnistuneisiin kuin epäonnistuneisiin – tutkimuksiin oli se, että nyt käytettiin eri hiirikantaa kuin muut. Koska hiirikantojen välillä on eroja kognitiossa ja NMDAR-antagonistien aiheuttamissa vaikutuksissa, on mahdollista, että nyt käytetty ulkosiittoinen ICR-hiirikanta ei kykene muodostamaan sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta, eikä näin ollen ei soveltuisi käytettäväksi ASST:ssä. Jos malli toimii ainoastaan yhdellä sisäsiittoisella hiirikannalla (C57), ei menetelmä ole kovinkaan luotettava tai käyttökelpoinen. On selvää, että eri hiirikantojen soveltuvuuden selvittämiseksi tarvitaan lisää tutkimuksia.

## 5 YHTEENVETO

Skitsofrenian lääkehoito kaipaava uusia lääkeinnovaatioita kognitiivisten oireiden lievittämiseksi. Uusien lääkeinnovaatioiden luomiseksi tarvitaan luotettavia kognitiivisia eläinmalleja. C57-hiirikannalla suoritettuna ASST:llä näyttää olevan jonkinasteista ennustavaa, rakenteellista, ja tunnistettavaa validiteettiä. Testin katsotaan vastaavan laajasti käytettyä kliinistä WCST-testiä ja mallintavan osaa niistä kognitiivista häiriöistä, joita skitsofreniaa sairastavilla havaitaan. ASST:ssä mitattavat kognitiiviset osa-alueet riippuvat toisiaan vastaavista aivoalueista ihmisillä ja hiirillä..

ASST ei kuitenkaan ole yleistettävissä muihin hiirikantoihin kuin kantaan C57. ASST on hyvin herkkä ulkoisille ja sisäisille muutoksille. Testin sisäistä ja ulkoista validiteettiä tuleekin tutkia lisää. Validoituna ASST tarjoaa mielenkiintoisen tulevaisuuden eläinmallin skitsofrenian kognitiivisten häiriöiden mallintamiseksi.

Tässä farmakologian erikoistyössä toteutetun tutkimuksen perusteella ICR-kannan hiiret kykenevät oppimaan ASST:n teknisen suorittamisen; hiiret valitsevat kahdesta kupista vihjeiden perusteella sen, josta palkinto löytyy ja osoittavat valintansa kaivamalla. Tutkimuksessa ei kuitenkaan onnistuttu osoittamaan ICR-hiirikannan soveltuvuutta ASST:iin. ICR-kannan hiiret eivät kyenneet muodostamaan sääntöä tarkkaavaisuuden kohteesta. Koeasetelmasta puuttui positiivinen kontrolli, joten ei voida luotettavasti tietää, johtuiko tulos kokeen suorituksesta vai itse hiirikannasta. Tosin aiemmin vain harvassa tutkimuksessa on havaittu tilastollisesti merkitsevä ero ID- ja ED-vaihdosten välillä, ja siten osoitettu hiirten kykenevän muodostamaan säännön tarkkaavaisuuden kohteesta. Nyt toteutetussa tutkimuksessa kontrolliryhmällä ei havaittu tällaista tarkkaavaisuuden kohdistamista määritteeseen, joka oli oleellinen palkkion löytymisen kannalta toistuvissa ID-vaihdoksissa. Kontrolliryhmän hiiret siirsivät huomionsa ”liian” helposti aiemmin epäoleelliseen määritteeseen, joten kyseistä toiminnanohjaukseen liittyvää kognitiivista kykyä ei pystytty tutkimaan ICR-hiirikannalla. Tämän tutkimuksen perusteella ei siis voida vetää johtopäätöksiä siitä, vaikuttiko NMDAR-antagonisti MK-801 subkroonisesti annosteltuna tähän kognition osa-alueeseen. MK-801 ei näyttänyt aiheuttavan sellaisia häiriöitä hiirten motoriikkaan tai motivaatioon, jotka olisivat vaikuttaneet testin läpiviemiseen. Käänteisten koevaiheiden (CDR) suorituksessa ei havaittu eroa MK-801- ja vertailuryhmien kesken. MK-801 ei aiheuttanut hiirille sellaisia kognition häiriöitä, jotka olisivat aiheuttaneen perseveraatiotaipumusta. Toisin sanoen aikaisemmin opitusta säännöstä pois oppiminen ei heikentynyt.

Kirjallisuuden ja nyt toteutetun tutkimuksen perusteella on ilmeistä, että ASST:n suorittaminen hiirillä vaatii lisää tutkimustietoa. Jatkotutkimusten tulisi keskittyä arvioimaan testin suoritettavuutta eri hiirikannoilla verraten niiden suoritusta C57-hiirikantaan, jolla testin kognitiivinen suoritettavuus on mahdollista. Jatkossa

kannattaa tarkastella myös testin eri tehtävien määrän, järjestyksen ja käytettävän kriteerin vaikutusta testin toimivuuteen.

## KIITOKSET

Haluan kiittää erikoistyöni ohjaajaa farmasian tohtori, dosentti Anni-Maija Lindeniä pitkäjänteisestä ohjauksesta. Kanssasi oli ilo työskennellä.

Lisäksi haluan kiittää farmakologian ja toksikologian osaston professoria Raimo Tuomista kannustavista yhteydenotoista sekä mahdollisuudesta tehdä pro-gradu - tutkielma laitoksen ulkopuolella.

Suuri kiitos kuuluu parhaimmalle ystävälleni elintarviketieteiden maisteri Sanna Luodolle loppumattomasta tsemppauksesta ja teknisestä avusta maapallon toiselta puolelta.

## KIRJALLISUUSLUETTELO

- Abi-Dargham A, Laruelle M: Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry* 20: 15-27, 2005
- Adell A, Jimenez-Sanchez L, Lopez-Gil X, Romon T: Is the acute NMDA receptor hypofunction a valid model of schizophrenia? *Schizophr Bull* 38: 9-14, 2011
- Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Goldberg T, Egan M, Pickar D, Breier A: Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 156: 1646-1649, 1999
- Allen AJ, Griss ME, Folley BS, Hawkins KA, Pearlson GD: Endophenotypes in schizophrenia: a selective review. *Schizophr Res* 109: 24-37, 2009
- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L: Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet* 40: 827-834, 2008
- Amitai N, Markou A: Disruption of performance in the five-choice serial reaction time task induced by administration of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: relevance to cognitive dysfunction in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 68: 5-16, 2010
- Amitai N, Semenova S, Markou A: Cognitive-disruptive effects of the psychotomimetic phencyclidine and attenuation by atypical antipsychotic medications in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 193: 521-537, 2007
- Arendt M, Mortensen PB, Rosenberg R, Pedersen CB, Waltoft BL: Familial predisposition for psychiatric disorder: comparison of subjects treated for cannabis-induced psychosis and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 65: 1269-1274, 2008
- Auclair AL, Besnard J, Newman-Tancredi A, Depoortere R: The five choice serial reaction time task: comparison between Sprague-Dawley and Long-Evans rats on acquisition of task, and sensitivity to phencyclidine. *Pharmacol Biochem Behav* 92: 363-369, 2009
- Ault DT, Werling LL: Phencyclidine and dizocilpine modulate dopamine release from rat nucleus accumbens via sigma receptors. *Eur J Pharmacol* 386: 145-153, 1999
- Axelrod J, Tomchick R: Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. *J Biol Chem* 233: 702-705, 1958
- Baddeley A: Working memory: looking back and looking forward. *Nat Rev Neurosci* 4: 829-839, 2003
- Barch DM, Sheline YI, Csernansky JG, Snyder AZ: Working memory and prefrontal cortex dysfunction: specificity to schizophrenia compared with major depression. *Biol Psychiatry* 53: 376-384, 2003
- Beck LH, Bransome ED, Mirsky AF, Rosvold HE, Sarason I: A continuous performance test of brain damage. *J Consult Psychol* 20: 343-350, 1956
- Bellack AS, Gold JM, Buchanan RW: Cognitive rehabilitation for schizophrenia: problems, prospects, and strategies. *Schizophr Bull* 25: 257-274, 1999

- Birrell JM, Brown VJ: Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J Neurosci* 20: 4320-4324, 2000
- Bissonette GB, Martins GJ, Franz TM, Harper ES, Schoenbaum G, Powell EM: Double dissociation of the effects of medial and orbital prefrontal cortical lesions on attentional and affective shifts in mice. *J Neurosci* 28: 11124-11130, 2008
- Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L: Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* 15: 339-343, 1978
- Brosnan-Watters G, Ogimi T, Ford D, Tatekawa L, Gilliam D, Bilsky EJ, Nash D: Differential effects of MK-801 on cerebrocortical neuronal injury in C57BL/6J, NSA, and ICR mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24: 925-938, 2000
- Brosnan-Watters G, Wozniak DF, Nardi A, Olney JW: Acute behavioral effects of MK-801 in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 701-711, 1996
- Bushnell PJ, Strupp BJ: Assessing attention in rodents. Kirjassa: *Methods of behavior analysis in neuroscience, 2. painos. Toim.* Buccafusco JJ, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton (FL) 2009
- Carboni G, Tueting P, Tremolizzo L, Sugaya I, Davis J, Costa E, Guidotti A: Enhanced dizocilpine efficacy in heterozygous reeler mice relates to GABA turnover downregulation. *Neuropharmacology* 46: 1070-1081, 2004
- Carli M, Robbins TW, Evenden JL, Everitt BJ: Effects of lesions to ascending noradrenergic neurones on performance of a 5-choice serial reaction task in rats; implications for theories of dorsal noradrenergic bundle function based on selective attention and arousal. *Behav Brain Res* 9: 361-380, 1983
- Chen CK, Lin SK, Sham PC, Ball D, Loh e, Murray RM: Morbid risk for psychiatric disorder among the relatives of methamphetamine users with and without psychosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 136B: 87-91, 2005
- Clarke PB, Reuben M: Inhibition by dizocilpine (MK-801) of striatal dopamine release induced by MPTP and MPP+: possible action at the dopamine transporter. *Br J Pharmacol* 114: 315-322, 1995
- Clinton SM, Meador-Woodruff JH: Abnormalities of the NMDA receptor and associated intracellular molecules in the thalamus in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 29: 1353-1362, 2004
- Colacicco G, Welzl H, Lipp HP, Wurbel H: Attentional set-shifting in mice: modification of a rat paradigm, and evidence for strain-dependent variation. *Behav Brain Res* 132: 95-102, 2002
- Collingridge G: Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330: 604-605, 1987
- Conn PJ, Pin JP: Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237, 1997
- Cornblatt B, Obuchowski M, Schnur DB, O'Brien JD: Attention and clinical symptoms in schizophrenia. *Psychiatr Q* 68: 343-359, 1997
- Cotman CW, Iversen LL: Excitatory amino acids in the brain - focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci* 10: 263-265, 1987

- Coyle JT: Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol* 26: 365-384, 2006
- Coyle JT, Balu D, Benneyworth M, Basu A, Roseman A: Beyond the dopamine receptor: novel therapeutic targets for treating schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* 12: 359-382, 2010
- Coyle JT, Tsai G, Goff D: Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 318-327, 2003
- Creese I, Burt DR, Snyder SH: Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192: 481-483, 1976
- Crow TJ: Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *Br Med J* 280: 66-68, 1980
- Dao-Castellana MH, Paillere-Martinot ML, Hantraye P, Attar-Levy D, Remy P, Crouzel C, Artiges E, Feline A, Syrota A, Martinot JL: Presynaptic dopaminergic function in the striatum of schizophrenic patients. *Schizophr Res* 23: 167-174, 1997
- Davis JM, Chen N, Glick ID: A meta-analysis of the efficacy of second-generation antipsychotics. *Arch Gen Psychiatry* 60: 553-564, 2003
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M: Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148: 1474-1486, 1991
- DeSteno DA, Schmauss C: Induction of early growth response gene 2 expression in the forebrain of mice performing an attention-set-shifting task. *Neuroscience* 152: 417-428, 2008
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61, 1999
- Dudchenko PA: An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 699-709, 2004
- Earle-Boyer EA, Serper MR, Davidson M, Harvey PD: Continuous performance tests in schizophrenic patients: stimulus and medication effects on performance. *Psychiatry Res* 37: 47-56, 1991
- Egerton A, Reid L, McGregor S, Cochran SM, Morris BJ, Pratt JA: Subchronic and chronic PCP treatment produces temporally distinct deficits in attentional set shifting and prepulse inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 198: 37-49, 2008
- Egerton A, Reid L, McKerchar CE, Morris BJ, Pratt JA: Impairment in perceptual attentional set-shifting following PCP administration: a rodent model of set-shifting deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 77-84, 2005
- Elliott R, McKenna PJ, Robbins TW, Sahakian BJ: Neuropsychological evidence for frontostriatal dysfunction in schizophrenia. *Psychol Med* 25: 619, 1995
- Fan J, McCandliss BD, Fossella J, Flombaum JJ, Posner MI: The activation of attentional networks. *Neuroimage* 26: 471-479, 2005
- FEY ET: The performance of young schizophrenics and young normals on the Wisconsin Card Sorting Test. *J Consult Psychol* 15: 311-319, 1951
- Floresco SB, Zhang Y, Enomoto T: Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res* 204: 396-409, 2009

- Garner JP, Thogerson CM, Wurbel H, Murray JD, Mench JA: Animal neuropsychology: validation of the Intra-Dimensional Extra-Dimensional set shifting task for mice. *Behav Brain Res* 173: 53-61, 2006
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR: Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 117-154, 2001
- Glickstein SB, Desteno DA, Hof PR, Schmauss C: Mice lacking dopamine D2 and D3 receptors exhibit differential activation of prefrontal cortical neurons during tasks requiring attention. *Cereb Cortex* 15: 1016-1024, 2005
- Goetghebuer P, Dias R: Comparison of haloperidol, risperidone, sertindole, and modafinil to reverse an attentional set-shifting impairment following subchronic PCP administration in the rat - a back translational study. *Psychopharmacology (Berl)* 202: 287-293, 2009
- Goff DC, Coyle JT: The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158: 1367-1377, 2001
- Gold JM, Carpenter C, Randolph C, Goldberg TE, Weinberger DR: Auditory working memory and Wisconsin Card Sorting Test performance in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 54: 159-165, 1997
- Goldman-Rakic PS: The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351: 1445-1453, 1996
- Goldman-Rakic PS: Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 6: 348-357, 1994
- Goldman-Rakic PS, Muly EC, Williams GV: D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 295-301, 2000
- Gottesman II, Gould TD: The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160: 636-645, 2003
- Grant DA, Berg EA: A behavioral analysis of degree of reinforcement and ease of shifting to new responses in a Weigl-type card-sorting problem. *J Exp Psychol* 38: 404-411, 1948
- Grayson B, Idris NF, Neill JC: Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. *Behav Brain Res* 184: 31-38, 2007
- Grottick AJ, Higgins GA: Effect of subtype selective nicotinic compounds on attention as assessed by the five-choice serial reaction time task. *Behav Brain Res* 117: 197-208, 2000
- Harrison PJ, Owen MJ: Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 361: 417-419, 2003
- Harvey PD, Keefe RS: Studies of cognitive change in patients with schizophrenia following novel antipsychotic treatment. *Am J Psychiatry* 158: 176-184, 2001
- Hashimoto K, Fujita Y, Shimizu E, Iyo M: Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol. *Eur J Pharmacol* 519: 114-117, 2005

- Hietala J, Syvalahti E, Vilkmann H, Vuorio K, Rakkolainen V, Bergman J, Haaparanta M, Solin O, Kuoppamaki M, Eronen E, Ruotsalainen U, Salokangas RK: Depressive symptoms and presynaptic dopamine function in neuroleptic-naive schizophrenia. *Schizophr Res* 35: 41-50, 1999
- Higgins GA, Enderlin M, Haman M, Fletcher PJ: The 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist M100,907 attenuates motor and 'impulsive-type' behaviours produced by NMDA receptor antagonism. *Psychopharmacology (Berl)* 170: 309-319, 2003
- Hoehn-Saric R, McLeod DR, Glowa JR: The effects of NMDA receptor blockade on the acquisition of a conditioned emotional response. *Biol Psychiatry* 30: 170-176, 1991
- Homayoun H, Moghaddam B: NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* 27: 11496-11500, 2007
- Hovatta I, Terwilliger JD, Lichtermann D, Makikyro T, Suvisaari J, Peltonen L, Lonnqvist J: Schizophrenia in the genetic isolate of Finland. *Am J Med Genet* 74: 353-360, 1997
- Hughes C, Kumari V, Soni W, Das M, Binneman B, Drozd S, O'Neil S, Mathew V, Sharma T: Longitudinal study of symptoms and cognitive function in chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 59: 137-146, 2003
- Humby T, Laird FM, Davies W, Wilkinson LS: Visuospatial attentional functioning in mice: interactions between cholinergic manipulations and genotype. *Eur J Neurosci* 11: 2813-2823, 1999
- Hustveit O, Maurset A, Oye I: Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, sigma and muscarinic receptors. *Pharmacol Toxicol* 77: 355-359, 1995
- Javitt DC, Zukin SR: Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148: 1301-1308, 1991
- Javitt DC, Zukin SR: Interaction of [3H]MK-801 with multiple states of the N-methyl-D-aspartate receptor complex of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 740-744, 1989
- Jentsch JD, Roth RH: The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20: 201-225, 1999
- Jentsch JD, Taylor JR, Roth RH: Subchronic phencyclidine administration increases mesolimbic dopaminergic system responsivity and augments stress- and psychostimulant-induced hyperlocomotion. *Neuropsychopharmacology* 19: 105-113, 1998
- Jentsch JD, Tran A, Le D, Youngren KD, Roth RH: Subchronic phencyclidine administration reduces mesoprefrontal dopamine utilization and impairs prefrontal cortical-dependent cognition in the rat. *Neuropsychopharmacology* 17: 92-99, 1997
- Keefe RS, Bilder RM, Davis SM, Harvey PD, Palmer BW, Gold JM, Meltzer HY, Green MF, Capuano G, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Davis CE, Hsiao JK, Lieberman JA: Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch Gen Psychiatry* 64: 633-647, 2007



- Keefe RS, Silva SG, Perkins DO, Lieberman JA: The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Schizophr Bull* 25: 201-222, 1999
- Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ: A test of the equal-environment assumption in twin studies of psychiatric illness. *Behav Genet* 23: 21-27, 1993
- Kleckner NW, Dingledine R: Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241: 835-837, 1988
- Kos T, Nikiforuk A, Rafa D, Popik P: The effects of NMDA receptor antagonists on attentional set-shifting task performance in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2010
- Krystal JH, Bennett A, Abi-Saab D, Belger A, Karper LP, D'Souza DC, Lipschitz D, Abi-Dargham A, Charney DS: Dissociation of ketamine effects on rule acquisition and rule implementation: possible relevance to NMDA receptor contributions to executive cognitive functions. *Biol Psychiatry* 47: 137-143, 2000
- Krystal JH, D'Souza DC, Karper LP, Bennett A, Abi-Dargham A, Abi-Saab D, Cassello K, Bowers MB, Jr, Vegso S, Heninger GR, Charney DS: Interactive effects of subanesthetic ketamine and haloperidol in healthy humans. *Psychopharmacology (Berl)* 145: 193-204, 1999
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr, Charney DS: Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51: 199-214, 1994
- Kumari V, Das M, Zachariah E, Ettinger U, Sharma T: Reduced prepulse inhibition in unaffected siblings of schizophrenia patients. *Psychophysiology* 42: 588-594, 2005
- Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA: Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13: 9-19, 1995
- Laurent A, Saoud M, Bougerol T, d'Amato T, Anchisi AM, Biloa-Tang M, Dalery J, Rochet T: Attentional deficits in patients with schizophrenia and in their non-psychotic first-degree relatives. *Psychiatry Res* 89: 147-159, 1999
- Laurent V, Podhorna J: Subchronic phencyclidine treatment impairs performance of C57BL/6 mice in the attentional set-shifting task. *Behav Pharmacol* 15: 141-148, 2004
- Lehtinen V, Joukamaa M, Lahtela K, Raitasalo R, Jyrkinen E, Maatela J, Aromaa A: Prevalence of mental disorders among adults in Finland: basic results from the Mini Finland Health Survey. *Acta Psychiatr Scand* 81: 418-425, 1990
- Li Z, Kim CH, Ichikawa J, Meltzer HY: Effect of repeated administration of phencyclidine on spatial performance in an eight-arm radial maze with delay in rats and mice. *Pharmacol Biochem Behav* 75: 335-340, 2003
- Lipton SA: Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* 16: 527-532, 1993
- Lodge D, Johnson KM: Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 11: 81-86, 1990
- Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R: Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 81: 363-369, 1959

- Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A: NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 14: 301-307, 1996
- Manahan-Vaughan D, von Haebler D, Winter C, Juckel G, Heinemann U: A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats. *Hippocampus* 18: 125-134, 2008
- Marcus MM, Jardemark KE, Wadenberg ML, Langlois X, Hertel P, Svensson TH: Combined alpha2 and D2/3 receptor blockade enhances cortical glutamatergic transmission and reverses cognitive impairment in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol* 8: 315-327, 2005
- McLean SL, Beck JP, Woolley ML, Neill JC: A preliminary investigation into the effects of antipsychotics on sub-chronic phencyclidine-induced deficits in attentional set-shifting in female rats. *Behav Brain Res* 189: 152-158, 2008
- Meltzer HY, Stahl SM: The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull* 2: 19-76, 1976
- Mouri A, Koseki T, Narusawa S, Niwa M, Mamiya T, Kano SI, Sawa A, Nabeshima T: Mouse strain differences in phencyclidine-induced behavioural changes. *Int J Neuropsychopharmacol* 1-13, 2011
- Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL, Snigdha S, Rajagopal L, Harte MK: Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: Focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther* 128: 419-432, 2010
- Norton N, Moskvina V, Morris DW, Bray NJ, Zammit S, Williams NM, Williams HJ, Preece AC, Dwyer S, Wilkinson JC, Spurlock G, Kirov G, Buckland P, Waddington JL, Gill M, Corvin AP, Owen MJ, O'Donovan MC: Evidence that interaction between neuregulin 1 and its receptor erbB4 increases susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B: 96-101, 2006
- O'Grada C, Dinan T: Executive function in schizophrenia: what impact do antipsychotics have? *Hum Psychopharmacol* 22: 397-406, 2007
- Olney JW, Farber NB: Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52: 998-1007, 1995
- Olney JW, Labruyere J, Price MT: Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 244: 1360-1362, 1989
- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB: NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 33: 523-533, 1999
- Olton DS, Werz MA: Hippocampal function and behavior: spatial discrimination and response inhibition. *Physiol Behav* 20: 597-605, 1978
- Paine TA, Carlezon WA: Effects of antipsychotic drugs on MK-801-induced attentional and motivational deficits in rats. *Neuropharmacology* 56: 788-797, 2009
- Paine TA, Tomasiewicz HC, Zhang K, Carlezon WA: Sensitivity of the five-choice serial reaction time task to the effects of various psychotropic drugs in Sprague-Dawley rats. *Biol Psychiatry* 62: 687-693, 2007

- Pantelis C, Barber FZ, Barnes TR, Nelson HE, Owen AM, Robbins TW: Comparison of set-shifting ability in patients with chronic schizophrenia and frontal lobe damage. *Schizophr Res* 37: 251-270, 1999
- Papaleo F, Crawley JN, Song J, Lipska BK, Pickel J, Weinberger DR, Chen J: Genetic dissection of the role of catechol-O-methyltransferase in cognition and stress reactivity in mice. *J Neurosci* 28: 8709-8723, 2008
- Perala J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuoppasalmi K, Isometsa E, Pirkola S, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, Hintikka J, Kieseppa T, Harkanen T, Koskinen S, Lonnqvist J: Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry* 64: 19-28, 2007
- Posner MI, Petersen SE: The attention system of the human brain. *Annu Rev Neurosci* 13: 25-42, 1990
- Ramoa AS, Alkondon M, Aracava Y, Irons J, Lunt GG, Deshpande SS, Wonnacott S, Aronstam RS, Albuquerque EX: The anticonvulsant MK-801 interacts with peripheral and central nicotinic acetylcholine receptor ion channels. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 71-82, 1990
- Riedel G, Platt B, Micheau J: Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140: 1-47, 2003
- Roberts AC, Robbins TW, Everitt BJ: The effects of intradimensional and extradimensional shifts on visual discrimination learning in humans and non-human primates. *Q J Exp Psychol B* 40: 321-341, 1988
- Rodefer JS, Murphy ER, Baxter MG: PDE10A inhibition reverses subchronic PCP-induced deficits in attentional set-shifting in rats. *Eur J Neurosci* 21: 1070-1076, 2005
- Rogers RD, Andrews TC, Grasby PM, Brooks DJ, Robbins TW: Contrasting cortical and subcortical activations produced by attentional-set shifting and reversal learning in humans. *J Cogn Neurosci* 12: 142-162, 2000
- Roth TL, Lubin FD, Sodhi M, Kleinman JE: Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790: 869-877, 2009
- Rund BR: A review of longitudinal studies of cognitive functions in schizophrenia patients. *Schizophr Bull* 24: 425-435, 1998
- Rund BR, Melle I, Friis S, Larsen TK, Midboe LJ, Opjordsmoen S, Simonsen E, Vaglum P, McGlashan T: Neurocognitive dysfunction in first-episode psychosis: correlates with symptoms, premorbid adjustment, and duration of untreated psychosis. *Am J Psychiatry* 161: 466-472, 2004
- Rutten BP, Mill J: Epigenetic mediation of environmental influences in major psychotic disorders. *Schizophr Bull* 35: 1045-1056, 2009
- Sams-Dodd F: Phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in rats: a possible animal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol* 7: 3-23, 1996
- Saperstein AM, Fuller RL, Avila MT, Adami H, McMahon RP, Thaker GK, Gold JM: Spatial working memory as a cognitive endophenotype of schizophrenia: assessing risk for pathophysiological dysfunction. *Schizophr Bull* 32: 498-506, 2006
- Seeman P: Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can J Psychiatry* 47: 27-38, 2002

- Seeman P: Atypical neuroleptics: role of multiple receptors, endogenous dopamine, and receptor linkage. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 358: 14-20, 1990
- Seillier A, Giuffrida A: Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: Divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801. *Behav Brain Res* 204: 410-415, 2009
- Silver H, Feldman P, Bilker W, Gur RC: Working memory deficit as a core neuropsychological dysfunction in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160: 1809-1816, 2003
- Snyder SH: The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry* 133: 197-202, 1976
- St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, Gosden C, Evans HJ: Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 336: 13-16, 1990
- Stahl SM: Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *CNS Spectr* 12: 265-268, 2007
- Stefansson H, Steinthorsdottir V, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K: Neuregulin 1 and schizophrenia. *Ann Med* 36: 62-71, 2004
- Steinpreis RE, Salamone JD: The role of nucleus accumbens dopamine in the neurochemical and behavioral effects of phencyclidine: a microdialysis and behavioral study. *Brain Res* 612: 263-270, 1993
- Suvisaari J: Uutta skitsofrenian riskitekijöistä. *Duodecim* 8: 869-76, 2010
- Thomson AM, West DC, Lodge D: An N-methylaspartate receptor-mediated synapse in rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature* 313: 479-481, 1985
- Tricklebank MD, Singh L, Oles RJ, Preston C, Iversen SD: The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol* 167: 127-135, 1989
- Tsuang M: Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry* 47: 210-220, 2000
- Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR: Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. *Schizophr Bull* 33: 69-94, 2007
- Tuulio-Henriksson A, Arajärvi R, Partonen T, Haukka J, Varilo T, Schreck M, Cannon T, Lonnqvist J: Familial loading associates with impairment in visual span among healthy siblings of schizophrenia patients. *Biol Psychiatry* 54: 623-628, 2003
- Tuulio-Henriksson A, Ilonen T, Pirkola T, Lonnqvist J: Neuropsykologia skitsofrenian tutkimuksessa ja hoidossa. *Duodecim* 116: 1453-8, 2000
- Waddington JL, Scully PJ, Quinn JF, Meagher DJ, Morgan MG: The origin and course of schizophrenia: implications for clinical practice. *J Psychiatr Pract* 7: 247-252, 2001
- van Rossum JM: The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 160: 492-494, 1966
- Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Lipska BK, Berman KF, Goldberg TE: Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50: 825-844, 2001

- Velligan DI, Bow-Thomas CC: Executive function in schizophrenia. *Semin Clin Neuropsychiatry* 4: 24-33, 1999
- Verma A, Moghaddam B: NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci* 16: 373-379, 1996
- Willetts J, Balster RL, Leander JD: The behavioral pharmacology of NMDA receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 11: 423-428, 1990
- Witt A, Macdonald N, Kirkpatrick P: Memantine hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov* 3: 109-110, 2004
- Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL: The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7104-7108, 1986
- Young JW, Powell SB, Risbrough V, Marston HM, Geyer MA: Using the MATRICS to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. *Pharmacol Ther* 122: 150-202, 2009

LIITTEET

LIITE 1 Tulokortti

Attentional Set Shifting Test (ASST)

Date:

Discrimination

Group O → M

Relevant: Right: Wrong:

Irrrelevant:

Mouse

1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		

Start time  
Stop time

Mouse

1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		

Start time  
Stop time