



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biologii
Neurobiologia

**Działanie ligandów receptorów opioidowych na nagradzające
efekty oddziaływań społecznych**

Marta Klimczak

Praca licencjacka
wykonana pod opieką
dr hab. Jana M. Rodrigueza-Parkitny
oraz dr Zofii Hardej
w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Kraków 2019

Kieruję serdeczne podziękowania dla mojego Promotora,
dr. hab. Jana M. Rodrigueza Parkitny,
za poświęcony czas, zaangażowanie i nieocenioną pomoc
w realizacji niniejszej pracy,
jak również za okazaną wyrozumiałość i życzliwość.

Składam szczególne podziękowania dla dr Zofii Hardej,
za opiekę i wprowadzenie w realizowany projekt, udzielane rady,
jak również dla pozostałych pracowników
Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej,
z którymi miałam przyjemność współpracować.

Część badawcza pracy była dofinansowana ze środków
z projektu grantowego OPUS 2016/21/B/NZ4/00198
przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.

1. Spis treści

1. Spis treści.....	5
2. Wykaz skrótów	5
3. Streszczenie	6
4. Abstract.....	7
5. Wstęp	8
5.1 Zachowania społeczne	8
5.2 Układ nagrody.....	10
5.3 Endogenny układ opioidowy	11
5.4 Agoniści i antagoniści receptorów opioidowych – farmakologia	15
6. Cel pracy	17
7. Materiały i metody.....	17
7.1 Zwierzęta	17
7.2 Odczynniki.....	18
7.3 Schemat doświadczenia	18
7.4 Analiza statystyczna	21
8. Wyniki	22
9. Dyskusja i wnioski.....	27
10. Wykaz rycin.....	30
11. Bibliografia	31

2. Wykaz skrótów

CPP – test warunkowanej preferencji kontekstu

DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]enkephalin) - selektywny agonista receptora opioidowego μ

DPDPE ([D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin) - selektywny agonista receptora opioidowego δ

GDP – guanozynyodifosforan

GTP – guanozynotryfosforan

GIRK – wewnątrzprostownicze kanały potasowe sprzężone z białkiem G

NAc – jądro półleżące

POMC - proopiomelanokortyna

SCPP – test warunkowanej preferencji kontekstu społecznego

VTA – brzuszne pole nakrywki

3. Streszczenie

Interakcje społeczne obejmują wszystkie formy kontaktów między osobnikami oraz odgrywają kluczową rolę w rozwoju zachowań adaptacyjnych. Kontakty społeczne mogą być nagradzające, zwiększając tym samym prawdopodobieństwo, że zwierzę je powtórzy. Zjawisko nagrody społecznej jest ściśle związane z prawidłowym funkcjonowaniem układu nagrody, jak również istotny jest modulujący wpływ endogennego układu opioidowego, co stanowi główny temat mojej pracy. Do obserwacji zachowań społecznych podejmowanych przez myszy posłużono się testem warunkowanej preferencji miejsca, który umożliwił weryfikację tezy o nagradzających właściwościach kontekstu społecznego. Natomiast podanie antagonistów receptorów opioidowych – nalmefenu i cyprodime – pozwoliło na zbadanie wpływu zaburzenia funkcjonowania układu opioidowego na ekspresję zachowań motywacyjnych skierowanych na nagrodę społeczną. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że podanie nieselektywnego antagonisty opioidowego, nalmefenu, obniżyło preferencję kontekstu społecznego wykazywaną przez zwierzęta, podczas gdy cyprodime nie wywołał takiego efektu w porównaniu z grupą kontrolną. Przeprowadzone badania są dobrym punktem wyjścia do zbadania wpływu innych leków na reakcje nagrody społecznej i określenia, w jakim stopniu i poprzez jakie receptory układ opioidowy je moduluje. Wyniki pokazują, że działanie na dane typy receptorów opioidowych zapobiega ekspresji nagrody społecznej.

Słowa kluczowe: zachowania społeczne, endogenne układy opioidowe, nagroda społeczna, warunkowana preferencja miejsca, nalmefen, cyprodime

4. Abstract

Social interactions encompass all forms of contacts between individuals and play a critical role in the development of adaptive behaviors. Social contacts may be rewarding thus increasing the probability of the animal to repeat them. The phenomenon of social reward is closely related to the proper functioning of the reward system, as well as the modulating effect of the endogenous opioid system, which is the main focus of my work. To observe social behaviors in mice, the conditioned place preference test was used. The experiment assessed whether juvenile mice preferred environments that were associated with group housing vs. social isolation. Furthermore, administration of opioid receptor antagonists - nalmefene and cyprodime - allowed to examine the effect of opioid system disorder on the expression of motivational behaviors directed at social reward. The results of the conducted studies indicate that the administration of the non-selective opioid antagonist, nalmefene, reduced the social context preference shown by the animals, whereas the administration of cyprodime did not cause such an effect. The research is a good starting point to study the effects of other drugs on social reward reactions and determine to what extent and through which receptors the opioid system modulates them. The results show that affecting particular opioid receptors prevents from the expression of a preference for a social context.

Key words: social interactions, endogenous opioid system, social reward, conditioned place preference, nalmefene, cyprodime

5. Wstęp

5.1 Zachowania społeczne

Zachowania określone jako społeczne są zorientowane wobec osobników tego samego gatunku i obejmują szereg interakcji zarówno pozytywnych, jak i negatywnych. Zachowania negatywne, czyli agresywne, występują zwłaszcza w przypadku konkurencji o zasoby. Natomiast do zachowań pozytywnych, określanych także jako „afiliacyjne”, możemy zaliczyć zachowania związane z reprodukcją, kooperacją czy relacją rodzic-dziecko. Szczególną formą zachowań społecznych są zachowania prospołeczne, niegdyś uważane za występujące przede wszystkim u ludzi, a dziś szeroko badane także wśród naczelnych i gryzoni. Różnorodność zachowań społecznych uniemożliwia traktowania ich jako odrębną jednostkę i doszukiwania się tych samych neurobiologicznych podłoży dla każdego z nich. Badając wybrane aspekty zachowań społecznych, należy uwzględnić wpływ innych oddziaływań, np. środowiska, ponieważ zmiany w zachowaniu mogą być swoiste w zależności od sytuacji.



Ryc. 1 Przykłady oddziaływań społecznych u zwierząt.

Źródło: Internet. Na zasadach licencji Creative Commons 0 (CC0).

Najważniejszym aspektem zachowań społecznych jest komunikacja, kluczowa dla przeżycia osobnika i zachowania gatunku (Trezza, Baarendse, & Vanderschuren, 2010). Ponadto, obecność interakcji społecznych w okresie młodocianym niesie ze sobą długotrwałe skutki, pozwalając na prawidłowe ugruntowanie i utrzymywanie kontaktów

społecznych, w tym seksualnych i rodzicielskich w wieku dorosłym. Do znanych form takich oddziaływań należy wzajemne oporządzenie się (ang. „*social grooming*”), tworzące poczucie wsparcia i ochrony, a także wpływające korzystnie na regulację stresu, oraz tulenie (ang. „*huddling*”) utrzymujące stan homeostazy i dobrego samopoczucia u młodych osobników oraz pomagające w tworzeniu więzi z rodzeństwem i partnerami. Przykłady interakcji społecznych u zwierząt przedstawiono na Ryc.1.

Interakcje społeczne mogą wywoływać uczucie przyjemności, euforii, tym samym aktywując regiony w mózgu zaangażowane w układ nagrody. Mechanizmy nagradzające zostały zaobserwowane w badaniach na gryzoniach dotyczących m.in. tworzenia monogamicznych par, przywiązania do matki, czy zabaw wśród młodocianych osobników (ang. „*social play*”). Zjawisko zabaw społecznych jest obecne przede wszystkim wśród młodych i dojrzewających gatunków ssaków, w tym ludzi i gryzoni (Trezza, Baarendse, i Vanderschuren 2010). Ich występowaniu często towarzyszy śmiech (naczelne) lub pozytywne wokalizacje ultradźwiękowe (szczury), co wskazuje na korzystny efekt zabaw (Meyza, Bartal, Monfils, Panksepp, & Knapska, 2017; J. Panksepp, Siviy, & Normansell, 1984). Badania nad gryzoniemi, które nie osiągnęły jeszcze wieku rozrodczego, są kluczowe do stwierdzenia, że interakcje społeczne niezwiązane bezpośrednio z reprodukcją również posiadają wartość nagradzającą. Jak wykazano, mediatorem ekspresji takich interakcji są układy odpowiedzialne również za nagradzające właściwości substancji uzależniających. Zachowania społeczne lub potrzeba ich realizacji wywołują wzmożoną aktywność jądra półleżącego oraz kory przedczołowej, natomiast akty odrzucenia społecznego, w tym także długotrwała izolacja, aktywują ciało migdałowe, przednią część wyspy, przedni zakręt obręczy czy istotę szarą okołowodociągową, a więc obszary pobudzone w odpowiedzi na ból fizyczny (Pellissier, Gandía, Laboute, Becker, & Le Merrer, 2018). Ponadto wykazano, iż aktywacja regionów wchodzących w układ nagrody takich jak pole brzuszne nakrywki (VTA) sprzyja przejawianiu nagradzających interakcji społecznych, ze względu na projekcje dopaminergiczne biegnące z VTA bezpośrednio do jądra półleżącego (NAc) (Gunaydin i in., 2014; Tye i in., 2013). Kolejnym znaczącym neuroprzekaźnikiem w kształtowaniu reakcji nagrody społecznej jest serotonina, której wydzielanie w jądrze półleżącym jest regulowane przez oksytocynę (Ahern & Young, 2009; Dölen, Darvishzadeh, Huang, & Malenka, 2013). Wiele badań wskazuje na istotną rolę układu opioidowego w zachowaniach społecznych, szczególnie w aspekcie motywacji oraz odczuwania przyjemności (Achterberg, van Swieten, Houwing, Trezza, &

Vanderschuren, 2018). Przygotowana przeze mnie praca licencjacka dotyczy regulacji oddziaływań społecznych przez endogenne układy opioidowe.

5.2 Układ nagrody

Początki badań nad umiejscowieniem układu nagrody w mózgu sięgają roku 1954, kiedy James Olds i Peter Milner odkryli zjawisko samodrażnienia mózgu. Szczury kojarzyły moment drażnienia elektrodą zaimplantowaną w brzusznej części mózgu z przebywaniem w określonym miejscu w klatce i chętniej do niego wracały. Co więcej, pobudzenie zaimplantowanych elektrod w tych strukturach skutkowało pragnieniem ich ponownej stymulacji poprzez wykonanie określonej reakcji takiej jak naciskanie dźwigni. Badacze wysunęli hipotezę sugerującą obecność w mózgu obszarów wytwarzających pozytywne wzmocnienie, a których bezpośrednia stymulacja działa jak nagroda (R. A. Wise, 1996).

W badaniach z użyciem klatki Skinnera zwierzę uczy się wykonywania reakcji instrumentalnej (naciśnięcie dźwigni) i w odpowiedzi dostaje bodziec o charakterze wzmacniającym (pokarm). Wzmocnienie polega na zwiększeniu częstości występowania zachowań prowadzących do jego otrzymania. W obecności apetytywnych bodźców nagradzających mamy do czynienia ze wzmocnieniem dodatnim (White, 1989; R. A. Wise, 1996). Z kolei pojęcie nagrody odnosi się do właściwości bodźca wyzwalających pragnienie i motywację do podjęcia działań pozwalających na jej zdobycie (Salamone & Correa, 2002; White, 1989). Koncepcja zaproponowana przez White'a zakłada zaangażowanie odrębnych struktur mózgowych w przetwarzaniu informacji o nagradzających i wzmacniających cechach bodźca (Berridge & Kringelbach, 2015).

W utrwalaniu śladów pamięciowych między bodźcem wzmacniającym a reakcją bierze udział droga prążkowiowo-czarna w grzbietowej części prążkowie, natomiast szlak biegnący z brzuszno-pola nakrywki do jądra półleżącego przegrody w brzusznej części prążkowie jest kluczowy w przetwarzaniu nagrody. W obu procesach decydująca jest transmisja dopaminowa (Mohebi i in., 2019; Roy A. Wise, 2004).

Neurony brzuszno-pola nakrywki wydzielające dopaminę wysyłają projekcje do struktur kontrolujących zachowania motywacyjne takich jak prążkowie, jądro półleżące czy kora przedczołowa. Substancje psychoaktywne o działaniu uzależniającym takie jak amfetamina zwiększają ilość i wydłużają działanie dopaminy w jądrze półleżącym. Podobny efekt wywołują naturalne nagrody w postaci jedzenia czy kontaktu seksualnego (White, 1989; Roy A. Wise, 2004). Jednak zgodnie z przedstawioną przez Schultza teorią

błędu przewidywania (ang. *reward prediction error*) pobudzenie neuronów dopaminowych koduje informacje o różnicy między oczekiwaną a uzyskaną nagrodą (Schultz, 2015). Zjawisko to jest związane z szybką fazową aktywnością neuronów dopaminowych, które modułują procesy uczenia się. Natomiast wolniejsze, toniczne fluktuacje neuronów dopaminowych odpowiedzialne są za kierowanie motywacją (Schultz, 2016). Z najnowszych prac wynika, że mechanizm przetwarzania nagrody przez komórki dopaminowe jest bardziej złożony i wyładowania pochodzące z NAc, kluczowe dla zachowań motywacyjnych, mogą działać niezależnie od pobudzenia dopaminowych komórek VTA. Tym samym transmisja dopaminowa z NAc stanowi sygnał o wartości nagrody, co może wywołać pragnienie i motywację do podjęcia działań pozwalających na jej zdobycie (Mohebi i in., 2019).

Mezokortykolimbiczny układ dopaminowy jest kluczowy również w przetwarzaniu informacji o nagrodzie społecznej. Zwiększenie ilości dopaminy w NAc podwyższa chęć podejmowania zabaw społecznych bez wywierania wpływu na aktywność eksploracyjną i aktywność lokomotoryczną (Manduca i in., 2016). W mediowaniu nagradzających właściwości interakcji społecznych oprócz dopaminy wskazuje się także na rolę peptydów opioidowych, endokannabinoidów, a także oksytocyny i wazopresyny (Insel, 2003; Trezza, Damsteegt, Achterberg, & Vanderschuren, 2011). W dalszej części mojej pracy przedstawię związek endogennego układu opioidowego z kształtowaniem interakcji społecznych o właściwościach nagradzających.

5.3 Endogenny układ opioidowy

Do układu opioidowego należą trzy główne rodzaje peptydów opioidowych: enkefaliny (Leu-enkefalina, Met-enkefalina), dynorfiny (Dynorfina A, Dynorfina B) oraz β -endorfina, produkowane z białek prekursorowych, odpowiednio: proenkefaliny (Penk), prodynorfiny (Pdyn) oraz proopiomelanokortyny (POMC) (Akil i in., 1984). Cechą wspólną dla wyżej wymienionych ligandów opioidowych jest obecność N-końcowej sekwencji aminokwasowej Tyr-Gly-Gly-Phe, kluczowej w wiązaniu do receptorów (Lord i in. 1977). Receptory opioidowe należą do rodziny receptorów metabotropowych związanych z białkiem G posiadającym siedem transbłonowych helis z N-końcem na zewnątrz komórki.

W stanie spoczynkowym receptor opioidowy związany jest z heterotrimerycznym białkiem $G_{i/o}$, a do jego podjednostki α przyłączony jest guanozynodifosforan (GDP).

W wyniku aktywacji receptora poprzez zmiany konformacyjne dochodzi do wymiany GDP na GTP, a następnie rozpadu kompleksu receptora z białkiem $G_{i/o}$. Białko G wraz z podjednostką α wchodzi w interakcje z białkami szlaków wewnątrzkomórkowych, co prowadzi do zahamowania aktywności cykazy adenylowej. Z kolei kompleks białek $G_{o/i}$ i podjednostek $\beta\gamma$ bezpośrednio stymuluje wewnątrzprostownicze kanały potasowe sprzężone z białkiem G (GIRK) (ang. *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel*) oraz hamuje kanały wapniowe. W efekcie zachodzi hiperpolaryzacja błony komórkowej i zahamowanie neurotransmisji. Do ponownej inaktywacji białka G dochodzi na drodze wewnętrznej aktywności hydrolazowej podjednostki $G\alpha$ lub dzięki białkom RGS (ang. „*regulators of G protein signaling*”), które przyspieszają hydrolizę GTP na GDP. Kompleks białko $G\alpha$ -GDP nie wykazuje właściwości efektorowych i na nowo łączy się z $\beta\gamma$ (Traynor, 2012).

Receptory opioidowe klasyfikowane są do trzech głównych klas: μ , δ i κ , przy czym β -endorfina i enkefaliny charakteryzują się odpowiednio większym powinowactwem do receptorów μ i δ , a dynorfiny do receptorów κ . Prekursory peptydów opioidowych w dużej mierze kolokalizują z ekspresją białek receptorów opioidowych, szczególnie zwiększoną w korze mózgu, pniu mózgu oraz układzie limbicznym, ale oprócz działania lokalnego na sąsiednie komórki istotne są także projekcje do odległych regionów mózgu. Proenkefalina należy do najbardziej rozpowszechnionych prekursorów endogennych opioidów w ośrodkowym układzie nerwowym, podobnie jak ciała komórek, w których dochodzi do jej ekspresji, ze szczególnym uwzględnieniem wzgórza mózgu. Natomiast proopiomelanokortyna nie jest obecna w strukturach korowych, a miejscami jej syntezy są jądro łukowate, pasmo jądra samotnego oraz przedni i pośredni płat przysadki mózgowej. Receptory μ i δ w pewnym stopniu ze sobą współwystępują, chociaż obecność receptorów δ jest bardziej ograniczona w rejonach wzgórza, podwzgórza, śródmózgowia i pnia mózgu. Z kolei najwyższe stężenie prodynorfiny obserwuje się w jądrze półleżącym, podczas gdy ciała komórek produkujących prodynorfinę są szeroko rozpowszechnione zwłaszcza w podwzgórzu. Receptory κ również występują licznie w rejonach podwzgórza, prążkowie, a także w jądrze półleżącym, jak i w pozostałych częściach podstawy przodomózgowia (Le Merrer, Becker, Befort, & Kieffer, 2009).

Neurony zlokalizowane w tyłomózgowiu kontrolują funkcje oddechowe oraz związane z krążeniem. Receptory opioidowe poza ośrodkowym układem nerwowym są również liczne w obwodowych neuronach czuciowych i biorą udział w modulowaniu reakcji na

ból, w tym osłabieniu wrażliwości na bodźce bólowe (analgezji). Ponadto odpowiadają za ruchy perystaltyczne jelit, wydzielanie wody i elektrolitów w przewodzie pokarmowym, a także regulują działanie układu odpornościowego.

Elementy układu opioidowego są istotne w przetwarzaniu bodźców o charakterze nagradzającym (Bozarth & Wise, 1984; Le Merrer i in., 2009), a ponadto są ważnymi mediatorami zachowań społecznych (J. Panksepp i in. 1980), co stanowi główny temat mojej pracy.

Wiele badań nad rolą układu opioidowego w modulowaniu interakcji społecznych opiera się na iniekcji egzogennych ligandów dla receptorów opioidowych i obserwacji ich działania na różne rodzaje zachowań społecznych u zwierząt. Wykazano istotną rolę transmisji opioidowej w kształtowaniu wzorców przywiązania u noworodków, nagradzających właściwościach relacji rodzic-dziecko, wzajemnego oporządzania się, relacji między rówieśnikami, a także w zachowaniach seksualnych i społecznych u dorosłych (Pellissier i in., 2018). Stwierdzono stymulujący efekt niskich dawek morfiny, aktywującej głównie receptory μ , na zaangażowanie w zabawy społeczne u młodych szczurów, podczas gdy nieselektywny antagonistą tych receptorów – nalokson – zmniejszał takie reakcje (Normansell & Panksepp, 1990). W badaniach przeprowadzonych nad młodymi ssakami iniekcje opioidów znacząco redukowały ultradźwiękowe wokalizacje wywołane stresem związanym z izolacją społeczną, natomiast antagoniści zwiększali indukowane stresem wokalizacje i przyjmowanie postawy obronnej (J. Panksepp, Herman, Vilberg, Bishop, & DeEsquinazi, 1980). Podanie selektywnego agonisty receptorów μ opioidowych (DAMGO) do jądra półleżącego, a zwłaszcza jego pokrywy, okazało się wystarczające do zwiększenia interakcji społecznych. Podczas gdy podanie selektywnego agonisty receptora δ (DPDPE) nie wywołało żadnych zmian, pobudzenie receptorów κ zmniejszyło chęć podejmowania zachowań społecznych (Trezza i in., 2011).

Podczas interakcji społecznych w jądrze półleżącym (NAc) zwiększone jest wydzielanie endogennych opioidów, stąd uważa się tę strukturę za kluczowe miejsce działania opioidów w modulowaniu nagrody społecznej (Trezza i in., 2011; Vanderschuren, Stein, Wiegant, & Van Ree, 1995). Receptory μ opioidowe znajdujące się w jądrze półleżącym są szczególnie operatywne w reakcjach tworzenia więzi społecznych, a ich ekspresja w tej strukturze jest zwiększona u gatunków monogamicznych. Podania antagonistów receptorów opioidowych bezpośrednio do jądra półleżącego ograniczają tworzenie się preferencji społecznych, natomiast taki zabieg u myszy w czwartym dniu postnatalnym prowadzi do zaburzeń społecznych i anhedonii w wieku dorosłym (Pellissier i in., 2018).

Zespół Pankseppa w roku 1978 zaproponował hipotezę BOTSA (Brain Opioid Theory of Social Attachment) dotyczącą zależności między poziomem endogennych peptydów opioidowych w mózgu a zachowaniami społecznymi i nagradzającymi. Hipoteza została oparta na podstawie obserwacji podobieństw behawioralnych i emocjonalnych wpływu bliskich kontaktów społecznych i substancji silnie uzależniających. Według teorii BOTSA deprywacja społeczna prowadzi do zmniejszonej transmisji endogennych opioidów, tym samym wywołując potrzebę zaspokojenia braku kontaktu społecznego i motywując do jej poszukiwania. Natomiast interakcje społeczne skutkują zwiększonym wydzielaniem endogennych peptydów opioidowych, pobudzeniem układu nagrody i poczucia euforii oraz zadowolenia, co wiąże się z nagradzającym efektem oddziaływań społecznych prowadzącym do tworzenia i podtrzymania więzi społecznych oraz wzorów przywiązania (J. Panksepp, Herman, Conner, Bishop, & Scott, 1978). Badania nad młodocianymi i dorosłymi ssakami potwierdzają tę hipotezę, jako że iniekcje agonistów receptorów opioidowych (morfiny) zmniejszały stres indukowany izolacją społeczną, a antagonistów – wyraźnie go zwiększały. Z drugiej strony, szereg innych badań nad młodocianymi i dorosłymi gryzoniami świadczy o zwiększonym zaangażowaniu w interakcje społeczne, takie jak zabawy czy wzajemne oporządzanie się, na skutek aktywacji układu opioidowego, także przez podanie morfiny (J. B. Panksepp & Lahvis, 2007; Vanderschuren i in., 1995).

Na wyjaśnienie tej niezgodności została zaproponowana hipoteza SOMSON (The State-dependent μ -Opioid Modulation of Social Motivation), według której efekt działania ligandów na receptory opioidowe jest determinowany przez wyjściową motywację zwierzęcia (Loseth, Ellingsen, & Leknes, 2014). Blokada transmisji opioidowej nie powoduje zwiększenia motywacji społecznej w warunkach społecznego komfortu, a jedynie w sytuacji społecznej deprivacji. Natomiast wzmożona aktywacja układu opioidowego poprzez iniekcje agonistów lub zwiększonego wydzielania endogennych peptydów opioidowych prowadzi do osiągnięcia stanu komfortu w przypadku deprivacji społecznej, a więc redukuje potrzebę kontaktu społecznego. Jednak w warunkach równowagi homeostatycznej zwiększona transmisja opioidowa skutkuje nasileniem motywacji do poszukiwania interakcji społecznych, a jej zahamowanie znosi ten efekt w postaci braku zaangażowania do podejmowania wszelkich kontaktów i przyjęcia postawy obojętnej. Potwierdziły to liczne badania, m.in. na naczelnych żyjących w grupie, które nie doświadczyły stresu związanego z izolacją społeczną. Podanie morfiny intensyfikowało podejmowanie reakcji społecznych w porównaniu z grupą

kontrolną, natomiast dostarczenie antagonisty powodowało efekt odwrotny (Guard, Newman, & Roberts, 2002; Schino & Troisi, 1992).

5.4 Agoniści i antagoniści receptorów opioidowych – farmakologia

Zidentyfikowano szereg substancji pochodzenia naturalnego lub produkowanych syntetycznie działających receptory opioidowe. Pierwszą grupą są opiaty, czyli alkaloidy z maku lekarskiego (*Papaver somniferum L.*), do których należą: morfina, kodeina, tebaina czy papaweryna. Produkowane z maku opium używane jest na całym świecie od ponad 5000 lat w celach medycznych, a także rekreacyjnych i religijnych. W XX. wieku w celu dostarczenia nowych farmaceutyków działających na receptory opioidowe naukowcy opracowali półsyntetyczne (np. heroina, oksykodon) i syntetyczne formy opioidów (np. fentanyl, metadon, tramadol). W założeniu poszukiwano pochodnych opioidów nie posiadających właściwości uzależniających, w rzeczywistości uzyskano również formy uzależniające silniej od poprzednio poznanych (Pasternak & Pan, 2013). Opioidy klasyfikowane są także na podstawie ich efektywności wiązania się z receptorami jako pełni agoniści, częściowi agoniści i antagoniści. Podanie pełnego agonisty wywołuje maksymalną odpowiedź receptorową, czego dobrym przykładem jest morfina o wysokim powinowactwie i selektywności dla receptora μ , podczas gdy częściowy agonista mimo związania się z receptorem aktywuje go z mniejszą wydajnością. Z kolei antagonistą po związaniu się do receptora nie aktywuje go i równocześnie blokuje dostęp agonisty do receptora. Mechanizm ten pozwala na zastosowanie antagonistów, takich jak nalokson lub naltrekson, do znoszenia działania opioidów, głównie w sytuacjach ich przedawkowania (Pathan & Williams, 2012). Szerokie spektrum substancji opioidowych pozwala na wykorzystanie ich w różnorodnych badaniach naukowych dotyczących nie tylko leczenia bólu czy uzależnień, reakcji stresowych, procesów metabolicznych, oddechowych, endokrynych czy immunologicznych, ale również roli układu opioidowego w procesach przetwarzania nagrody i w zachowaniach społecznych, co stanowi także główny temat mojej pracy licencjackiej. Zastosowanie agonisty lub antagonisty dla danego receptora pozwala na obserwację efektów wynikających odpowiednio z ich aktywacji lub hamowania. Skupiając się na modulowaniu oddziaływań społecznych przez układ opioidowy przeprowadzono szereg testów na gryzoniach, naczelnych i ludziach w warunkach społecznego komfortu lub izolacji społecznej, badając wpływ niskich dawek lub trwałej ekspozycji na substancje opioidowe.

W pracach naukowych mających na celu zbadanie roli układu opioidowego w modulowaniu oddziaływań społecznych i przetwarzaniu nagradzających właściwości bodźców stosuje się małe dawki agonistów lub antagonistów najczęściej w formie podskórnych iniekcji, a następnie obserwuje się zmiany w zachowaniu w różnych testach behawioralnych. Na potrzeby mojej pracy licencjackiej zostały zastosowane dwie substancje opioidowe z grupy antagonistów – nalmefen i cyprodime.

Cyprodime jest wysoce selektywnym antagonistą receptorów μ opioidowych otrzymanym syntetycznie w latach osiemdziesiątych XX wieku. W porównaniu do powszechnie stosowanych naloksonu i naltreksonu ma słabe powinowactwo do receptorów δ i κ , a silne do receptorów μ , ze stałymi dysocjacji odpowiednio $K_i=244,6\text{nM}$, 2187 nM oraz $5,4\text{nM}$. Zastosowanie cyprodime pozwala na badanie efektów zablokowania jedynie receptora μ , bez wywierania efektu na pozostałe receptory opioidowe (Schmidhammer 1989).

Nalmefen, o zbliżonej budowie i działaniu do naltreksonu również posiada antagonistyczne właściwości w stosunku do receptorów μ ($K_i=0,24\text{nM}$) i w mniejszym stopniu do receptorów δ ($K_i=16\text{nM}$). Jest także częściowym agonistą receptorów κ ($K_i = 0,083\text{ nM}$) o niskiej wydajności (Paille & Martini, 2014). Został wprowadzony na rynek jako lek stosowany w terapii alkoholizmu w celu zmniejszenia ryzyka epizodów intensywnego picia alkoholu.

Zastosowanie wyżej wymienionych antagonistów receptorów opioidowych może pomóc w odpowiedzi na pytanie, czy zaburzenie funkcjonowania układu opioidowego wpłynie na ekspresję zachowań społecznych o charakterze nagradzającym.

6. Cel pracy

Celem mojej pracy licencjackiej było zbadanie roli endogennego układu opioidowego w nagradzających efektach oddziaływań społecznych. Opierając się na założeniu, że obniżenie aktywności receptorów opioidowych może dezorganizować prawidłowe funkcjonowanie układu nagrody, do zbadania tego zjawiska posłużono się antagonistami receptorów opioidowych. Pierwszym krokiem było dobranie odpowiednich warunków eksperymentalnych umożliwiających obserwację zjawiska nagrody społecznej u myszy. Do prawidłowej oceny interakcji społecznych podejmowanych przez zwierzęta wdrożono test warunkowanej preferencji kontekstu społecznego. Zastosowanie środków farmakologicznych umożliwiło sprawdzenie roli układu opioidowego w ekspresji zachowań skierowanych na interakcje społeczne. Podanie dwóch różnych antagonistów receptorów opioidowych – nalmefenu i cyprodime - pozwoliło na obserwację zmiany zachowania badanych zwierząt będącego efektem zaburzonego działania układu opioidowego. Wyniki przeprowadzanych eksperymentów mogą być źródłem informacji, czy zmiana działania układu opioidowego wpływa na kształtowanie reakcji nagrody społecznej.

7. Materiały i metody

7.1 Zwierzęta

W przeprowadzonych w ramach mojej pracy licencjackiej doświadczeniach poddane były myszy (*Mus musculus L.*) szczepu C57BL/6J pochodzące z hodowli Instytutu Farmakologii im. Jerego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. W eksperymentach uczestniczyły samce w wieku od 3 do 5 tygodni, odstawione od matki najwcześniej 21 dni po urodzeniu. Przez cały okres trwania doświadczeń zwierzęta miały swobodny dostęp do wody i pożywienia. Przebywały w warunkach o stałej temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i cyklu dobowym z fazą jasną w godzinach 10-22 i fazą ciemną w godzinach 22-10. Były umieszczane w klatkach hodowlanych wykonanych z pleksiglasu w liczbie 2-5 osobników na jedną klatkę (dł. 325 mm x szer. 170 mm). Każdy z przeprowadzonych eksperymentów przebiegał za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie nr 35/2019 oraz według zarządzeń Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz. Urz. UE L 276 z 20.10.2010).

7.2 Odczynniki

W fazie testu zwierzęta z grupy badanej otrzymały dootrzewnowo zastrzyki zawierające odpowiednio roztwór chlordorowodorku nalmefenu (1mg/kg, 5µl/g) z firmy TOCRIS, nr 4085 oraz roztwór chlorowodorku cyprodime (1mg/kg, 5µl/g), TOCRIS, nr 2601. Roztwór przyrządzano poprzez rozpuszczenie leku w fizjologicznym roztworze chlorku sodu (5mg substancji/ 5ml soli fizjologicznej). Ponieważ po upływie 1,5 godziny od podskórnego podania nalmefenu w osoczu osiągnięte jest jego najwyższe stężenie, godzinę po iniekcji rozpoczynana była próba trwająca 30 minut. Analogicznie postąpiono z chlorowodorkiem cyprodime. Jednocześnie zwierzęta z grupy kontrolnej dostały iniekcję soli fizjologicznej.

7.3 Schemat doświadczenia

Test warunkowanej preferencji kontekstu społecznego

Model eksperymentalny badający zjawisko nagrody społecznej został oparty na procedurze warunkowanej preferencji miejsca (CPP – ang. *conditioned place-preference*) będącej podstawową metodą weryfikacji nagradzającego działania bodźców.

W eksperymencie warunkowanej preferencji miejsca bodźcami neutralnymi są odrębne środowiska (np. typ ściółki, rodzaj klocka). Jedno ze środowisk jest kojarzone z występowaniem nagrody, a drugie z jej brakiem. W modyfikacji CPP mierzącej motywacyjne efekty interakcji społecznych (SCPP – ang. *social conditioned place-preference*) nagrodą jest bytowanie w jednym ze środowisk wraz z innymi zwierzętami, co stwarza kontekst społeczny (J. B. Panksepp & Lahvis, 2007). W drugim środowisku zwierzęta umieszczane są oddzielnie (kontekst izolacji społecznej). Do testów CPP skonstruowany został specjalny aparat zawierający dwa oddzielne przedziały (Ryc.2). Przed rozpoczęciem sesji warunkowań, zwierzę umieszczane jest w aparacie i oceniana jest wyjściowa preferencja do dwóch rodzajów środowisk. Założenia procedury w schemacie „bez uprzedzeń” (z ang. „*unbiased*”) wymagają, by oba środowiska były neutralne dla zwierzęcia. Po sesjach warunkowań naprzemiennie w obu środowiskach, warunkowana preferencja miejsca mierzona jest jako czas spędzony przez zwierzę w wybranym przez siebie jednym ze środowisk. W tym celu zwierzę ponownie jest umieszczane w aparacie, a swobodny dostęp do obu kompartamentów pozwala ocenić

preferowany przez zwierzę kontekst. Czas spędzony w każdym z przedziałów jest mierzony i następnie porównywany z wyjściową preferencją.



Ryc.2 **Klatka do testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (SCPP).**

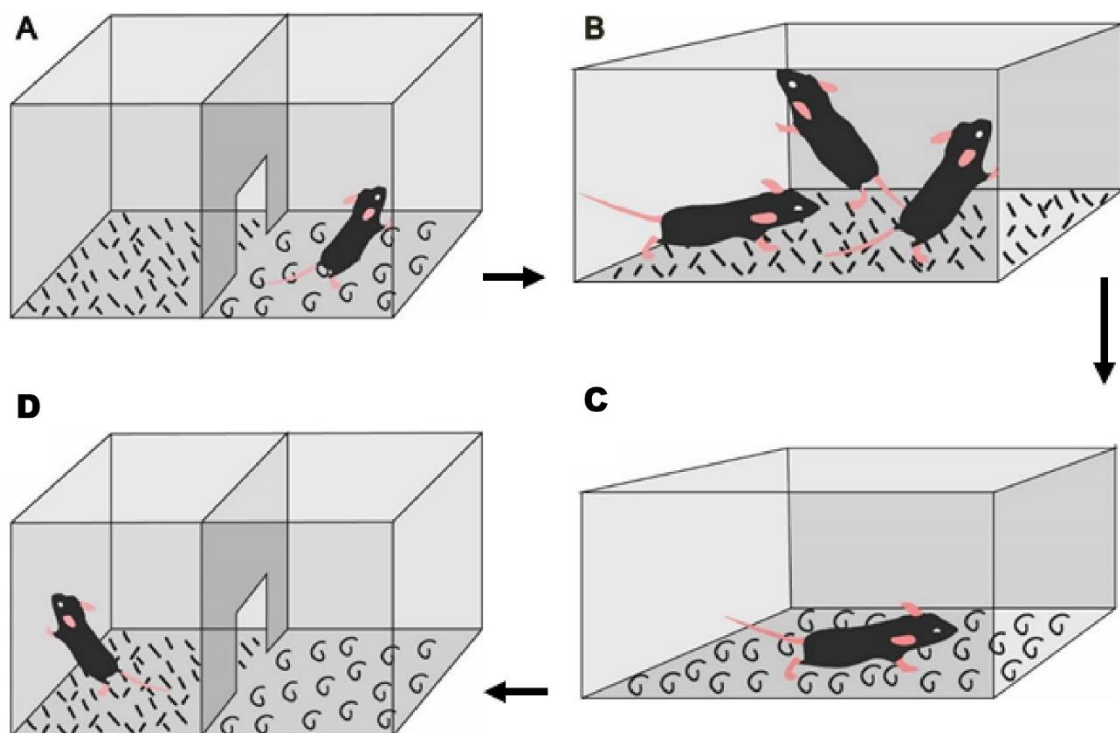
Przedział u góry: ściółka z buku i prostopadłościenny klocek. Przedział na dole: ściółka z celulozy i sześcienny klocek.

Źródło: Opracowanie własne.

Schemat doświadczenia

Procedura warunkowanej preferencji kontekstu społecznego zastosowana w ramach realizacji mojej pracy licencjackiej została oparta na modelu Pankseppa (J. B. Panksepp

& Lahvis, 2007) oraz Dölen (Dölen i in., 2013). W eksperymencie badane były młode samce myszy C57BJ/6J, aby wykluczyć inne przejawy zachowań społecznych występujące u osobników starszych. Po wcześniejszych eksperymentach pilotażowych ustalone zostały dwa typy neutralnych środowisk, z których pierwszym była ściółka z buku (Trociny bukowe przesiane gat. 1; producent P.P.H. "WO-JAR".) oraz prostopadłościenny klocek (gryzak w kształcie prostopadłościanu), a drugim ściółka z celulozy (Biofresh Performance Bedding, Absorption Corp, USA, 1/8' Pelleted Cellulose) oraz sześcienny klocek (gryzak w kształcie sześcianu). Ponadto, w każdej z klatek podczas warunkowania znajdował się materiał gniazdowy oraz nielimitowany dostęp do wody i pożywienia. Schemat eksperymentu został przedstawiony na Ryc.3.



Ryc.3 Schemat przebiegu testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego.

- A) Faza pre-testu: zwierzę swobodnie eksploruje dwa przedziały o neutralnych, różnych od siebie środowiskach. B) Zwierzęta umieszczane są w kontekście społecznym na jednej ze ściółek. C) Po upływie 24h zwierzę umieszczane jest w izolacji w innym środowisku. D) Faza post-testu: Po 6 sesjach naprzemiennych warunkowań w kontekście społecznym (B) i izolacji (C) zwierzę ponownie umieszczane jest w aparacie do SCPP.

Źródło: Opracowanie własne.

W fazie pre-testu myszy umieszczane były w specjalnie zaprojektowanym aparacie do CPP składającym się z dwóch przedziałów (Ryc.2 wraz z wymiarami) przedzielonych przezroczystą szybą z wycięciem pozwalającym na swobodną eksplorację w obu częściach klatki. W każdym z przedziałów znajdował się jeden typ wybranej uprzednio ściółki wraz ze zdefiniowanym dla niej klockiem. Podczas 30-minutowych prób badany był czas przebywania przez zwierzę na każdej ze ściółek w celu weryfikacji braku wyjściowej preferencji. Następnego dnia rozpoczęto sesje warunkowań: najpierw myszy były umieszczane na 24 godziny w standardowych klatkach domowych wspólnie z rodzeństwem na jednym z rodzajów środowisk (kontekst społeczny). Podczas kolejnych 24 godzin myszy były umieszczane oddzielnie w klatkach zawierających drugi typ środowiska (kontekst izolacji społecznej). Łącznie wykonano 6 sesji warunkowań, przy czym ostatnią sesją była zawsze izolacja społeczna. Zastosowanie takiej kolejności sesji warunkowań oraz 24-godzinnych okresów ich trwania jest uzasadnione oczekiwaniem mocniejszych efektów testu warunkowanej preferencji kontekstu (J. B. Panksepp i Lahvis 2007). Przed przystąpieniem do post-testu, myszy zostały podzielone na grupę kontrolną i badawczą, które otrzymały odpowiednio iniekcje placebo oraz roztworu chlorowodorku nalmefenu lub chlorowodorku cyprodime. Faza post-testu przebiegała analogicznie do pre-testu. Analizowano czas przebywania w każdym z przedziałów i porównano wyniki preferencji z pre-testem oraz różnice dla osobników z grupy kontrolnej i badanej.

7.4 Analiza statystyczna

Przebieg 30-minutowych prób był nagrywany za pomocą kamer Basler GigE i analizowany w programie Noldus EthoVision 11.5.

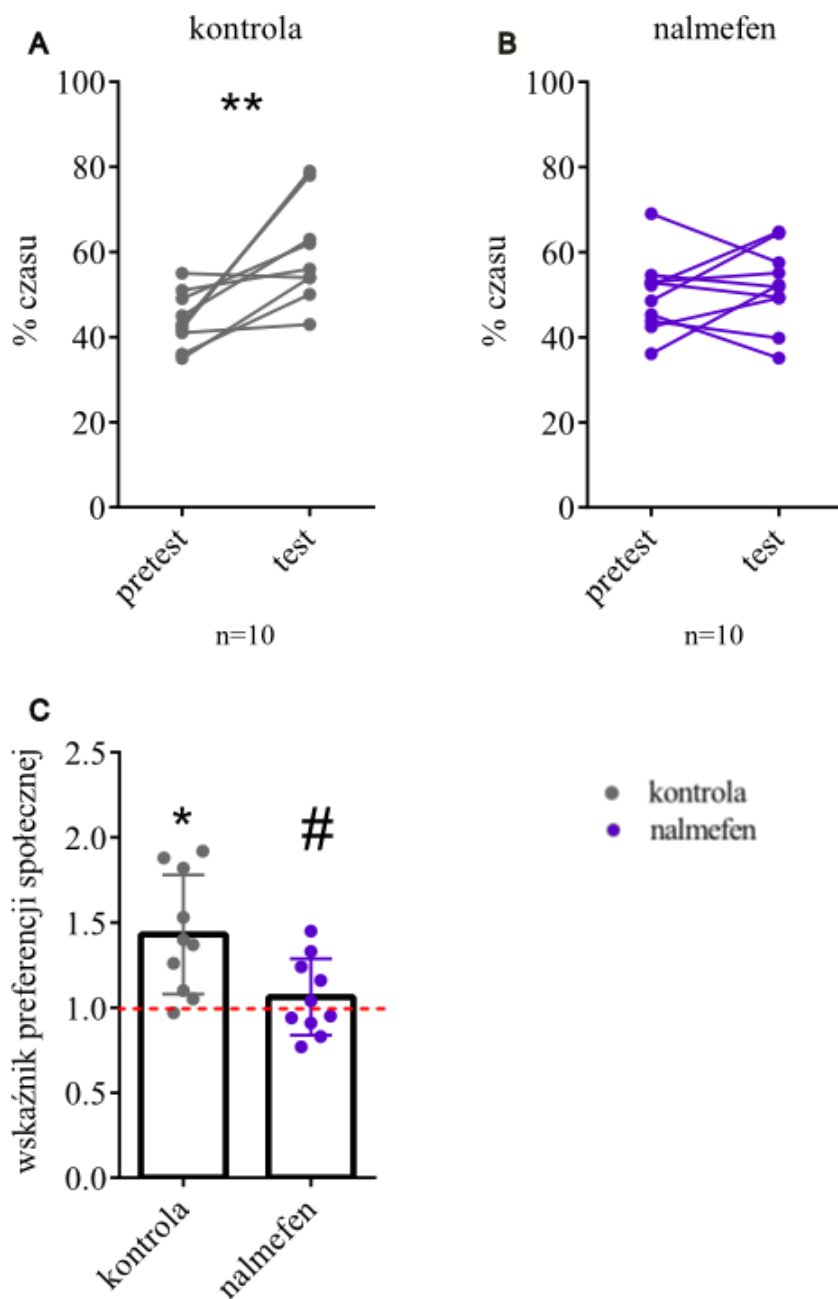
Analizę statystyczną dotyczącą różnic między badanymi grupami przeprowadzono z użyciem testu t Studenta dla porównań dwóch grup oraz dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) w modelu mieszanym w przypadku porównań dla więcej niż dwóch prób w programie GraphPad Prism. Edycje rycin dokonano w programie Inkscape.

8. Wyniki

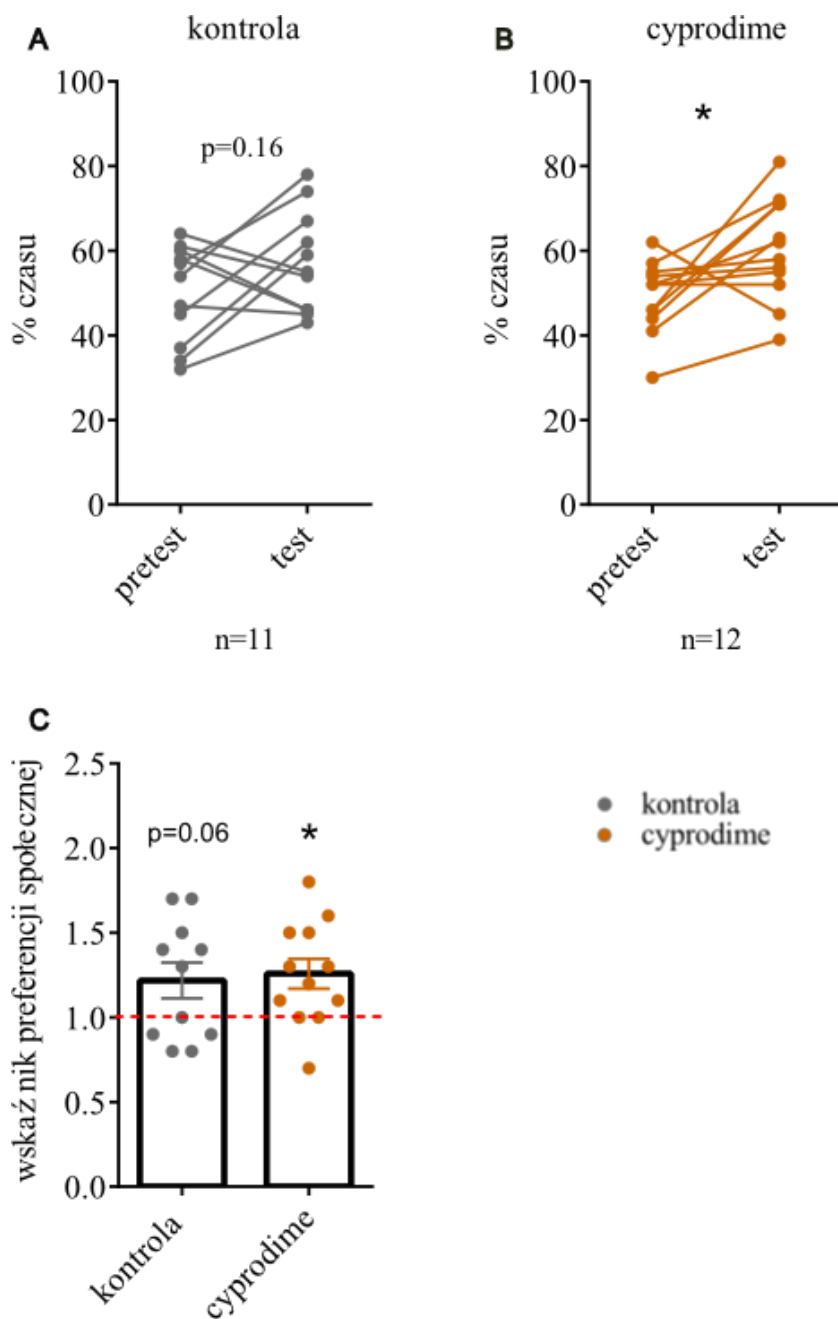
Pierwszy etap badań polegał na wyborze dwóch kontekstów, czyli rodzajów ściółek, które byłyby dla zwierząt neutralne. W serii wstępnych doświadczeń przeanalizowana została naturalna preferencja myszy do ściółek przygotowanych z celulozy, różnych rodzajów drewna i liści kukurydzy. Ostatecznie ściółki z celulozy i buka okazały się neutralne i nie były względem siebie preferowane. Następnie zbadano nabywanie preferencji ściółki skojarzonej z kontekstem społecznym i wpływ podania leku na ekspresję nabytej preferencji. W pierwszej kolejności zbadana została początkowa preferencja między dwoma nowymi kontekstami (pre-test), po czym zwierzę w kolejnych 24-godzinnych okresach warunkowania przebywało w klatce w towarzystwie rówieśników w jednym z kontekstów oraz samotnie w drugim kontekście.

Po warunkowaniu, zwierzęta otrzymały nalmefen (1mg/kg, 5 μ l/g) lub roztwór soli fizjologicznej (kontrola) i ponownie zbadana została preferencja między kontekstami (post-test). Wynik doświadczenia przedstawiony jest na Rycinie 4. Zgodnie z oczekiwaniami u zwierząt kontrolnych zaobserwowano znamienne wzrost preferencji kontekstu skojarzonego z przebywaniem w grupie. Z kolei u zwierząt, które otrzymały nalmefen, nie została zaobserwowana zmiana w preferencji, a analiza wariancji wskazała na znaczącą interakcję między fazą testu i podaniem leku (Ryc. 4AB, dwuczynnikowa ANOVA, *pre-post test czas* $F(1,17)= 10,58$, $p= 0,0047$, *lek* $F(1, 17)= 0,13$, $p= 0,723$, ***pre-post test czas* \times *lek* $F(1, 174)= 6,08$, $p= 0,0246$**). Wynik jednoznacznie wskazuje, że kontakt społeczny zadziałał nagradzająco, a podanie nalmefenu zahamowało ekspresję nabytej preferencji, co ilustrują wskaźniki preferencji społecznej (Ryc. 4C, test t Studenta dla jednej próby, $t_9=2,569$, $p=0,0332$).

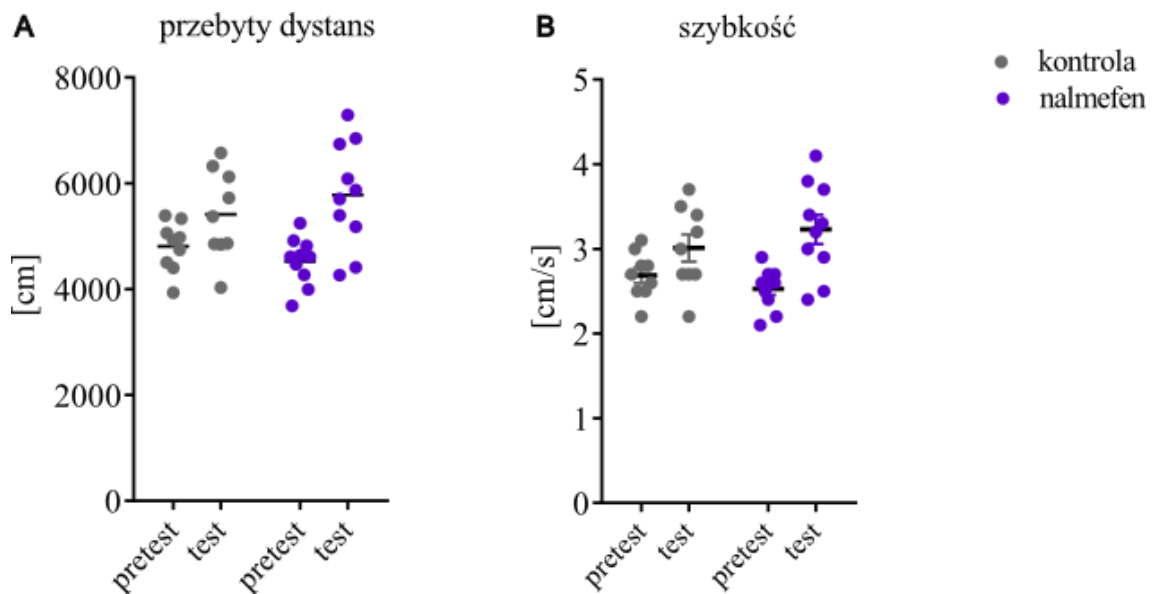
W drugim eksperymencie zwierzęta po sesjach warunkowania otrzymały iniekcję cyprodime (1mg/kg, 5 μ l/g) lub soli fizjologicznej (kontrola). Na podstawie wyniku interakcji można powiedzieć, że cyprodime nie różnił się działaniem na nagrodę społeczną od fizjologicznego roztworu soli. (Ryc. 5AB, dwuczynnikowa ANOVA, *pre-post test czas* $F(1,21)= 8,37$, $p= 0,0087$, *lek* $F(1,21)=0,15$, $p= 0,7061$, ***pre-post test czas* \times *lek* $F(1,21)= 0,37$, $p= 0,5478$**). Również wskaźniki interakcji społecznej nie wskazują na różnice między grupą badaną a kontrolną (Ryc. 5C, test t Studenta dla jednej próby, $t_{10}=0,4723$, $p=0,6469$).



Ryc. 4 Wyniki testu preferencji kontekstu społecznego w eksperymencie z podaniem nalmeferenu. A) Procent czasu spędzonego przez myszy z grupy kontrolnej w kontekście społecznym w czasie pre-testu i post testu. Liczebność grupy wynosiła n=10 osobników. Symbol „**” wskazuje na $p < 0,01$ w teście ANOVA. B) Procent czasu spędzonego przez myszy z grupy badanej w kontekście społecznym w czasie pre-testu i post-testu. Liczebność grupy wynosiła n=10 osobników. C) Wskaźnik preferencji społecznej. Ustalany według iloczynu czasu spędzonego w kontekście społecznym w czasie post-testu (%) i pre-testu (%). Słupki błędów oznaczają SEM.

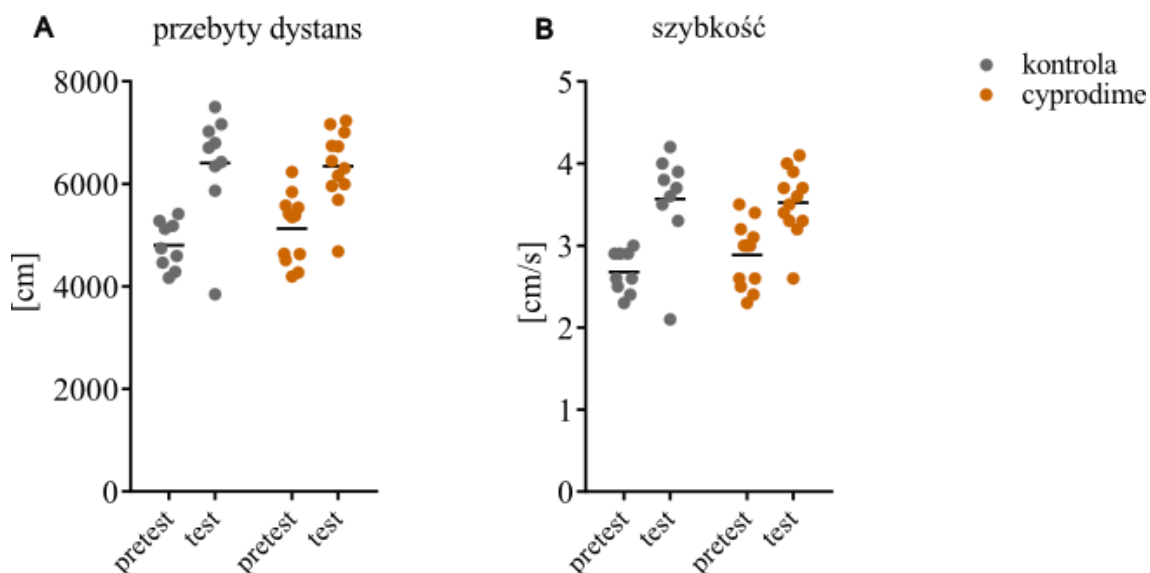


Ryc. 5 Wyniki testu preferencji kontekstu społecznego w eksperymencie z podaniem **cyprodime**. A) Procent czasu spędzonego przez myszy z grupy kontrolnej w kontekście społecznym w czasie pre-testu i post-testu. Liczebność grupy wynosiła n=11 osobników. B) Procent czasu spędzanego przez myszy z grupy badanej w kontekście społecznym w czasie pre-testu i post-testu. Liczebność grupy wynosiła n= 12 osobników. Symbol „*” wskazuje na $p < 0,05$ w teście ANOVA. C) Wskaźnik preferencji społecznej. Ustalany według iloczynu czasu spędzonego w kontekście społecznym w czasie post-testu (%) i pre-testu (%). Słupki błędów oznaczają SEM. Symbol „*” wskazuje na $p < 0,05$ w teście t Studenta dla jednej próby.



Ryc. 6 Dystans i średnia szybkość w fazie pre- i post-testu u myszy z grupy kontrolnej i badanej, poddanej działaniu nalbafenu. A) Dystans przebyty przez myszy podany w jednostkach [cm]. B) Średnia szybkość osiągnięta przez myszy wyrażona w jednostkach [cm/s].

Analizie poddana została również aktywność ruchowa zwierząt podczas pre- i post-testu. Zaobserwowano, że jakkolwiek myszy miały większą aktywność w post-teście, to podanie leku nie miało wpływu na łączny przebyty dystans. Wyniki analizy wariancji aktywności w doświadczeniach z nalbafenem (ANOVA) i cyprodime (ANOVA) są bardzo zbliżone (Ryc. 6A dla grupy kontrolnej i nalbafenu, dwuczynnikowa ANOVA, *faza testu* $F(1,17) = 21,22$, $p = 0,0003$; *dystans* $F(1,17) = 0,02508$, $p = 0,8760$; *dystans x faza testu* $F(1,17) = 2,579$, $p = 0,1267$, Ryc. 7A dla grupy kontrolnej i cyprodime, dwuczynnikowa ANOVA, *faza testu* $F(1,19) = 44,52$; $p < 0,0001$; *dystans* $F(1,19) = 0,2642$; $p = 0,6132$; *dystans x faza testu* $F(1,19) = 0,8592$, $p = 0,3656$).



Ryc. 7 **Dystans i średnia szybkość w fazie pre- i post-testu u myszy z grupy kontrolnej i badanej, poddanej działaniu cyprodime.** A) Dystans przebyty przez myszy podany w jednostkach [cm]. B) Średnia szybkość osiągnięta przez myszy wyrażona w jednostkach [cm/s].

Średnia szybkość podczas poruszania się to dystans przebyty w określonej jednostce czasu analizowany w programie EthoVision. Wartość ta również była niższa w fazie pre-testu niż w fazie post-testu, natomiast nie różniła się u myszy z grupy kontrolnej i poddanej działaniu leku w fazie post-testu (Ryc. 6B dla grupy kontrolnej i nalmefenu, dwuczynnikowa ANOVA, *faza testu* $F(1,17)= 22,29$, $p= 0,0002$; *szybkość* $F(1,17)= 0,03802$, $p= 0,8477$; *szybkość x faza testu* $F(1,17)= 3,044$, $p= 0,0991$.) Ryc. 7B dla grupy kontrolnej i cyprodime, dwuczynnikowa ANOVA, *faza testu* $F(1,19)= 37,17$, $p < 0,0001$; *szybkość* $F(1,19)= 0,3284$, $p= 0,5733$; *szybkość x faza testu* $F(1,19)= 0,9698$, $p= 0,3371$).

9. Dyskusja i wnioski

Badania nad rolą układu opioidowego w oddziaływaniach społecznych o charakterze nagradzającym są dobrym wyjściem do zrozumienia podstaw tych zachowań. Dowiedziono, że pewne interakcje społeczne pełnią funkcję nagrody również dla gryzoni, w tym myszy, stąd ich wybór jako model badawczy. W teście warunkowanej preferencji kontekstu społecznego podanie nalmefenu, ale nie cyprodime, wywołało zmianę w zachowaniu myszy w porównaniu z grupą kontrolną. Zaburzenie działania układu opioidowego może mieć związek z brakiem ekspresji nagrody społecznej.

Test warunkowanej preferencji miejsca jest używany szczególnie w badaniach nad wzmacniającymi lub awersyjnymi właściwościami substancji farmakologicznych. Procedura sprawdza się równie dobrze do mierzenia mechanizmów kontrolujących zachowania motywacyjne z uwzględnieniem struktur mózgowych, w przypadku gdy iniekcje leku podawane są bezpośrednio do miejsca w mózgu, które może mieć potencjalny udział w kształtowaniu nagrody. Metodyka testu warunkowanej preferencji miejsca pozwala także na porównywanie różnic w przejawianiu zachowań motywacyjnych między zwierzętami z wyciszeniem (ang. *knock-down*) lub usunięciem (ang. *knock-out*) danego typu receptora. Z kolei protokół warunkowanej preferencji kontekstu społecznego został zaimplementowany w celu potwierdzenia, że dla badanych zwierząt życie w grupie ma właściwości nagradzające. Przeprowadzone w ramach mojej pracy licencjackiej eksperymenty z użyciem paradygmatu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego potwierdziły stanowisko mówiące o tym, że kontakt społeczny posiada właściwości nagradzające (J. B. Panksepp & Lahvis, 2007). Środowisko neutralne w pierwszej fazie testu wyzwalalo działania motywacyjne na skutek skojarzenia go z występowaniem kontekstu społecznego, co można było zaobserwować w fazie post-testu. Przeważająca część zwierząt z grup kontrolnych wybierała środowisko skojarzone z kontekstem społecznym, co świadczy również o udanym wdrożeniu protokołu w naszym laboratorium na zwierzętach pochodzących z hodowli Instytutu Farmakologii PAN. Pojedyncze osobniki, które nie wykazały preferencji kontekstu społecznego, mogą być przejawem różnic międzyosobniczych. Jak pokazują badania Pankseppa, istnieją pewne szczepy myszy wykazujące mniejszą skłonność do wyboru miejsca skojarzonego z obecnością kontekstu społecznego. Również odpowiedni dobór wieku oraz płci myszy jest kluczowy do otrzymania wymiernych wyników testu,

ponieważ przejawianie zachowań zorientowanych na nagrodę społeczną u samców myszy powyżej piątego tygodnia życia maleje, co zostało zaobserwowane we wcześniejszych eksperymentach (Dölen i in., 2013).

Zastosowanie ligandów receptorów opioidowych w protokole warunkowanej preferencji kontekstu społecznego pozwoliło na ocenę znaczenia układu opioidowego w przejawianiu zachowań motywacyjnych. Podobny schemat eksperymentalny został podjęty w badaniach z 2018 roku, podczas których szczury otrzymywały iniekcje morfiny lub naloksonu (Achterberg i in., 2018). Zwierzęta traktowane morfiną wykształciły silniejszą preferencję kontekstu społecznego niż zwierzęta z grupy kontrolnej, natomiast podanie naloksonu wywołało efekt odwrotny. W mojej pracy zastosowano antagonistów receptorów opioidowych – nalmefen i cyprodime, przy czym nalmefen jest także częściowym agonistą receptorów κ opioidowych. Z racji tego, że lek podawany był tuż przed fazą post-testu, możliwe było sprawdzenie jego wpływu na ekspresję zachowań motywacyjnych ukierunkowanych na nagrodę społeczną, a nie na przebieg warunkowania.

Znaczący spadek preferencji kontekstu społecznego po podaniu nalmefenu sugeruje negatywny wpływ substancji na przejawianie zachowań zorientowanych na nagrodę społeczną. Mimo tych samych sesji warunkowań zwierzęta z grupy kontrolnej chętniej wybierały środowisko skojarzone z przebywaniem w grupie niż zwierzęta z grupy poddanej działaniu nalmefenu.

Brak różnic w preferencji kontekstu społecznego w grupie cyprodime może być spowodowany znacznie innym powinowactwem cyprodime do receptorów opioidowych niż nalmefen. Proponowaną przyczyną może być selektywność cyprodime do jednego typu receptorów - μ opioidowych, wykluczając zbadanie znaczenia pozostałych, δ i κ , w kształtowaniu nagrody społecznej. Efekt po podaniu nalmefenu może wynikać z faktu, że nalmefen jest częściowym agonistą receptorów κ , a ich pobudzenie może zmniejszać chęć podejmowania zachowań społecznych (Trezza i in., 2011). W dalszych planach uzasadnione byłoby zastosowanie innych antagonistów opioidowych w celu zbadania wpływu inaktywacji poszczególnych receptorów na interakcje społeczne o charakterze nagradzającym.

Obie substancje zastosowane w protokole warunkowanej preferencji miejsca, nalmefen i cyprodime, nie wpłynęły na aktywność motoryczną badanych zwierząt. Mierzone w czasie fazy pre- i post-testu wartości przebytego dystansu i średniej szybkości nie

różnią się między grupami zwierząt. Jest to istotny wynik mówiący o braku skutków ubocznych leków na przejawianie ogólnych zachowań przez zwierzęta, których zmiana mogłaby wpływać na złą interpretację rezultatów eksperymentu nad nagrodą społeczną. Podanie substancji nie osłabiało zdolności do eksploracji i swobodnego przemieszczania się po klatce, nie wpływało też na spowolnienie ogólnej szybkości ruchowej. Wyższe wartości średniej szybkości i przebytego dystansu w końcowej fazie testu mają związek z dojrzwaniem i przybieraniem na wadze, szczególnie intensywnymi w pierwszych tygodniach życia myszy.

Przeprowadzone badania wskazują na udział endogenego układu opioidowego w modulowaniu nagrody społecznej. Działanie na receptory opioidowe wpływa na ekspresję zachowań motywacyjnych skierowanych na interakcje społeczne oraz ich nagradzające właściwości.

10. Wykaz rycin.

[Rycina 1]Przykłady oddziaływań społecznych u zwierząt.	Str. 8
[Rycina 2]Klatka do testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (SCPP)	Str. 18
[Rycina 3]Schemat przebiegu testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego.....	Str. 20
[Rycina 4]Wyniki testu preferencji kontekstu społecznego w eksperymencie z podaniem nalmefenu.	Str. 22
[Rycina 5]Wyniki testu preferencji kontekstu społecznego w eksperymencie z podaniem cyprodime.....	Str. 24
[Rycina 6]Dystans i średnia szybkość w fazie pre- i post-testu u myszy z grupy kontrolnej i badanej, poddanej działaniu nalmefenu.....	Str. 25
[Rycina 7]Dystans i średnia szybkość w fazie pre- i post-testu u myszy z grupy kontrolnej i badanej, poddanej działaniu cyprodime.....	Str. 26

11. Bibliografia

- Achterberg, E. J. M., van Swieten, M. M. H., Houwing, D. J., Trezza, V., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2018). Opioid modulation of social play reward in juvenile rats. *Neuropharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.007>
- Ahern, T. H., & Young, L. J. (2009). The Impact of Early Life Family Structure on Adult Social Attachment, Alloparental Behavior, and the Neuropeptide Systems Regulating Affiliative Behaviors in the Monogamous Prairie Vole (*Microtus Ochrogaster*). *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3.
<https://doi.org/10.3389/neuro.08.017.2009>
- 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(1), 223–255.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.001255>
- 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>
- Bozarth, M. A., & Wise, R. A. (1984). Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. *Science*, 224(4648), 516–517.
<https://doi.org/10.1126/science.6324347>
- 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>
- Guard, H. J., Newman, J. D., & Roberts, R. L. (2002). Morphine administration selectively facilitates social play in common marmosets. *Developmental Psychobiology*, 41(1), 37–49. <https://doi.org/10.1002/dev.10043>

- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., ... 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>
- Insel, T. R. (2003). Is social attachment an addictive disorder? *Physiology & Behavior*, *79*(3), 351–357.
- 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>
- Loseth, G. E., Ellingsen, D.-M., & Leknes, S. (2014). State-dependent μ -opioid modulation of social motivation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00430>
- Manduca, A., Servadio, M., Damsteegt, R., Campolongo, P., Vanderschuren, L. J., & Trezza, V. (2016). Dopaminergic Neurotransmission in the Nucleus Accumbens Modulates Social Play Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology*, *41*(9), 2215–2223. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.22>
- Meyza, K. Z., Bartal, I. B.-A., Monfils, M. H., Panksepp, J. B., & Knapska, E. (2017). The roots of empathy: Through the lens of rodent models. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *76*(Pt B), 216–234.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.028>
- Mohebi, A., Pettibone, J. R., Hamid, A. A., Wong, J.-M. T., Vinson, L. T., Patriarchi, T., ... Berke, J. D. (2019). Dissociable dopamine dynamics for learning and motivation. *Nature*, *570*(7759), 65. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1235-y>

- Normansell, L., & Panksepp, J. (1990). Effects of morphine and naloxone on play-rewarded spatial discrimination in juvenile rats. *Developmental Psychobiology*, 23(1), 75–83. <https://doi.org/10.1002/dev.420230108>
- Paille, F., & Martini, H. (2014). Nalmefene: a new approach to the treatment of alcohol dependence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4133028/?report=reader>
- 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., Conner, R., Bishop, P., & Scott, J. P. (1978). The biology of social attachments: Opiates alleviate separation distress. *Biological Psychiatry*, 13(5), 607–618.
- 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)
- Panksepp, J., Siviy, S., & Normansell, L. (1984). The psychobiology of play: Theoretical and methodological perspectives. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 8(4), 465–492.
- Pasternak, G. W., & Pan, Y.-X. (2013). Mu Opioids and Their Receptors: Evolution of a Concept. *Pharmacological Reviews*, 65(4), 1257–1317. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007138>
- Pathan, H., & Williams, J. M. (2012). Basic opioid pharmacology: An update. - PubMed—NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26516461>
- Pellissier, L. P., Gandía, J., Laboute, T., Becker, J. A. J., & Le Merrer, J. (2018). μ 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>

- Salamone, J. D., & Correa, M. (2002). Motivational views of reinforcement: Implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behavioural Brain Research*, 137(1–2), 3–25.
- Schino, G., & Troisi, A. (1992). Opiate receptor blockade in juvenile macaques: Effect on affiliative interactions with their mothers and group companions. *Brain Research*, 576(1), 125–130.
- Schmidhammer, H. (1989). Synthesis and biological evaluation of 14-alkoxymorphinans, V: 6-Deoxyocypodime, an opioid antagonist with decreased mu receptor selectivity in co... - PubMed—NCBI.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1650547>
- Schultz, W. (2015). Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data. *Physiological Reviews*, 95(3), 853–951.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2014>
- Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction-error signalling: a two-component response. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(3), 183–195.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.26>
- Traynor, J. (2012). μ -Opioid Receptors and Regulators of G protein Signaling (RGS) proteins: From a symposium on new concepts in mu-opioid pharmacology. *Drug and Alcohol Dependence*, 121(3), 173–180.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.10.027>
- Trezza, V., Damsteegt, R., Achterberg, E. J. M., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2011). Nucleus accumbens μ -opioid receptors mediate social reward. *The Journal of*

- Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(17), 6362–6370. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5492-10.2011>
- Tye, K. M., Mirzabekov, J. J., Warden, M. R., Ferenczi, E. A., Tsai, H.-C., Finkelstein, J., ... Deisseroth, K. (2013). Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*, 493(7433), 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature11740>
- Vanderschuren, L. J., Stein, E. A., Wiegant, V. M., & Van Ree, J. M. (1995). Social play alters regional brain opioid receptor binding in juvenile rats. *Brain Research*, 680(1–2), 148–156.
- White, N. M. (1989). Reward or reinforcement: What's the difference? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 13(2), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80028-4](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80028-4)
- Wise, R. A. (1996). Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 319–340. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.001535>
- Wise, Roy A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(6), 483–494. <https://doi.org/10.1038/nrn1406>