



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie

Wydział Biologii

Neurobiologia

**Wpływ zahamowania endogennego układu opioidowego na  
interakcje społeczne u myszy**

Magdalena Chrószcz

Praca licencjacka

wykonana pod opieką

dr hab. Jana Rodrigueza Parkitny

w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej

Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN

Kraków 2020

*Pragnę serdecznie podziękować:*

*Promotorowi,  
Panu dr hab. Janowi Rodriguezowi Parkitnie  
Za możliwość realizacji tej pracy,  
Okazaną pomoc i życzliwość*

*Pani dr Zofii Hardej  
Za wprowadzenie w techniki badań na zwierzętach,  
Dzielenie się wiedzą i doświadczeniem*

*Panu mgr Łukaszowi Szumcowi  
Oraz Pani mgr Klaudii Misiołek  
Za nieocenioną pomoc w przeprowadzeniu doświadczeń.*

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	2
Streszczenie .....	3
Abstract .....	4
1. Wstęp .....	5
1.1. Zachowania społeczne .....	5
1.2. Budowa endogennego układu opioidowego .....	7
1.3. Rola układu opioidowego w regulacji zachowań społecznych .....	8
2. Cel pracy .....	15
3. Materiały i metody .....	16
3.1. Zwierzęta .....	16
3.2. Leki .....	16
3.3. Test interakcji społecznej w otwartym polu .....	16
3.4. Test interakcji społecznej z przegrodą .....	18
3.5. Analiza statystyczna .....	19
4. Wyniki .....	20
4.1. Wpływ nalmefenu na interakcje społeczne .....	20
4.2. Wpływ uszkodzenia genu <i>Penk</i> na interakcje społeczne .....	24
5. Dyskusja .....	28
Spis rycin i tabel .....	32
Bibliografia .....	32

## Wykaz skrótów

ASD – zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. *Autism Spectrum Disorder*)

BOTSA – opioidowa teoria przywiązania (ang. *Brain Opioid Theory of Social Attachment*)

CPP – test warunkowanej preferencji miejsca (ang. *Conditioned Place Preference*)

NAc – jądro pólężące (ang. *Nucleus Accumbens*)

SEM – błąd standardowy średniej (ang. *Standard Error Mean*)

wt – typ dziki (ang. *Wild Type*)

## Streszczenie

Interakcje społeczne są zachowaniami polegającymi na bezpośrednim, odwzajemnionym kontakcie z innym osobnikiem. Umiejętność prawidłowego dostosowania zachowania do charakteru interakcji umożliwia tworzenie więzi międzyosobniczych oraz zwiększa dostosowanie zwierząt. Opioidowa teoria przywiązania opierając się na podobieństwach pomiędzy tworzeniem więzi, a rozwojem uzależnień przypisuje szczególną rolę w regulacji obu procesów endogennemu układowi opioidowemu. Dostępna literatura wskazuje na szczególne znaczenie receptora opioidowego  $\mu$  w regulacji nagradzających aspektów afiliacyjnych interakcji między osobnikami oraz rozpoznawaniu nowych bodźców o charakterze społecznym. W ramach przeprowadzonych doświadczeń przeanalizowano wpływ zahamowania endogennego układu opioidowego na interakcje społeczne pomiędzy nieznanymi osobnikami tej samej płci u myszy. Zahamowanie funkcji układu badano poprzez podanie myszom obu płci nieselektywnego antagonisty receptorów opioidowych – nalmefenu oraz wykorzystując samice szczepu z genetyczną modyfikacją skutkującą obniżeniem poziomu enkefalin. Na zwierzętach przeprowadzono testy interakcji w otwartym polu oraz w klatce z przegrodą między osobnikami. Podanie nalmefenu wywołało wydłużenie czasu w interakcji w teście otwartego pola. Efekt nalmefenu w zastosowanej dawce (1 mg/kg) był zależny od płci i został zaobserwowany tylko u samic. U samic nalmefen wpłynął także na wydłużenie czasu eksploracji centrum otwartego pola. Nie zaobserwowano wpływu spadku poziomu enkefalin na długość interakcji, ani na czas spędzony w centrum otwartego pola. Wyniki testów w klatce z przegrodą nie wykazały różnic pomiędzy grupami. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły, że układ opioidowy może wpływać na motywację do podejmowania interakcji społecznych. Dalsze badania pozwolą na określenie, czy efekt podania nalmefenu u samic mógł być skutkiem jego potencjalnych właściwości przeciwlękowych, umożliwią porównanie różnic płciowych w odpowiedzi na lek w zależności od zastosowanej dawki, a także pozwolą na dokładniejsze scharakteryzowanie zmian wywołanych spadkiem poziomu enkefalin.

Słowa kluczowe: interakcja społeczna, endogenne układy opioidowe, receptory opioidowe, enkefaliny

## Abstract

Social behaviours include all forms of conscious contact between conspecific animals. The ability to adjust social behaviour to circumstances and form bonds is adaptive and plays a major role in evolutionary fitness. The mechanisms controlling social behaviour are complex, rely on a combination of multiple signalling pathways in the brain and remain only partly understood. One of the hypotheses, the Brain Opioid Theory of Social Attachment (BOTSA), based on similarities between development of addiction and social bonding posits that endogenous opioid system could play a major role in controlling brain activity related to social contact. Accordingly, some reports indicate a strong involvement of  $\mu$  opioid receptors on rewarding properties of affiliative social behaviours or discrimination of novel social stimuli. Here, I assess the effect of endogenous opioid signalling on non-aggressive social interactions between same-sex conspecifics. I tested the effects of treatment with nalmefene, an unspecific opioid ligand on social behaviour in male and female C57BL/6N mice, as well as female genetically modified mice with minimal expression of the *Penk* gene. Social behaviours were studied using open field and partition test. A single treatment with nalmefene (1 mg/kg) an hour before social contact caused an increase in the time spent by female mice in close contact in the open field. However, there was no significant effect on the social behaviour in nalmefene-treated male mice, nor in female mice with a mutation in the *Penk* gene. Additionally, nalmefene-treated females showed an increase of time spent in the central part of the cage, which might be indicative of anxiolytic effect of the compound. Conversely, neither nalmefene treatment nor *Penk* mutation affected interaction through a partition in the second behavioural task. Taken together, these results confirm the hypothesis that endogenous opioid system influences social interaction and suggest a sex-dependent role of opioid-singling. Further research would be necessary in order to clarify if the observed phenomenon is due to anxiolytic effect of nalmefen. Additionally, I plan to study the effect of different nalmefene doses on social behavior in male and female mice.

Key words: social interaction, endogenous opioid system, opioid receptors, enkephalins

## 1. Wstęp

### 1.1. Zachowania społeczne

Interakcje społeczne są zachowaniami polegającymi na bezpośrednim, odwzajemnionym kontakcie między organizmami. Możliwe jest wyróżnienie szerokiego spektrum interakcji, od zachowań agresywnych i dążących do dominacji, przez związane z rozrodem i opieką rodzicielską, po kooperację i zachowania prospołeczne. Zachowania społeczne są charakterystyczne dla danego gatunku, płci, stadium rozwoju i sytuacji, w której znajduje się osobnik. Umiejętność adaptacyjnego dostosowania zachowania zwiększa szanse przeżycia i zapewnia sukces reprodukcyjny. Zaburzenia odbioru i przetwarzania bodźców społecznych, motywacji lub zachowania jako takiego powodują nieprawidłowości i skutkują dezadaptacyjnymi zmianami zachowania (Kennedy & Adolphs, 2012). Nieprawidłowe funkcjonowanie społeczne może występować w chorobach afektywnych, niektórych zaburzeniach osobowości, schizofrenii, chorobach neurodegeneracyjnych, a także w zaburzeniach ze spektrum autyzmu, w których deficyty te stanowią jeden z objawów osiowych (American Psychiatric Association, 2013). Wyjaśnienie mechanizmów regulujących zachowania społeczne jest kluczowe dla dokładniejszego zrozumienia charakteru zmian występujących u osób cierpiących na wymienione zaburzenia. Badania przeprowadzane na ludziach dostarczają wielu cennych informacji, posiadają jednak istotne ograniczenia etyczne, dlatego znaczna część badań dotycząca neuronalnych i molekularnych mechanizmów kierujących zachowaniami społecznymi wykonywana jest na modelach zwierzęcych.

Gryzonie laboratoryjne charakteryzują się rozbudowanym behawiorem społecznym. Można zaobserwować u nich szereg afiliacyjnych zachowań społecznych, jak na przykład tendencję do wspólnego gniazdowania czy wzajemne czyszczenie futra. Posiadają także silnie rozwinięty system komunikacji oparty głównie o bodźce zapachowe, ale również dźwiękowe oraz wzrokowe (Arakawa i in., 2008; Fischer & Hammerschmidt, 2011). Zwierzęta charakteryzuje również wyższy stopień uspołecznienia i stosunkowo niski poziom agresji w porównaniu do dzikich krewnych, z tego powodu mogą stanowić dobry organizm modelowy do badania mechanizmów zachowań społecznych (Kondrakiewicz i in., 2019).

Do potwierdzenia zgodności objawów między modelem zwierzęcym, a zaburzeniem modelowanym konieczne jest wytworzenie odpowiednich testów

umożliwiających obserwację zmian zachowania zbliżonych do objawów modelowanego zaburzenia (ang. *face validity*) (Kondrakiewicz i in., 2019; Silverman i in., 2010). W badaniach zachowań społecznych wyróżnić można testy skupiające się na bezpośredniej interakcji z drugim osobnikiem, komunikacji lub nagradzającej wartości zachowań społecznych. Testy polegające na bezpośredniej interakcji można podzielić dalej ze względu na miejsce jej odbywania, możliwość inicjacji interakcji przez partnera czy jego nowość dla osobnika badanego. Podczas doboru odpowiedniego schematu doświadczalnego należy zwrócić uwagę na płeć, wiek i szczep zwierząt (Kazdoba i in., 2015; Moy i in., 2004; Silverman i in., 2010). Aby zbadać interakcje społeczne między osobnikami, w swojej pracy licencjackiej posłużyłam się dwoma testami, testem interakcji w otwartym polu oraz testem interakcji w klatce z przegrodą.

Test interakcji w otwartym polu polega na pomiarze czasu spędzonego na interakcji przez parę zwierząt swobodnie eksplorujących kwadratową lub prostokątną arenę ograniczoną ściankami. Test pozwala także na określenie charakteru interakcji poprzez zliczanie przyjaznych lub agresywnych zachowań, takich jak obwąchiwanie pyszczków i okolic anogenitalnych, podążanie, przepychanie, wspinanie się na plecy drugiego osobnika czy pokrywanie (Silverman i in., 2010). Istotnym czynnikiem wpływającym na motywację zwierząt do podejmowania różnych form kontaktu w tym teście jest poziom lęku. Podanie przed testem leków przeciwlękowych wydłuża czas kontaktu, a anksjogennych skraca go. Wpływ lęku na zachowania można zmniejszyć poprzez zastosowanie słabego oświetlenia pola lub użycie znajomego osobnika jako partnera interakcji (File & Seth, 2003). W przypadku badań dwóch nieznanymi osobników czynnikiem uniemożliwiającym przeprowadzenie testu może być zbyt nasiloną agresją zwierząt wobec siebie, dlatego zalecany jest dobór partnera o podobnej masie i wieku. Aby ograniczyć akty agresji możliwe jest też przestrzenne rozdzielanie zwierząt, na przykład poprzez umieszczenie partnera w metalowym kubku.

Drugi z zastosowanych testów, test z przegrodą (ang. *partition test*) pozwala na wyeliminowanie zmienności wynikającej ze zróżnicowanego poziomu motywacji do inicjowania kontaktu przez partnera interakcji. Zwierzęta wkładane są do osobnych części klatki, oddzielonych perforowaną przegrodą, tak by mogły się wzajemnie widzieć, słyszeć i obwąchiwać, uniemożliwiony jest jednak ich fizyczny kontakt. Test jest wykorzystywany między innymi do badania skutków stresu wywołanego porażką społeczną (ang. *social defeat*) czy zainteresowania partnerem innej płci. Zastosowanie



nieprzezroczystej przegrody umożliwia określenie roli bodźców wzrokowych w dyskryminacji nowych osobników (Kudryavtseva, 2003). Wprowadzanie do klatki nowych partnerów interakcji umożliwia natomiast ocenę preferencji nowych bodźców społecznych oraz pamięci społecznej (Langford i in., 2010). Ponadto modyfikacja testu przez podniesienie bariery pomiędzy osobnikami pozwala na badanie dominacji i potencjalnych zachowań agresywnych, a otrzymywane wyniki zaobserwowanych zachowań agresywnych wykazują wysoką korelację z czasem spędzonym w pobliżu przegrody przez osobnika dominującego przed jej podniesieniem (Kudryavtseva, 2003).

## 1.2. Budowa endogennego układu opioidowego

Endogenne układy opioidowe są modulatorami aktywności neuronalnej. Jego działanie było przedmiotem szczególnie intensywnych badań w kontekście roli, jaką odgrywa w mechanizmach analgezji oraz regulacji funkcji układu nagrody. Niemniej, endogenne opioidy mogą wpływać na działanie szlaków przekazywania sygnałów w całym układzie nerwowym (Akil i in., 1984; Le Merrer i in., 2009).

U większości kręgowców występują trzy typy receptorów opioidowych:  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  oraz receptor dla nocyceptyny (Borsodi i in., 2019), kodowane przez oddzielne geny, u myszy odpowiednio: *Oprm1*, *Oprd1*, *Oprk1* i *Oprl1*. Receptory te należą do rodziny GPCR (ang. *G protein-coupled receptors*) i wiążą się z hamującymi białkami  $G_{i/o}$ . Ich aktywacja wywołuje wzrost przepuszczalności wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych i zahamowanie napięciowozależnych kanałów wapniowych oraz działania cykazy adenylowej, co skutkuje hiperpolaryzacją komórki i wpływa na aktywność kaskad przekazujących sygnały wewnątrzkomórkowe (Al-Hasani & Bruchas, 2011). Do endogennych ligandów receptorów opioidowych należą enkefaliny, dynorfiny,  $\beta$ -endorfina oraz nocyceptyna, które powstają w wyniku proteolizy białek prekursorowych. Białka prekursorowe u myszy kodowane są przez geny *Penk*, *Pdyn*, *Pomc*, *Pnoc*. W wyniku ekspresji genu *Penk* powstaje preproenkefalina, która jest prekursorem enkefalin, przede wszystkim pentapeptydów, Met- i Leu-enkefaliny; z genu *Pdyn* powstaje preprodynorfina, białko prekursorowe dynorfin; z *Pomc* powstaje proopiomelanokortyna, która jest źródłem  $\beta$ -endorfiny, natomiast z *Pnoc* prepronocyceptyna – prekursor nocyceptyny. Wszystkie wymienione opioidy z wyjątkiem nocyceptyny charakteryzują się występowaniem na N-końcu łańcucha aminokwasowego rdzenia opioidowego YGGF, który jest konieczny do rozpoznania sekwencji peptydu przez enzymy proteolityczne i umożliwia oddziaływanie

z receptorami (Akil i in., 1984; Larhammar i in., 2015). Powstałe peptydy opioidowe są wydzielane na drodze egzocytozy regulowanej do przestrzeni międzykomórkowej, a ich działanie jest ograniczane przez enzymy zakotwiczone w błonach takie jak metalopeptydazy cynkowe: neutralną aminopeptydazę (EC3.4.21.11) lub aminopeptydazę N (EC3.4.11.2), które katalizują reakcje dezaktywacji poprzez przecięcie sekwencji rdzenia opioidowego (Roques i in., 2012).

Układ opioidowy charakteryzuje niska selektywność ligandów do receptorów. Enkefalinę łączą się z wysokim powinowactwem do receptorów  $\mu$  i  $\delta$ , oraz z niższym do receptora  $\kappa$ ,  $\beta$ -endorfina również posiada wysokie powinowactwo względem receptorów  $\mu$  i  $\delta$ , dynorfina z kolei wykazuje preferencję względem receptora  $\kappa$ , a także pewne powinowactwo do receptora  $\mu$  (Akil i in., 1984). Nocyceptyna łączy się wybiórczo ze swoim receptorem i przypisuje się jej znacząco odmienne funkcje niż pozostałym peptydom opioidowym (Clarke i in., 2002).

### 1.3. Rola układu opioidowego w regulacji zachowań społecznych

Badania prowadzone na ludziach oraz zwierzętach laboratoryjnych wskazują, że układ opioidowy jest zaangażowany w regulację różnych aspektów zachowań społecznych (Panksepp i in., 1980; Pellissier i in., 2018; Smith i in., 2018; Trezza i in., 2011). Szczególną rolę przypisuje się receptorowi  $\mu$ . Receptor ten jest głównym punktem uchwytu dla wielu przeciwbólowych leków opioidowych. Myszy z delecją w genie *Oprm1* nie wykazują analgezji ani nie rozwijają uzależnienia w odpowiedzi na podania morfiny (Matthes i in., 1996). Receptory  $\mu$  występują szeroko w strukturach układu nagrody takich jak jądro półleżące, przysiódkowe jądro uzdeczki, wzgórze, pole brzuszne nakrywki czy ciało migdałowe, gdzie regulują działanie neuronów monoaminergicznym i są zaangażowane w przetwarzanie informacji o nagradzających właściwościach bodźców, w tym także tych stanowiących nagrody naturalne (Le Merrer i in., 2009; Lutz & Kieffer, 2013). Uważa się, że działanie endogennych opioidów odpowiada za wywoływanie hedonistycznych odczuć związanych z nagrodą, ale może także regulować stany motywacyjne związane z dążeniem do jej uzyskania (Berridge & Kringelbach, 2015; DiFeliceantonio i in., 2012).

Badania wskazują, że za nagradzającą wartość zachowań społecznych odpowiadają receptory  $\mu$  zlokalizowane w jądrze półleżącym (ang. *Nucleus Accumbens*, NAc) (Trezza i in., 2011). Antagonista receptorów  $\mu$  podany do NAc hamuje motywację

do zabawy wśród młodych samców szczurów, a także blokuje wykształcanie się u nich preferencji społecznej w teście warunkowanej preferencji miejsca (ang. *Conditioned Place Preference*, CPP). Przeciwny wpływ na aspekt motywacyjny i nagradzające efekty zabaw obserwuje się po podaniu zwierzętom niskich dawek morfiny. Receptory opioidowe  $\mu$  w NAc zaangażowane są również w tworzenie par u gatunków monogamicznych. U samic norników preriowych blokada receptorów  $\mu$  w grzbietowo-przyśrodkowej części skorupy jądra półleżącego, stanowiącej ośrodek hedonii (ang. *hedonic hot-spot*) hamuje wytworzenie preferencji względem partnera badanej w teście CPP. Mimo to nie obserwuje się spadku częstotliwości zachowań związanych z prokreacją podczas kohabitacji zwierząt. Obserwacja może więc sugerować, że zahamowanie receptora  $\mu$  w tej strukturze jest związane z zanikiem hedonistycznych właściwości prokreacji, ale nie z samą motywacją do jej podejmowania (Resendez i in., 2013). Również badania prowadzone na ludziach wskazują, że podania subklinicznych dawek morfiny zwiększają przyjemność czerpaną z obserwowania zdjęć twarzy płci przeciwnej cechujących się wysokim poziomem atrakcyjności, a także zwiększają motywację do podejmowania czynności mających zatrzymać na ekranie atrakcyjny obraz (Chelnokova i in., 2014). Wyniki przytoczonych badań sugerują, że podania ligandów receptorów opioidowych  $\mu$  mogą wpływać na wartość hedonistyczną bodźców, przy czym szczególne znaczenie w tym procesie mogą odgrywać receptory zlokalizowane w jądrze półleżącym. Według przytoczonych badań agoniści receptora  $\mu$  powinni podnosić, natomiast antagoniści obniżać wartość nagradzającą zachowań społecznych, manipulacje te mogą wpłynąć również na aspekt motywacyjny nagrody.

Amerykański badacz estońskiego pochodzenia Jaak Panksepp w swojej pracy zauważa, że preferencja zwierząt względem bodźców społecznych może wynikać zarówno z hedonistycznej wartości kontaktu, jak również z chęci uniknięcia izolacji (Panksepp & Lahvis, 2007). Izolacja u wielu gatunków zwierząt wykazuje właściwości awersyjne i przyczynia się do silnego stresu. Badania wskazują, że zarówno izolacja jak i odrzucenie społeczne aktywują podobne obszary mózgu, co ból wywołany bodźcem fizycznym (Eisenberger, 2012). W przypadku odizolowania młodych gryzoni od matki, oseski emitują wokalizacje ultradźwiękowe mające na celu jej przywołanie. Podanie zwierzętom niskich dawek morfiny zmniejsza częstotliwość wydawanych odgłosów i redukuje ruchliwość młodych. Z kolei podanie antagonisty wywiera przeciwny efekt (Panksepp i in., 1980). Zaproponowana przez Pankseppa opioidowa teoria przywiązania

(ang. *Brain Opioid Theory of Social Attachment*, BOTSA) próbuje wyjaśnić zaobserwowane zmiany wskazując na podobieństwa pomiędzy procesami związanymi z izolacją społeczną, efektami odstawiennymi w uzależnieniach i działaniem przeciwbólowym opioidów. Zahamowanie aktywności układu opioidowego przez podanie antagonisty może spowodować wzrost poziomu kortyzolu (Eisenberg, 1984), który może potęgować dystres, zwiększając motywację zwierzęcia do poszukiwania kontaktu. Wykazano, że kontakt ze znajomym osobnikiem u myszy może wywierać działanie uśmierzające ból oraz przyczyniać się do zwiększenia efektów działania przeciwbólowego niskich dawek morfiny. Efekty zależą od kontaktu fizycznego pomiędzy zwierzętami i są odwracalne podaniem antagonisty receptorów opioidowych (D'Amato, 1998; D'Amato & Pavone, 1996).

Badania wskazują również, że podanie antagonisty receptora  $\mu$  do jądra półleżącego u młodych szczurów wywołuje zwiększenie motywacji do kontaktu ze znajomym osobnikiem i zmniejszenie preferencji względem nowego osobnika (Smith i in., 2018). Również izolacja przed testem prowadzi do wydłużenia czasu przebywania w pobliżu znanego osobnika. Jednocześnie podanie zwierzętom po izolacji morfiny przywraca preferencję względem nowego osobnika u zwierząt wrażliwych na izolację (Smith i in., 2018). Modułacja przekaźnictwa przez receptor opioidowy  $\mu$  jest zatem niezbędna do różnicowania bodźców, w taki sposób by dostosować ich wartość motywacyjną do potrzeb organizmu. Doświadczenia przeprowadzone na myszach nieposiadających funkcjonalnego receptora  $\mu$  wskazują, że występują u nich deficyty związane z przetwarzaniem nagrody społecznej i wartościowaniem bodźców społecznych. Oseski wokalizują słabiej po odseparowaniu od matki, a ich odgłosy cechują się niższą złożonością, zwierzęta wykazują również mniejszą wrażliwość na bodźce skojarzone z matką (Cinque i in., 2012; Moles, 2004). Młode samce wykazują niskie zainteresowanie innymi osobnikami oraz brak preferencji względem kontekstu skojarzonego społecznie w CPP (Cinque i in., 2012). U dorosłych zwierząt natomiast obserwuje się wyższą odporność na długotrwały stres społeczny (Komatsu i in., 2011).

O znaczeniu, jakie receptor  $\mu$  odgrywa z zachowaniami społecznymi, mogą świadczyć również badania przeprowadzone na osobach posiadających polimorfizm receptora  $\mu$  A118G. Polimorfizm A118G występuje u około 20% populacji rasy kaukaskiej i 40-50% populacji azjatyckiej. U osób posiadających allel G obserwuje się obniżoną ekspresję receptora  $\mu$  w rejonach mózgu związanych z przetwarzaniem bólu

i zachowań afektywnych. Posiadacze allelu G charakteryzują się wyższą neurotycznością i wrażliwością na odrzucenie, która wiąże się również z podwyższoną aktywnością struktur zaangażowanych w przetwarzanie informacji bólowych, takich jak grzbietowo-przednia częśći zakrętu obręczy czy przednia wyspa (Tchalova i in., 2019; Way i in., 2009). Ponadto testy psychometryczne wskazują, że osoby posiadające allel G wykazują większą zdolność odczuwania przyjemności w sytuacjach społecznych i skłonność trwania w toksycznych relacjach (Troisi i in., 2011). Badania prowadzone na myszach ze sztucznie wprowadzonym polimorfizmem A112G, który odpowiada ludzkiemu A118G, wykazują podobne zmiany: zmniejszoną ekspresję mRNA genu kodującego receptor  $\mu$ , słabszą odpowiedź przeciwbólową po podaniu morfiny. Zaobserwować u nich można także większą skłonność do kontaktu z drugim osobnikiem i wykazywania zachowań dominujących oraz niższą wrażliwość na chroniczny społeczny stres (Briand i in., 2015; Mague i in., 2009).

Jakkolwiek znaczna część badań w kontekście zachowań społecznych skupia się na roli receptora  $\mu$ , aktywność pozostałych receptorów opioidowych również może oddziaływać na zachowania społeczne. Zarówno na neuronach dopaminergicznych jak i serotonergicznych projektujących do jądra półleżącego obserwuje się wysokie stężenia receptorów  $\kappa$ . Uważa się, że pobudzenie tych receptorów przez dynorfiny jest kluczowe do wywołania awersji u gryzoni (Chefer i in., 2013). Wykazano, również, że podanie agonisty receptorów  $\kappa$  do jądra półleżącego u młodych samców szczurów hamuje zachowania nagradzające związane z zabawą społeczną (Trezza i in., 2011).

Receptory  $\kappa$  w układzie mezolimbicznym współdziałają z kortykoliberyną w regulacji odpowiedzi stres. Myszy z delecją genu kodującego dynorfiny nie wykazują awersji miejsca wywołanej przez bodziec stresogenny ani przez dootrzewnowe podanie kortykoliberyny. Podobne efekty obserwuje się również u myszy po podaniu antagonisty receptorów  $\kappa$ , norbinaltorfiminu (Land i in., 2008). U myszy z delecją receptora  $\kappa$  wykazano odporność na stres wywołany społeczną porażką i brak wykształcania się związanych z nim: indukowanej stresem analgezji, wydłużenia czasu bezruchu w teście wymuszonego pływania, oraz preferencji miejsca wywołanej podaniami kokainy (McLaughlin i in., 2006). Wzrost wrażliwości na nagradzające właściwości kokainy spowodowany u myszy bez mutacji może być skutkiem zmian w regulacji wydzielania dopaminy w jądrze półleżącym zachodzących pod wpływem chronicznego stresu. Dynorfiny działając na zlokalizowane presynaptycznie na neuronach dopaminergicznych

receptory  $\kappa$ , hamują wydzielanie dopaminy w jądrze półleżącym, przez co wywołują stany awersyjne, które są łagodzone przez podanie substancji uzależniającej. Rozregulowanie ujemnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy dynorfinami, a dopaminą w osi pole brzuszne nakrywki – jądro półleżące jest uważane za przyczynę negatywnych stanów emocjonalnych występujących po odstawieniu substancji uzależniających (Koob & Mason, 2016). Badania wskazują, że izolacja społeczna u szczurów w okresie dorostania przyczynia się do zmian w funkcjonowaniu sprzężenia w dorosłości, przez co może zwiększać nagradzające efekty etanolu w warunkach stresogennych i zwiększać skłonności do rozwoju uzależnień (Karkhanis i in., 2016). Receptory  $\kappa$  mają także istotne znaczenie w tworzeniu par u gatunków monogamicznych, a ich blokada w skorupie jądra półleżącego jest łączona z wykazywaniem preferencji do partnera i motywacją do podejmowania wrogich zachowań względem osobników innej płci nie będących partnerami (Resendez i in., 2012).

Również aktywność receptora  $\delta$  może przyczyniać się do regulacji zachowań społecznych. Receptor opioidowy  $\delta$  jest wiązany przede wszystkim z regulacją nastroju i podatności na stres. Białka receptorowe występują licznie w strukturach zaangażowanych w regulację nastroju: korze wyspowej, korze przedczołowej, jądrze półleżącym, ciele migdałowatym oraz hipokampie (Lutz & Kieffer, 2013). Myszy pozbawione funkcjonalnego receptora  $\delta$  charakteryzują się wyższymi wynikami w testach badających zachowania związane z lękiem i depresyjnością (Filliol i in., 2000). Również doświadczenia farmakologiczne potwierdzają, że zablokowanie działania receptorów  $\delta$  przez podanie selektywnego antagonisty, naltrindolu wywiera efekt anksjogeny, który może zostać odwrócony przy użyciu agonisty receptora  $\delta$  – SNC80 (Perrine i in., 2006).

Podobne zmiany w zachowaniu obserwuje się u myszy z delecją genu *Penk*. Zwierzęta pozbawione genu kodującego enkefalinę charakteryzują się wyższym poziomem niepokoju oraz silniejszą reakcją orientacyjną na bodźce dźwiękowe skojarzone awersyjnie (Bilkei-Gorzo i in., 2004; König i in., 1996; Kung i in., 2010; Ragnauth i in., 2001). Obserwowany fenotyp lękowy wiąże się również ze zmianami w zakresie zachowań społecznych. Zwierzęta z delecją genu *Penk* wykazują większą agresję względem innych osobników, agresja jest szczególnie nasilona, gdy osobniki hodowane są pojedynczo (König i in., 1996). Ponadto izolacja u tych myszy może wpłynąć na wzrost zachowań związanych z lękiem (Melo i in., 2014). Niektóre szczepy wykazują również obniżoną skłonność do podejmowania interakcji społecznych w teście

otwartego pola (Bilkei-Gorzo i in., 2004). Ponadto u młodych osobników z delecją genu *Penk* obserwuje się ograniczenie wokalizacji ultradźwiękowych po oddzieleniu od matki, jednak wynik jest zależny od tła genetycznego badanego szczepu (Bilkei-Gorzo i in., 2007).

Podobieństwo fenotypów pomiędzy zwierzętami pozbawionymi enkefalin, a myszami z delecją receptora  $\delta$  stało się podstawą założenia, że enkefalin wywierają swoje działanie na nastrój poprzez ten receptor. Badania wskazują, że podatność na chroniczny stres społeczny jest związana z obniżonym poziomem mRNA dla enkefalin w podstawno-bocznym jądrze ciała migdałowatego oraz dla receptora  $\delta$  w hipokampie, a także z podwyższonymi poziomami mRNA dla enkefalinaz w jądrze półleżącym (Henry i in., 2018; Nam i in., 2019). Wykazano, że neurony podstawno-bocznego jądra ciała migdałowatego syntetyzujące enkefalinę są zaangażowane w regulację zachowań związanych z lękiem, a zahamowanie ich transkrypcji w tej strukturze może przyczyniać się między innymi do skrócenia czasu interakcji w otwartym polu u zwierząt wrażliwych na chroniczny stres, czego nie obserwuje się jednak u zwierząt odpornych (Bérubé i in., 2014). Dootrzewnowe podanie agonisty receptorów  $\delta$ , SNC80 zwierzętom podatnym na chroniczny stres społeczny wywołuje wydłużenie czasu spędzonego w pobliżu innego osobnika podczas testu interakcji, co jest wiązane między innymi z neuroprotekcją rolą tego receptora wywieraną na neurony hipokampa (Henry i in., 2018). Podobne wydłużenie czasu interakcji uzyskiwane jest również przez zablokowanie rozkładu enkefalin przy pomocy podwójnych inhibitorów enkefalinaz (Nam i in., 2019).

Podsumowując, receptory  $\mu$ , jak również  $\kappa$  i  $\delta$  mogą wpływać na motywację do podejmowania zachowań społecznych, zarówno bezpośrednio, jak i poprzez oddziaływanie na funkcje regulujące zachowanie, takie jak odczuwanie awersji czy poziom lęku. Należy podkreślić, że działanie endogennych opioidów jest jednym z wielu mechanizmów wskazywanych w kontekście interakcji społecznych. Szczególne znaczenie w kontroli zachowań społecznych przypisuje się także działaniu oksytocyny (Ross & Young, 2009), układu serotonergicznego i dopaminergicznego (Dölen i in., 2013; Gunaydin i in., 2014; Matthews i in., 2016) oraz hormonom płciowym (Gabor i in., 2012). Hipotezą badań, których częścią są przeprowadzone w ramach pracy licencjackiej doświadczenia jest założenie, że endogenne układy opioidowe mogą być wspólnym modulatorem szlaków przekazywania związanych z zachowaniami społecznymi, w szczególności, że receptory opioidowe położone na neuronach układu nagrody mogą

wpływać na zachowania społeczne poprzez kontrolę uwalniania dopaminy, serotoniny i oksytocyny w jądrze półleżącym. Wyniki wcześniejszych badań prowadzonych w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej wskazują, że nieselektywny antagonist receptorów opioidowych, nalmefen hamuje ekspresję warunkowanej społecznie preferencji miejsca u młodych samców myszy, przy czym badania wskazują, że ma to związek z jego działaniem przez receptory  $\kappa$  (Klimczak, 2019). Nalmefen jest lekiem stosowanym w leczeniu uzależnienia alkoholowego u ludzi i hamuje u nich niekontrolowane spożywanie alkoholu, jednak według naszej wiedzy brak jest danych o jego potencjalnym działaniu na zachowania społeczne zarówno u ludzi jak i u zwierząt.



## 2. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie roli jaką układ opioidowy może pełnić w adaptacyjnych zachowaniach społecznych. W badaniach skupiono się na efekcie liganda opioidowego, nalmefenu oraz uszkodzenia genu *Penk* na interakcje między dwoma nieznanymi osobnikami tej samej płci. Opierając się na dotychczasowych badaniach i przytoczonej literaturze, założono, że zarówno podanie nalmefenu, będącego antagonistą receptora  $\mu$  i  $\delta$  oraz częściowym agonistą  $\kappa$ , jak i uszkodzenie genu *Penk*, skutkujące obniżeniem poziomu endogennych enkefalin powinny zmniejszać chęć podejmowania interakcji z nieznanym osobnikiem u badanych myszy.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Zwierzęta

Doświadczenia z podaniem leku przeprowadzono na samcach i samicach szczepu C57BL/6N w wieku 8-10 tygodni sprowadzonych z hodowli Charles River (Charles River Laboratories, Niemcy). Do testów wykorzystano również myszy *Penk flox*, z mutacją wywołującą spadek ekspresji mRNA dla genu proenkefaliny. Myszy z mutacją zostały wygenerowane w laboratorium Cyagen (Cyagen Bioscience, USA), na tle genetycznym C57BL/6N. Do mutacji obniżającej ekspresję doszło poprzez wstawienie sekwencji *loxP* powyżej kodonu startowego i poniżej kodonu stop sekwencji kodującej preproenkefalinę. Insercja wywołała około 50-krotny spadek poziomu mRNA *Penk* w prążkowi (Misiołek, 2020).

Myszy hodowano w warunkach cyklu dobowego 12/12h światło/ciemność, z włączeniem światła o godzinie 7:00, w stałej temperaturze  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Zwierzęta przebywały w grupach po 2-8 osobników na klatkę, we wzbogaconym środowisku, z dostępem do wody oraz standaryzowanej karmy hodowlanej *ad libitum*. Myszy będące partnerami interakcji hodowano oddzielnie od osobników badanych przed oraz przez cały okres prowadzenia eksperymentów. Wszystkie zwierzęta były przyzwyczajane do eksperymentatora przez minimum 2 dni przed rozpoczęciem doświadczeń. Testy wykonano w fazie jasnej, pomiędzy 8:00 a 16:00, przy oświetleniu  $\sim 20$  luksów.

Wykonane doświadczenia zostały zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną w Krakowie, nr zgody 185/2020.

#### 3.2. Leki

Do zablokowania receptorów opioidowych użyto nioselektywnego antagonisty – nalmefenu. Grupa badana otrzymywała dootrzewnowo roztwór chlorowodoru nalmefenu (Tocris Bioscience, USA) w soli fizjologicznej, w dawce 1 mg/kg i objętości 5  $\mu\text{l/g}$  masy ciała. Zwierzętom z grupy kontrolnej podawano równoważne objętości soli fizjologicznej. Zastrzyki wykonywano na godzinę przed ekspozycją na partnera testu.

#### 3.3. Test interakcji społecznej w otwartym polu

Test otwartego pola został wykonany na samcach i samicach C57BL/6N oraz na samicach szczepu *Penk flox* według protokołu opisanego w pracy Jastrzębskiej

(Jastrzębska i in., 2016). Partnerami interakcji były nieznane osobniki tej samej płci, o możliwie zbliżonym wieku i masie ciała do myszy badanych (Tab. 1).

**Tab. 1** Wiek, masa ciała i ilość zwierząt użytych w doświadczeniach.

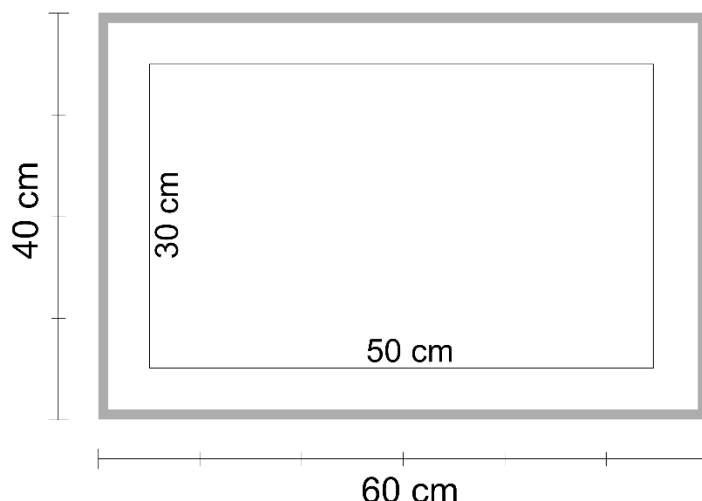
Myszy badane				Partnerzy interakcji		
kohorta	liczba	wiek	masa ciała	liczba	wiek	masa ciała
Samce C57BL/6N	16	9 tygodni	23,1 ± 0,37 g <sup>a</sup>	16	8 tygodni	23,2 ± 0,68 g <sup>a</sup>
Samice C57BL/6N	14	9 tygodni	19,0 ± 0,35 g <sup>a</sup>	14	8 tygodni	19,1 ± 0,29 g <sup>a</sup>
Samice <i>Penk flox</i>	<i>wt</i>	5	7-13 tygodni	5	8-12 tygodni	19,84 ± 0,65 g <sup>a</sup>
	<i>wt</i> <sup>b</sup>					
<i>Penk flox</i>	flox	5	7-13 tygodni	5	8-12 tygodni	19,88 ± 0,90 g <sup>a</sup>
	flox					

<sup>a</sup>: średnie masy ciała zostały podane wraz z SEM,

<sup>b</sup>: typ dziki (*ang. wild type*)

Podczas testu zwierzę badane umieszczano w przezroczystej klatce o wymiarach 40×60×25 cm, wypełnionej 1-centymetrową warstwą ściółki (Ryc. 1). Po 30 minutach swobodnej eksploracji klatki, wprowadzana była mysz-partner interakcji. Czas pomiaru interakcji między osobnikami wynosił 10 minut. Po każdej z prób klatkę przemywano 70% roztworem alkoholu, a ściółkę wymieniano. Zachowania zwierząt zostały nagrane i przeanalizowane przy pomocy oprogramowania EthoVision 11.5 (Noldus, Holandia). Interakcje społeczne analizowano przy użyciu modułu pozwalającego na jednoczesne śledzenie pozycji kilku zwierząt.

Podczas pierwszych 30 minut obserwowano aktywność zwierząt: czas spędzony w centrum klatki (w prostokątnym polu o wymiarach 30×50cm), a także całkowity przebyty dystans. Podczas ostatnich 10 minut testu mierzono całkowity czas spędzony na interakcji (w odległości mniejszej niż 8 cm pomiędzy środkami ciała zwierząt) oraz średni dystans między zwierzętami.



**Ryc. 1 Schemat klatki wykorzystanej do przeprowadzenia testu otwartego pola.**

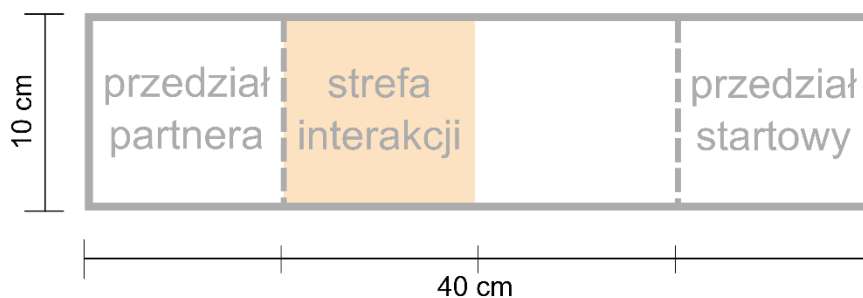
W trakcie trwania doświadczeń 2 samce i 1 samica w eksperymencie z nalmefenem oraz 1 samica *Penk flox* wskoczyły na ściankę aparatu testowego. W przypadkach, gdy mysz pozostawała na ściance przez dłuższy czas, była ściągana i wkładana ponownie do wnętrza klatki. Całkowity czas nieobecności w otwartym polu u żadnego z osobników nie przekroczył 30 sekund.

#### 3.4. Test interakcji społecznej z przegrodą

W odstępie 6-7 dni po teście interakcji w otwartym polu na tych samych zwierzętach (Tab. 1) wykonano drugi z testów. Doświadczenie przeprowadzano z wykorzystaniem prostokątnej klatki o wymiarach 40×10×22 cm, składającej się z 3 przedziałów (Ryc. 2), podobnej do klatki wykorzystanej do przez Langforda i współpracowników (Langford i in., 2010). Przedziały skrajne oddzielone zostały podnoszonymi, perforowanymi ściankami z przezroczystego pleksiglasu. Na dzień przed eksperymentem myszy badane i partnerzy interakcji były przyzwyczajane do testu przez umieszczenie na 5 minut w skrajnych przedziałach.

Test składał się z dwóch części, fazy pretestu oraz fazy interakcji. Podczas pretestu mysz badaną umieszczano w przedziale startowym, następnie podnoszono najbliższą przegrodę, umożliwiając rozpoczęcie eksploracji przedziału środkowego. Po 5 minutach zwierzę wyjmowano. Podczas drugiej części testu w przeciwległym przedziale za ścianką obecny był partner interakcji. Mysz badaną ponownie wkładano do przedziału startowego i umożliwiano rozpoczęcie eksploracji. Podczas obu części testu mierzono całkowity czas spędzony przez mysz badaną w „strefie interakcji”, czyli polu

o wymiarach 10×10 cm, sąsiadującym ze ścianką oddzielającą przedział partnera, a także średnią odległość myszy badanej od środka ścianki. Do rejestracji i analizy parametrów wykorzystano oprogramowanie EthoVision 11.5. Po każdej próbie klatkę przemywano 70% roztworem alkoholu.



*Ryc. 2 Schemat klatki z przegrodą do badania interakcji w otwartym polu.*

### 3.5. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przeanalizowano przy użyciu programu GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, USA). Do analizy efektu płci oraz podania leku na ruchliwość w otwartym polu wykonano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA), po której zastosowano *post-hoc* testy Tukeya. Do porównania średnich w doświadczeniu na myszach *Penk flox* użyto testu t dla prób niesparowanych. Wyniki uzyskane w obu fazach testów klatki z przedziałami porównano przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testów *post-hoc* Sidaka. Za poziom istotności statystycznej we wszystkich testach przyjęto wartość 0,05. Mapy ciepłe przedstawiające znormalizowany czas przebywania zwierząt w różnych punktach klatek uzyskano w programie EthoVision 11.5 na podstawie danych o położeniu myszy generowanych w 33-milisekundowych odstępach czasowych.

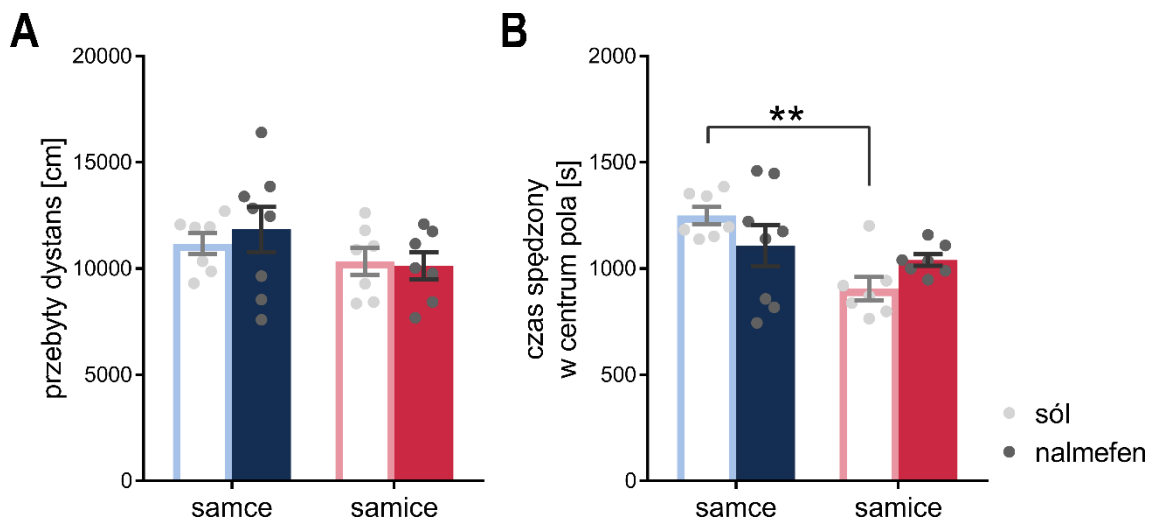
Na poziomie analizy wyników z pierwszych 30 minut testu otwartego pola zostały wykluczone: 1 samiec kontrolny w doświadczeniu z nalmefenem oraz 1 samica o dzikim genotypie w doświadczeniu przeprowadzanym na myszach *Penk flox*. Zwierzęta wykluczono z powodu zbyt dużej ilości utraconych klatek na nagranych filmach (>7,5%). Podczas analizy interakcji społecznych w tym teście nie odrzucono żadnych zwierząt. Z analizy doświadczeń przeprowadzonych w klatce z przegrodą oddzielającą partnera również nie wykluczono żadnego osobnika.

## 4. Wyniki

### 4.1. Wpływ nalmefenu na interakcje społeczne

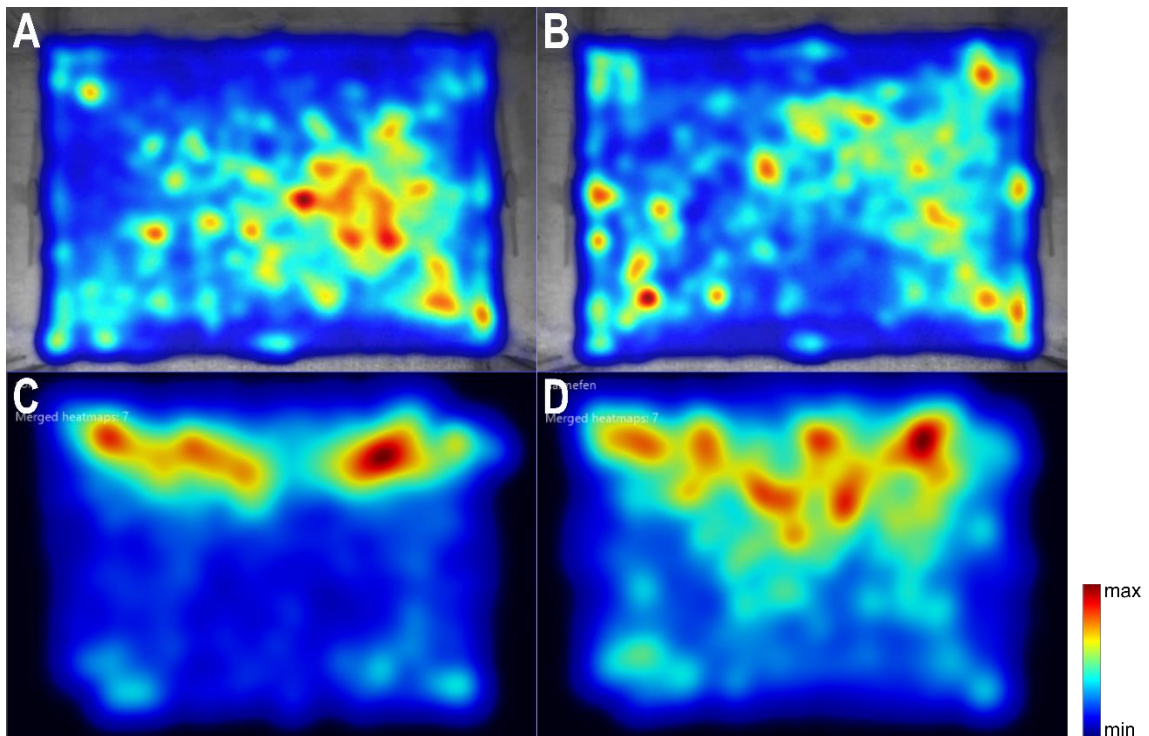
#### *Test interakcji w otwartym polu*

Wpływ nalmefenu na zachowania społeczne badano na osobnikach obu płci u myszy szczepu C57BL/6N. W pierwszej kolejności wykonywano test interakcji w otwartym polu. Podczas pierwszych 30 minut rejestracji analizowano aktywność ruchową i zachowania wskazujące na podwyższony poziom niepokoju u zwierząt, w tym celu porównano całkowity dystans przebyty przez zwierzęta oraz czas spędzony w centralnej części otwartego pola. Nie wykazano istotnego statystycznie wpływu leku na dystans pokonywany w teście u żadnej z płci (dwuczynnikowa ANOVA: *pleć*  $F(1,25)=2,724$ ,  $p=0,1113$ , *lek*  $F(1,25)=0,3368$ ,  $p=0,7705$ , *pleć*  $\times$  *lek*  $F(1,25)=0,08697$ ,  $p=0,5669$ ; Ryc. 3A). Zaobserwowano natomiast, że samice przebywały krócej w centralnej części otwartego pola, a także, że efekt działania nalmefenu był zależny od płci – dotyczył jedynie samic (*pleć*  $F(1,25)=10,09$ ,  $p=0,0039$ , *lek*  $F(1,25)=0,002887$ ,  $p=0,9576$ , *pleć*  $\times$  *lek*  $F(1,25)=4,535$ ,  $p=0,0432$ ; Ryc. 3B).



**Ryc. 3** Aktywność ruchowa myszy w otwartym polu po podaniu nalmefenu. Na wykresach przedstawiono dystans przebyty podczas pierwszych 30 minut testu (A) oraz czas spędzony w centrum otwartego pola (B). Dane przedstawiono jako średnie wraz z SEM. Istotna statystycznie różnica między średnimi w teście post-hoc Tukeya. została przedstawiona symbolem „\*\*” dla  $p < 0,01$ . Liczebność grup wyniosła: samce sól – 7, samce nalmefen – 8, samice sól – 7, samice nalmefen – 7.

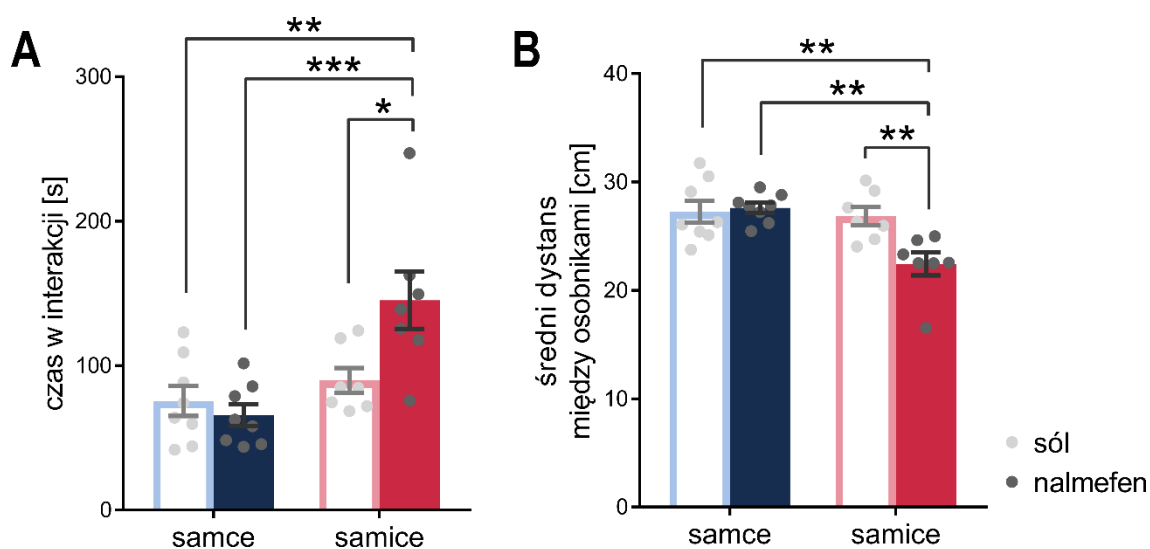
W celu dokładniejszego scharakteryzowania wzorców aktywności myszy w tym teście wygenerowano mapy cieplne przedstawiające znormalizowany czas spędzony przez zwierzęta w poszczególnych częściach otwartego pola (Ryc. 4). Wyniki wskazują na równomierną eksplorację klatki u obu grup samców, natomiast w przypadku samic można zauważyć większą skłonność grupy kontrolnej do przebywania w pobliżu jednej z krawędzi klatki.



**Ryc. 4** Mapy aktywności ruchowej w otwartym polu po podaniu nalmefenu. Mapy przedstawiają znormalizowany czas spędzony przez zwierzęta w różnych punktach otwartego pola. Kolejno przedstawiono grupy: samce kontrolne (A), samce po podaniu nalmefenu (B), samice kontrolne (C), samice po podaniu nalmefenu (D). Ciepłe kolory oznaczają miejsca, w których zwierzęta przebywały dłużej.

Podczas ostatnich 10 minut testu mierzono interakcje społeczne z drugim osobnikiem. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice między płciami. Grupa samic, którym podano nalmefen, spędzała średnio więcej czasu w pobliżu drugiego osobnika w porównaniu do grupy kontrolnej samic oraz obu grup samców (*pleć*  $F(1,26)=14,80$ ,  $p=0,0007$ , *lek*  $F(1,26)=3,494$ ,  $p=0,0729$ , *pleć*  $\times$  *lek*  $F(1,26)=7,199$ ,  $p=0,0125$ ; Ryc. 5A). Analogiczny wynik uzyskano również dla średniej odległości utrzymywanej między zwierzętami podczas testu (*pleć*  $F(1,26)=10,29$ ,  $p=0,0035$ , *lek*  $F(1,26)=5,489$ ,  $p=0,0271$ , *pleć*  $\times$  *lek*  $F(1,26)=7,619$ ,  $p=0,0104$ ; Ryc. 5B).





**Ryc. 5 Interakcje społeczne w otwartym polu po podaniu nalbuphenu.** Na wykresach przedstawiono czas w interakcji społecznej, zdefiniowanej jako mniejsza niż 8 cm odległość między środkami masy ciała (A) oraz średnią odległość pomiędzy środkami ciała (B). Dane przedstawiono jako średnie wraz z SEM. Na wykresie przyjęto oznaczenia „\*” dla  $p < 0,05$ , „\*\*” dla  $p < 0,01$  oraz „\*\*\*” dla  $p < 0,001$  dla wyników uzyskanych w teście post-hoc Tukeya. Liczebność grup: samce sól – 8, samce nalbuphena – 8, samice sól – 7, samice nalbuphena – 7.

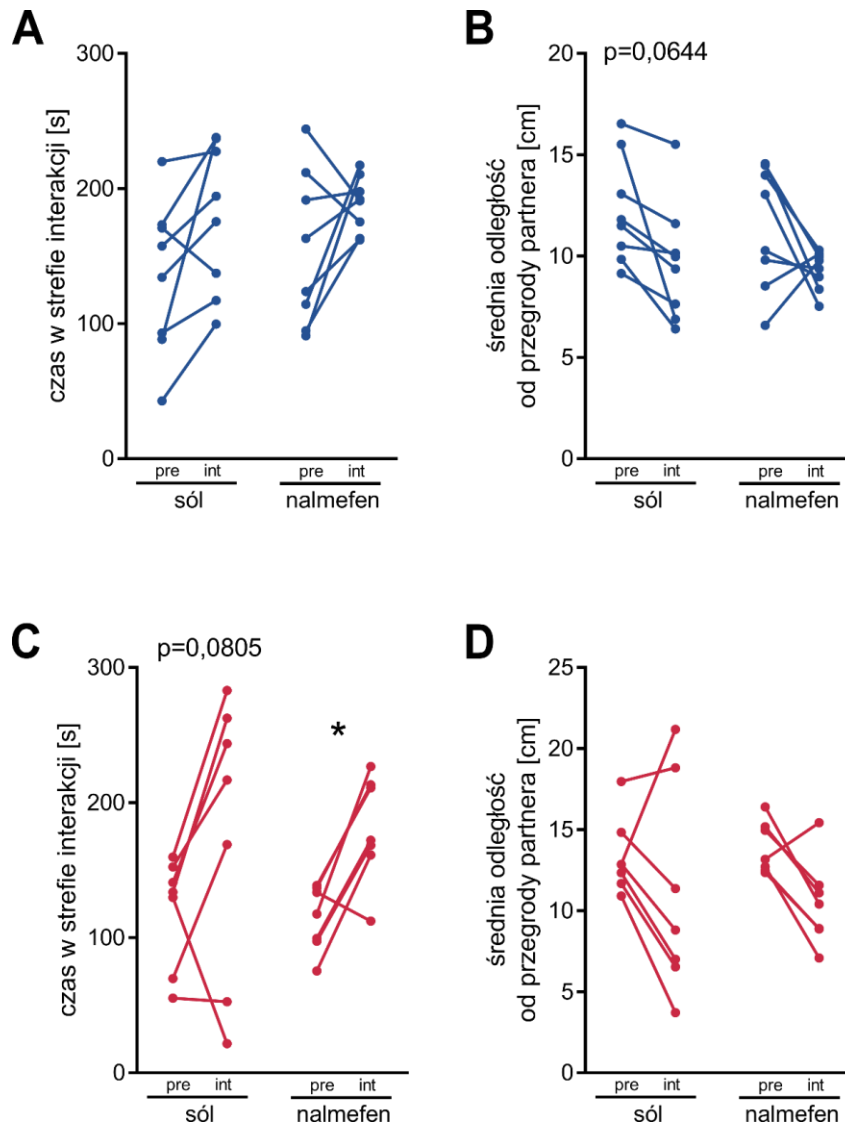
Celem testu w otwartym polu było zbadanie odwzajemnionych interakcji społecznych między osobnikami. Podczas trwania doświadczeń we wszystkich grupach odnotowano przypadki intensywnego obwąchiwania i gonienia partnera, których częstotliwość malała z czasem trwania interakcji. U jednej z samic grupy kontrolnej doświadczenia z nalbuphenu zaobserwowano również uporczywe próby pokrywania partnerki interakcji (ang. *mounting behaviour*), które może być przejawem dominacji u samic (Williamson i in., 2019). Nie zaobserwowano jednak bezpośrednich ataków i innych form agresji względem drugiego osobnika.

#### Test interakcji z przegrodą

W celu wyeliminowania wpływu partnera na długość interakcji wykonano test w klatce z przegrodami. Za parametr świadczący o zajściu interakcji pomiędzy zwierzętami uznano czas spędzony przez mysz badaną w odległości mniejszej niż 10 cm od przegrody oddzielającej ją od partnera, nazwanej „strefą interakcji”. Porównano również średni dystans dzielący zwierzę od środkowego punktu położonego na przegrodzie oddzielającej zwierzęta podczas obu faz testu. Analiza wykazała, że czas spędzony w strefie interakcji był zależny od obecności partnera w klatce (efekt fazy testu) zarówno w grupie samców (faza testu  $F(1,14)=7,321$ ,  $p=0,0171$ , lek  $F(1,14)=0,5215$ ,  $p=0,4821$ , faza testu  $\times$  lek  $F(1,14)=0,09904$ ,  $p=0,7576$ ; Ryc. 6A), jak i u samic (faza testu  $F(1,12)=12,02$ ,  $p=0,0047$ , lek  $F(1,12)=0,004979$ ,  $p=0,9449$ , faza testu  $\times$  lek  $F(1,12)=0,05365$ ,  $p=0,8207$ ; Ryc. 6C).

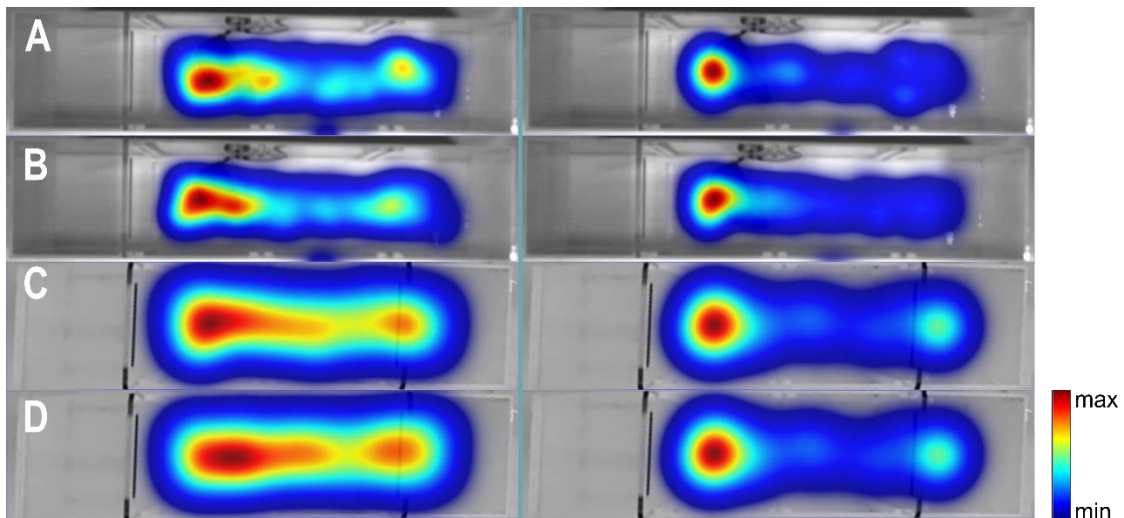


Analogiczne wyniki uzyskano dla parametru średniej odległości od przegrody partnera u samców (*faza testu*  $F(1,14)=9,381$ ,  $p=0,0084$ , *lek*  $F(1,14)=0,3578$ ,  $p=0,5593$ , *faza testu*  $\times$  *lek*  $F(1,14)=0,08260$ ,  $p=0,7780$ ; Ryc. 6B) oraz u samic (*faza testu*  $F(1,12)=6,426$ ,  $p=0,0262$ , *lek*  $F(1,12)=0,0001190$ ,  $p=0,9915$ , *faza testu*  $\times$  *lek*  $F(1,12)=0,2494$ ,  $p=0,6265$ ; Ryc. 6D).



**Ryc. 6 Interakcje społeczne w klatce z przegrodą u myszy po podaniu nalmefenu.** Na rycinie przedstawiono czas spędzony w strefie interakcji oraz średnią odległość od przegrody oddzielającej partnera interakcji w grupie samców (A,B) i samic (C,D). Skrót „pre” oznacza fazę pretestu, a „int” – fazę interakcji. Linie łączą wyniki uzyskane przez jednego osobnika. Na wykresie podano wartości  $p < 0,1$  oraz użyto symbolu „\*” dla wartości  $p < 0,05$  w teście post-hoc Sidaka. Liczebność grup wynosiła: samce sól – 8, samce nalmefen – 8, samice sól – 7, samice nalmefen – 7.

Na podstawie danych o położeniu myszy w czasie testu stworzono mapy ciepłe przedstawiające czas spędzony przez zwierzęta w różnych punktach klatki (Ryc. 7). Uzyskane wyniki wskazują na wydłużenie czasu spędzonego w części klatki sąsiadującej z przedziałem partnera podczas fazy interakcji u wszystkich badanych grup.

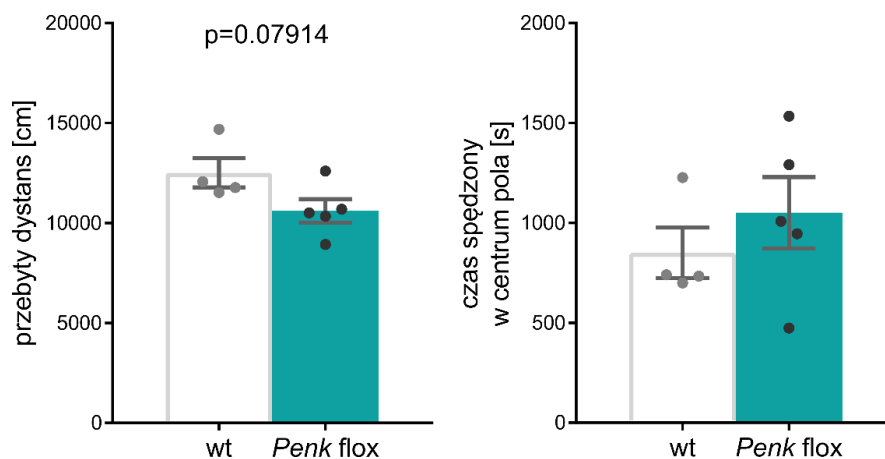


**Ryc. 7** Mapy aktywności w klatce z przegrodą po podaniu nalmeferenu. Mapy przedstawiają znormalizowany czas spędzony przez myszy badane w różnych punktach klatki. Po lewej przedstawiono wyniki uzyskane w preteście, po prawej podczas fazy interakcji. Kolejno przedstawiono grupy: samce kontrolne (A), samce po podaniu nalmeferenu (B), samice kontrolne (C), samice po podaniu nalmeferenu (D).

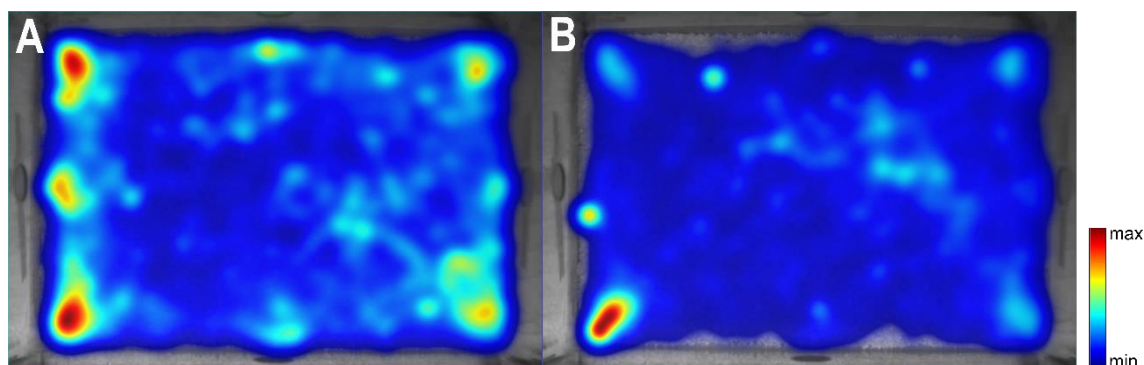
#### 4.2. Wpływ uszkodzenia genu *Penk* na interakcje społeczne

##### *Test interakcji w otwartym polu*

W celu sprawdzenia wpływu enkefalin na zachowania społeczne analogiczne testy wykonano u 5 samic z mutacją obniżającą poziom enkefalin oraz u 5 samic kontrolnych. Aby określić zmiany w zakresie aktywności ruchowej zbadano wpływ mutacji na całkowity dystans przebyty podczas 30 minut eksploracji klatki w otwartym polu. Zaobserwowano tendencję statystyczną względem pokonywanego krótszego dystansu w teście u myszy z mutacją (test t,  $p=0,0791$  Ryc. 8A). Zastosowany test statystyczny nie wykazał wpływu genotypu na zachowania lękowe wyrażone czasem spędzonym w centralnej części pola ( $p=0,4129$ ; Ryc. 8B). Stworzone mapy ciepłe wskazują jednak na zwiększoną tendencję myszy *Penk* flox do przebywania w jednym z rogów klatki (Ryc. 9).

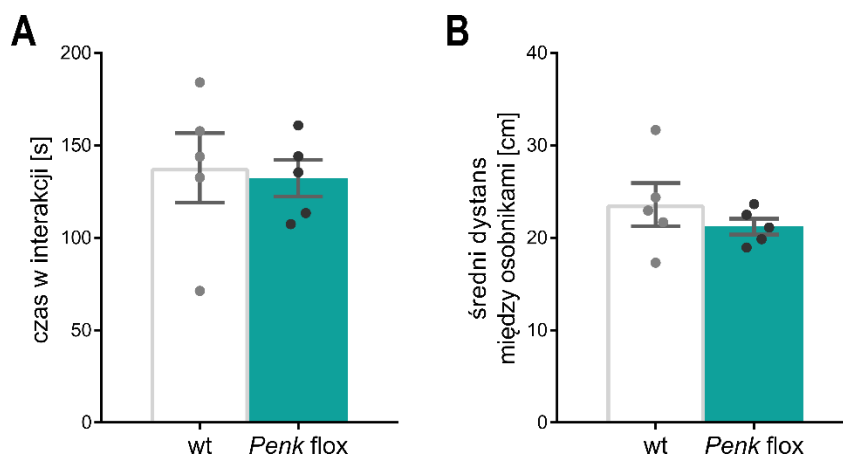


**Ryc. 8 Aktywność ruchowa samic *Penk flox* w teście otwartego pola.** Na wykresach przedstawiono dystans przebyty podczas pierwszych 30 minut testu (A) oraz czas spędzony w centrum otwartego pola (B). Dane przedstawiono jako średnie wraz z SEM. Liczebność grup wyniosła: u myszy typu dzikiego – 4, u *Penk flox* – 5.



**Ryc. 9 Mapy aktywności myszy *Penk flox* w otwartym polu.** Mapy ciepłne przedstawiają znormalizowany czas spędzony przez zwierzęta w różnych punktach otwartego pola, odpowiednio dla myszy o genotypie dzikiego (A) i mutantów (B). Ciepłe kolory oznaczają miejsca, w których zwierzęta przebywały dłużej.

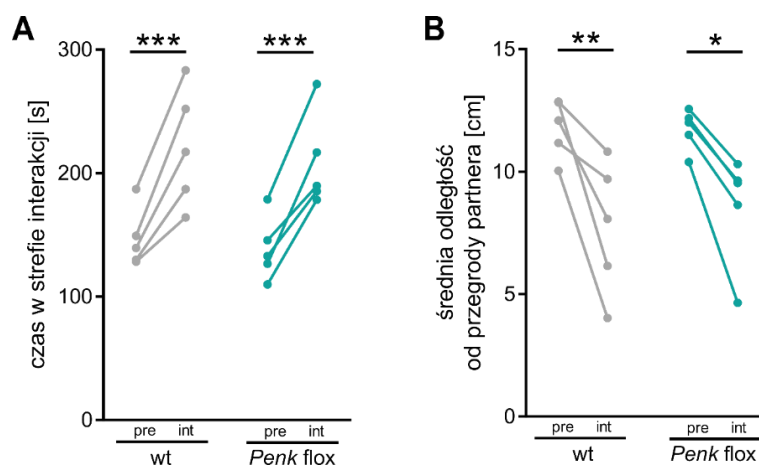
Analiza statystyczna nie wykazała różnic genotypowych w czasie spędzonym na kontakcie z drugim osobnikiem ( $p=0,7961$ ; Ryc. 10A), a także w średnim dystansie między zwierzętami ( $p=0,3668$ ; Ryc. 10B). Podczas testu nie zaobserwowano znaczącego poziomu zachowań agresywnych pomiędzy osobnikami.



**Ryc. 10 Interakcje społeczne w otwartym polu u samic Penk flox.** Na wykresach przedstawiono czas interakcji zdefiniowanej jako mniejsza niż 8 cm odległość między środkami masy ciała (A) oraz średnią odległość pomiędzy osobnikami (B). Dane przedstawiono jako średnie z SEM. Liczebność grup: myszy typu dzikiego – 5, Penk flox – 5.

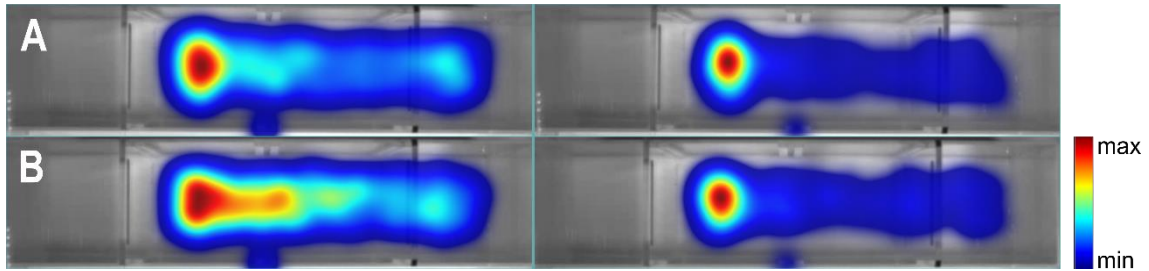
### Test z przegradą

Test przeprowadzony w klatce z przegradą wykazał brak różnic w zachowaniu zwierząt pomiędzy genotypami. Niezależnie od genotypu zwierzęta spędzały istotnie dłuższy czas w strefie interakcji podczas drugiej części testu (*faza testu*  $F(1,8)=82,64$ ,  $p<0,0001$ , *genotyp*  $F(1,8)=0,2334$ ,  $p=0,6420$ , *faza testu*  $\times$  *genotyp*  $F(1,8)=0,06968$ ,  $p=0,7985$ ; Ryc. 11A), w tej części widoczne było również skrócenie średniej odległości myszy badanej od przegrody oddzielającej przedział partnera (*faza testu*  $F(1,8)=34,82$ ,  $p=0,0004$ , *genotyp*  $F(1,8)=0,1216$ ,  $p=0,7363$ , *faza testu*  $\times$  *genotyp*  $F(1,8)=0,5087$ ,  $p=0,4960$ ; Ryc. 11B).



**Ryc. 11 Interakcje społeczne w klatce z przegradą u samic Penk flox.** Na wykresach przedstawiono czas spędzony w strefie interakcji (A) oraz średnią odległość od przegrody oddzielającej partnera interakcji (B) dla każdego osobnika. Linie łączą wyniki uzyskane przez jednego osobnika. Na wykresie przyjęto oznaczenia „\*” dla wartości  $p<0,05$ , „\*\*” dla  $p<0,01$  oraz „\*\*\*” dla  $p<0,001$  uzyskanych w teście post-hoc Sidaka. Liczebność grup wynosiła: myszy typu dzikiego – 5, Penk flox – 5.

Również wygenerowane mapy ciepłne wskazują na wydłużenie czasu spędzonego w pobliżu przedziału partnera w fazie interakcji (Ryc. 12).



*Ryc. 12 Mapy aktywności myszy Penk flox w teście z przegrodą. Mapy przedstawiają znormalizowany czas spędzony przez zwierzęta w różnych punktach klatki z przegrodą. Kolejno przedstawiono grupy: myszy o genotypie dzikim (A), myszy z mutacją (B). Po lewej przedstawiono wyniki uzyskane w preteście, po prawej podczas fazy interakcji.*

Podsumowując, wykazano, że nalmefen nie powodował zaburzeń funkcji ruchowych, miał jednak wpływ na parametry zachowania związane z lękiem i interakcją społeczną u myszy. Efekt działania leku był zależny od płci – dotyczył wyłącznie samic. U myszy z obniżonym poziomem enkefalin nie zaobserwowano istotnych zmian w badanych parametrach zachowań lękowych i interakcji społecznej w otwartym polu, widoczna była jednak tendencja do zmniejszonej ruchliwości oraz preferencja do przebywania w jednym z rogów klatki. Wyniki analizy interakcji w klatce z przegrodą wykazały, że obecność drugiego osobnika wpływa na preferencje myszy do przebywania w pobliżu przedziału z partnerem, jednak nie potwierdziły efektu działania nalmefenu na wydłużenie interakcji u samic.

## 5. Dyskusja

Celem pracy było zbadanie interakcji społecznych pomiędzy osobnikami tej samej płci u myszy. Test otwartego pola pozwolił na określenie motywacji do podejmowania interakcji między dwoma nieznanymi osobnikami. Myszy wykazywały zainteresowanie partnerem interakcji, nie zaobserwowano wysokiego poziomu agresji. Doświadczenie przeprowadzone w klatce z przegrodą wykazało, że u większości badanych grup widoczna była tendencja lub istotność statystyczna dotycząca jednego z badanych parametrów interakcji pomiędzy fazami testu. Uzyskane wyniki potwierdzają naturalną dla myszy preferencję do eksploracji niezagrażających bodźców społecznych i podejmowania kontaktu z innym osobnikiem (Moy i in., 2004).

### *Zróżnicowanie płciowe efektów działania nalmefenu*

W pierwszej części badań do zahamowania endogennego układu opioidowego użyto nalmefenu, który jest nieselektywnym antagonistą receptorów opioidowych, wykazującym wysokie powinowactwo względem receptorów  $\mu$  i  $\kappa$ , oraz znacznie niższe do receptorów  $\delta$ . Przy czym działanie nalmefenu na receptory  $\kappa$  *in vivo* ma charakter częściowego agonizmu (Bart i in., 2005; Osborn i in., 2010). Wyniki doświadczenia wskazują, że lek wpłynął na zachowania społeczne w teście u samic, lecz nie wywołał takiego efektu u samców. Rozbieżności pomiędzy uzyskanymi przez osobniki obu płci wynikami mogły być skutkiem dymorfizmu płciowego dotyczącego na przykład rozmieszczenia docelowych receptorów leku.

Czynnikami mogącym wpłynąć na sposób działania nalmefenu mógł być także zróżnicowany poziom lęku u zwierząt. Porównanie czasu spędzonego w centrum otwartego pola wykazało, że samice z grupy kontrolnej przebywały krócej w tej części klatki w stosunku do samców. Wynik jest zgodny z obserwacjami wskazującymi na tendencję samic do uzyskiwania wyższych wyników w testach oceniających zachowania podobne do niepokoju (An i in., 2011; Archer, 1975), ale niektóre meta-analizy wskazują także na brak różnic płciowych w czasie spędzonym w centrum pola (Fritz i in., 2017). Podczas testu nie zaobserwowano charakterystycznej dla samic zwiększonej aktywności ruchowej w nowym środowisku (Archer, 1975). Według danych literaturowych samice mogą wykazywać także zwiększoną tendencję do podejmowania kontaktu z innymi osobnikami (An i in., 2011). W przeprowadzonym eksperymencie nie zaobserwowano różnic w zachowaniach społecznych pomiędzy samcami i samicami grup kontrolnych.



Czynnikiem przyczyniającym się więc do zaobserwowanych wyników, obok naturalnych różnic międzypłciowych, mogły być warunki przeprowadzania testu. Mimo, że w obu doświadczeniach starano się zachować takie same parametry testowania, to, zgodnie z metodyką przeprowadzania doświadczeń behawioralnych, samce i samice testowano w oddzielnych pomieszczeniach eksperymentalnych. Pokoje eksperymentalne mogły różnić się stopniem stresogenności, co mogło wpłynąć na uzyskane w teście wyniki.

Wyniki uzyskane podczas testu otwartego pola i testu z przegrodą częściowo się potwierdziły – u samców nie zaobserwowano wpływu leku na zachowanie. Co istotne nie wykazano również różnic pomiędzy grupą kontrolną, a nalmefenową u samic. Zakładając jednak, że przez rozdzielenie przestrzenne zwierząt ograniczony został aspekt lękowy interakcji, można wysnuć wniosek, że oddziaływanie nalmefenu na interakcje u samic jest związane jego działaniem anksjolitycznym. W celu lepszego scharakteryzowania różnicy pomiędzy wynikami obu testów przydatne wydawałoby się przeanalizowanie konkretnych zachowań składających się na interakcje w otwartym polu oraz ocena, które ze zwierząt częściej je inicjuje, a także sprawdzenie czy różnice płciowe w działaniu nalmefenu zostaną potwierdzone w innych testach badających zachowania związane z lękiem.

Niemniej odmienny wpływ nalmefenu na badane zachowania u samców i samic pozostaje zaskakujący. Publikacja Browne i współpracowników wskazuje, że lek w dawkach 2,5 mg/kg i 5 mg/kg nie wywołuje różnic płciowych w częstotliwości zachowań związanych z fenotypem depresyjnym (Browne i wsp. 2020). Oczekiwano więc, że efekty uzyskane w teście otwartego pola będą podobne u obu płci. Podczas doświadczeń użyto dawki leku 1 mg/kg. Zarówno dawka jak i odstęp czasowy zostały wybrane zgodnie z danymi literaturowymi opisującymi efekty działania nalmefenu na samcach myszy (Osborn i in., 2010). Wysokie stężenia leków opioidowych mogą zwiększać niespecyficzność wiązania leku z receptorami, co utrudnia interpretację wyników, ponadto znacznie przekraczają zalecaną dawkę nalmefenu u ludzi, która wynosi około 0,25 mg/kg. Być może jednak zastosowane przez mnie stężenie nie było wystarczające do wywołania efektu u samców w tym teście. Dane zebrane na pacjentach poddawanych terapii przeciwbólowej opioidami wskazują na występowanie zróżnicowania płciowego w odpowiedzi na różne dawki opioidów. W przypadku receptorów  $\kappa$ , u kobiet wykazano silniejsze efekty przeciwbólne częściowych agonistów tego receptora niż u mężczyzn,

jednak wyniki uzyskane na gryzoniach wykazują odwrotną zależność (Rasakham & Liu-Chen, 2011). W dalszych badaniach celowym byłoby sprawdzenie wpływu różnych dawek leku na obserwowane zachowania.

#### *Wpływ obniżenia poziomu enkefalin na interakcję społeczną*

Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że myszy szczepu *Penk flox* charakteryzują się silnym zahamowaniem ekspresji genu proenkefaliny, przez co posiadają śladowe ilości enkefalin (Misiołek 2020). Enkefaliny są naturalnymi agonistami receptorów  $\mu$  i  $\delta$ , ich spadek mógł zatem przyczynić się do obniżenia aktywności tych receptorów. Testy przeprowadzone na samicach szczepu *Penk flox* w ramach pracy licencjackiej nie wykazały istotnego wpływu mutacji na zachowania społeczne i związane z lękiem. Brak różnic w czasie spędzonym w centrum otwartego pola jest dosyć zaskakujący w kontekście wcześniejszych doniesień dotyczących myszy z całkowitą delecją genu *Penk* (König i in., 1996; Ragnauth i in., 2001). Mimo że uzyskane wyniki nie wskazują jednoznacznie na zwiększenie poziomu lęku, wzorce poruszania widoczne na mapach cieplnych uwiadcniają silną preferencję myszy do przebywania w jednym z rogów klatki. U zwierząt zaobserwowano również tendencję do pokonywania krótszego dystansu w teście otwartego pola, mimo że wcześniejsze publikacje nie wskazują na występowanie zaburzeń lokomotycznych u myszy pozbawionych enkefalin (Berrendero, 2005; König i in., 1996). Uzyskane wyniki mogą zatem wskazywać na podwyższony poziom lęku, który mógł manifestować się przez bezruch myszy w jednym z punktów klatki. Aby potwierdzić tę hipotezę konieczne byłoby ręczne przeanalizowanie nagrań prób i wykonanie innych testów badających zachowania lękowe.

Dane literaturowe wskazują, że brak enkefalin może obniżać czas interakcji w otwartym polu, jednak jest to uzależnione od testowanego szczepu myszy i nie zostało zaobserwowane u zwierząt na tle genetycznym C57BL/6J (Bilkei-Gorzo i in., 2004). Co warto podkreślić u myszy pozbawionych preproenkefaliny występują rozbieżności osiąganych w testach wyników w zależności od tła genetycznego (C57BL/6J, a DBA/2J) oraz warunków testowania (Bilkei-Gorzo i in., 2008; Bilkei-Gorzo i in., 2004). Niezgodność wyników z danymi literaturowymi może być więc skutkiem tego typu czynników.



Podsumowując brak istotnych statycznie różnic nie wyklucza, że myszy *Penk* flox w rzeczywistości nie wykazują zmian zachowania. W doświadczeniach użyto stosunkowo mało licznych grup myszy, przez co wyniki mogły nie osiągnąć znamienności statystycznej. Nie można też w pełni wykluczyć wpływu zachowania szczątkowej ekspresji białka preproenkefaliny na badane zachowania. Dalsze doświadczenia na myszach z całkowitą delecją genu kodującego preproenkefalinę pozwoliłyby na dokładniejsze określenie zmian wywołanych niedoborem enkefalin, umożliwiłyby również dostosowanie wielkości grup doświadczalnych i porównanie wyników między płciami.

### *Podsumowanie*

Celem pracy było scharakteryzowanie wpływu zahamowania endogennego układu opioidowego na interakcję społeczną. Wykorzystanie nalmefenu umożliwiło zbadanie wpływu zablokowania funkcjonowania receptora  $\mu$  oraz modulacji aktywności receptora  $\kappa$  na badane zachowania. Opierając się na publikacjach udowadniających zaangażowanie receptora  $\mu$  w regulację afiliacyjnych zachowań społecznych założono, że blokada tego receptora będzie miała wpływ na obniżenie czasu interakcji z innym osobnikiem. W doświadczeniu z podaniem nalmefenu zaobserwowano przeciwny efekt, co skłania do postawienia hipotezy, że kluczową dla działania leku w tym teście mogła być modulacja działania receptorów  $\kappa$ . Antagoniści receptorów  $\kappa$  są znani z działania przeciwdepresyjnego i przeciwlękowego (Jacobson i in., 2020). Mimo że nalmefen jest częściowym agonistą receptora  $\kappa$ , wykazano, że u dorosłych samców myszy jego chroniczne podania mogą hamować efekt całkowitego agonisty U50,488 na wydzielanie dopaminy w jądrze półleżącym, co wskazuje, że w pewnych warunkach działanie nalmefenu może mieć charakter funkcjonalnego antagonizmu i mogłoby wyjaśniać zaobserwowane efekty (Browne i in., 2020).

Wyniki uzyskane na myszach z obniżonym poziomem enkefalin pozwoliły z kolei zbadać efekt częściowego braku stymulacji receptorów  $\delta$  i  $\mu$ . Jako że dostępne dane literaturowe o myszach z całkowitą delecją genu *Penk* wykazywały widoczne zmiany o charakterze lękowym i społecznym u myszy, brak wyraźnych różnic w zachowaniu zwierząt w opisanych w tej pracy doświadczeniach był niezgodny z wcześniej przyjętym założeniem. Możliwym jest, że badane parametry i wielkość grup okazały się niewystarczające do zaobserwowania zmian w zachowaniu u tych zwierząt.

Podsumowując, wykorzystane w pracy sposoby modyfikacji funkcji endogenego układu opioidowego nie wywołały oczekiwanego hamującego wpływu na bezpośrednią interakcję z nieznanym osobnikiem tej samej płci. Zaobserwowano natomiast przeciwny efekt – zwiększenie czasu interakcji w wyniku podania nieselektywnego antagonisty receptorów opioidowych. Efekt ten był zależny od płci – wystąpił tylko u samic. W perspektywie kolejnych badań pozostaje próba scharakteryzowania neuronalnego mechanizmu wpływu opioidów na ten rodzaj interakcji oraz potencjalnych różnic płciowych w odpowiedzi na efekty działania nalmefenu u myszy.

## Spis rycin i tabel

Tab. 1 Wiek, masa ciała i ilość zwierząt użytych w doświadczeniach.....	17
Ryc. 1 Schemat klatki wykorzystanej do przeprowadzenia testu otwartego pola.....	18
Ryc. 2 Schemat klatki z przegrodą do badania interakcji w otwartym polu.....	19
Ryc. 3 Aktywność ruchowa myszy w otwartym polu po podaniu nalmefenu.....	20
Ryc. 4 Mapy aktywności ruchowej w otwartym polu po podaniu nalmefenu.....	21
Ryc. 5 Interakcje społeczne w otwartym polu u myszy po podaniu nalmefenu.....	22
Ryc. 6 Interakcje społeczne w klatce z przegrodą u myszy po podaniu nalmefenu.....	23
Ryc. 7 Mapy aktywności w klatce z przegrodą po podaniu nalmefenu.....	24
Ryc. 8 Aktywność ruchowa samic Penk flox w teście otwartego pola.....	25
Ryc. 9 Mapy aktywności samic Penk flox w otwartym polu.....	25
Ryc. 10 Interakcje społeczne w otwartym polu u samic Penk flox.....	26
Ryc. 11 Interakcje społeczne w klatce z przegrodą u samic Penk flox.....	26
Ryc. 12 Mapy aktywności samic Penk flox w teście z przegrodą.....	27

## Bibliografia

Akil, H., Watson, S. J., Young, E., Lewis, M. E., Khachaturian, H., & Walker, J. M. (1984). Endogenous Opioids: Biology and Function: *Annual Review of*

- Neuroscience*, 7, 223–255.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.001255>.
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior: *Anesthesiology*, 1.  
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Fifth Edition). American Psychiatric Association.  
<https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- An, X.-L., Zou, J.-X., Wu, R.-Y., Yang, Y., Tai, F.-D., Zeng, S.-Y., Jia, R., Zhang, X., Liu, E.-Q., & Broders, H. (2011). Strain and Sex Differences in Anxiety-Like and Social Behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Experimental Animals*, 60(2), 111–123. <https://doi.org/10.1538/expanim.60.111>
- Arakawa, H., Blanchard, D. C., Arakawa, K., Dunlap, C., & Blanchard, R. J. (2008). Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(7), 1236–1248.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.05.012>
- Archer, J. (1975). Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behavioral Biology*, 14(4), 451–479. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(75\)90636-7](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(75)90636-7)
- Bart, G., Schluger, J. H., Borg, L., Ho, A., Bidlack, J. M., & Kreek, M. J. (2005). Nalmefene Induced Elevation in Serum Prolactin in Normal Human Volunteers: Partial Kappa Opioid Agonist Activity? *Neuropsychopharmacology*, 30(12), 2254–2262. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300811>
- Berrendero, F. (2005). Nicotine-Induced Antinociception, Rewarding Effects, and Physical Dependence Are Decreased in Mice Lacking the Preproenkephalin Gene. *Journal of Neuroscience*, 25(5), 1103–1112.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3008-04.2005>
- Berridge, K. C., & Kringelbach, M. L. (2015). Pleasure Systems in the Brain. *Neuron*, 86(3), 646–664. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018>
- Bérubé, P., Poulin, J.-F., Laforest, S., & Drolet, G. (2014). Enkephalin Knockdown in the Basolateral Amygdala Reproduces Vulnerable Anxiety-Like Responses to Chronic Unpredictable Stress. *Neuropsychopharmacology*, 39(5), 1159–1168.  
<https://doi.org/10.1038/npp.2013.316>
- Bilkei-Gorzo, A., Otto, M., & Zimmer, A. (2008). Environmental modulation of anxiety-related neuronal activity and behaviors. *Behavioural Brain Research*, 186(2), 289–292. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.027>
- Bilkei-Gorzo, A., Michel, K., Noble, F., Roques, B. P., & Zimmer, A. (2007). Preproenkephalin Knockout Mice Show No Depression-Related Phenotype. *Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2330–2337.  
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301370>

- Bilkei-Gorzo, Andras, Racz, I., Michel, K., Zimmer, A., Klingmüller, D., & Zimmer, A. (2004). Behavioral phenotype of pre-proenkephalin-deficient mice on diverse congenic backgrounds. *Psychopharmacology*, *176*(3–4), 343–352. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1904-9>
- Borsodi, A., Bruchas, M., Caló, G., Chavkin, C., Christie, M. J., Civelli, O., Connor, M., Cox, B. M., Devi, L. A., Evans, C., Höllt, V., Henderson, G., Husbands, S., Kelly, E., Kieffer, B., Kitchen, I., Kreek, M.-J., Liu-Chen, L.-Y., Massot, D., ... Zimmer, A. (2019). Opioid receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, *2019*(4). <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F50/2019.4>
- Briand, L. A., Hilario, M., Dow, H. C., Brodtkin, E. S., Blendy, J. A., & Berton, O. (2015). Mouse Model of OPRM1 (A118G) Polymorphism Increases Sociability and Dominance and Confers Resilience to Social Defeat. *Journal of Neuroscience*, *35*(8), 3582–3590. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4685-14.2015>
- Browne, C. A., Smith, T., & Lucki, I. (2020). Behavioral effects of the kappa opioid receptor partial agonist nalmefene in tests relevant to depression. *European Journal of Pharmacology*, *872*, 172948. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172948>
- Chefer, V. I., Bäckman, C. M., Gigante, E. D., & Shippenberg, T. S. (2013). Kappa Opioid Receptors on Dopaminergic Neurons Are Necessary for Kappa-Mediated Place Aversion. *Neuropsychopharmacology*, *38*(13), 2623–2631. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.171>
- Chelnokova, O., Laeng, B., Eikemo, M., Riegels, J., Løseth, G., Maurud, H., Willoch, F., & Leknes, S. (2014). Rewards of beauty: The opioid system mediates social motivation in humans. *Molecular Psychiatry*, *19*(7), 746–747. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.1>
- Cinque, C., Pondiki, S., Oddi, D., Di Certo, M. G., Marinelli, S., Troisi, A., Moles, A., & D'Amato, F. R. (2012). Modeling socially anhedonic syndromes: Genetic and pharmacological manipulation of opioid neurotransmission in mice. *Translational Psychiatry*, *2*(8), e155–e155. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.83>
- Clarke, S., Czyzyk, T., Ansonoff, M., Nitsche, J. F., Hsu, M.-S., Nilsson, L., Larsson, K., Borsodi, A., Toth, G., Hill, R., Kitchen, I., & Pintar, J. E. (2002). Autoradiography of opioid and ORL1 ligands in opioid receptor triple knockout mice: Autoradiography in opioid triple knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, *16*(9), 1705–1712. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02239.x>
- D'Amato, F. R. (1998). Kin interaction enhances morphine analgesia in male mice. *Behavioural Pharmacology*, *9*(4), 369–374. <https://doi.org/10.1097/00008877-199807000-00009>

- D'Amato, Francesca R., & Pavone, F. (1996). Reunion of Separated Sibling Mice: Neurobiological and Behavioral Aspects. *Neurobiology of Learning and Memory*, *65*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0002>
- DiFeliceantonio, A. G., Mabrouk, O. S., Kennedy, R. T., & Berridge, K. C. (2012). Enkephalin Surges in Dorsal Neostriatum as a Signal to Eat. *Current Biology*, *22*(20), 1918–1924. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.014>
- Dölen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K. W., & Malenka, R. C. (2013). Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature*, *501*(7466), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature12518>
- Eisenberg, R. M. (1984). Effects of naltrexone on plasma corticosterone in opiate-naive rats: A central action. *Life Sciences*, *34*(12), 1185–1191. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(84\)90091-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90091-2)
- Eisenberger, N. I. (2012). The pain of social disconnection: Examining the shared neural underpinnings of physical and social pain. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(6), 421–434. <https://doi.org/10.1038/nrn3231>
- File, S. E., & Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1–3), 35–53. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01273-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01273-1)
- Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H. W. D., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R., & Kieffer, B. L. (2000). Mice deficient for  $\delta$ - and  $\mu$ -opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature Genetics*, *25*(2), 195–200. <https://doi.org/10.1038/76061>
- Fischer, J., & Hammerschmidt, K. (2011). Ultrasonic vocalizations in mouse models for speech and socio-cognitive disorders: Insights into the evolution of vocal communication. *Genes, Brain and Behavior*, *10*(1), 17–27. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00610.x>
- Fritz, A.-K., Amrein, I., & Wolfer, D. P. (2017). Similar reliability and equivalent performance of female and male mice in the open field and water-maze place navigation task. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, *175*(3), 380–391. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31565>
- Gabor, C. S., Phan, A., Clipperton-Allen, A. E., Kavaliers, M., & Choleris, E. (2012). Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition. *Behavioral Neuroscience*, *126*(1), 97–109. <https://doi.org/10.1037/a0026464>
- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J. J., Airan, R. D., Zalocusky, K. A., Tye, K. M., Anikeeva, P., Malenka, R. C., & Deisseroth, K. (2014). Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. *Cell*, *157*(7), 1535–1551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.017>

- Henry, M. S., Bisht, K., Vernoux, N., Gendron, L., Torres-Berrio, A., Drolet, G., & Tremblay, M.-È. (2018). Delta Opioid Receptor Signaling Promotes Resilience to Stress Under the Repeated Social Defeat Paradigm in Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 100. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00100>
- Jacobson, M. L., Browne, C. A., & Lucki, I. (2020). Kappa Opioid Receptor Antagonists as Potential Therapeutics for Stress-Related Disorders. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *60*(1), 615–636. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023317>
- Jastrzębska, K., Walczak, M., Cieślak, P. E., Szumiec, Ł., Turbasa, M., Engblom, D., Błasiak, T., & Parkitna, J. R. (2016). Loss of NMDA receptors in dopamine neurons leads to the development of affective disorder-like symptoms in mice. *Scientific Reports*, *6*(1), 37171. <https://doi.org/10.1038/srep37171>
- Karkhanis, A. N., Rose, J. H., Weiner, J. L., & Jones, S. R. (2016). Early-Life Social Isolation Stress Increases Kappa Opioid Receptor Responsiveness and Downregulates the Dopamine System. *Neuropsychopharmacology*, *41*(9), 2263–2274. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.21>
- Kazdoba, T. M., Leach, P. T., Yang, M., Silverman, J. L., Solomon, M., & Crawley, J. N. (2015). Translational Mouse Models of Autism: Advancing Toward Pharmacological Therapeutics. W T. W. Robbins & B. J. Sahakian (Red.), *Translational Neuropsychopharmacology* (T. 28, s. 1–52). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2015\\_5003](https://doi.org/10.1007/7854_2015_5003)
- Kennedy, D. P., & Adolphs, R. (2012). The social brain in psychiatric and neurological disorders. *Trends in Cognitive Sciences*, *16*(11), 559–572. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.09.006>
- Klimczak, M. (2019). *Działanie ligandów receptorów opioidowych na nagradzające efekty oddziaływań społecznych*. Praca licencjacka, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.
- Komatsu, H., Ohara, A., Sasaki, K., Abe, H., Hattori, H., Hall, F. S., Uhl, G. R., & Sora, I. (2011). Decreased response to social defeat stress in  $\mu$ -opioid-receptor knockout mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *99*(4), 676–682. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.06.008>
- Kondrakiewicz, K., Kostecki, M., Szadzińska, W., & Knapska, E. (2019). Ecological validity of social interaction tests in rats and mice. *Genes, Brain and Behavior*, *18*(1), e12525. <https://doi.org/10.1111/gbb.12525>
- König, M., Zimmer, A. M., Steiner, H., Holmes, P. V., Crawley, J. N., Brownstein, M. J., & Zimmer, A. (1996). Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature*, *383*(6600), 535–538. <https://doi.org/10.1038/383535a0>

- Koob, G. F., & Mason, B. J. (2016). Existing and Future Drugs for the Treatment of the Dark Side of Addiction. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *56*(1), 299–322. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103143>
- Kudryavtseva, N. N. (2003). Use of the “Partition” Test in Behavioral and Pharmacological Experiments. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, *33*(5), 461–471. <https://doi.org/10.1023/A:1023411217051>
- Kung, J.-C., Chen, T.-C., Shyu, B.-C., Hsiao, S., & Huang, A. (2010). Anxiety- and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice: Oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder. *Journal of Biomedical Science*, *17*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-29>
- Land, B. B., Bruchas, M. R., Lemos, J. C., Xu, M., Melief, E. J., & Chavkin, C. (2008). The Dysphoric Component of Stress Is Encoded by Activation of the Dynorphin-Opioid System. *Journal of Neuroscience*, *28*(2), 407–414. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4458-07.2008>
- Langford, D. J., Tuttle, A. H., Brown, K., Deschenes, S., Fischer, D. B., Mutso, A., Root, K. C., Sotocinal, S. G., Stern, M. A., Mogil, J. S., & Sternberg, W. F. (2010). Social approach to pain in laboratory mice. *Social Neuroscience*, *5*(2), 163–170. <https://doi.org/10.1080/17470910903216609>
- Larhammar, D., Bergqvist, C., & Sundström, G. (2015). Ancestral Vertebrate Complexity of the Opioid System. W *Vitamins & Hormones* (T. 97, s. 95–122). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.11.001>
- Le Merrer, J., Becker, J. A. J., Befort, K., & Kieffer, B. L. (2009). Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Reviews*, *89*(4), 1379–1412. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2009>
- Lutz, P.-E., & Kieffer, B. L. (2013). Opioid receptors: Distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*, *36*(3), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.002>
- Mague, S. D., Isiegas, C., Huang, P., Liu-Chen, L.-Y., Lerman, C., & Blendy, J. A. (2009). Mouse model of OPRM1 (A118G) polymorphism has sex-specific effects on drug-mediated behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(26), 10847–10852. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901800106>
- Matthes, H. W. D., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B. P., & Kieffer, B. L. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the  $\mu$ -opioid-receptor gene. *Nature*, *383*(6603), 819–823. <https://doi.org/10.1038/383819a0>
- Matthews, G. A., Nieh, E. H., Vander Weele, C. M., Halbert, S. A., Pradhan, R. V., Yosafat, A. S., Glober, G. F., Izadmehr, E. M., Thomas, R. E., Lacy, G. D., Wildes, C. P., Ungless, M. A., & Tye, K. M. (2016). Dorsal Raphe Dopamine

- Neurons Represent the Experience of Social Isolation. *Cell*, 164(4), 617–631.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.040>
- McLaughlin, J. P., Li, S., Valdez, J., Chavkin, T. A., & Chavkin, C. (2006). Social Defeat Stress-Induced Behavioral Responses are Mediated by the Endogenous Kappa Opioid System. *Neuropsychopharmacology*, 31(6), 1241–1248.  
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300872>
- Melo, I., Drews, E., Zimmer, A., & Bilkei-Gorzo, A. (2014). Enkephalin knockout male mice are resistant to chronic mild stress: Enkephalin knockout mice in chronic mild stress. *Genes, Brain and Behavior*, 13(6), 550–558.  
<https://doi.org/10.1111/gbb.12139>
- Misiołek, K. (2020). *Myszy z mutacją genu proenkefaliny jako model do badań nad działaniem układu nagrody mózgu*. Praca dyplomowa Uniwersytet Jagielloński, Kraków.
- Moles, A. (2004). Deficit in Attachment Behavior in Mice Lacking the—Mu Opioid Receptor Gene. *Science*, 304(5679), 1983–1986.  
<https://doi.org/10.1126/science.1095943>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., & Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>
- Nam, H., Chandra, R., Francis, T. C., Dias, C., Cheer, J. F., & Lobo, M. K. (2019). Reduced nucleus accumbens enkephalins underlie vulnerability to social defeat stress. *Neuropsychopharmacology*, 44(11), 1876–1885.  
<https://doi.org/10.1038/s41386-019-0422-8>
- Osborn, M. D., Lowery, J. J., Skorput, A. G. J., Giuvelis, D., & Bilsky, E. J. (2010). In vivo characterization of the opioid antagonist nalmefene in mice. *Life Sciences*, 86(15–16), 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.02.013>
- Panksepp, J. B., & Lahvis, G. P. (2007). Social reward among juvenile mice. *Genes, Brain and Behavior*, 6(7), 661–671. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00295.x>
- Panksepp, J., Herman, B. H., Vilberg, T., Bishop, P., & DeEsquinazi, F. G. (1980). Endogenous opioids and social behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 4(4), 473–487. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(80\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0149-7634(80)90036-6)
- Pellissier, L. P., Gandía, J., Laboute, T., Becker, J. A. J., & Le Merrer, J. (2018).  $\mu$  opioid receptor, social behaviour and autism spectrum disorder: Reward matters. *British Journal of Pharmacology*, 175(14), 2750–2769.  
<https://doi.org/10.1111/bph.13808>



- Perrine, S. A., Hoshaw, B. A., & Unterwald, E. M. (2006). Delta opioid receptor ligands modulate anxiety-like behaviors in the rat. *British Journal of Pharmacology*, *147*(8), 864–872. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706686>
- Ragnauth, A., Schuller, A., Morgan, M., Chan, J., Ogawa, S., Pintar, J., Bodnar, R. J., & Pfaff, D. W. (2001). Female preproenkephalin-knockout mice display altered emotional responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(4), 1958–1963. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1958>
- Rasakham, K., & Liu-Chen, L.-Y. (2011). Sex differences in kappa opioid pharmacology. *Life Sciences*, *88*(1–2), 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.007>
- Resendez, S. L., Dome, M., Gormley, G., Franco, D., Nevarez, N., Hamid, A. A., & Aragona, B. J. (2013). Mu-Opioid Receptors within Subregions of the Striatum Mediate Pair Bond Formation through Parallel Yet Distinct Reward Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, *33*(21), 9140–9149. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4123-12.2013>
- Roques, B. P., Fournié-Zaluski, M.-C., & Wurm, M. (2012). Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nature Reviews Drug Discovery*, *11*(4), 292–310. <https://doi.org/10.1038/nrd3673>
- Ross, H. E., & Young, L. J. (2009). Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *30*(4), 534–547. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.004>
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(7), 490–502. <https://doi.org/10.1038/nrn2851>
- Smith, C. J. W., Wilkins, K. B., Li, S., Tulimieri, M. T., & Veenema, A. H. (2018). Nucleus accumbens mu opioid receptors regulate context-specific social preferences in the juvenile rat. *Psychoneuroendocrinology*, *89*, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.12.017>
- Tchalova, K., Sadikaj, G., Moskowitz, D. S., Zuroff, D. C., & Bartz, J. A. (2019). Variation in the  $\mu$ -opioid receptor gene (OPRM1) and experiences of felt security in response to a romantic partner's quarrelsome behavior. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0600-4>
- Trezza, V., Damsteegt, R., Achterberg, E. J. M., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2011). Nucleus Accumbens Mu-Opioid Receptors Mediate Social Reward. *Journal of Neuroscience*, *31*(17), 6362–6370. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5492-10.2011>
- Troisi, A., Frazzetto, G., Carola, V., Di Lorenzo, G., Coviello, M., D'Amato, F. R., Moles, A., Siracusano, A., & Gross, C. (2011). Social hedonic capacity is associated with the A118G polymorphism of the mu-opioid receptor gene (

*OPRM1*) in adult healthy volunteers and psychiatric patients. *Social Neuroscience*, 6(1), 88–97. <https://doi.org/10.1080/17470919.2010.482786>

Way, B. M., Taylor, S. E., & Eisenberger, N. I. (2009). Variation in the  $\mu$ -opioid receptor gene (*OPRM1*) is associated with dispositional and neural sensitivity to social rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), 15079–15084. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812612106>

Williamson, C. M., Lee, W., DeCasien, A. R., Lanham, A., Romeo, R. D., & Curley, J. P. (2019). Social hierarchy position in female mice is associated with plasma corticosterone levels and hypothalamic gene expression. *Scientific Reports*, 9(1), 7324. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43747-w>