



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Neurobiologia

**Zachowania społeczne u genetycznie modyfikowanych myszy  
szczepu *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>***

Anna Bryksa

Praca magisterska

wykonana pod opieką

dr. hab. Jana Rodrigueza Parkitny

w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej

Instytutu Farmakologii PAN

Kraków 2018

## Streszczenie

Zwierzęta wykazują wrodzone, filogenetycznie ciągłe zachowania społeczne, przejawiające się w postaci pierwotnych instynktów, będących wynikiem reakcji na specyficzne bodźce społeczne. Zachowania społeczne mogą mieć charakter pozytywny (afiliacyjne) lub negatywny. Afiliacyjne zachowania społeczne mają wartość nagradzającą, objawiającą się odczuciem przyjemności, a także uruchomieniem procesów motywacyjnych oraz związanych z uczeniem się. Nagroda społeczna jest prawdopodobną pobudką do dokonywania przez zwierzęta wyborów przynoszący korzyść innym, jednakże istnienie zachowań prospołecznych u myszy jest kwestią do tej pory nierozstrzygniętą. Zachowania społeczne zależą od funkcjonowanie struktur związanych z systemem nagrody, których aktywność modulowana jest przez endogenny układ opiodowy.

Celem mojej pracy magisterskiej była weryfikacja hipotezy, że genetyczna modyfikacja układu opiodowego będzie przyczyną zmian fenotypu zachowań społecznych. Do badań wykorzystałam transgeniczne myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*, u których dokonano wyciszenia receptorów opiodowych  $\mu$  i  $\delta$  na neuronach wyrażających receptory dopaminy D1. Ponadto, aby stwierdzić, czy myszy wykazują zachowania prospołeczne, zaadaptowano test wyborów prospołecznych opracowany do badania szczurów (Hernandez-Lallement i wsp., 2015).

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* ekspresja transgenu zachodzi w strukturach drogi bezpośredniej pętli korowo-podstawnej. Obniżenie aktywacji układu opiodowego w strukturach związanych z układem nagrody nie wywołało istotnych zmian w podstawowym fenotypie (aktywności motorycznej, zachowaniach lękowych, uczenia się, pamięci i wrażliwości na bodźce) oraz całkowitym czasie spędzonym na kontakcie z partnerem. Niemniej myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* charakteryzowały się wydłużonym czasem do podjęcia interakcji. Dodatkowo wpływ hamowania układu opiodowego na wydłużenie czasu inicjacji zachowań społecznych potwierdzono w eksperymencie z zastosowaniem antagonisty receptorów opiodowych. Natomiast test wyborów prospołecznych nie dał jednoznacznych wyników pozwalających stwierdzić czy myszy wykazują zachowania prospołeczne, jednakże nie wykluczono modulacyjnego działania układu opiodowego na podejmowanie wyborów w kontekście społecznym.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>DI-KD</sup>* inaktywacja receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  zlokalizowanych na drodze prążkowiowo-czarnej wydłuża czas inicjacji interakcji społecznej, co może być przejawem zaburzeń motywacji społecznej oraz sugeruje rozdzielność procesów motywacyjnych dla domeny społecznej i niespołecznej.

## Abstract

Social behaviors represent innate, evolutionarily conserved responses triggered by cues from conspecifics. Social interaction can be experienced as positive (affiliative) or negative (aversive). Affiliative social behaviors have rewarding properties, elicit pleasurable feelings, activate motivational and learning processes. Therefore, social reward is likely to drive prosocial decision making. Prosociality is a common feature in many species, however, it remains uncertain if mice exhibit prosocial behaviors beyond those related to parental care and mating. Social behaviors depend on reward system functioning and are modulated by the endogenous opioid system.

The aim of this study was to examine whether genetic disruption of endogenous opioid system would lead to changes in social behavior. To test this hypothesis I have performed experiments on genetically modified *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* mice, which have a knock-down of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors in neurons expressing dopamine receptors D1. In order to investigate prosocial behaviors in mice I adapted the method developed by Hernandez-Lallement and colleagues (Hernandez-Lallement et al., 2015).

My experiments confirmed that expression of the transgene is present in the direct pathway of the cortico-basal ganglia loop. The mutation had no apparent influence on basic behaviors (motor activity, anxiety-like behavior, learning, memory and stimulus sensitivity) and did not cause any changes in total time spent on social interaction. However, mutant mice were significantly slower to approach a previously unknown mouse. Interestingly, administration of an opioid antagonist before the social interaction test had a similar effect. Experiments directly testing prosocial choices were inconclusive, the observed tendencies did not reach significance.

In conclusion, the activity of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors located in direct pathway influences social behavior in mice. The increased latency to approach a conspecific could be a manifestation of impaired social motivation. Speculatively, these results might suggest a dichotomy of motivational processes related to social and non-social domains.

## Spis treści

<b>WSTĘP .....</b>	<b>7</b>
<b>Układ nagrody.....</b>	<b>7</b>
Układ dopaminergiczny.....	8
Endogenny układ opioidowy .....	10
<b>Zachowania społeczne .....</b>	<b>14</b>
Rola układu opioidowego w modulacji zachowań społecznych.....	16
Zachowania prospołeczne .....	19
<b>CEL BADAŃ .....</b>	<b>21</b>
<b>MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>22</b>
<b>Zwierzęta .....</b>	<b>22</b>
Myszy <i>Oprd1/Oprm1<sup>DI-KD</sup></i> .....	22
<b>Odczynniki.....</b>	<b>23</b>
<b>Immunofluorescencja .....</b>	<b>23</b>
<b>Podstawowe testy behawioralne .....</b>	<b>25</b>
Test otwartego pola .....	25
Test rozpoznawania nowego obiektu .....	25
Test warunkowego wzmocnienia .....	26
<b>Testy zachowań społecznych.....</b>	<b>27</b>
Test interakcji społecznej .....	27
Test wyborów prospołecznych .....	28
<b>Analiza danych.....</b>	<b>30</b>
<b>WYNIKI .....</b>	<b>31</b>
<b>Ekspresja transgenu u myszy <i>Oprd1/Oprm1<sup>DI-KD</sup></i> .....</b>	<b>31</b>
<b>Podstawowe testy behawioralne .....</b>	<b>34</b>
Test otwartego pola .....	34
Test rozpoznawania nowego obiektu .....	34
Test warunkowego wzmocnienia .....	35
<b>Testy zachowań społecznych.....</b>	<b>38</b>
Test interakcji społecznej .....	38
Test wyborów prospołecznych .....	40

<b>DYSKUSJA.....</b>	<b>42</b>
Zaburzenia interakcji społecznej nie są wynikiem ogólnych zmian funkcjonowania myszy <i>Oprd1/Oprm1<sup>DI-KD</sup>.....</i>	42
Czy wyciszenie receptorów opioidowych $\mu$ i $\delta$ wpływa na funkcjonowanie układu nagrody? Odczuwanie przyjemności a motywacja. ....	43
Rola receptorów opioidowych w regulacji afiliacyjnych zachowań społecznych. ....	45
Czy wydłużenie czasu inicjacji interakcji społecznej jest wynikiem zaburzonej motywacji? Rola receptorów $\mu$ i $\delta$ opioidowych. ....	46
Czy myszy są prospołeczne? Rola opioidów w podejmowaniu decyzji .....	47
Krytyka i dalsze perspektywy badań .....	49
Podsumowanie.....	50
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>52</b>
<b>WYKAZ SKRÓTÓW .....</b>	<b>57</b>

## Wstęp

Przedmiotem badań przeprowadzonych w ramach pracy magisterskiej były mechanizmy kierujące działaniem układu nagrody w kontekście zachowań społecznych. W pierwszym rozdziale zostaje omówiona rola szlaków dopaminowych oraz aktywacji endogennego układu opioidowego na aspekt motywacyjny oraz odczuwanie przyjemności, które związane są z doświadczaniem nagrody. Natomiast druga część wstępu skupiona jest na omówieniu wpływu transmisji opioidowej na różne aspekty zachowań społecznych oraz procesów podejmowania decyzji prospołecznych.

## Układ nagrody

Nagroda to bodziec apetytywny, zazwyczaj o działaniu wzmacniającym, który w przyszłości zwiększa prawdopodobieństwo przejawiania odpowiednich zachowań. Wzmocnienie może być mechanizmem adaptacyjnym, prowadzącym do lepszego dostosowania jednostki poprzez utrzymanie homeostazy organizmu, zwiększenie szansy na sukces reprodukcyjny, realizację wewnętrznych instynktów oraz odczucie przyjemności (Fields i Margolis, 2015; Schultz, 2015). Zatem terminy „nagroda” oraz „wzmocnienie” nie są tożsame, jednak bezpośrednio ze sobą związane. Nagroda nie jest cechą bodźca, ale odnosi się do aktywowanych mechanizmów mózgowych, które mogą być na bieżąco aktualizowane.

Wartość nagradzającą można rozpatrywać w kontekście trzech komponentów o różnych psychologicznych i fizjologicznych podłożach: lubienia, chcenia oraz uczenia. Lubienie definiowane jest jako hedonistyczna wartość nagrody, wywołująca odczucie przyjemności niekoniecznie będące efektem świadomej konstatacji. Lubienie jest wynikiem oceny bodźców zmysłowych, która zależy od kontekstu i zmieniających się potrzeb fizjologicznych organizmu. Struktury mózgowe odpowiedzialne za wywołanie wrażenia przyjemności oraz kodujące hedonistyczną informację mogą się różnić. Mózgowe centra przyjemności zlokalizowano w części przyśrodkowej tylnobocznej skorupy jądra półleżącego, brzusznej gałce bladej (VP) oraz jądrach okołoramieniowych mostu, a ich aktywność wykazuje wielopoziomowe powiązania (Berridge i Kringelbach, 2008; Castro i Berridge, 2014).

Drugim aspektem nagrody jest chcenie, rozumiane jako motywacja związana z podejmowaniem działań ukierunkowanych na uzyskanie nagrody i jej konsumpcję. Chcenie może odnosić się do wrodzonego bodźca motywacyjnego lub być wynikiem

adaptacyjnych wzmocnień. Motywacja w tym znaczeniu modulowana jest przez aktywność obszarów podkorowych i jest związana z utrzymaniem homeostazy (Berridge, Robinson i Aldridge, 2009).

Ostatnim wyróżnionym komponentem nagrody jest zdolność do przewidywania nagrody, która jest w dużym stopniu zależna od stanu motywacyjnego oraz wartości hedonistycznej bodźca (Berridge, Robinson i Aldridge, 2009) i jest wynikiem uczenia opartego na wzmocnieniach (Schultz, 2015).

Kluczowymi strukturami anatomicznymi systemu nagrody są brzuszne pole nakrywki (VTA) i jądro półleżące (NAc), będące częścią sieci połączeń, których aktywacja opiera się na zasadzie sprzężeń zwrotnych (Russo i Nestler, 2013). NAc jest częścią prążkowiego, które różni się od prążkowiego architekturą połączeń z innymi obszarami mózgu (Kupchik i wsp., 2015). Głównym rodzajem neuronów występujących w prążkowie są dwie populacje GABA-ergicznych średnich neuronów kolczystych, tworzących drogę bezpośrednią (prążkowie-czarna) oraz pośrednią (prążkowie-błada). Droga bezpośrednia dociera do SNpr poprzez gałkę bładą wewnętrzną i jądro niskowzgórzowe, natomiast droga pośrednia dodatkowo przechodzi przez gałkę bładą zewnętrzną. Neurony ścieżki bezpośredniej charakteryzują się ekspresją receptorów dopaminy D1, dodatkowo wydzielają dynorfiny i substancję P. Natomiast ścieżkę pośrednią tworzą neurony wyrażające receptory dopaminy D2 oraz enkefalinę (Gerfen i Surmeier, 2011). Aktywność ścieżki bezpośredniej i pośredniej kontroluje pobudzenie wielu struktur mózgowych, które zwrotnie wpływają na ich funkcjonowanie. Przykładami tychże struktur zaangażowanych w przetwarzanie ruchowych, kognitywnych oraz emocjonalnych aspektów nagrody są przyśrodkowa kora przedczołowa, grzbietowa kora zakrętu obręczy, hipokamp, ciało migdałowe, wzgórze czy boczne podwzgórze (Haber i Knutson, 2009).

## Układ dopaminergiczny

Dopamina jest najważniejszym neuroprzekaźnikiem związanym z działaniem układu nagrody a jej uwalnianie zachodzi głównie na czterech szlakach. W śródmózgowiu dopamina syntetyzowana jest w VTA oraz części zbitkiej istoty czarnej (SNpc). Neurony VTA wysyłają swoje projekcje do struktur limbicznych, w szczególności NAc i guzka węchowego, będących częścią brzusznego prążkowiego (szlak mezolimbiczny) oraz do kory przedczołowej (szlak mezkortykalny). Aktywność systemu mezkortykolimbicznego w dużym stopniu odpowiedzialna jest za reakcje



emocjonalne i procesy kognitywne. Natomiast neurony SNpc wysyłają zakończenia do grzbietowego prążkowie, tworząc szlak nigrostriatalny (prążkowie-czarny), który związany jest głównie z koordynacją aktywności motorycznej. Grzbietowe prążkowie (Arias-Carrión i wsp., 2010; Ikemoto, 2007; Wise, 2004). Innym szlakiem nie będącym częścią układu nagrody jest szlak guzkowo-lejkowy tworzony przez neurony jądra łukowatego podwzgórza kontrolujące uwalnianie prolaktyny z przedniego płata przysadki (Gudelsky, 1980). Działanie dopaminy na każdym z tych szlaków podlega specyficznej regulacji i wywołuje odmienne efekty.

Dopamina uruchamia różne kaskady molekularne, w zależności od typu receptora, na który oddziałuje. Receptory z grupy D1 (receptory D1 i D5) są receptorami postsynaptycznymi związanymi z białkiem  $G_s$  lub  $G_{olf}$  a ich pobudzenie skutkuje aktywacją cykazy adenylanowej i wzrostem stężenia cAMP. Natomiast receptory z grupy D2 (D2, D3, D4) związane są z białkiem  $G_{i/o}$  i zlokalizowane presynaptycznie lub postsynaptycznie. Ich aktywacja prowadzi do zahamowania cykazy adenylanowej, dodatkowo powodując otwarcie kanałów potasowych. Gęstość receptorów D1 jest wyższa w korze przedczołowej, natomiast D2 w jądrach podkorowych (Arias-Carrión i wsp., 2010). Wpływ dopaminy wydzielanej przez SNpc oraz VTA na funkcjonowanie struktur układu nagrody jest zależny od aktywowanej ścieżki. Stymulacja drogi bezpośredniej daje efekt pobudzający, natomiast pośredniej hamujący. Ponadto aktywność jąder podkorowych i neuronów dopaminergicznych jest zwrotnie modulowana przez korę mózgową i wzgórze (Gerfen i Surmeier, 2011).

Rola dopaminy w mediowaniu nagrody jest badana od dziesięcioleci. We wczesnych eksperymentach wykazano, że zarówno jedzenie jak i substancje uzależniające prowadzą do zwiększenia stężenia dopaminy i jej metabolitów w NAc (Di Chiara i Imperato, 1988; Hernandez i Hoebel, 1988; Radhakishun, van Ree i Westerink, 1988). Jednak, należy mieć na uwadze, że wzrost stężenia dopaminy w NAc nie jest jednoznaczny z uzyskaniem nagrody (Fields i Margolis, 2015). Obecnie uważa się, że dopamina koduje informacje nie o samej nagrodzie, ale raczej o wypadkowej oczekiwania związanych z nagrodą (z ang. *reward prediction error*) (Schultz, 2013). Ponadto jej rola związana jest z motywacyjnym i antycypacyjnym aspektem nagrody, natomiast nie jest kluczowa dla samych zachowań konsumpcyjnych czy wartościowania nagrody (Barbano i Cador, 2007). Stwierdzono, że procesy motywacyjne oraz związane z uczeniem się posiadają odrębne podłoże fizjologiczne, opierające się na odmiennej aktywności neuronów dopaminergicznych śródmózgowia: tonicznej i fazowej.

Aktywność fazowa wiązana jest głównie z pobudzeniem receptorów D1 i procesami opartymi na uczeniu, dokładniej z wykrywaniem błędu oczekiwań odnoszących się do nagrody. Obserwuje się ją w odpowiedzi na nowy apetytywny bodziec lub bodziec skojarzony z dostarczeniem nagrody. Co więcej, jeśli po bodźcu warunkowym nie pojawiła się oczekiwana nagroda, aktywność fazowa neuronów jest hamowana. Natomiast aktywność toniczna prowadzi do pobudzenia receptorów D2 i zaangażowana jest w regulację procesów motywacyjnych (Schultz, 2015). Obecnie wskazuje się, że wpływ aktywacji neuronów dopaminowych i wydzielania dopaminy na motywację i procesy uczenia jest bardziej skomplikowany (Berke, 2018).

W oparciu o przytoczone powyżej badania sformułowano pogląd obecnie dominujący, że działanie dopaminy opiera się na aktywacji wielu struktur mózgowych i związane jest z przetwarzaniem informacji o nagrodzie skierowanym na przeszłość (uczenie się) oraz przyszłość (motywacja). Pobudzenie układu nagrody jest modulowane przez liczne neuroprzekaźniki, w tym opioidy, których rola zostanie szerzej opisana w dalszej części pracy.

## **Endogenny układ opioidowy**

Endogenne opioidy wpływają na szereg ważnych funkcji fizjologicznych, zależnych od lokalizacji i typu receptora na który oddziałują. Receptory opioidowe zlokalizowane są zarówno w ośrodkowym jak i obwodowym układzie nerwowym. Najwięcej receptorów opioidowych występuje w układzie pokarmowym, gdzie regulują perystaltykę jelit. Rola opioidów jest kojarzona głównie z działaniem przeciwbólowym, analgezą oraz modulacją odpowiedzi na stres. Opioidy są również związane z odczuwaniem przyjemności, regulacją nastroju oraz uzależnieniami (Merrer i wsp., 2009). Ponadto wykazano modulacyjny wpływ opioidów na zachowania społeczne (Johnson, 1992; Moles, Kieffer i Amato, 2004; Normansell i Panksepp, 1990), co stanowi główny temat niniejszej pracy.

Endogenne opioidy powstają z trzech białek prekursorowych: proopiomelanokortyny (POMC), proenkefaliny oraz prodynorfiny, z których po odpowiednich modyfikacjach potranslacyjnych powstają, odpowiednio,  $\beta$ -endorfiny, enkefaliny (Met-enkefalina i Leu-enkefalina) oraz dynorfiny (dynorfina A, dynorfina B, neoendorfina) (Akil i wsp., 1984). Wyróżnia się trzy klasy receptorów opioidowych  $\mu$ ,  $\delta$  oraz  $\kappa$ , wszystkie one należą do rodziny receptorów metabotropowych związanych z białkiem G. Potencjalnie wszystkie peptydy opioidowe mają zdolność aktywacji

trzech klas receptorów opioidowych, jednak różnią się powinowactwem. Stwierdzono, że  $\beta$ -endorfina i enkefaliny mają największe powinowactwo do receptorów  $\mu$  i  $\delta$ , których aktywacja powoduje spadek pobudliwości neuronu i hyperpolaryzację. Mechanizm opiera się na hamowaniu aktywności cykazy adenylanowej oraz otwarciu kanałów potasowych GIRK. Ponadto zamykane są kanały wapniowe, co w konsekwencji zmniejsza prawdopodobieństwo uwolnienia neurotransmitera z zakończeń synaptycznych. Z kolei dynorfina charakteryzują się najwyższym powinowactwem do receptora  $\kappa$ , którego aktywacja prowadzi do zamknięcia kanałów wapniowych oraz zmniejszenia ilości uwalnianych neuroprzekaźników (Galligan, Akbarali, 2015). NA poziomie molekularnym działanie wszystkich typów receptorów opioidowych jest zbliżone, jednak są one zlokalizowane w różnych miejscach na komórce (i na różnych typach komórek), stąd też fizjologiczne efekty ich aktywacji są odmienne.

Receptory opioidowe występują powszechnie w mózgowiu, głównie w korze mózgowej, układzie limbicznym oraz pniu mózgu. Receptory  $\mu$  zlokalizowane są w ciele migdałowatym, wzgórzu, śródmózgowiu oraz niektórych jądrach pniu mózgu. Często współwystępują z receptorami  $\kappa$ , których szczególnie duża ekspresja widoczna jest w podstawnym przodomózgowiu. Natomiast receptory  $\delta$  znajdują się w największej ilości w strukturach węchowych, korowych i prążkowiu. Receptory opioidowe modulują aktywność przede wszystkim neuronów lokalnych, a ich ekspresja w dużym stopniu pokrywa się z ekspresją peptydów opioidowych. Proenkefalina to najbardziej rozpowszechniony prekursor opioidowy. W ośrodkowym systemie nerwowym syntetyzowana jest w korze i strukturach podkorowych, z najwyższą ekspresją we wzgórzu. Ponadto jej obecność stwierdza się w rdzeniu kręgowym, gdzie bierze udział w transmisji nocyceptywnej. Natomiast prodynorfina jest niemal nieobecna we wzgórzu a syntetyzowana przede wszystkim w jądrze półleżącym, niektórych jądrach podwzgórza oraz pniu mózgu. Neurony produkujące POMC są nieliczne i ograniczają się do jądra łukowatego podwzgórza, przysadki oraz jądra pasma samotnego. Wysyłają one projekcje do odległych struktur mózgowych, w których można stwierdzić obecność  $\beta$ -endorfin (Akil et al., 1984; Merrer i wsp., 2009).

## Rola opioidów w regulacji układu nagrody- mechanizmy uwalniania dopaminy

W pracy magisterskiej skupiłam się na roli układu opioidowego w modulowaniu aktywności układu nagrody. Istnieje szereg dowodów wskazujących na nagradzające działanie opioidów uwalnianych w VTA i NAc (Fields i Margolis, 2015). We wczesnych pracach z użyciem protokołu samopodawania substancji wykazano, że szczury chętnie naciskają dźwignię, aby uzyskać dawkę morfiny (nieselektywnego agonisty receptorów opioidowych), DAMGO (agonisty receptorów  $\mu$ ) lub DPDPE (agonisty receptorów  $\delta$ ) do VTA. Ponadto ustalono, że efektywna dawka DAMGO jest stukrotnie mniejsza niż DPDPE, co skłania do wniosku, że nagradzające efekty opioidów są mediowane głównie przez receptor opioidowy  $\mu$  (Devine i Wise, 1994). W badaniach z użyciem mikrodializy ustalono, że dokomorowe iniekcje DAMGO i DPDPE skutkują wzrostem stężenia dopaminy i jej metabolitów w NAc, natomiast agonści receptorów  $\kappa$  wywołują efekt odwrotny. Dodatkowo wykazano, że jednorazowe podania antagonistów receptorów opioidowych nie wpływały na poziom dopaminy w NAc (Spanagel, Herz, i Shippenberg, 1990). W innym eksperymencie, w którym podawano substancje bezpośrednio do VTA potwierdzono stymulujący wpływ selektywnych agonistów receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  na wydzielanie dopaminy w brzuszny prążkowie, jednak w odróżnieniu od iniekcji obwodowych agonista receptorów  $\kappa$  nie wywierał żadnego efektu (Devine i wsp., 1994). Ponadto badania Steina udowodniły odwrotną zależność przyczynową, wykazując zmiany wydzielania opioidów w reakcji na elektryczną stymulację VTA. Za pomocą metod autoradiograficznych stwierdzono wzrost wydzielania opioidów w VP, SNpc, grzbietowo przyśrodkowym wzgórzu, tylnym podwzgórzu, czy jądrze niepewnym, natomiast spadek wydzielania opioidów zaobserwowano w przyśrodkowej uzdeczce oraz przedmurzu (Stein, 1993).

Wpływ pobudzenia receptorów opioidowych na wydzielanie dopaminy zależy od typu i lokalizacji receptora. Wykazano, że średnie neurony kolczyste wyrażające receptory dopaminy D2 wykazują ekspresję receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  (Banghart i wsp., 2015; Oude Ophuis i wsp., 2014). Jednakże ekspresja receptorów opioidowych na neuronach D1 jest kwestią sporną, ponieważ część prac wskazuje na obecność wyłącznie receptorów opioidowych  $\mu$  (Banghart i wsp., 2015; Oude Ophuis i wsp., 2014), natomiast inne badania potwierdzają współwystępowanie receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  (Ambrose i wsp., 2006; Harda i wsp. 2018). Natomiast receptory

opiodowe  $\kappa$  zlokalizowane są presynaptycznie na neuronach SNpc/VTA lub postsynaptycznie w prążkowie (głównie brzuszny) a ich aktywacja przez dynorfiny uwalniane na drodze prążkowiowo-czarnej prowadzi do spadku uwalniania dopaminy. Oznacza to, że zmiany w lokalnym poziomie dynorfin oraz aktywacja receptorów  $\kappa$  odwrotnie korelują z aktywacją neuronów D1. Z drugiej strony pobudzenie presynaptycznych receptorów  $\mu$  i  $\delta$  zlokalizowanych na średnich neuronach kolczystych prowadzi do hamowania ścieżki pośredniej, w konsekwencji zwiększenia ilości wydzielanej dopaminy. Aktywność obu ścieżek regulowana jest na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego (Steiner i Gerfen, 1998). Ponadto badaniach *in vitro* wykazały, że stymulacja receptorów opiodowych  $\mu$  w VTA powoduje hamowanie aktywności interneuronów GABA-ergicznym, co w konsekwencji prowadzi do odhamowania neuronów dopaminergicznych (Johnson, 1992). Działanie agonistów receptorów opiodowych  $\mu$  w VTA może prowadzić do przeciwnego skutku poprzez inhibicję interneuronów GABA tworzący zakończenia na neuronach glutamatergicznych, co skutkuje pobudzeniem neuronów dopaminowych. Co więcej istnieją subpopulacje neuronów dopaminergicznych, u których bezpośrednia aktywacja receptorów  $\mu$  opiodowych może prowadzić do pobudzenia lub inhibicji (Fields i Margolis, 2015). Natomiast badania funkcji receptorów opiodowych  $\kappa$  zlokalizowanych bezpośrednio na neuronach dopaminowych i „trzeciorzędowych” ujawniły zahamowanie aktywności tychże neuronów (Margolis i wsp., 2003). W późniejszych pracach Margolis i współpracownicy stwierdzili, że pobudzenie receptorów opiodowych  $\kappa$  w VTA prowadzi do spadku stężenia dopaminy tylko w przyśrodkowej korze przedczołowej, natomiast nie zmienia transmisji w NAc (Margolis i wsp., 2006). Wynika z tego, że w VTA istnieją farmakologicznie i anatomicznie odmienne grupy neuronów, których aktywacja w zróżnicowany sposób zależy od transmisji opiodowej. Ponadto należy podkreślić, że pobudzenie neuronów dopaminergicznych nie jest jednoznaczne z uwalnianiem dopaminy, które modulowane jest przez szereg innych mechanizmów.

### ***Rola opiodów w regulacji motywacji i odczuciu przyjemności***

Działanie opiodów związane jest przede wszystkim z odczuciem przyjemności i wartościowaniem nagrody. Wykazano, że gdy zwierzęta mają wybór między preferowanym a niepreferowanym pokarmem dootrzewnowe podanie naloksonu (niespecyficznego antagonisty receptorów opiodowych) prowadzi do zmniejszenia

spożycia jedynie preferowanego pokarmu (Barbano i Cador, 2007). Wpływ opioidów na subiektywną ocenę wartości hedonistycznej potwierdzili Wooley i współpracownicy, dodatkowo wykazując, że za ten efekt odpowiedzialne są receptory  $\mu$  opioidowe zlokalizowane w NAc (Woolley, Lee, i Fields, 2006). Ponadto Barbano i Cador badali rolę opioidów w procesach motywacyjnych, które oceniali na podstawie czasu potrzebnego do osiągnięcia nagrody lub liczby naciśnieć dźwigni, co skutkowało dostarczeniem nagrody. W obu eksperymentach wykazali, że u szczurów, które miały nieograniczony dostęp do karmy blokada receptorów opioidowych skutkuje spadkiem motywacji, objawiającym się wydłużeniem czasu zdobycia preferowanego pokarmu oraz zmniejszoną liczbą naciśnieć dźwigni (Barbano i Cador, 2006 i 2007). Innym przykładem potwierdzającym wpływ opioidów na postrzeganą wartość hedonistyczną i motywacyjną nagrody jest badanie, w którym podawano szczurom specyficznych agonistów receptorów opioidowych do NAc. Naukowcom udało się wyróżnić obszar w części przyśrodkowej tylnobocznej skorupy jądra półleżącego, w którym mikroiniekcje specyficznych agonistów każdego z receptorów opioidowych wywoływały zachowanie wskazujące na odczuwanie przyjemności (charakterystyczne reakcje mimiczne). Jednakże tylko iniekcje agonistów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych w tej części NAc powodowały preferencję miejsca, co może sugerować odmienny mechanizm subiektywnej i obiektywnej wartości nagrody. Dodatkowo wykazano wzrost spożywania smacznego pokarmu po zastosowaniu agonistów receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$ , co miało potwierdzać także rolę motywacyjną tychże receptorów (Castro i Berridge, 2014; Peciña, 2008).

Podsumowując, regulacja funkcjonowania układu nagrody zależna jest od wielu mechanizmów, w których znaczącą rolę odgrywają opioidy. Poprzez aktywację receptorów opioidowych w zróżnicowany sposób wpływają na pobudzenie neuronów VTA oraz modulację wydzielania dopaminy, szczególnie w strukturach brzuszno-prążkowia i PFC. Opioidy regulują procesy związane głównie z subiektywnym odczuciem przyjemności oraz oceną hedonistycznej wartości, wpływając również na procesy motywacyjne.

## Zachowania społeczne

Zachowania społeczne są powszechnym zjawiskiem w świecie zwierząt i przejawiają się w postaci pierwotnych instynktów, będących wynikiem reakcji na specyficzne bodźce społeczne. Zachowania społeczne mogą mieć charakter

pozytywny (afiliacyjny) lub negatywny, związany z agresją czy podporządkowaniem. Przykładem afiliacyjnych zachowań społecznych są zabawy młodocianych osobników, „*huddling*” (wspólny odpoczynek oparty na kontakcie) oraz „*grooming*” (społeczne zachowania pielęgnacyjne) (Loseth, Ellingsen, i Leknes, 2014). W ujęciu ewolucyjnym prawidłowe interakcje międzysobnicze wspierają dobrostan jednostki i zwiększają szanse na rozród, wpływając na ogólny poziom dostosowania. U ludzi zaburzenia społecznego funkcjonowania są przyczyną dyskomfortu oraz symptomem wielu chorób psychiatrycznych, takich jak autyzm, schizofrenia czy depresja (Pellissier i wsp., 2017).

W mojej pracy magisterskiej badałam afiliacyjne interakcje społeczne oraz zachowania prospołeczne u myszy. Gryzonie są odpowiednim modelem badań zachowań społecznych z uwagi na tworzone przez nich hierarchiczne struktury społeczne, przejawianie podstawowych zachowań społecznych, takich jak obwąchiwanie, wężanie anogenitalne, „*grooming*” czy różnego typu zabawy („*pinning*” i „*pouncing*”) (Trezza i wsp., 2011). Ponadto stwierdzono, że szczury wykazują się zróżnicowanymi zachowaniami prospołecznymi (Bartal, Decety i Mason, 2012; Hernandez-Llallement i wsp., 2015).

W licznych badaniach wykazano, że afiliacyjne interakcje społeczne mają charakter nagradzający, porównywalny z innymi naturalnymi nagrodami czy działaniem substancji uzależniających. Doświadczenie społecznej nagrody jest związane z odczuciem przyjemności, a także zwiększeniem motywacji do podejmowania społecznych interakcji. Nie dziwi więc, że zachowania społeczne zależne są od funkcjonowania układu nagrody. W badaniach z użyciem fMRI wykazano, że u ludzi nasilenie afiliacyjnych interakcji społecznych (zabawa z podawaniem piłki) skutkuje zwiększoną aktywacją przedkorka oraz struktur brzuszno-prądkowia, będących częścią układu nagrody. Ponadto stwierdzono, że intensywność pobudzenia brzuszno-prądkowia jest zależna od indywidualnych preferencji i oczekiwań społecznych (Kawamichi i wsp., 2016). Obecnie przy użyciu nowoczesnych metod jak optogenetyka i pomiary stężenia jonów wapnia z użyciem włókien światłowodowych udaje się monitorować spontaniczną aktywność układu nagrody u myszy swobodnie eksplorujących. Gunaydin i współpracownicy (2014) wykazali obecność fazowej aktywności neuronów dopaminowych w VTA podczas przejawiania apetytywnych zachowań społecznych. Co więcej, udowodniono, że afiliacyjne interakcje społeczne zależą od aktywacji specyficznego szlaku VTA-NAc, w którym neurony dopaminergiczne VTA tworzą bezpośrednie zakończenia w NAc, które wysyła

projekcje zwrotne poprzez aksony średnich neuronów kolczystych ze specyficzną ekspresją receptora D1. Udowodniono, że pobudzenie bezpośredniego szlaku VTA-NAc jest wystarczające i konieczne do wykazywania afiliacyjnych zachowań społecznych (Gunaydin i wsp., 2014).

Zatem zachowania społeczne zależą od funkcjonowania struktur związanych z układem nagrody, którego aktywność podlega regulacji wielu neuroprzekaźników, takich jak dopamina, noradrenalina, serotonina, oksytocyna, kannabinoidy oraz opioidy (Pellissier i wsp., 2017). W mojej pracy magisterskiej skupiłam się na roli endogenego układu opioidowego w modulacji zachowań społecznych.

## **Rola układu opioidowego w modulacji zachowań społecznych**

Badania nad funkcją układu opioidowego w kontekście zachowań społecznych zapoczątkował Jaak Panksepp, wraz z kolegami w roku 1978 formułując hipotezę *Brain Opioid Theory of Social Attachment- BOTSA*, według której zachowania społeczne wyewoluowały na bazie aktywności pierwotnych systemów mózgowych związanych z przetwarzaniem bólu. Ponadto zasugerowano podobieństwo zachowań społecznych i związanych z uzależnieniami. Stosując analogię stwierdzono, że izolacja społeczna jest przyczyną dystresu, który motywuje zwierzęta do poszukiwania kontaktu społecznego, w konsekwencji prowadząc do podniesienia poziomu endogennych opioidów i przywrócenia komfortu (Panksepp i wsp., 1978). Istotnie, w swoich licznych badaniach Panksepp i współpracownicy wykazali wpływ aktywacji receptorów opioidowych na relacje matka-dziecko czy zachowania młodocianych osobników (Normansell i Panksepp, 1990; Panksepp, Nelson, i Sivi, 1994).

Ważnym punktem rozważań nad rolą układu opioidowego w regulacji zachowań społecznych jest stwierdzenie, że wpływa on zarówno na aspekt motywacyjny interakcji społecznych jak i na subiektywne odczucie przyjemności. W badaniach na grupie mężczyzn, którym pokazywano zdjęcia kobiecych twarzy stwierdzono, że ligandy opioidowe wpływają na ocenę atrakcyjności kobiecych twarzy oraz motywację do zmiany zdjęć (Chelnokova i wsp., 2014). Jednak obserwowane zmiany dotyczyły jedynie bodźców znajdujących się na ekstremach zadeklarowanej atrakcyjności, co może potwierdzać wpływ kontekstu na efekty aktywacji opioidowej oraz rolę opioidów w wartościowaniu bodźców (Woolley i wsp., 2006).

Rola opioidów w mediowaniu uczucia przyjemności związanej z afiliacyjnymi zachowaniami społecznymi została dobrze udokumentowana. Wczesne badania



wykazały, że morfina zwiększa intensywność zabaw u szczurów, natomiast nalokson wywiera efekt odwrotny, jednocześnie nie wpływając na ogólną motywację społeczną (Normansell i Panksepp, 1990). Później Trezza i współpracownicy udowodnili, że nagradzający aspekt zabaw zależy od selektywnego pobudzenia receptorów  $\mu$  opioidowych w jądrze półleżącym, które to jest konieczne i wystarczające do uzyskania preferencji miejsca skojarzonego z zabawami (Trezza i wsp., 2011). Natomiast w opozycji do przytoczonych przykładów stoją eksperymenty, w których wykazano, że podawanie antagonistów receptorów opioidowych skutkuje nasileniem społecznych zachowań pielęgnacyjnych u małp (Fabre-Nys, Meller, i Keverne, 1982). Ponadto w badaniu przeprowadzonym na ludziach z użyciem skanera PET stwierdzono obniżenie aktywacji endogennego układu opioidowego w strukturach brzuszego prążkowiec, amygdali i kory przedczołowej w odpowiedzi na społeczny dotyk (Nummenmaa i wsp, 2016).

Z kolei w badaniach nad społeczną motywacją stwierdzono, że wpływ ligandów opioidowych zależy od wyjściowego stanu motywacyjnego zwierząt, a także od cech gatunkowych, czyli wrodzonej zależności od relacji międzyosobniczych (*The State-dependent  $\mu$ -Opioid Modulation of Social Motivation- SOMSON*) (Loseth, Ellingsen, i Leknes, 2014). W przypadku izolacji społecznej, która jest czynnikiem wywołującym dystres, zachowania zwierząt są ukierunkowane na przywrócenie zaburzonej homeostazy. Wykazano, że gdy zachowaniem zwierząt kieruje negatywna motywacja (usunięcie nieprzyjemnego stanu) blokada receptorów opioidowych powoduje zwiększenie motywacji do poszukiwania społecznych interakcji, natomiast pobudzenie receptorów opioidowych zmniejsza dystres i prowadzi do osłabienia motywacji związanej z poszukiwaniem kontaktu (Loseth, Ellingsen, i Leknes, 2014). Badaniem wspierającymi hipotezę SOMSON mogą być eksperymenty, w których za pomocą metod autoradiograficznych stwierdzono obniżoną transmisję opioidową w przyśrodkowej korze przedczołowej, VTA i SNpc u społecznie izolowanych zwierząt, a także stwierdzono efekt odbicia (nasilenie wydzielania opioidów) po okresie deprivacji (Vanderschuren i wsp., 1995). Co więcej, w doświadczeniu badającym efekty dootrzewnowego podania ligandów opioidowych w odpowiedzi na matczyną izolację stwierdzono, że iniekcje morfiny zmniejszają częstotliwość wokalizacji, natomiast naltrekson (nieselektywny antagonist receptorów opioidowych) zwiększa ich intensywność oraz znosi efekt podania morfiny (Carden i Hofer, 1990).

Z drugiej strony działanie ligandów opioidowych daje efekt zgoła odwrotny jeśli zwierzęta znajdują się w normalnym kontekście społecznym. W tym wypadku motywacja do szukania kontaktu nie jest związana z usunięciem dyskomfortu a zachowanie zwierząt ukierunkowane jest na szukanie przyjemnych doznań (Loseth, Ellingsen, i Leknes, 2014). W swoich badaniach Trezza i współpracownicy wykazali, że u młodocianych szczurów motywacja do zabawy modulowana jest przez aktywację receptorów opioidowych w NAc. Oseski chętniej angażowały się w zabawy po iniekcjach morfiny a efekt był specyficznie zależny od aktywacji receptorów  $\mu$  opioidowych przez  $\beta$ -endorfiny i DAMGO (selektywny agonista receptorów  $\mu$  opioidowych). Ponadto blokada tego receptora skutkowała osłabieniem motywacji do szukania społecznego kontaktu (Trezza i wsp., 2011).

Rola endogennego układu opioidowego w mediowaniu zachowań społecznych została również potwierdzona badaniami genetycznymi. Udowodniono, że polimorfizm genu receptora opioidowego  $\mu$  wpływa na wrażliwość na bodźce społeczne i jest związany z różnym powinowactwem do  $\beta$ -endorfiny. Eksperymenty przeprowadzone na makakach wykazały, że w odpowiedzi na izolację od matki noworodki posiadające allel G (*OPRM1* 77G) genu *Oprm1* wokalizowały intensywniej od homozygot C, a także przejawiały nasilony kontakt z matką po okresie deprivacji (Barr i wsp., 2008). W późniejszych badaniach wykonanych na ludziach potwierdzono wpływ polimorfizmu receptora opioidowego  $\mu$  na przetwarzanie bodźców społecznych. Wykazano bowiem, że nosiciele allelu G charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na odrzucenie, które było mierzone w komputerowym paradygmacie podawania piłki oraz silniejszą aktywacją struktur związanych z przetwarzaniem informacji bólowej (Way, Taylor, i Eisenberger, 2009). Z drugiej strony transgeniczne myszy z ekspresją ludzkiego allelu G są mniej wrażliwe na stres społeczny w teście rezydent- intruz, wykazują więcej zachowań dominujących oraz częściej angażują się w społeczne zachowania afiliacyjne. Co więcej, w odpowiedzi na społeczną porażkę stwierdzono podwyższą ekspresję c-Fos w wielu strukturach mózgu, m. in. NAc, co prawdopodobnie związane jest z nasiloną transmisją opioidową (Briand i wsp., 2015).

Dysfunkcyjne zachowania społeczne mogą być wynikiem zaburzeń genetycznych. Wykazano że, transgeniczne myszy z usuniętym receptorem opioidowym  $\mu$  w odpowiedzi na izolację od matki wokalizują mniej niż zwierzęta dzikie. Autorzy spekulują, że jest to wynik zaburzonej asocjacji matczynych bodźców i wywoływanego przez nie przyjemnego stanu. Z kolei brak wrażliwości na matczyne

bodźce wynika z wrodzonej dysfunkcji systemu opioidowego (Cinque i wsp., 2012; Moles, Kieffer, i Amato, 2004). Ze względu na podobieństwa symptomów sugeruje się wykorzystanie myszy pozbawionych receptora opioidowego  $\mu$  jako model zaburzeń ze spektrum autyzmu, których jednym z osiowych objawów są właśnie zaburzenia zachowań społecznych (Oddi, Crusio, Amato i Pietropaolo, 2013).

Z podsumowanych powyżej badań wynika, że zachowania społeczne są regulowane przez opioidy, które wpływają zarówno na odczucie przyjemności oraz motywację społeczną.

## Zachowania prospołeczne

Wybór decyzji przynoszącej największą korzyść dla danego osobnika jest wypadkową procesów kognitywnych, emocjonalnych oraz motywacyjnych integrowanych przez struktury prążkowania (Macpherson, Morita, i Hikida, 2014). Podejmowanie decyzji może opierać się na postrzeganej wartości nagrody lub też na zdolności bodźca do przewidywania konkretnego rezultatu, który wpływa na wybór. Oba te procesy mają odmienne podłoże neuroanatomiczne i angażują różne receptory, niemniej mają także części wspólne. Szczególną rolę w regulacji procesów podejmowania decyzji odgrywają połączenia podstawno-bocznego jądra migdałowatego z NAc (Laurent i wsp., 2012).

Zachowania prospołeczne to zachowania zaspokajające potrzeby i sprzyjające dobrostanowi drugiego osobnika. Podejmowanie wyborów prospołecznych może polegać na doznawaniu przez „aktora” społecznej nagrody, ale niewykluczony jest udział innych mechanizmów. Zachowania prospołeczne zależą od wielu czynników takich jak stopień pokrewieństwa, miejsce w hierarchii społecznej, zachowania odbiorcy, widoczność pokarmu czy rodzaju testu prospołecznego. Zazwyczaj są one badane w dwóch paradygmatach: teście wyborów prospołecznych oraz „*out-of-reach task*”, w którym zwierzęta muszą wykonać jakąś czynność, aby pomóc drugiemu osobnikowi (Cronin, 2012). Występowanie zachowań prospołecznych u naczelnych zostało dobrze opisane w literaturze (np. Horner i wsp., 2011), jednak sprawą dyskusyjną pozostaje obecność zachowań prospołecznych u gryzoni. Dowodów na podejmowanie wyborów prospołecznych przez gryzonia dostarczają badania Bartal i współpracowników, w których szczur unieruchomiony w klatce mógł zostać uwolniony przez swojego partnera znajdującego się na zewnątrz. Stwierdzono,

że zwierzęta charakteryzowały się stałą skłonnością do uwalniania partnera a ich zachowanie nie było zależne od antycypowanej społecznej interakcji (Bartal, Decety, i Mason, 2012). W innym eksperymencie analizowano zachowania szczurów w teście wyborów prospołecznych. Wykazano, że w warunkach, w których zwierzę może wybrać między identyczną nagrodą dostarczaną sobie i partnerowi lub wyłącznie dla siebie, częściej podejmuje wybory prospołeczne a zachowanie to jest cechą stałą i zróżnicowana osobniczo (Hernandez-Lallement i wsp., 2015).

Na podstawie licznych badań można stwierdzić, że afiliacyjne zachowania społeczne mają charakter nagradzający, tzn. wywołują odczucie przyjemności oraz motywują do podejmowania kontaktu społecznego. Opioidy modulują zachowania społeczne w sposób zależny od wyjściowej aktywacji receptorów opioidowych  $\mu$ , których zrównoważone pobudzenie jest konieczne do przejawiania normalnego fenotypu zachowań społecznych (Pellissier i wsp., 2017).

## Cel badań

Celem mojej pracy magisterskiej było zbadanie roli endogenego układu opioidowego w regulacji zachowań społecznych. Przypuszczalnie wyhamowanie aktywności opioidowej prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu systemu nagrody, który może odpowiadać za wzmacnianie afiliacyjnych zachowań społecznych. Do weryfikacji tej hipotezy zostały wykorzystane genetycznie modyfikowane myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*, u których zachodzi inaktywacja receptorów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych na neuronach wyrażających receptory dopaminy D1. Aby scharakteryzować transgeniczny szczep przeprowadzono barwienia immunofluorescencyjne oraz podstawowe testy behawioralne, które umożliwiły ocenę podstawowych czynności związanych z ruchem, wrażliwością na bodźce, pamięcią i uczeniem się oraz zachowaniami lękowymi. W ramach analizy zachowań społecznych przeprowadzono testy interakcji społecznej oraz wyborów prospołecznych na myszach *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*. Ponadto żeby potwierdzić hipotezę, iż zmiany społecznego fenotypu są wynikiem nieprawidłowego funkcjonowania układu opioidowego przeprowadzono eksperymenty z podaniem antagonisty receptorów opioidowych. Zastosowanie leku pozwoliło na ocenę czy zmiany zachowania są wynikiem wtórnych adaptacji związanych z mutacją czy bezpośrednim efektem obniżenia aktywności układu opioidowego.

Dodatkowo w mojej pracy magisterskiej podjęłam się próby dostosowania testu zachowań prospołecznych do badań na myszach. Eksperymenty miały na celu sprawdzenie czy myszy charakteryzują się zachowaniami prospołecznymi, które są zależne od aktywności endogenego układu opioidowego.

# Materiały i metody

## Zwierzęta

Myszy (*Mus musculus L.*) użyte w eksperymentach pochodziły z hodowli Instytutu Farmakologii Państwowej Akademii Nauk w Krakowie (szczep C57BL/6J oraz *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*), a także z firmy Charles River Laboratories (szczep C57BL/6N). Wszystkie doświadczenia zostały przeprowadzane na samcach. Zwierzęta przebywały w klatkach z pleksiglasu w grupach od 3 do 6 osobników na klatkę w pomieszczeniu o stałej temperaturze 22±2 °C i cyklu dobowym z fazą jasną 22-10, fazą ciemną 10-22. Doświadczenia były przeprowadzane w fazie ciemnej, z wyjątkiem eksperymentu 1 testu wyborów prospołecznych. Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do jedzenia i wody w klatkach domowych. Jeśli protokół eksperymentu tego wymagał, zwierzęta poddawano deprywacji pokarmowej trwającej około 7 dni oraz podczas trwania procedury. Wszystkie doświadczenia behawioralne przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Bioetycznej w Krakowie (numer zgody 224/2016).

## Myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*

Zwierzęta *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* zostały stworzone w Pracowni Modeli Transgeniczných Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, w oparciu o metodę zastosowaną przez Novaka i wsp. (Novak et al., 2010). Skonstruowano transgen posiadający promotor genu receptorów dopaminy D1, co determinuje ekspresję tylko w neuronach posiadających receptory dopaminowe D1. W celu przyszłej wizualizacji miejsc ekspresji transgeny, pod promotorem umieszczono sekwencję białka fluorescencyjnego eGFP. Kluczowym elementem transgeny był prekursor miRNA 155, zawierający cztery sekwencje kodujące syntetyczne miRNA o strukturze spinek do włosów. Konstrukt genetyczny wbudowano do sztucznego chromosomu bakteryjnego, który następnie wszczepiono do przedjadrza zapłodnionego oocyty myszy szczepu C57BL/6J. Ten etap generacji szczepu był przeprowadzony w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie. Zwierzęta eksperymentalne to heterozygoty pod względem transgeny powstałe na skutek krzyżówek wstecznych wygenerowanych myszy. Jako metodę genotypowania zastosowano technikę PCR przeprowadzaną w 40 cyklach [(95°C denaturacja- 3:00, 95°C- 0:30, 58°C przyłączanie starterów- 0:30, elongacja 72°C- 1:00 × 40), 72°C- 3:00]. W celu identyfikacji transgeny użyto starterów łączących się

do sekwencji GFP1: ACG TAA ACG GCC ACA AGT TC i GFP2: AAG TCG TGC TGC TTC ATG TG. Jako kontrolę pozytywną zastosowano starter 1: CCA TTT GCT GGA GTG ACT CTG oraz starter 2: TAA ATC TGG CAA GCG AGA CG.

Obecna u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* mutacja jest konstytutywna i polega na interferencji selektywnych miRNA do transkryptów receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  w neuronach wyrażających receptory D1. Skutkiem mutacji jest wyciszenie funkcji receptorów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych poprzez degradację transkryptów i zahamowanie translacji białek.

## Odczynniki

Wykonywano dootrzewnowe zastrzyki z soli fizjologicznej i roztworu chlorowodoru nalmefenu 1mg/kg (TOCRIS, nr kat. 4085). Nalmefen jest ligandem receptorów opioidowych z dużym powinowactwem do receptorów  $\mu$  i słabszym do  $\delta$  (antagonista) oraz częściowym agonistą receptorów  $\kappa$  opioidowych. Maksymalne stężenie nalmefenu w osoczu osiągane jest w czasie 1,5-2,3 godzin od podania dootrzewnowego. Czas półtrwania tego związku wynosi 5,2-10,8 godzin. W klinice nalmefen wykorzystywany jest interwencyjnie w przypadkach przedawkowania opioidów oraz leczenia uzależnień alkoholowych i behawioralnych.

## Immunofluorescencja

W celu przeprowadzenia perfuzji myszom *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* podano dootrzewnowy zastrzyk śmiertelnej dawki morbitalu 1,66 ml/kg (mieszanina pentobarbitalu 26,7 mg/ml i pentobarbitalu sodowego 133,3 mg/kg). Perfuzję przeprowadzono za pomocą pompy perystaltycznej, kolejno wprowadzając buforowany fosforanami sodu i potasu roztwór soli fizjologicznej (PBS Carl Roth) i 4% (wag./obj.) paraformaldehyd (PFA). Wyizolowane mózgi utrwalano przez 24h w 4% roztworze PFA, następnie przeniesiono do roztworu sacharozy w PBS. do czasu opadnięcia na dno probówki. Wykonano czołowe skrawki mrożeniowe o grubości 40  $\mu$ m, które umieszczono w roztworze krioprotekcyjnym (mieszanina glikolu etylenowego, glicerolu i PBS).

### Barwienie anty-GFP

W celu identyfikacji neuronów wyrażających receptory D1 z wyciszoną ekspresją receptorów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* wykonano

barwienie z wykorzystaniem przeciwciała anty-GFP. Pierwszego dnia procedury skrawki wypłukano w PBS oraz poddano 45 minutowej inkubacji w roztworze blokującym (1×PBS + albumina wołowa 1% (wag./obj.) + Triton 0,3% (obj/obj.)). Następnie skrawki umieszczono na noc w roztworze pierwszorzędowego przeciwciała anty-GFP (królicze poliklonalne do GFP, Life Technologies, rozcieńczenie w roztworze blokującym 1:500). Drugiego dnia skrawki 5-krotnie wypłukano w PBS i inkubowano w roztworze drugorzędowego przeciwciała (Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, R37118, Invitrogen, rozcieńczenie w roztworze blokującym 1:1000). Po 2 godzinach skrawki trzykrotnie wypłukano w PBS, nałożono na szkiełka i zaklejono.

#### *Barwienie anty-GFP i anty-pEnk*

W celu identyfikacji neuronów D1 z wyciszoną ekspresją receptorów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych u myszy *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup> oraz neuronów D2 wykonano podwójne barwienie anty-GFP i anty-pEnk.

Pierwszego dnia skrawki wypłukano w PBS oraz poddano 45 minutowej inkubacji w roztworze blokującym (1×PBS + albumina wołowa 1% (wag./obj.) + Triton 0,3% (obj/obj.)). Następnie skrawki umieszczono na noc w roztworze pierwszorzędowego przeciwciała anty-GFP (kurze poliklonalne do GFP, ab13970, Abcam, rozcieńczenie w roztworze blokującym 1:10000) oraz pierwszorzędowego przeciwciała anty-pEnk (królicze poliklonalne do PENK, RA14124-50, Neuromics, rozcieńczenie w roztworze blokującym 1:1000). Drugiego dnia skrawki 5-krotnie wypłukano w PBS i inkubowano w roztworach drugorzędowych przeciwciał anty-GFP z zielonym fluorochromem (Goat anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, A-11039, Invitrogen, rozcieńczenie w roztworze blokującym 1:1000 ) oraz anty-pEnk z czerwonym fluorochromem (Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555, A-31572, Invitrogen, rozcieńczenie w roztworze blokującym 1:1000). Po 2 godzinach skrawki trzykrotnie wypłukano w PBS, nałożono na szkiełka i zaklejono.

Zdjęcia barwienia na obecność GFP oraz pEnk wykonywano mikroskopem konfokalnym (LSM700 Zeiss Upright Confocal), natomiast zdjęcia z barwienia tylko dla GFP zrobiono mikroskopem szerokiego pola (LM Leica DMI8). Scalanie zdjęć i nałożenie skali wykonano w programie ZEISS ZEN.



## Podstawowe testy behawioralne

### Test otwartego pola

W celu zbadania aktywności motorycznej zwierząt wykonano trzy niezależne eksperymenty, wykorzystując łącznie 42 myszy szczepu *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup> (WT=19, TG=23). Liczba i wiek zwierząt biorących udział w poszczególnych eksperymentach przedstawiono w tabeli 1. Test został przeprowadzony w fazie ciemnej w prostokątnych klatkach o wymiarach 55 x 37,5 x 20,5 cm wysokości według protokołu opisanego przez Sikorę i współpracowników (Sikora i wsp., 2016). Zwierzę umieszczono w centralnej części klatki i pozostawiono na 30 minut w celu swobodnej eksploracji. Zachowania lękowe były oceniane na podstawie czasu spędzanego w centralnym polu klatki o wymiarach 41,5 x 29 cm, wygenerowanym w programie Noldus EthoVision 11.5. Analizowano średnią prędkość zwierząt, całkowity przebyty dystans oraz procent czasu spędzany na środku klatki.

<b>Eksperyment</b>	<b>Liczba myszy</b>	<b>Wiek myszy (tygodnie)</b>	<b>Średnia masa (gramy)</b>
1	WT=5, Tg= 5	11-12	23,1
2	WT=4, Tg=7	10-17	24,5
3	WT=10, Tg=11	12-13	26,2

Tabela 1 Liczba, wiek i masa myszy *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup> użytych w teście otwartego pola.

### Test rozpoznawania nowego obiektu

Eksperyment został przeprowadzony na 20 samcach myszy szczepu *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup> (WT=10, Tg=10) w wieku 14-15 tygodni oraz 8 5-tygodniowych myszach szczepu C57BL/6N (obiekty w klatkach). Test rozpoznawania nowego obiektu przeprowadzono według protokołu opisanego przez Wietrzyh i wsp. (Wietrzyh i wsp., 2005). Habitację myszy-obiektów do klatek wykonano za Yangiem i wsp. (Yang, Silverman i Crawley, 2016). Eksperyment odbywał się przy minimalnym oświetleniu (6 luksów). Podczas pre-testu zwierzęta badane były umieszczane w klatce z pleksiglasu o wymiarach 28 × 28 × 20 cm wysokości, w obecności dwóch obiektów umieszczonych po przeciwległych stronach klatki. Klatki oraz przedmiot były dezynfekowane przed każdym testem. Obiektami były dwie identyczne małe klatki, w jednej z nich znajdowała się mysz C57BL/6N a w drugiej zielona nakrętka od butelki. Zwierzętom umożliwiono 10 minutową swobodną eksplorację klatki. Po trzygodzinnej

przerwie zwierzęta ponownie umieszczano w klatce, ale w tej fazie testu zamiast przedmiotu pod jedną z klatek został umieszczony nowy młodociany osobnik. Położenia klatek były zmienione względem pozycji wyjściowej. Zwierzęta mogły eksplorować klatkę przez kolejne 10 minut. Analizowano czas interakcji ze znaną myszą i nowym osobnikiem.

## Test warunkowego wzmocnienia

W eksperymencie zbadano 12 samców myszy szczepu *Oprdl/Oprm1<sup>DI-KD</sup>* (WT=7, TG =5). Test przeprowadzono według protokołu opisanego przez O'Connora i współpracowników (O'Connor i wsp., 2010). Przed rozpoczęciem warunkowania myszy poddano procesowi habituacji oraz deprywacji pokarmowej. Myszy były codziennie ważone i karmione tak, aby utrzymać 85% wagi wyjściowej. Eksperyment przeprowadzono w klatkach Skinner'a (ENV-307W, Med. Associates Inc.). Cały eksperyment trwał 10 dni.

### *Warunkowanie klasyczne*

Przez 8 kolejnych dni myszy poddano procedurze warunkowania pawłowskiego. W trakcie każdej sesji prezentowano łącznie 50 bodźców warunkowych (25 nagradzanych CS+ i 25 nienagradzanych CS-) w pseudolosowej kolejności i nieregularnych odstępach. Dla połowy zwierząt bodźcem skojarzonym z nagrodą był dźwięk a neutralnym światło, dla drugiej połowy bodźce były odwrotne. Nagrodę stanowiły dwa chrupki, których łącznie zwierzęta otrzymywały 50 podczas trwania całej sesji. Prezentacja bodźców warunkowych zachodziła w różnych odstępach czasu (30-90 s), losowo wybieranych z puli 25 możliwości. Długość trwania bodźca warunkowego wynosiła 10 s. Po 5 s od rozpoczęcia prezentacji bodźca podawano 1 chrupkę a w 6 s kolejny. Jedna sesja trwała około godziny. Mierzono czas od pojawienia się bodźca warunkowego do podejścia myszy do podajnika z jedzeniem oraz odsetek prób, które nie powodowały reakcji zwierząt.

### *Wzmocnienie warunkowe*

W dniach 9 i 10 myszy zostały poddane procedurze wzmocnienia warunkowego. W tej fazie eksperymentu odpowiedź instrumentalna zwierząt (wsadzenie pyszczka do odpowiedniego otworu) skutkowałą pojawieniem się CS+ lub CS- bez dostarczenia nagrody. Dla połowy zwierząt CS+ był skojarzony z odpowiedzią w lewym otworze, dla drugiej połowy w prawym. Mierzono liczbę odpowiedzi instrumentalnych, liczbę

prezentowanych bodźców warunkowych oraz odsetek bodźców warunkowych, po których nastąpiło włożenie głowy do otworu z podajnikiem.

## Testy zachowań społecznych

### Test interakcji społecznej

W celu zweryfikowania wpływu aktywacji receptorów opioidowych na zachowania społeczne przeprowadzono doświadczenia na myszach *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* oraz C57BL/6N z podaniami nalmefenu.

Szczep *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*

Wykonano cztery niezależne eksperymenty na samcach myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* (WT=24, Tg=28, dane w tabeli 2). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono według protokołu opisanego przez Sikorę i wsp. (Sikora i wsp., 2016) a ich wyniki połączono.

NUMER EKSPERYMENTU	ROLA MYSZY	LICZBA/WARUNEK	WIEK (TYGDONIE)	POCHODZENIE
1	badane	WT=5, Tg=4/ <i>społeczny</i>	9-16	IF PAN
	partnerzy	9	9-17	IF PAN
2	badane	WT=5, Tg=5/ <i>społeczny</i>	11-12	IF PAN
	partnerzy	10	9	Charles River Laboratories
3	badane	WT=4, Tg=7/ <i>przedmiot</i>	10-17	IF PAN
	partnerzy	-	-	-
4	badane	WT=5, Tg=6/ <i>społeczny</i> WT=4, Tg=5/ <i>przedmiot</i>	13-14	IF PAN
	partnerzy	11	9	Charles River Laboratories

Tabela 2 Liczba, wiek i pochodzenie zwierząt użytych w teście interakcji społecznej.

Test interakcji społecznej przeprowadzono w fazie ciemnej w prostokątnych klatkach o wymiarach 55 x 37,5 x 20 cm wysokości. Zwierzę badane umieszczono w centralnej części klatki i pozostawiono na 30 minut w celu swobodnej eksploracji. Po upływie tego czasu na środku klatki umieszczano partnera interakcji (WT=15,

Tg=16) lub przedmiot (pomalowany farbą do drewna klocek WT=9, Tg=12). Test trwał 10 minut. Analizowano całkowity czas trwania interakcji oraz czas od pojawienia się nowego obiektu w klatce do pierwszego podejścia zwierzęcia do obiektu. Z analizy wykluczono 2 osobników (eksperyment 1) z powodu złej jakości nagrań.

#### Szczep C57BL/6N

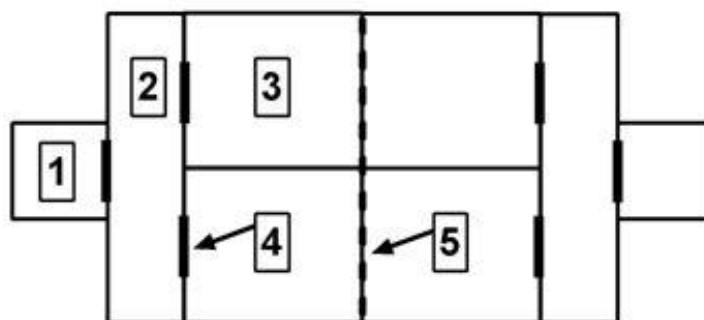
Eksperyment przeprowadzono na 15 samcach myszy szczepu C57BL/6N w wieku 15 tygodni. Partnerami były 9-tygodniowe myszy C57BL/6N (n=15). Schemat eksperymentu (tylko warunek społeczny) i analiza danych były takie same jak w przypadku szczepu *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup>. Ponadto godzinę przed przeprowadzeniem testu połowie zwierząt badanych podano dootrzewnowo roztwór soli fizjologicznej (5 µl/g), natomiast drugiej połowie roztwór nalmefenu w soli fizjologicznej (5 µl/g).

### Test wyborów prospołecznych

Test wyborów prospołecznych był adaptacją protokołu użytego do badania zachowań prospołecznych u szczurów przez Hernandez-Lallementa i współpracowników (Hernandez-Lallement i wsp., 2015). Przed przystąpieniem do testów zwierzęta poddawano restrykcji pokarmowej, tak aby ich waga spadła do 85% początkowej masy ciała. Zwierzętom przypisano rolę aktorów (zwierząt badanych) lub partnerów (myszy bodźców). Każdemu aktorowi przypisano 2 partnerów pochodzących z tej samej klatki, natomiast każdy partner był przypisany do 2 aktorów. Role zwierząt pozostawały niezienne przez cały czas trwania eksperymentu. Eksperyment 1 przeprowadzono w fazie jasnej na 16 9-tygodniowych samcach myszy C57BL/6J (aktorzy n=8, partnerzy n=8). Natomiast w eksperymencie 2 wykorzystano 16 samców myszy szczepu *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup> (aktorzy: WT= 5, Tg=5; partnerzy: WT=6) w wieku 12-16 tygodni a test przeprowadzono w fazie ciemnej. Analizowano procent dokonywanych wyborów prospołecznych w fazie pre-testu, po podaniu soli fizjologicznej (kontrola) oraz nalmefenu. W trakcie eksperymentu 2 zmarła jedna mysz (aktor WT), więc do analizy włączono 9 osobników.

#### Leki

Wykonywano dootrzewnowe podania z soli fizjologicznej (5 µl/g) oraz chlorowodorku nalmefenu godzinę przed rozpoczęciem testu. Nalmefen rozpuszczono w soli fizjologicznej (1 mg nalmefenu/5 ml soli fizjologicznej).



**Rysunek 1** Klatka do badań nad zachowaniami prospołecznymi. 1) Przedział startowy; 2) Przedział wyboru; 3) Przedział żywieniowy; 4) otwór z zasuwą; 5) przezroczysta ściana z perforacjami oddzielająca zwierzęta.

### *Przebieg sesji eksperymentalnej*

Aktora umieszczano w przedziale startowym (Rysunek 1), natomiast partnerów interakcji umieszczano w przedziałach żywieniowych po drugiej stronie klatki. Następnie podnoszono zasuwę pomiędzy przedziałem a przedziałem wyboru oraz pomiędzy przedziałem wyboru a obydwo przedziałami żywieniowymi (lub – w czasie prób wymuszonych – pomiędzy przedziałem wyboru a jednym z przedziałów żywieniowych, patrz niżej) po stronie aktora. Aktor wchodził do jednego z dostępnych przedziałów żywieniowych. W pojedynczych przypadkach, kiedy aktor zatrzymał się w przedziale wyboru na więcej niż 10 s, mysz zostawała delikatnie przesuwana do tego przedziału żywieniowego, bliżej którego się znajdowała. Następnie zamykano wszystkie zapadki. Aktor otrzymywał nagrodę (2 czekoladowe chrupki, 20 mg, BioServ, nr kat.: F05301) niezależnie od tego, do którego z przedziałów żywieniowych wszedł. Wybór prospołeczny to wybór pomieszczenia, którego konsekwencją jest dostarczenie nagrody zarówno dla aktora jak i obu partnerów. Alternatywą był wybór pomieszczenia, w którym nagrodę otrzymywał wyłącznie aktor (wybór aspołeczny). W eksperymencie 1 nagroda była dostarczana obydwu partnerom po 5 s od wejścia aktora do przedziału prospołecznego (od zamknięcia zasuw), natomiast aktor otrzymywał pożywienie po upływie 10 s. W eksperymencie 2 na początku nagrodę otrzymywali aktor i partner znajdujący się naprzeciwko aktora (po 5 s), natomiast drugi partner otrzymywał chrupki po 10 s. Zasuwę podnoszono ponownie po zjedzeniu nagrody przez aktora lub po upływie 60 s. Jeśli aktor nie opuścił przedziału żywieniowego w ciągu 20 s od podniesienia zasuw, był przesuwany przez eksperymentatora do przedziału wyboru. Następnie miał 10 s na wycofanie się do przedziału startowego, po czym zamykano wszystkie zapadki. Po upływie 4 s rozpoczynano kolejną próbę.

Każda badana mysz była codziennie poddawana 6 próbom wymuszonym, w których podnoszono zasuwę prowadzącą tylko do jednego przedziału żywieniowego. Sesja zawsze zaczynała się od próby prospołecznej, później próby prospołeczne i aspołeczne następowały w równych ilościach w kolejności pseudolosowej. Następnie aktorzy dokonywali 25 (eksperyment 1) lub 20 (eksperyment 2) swobodnych wyborów. Sesja trwała około 30-60 minut.

W eksperymencie 1 codziennie zmieniano przedział prospołeczny z aspołecznym (zmiana prawa-lewa), a w eksperymencie 2 dodatkowo zamieniano stronami aktora i partnerów (zmiana północ-południe). Ten sam schemat doświadczenia obowiązywał dla wszystkich zwierząt badanych danego dnia.

### *Schemat eksperymentu*

Dzień 1: Habitacja do klatki. Zwierzęta (aktora i dwóch partnerów) umieszczono na 10 minut w klatce w układzie takim, jak na początku sesji eksperymentalnej. Po stronie aktora podniesiono wszystkie zasuwki. Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do nagrody w przedziałach żywieniowych.

Dzień 2: Habitacja do testu. Zwierzęta poddano sześciu próbom wymuszonym.

Dni 3-7: Pre-test. W celu ustalenia podstawowego poziomu zachowań prospołecznych, każde zwierzę przez kolejnych pięć dni przechodziło jedną sesję eksperymentalną, wg schematu opisanego wyżej.

Dni 8-9: Podanie soli fizjologicznej. Aktorzy na godzinę przed eksperymentem otrzymywali dootrzewnowy zastrzyk z soli fizjologicznej (5  $\mu$ l/g).

Dni 10-11: Podanie nalmefenu. Aktorzy na godzinę przed eksperymentem otrzymywali dootrzewnowy zastrzyk nalmefenu (1 mg/kg, 5  $\mu$ l/g).

## **Analiza danych**

Do nagrywania zachowań zwierząt użyto kamery Basler GigE oraz programu Noldus EthoVision 11.5. Analizę zachowań przeprowadzono w programie EthoVision 11.5 oraz Boris 6.2.2. Do analizy znamienności statystycznej różnic między dwiema grupami zastosowano test t-studenta lub test Mann-Whitney'a a dla sparowanych danych test Wilcoxon. W celu porównań wielu grup doświadczalnych użyto jedno- lub wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz test post-hoc HSD Tukey'a. Ryciny zostały wygenerowane w programie EthoVision 11.5 oraz edytowane w programie Inkscape oraz ZEISS ZEN.

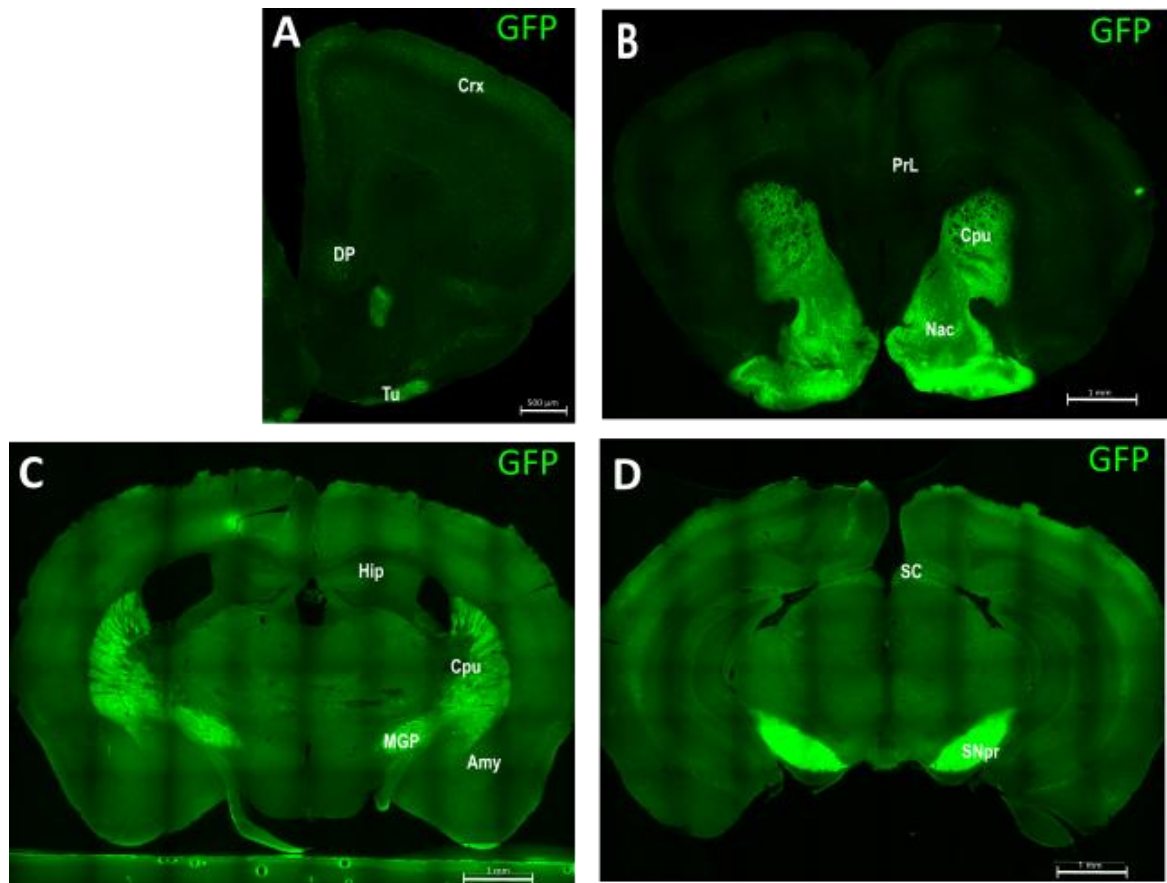
## Wyniki

W ramach doświadczeń przeprowadzonych do pracy magisterskiej wykonano barwienia fluorescencyjne skrawków mózgowych pobranych od myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*. Ponadto przeprowadzono szereg testów behawioralnych badających podstawowe funkcjonowanie zwierząt oraz zachowania społeczne. Dodatkowo sprawdzono efekty farmakologicznej blokady receptorów opioidowych na interakcje międzysobnicze i wybory prospołeczne.

### Ekspresja transgenu u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*

W celu identyfikacji struktur mózgowych, w których doszło do wyrażania transgenu wykonano barwienie immunofluorescencyjne na obecność białka GFP (Rysunek 2). W przedniej części mózgowia stwierdzono ekspresję GFP w niektórych warstwach kory mózgowej oraz guzku węchowym (Rysunek 2A), a także w grzbietowej korze konarowej i korze prelimbiczej (Rysunek 2A, 2B). Co więcej obecność mutacji stwierdzono również w prążkowie, jądrze półleżącym oraz gałce bladej (Rysunek 2B, 2C). Ekspresja GFP była charakterystyczna dla części siateczkowatej istoty czarnej, a także części wzgórka górnego (Rysunek 2D).





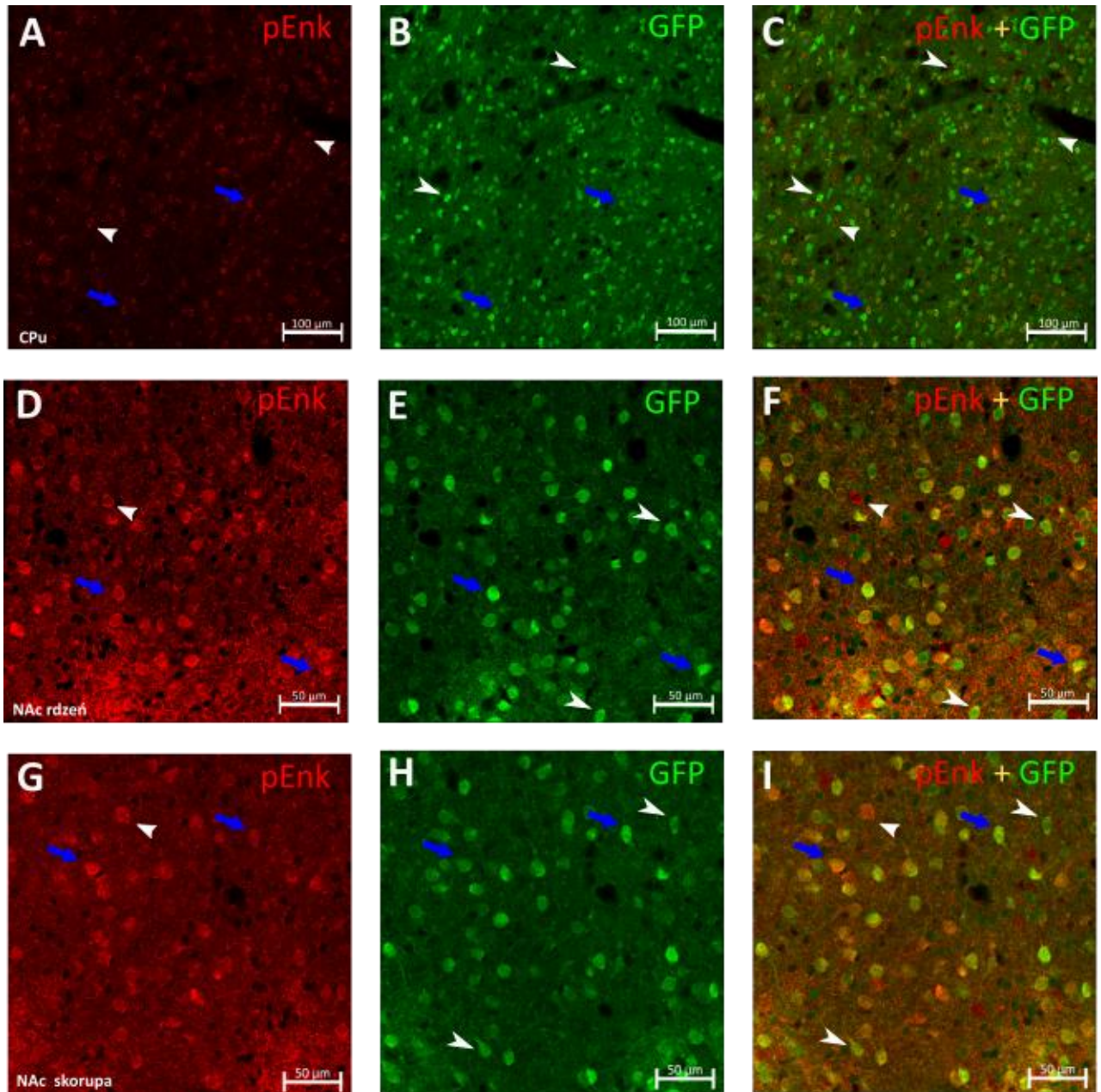
**Rysunek 2** Barwienie immunofluorescencyjne na obecność GFP (zielony) u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*. Zdjęcia mikroskopowe skrawków mrożeniowych o grubości 40  $\mu\text{m}$  przy powiększeniu  $\times 10$ . Cienie na obrazie są skutkiem winiotowania. A) Skrawek pobrany w okolicach czołowych (Bregma~ 1,98 mm) z widoczną korą czołową, guzkiem węchowym oraz grzbietową korą konarową. B) Na skrawku wybarwione grzbietowe i brzuszne prążkowie oraz kora prelimbiczna (Bregma ~ 1,54 mm). C) Skrawek z widoczną drogą prążkowiowo-czarną (Bregma ~-0,94 mm). D) Skrawek pobrany w śródmózgowiu (Bregma ~ -3,16) z widoczną częścią siateczkowatą istoty czarnej i wzgórkem górnym. Oznaczenie skrótów: Crx- kora mózgowa, DP- grzbietowa kora konarowa, Tu- guzek węchowy, PrL- kora prelimbiczna, Cpu- prążkowie, NAc- jądro półleżące, Hip- hipokamp, Amy- jądro migdałowe, MGP- przyśrodkowa gałka biała, SC- wzgórek górny, SNpr- część siateczkowata istoty czarnej.

Ponadto w celu dyskryminacji neuronów D1 i D2 w prążkowie i jądrze półleżącym wykonano podwójne barwienie immunofluorescencyjne na obecność białka GFP oraz proenkefaliny (pEnk). Z założenia białko GFP powinno być wyrażane wyłącznie w neuronach, które posiadają receptory dopaminergiczne typu D1. Natomiast ekspresja pEnk miałaby charakteryzować neurony z receptorami dopaminergicznymi D2. Na rycinie zaobserwowano, że zarówno w grzbietowym (Rysunek 3A-C) jak i brzusznej (Rysunek 3D-I) prążkowie występują neurony, które barwią się specyficznie na jeden rodzaj białka (GFP lub pEnk). Jednakże istnieje grupa neuronów, które charakteryzują się nałożeniem obu sygnałów z barwników fluorescencyjnych (Rysunek 3).

Na podstawie przeprowadzonych barwień immunofluorescencyjnych stwierdzono obecność mutacji w strukturach związanych z układem nagrody (Rysunek



2), a także wysnuto wniosek, że segregacja neuronów D1 i D2 w prążkowie grzbietowym (Rysunek 3A-C), rdzeniu jądra półleżącego (Rysunek 3D-F) oraz w skorupie jądra półleżącego (Rysunek 3G-I) nie jest całkowita.



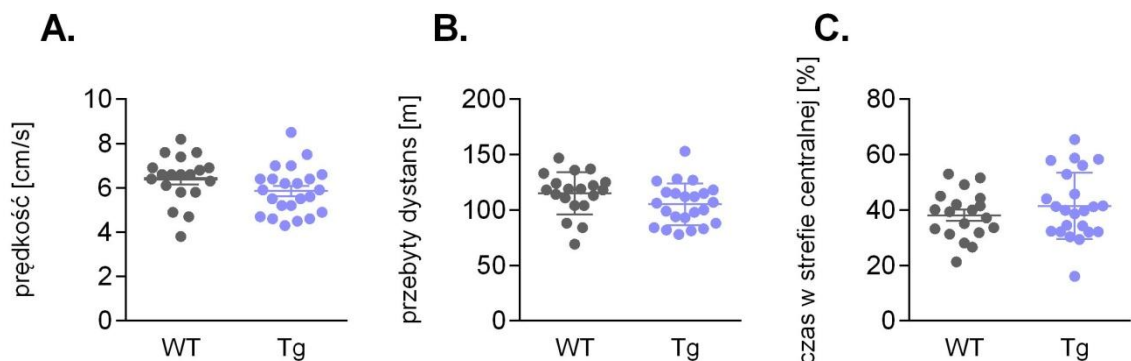
**Rysunek 3** Barwienie immunofluorescencyjne na obecność eGFP (zielony) oraz pEnk (czerwony) u myszy szczepu *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup>. A-C) Skrawek z grzbietowym prążkowie (CPu) przy powiększeniu × 20. D-F) Skrawek z rdzeniem jądra półleżącego (NAc rdzeń) przy powiększeniu × 40. G-I) Skrawek ze skorupą jądra półleżącego (NAc skorupa) przy powiększeniu × 40. C,F,I.) Współwystępowanie sygnałów dla GFP i pEnk (żółto-pomarańczowy). Białe strzałki zwrócone w prawo wskazują neurony wykazujące ekspresję GFP, białe strzałki zwrócone w lewo wskazują neurony z ekspresją pEnk, niebieskie strzałki wskazują neurony z nałożeniem sygnałów z GFP i pEnk.

## Podstawowe testy behawioralne

Aby sprawdzić czy inaktywacją receptorów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych na neuronach D1 u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* nie zaburza ich prawidłowego funkcjonowania przeprowadzono podstawowe testy behawioralne. Zbadana została aktywność motoryczna, zachowania związane z lękiem, zdolności uczenia się i zapamiętywania oraz wrażliwość na bodźce.

### Test otwartego pola

W celu ustalenia bazowej aktywności motorycznej oraz oceny zachowań lękowych u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* przeprowadzono test otwartego pola. Zwierzęta z mutacją nie różniły się statystycznie od zwierząt typu dzikiego średnią prędkością osiąganą w teście (Rysunek 4A,  $t(40)= 1,657$ ,  $p= 0,1054$ ) ani długością całkowitego przebytego dystansu (Rysunek 4B,  $t(40)= 1,7$ ,  $p= 0,0968$ ). Nie wykryto również różnic w czasie spędzonym w polu centralnym (Rysunek 4C,  $t(40)=1,032$ ,  $p= 0,3083$ ). Z danych wynika, że mutacja nie miała wpływu na aktywność ruchową ani zachowania związane z lękiem.

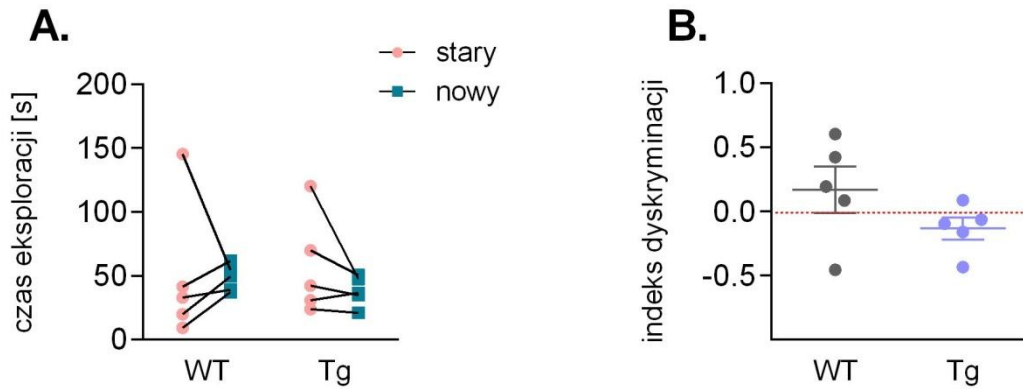


**Rysunek 4** Aktywność w otwartym polu u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*. Wykresy przedstawiają A) średnią prędkość B) całkowity przebyty dystans oraz C) procent całkowitego czasu spędzonego przez myszy w strefie centralnej. Słupki błędów pokazują SEM. Liczebność grup wynosiła WT=19, Tg=23.

### Test rozpoznawania nowego obiektu

Aby sprawdzić zdolność dyskryminacji obiektów oraz funkcjonowanie pamięci krótkotrwałej u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* przeprowadzono test rozpoznawania nowego obiektu. Nie znaleziono statystycznie istotnych różnic między całkowitym czasem eksploracji nowego obiektu w porównaniu do obiektu starego przez obie grupy zwierząt (Rysunek 5A, dwuczynnikowa ANOVA *obiekt*  $F(1, 16)= 0,4496$ ,  $p= 0,5121$ , *genotyp*

$F(1, 16) = 0,0073$ ,  $p = 0,933$ , *obiekt*  $\times$  *genotyp*  $F(1, 16) = 0,3323$ ,  $p = 0,5723$ ). Obie grupy zwierząt nie różniły się pod względem zdolności dyskryminacji obiektów (Rysunek 5B, test Mann-Whitney'a  $U = 6$ ,  $p = 0,2222$ ) i charakteryzowały się słabą pamięcią krótkotrwałą.



**Rysunek 5 Wyniki testu rozpoznawania nowego obiektu dla myszy *Oprd1/Oprm1*<sup>DI-KD</sup>.** A) Całkowity czas eksploracji starego i nowego obiektu. B) Indeks dyskryminacji obiektu oznaczający różnicę czasu spędzonego na eksploracji nowego obiektu i obiektu starego podzielonego przez ich sumę. Słupki błędów pokazują SEM. Liczebność grup wynosiła WT=5, Tg=5.

## Test warunkowego wzmocnienia

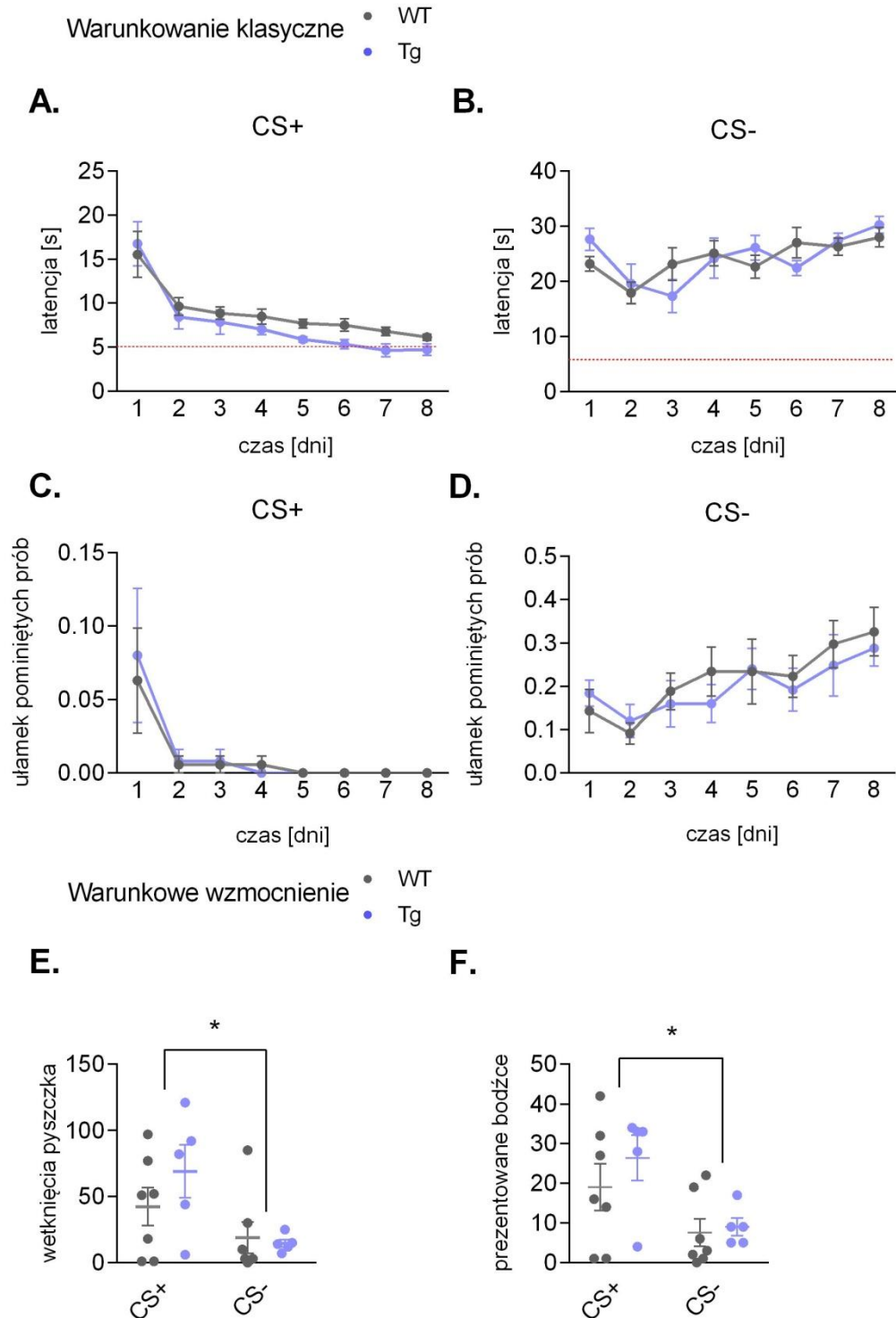
### Warunkowanie klasyczne

Warunkowanie pawłowskie jest podstawową formą warunkowania, polegającą na skojarzeniu bodźca bezwarunkowego z warunkowym. W przeprowadzonym eksperymencie analizowano efektywność skojarzenia bodźca neutralnego (światło lub dźwięk) z dostarczeniem nagrody (czekoladowe chrupki). W tym celu zmierzono czas od pojawienia się bodźca warunkowego (CS+ lub CS-) do momentu podejścia zwierząt do podajnika z jedzeniem (Rysunek 6A-B.). W przypadku gdy bodziec warunkowy był skojarzony z nagrodą w ciągu kolejnych dni w obu grupach zwierząt zaobserwowano skrócenie czasu, po którym zwierzęta podchodziły do podajnika z jedzeniem (Rysunek 6A, dwuczynnikowa ANOVA, *czas*  $F(7, 70) = 21,42$ ,  $p < 0,0001$ , *genotyp*  $F(1, 10) = 1,807$ ,  $p = 0,2086$ , *czas*  $\times$  *genotyp*  $F(7, 70) = 0,5337$ ,  $p = 0,8061$ ). Natomiast gdy w trakcie prezentacji bodźca warunkowego nie pojawiała się nagroda czas do podejścia do podajnika z jedzeniem się wydłużał wraz z upływem dni (Rysunek 6B, dwuczynnikowa ANOVA *czas*  $F(7, 70) = 4,906$ ,  $p = 0,0002$ , *genotyp*  $F(1, 10) = 0,01401$ ,  $p = 0,9081$ , *czas*  $\times$  *genotyp*

$F(7, 70) = 1,494$ ,  $p = 0,1835$ ). Ponadto wraz z upływem dni ułamek pominiętych prób w odpowiedzi na CS+ znacznie spadł, w końcowych dniach przyjmując wartość zero zarówno dla zwierząt dzikich jak i mutantów (Rysunek 6C, dwuczynnikowa ANOVA, *czas*  $F(7, 70) = 5,397$ ,  $p < 0,0001$ , *genotyp*  $F(1, 10) = 0,08772$ ,  $p = 0,7732$ , *czas*  $\times$  *genotyp*  $F(7, 70) = 0,09713$ ,  $p = 0,9983$ ). W przypadku gdy bodźcem był CS-, dla obu grup ułamek pominiętych prób z każdym dniem się zwiększał (Rysunek 6D, dwuczynnikowa ANOVA, *czas*  $F(7, 70) = 4,04$ ,  $p = 0,0009$ , *genotyp*  $F(1, 10) = 0,1634$ ,  $p = 0,6945$ , *czas*  $\times$  *genotyp*  $F(7, 70) = 0,5337$ ,  $p = 0,8061$ ). Wnioskując z otrzymanych danych genotyp nie miał znaczącego wpływu na zdolność uczenia się u badanych zwierząt.

#### *Warunkowe wzmocnienie*

W drugim etapie doświadczenia sprawdzano czy mutacja u myszy *Oprm1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup> zmieni ich wrażliwość na bodźce uwarunkowane. W tym analizowano liczbę odpowiedzi instrumentalnych skojarzonych z bodźcem warunkowym CS+ i CS- bez dostarczenia nagrody (Rysunek 6E), oraz liczbę zaprezentowanych bodźców (Rysunek 6F). Zarówno mutanty jak i myszy kontrolne wykazywały preferencję do wykonywania odpowiedzi związanych z pojawieniem się CS+ w porównaniu do CS- (Rysunek 6E, dwuczynnikowa ANOVA, *rodzaj bodźca*  $F(1, 20) = 7,938$ ,  $p = 0,0106$ , *genotyp*  $F(1, 20) = 0,6442$ ,  $p = 0,4316$ , *genotyp*  $\times$  *rodzaj bodźca*  $F(1, 20) = 1,257$ ,  $p = 0,2755$ ). Ponadto dla obu grup liczba prezentowanych bodźców CS+ również była większa w porównaniu do CS- (Rysunek 6F, dwuczynnikowa ANOVA, *rodzaj bodźca*  $F(1, 20) = 9,035$ ,  $p = 0,007$ , *genotyp*  $F(1, 20) = 0,8473$ ,  $p = 0,3683$ , *genotyp*  $\times$  *rodzaj bodźca*  $F(1, 20) = 0,3876$ ,  $p = 0,5406$ ). Nie zaobserwowano różnic między genotypami w liczbie dokonywanych odpowiedzi instrumentalnych ani liczbie prezentowanych bodźców.



**Rysunek 6 Wyniki test warunkowego wzmocnienia dla myszy *Opr1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup>. Warunkowanie klasyczne.** A) Latencja oznaczająca czas od pojawienia się bodźca nagradzanego do podejścia zwierząt do podajnika z jedzeniem; B) latencja oznaczająca czas od pojawienia się bodźca neutralnego do podejścia zwierząt do podajnika z jedzeniem; C) ułamek prób pominiętych czyli prezentacji bodźców nagradzanych bez podejść zwierząt do podajnika z jedzeniem; D) ułamek prób pominiętych czyli prezentacji bodźców neutralnych bez podejść zwierząt do podajnika z jedzeniem. Warunkowe wzmocnienie: E) Ilość wetknięć pyszczka po stronach skojarzonych z prezentacją bodźców warunkowych zapowiadających dostarczenie nagrody lub nienagradzanych oraz F) liczba prezentowanych bodźców warunkowych. Oznaczenia skrótów: CS<sup>+</sup> bodziec warunkowy skojarzony z nagrodą, CS<sup>-</sup> bodziec warunkowy nienagradzany. Słupki błędów pokazują SEM. Symbol „\*” oznacza  $p < 0,05$  w teście ANOVA. Liczebność grup wynosiła WT=7, Tg=5.



Podsumowując, zwierzęta z mutacją nie różniły się zdolnością uczenia od zwierząt kontrolnych. Nabywanie odruchu na bodźce zapowiadające nagrodę w obu grupach była zbliżona.

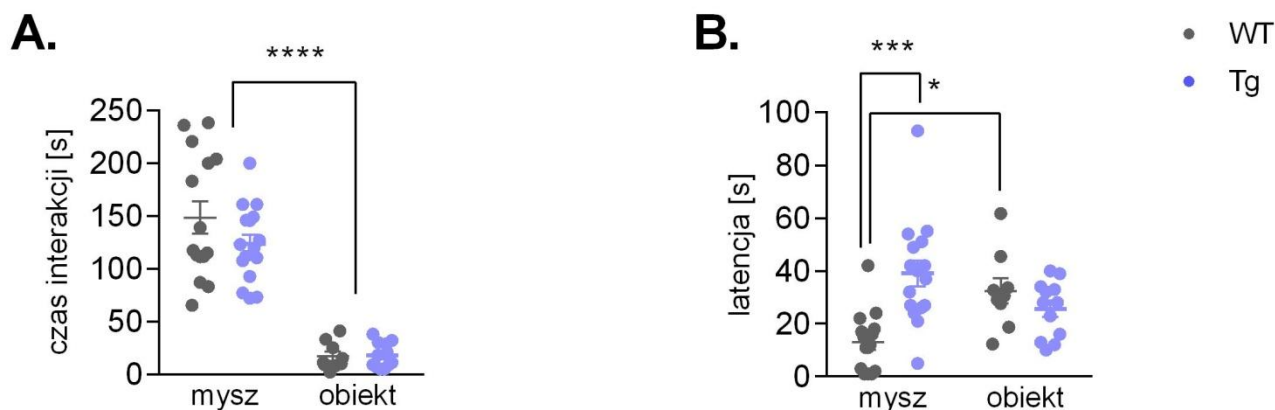
## Testy zachowań społecznych

W dotąd zaprezentowanych wynikach nie stwierdzono znamiennej różnicy w fenotypie zachowań u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*. Jednak głównym celem niniejszej pracy była charakteryzacja zachowań społecznych myszy z zaburzoną aktywacją układu opioidowego.

### Test interakcji społecznej

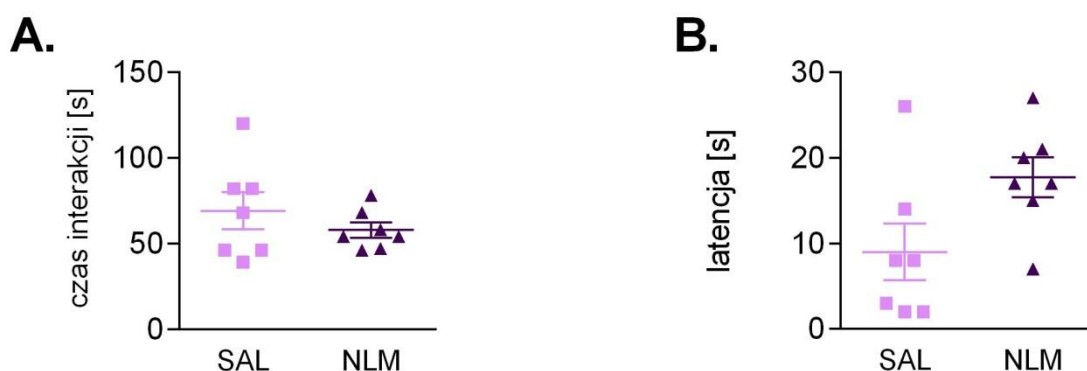
W celu sprawdzenia czy mutacja wpływa na interakcje z obiektem przeprowadzono test interakcji, w którym analizowano czas jaki myszy spędzają na interakcji z partnerem lub eksploracji obiektu, a także czas do pierwszej interakcji (Rysunek 7). Niezależnie od genotypu myszy spędzały więcej czasu na interakcji z partnerem niż z obiektem (Rysunek 7A, dwuczynnikowa ANOVA, *rodzaj bodźca*  $F(1, 48)=117,1$ ,  $p<0,0001$ , *genotyp*  $F(1, 48)= 1,205$ ,  $p= 0,2778$ , *genotyp*  $\times$  *rodzaj bodźca*  $F(1, 48)=1,354$ ,  $p= 0,2503$ ). Co istotne stwierdzono wydłużenie czasu inicjacji interakcji społecznej w przypadku zwierząt z mutacją (Rysunek 7B, dwuczynnikowa ANOVA, *rodzaj bodźca*  $F(1, 48)= 0,4961$ ,  $p= 0,4846$ , *genotyp*  $F(1, 48)= 5,221$ ,  $p= 0,0268$ , *genotyp*  $\times$  *rodzaj bodźca*  $F(1, 48)= 15,07$ ,  $p= 0,0003$ ). Ponadto w przypadku myszy kontrolnych latencja interakcji międzyosobniczej była krótsza niż w warunkach z obiektem (Rysunek 7B, test post-hoc Tukey'a  $p= 0,0168$ ), natomiast dla zwierząt transgenicznym zaobserwowano trend w kierunku krótszego opóźnienia eksploracji obiektu niż interakcji z partnerem (Rysunek 7B, test post-hoc Tukey'a  $p= 0,0974$ ).

Reasumując, stwierdzono istotny wpływ genotypu na inicjację interakcji społecznej, natomiast całkowity czas interakcji nie różnił się między obiema grupami.



**Rysunek 7 Interakcja społeczna i eksploracja obiektu u myszy *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup>.** A) Całkowity czas interakcji z partnerem i obiektem. B) Latencja oznaczająca czas od umieszczenia przedmiotu interakcji (mysz lub obiekt) na arenie testowej do pierwszej zainicjowanej przez mysz badaną interakcji. Słupki błędów pokazują SEM. Symbol „\*” oznacza  $p < 0,05$ , „\*\*\*”  $p < 0,001$ , „\*\*\*\*”  $p < 0,0001$  w teście post-hoc Tukey’a. Liczebność grup wynosiła WT=24, Tg=28.

Dodatkowo aby zweryfikować wynik uzyskany u zwierząt z mutacją, zbadano wpływ podania nalmefenu, antagonisty receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  oraz częściowego agonisty  $\kappa$ . Wykazano, że również w tym przypadku całkowity czas interakcji społecznej nie różnił się między grupami (Rysunek 8A, test Mann-Whitney’a,  $U = 21,5$ ,  $p = 0,722$ ). Ponadto zastosowanie leku wydłużało czas inicjacji kontaktu w porównaniu do grupy kontrolnej (Rysunek 8B, test t-studenta,  $t(12) = 2,173$ ,  $p = 0,0505$ ).



**Rysunek 8 Interakcja społeczna u myszy C57BL/6N.** A) Całkowity czas interakcji z partnerem. B) Latencja oznaczająca czas od umieszczenia partnera interakcji na arenie testowej do pierwszej zainicjowanej przez mysz badaną interakcji. Słupki błędów pokazują SEM. Oznaczenia skrótów: NLM- grupa zwierząt, które otrzymały 1 mg/kg nalmefenu na 60 minut przed początkiem testu; SAL- grupa kontrolna otrzymująca sól fizjologiczną. Liczebność grup wynosiła SAL=7, NLM=7.

Eksperyment z podaniem nalmefenu potwierdził rolę receptorów opioidowych w modulowaniu inicjacji interakcji społecznej. Stwierdzono, że genetyczna inaktywacja lub farmakologiczne zablokowanie receptorów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych prowadzą

do wydłużenia czasu interakcji społecznej. Opóźnienie podejmowania czynności nie jest globalne (normalny czas latencji do eksploracji obiektu), ale specyficzne dla modalności społecznej.

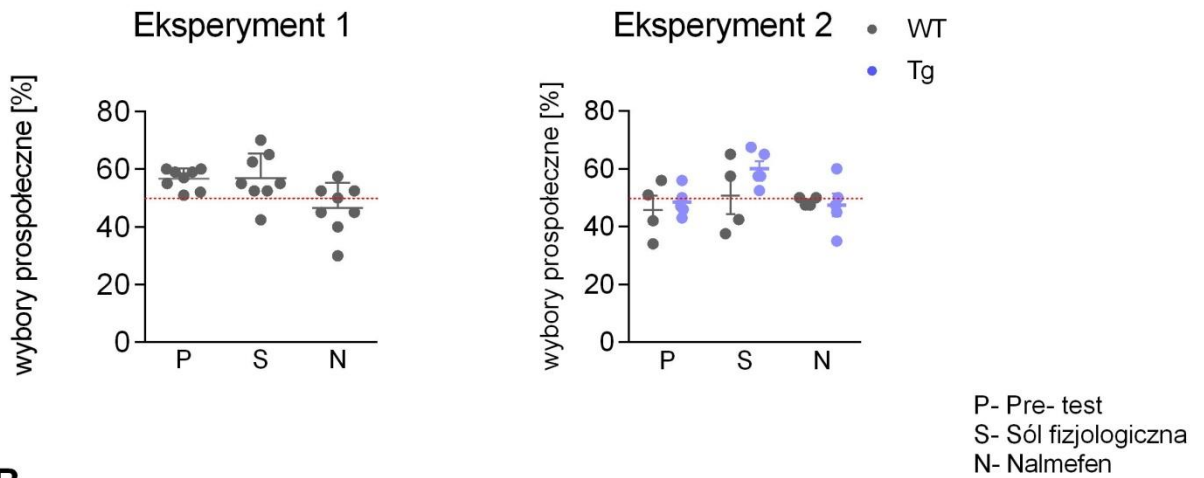
## Test wyborów prospołecznych

Zachowania prospołeczne polegają na podejmowaniu działań, które przynoszą korzyść innym. Doświadczenia przeprowadzono w celu sprawdzenia wpływu aktywacji układu opioidowego na decyzje podejmowane w kontekście społeczny. Ponadto przeprowadzony test jest pierwszą adaptacją testu wyborów prospołecznych zastosowaną na myszach. Analizowano procent dokonywanych wyborów prospołecznych w fazie pre-testu, po podaniu roztworu nalmefenu oraz soli fizjologicznej. Na początku postawiono pytanie czy myszy w ogóle wykazują preferencję podejmowania wyborów prospołecznych (Rysunek 9A). W tym celu analizowano ilość wyborów prospołecznych dokonywanych przez aktorów w fazie pre-testu. Tylko w przypadku eksperymentu 1 stwierdzono znamienne skłonność do podejmowania wyborów prospołecznych wynoszącą 57 % (test dla jednej próby  $t(7)= 5,230$ ,  $p= 0,0012$ , wynik nie pokazany na wykresie). Natomiast w eksperymencie 2 zarówno myszy kontrolne jak i mutanty nie wykazywały zachowań prospołecznych częściej niż losowo (test dla jednej próby WT  $t(3)= 0,8725$ ,  $p= 0,4472$ , Tg  $t(4)= 0,7258$ ,  $p= 0,5082$ , wynik nie pokazany na wykresie).

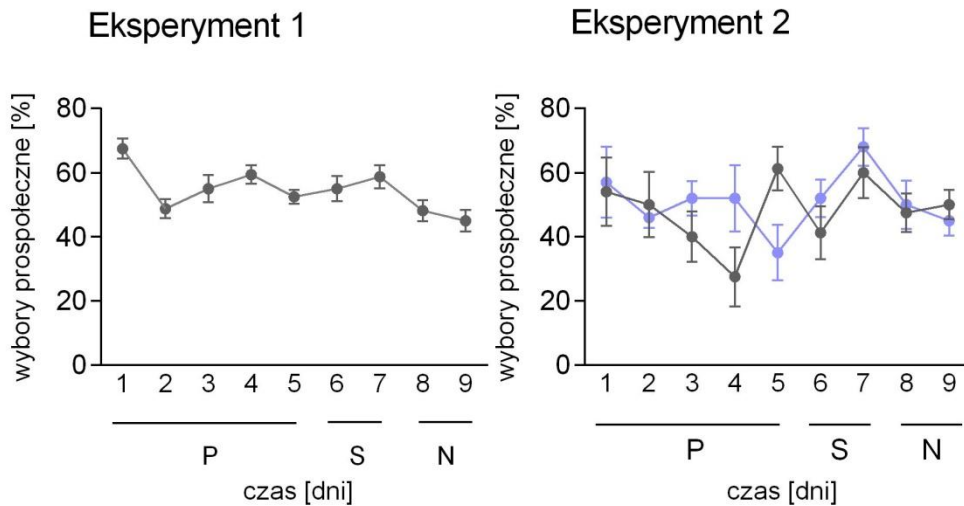
W eksperymencie 1 zaobserwowano znamienne spadek liczby wyborów prospołecznych po podaniu nalmefenu (Rysunek 9A, jednoczynnikowa ANOVA  $F(2, 21)= 5,119$ ,  $p= 0,0155$ ). Natomiast w eksperymencie 2 zarówno w przypadku myszy dzikich jak i transgenicznym nie zaobserwowano znaczących różnic w liczbie dokonywanych wyborów prospołecznych po podaniu nalmefenu (Rysunek 9A, dwuczynnikowa ANOVA, *lek*  $F(2, 14)= 2,170$ ,  $p= 0,1510$ , *genotyp*  $F(1, 7)= 2,971$ ,  $p= 0,1284$ , *genotyp*  $\times$  *dzień*  $F(2, 14)= 0,7796$ ,  $p= 0,4775$ ).



**A.**



**B.**



**Rysunek 9 Wybory prospołeczne podejmowane przez myszy C57BL/6N i *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup>.** A) Średni procent dokonywanych wyborów prospołecznych przez myszy C57BL/6N (eksperyment 1) i *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup> (eksperyment 2) w fazie pre-testu, po podaniu soli fizjologicznej i nalmefenu. B) Zmiany procenta dokonywanych wyborów prospołecznych przez myszy C57BL/6N (eksperyment 1) oraz *Oprd1/Oprm1*<sup>D1-KD</sup> (eksperyment 2) w trakcie wszystkich dni trwania testu. Słupki błędów pokazują SEM. Oznaczenia skrótów: P- wybory dokonywane w czasie pre-testu, S- wybory dokonywane po podaniu 1 mg/kg soli fizjologicznej na 60 minut przed początkiem testu, N- wybory dokonywane po podaniu 1 mg/kg nalmefenu na 60 minut przed początkiem testu; Liczebność grup w eksperymencie 1 wynosiła n=8, natomiast w eksperymencie 2 WT= 4, Tg= 5.

Z obserwacji wynika, że genotyp zwierząt nie wpłynął na liczbę dokonywanych wyborów prospołecznych, niemniej działanie nalmefenu nie było jednoznaczne. Lek zmniejszał liczbę dokonywanych wyborów prospołecznych w eksperymencie 1, w którym wykazano bazową preferencję dokonywania wyborów prospołecznych. Jednakże w eksperymencie 2 nie stwierdzono wpływu podania nalmefenu na podejmowane wybory a zwierzęta nie charakteryzowały się znaczącą skłonnością do wyborów prospołecznych.

## Dyskusja

Punktem wyjścia przeprowadzonych badań była charakteryzacja szczepu transgenicznego myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*. W celu weryfikacji specyficzności mutacji przeprowadzono barwienia immunofluorescencyjne, umożliwiające identyfikację miejsc ekspresji transgenu. Stwierdzono, że lokalizacja białka GFP była charakterystyczna dla drogi bezpośredniej pętli korowo-podstawnej. Na podstawie tej obserwacji założono, że mutacja prowadzi do inaktywacji receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  na neuronach wyrażających receptory dopaminy D1, co może być bezpośrednią przyczyną zaburzeń funkcjonowania układu nagrody oraz zmian fenotypowych.

Aby stwierdzić, czy modyfikacja genetyczna miała wpływ na zachowanie przeanalizowano podstawowe funkcjonowanie zwierząt w teście otwartego pola, rozpoznawania nowego obiektu i warunkowego wzmocnienia. Wykazano, że myszy transgeniczne nie różniły się od myszy kontrolnych aktywnością ruchową, zachowaniami lękowymi, umiejętnością uczenia się i zapamiętywania czy wrażliwością na bodźce sensoryczne. Zaobserwowany brak zmian behawioralnych myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* jest w zgodzie z wynikami Jastrzębskiej, która jako pierwsza podjęła się opisu tego transgenicznego szczepu (Jastrzębska, 2017).

Zasadniczą część pracy stanowiły badania zachowań społecznych oraz podejmowania decyzji w kontekście społecznym. Zaobserwowano, że myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* wykazują wydłużony czas inicjacji interakcji społecznej, jednak całkowity czas spędzony na kontakcie z partnerem interakcji był niezmienny. Dodatkowo wyniki eksperymentu na myszach dzikich, którym podawano dootrzewnowo nalmefen (antagonistę receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  oraz agonistę  $\kappa$ ) potwierdziły wpływ wyciszenia układu opioidowego na wydłużenie opóźnienia przed podjęciem interakcji oraz dały podstawę do twierdzenia, iż obserwowane zmiany nie są wynikiem procesów adaptacyjnych związanych z wprowadzeniem transgenu. Natomiast próba przystosowania testu wyborów prospołecznych do badań na myszach nie przyniosła oczekiwanego efektu, uniemożliwiając określenie, czy myszy w ogóle charakteryzują się skłonnością do wyborów prospołecznych.

### Zaburzenia interakcji społecznej nie są wynikiem ogólnych zmian funkcjonowania myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*

Prążkowie zaangażowane jest przede wszystkim w kontrolę ruchową oraz integrację procesów kognitywnych, emocjonalnych i motywacyjnych. Zbudowane jest

głównie z średnich neuronów kolczystych, wykazujących charakterystyczną ekspresję receptorów dopaminowych. Wykazano, że zaburzenia aktywacji ścieżki bezpośredniej tworzonej przez neurony wyrażające receptory dopaminy D1 prowadzą do obniżenia aktywności motorycznej myszy (Bateup i wsp., 2010). Jednakże w prezentowanych tu badaniach nie wykazano zmian w ogólnym pobudzeniu zwierząt *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* analizowanym w teście otwartego pola czy na podstawie czasu eksploracji obiektów w teście rozpoznawania nowego obiektu. Niemniej zaobserwowano wydłużenie opóźnienia przed podjęciem interakcji społecznej, co jest zaskakujące w kontekście mutacji, która teoretycznie prowadziła do odhamowania ścieżki bezpośredniej. W swoich badaniach Cui i współpracownicy wykazali, że inicjację czynności poprzedza aktywacja obu ścieżek podstawno-korowych, a nie jak klasycznie uważano tylko drogi prążkowiowo-czarnej (Cui i wsp., 2014). Możliwe, że w wyniku prenatalnej modyfikacji genetycznej doszło do adaptacyjnych zmian aktywacji specyficznych średnich neuronów kolczystych, których wynikiem było wzmocnienie działania ścieżki pośredniej. Dodatkowo interesującym jest fakt, że wydłużenie czasu inicjacji interakcji dotyczyło tylko warunku społecznego. Jedną z przyczyn takiego zachowania myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* mogła być zmniejszona wrażliwość na bodźce społeczne. Argument ten odrzucono przeprowadzając test rozpoznawania nowego osobnika, w którym wykazano, że genotyp nie miał wpływu na zdolność dyskryminacji myszy. Stwierdzono również, że zachowania myszy w teście interakcji społecznej nie były wynikiem nasilonych zachowań lękowych, które analizowano na podstawie czasu spędzanego w centrum klatki w teście otwartego pola. Innym wyjaśnieniem wydłużonej latencji interakcji mogły być zmiany w wartościowaniu bodźców i procesach motywacyjnych, co zostanie rozwinięte w dalszej części dyskusji.

### **Czy wyciszenie receptorów opioidowych $\mu$ i $\delta$ wpływa na funkcjonowanie układu nagrody? Odczuwanie przyjemności a motywacja.**

Prążkowie jest częścią układu nagrody, biorącego udział w przetwarzaniu informacji o wartości hedonistycznej i motywacyjnej nagrody oraz procesach uczenia się. Grzbietowe prążkowie unerwiają głównie kora czuciowo-ruchowa oraz obszary asocjacyjne a jego aktywność związana jest z uczeniem na zasadzie wzmocnień oraz powstawaniem nawyków behawioralnych. Natomiast do brzuszego prążkowie dochodzą aksony struktur limbicznych. Strukturze tej przypisuje się ważną rolę w asocjacyjnym uczeniu (Macpherson, Morita i Hikida, 2014) oraz odczuwaniu

przyjemności (Castro i Berridge, 2014). W licznych badaniach wykazano, że bodźce nagradzające prowadzą do wzrostu uwalniania dopaminy w NAc (Di Chaira i Imperato, 1988; Hernandez i Hoebel, 1988; Radhakishun, Van Ree i Westerink, 1988), który może być kontrolowany przez transmisję opioidową (Margolis i wsp., 2006; Margolis i wsp., 2003). Zatem zmiany w aktywacji ścieżki bezpośredniej mogłyby być przyczyną zaburzeń w odczuwaniu przyjemności, jednak wydaje się, że myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* nie różnią w tym aspekcie od zwierząt kontrolnych. Jastrzębska wykazała, że mutacja nie miała wpływu na preferencję sacharyny, ilość zjadanego pokarmu czy też wrażliwość na morfinę i nalokson w teście preferencji miejsca. Niemniej zauważono, że myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* wykonują więcej odpowiedzi instrumentalnych w teście samopodawania jedzenia (Jastrzębska, 2017), co może świadczyć o zwiększonej wartości nagradzającej bodźców.

Zachowania afiliacyjne mają charakter społecznej nagrody i wiążą się z pobudzeniem szlaku VTA-NAc poprzez aktywację neuronów wyrażających receptory dopaminy D1 (Gunaydin i wsp., 2014). Warto zaznaczyć, że przetwarzanie informacji o niespołecznych bodźcach nagradzających może różnić się od przetwarzania bodźców o bodźcach społecznych i angażować inne struktury bądź grupy neuronów (Ruff i Fehr, 2014). W kontekście odczuwania przyjemności wyniki mojej pracy mogą przemawiać na rzecz hipotezy o wspólnym mechanizmie nagrody społecznej i niespołecznej, ponieważ w teście interakcji społecznej potwierdzono brak wpływu mutacji na odczuwanie przyjemności, objawiający się brakiem różnic w ogólnym czasie interakcji społecznej. Badane osobniki były starsze, więc spodziewano się reakcji agresywnych oraz lękowych, których jednak nie zaobserwowano, więc na podstawie tych obserwacji wyciągnięto wniosek o nagradzającej wartości interakcji społecznych. Brak objawów anhedonii u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* może być spowodowany tym, że mutacja zaszła wyłącznie na neuronach D1 obecnych w NAc, które nie jest jedyną strukturą odpowiedzialną za odczucie przyjemności. Innymi strukturami związanymi z przetwarzaniem informacji o nagrodzie są VP oraz jądra okółoramieniowe mostu (Berridge i Kringelbach, 2008), w których nie doszło do wbudowania transgenu. Możliwe, że aktywność tych dwóch struktur kompensuje zaburzenia aktywacji w NAc lub/ oraz brak zmian w zachowaniu afiliacyjnym jest wynikiem włączenia procesów homeostatycznych w aktywacji pętli korowo-podstawnych, opierających się na zasadzie sprzężeń zwrotnych. Prawdopodobnie wynika to ze wzmożonej aktywności interneuronów w NAc, zapobiegającej

przedłużonej aktywacji neuronów NAc przez nagradzające bodźce (Macpherson, Morita, i Hikida, 2014).

### **Rola receptorów opioidowych w regulacji afiliacyjnych zachowań społecznych.**

W wielu badaniach udowodniono rolę opioidów w regulacji zachowań społecznych (Loseth, Ellingsen, i Leknes, 2014; Vanderschuren i wsp., 1995). Zaobserwowano, że dootrzewnowe podania morfiny (nieselektywnego agonisty opioidowego) zwiększają skłonności do zabaw u młodocianych szczurów, natomiast podania naloksonu (nieselektywnego antagonisty receptorów opioidowych) mają odwrotny skutek (Normansell i Panksepp, 1990). W późniejszych badaniach wykazano, że kluczową rolę w nagradzających efektach kontekstu społecznego pełnią receptory opioidowe zlokalizowane w strukturach układu nagrody. Stwierdzono, że pobudzenie receptorów  $\mu$  w skorupie oraz rdzeniu NAc, a także zablokowanie receptorów  $\kappa$  prowadzi do zintensyfikowania zabaw u młodocianych szczurów (Trezza i wsp., 2011). Należałoby zatem przypuszczać, że obniżenie aktywacji receptorów  $\mu$  w prądkowiu będzie skutkowało skróceniem interakcji osobników, czego jednak nie wykazano w przeprowadzonych przeze mnie eksperymentach. Zarówno zwierzęta transgeniczne jak i myszy, którym podano nalmefen nie różniły się znamienne czasem spędzonym na interakcji z partnerem. Jednak badane osobniki były starsze (9-17 tygodni) niż szczury w eksperymentach Trezzy (5 tygodni), co mogło wpłynąć na osiągnięty wynik. Zaobserwowano bowiem, że u samców myszy zachowania afiliacyjne słabną z wiekiem, więc różnice mogą być trudniejsze do wykrycia.

Ponadto istnieją prace, które wskazują na konieczność zrównoważonej aktywacji układu opioidowego na wczesnych etapach życia, by zwierzęta mogły wykształcić prawidłowe wzorce interakcji społecznej. Zaburzona transmisja opioidowa byłaby powodem zmienionej wrażliwości na bodźce społeczne, która jest pobudką do podejmowania odpowiednich reakcji w kontekście społecznym. Eksperymenty przeprowadzone na myszach pozbawionych receptora opioidowego  $\mu$  wykazały, że zwierzęta te charakteryzują się zmniejszoną intensywnością wokalizacji w odpowiedzi na separację od matki w porównaniu do myszy kontrolnych. (Moles, Kieffer i Amato, 2004). Podobnie Cinque i współpracownicy stwierdzili, że zarówno brak receptora opioidowego  $\mu$  jak i postnatalne podania naltreksonu (niespecyficznego antagonisty receptorów opioidowych) powodowały zmniejszenie wrażliwości

na matczyne bodźce oraz osłabienie interakcje z rówieśnikami w późniejszym wieku. Co więcej zwierzęta nie wykazywały preferencji miejsca skojarzonego z kontekstem społecznym, co może świadczyć o obniżonej zdolności do odczuwania przyjemności z kontaktu społecznego (Cinque i wsp., 2012). Z drugiej strony wyniki moich badań wskazują, że wyciszenie receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  na neuronach wyrażających receptor dopaminowy D1 nie jest wystarczające, aby obniżyć wartość nagradzającą bodźców społecznych u dorosłych myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>*. Natomiast wydłużony czas inicjacji interakcji społecznej może sugerować zaburzenia procesów motywacyjnych.

### **Czy wydłużenie czasu inicjacji interakcji społecznej jest wynikiem zaburzonej motywacji? Rola receptorów $\mu$ i $\delta$ opioidowych.**

Zaburzenia funkcjonowania układu opioidowego mogą wpływać nie tylko na odczucie przyjemności związane z nagrodą, ale również na zdolność bodźców do przewidywania nagrody. Strukturą biorącą udział w przetwarzaniu wartości motywacyjnej bodźców warunkowych jest grzbietowo-boczna część prążkowiec. Wykazano, że iniekcje DAMGO (selektywnego agonisty receptorów opioidowych  $\mu$ ) do grzbietowo-bocznego prążkowiec zwiększały wrażliwość na prezentowane bodźce warunkowe i zmniejszały czas opóźnienia do podejścia do bodźca zapowiadającego nagrodę lub do miejsca, w którym nagroda miała się pojawić. Ponadto w teście warunkowego wzmocnienia zwierzęta te wykazywały się zwiększoną motywacją do wykonywania specyficznych odpowiedzi, skutkujących pojawieniem się bodźca warunkowego skojarzonego z nagrodą (Difeliceantonio i Berridge, 2016). Niemniej w przeprowadzonym przeze mnie teście warunkowego wzmocnienia nie wykazano obniżenia motywacyjnej wartości bodźców warunkowych, co teoretycznie byłoby efektem wyciszenia receptorów opioidowych w grzbietowym prążkowiec. Z badań wynika, że wydłużenie opóźnienia do interakcji społecznej nie było prawdopodobnie wynikiem zaburzeń w antycypacji nagrody.

W swoich badaniach Laurent i współpracownicy (2012) wskazują na istnienie dwóch procesów motywacyjnych, odrębnych anatomicznie i chemicznie, związanych z wartościowaniem nagrody oraz bodźca zapowiadającego nagrodę. Zaobserwowano, że myszy z inaktywacją receptora opioidowego  $\mu$  w rdzeniu NAc charakteryzowały się obniżoną wrażliwością na dewaluację nagrody, jednak nie wykazując zmian w wartościowaniu bodźców warunkowych. Natomiast usunięcie lub zablokowanie

receptora opioidowego  $\delta$  w skorupie NAc prowadziło do zaburzeń wartościowania bodźców warunkowych, nie wpływając na wartość samej nagrody (Laurent i wsp., 2012). Możliwe zatem, że opóźnienie interakcji społecznej jest skutkiem obniżenia pobudzenia receptora opioidowego  $\mu$  na drodze prążkowiowo-czarnej i wynika ze zmian w wartościowaniu samej nagrody a nie bodźców skojarzonych z nagrodą.

Według modelu SOMSON aktywacja receptora opioidowego  $\mu$  może wywoływać odmienne skutki na zachowania społeczne w zależności od początkowego stanu motywacyjnego danego osobnika (Loseth, Ellingsen, i Leknes, 2014). Zablokowanie tychże receptorów u zwierząt nie poddawanych izolacji społecznej prowadziłyby do osłabienia motywacji do poszukiwania społecznego kontaktu, co również potwierdzają wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań. Zarówno doświadczenia na myszach *Oprd1/Oprm1<sup>DI-KD</sup>* jak i z dootrzewnowym podaniem nalmefenu wykazały wydłużenie latencji interakcji społecznej, niemniej efekt wywołany przez lek nie osiągnął progu istotności statystycznej, ale widoczna była silna tendencja. Nalmefen wykazuje powinowactwo do wszystkich typów receptorów opioidowych. Działa głównie jako antagonist receptorów  $\mu$  oraz słabiej jako antagonist receptorów  $\delta$  i częściowy agonista receptorów  $\kappa$ . Możliwe, że dużą rolę w inicjacji interakcji społecznej odgrywa aktywacja receptorów  $\delta$  opioidowych, które były w niewielkim stopniu blokowane przez nalmefen, dlatego nie stwierdzono tak znamiennej różnicy w motywacji jak w przypadku myszy transgenicznych.

Podsumowując, mutacja u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>DI-KD</sup>* nie wywołuje globalnych zmian w doświadczaniu przyjemności. Natomiast zjawisko wydłużonego czasu inicjacji interakcji społecznej jest skutkiem zaburzeń motywacji, wynikającej ze specyficznych zmian w wartościowaniu kontaktu społecznego. Zatem wyniki moich badań potwierdzają rozdzielność procesów motywacyjnych oraz związanych z odczuwaniem przyjemności oraz sugerują istnienie odrębnych mechanizmów przetwarzających informacje o niespołecznych i społecznych bodźcach nagradzających

### **Czy myszy są prospołeczne? Rola opioidów w podejmowaniu decyzji**

Dodatkowym celem pracy była próba adaptacji testu wyborów prospołecznych do badań na myszach. Na podstawie doniesień o zachowaniach prospołecznych szczurów (Hernandez-Lallement i wsp., 2015) na zasadzie analogii podejrzewano, że zjawisko to będzie również obserwowane u myszy. Postuluje się, że mechanizmem



odpowiedzialnym za podejmowanie wyborów prospołecznych jest doświadczanie nagrody społecznej, która może zależeć od aktywacji układu opioidowego.

Na podstawie badań przeprowadzonych w ramach pracy magisterskiej nie można jednoznacznie stwierdzić czy myszy wykazują się skłonnością do podejmowania wyborów prospołecznych oraz czy manipulacje układem opioidowym powodują zmiany decyzji. Wykazano bowiem, że myszy transgeniczne nie różniły się liczbą wyborów prospołecznych od myszy kontrolnych (eksperyment 2), z drugiej strony iniekcje nalmefenu zmniejszały skłonność do decyzji prospołecznych u myszy dzikich (eksperyment 1). W takim razie co mogło być przyczyną rozbieżności wyników?

Po pierwsze procedury zastosowane w eksperymencie 1 (wpływ nalmefenu) różniły się od eksperymentu 2 (wpływ mutacji). Zastosowane zmiany dotyczyły czasu prowadzenia testu (faza jasna vs faza ciemna), ilości prób (25 vs 20), wieku zwierząt (9 vs 12-16), minimalizacji wpływu czynników związanych z otoczeniem oraz kolejności dostarczania nagród (patrz Materiały i metody). Wyniki eksperymentu 1 wskazują na zachowania prospołeczne myszy powyżej poziomu losowości (57% wyborów prospołecznych) i są zgodne z obserwacjami grupy Hernandez-Lallement'a, w których szczury osiągnęły podobny rezultat (Hernandez-Lallement i wsp., 2015). U tych myszy blokada receptorów opioidowych skutkowała statystycznie znamionym spadkiem wyborów prospołecznych. Natomiast w eksperymencie 2 żadna z grup nie wykazywała się zachowaniami prospołecznymi, a zastosowanie nalmefenu nie spowodowało obserwowalnych zmian fenotypowych.

Nalmefen wykazuje powinowactwo przede wszystkim do receptorów  $\mu$  oraz słabiej do receptorów  $\delta$  opioidowych (antagonista), ale jest także częściowym agonistą receptorów  $\kappa$ . W teście wyborów prospołecznych nie zaobserwowano wpływu genetycznej modyfikacji na podejmowane decyzje, jednak w eksperymencie 1 stwierdzono spadek wyborów prospołecznych po zastosowaniu nalmefenu. Niewykluczone zatem, że to właśnie manipulacje aktywacją receptorów  $\kappa$  są przyczyną zmian w podejmowaniu decyzji. Możliwe, że zachowania prospołeczne u myszy nie są wynikiem doświadczania nagrody społecznej, w mediowaniu której biorą udział receptory opioidowe  $\mu$  i  $\delta$  (Laurent i wsp., 2012; Trezza i wsp., 2011), ale paradoksalnie są konsekwencją odczuwania kary społecznej związanej z aktywacją receptorów opioidowych  $\kappa$  (McLaughlin i wsp., 2006). Negatywne bodźce przesyłane przez partnera (Horner i wsp., 2011) oraz dodatkowa aktywacja receptorów  $\kappa$  mogłyby prowadzić



do uczucia dyskomfortu, który motywowałby do podejmowania wyborów prospołecznych.

Możliwe również, że niejasne wyniki eksperymentów są spowodowane złym dobozem obiektów badawczych. Testy wyborów prospołecznych zostały przeprowadzone na samcach myszy, natomiast w wielu badaniach wykazano, że większą skłonność do zachowań prospołecznych mają samice (Bartal, Decety i Mason, 2012; Hernandez-Lallement i wsp., 2015). Co więcej osobniki biorące udział w teście pochodziły z innych klatek, co zmniejsza prawdopodobieństwo zachowań prospołecznych motywowanych wzajemnością (Cronin, 2012), a także opartych na wcześniejszych doświadczeniach (Rutte i Taborsky, 2008).

Z przeprowadzonych badań wynika, że myszy mogą przejawiać zachowania prospołeczne. Prawdopodobnie zmiany w aktywacji układu opioidowego mogą wpływać na podejmowane wybory w kontekście społecznym, ale tylko wśród osobników, które wyjściowo ją przejawiają.

### **Krytyka i dalsze perspektywy badań**

Dotychczas opisano wpływ endogennego układu opioidowego na wiele aspektów zachowania, dlatego dziwić mogą wyniki badań, w których zastosowanie manipulacji genetycznej prowadzącej do inaktywacji receptorów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych na neuronach ścieżki bezpośredniej pętli korowo-podstawnej nie wywołuje spektakularnych zmian w zachowaniu zwierząt. Powodów tego stanu rzeczy może być kilka.

Po pierwsze przeprowadzona mutacja prowadzi do obniżonej transkrypcji genów, na których matrycy powstają receptory  $\mu$  i  $\delta$  opioidowe oraz do zaburzeń translacji tychże białek. Oznacza to, że skutkiem mutacji nie jest całkowity brak receptorów opioidowych i wciąż może powstawać pewna ilość funkcjonalnych białek wystarczająca do wywołania normalnego efektu stymulacji opioidowej. W rzeczy samej Jastrzębska udowodniła, że myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* reagują na podania morfiny i naloksonu w teście preferencji miejsca tak samo jak myszy kontrolne (Jastrzębska, 2017), co może dowodzić istnienia wystarczającej ilości funkcjonalnych receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  na neuronach D1 lub też prowadzić do konkluzji, że miejsca działania opioidów skojarzone z nagrodą są zgoła inne niż neurony D1, czemu jednak przeczą dane literaturowe (Kravitz i wsp., 2012). W przyszłości warto byłoby zbadać

ilość funkcjonalnych receptorów opioidowych oraz przeprowadzić badania elektrofizjologiczne, które pozwoliłyby na ocenę efektywności mutacji.

Po drugie na podstawie przeprowadzonych barwień immunofluorescencyjnych nie można jednoznacznie stwierdzić czy mutacja jest specyficzna dla neuronów wyrażających receptor dopaminowy D1, tym samym czy skutki genetycznej modyfikacji są wynikiem zaburzeń funkcjonowania wyłącznie ścieżki bezpośredniej. Na podstawie analizy obrazu mikroskopowego stwierdzono, że ekspresja transgenu owszem zachodzi w neuronach D1, natomiast do identyfikacji neuronów D2 użyto przeciwciał dla enkefaliny. Zaobserwowano, że istnieją neurony, które wyrażają zarówno transgen jak i proenkefalinę, co może sugerować niecałkowitą rozdzielność ścieżki bezpośredniej i pośredniej. Owszem istnieją badania, w których potwierdzono powyższą hipotezę, a także zanegowano klasyczny podział ścieżki bezpośredniej i pośredniej odpowiednio na aktywacyjną i hamującą (Kupchik i wsp., 2015). Niemniej jednak na podstawie przeprowadzonych barwień stwierdzono, że lokalizacja struktur mózgowych wyrażających transgen jest charakterystyczna dla drogi bezpośredniej.

Ponadto liczba testów behawioralnych przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy jest niewystarczająca, aby stwierdzić, że mutacja wpływa wyłącznie na jeden aspekt zachowań. Zasadne byłoby dokładniej przyjrzeć się procesom związanym z wartością motywacyjną bodźców społecznych, a także porównać wpływ różnych wyjściowych stanów motywacyjnych na zachowania społeczne. Ponadto warto ustalić specyficzną rolę receptorów opioidowych w inicjacji interakcji, wykorzystując selektywnych antagonistów stereotaktycznie podawanych do struktur układu nagrody. W celu charakteryzacji szczepu *Oprdl/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* należałoby zanalizować inne zachowania społeczne, takie jak wrażliwość na separację od matki czy też wpływ kontekstu społecznego na warunkowanie preferencji miejsca. Poza tym w mojej pracy nie podjęłam się odpowiedzi na pytanie czy i w jaki sposób wyciszenie układu opioidowego wpływa na zachowania negatywne takie jak agresja lub wycofanie. Dalej pozostaje wyzwaniem ustalenie czy i w jakim stopniu myszy są prospołeczne, jakie są mechanizmy prospołeczności oraz przystosowanie procedur eksperymentalnych do możliwości badanego gatunku.

## Podsumowanie

Wyniki przedstawione w mojej pracy magisterskiej potwierdzają rolę endogennego układu opioidowego w regulacji zachowań społecznych. Stwierdzono,

że inaktywacja receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  na neuronach wyrażających receptory dopaminy D1 u myszy *Oprd1/Oprm1<sup>D1-KD</sup>* prowadzi do wydłużenia czasu inicjacji interakcji społecznej, co może świadczyć o zaburzeniach procesów motywacyjnych związanych z wartościowaniem bodźców społecznych. Przeprowadzone eksperymenty potencjalnie mogą wpłynąć na dalszy rozwój badań nad podłożem społecznego funkcjonowania człowieka i niewykluczone, że wyznaczą nowy kierunek leczenia farmakologicznego zaburzeń interakcji społecznych.

## Bibliografia

- Akil, H., Watson, S. J., Young, E., Michael, E., Khachaturian, H i Walker, J. M. (1984). Endogenous opioids: Biology and Function. W: *Annual Review of Neuroscience* 7, s. 223-255.
- Ambrose, L.M., Gallagher, S.M., Unterwald, E.M., Van Bockstaele, E.J., 2006. Dopamine-D1 and delta-opioid receptors co-exist in rat striatal neurons. *Neurosci. Lett.* 399, s. 191-196.
- Arias-carrión, O., Stamelou, M., Murillo-rodríguez, E., Menéndez-gonzález, M. i Pöppel, E. (2010). Dopaminergic reward system : a short integrative review, 1-6. *International Archives of Medicine*, s. 3-24.
- Barbano, M. F., i Cador, M. (2006). Differential Regulation of the Consummatory , Motivational and Anticipatory Aspects of Feeding Behavior by Dopaminergic and Opioidergic Drugs, *Neuropsychopharmacology* 31, s. 1371-1381.
- Barbano, M. F., i Cador, M. (2007). Opioids for hedonic experience and dopamine to get ready for it, *Neuropsychopharmacology* 191, s. 497-506.
- Barr, C. S., Schwandt, M. L., Lindell, S. G., Higley, J. D., Maestriperi, D., Goldman, D., ... Heilig, M. (2008). Variation at the mu-opioid receptor gene ( OPRM1 ) influences attachment behavior in infant primates, *Proc Natl Acad Sci* 105, s. 5277-5281.
- Bartal, I. B., Decety, J., i Mason, P. (2012). Empathy and Pro-Social Behavior in Rats, *Science* 334: 1427-1430.
- Bateup, H. S., Santini, E., Shen, W., Birnbaum, S., Valjent, E., & Surmeier, D. J. (2010). Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors, *Proc Natl Acad Sci* 107(33), 14845-14850.
- Banghart, M.R., Neufeld, S.Q., Wong, N.C., Sabatini, B.L., 2015. Enkephalin Disinhibits Mu Opioid Receptor-Rich Striatal Patches via Delta Opioid Receptors. *Neuron* 88, s. 1227-1239.
- Berke, J. D. (2018). What does dopamine mean? *Nature Neuroscience* 21(6), s. 787-793.
- Berridge, K. C. i Kringelbach, M. L. (2008). Affective neuroscience of pleasure : reward in humans and animals, *Psychopharmacology* 199, s. 457-480.
- Berridge, KC i TE Robinson (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research. Brain Research Reviews* 28.3, s. 309-369.
- Briand, L. A., Hilario, M., Dow, H. C., Brodtkin, E. S., Blendy, J. A. i Berton, O. (2015). Mouse Model of OPRM1 ( A118G ) Polymorphism Increases Sociability and Dominance and Confers Resilience to Social Defeat, *The Journal of Neuroscience* 35(8), s. 3582-3590.
- Carden, S. E. i Hofer, M. A. (1990). Independence of Benzodiazepine and Opiate Action in the Suppression of Isolation Distress in Rat Pups, *Behavioral Neuroscience* 104(1), s. 160-166.
- Castro, D. C. i Berridge, K. C. (2014). Opioid Hedonic Hotspot in Nucleus Accumbens Shell : Mu , Delta , and Kappa Maps for Enhancement of Sweetness “ Liking ” and “ Wanting ,” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34(12), s. 4239-4250.

- Chelnokova, O., Laeng, B., Eikemo1, M., Riegels, J., Løseth, G., Maurud, H., ... Leknes, S. (2014). Rewards of beauty: the opioid system mediates social motivation in humans. *Metamoodics: meta-analysis and bioinformatics resource for mood disorders, Molecular Psychiatry* 19, s. 746-747.
- Cinque, C., Pondiki, S., Oddi, D., Certo, M. G. Di, Marinelli, S., Troisi, A., ... Amato, F. R. D. (2012). Modeling socially anhedonic syndromes: genetic and pharmacological manipulation of opioid neurotransmission in mice, *Translational Psychiatry* 2, s. 1-7.
- Connor, E. C. O., Crombag, H. S., Mead, A. N., i Stephens, D. N. (2010). The mGluR5 Antagonist MTEP Dissociates the Acquisition of Predictive and Incentive Motivational Properties of Reward-Paired Stimuli in Mice, *Neuropsychopharmacology* 35, s. 1807-1817.
- Cronin, K. A. (2012). Prosocial behaviour in animals: the influence of social relationships, communication and rewards. *Animal Behaviour*, 84(5), s. 1085-1093.
- Cui, G., Sang Beom, J., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M. i Costa, R. M. (2014). *Nature* 494(7436), s. 238-242.
- Devine, D. P., Leone, P., Pocock, D. i Wise, R. A. (1994). Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14.4, s. 1978-1984.
- Di Chiara, G. i Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Neurobiology* 85, s. 5274-5278.
- Difeliceantonio, A. G. i Berridge, K. C. (2016). Dorsolateral neostriatum contribution to incentive salience: opioid or dopamine stimulation makes one reward cue more motivationally attractive than another, *European Journal of Neuroscience* 43, s. 1203-1218.
- Fabre-Nys, C., Meller, R. E. i Keverne, E., B. (1982). Opiate Antagonists Stimulate Affiliative Behaviour in Monkeys, *Pharmacology Biochemistry. & Behavior*, 16, s. 653-659.
- Fields, H. L. i Margolis, E. B. (2015). Understanding opioid reward. *Trends in Neurosciences* 38(4), s. 217-25.
- Galligan, J. J. i Akbarali, H. I. (2015). Molecular Physiology of Enteric Opioid Receptor. *Am J Gastroenterol Suppl*, 2(1), s. 17-21.
- Gerfen, CR i DJ Surmeier (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience* 34, s. 441-466.
- Gudelsky, Gary, A. (1980). Tuberoinfundibular regulation neurons and the the regulation of prolactin secretion. *Psychoneuroendocrinolog*, 6(1), s. 3-16.
- 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: s. 1535-1551.
- Haber, S. N. i Knutson, B. (2009). The Reward Circuit: Linking Primate Anatomy and Human Imaging. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 4-26.
- Harda, Z., Jastrzębska, K., Bryksa, A., Gołda, S., Zajdel J., Szumiec, L., Spyrka, J., Blasiak, A. i Rodriguez Parkitna J. (lipiec 2018). The role of opioid modulation of D1 dopaminoceptive cells

- in social contact initiation. Sesja posterowa na konferencji Forum of Neuroscience FENS w Berlinie.
- Hernandez, L. i Hoebel, B. G. (1988). Food reward and cocaine increase extracellular, *Life Sciences* 42, s. 1705–1712.
- Hernandez-Lallement, J., Wingerden, M. Van, Marx, C., Srejic, M., i Kalenscher, T. (2015). Rats prefer mutual rewards in a prosocial choice task, *Front Neurosci* 8, s. 1–9.
- Horner, V., Carter, J. D., Suchak, M., i Waal, F. B. M. De. (2011). Spontaneous prosocial choice by chimpanzees, *Proc Natl Acad Sci* 108(33), s. 13847-13851.
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens – olfactory tubercle complex, *Brain Research Reviews* 6, s. 27-78.
- Jastrzębska, K. (2017). Genetyczne zaburzenie działania układu nagrody prowadzi do rozwoju zachowań podobnych do objawów depresji w modelu zwierzęcym. Praca doktorska IF PAN.
- Johnson, S. W. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience* 12(2), s. 483-488.
- Johnson, Z. V. & Young, L. J. (2015). Neurobiological mechanisms of social attachment and pair bonding. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 3, 38–44.
- Kawamichi, H., Sugawara, S. K., Hamano, Y. H. i Makita, K. (2016). Increased frequency of social interaction is associated with enjoyment enhancement and reward system activation. *Nature Publishing Group* 6, s 1–11.
- Kravitz, A. V., Tye, L. D., Kreitzer, A. C., Francisco, S., & Francisco, S. (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15(6), s. 816–818.
- Kupchik, Y. M., Brown, R. M., Heinsbroek, J. A., Lobo, M. K., Schwartz, D. J., i Kalivas, P. W. (2015). Coding the direct / indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nature Neuroscience* 18(9), s. 1230-2.
- Laurent, V., Leung, B., Maidment, N. i Balleine, B. W. (2012).  $\mu$ - and  $\delta$  -opioid-related processes in the accumbens core and shell differentially mediate the influence of reward-guided and stimulus-guided decisions on choice. *The Journal of Neuroscience* 32(5), s. 1875–1883.
- Loseth, G. E., Ellingsen, D. i Leknes, S. (2014). State-dependent  $\mu$  -opioid modulation of social motivation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8, s. 1–15.
- Macpherson, T., Morita, M. i Hikida, T. (2014). Striatal direct and indirect pathways control decision-making behavior. *Frontiers in Psychology* 5, s. 1–7.
- Margolis, E. B., Hjelmstad, G. O., Bonci, A. i Fields, H. L. (2003).  $\kappa$  -opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience* 23(31), s. 9981–9986.
- Margolis, E. B., Lock, H., Chefer, V. I., Shippenberg, T. S., Hjelmstad, G. O. i Fields, H. L. (2006).  $\kappa$  opioids selectively control dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci* 103(8), s. 2938–2942.
- McLaughlin, J. P., Li, S., Valdez, J., Chavkin, T. A. i Chavkin, C. (2006). Social defeat stress-

- induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system. *Neuropsychopharmacology* 31, s. 1241–1248.
- Merrer, J. L. E., Becker, J. A. ., Befort, K. i Kieffer, B. . (2009). Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 89, s. 1379–1412.
- Moles, A., Kieffer, B. L. i Amato, F. R. D. (2004). Deficit in attachment behavior in mice lacking the  $\mu$ -opioid receptor gene, *Science* 304, s. 1983–1986.
- Normansell, L. i Panksepp, J. (1990). Effects of morphine and naloxone on play-rewarded spatial discrimination in juvenile rats. *Developmental Psychobiology* 23, s. 75–83.
- Novak, M., Halbout, B., Connor, E. C. O., Parkitna, J. R., Su, T., Chai, M., ... Engblom, D. (2010). Incentive learning underlying cocaine-seeking requires mglur5 receptors located on dopamine d1 receptor-expressing neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(36), s. 11973–11982.
- Nummenmaa, L., Tuominen, L., Dunbar, R., Hirvonen, J., Manninen, S., Arponen, E., ... Sams, M. (2016). NeuroImage Social touch modulates endogenous  $\mu$ -opioid system activity in humans. *NeuroImage*, 138, s. 242–247.
- Oddi, D., Crusio, W. E., Amato, F. R. D. i Pietropaolo, S. (2013). Monogenic mouse models of social dysfunction: Implications for autism. *Behavioural Brain Research*, s. 1–10.
- Oude Ophuis, R.J.A., Boender, A.J., van Rozen, A.J., Adan, R.A.H., 2014. Cannabinoid, melanocortin and opioid receptor expression on DRD1 and DRD2 subpopulations in rat striatum. *Front Neuroanat* 8.
- Panksepp J, Herman B, Conner R, Bishop P, Scott JP (1978). The biology of social attachments: opiates alleviate separation distress. *Biol Psychiatry* 13(5), s. 607-618.
- Panksepp, J., Nelson, E., i Siviy, S. (1994). Brain opioids and mother-infant social motivation, *Acta Paediatr Suppl* 397(4), s. 40–46.
- Peciña, S. (2008). Physiology & Behavior Opioid reward “liking” and “wanting” in the nucleus accumbens. *Physiology & Behavior* 94, s. 675–680.
- Pellissier, L. P., Gandia, J., Laboute, T., Becker, J. A. J. i Le Merrer, J. (2017). Mu opioid receptor , social behaviour and autism spectrum disorder : reward matters Social reward and social pain : overlapping neurobiological substrates. *British journal of Pharmacology* 175(14), s. 2750-2769.
- Radhakishun, F. S., van Ree, J. M., i Westerink, B. H. . (1988). Scheduled eating increases dopamine release in the nucleus accumbens of food-deprived rats as assessed with on-line brain dialysis. *Neuroscience Letters* 85, s. 351–356.
- Ruff, C. C., i Fehr, E. (2014). The neurobiology of rewards and values in social decision making. *Nature Publishing Group*, 15(8), s. 549–562.
- Russo, S. J., i Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews. Neuroscience* 14(9), s. 609–625.
- Rutte, C. i Taborsky, M. (2008). The influence of social experience on cooperative behaviour of rats ( *Rattus norvegicus* ): direct vs generalised reciprocity. *Behav Ecol Sociobiol* 62, s. 499–505.
- Schultz, W, P Dayan i PR Montague (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science* 275.5306, s. 1593-1599.

- Schultz, W. (2013). Updating dopamine reward signals. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(2), s. 229–238.
- Schultz, W. (2015). Neuronal reward and decision signals: from theories to data. *Physiol Rev* 95, s. 853–951.
- Sikora, M., Tokarski, K., Bobula, B., Zajdel, J., Jastrze, K., Zygmunt, M., ... Parkitna, J. R. (2016). NMDA receptors on dopaminergic neurons are essential for drug-induced conditioned place. *eNeuro* 9, 3(3) e0084-15.2016.
- Spanagel, R., Herz, A., i Shippenberg, T. S. (1990). The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *Journal of Neurochemistry* 55(5), s. 1734-1740.
- Stein, E. A. (1993). Ventral tegmental self-stimulation selectively induces opioid peptide release in rat CNS. *SYNAPSE* 13, s. 63-7373.
- Steiner, H. i Gerfen, C. R. (1998). Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Experimental Brain Research* 123.1-2, s. 60-76.
- Trezza, V., Damsteegt, R., Achterberg, E. J. M., i Vanderschuren, L. J. M. J. (2011). Nucleus Accumbens  $\mu$  -Opioid Receptors Mediate Social Reward. *J Neurosci* 3, s. 6362–6370.
- Vanderschuren, L. J. M. J., Stein, E. A., Wiegant, V. M. i Van Ree, J. M. (1995). Social isolation and social interaction alter regional brain opioid receptor binding in rats. *European Neuropsychopharmacology* 5, s. 119-127.
- Way, B. M., Taylor, S. E. i Eisenberger, N. I. (2009). Variation in the  $\mu$  -opioid receptor gene ( OPRM1 ) is associated with dispositional and neural sensitivity to social rejection. *Proc Natl Acad Sci* 106(35), s. 15079–15084.
- Wietrzych, M., Meziane, H., Sutter, A., Ghyselinck, N., Chapman, P. F., Chambon, P., ... Gae, I. De. (2005). Working memory deficits in retinoid X receptor  $\gamma$  -deficient mice. *Learn Mem.* 12(3), s. 318–326.
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews. Neuroscience* 5(6), s. 483-494.
- Woolley, J. D., Lee, B. S. i Fields, H. L. (2006). Nucleus accumbens opioids regulate flavor-based preferences in food consumption. *Neuroscience* 143, 309–317.
- Yang, M., Silverman, J. L., i Crawley, J. N. (2016). Automated three-chambered social approach task for mice. *Curr Protoc Neurosci*; CHAPTER 8: Unit–8.26.



## Wykaz skrótów

**Amy** jądro migdałowe

**cAMP** cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan

**CPu** prążkowie,

**Crx** kora mózgowa

**CS-** bodziec warunkowy niezapowiadający nagrodę

**CS+** bodziec warunkowy zapowiadający nagrodę

**DAMGO** ([D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]enkephalin) selektywny agonista receptora opioidowego  $\mu$

**DP** grzbietowa kora konarowa

**DPDPE** ([D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]enkephalin) selektywny agonista receptora opioidowego  $\delta$

**GFP** białko zielonej fluorescencji

**Hip** hipokamp

**IF PAN** Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk

**MGP** przyśrodkowa gałka błada

**NAc** jądro półleżące

**pEnk** proenkefalina

**PFC** kora przedczołowa

**POMC** proopiomelanokortyna

**PrL** kora prelimbiczna

**SC** wzgórek górny

**SNpc** część zbita istoty czarnej

**SNpr** część siateczkowata istoty czarnej

**Tg** myszy modyfikowane genetycznie wyrażające transgen

**Tu** guzek węchowy

**VP** brzuszna gałka błada

**VTA** brzuszne pole nakrywki

**WT** myszy kontrolne bez ekspresji transgeny