

The stress of panic: neuroendocrinological and neuroimmunological studies in Panic Disorder

Citation for published version (APA):

van Duinen, M. A. (2005). The stress of panic: neuroendocrinological and neuroimmunological studies in Panic Disorder. Maastricht: Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2005

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Panic Disorder (PD) is an anxiety disorder, characterised by sudden spells of acute fear or discomfort, referred to as panic attacks (PAs). Considering the symptoms and cognitions of a PA, the resemblance with a normal fear response or classic stress response might seem obvious. However, considering the neuroendocrinological and neuroimmunological aspects the comparison with fear might be less straightforward. The current thesis focusses on these aspects.

Chapter one provides a general introduction into the different subjects of the thesis. From a symptomatological point of view, panic can be compared to fear. This would implicate that certain characteristic features of an acute fear response might also be implemented in panic. Characteristic for fear is the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA-) axis response. Studies in panic measuring HPA-axis activity have shown inconsistent results. Basal HPA-axis functioning, the HPA-axis response following real-life PAs, and the HPA-axis response following laboratory induced panic are discussed. A scala of experimental models exist that have been developed to study panic. However, most of these models lack specificity. Lactate infusion, cholecystokinin-4 infusion and particularly carbon dioxide (CO₂) inhalation seem to be the most promising methods. These models can be applied to study the underlying mechanisms of panic. HPA-axis hormone levels can be assessed to gain insight into the issue of the relationship between panic and fear. Not only HPA-axis activity can be measured to serve this purpose, also other stress response systems are known to show altered activity in periods of stress. In fact, evidence exists of intense reciprocal communication between the HPA-axis and the immune system. In psychiatric research, studies in psychoneuroimmunology have been performed mainly in major depression. Findings in PD are scarce and scanty, and only apply to the basal conditions.

The following four chapters describe a series of related experimental studies in which the HPA-axis response following panic induction is monitored.

Chapter two focusses on the occurrence of a cortisol response following the 35% CO₂ challenge in healthy volunteers. Former studies have shown that, in general, healthy volunteers do not react with high levels of anxiety as measured on the Visual Analogue Scale of Anxiety (VAAS). Also, the physical symptoms that are evoked in these subjects do not seem to be very stressful. From this, it might be expected that the 35% CO₂ inhalation will not increase cortisol release. However, literature is not consistent in this matter. Methodological differences seem to account for most of the inconsistencies. In accordance with our hypothesis, we found no cortisol increase following 35% CO₂ inhalation. However, the methods used in this study were somewhat crude. Therefore, it warrants replication in a methodologically stronger study.

In chapter three, the sample with healthy subjects is extended with a group of matched PD patients. The 35% CO₂ challenge is especially relevant for PD patients. In this chapter, the issue of panic being equal to fear, is addressed in this population. Most PD patients experienced an experimental PA, whereas only one healthy subject did. In other words, the patient group was significantly more affected than the controls, especially with regard to the anxiety levels. However, the cortisol response of the patients equalled the controls' response. Therefore, these results seem to support the hypothesis that fear and panic are different entities that probably rely on different brain circuits.

Chapter four provides a second study on the neuroendocrinological response to 35% CO₂ inhalation in healthy volunteers. Compared to the first study, some methodological improvements were implemented. Furthermore, disturbances at higher levels of the HPA-axis

might prevent initial activation from being expressed in cortisol release, which might erroneously lead to the conclusion that the HPA-axis is not activated. We therefore also included ACTH measurements.

In contrast with our former study in healthy volunteers (chapter 2), there was a significant increase in cortisol values accompanied by a proportional ACTH response. Although this might seem unexpected, this difference can be subscribed to the methodological improvements. This suggests that 35% CO₂ inhalation is accompanied by cortisol release even in modestly reacting healthy subjects. Even though this increase is statistically significant, from a clinical point of view, the magnitude is quite modest. In other words, in healthy subjects 35% CO₂ inhalation induces modest feelings of anxiety with a corresponding small increase in ACTH and cortisol levels.

In chapter five the neuroendocrinological response of PD patients and healthy subjects is compared, also using the improved design. The modest increase in ACTH and cortisol levels that we described in healthy subjects before, was now found in the PD patients as well. Despite the significant difference in anxiety levels, there was no difference in the neuroendocrinological responses between the two groups, which is in agreement with our former results in PD patients. Even though 35% CO₂ inhalation apparently does induce some HPA-axis activation, it does not induce a classic stress response, which is characterised by a strong HPA-axis response. If panic would be an extreme form of normal fear, robust increases in cortisol and ACTH levels should be expected in the patient group. It is proposed that this could either be the result of subsensitisation, or that panic is a separate entity, distinguished by its lack of HPA-axis activity. The apparent 'spontaneousness' is a characteristic feature of panic. Initially, there seems to be no assignable external trigger, which suggests that internal disturbances trigger a PA. Hypothetically, this could explain the absence of the HPA response: how could one flee from or fight an internal stressor? From this, it can be expected that in other anxiety disorders, where fear is elicited by external stressors such as specific phobias, confrontation with the feared stimulus is accompanied by HPA-axis activation.

This hypothesis is put to the test in chapter six. Sixteen spider phobic subjects and a matched control group were exposed to different conditions involving spiders in a standardised paradigm. Saliva was sampled for cortisol determination as an index of HPA-axis activity.

Subjective fear was significantly increased in the phobics as compared to the controls. However, their cortisol levels remained unaffected. This phenomenon has been described as 'desynchrony of fear'. Putatively, ancient fears that no longer provide survival benefits, such as fear for spiders, are subjected to an ongoing process of progressive extinction of which the disappearance of the HPA component may be a forerunner. Another possibility would be that these phobias, like PD, represent a separate entity with specific pathophysiological properties. In chapter seven and eight, the focus shifts to another stress responsive system that is strongly connected to the neuroendocrinological system: the immune system.

Chapter seven provides a review of the literature on immunological variables in PD. Only a limited number of studies has been performed on this topic with various methodological designs, small patient groups and several variables. The majority of these studies showed no clear differences in immune levels between PD patients and controls. Only two parameters, B-lymphocyte counts and HLA-DR cells, showed increased levels in the patients group as compared with the controls. Probably, the increase in HLA-DR cells is directly related to the increase in B-cells, since this marker is expressed on B-cells. The implication of this finding is unclear, although it is potentially important since the same has been found in major

depression. The increase in B-cell numbers was not reported to be accompanied by increased proliferative responses in response to mitogen stimulation, which might be expected in view of the signs of increased immune activation. Possibly, this is the result of functional exhaustion of the B-cells.

All of the studies that were included in the review compared basal values of the immune variables. However, PD is characterised by sudden spells of acute fear or discomfort limited in time. It is conceivable that immune changes are more pronounced directly following a PA and do not persist. In the next chapter, this subject is addressed.

In chapter eight the 35% CO₂ challenge is applied to study the direct effect of panic on the functional capacity of the immune system. Eighteen panic disorder patients and eighteen controls were included. Blood samples were taken at fixed time intervals before and after the challenge. Determinations of acute phase proteins were performed in serum, and cytokines were determined both in serum samples and following mitogen stimulation. The results showed no sign of panic-induced, altered immune functioning. This is in line with findings in social phobia (SP) in which no changes in immune functioning were found either. On the other hand, in other affective disorders such as major depression and post-traumatic stress disorder (PTSD), signs of immune disturbances have been found. In major depression, ongoing inflammatory processes are present, whereas in PTSD decreased immune functioning is found. It is suggested that these changes might be related to changes in HPA-axis functioning. In depression and PTSD, respectively increased and decreased HPA-axis functioning have indeed been found. In accordance, in PD and SP, both HPA-axis and immune functioning seem to be normal. Disturbances in the neuroendocrinological system related to disturbances in the immune system might therefore play a role in some, but not all affective disorders.

Chapter nine provides a general discussion that integrates the results of the different chapters. Neither panic nor phobic fear equal normal fear or stress, as evidenced by a lack of HPA-axis activity. It has been hypothesised that in both these disorders, cortisol release and the resulting mobilisation of energy resources would be maladaptive. In case of spider phobia, cortisol release would be maladaptive, since it no longer promotes survival. Therefore, the potential benefits do not counterbalance the costs of energy expenditure. Panic would normally be induced in case of suffocation. Maintaining a low level of energy expenditure in that specific situation, would be adaptive. A similar response would occur in the immune system. The close physiological link between the two stress-responsive systems can be explained by the theory that the classic defensive response emerged from the immune system.

Furthermore, some suggestions for future research are proposed. Results obtained with laboratory models should preferably be verified in real-life situations. PAs during sleep might offer a promising natural model in this respect since influences of environmental factors can be avoided.

With regard to phobias, it was suggested that HPA-axis activity extinguished in phobias with phylogenetically ancient contents. This implies that phobias with an ontogenetically based content are accompanied by HPA-axis activation, which could relatively easily be examined. Neuroendocrinological research in panic still offers new challenges. It has been found that following lactate infusion in PD patients and controls, atrial natriuretic hormone (ANH) levels increased more in the patient group. ANH exerts an inhibiting effect on cortisol and ACTH release and therefore can account for the lack of HPA-axis activity that we found. A similar study is currently underway in our laboratory using the 35% CO₂ challenge.

Samenvatting

De Paniekstoornis (Eng.: Panic Disorder: PD) is een angststoornis die gekenmerkt wordt door plotselinge aanvallen van acute vrees¹ of ongemak, die paniekaanvallen (PAs) genoemd worden. Gezien de symptomen en de cognities van een PA, lijkt de vergelijking met een normale vrees respons of klassieke stress respons voor de hand liggend. Echter, als we kijken naar de neuroendocrinologische en neuroimmunologische aspecten is de vergelijking met vrees minder evident. Het huidige proefschrift richt zich op deze aspecten.

Hoofdstuk één is een algemene introductie op de verschillende onderwerpen in het proefschrift. Vanuit een symptomatologisch perspectief gezien, kan paniek vergeleken worden met vrees. Een gelijkenis zou impliceren dat bepaalde karakteristieke eigenschappen van een acute vrees respons ook aanwezig zijn bij paniek. Kenmerkend voor vrees is de hypothalamus-hypofyse-bijnier as respons (Eng.: hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA-axis). Onderzoek naar het fenomeen paniek waarin HPA-as activiteit werd gemeten leverde inconsistente resultaten op. Basale HPA-as functie, de HPA-as respons op natuurlijke PAs en de HPA-as respons volgend op experimenteel geïnduceerde paniek worden bediscussieerd. Er bestaat een scala aan experimentele modellen dat gebruikt wordt om paniek te bestuderen. Echter, de meeste van deze modellen zijn weinig specifiek. Lactaat infusie, cholecystokinine-4 infusie en in het bijzonder koolstofdioxide (CO₂) inhalatie lijken de meest veelbelovende modellen. Deze modellen kunnen gebruikt worden om de onderliggende mechanismen van paniek te bestuderen. HPA-as hormoon niveaus kunnen worden bepaald om inzicht te verkrijgen in de relatie tussen paniek en vrees. Niet alleen HPA-as activiteit kan gemeten worden in dit opzicht, ook van andere stress-responsieve systemen is bekend dat hun activiteit verandert ten tijde van stress. Het is zelfs zo dat er bewijs bestaat van intensieve wederkerige communicatie tussen de HPA-as en het immuun systeem. In het psychiatrische onderzoeksveld zijn neuroimmunologische studies hoofdzakelijk uitgevoerd bij depressie. Bevindingen in het veld van PD zijn schaars en hebben alleen betrekking op de basale toestand van deze aandoening en niet op de kern: de paniekaanvallen.

De volgende vier hoofdstukken beschrijven een serie gerelateerde experimentele studies waarbij de HPA-as respons op paniek-inductie gevolgd wordt.

Hoofdstuk twee richt zich op het vóórkomen van een cortisol respons volgend op de 35% CO₂ challenge bij gezonde vrijwilligers. Voorgaande studies hebben aangetoond dat, over het algemeen, gezonde vrijwilligers niet met hoge mate van angst reageren zoals gemeten op de Visual Analogue Scale of Anxiety (VAAS). Eveneens lijken de lichamelijke symptomen die bij deze proefpersonen worden opgewekt niet erg stressvol te zijn. Om deze reden mag verwacht worden dat de 35% CO₂ inhalatie de cortisol afgifte niet zal doen toenemen. Echter, de literatuur is hier niet consistent over. Methodologische verschillen lijken de meeste inconsistenties te kunnen verklaren. In overeenstemming met onze hypothese, vonden we geen toename in cortisol niveaus na 35% CO₂ inhalatie. Echter, de methoden die in deze studie gebruikt werden, bleken achteraf onvoldoende verfijnd. Om deze reden zou deze studie gerepliceerd moeten worden in een methodologisch sterker onderzoek.

¹ Aangezien getracht wordt een onderscheid te maken tussen 'fear' en 'anxiety' is er bij deze vertaling voor gekozen het Engelse 'fear' te vertalen met het misschien iets minder gebruikelijke 'vrees'. Zie ook de algemene inleiding van dit proefschrift voor een toelichting op het onderscheid in betekenis van deze begrippen.

In hoofdstuk drie wordt de groep gezonde proefpersonen uitgebreid met een groep gematchte PD patiënten. De 35% CO₂ challenge is immers vooral relevant voor PD patiënten. In dit hoofdstuk wordt het vraagstuk of paniek gelijk is aan vrees, behandeld in deze populatie. De meeste PD patiënten ervoeren een experimentele PA, terwijl dat slechts bij één gezonde vrijwilliger het geval was. Met andere woorden, de patiënten groep was significant gevoeliger dan de controles, vooral wat betreft de angst niveaus. Echter, de cortisol respons van de patiënten verschilde niet van die van de controles. Derhalve lijken deze resultaten de hypothese dat vrees en paniek verschillende entiteiten zijn, die waarschijnlijk geassocieerd zijn met verschillende netwerken in de hersenen, te ondersteunen.

Hoofdstuk vier omvat een tweede studie over de neuroendocrinologische respons op 35% CO₂ inhalatie bij gezonde vrijwilligers. In vergelijking met de eerste studie zijn er echter enkele methodologische verbeteringen aangebracht. Daarnaast is het zo dat verstoringen op de hogere niveaus van de HPA-as ervoor kunnen zorgen dat initiële activatie niet tot uitdrukking komt in cortisol afgifte. Dit zou onterecht tot de conclusie kunnen leiden dat de HPA-as niet geactiveerd wordt. Om die reden hebben wij ook ACTH bepalingen gedaan.

In tegenstelling tot onze vorige studie bij gezonde vrijwilligers (hoofdstuk 2), was er wel een significante toename in cortisol waarden gepaard aan een evenredige ACTH respons. Dit mag op het eerste gezicht onverwacht lijken, maar het verschil kan toegeschreven worden aan de methodologische verbeteringen. Dit suggereert dat 35% CO₂ inhalatie gepaard gaat met cortisol secretie bij matig reagerende gezonde vrijwilligers. Alhoewel statistisch significant, is de toename vanuit klinisch perspectief beperkt. Met andere woorden, 35% CO₂ inhalatie induceert bij gezonde vrijwilligers beperkt gevoelens van angst, samengaan met een bescheiden toename in ACTH en cortisol niveaus.

In hoofdstuk vijf wordt de neuroendocrinologische respons van PD patiënten en gezonde vrijwilligers vergeleken waarbij eveneens het verbeterde design wordt toegepast. De bescheiden toename in ACTH en cortisol niveaus die we eerder beschreven bij gezonde vrijwilligers, werd nu ook bij PD patiënten gevonden. Ondanks het significante verschil in angst niveaus, was er geen verschil tussen de groepen wat betreft de neuroendocrinologische responsen. Dit is in overeenstemming met onze vorige resultaten bij PD patiënten. Alhoewel 35% CO₂ inhalatie schijnbaar enige mate van HPA-as activatie veroorzaakt, induceert het geen klassieke stress respons, die juist gekarakteriseerd wordt door sterke HPA-as activatie. Wanneer paniek een extreme vorm van normale vrees zou zijn, zou er een sterke toename in cortisol en ACTH niveaus verwacht worden in de patiënten groep. Een dergelijke toename treedt echter niet op. Dit zou een gevolg kunnen zijn van subsensitatie, maar mogelijk is paniek een aparte entiteit, die zich juist onderscheidt door de afwezigheid van HPA-as activatie.

Het schijnbaar spontane optreden is een kenmerkende eigenschap van paniek. Er lijkt geen aanwijsbare externe trigger te zijn, wat suggereert dat inwendige verstoringen een PA veroorzaken. Dit zou hypothetisch de afwezigheid van de "fight-flight" respons met HPA-as activatie kunnen verklaren: hoe zou men kunnen vluchten voor, of vechten tegen een inwendige stressor? Derhalve kan verwacht worden dat bij andere angststoornissen waar de angst opgewekt wordt door externe stressoren, zoals bij specifieke fobieën, confrontatie met de gevreesde stimulus wel gepaard gaat met HPA-as activatie.

Deze hypothese wordt getest in hoofdstuk zes. Zestien spin fobici en een gematchte controle groep werden in een gestandaardiseerd paradigma blootgesteld aan verschillende condities waarbij spinnen betrokken waren. Speeksel werd verzameld voor cortisol bepalingen om een

index van HPA-as activiteit te verkrijgen. De fobici hadden significant hogere niveaus van vrees dan de controles. Echter, het cortisol niveau van beide groepen bleef onveranderd. Dit fenomeen is eerder beschreven als 'desynchrony of fear'. Vermoedelijk zijn deze 'oude' angsten, die de kans op overleving niet langer vergroten, onderhevig aan een doorlopend proces van progressieve extinctie, waarvan het verdwijnen van de HPA-as component een voorloper zou kunnen zijn. Een andere mogelijkheid is dat deze fobieën, net zoals PD, een aparte eenheid vormen met specifieke pathofysiologische eigenschappen.

In hoofdstuk zeven en acht ligt de nadruk op een ander stress-responsief systeem dat sterk verbonden is met het neuroendocrinologische systeem: het immuun systeem.

Hoofdstuk zeven verschafft een overzicht van de literatuur over de rol van immunologische variabelen bij PD. Slechts een beperkt aantal studies zijn verschenen over dit onderwerp, met verschillende methodologische designs, kleine patiënten groepen en verscheidene variabelen. De meerderheid van deze studies toonde geen duidelijk verschil aan in niveaus van immuun variabelen tussen PD patiënten en controles. Slechts twee parameters; B-lymfocyt tellingen en HLA-DR cellen, waren verhoogd in de patiënten groep ten opzichte van de controles. Mogelijk is de toename in HLA-DR cellen direct gerelateerd aan de toename in B-cellen, aangezien deze marker tot expressie wordt gebracht op B-cellen. De implicatie van deze bevinding is onduidelijk, alhoewel het potentieel belangrijk is gezien het feit dat dezelfde bevinding is gedaan bij depressie. De toename in B-cel aantallen ging niet gepaard met een toename van de proliferatie capaciteit in respons op mitogeen stimulatie, hetgeen wel verwacht zou kunnen worden in het kader van de gevonden tekenen van verhoogde immuun activatie. Mogelijk is dit het resultaat van functionele uitputting van de B-cellen.

Alle onderzoeken die in het literatuuroverzicht opgenomen waren, vergeleken basale waarden van de immuun variabelen. PD wordt echter gekenmerkt door plotselinge aanvallen van acute vrees of ongemak die beperkt zijn in tijd. Het is aannemelijk dat veranderingen in het immuun systeem duidelijker aanwezig zijn direct na een PA en vervolgens weer verdwijnen. In het volgende hoofdstuk zal aandacht besteed worden aan dit onderwerp.

In hoofdstuk acht wordt de 35% CO₂ challenge toegepast om het directe effect van paniek op de functionele capaciteit van het immuun systeem te onderzoeken. Achttien paniekstoornis patiënten en achttien controle personen werden geïncludeerd. Op vastgestelde tijdsintervallen voor en na de challenge werden bloed samples genomen. De bepalingen van acute fase eiwitten werden in serum gedaan, en cytokine niveaus werden gemeten zowel volgend op mitogeen stimulatie als in serum monsters. De resultaten lieten geen tekenen zien van paniekgeïnduceerde veranderingen in immuun functioneren. Dit is in overeenstemming met bevindingen bij sociale fobie (SP) waarbij ook geen veranderingen in immuun functioneren werden gevonden. Daarentegen, bij andere affectieve stoornissen, zoals depressie en post-traumatische stress stoornis (PTSD), zijn wel verstoringen in het immuun systeem aangetoond. Bij ernstige depressie is er sprake van aanhoudende ontstekingsprocessen, terwijl bij PTSD juist verminderd immuun functioneren is gevonden. Er is gesuggereerd dat deze veranderingen gerelateerd zouden zijn aan veranderingen in het HPA-as functioneren. Bij depressie en PTSD zijn inderdaad respectievelijk verhoogd en verlaagd HPA-as functioneren gevonden. De verstoringen van het endocriene en het immunologische systeem lijken met andere woorden parallel te lopen. In overeenstemming hiermee lijken bij PD en SP zowel het HPA-as als het immuun functioneren normaal. Verstoringen in het neuroendocrinologische systeem, gerelateerd aan verstoringen in het immuun systeem zouden daarom een rol kunnen spelen bij sommige, maar niet alle affectieve stoornissen.

Hoofdstuk negen omvat een algemene discussie die de resultaten van de verschillende hoofdstukken integreert. Noch paniek, noch fobische vrees is gelijk aan "normale" vrees of stress, wat blijkt uit het uitblijven van verhoogde HPA-as activiteit. Verondersteld wordt dat bij deze twee stoornissen cortisol afgifte en de daarop volgende mobilisatie van energie voorraden, juist ongewenst zou zijn. In het geval van de spin fobie zou het ongewenst zijn omdat het de overlevingskansen niet vergroot. Hierdoor zou het mogelijke voordeel niet opwegen tegen de verspilling van energie. Paniek zou normaal gesproken ontstaan in het geval van verstikking. In die specifieke situatie zou een laag energie verbruik het gunstigst zijn. Een zelfde respons zou plaatsvinden binnen het immuun systeem. De hechte fysiologische link tussen de twee stress-responsieve systemen kan verklaard worden door de theorie dat de klassieke defensieve endocriene respons ontstaan is vanuit het immuun systeem.

Verder worden nog enkele voorstellen gedaan voor vervolgonderzoek. Resultaten die verkregen zijn met laboratorium modellen zouden bij voorkeur geverifieerd moeten worden in situaties uit het dagelijks leven. PAs tijdens de slaap vormen in dit opzicht een veelbelovend natuurlijk model aangezien de invloed van omgevingsfactoren vermeden kan worden. Wat betreft fobieën is gesuggereerd dat HPA-as activiteit verdwenen is bij fobieën met een fylogenetisch 'oude' inhoud. Dit impliceert dat fobieën met een ontogenetisch gebaseerde inhoud wel gepaard gaan met HPA-as activatie, hetgeen relatief gemakkelijk onderzocht zou kunnen worden.

Neuroendocrinologisch onderzoek bij paniek biedt nog steeds nieuwe uitdagingen. Volgend op lactaat infusie werd gevonden dat bij PD patiënten niveaus van 'atrial natriuretisch hormoon' (ANH) sterker stegen dan bij controle personen. ANH heeft een remmende invloed op de cortisol en ACTH afgifte en zou daardoor verantwoordelijk kunnen zijn voor het uitblijven van een HPA-as respons, zoals in ons onderzoek. Een vergelijkbare studie wordt momenteel opgezet in ons laboratorium waarbij gebruik zal worden gemaakt van de 35% CO₂ challenge.