



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Biologii  
Neurobiologia

**Rola receptora  $\mu$ -opiodowego w nagradzających efektach  
interakcji społecznych w okresie dojrzewania u myszy**

Marta Klimczak

Praca magisterska wykonana pod opieką  
dr hab. Jana Rodrigueza Parkitny  
w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej  
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Kraków 2021

Składam szczególne podziękowania dla promotora mojej pracy, dr hab. Jana Rodrigueza Parkitny, za zaangażowanie i poświęcony czas przy realizacji niniejszej pracy, służeniem dobrym słowem i radą, okazaną wyrozumiałość i życzliwość, jak również za inspirację do podejmowania naukowych wyzwań i zgłębiania wiedzy.

Pragnę również podziękować dr Zofii Hardej, opiekunce projektu, za prowadzenie i współpracę przy eksperymentalnej części pracy oraz dzielenie się nieocenionym doświadczeniem w pracy badawczej.

Dziękuję również współpracownikom z Zakładu NF MOL, w szczególności: mgr Łukaszowi Szumcowi, mgr Klaudii Misiołek, lic. Magdalenie Chrószcz za pomoc przy eksperymentach, dodawanie otuchy i dzielenie się optymizmem.

Część badawcza pracy była dofinansowana ze środków z projektu grantowego OPUS 2019/35/B/NZ7/03477 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.

## 1. Spis treści

1. Spis treści.....	3
2. Wykaz skrótów .....	4
3. Streszczenie .....	5
4. Abstract.....	6
5. Wstęp .....	7
6. Cel pracy .....	14
7. Materiały i metody.....	14
7.1 Zwierzęta .....	14
7.2 Odczynniki.....	15
7.3 Schemat doświadczenia .....	15
7.4 Analiza statystyczna .....	17
8. Wyniki .....	18
9. Dyskusja i wnioski.....	24
10. Spis rycin .....	27
11. Bibliografia .....	28

## 2. Wykaz skrótów

**ASD** – spektrum zaburzeń autystycznych (ang. *Autism Spectrum Disorder*)

**CPP** – warunkowana preferencja miejsca (ang. *Conditioned Place Preference*)

**CPA** – warunkowana awersja miejsca (ang. *Conditioned Place Aversion*)

**CTAP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>)** – sztuczny selektywny antagonistą  $\mu$  opioidowy

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

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

**DRN** – grzbietowe jądra szwu (ang. *dorsal raphe nucleus*)

**GDP** – guanozynodifosforan (ang. *Guanosine-5'-diphosphate*)

**GTP** – guanozynotrifosforan (ang. *Guanosine-5'-triphosphate*)

**GIRK** – wewnątrzprostownicze kanały potasowe sprzężone z białkiem G (ang. *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel*)

**NAc** – jądro półleżące (ang. *nucleus accumbens*)

**PND** – dzień po urodzeniu (ang. *postnatal day*)

**PSD** – zagęszczenie postsynaptyczne (ang. *postsynaptic density*)

**sCPP** – warunkowana preferencja kontekstu społecznego (ang. *social Conditioned Place Preference*)

**VTA** – brzuszne pole nakrywki (ang. *ventral tegmental area*)

### 3. Streszczenie

Okres dojrzewania jest związany z szeregiem złożonych zmian w zachowaniu, między innymi obniżeniem zaangażowania w relacje z rodziną. Głównym założeniem mojej pracy magisterskiej było zbadanie nagradzających efektów interakcji między rodzeństwem podczas okresu dojrzewania u myszy (33 – 42 dzień po urodzeniu). Drugim celem przeprowadzanych doświadczeń było wskazanie roli receptora  $\mu$  opioidowego w kontrolowaniu nagrody społecznej podczas okresu dojrzewania. Aby śledzić zmiany w nagradzających właściwościach oddziaływań społecznych u myszy szczepu C57BL/6J, posłużono się testem warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (sCPP). Wyniki eksperymentów wskazują, że interakcje społeczne z rodzeństwem są nagradzające dla myszy we wczesnej i późnej fazie dojrzewania, ale nie w środkowej (36-39 dzień po urodzeniu). Ponadto, podanie selektywnego antagonisty receptora opioidowego – cyprodime – odwróciło obniżenie zainteresowania kontaktami z rodziną u myszy w środkowym okresie dojrzewania. Powyższa obserwacja może świadczyć o istnieniu okresu krytycznego dla rozwoju zachowań społecznych między 36 a 39 dniem po urodzeniu u myszy. Natomiast wpływ podania cyprodime wskazuje na szczególną rolę receptorów  $\mu$  opioidowych w regulowaniu reorientacji społecznej, czyli zmiany zainteresowania kontaktami z rodziną na rzecz relacji z rówieśnikami. Przedstawione doświadczenia mogą stanowić podstawę dla przyszłych badań nad określeniem w jakim stopniu i przez jakie receptory układ opioidowy moduluje interakcje społeczne oraz nad efektem leków na nagrodę społeczną.

Słowa kluczowe: układ nagrody, endogenne układy opioidowe, nagroda społeczna, okres dojrzewania, reorientacja społeczna

#### **4. Abstract**

Adolescence is associated with a complex pattern of behavioural changes including decreased interest in bonding with family members. The main focus of my work was to investigate the rewarding effects of interactions among siblings across adolescence in male mice (postnatal days 33-42). The second goal was to test the role of the  $\mu$ -opioid system in modulating social reward in adolescence. To study changes in rewarding value of social interactions in C57BL/6J male mice a social conditioned place preference procedure (SCPP) was employed. The results showed that social interactions with siblings are rewarding for mice in their early and late adolescence, but not mid-adolescence (PND 36-39). Furthermore, the administration of the  $\mu$ -opioid receptor antagonist – cyprodime – reversed the decline in rewarding effects of social interactions with siblings in mid-adolescent individuals. This observation may indicate the existence of a critical period for social interactions development between postnatal days 36 and 39. It can be also conceivably hypothesized that  $\mu$ -opioid receptors regulate social re-orientation from family to peers during adolescence. Thus, the research is also a good starting point to study the effects of other drugs on social reward and to determine to what extent and through which receptors the opioid system modulates social interactions.

**Key words:** reward system, endogenous opioid system, social reward, adolescence, social re-orientation

## 5. Wstęp

### 5.1 Charakterystyka okresu dojrzewania.

Na okres dojrzewania składają się liczne przemiany rozwojowe i procesy uczenia się będące podstawą do przejścia z wieku dziecięcego w dorosłość. Przemiana ta zaczyna się wraz z rozpoczęciem etapu dojrzewania płciowego, które u człowieka występuje zazwyczaj w wieku 10 lat u dziewcząt i 12 lat u chłopców. U podstaw dojrzewania płciowego leżą procesy zachodzące w mózgu, które stymulują zmiany metaboliczne, szybkie wzrastanie, rozwijanie narządów płciowych oraz drugorzędowych cech płciowych (Blakemore i in., 2010). Z kolei hormony wydzielane przez narządy gruczołowe (gonady, nadnercza) oddziałują na struktury w mózgu i regulują zachowania kognitywne, emocjonalne i motywacyjne.

Zmiany zachodzące w układzie nerwowym podczas okresu dojrzewania są ściśle związane ze zmianami w zachowaniu, które obejmują między innymi zwiększoną motywację do poszukiwania nowości i wrażeń oraz zmianę orientacji społecznej. Reorientacja społeczna charakteryzuje się zmniejszonym zainteresowaniem w relacje rodzinne, a zwiększoną motywacją do zawierania relacji z rówieśnikami (Nelson i in., 2005). U człowieka przywiązanie emocjonalne do rodziców spada wraz z przejściem od wczesnej fazy dojrzewania (9-10 lat) do środkowej, na rzecz interakcji z rówieśnikami tej samej płci, aż do późnego etapu dojrzewania (15-16 lat), w którym wzrasta zainteresowanie osobami płci przeciwnej (Lieberman i in., 1999). Zjawisku reorientacji społecznej towarzyszy zmiana w nagradzających właściwościach bodźców społecznych, co motywuje osobnika do podjęcia określonych interakcji. Przykładem jest nabywanie przez nastolatków zachowań społecznych pożądaných w grupie rówieśników w celu zdobycia akceptacji (Morningstar i in., 2019). Zmiany w wartościowaniu bodźców społecznych i uczenie asocjacyjne wskazują, że neuronalnym podłożem zjawiska reorientacji społecznej są mechanizmy przetwarzające informacje o nagrodzie. Nabycie odpowiednich zachowań społecznych jest kluczowe dla prawidłowego rozwoju osobnika i oddziałuje na jego zdolności adaptacyjne w dorosłym życiu (Crone & Dahl, 2012). Natomiast poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany w odpowiedziach na bodźce społeczne może nie tylko pomóc w zrozumieniu stanów emocjonalnych towarzyszących nastolatkom, ale także w opracowaniu terapii zaburzeń społecznych.

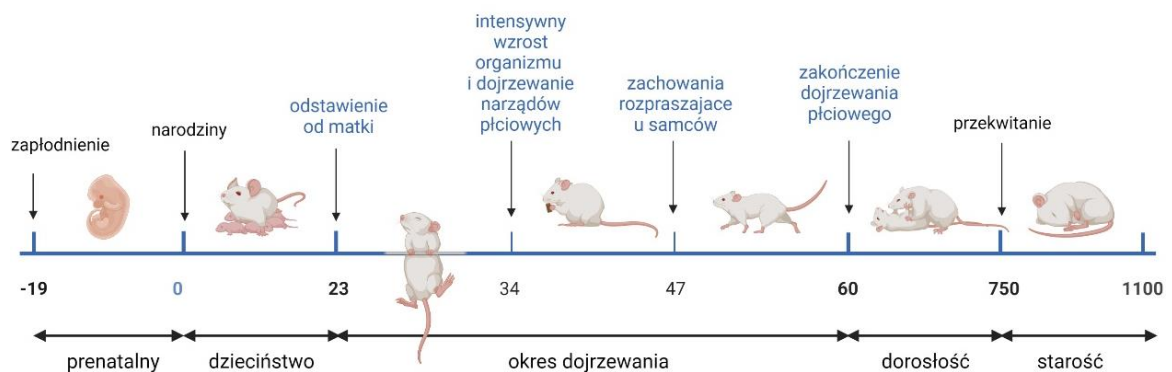
### Okres dojrzewania u myszy (*Mus musculus*).

Myszy wydają się dobrym organizmem modelowym nie tylko ze względu na wysokie podobieństwo w sekwencjach genetycznych człowieka (99% w przypadku sekwencji genów ortologicznych), ale również na podobny przebieg cyklu życiowego. Kolejne lata życia myszy i człowieka mogą być porównywane w obrębie tych samych faz rozwojowych, dla przykładu: w okresie dojrzewania jeden rok człowieka będzie wynosić około 3,65 dni myszy, a w okresie dorosłości – 2,60 dni (Dutta & Sengupta, 2016).

Wyróżniamy pięć głównych etapów rozwojowych u myszy: prenatalny, wczesnego dzieciństwa, dojrzewania, dorosłości i późnej starości. Etapy dojrzewania można podzielić na trzy okresy: wczesny, środkowy i późny. Za rozpoczęcie wczesnej fazy

dojrzwania uznaje się dzień odstawienia osobnika od matki, które następuje zazwyczaj w 23 dniu po urodzeniu, a trwa do około 34 dnia życia. Jest to faza intensywnego wzrostu organizmu (wydzielanie hormonu wzrostu osiąga swoje maksimum około 30 dnia postnatalnego) i rozwoju narządów płciowych – u samców rozpoczyna się proces spermatogenezy (Krishnamurthy i in., 2001), a u samic dochodzi do otwarcia pochwy. W tym okresie myszy wykazują się wzmożoną eksploracją środowiska, zmniejszonym poziomem lęku i niską reaktywnością na stres, co sprzyja podejmowaniu ryzykownych aktywności (Williams & Scott, 1954; Adriani & Laviola, 2004). Tego typu zachowania utrzymują się również w środkowym etapie dojrzwania między 35 a 47 dniem postnatalnym myszy. W tej fazie zwierzęta osiągają dojrzałość płciową (Jean-Faucher i in., 1978), co charakteryzuje się między innymi zwiększonym wydzielaniem steroidowych hormonów płciowych oraz nabywaniem wrażliwości na feromony. Doświadczone w tym etapie przeżycia stresowe silniej oddziałują na zwierzę, skutkując zwiększonym poziomem lęku i obniżonym wzrostem, niż gdyby występowały one w późniejszym okresie (Brust i in., 2015). Wejście w fazę późnego dojrzwania w około 48 dniu życia charakteryzuje się próbami oddzielenia się od rodziny (z ang. „*disperse*” - rozpraszać się) głównie przez samce (Pocock i in., 2005). Przejawiają się również pierwsze formy zachowań agresywnych, których intensywność zwiększa się wraz z wiekiem (Tsuda i in., 2011). Schemat przebiegu kolejnych faz rozwoju u myszy przedstawiono na Ryc.1.

## Cykl życia myszy



**Ryc.1. Cykl życia myszy.** Opracowanie własne za pomocą narzędzia *biorender.com*. Długość trwania kolejnych etapów rozwoju jest przybliżona ze względu na występowanie różnic osobniczych (Dutta & Sengupta, 2016).

### Zmiany w zachowaniu społecznym podczas rozwoju

Okres krytyczny dla uczenia się interakcji społecznych, jak wiele innych, występuje podczas okresu dojrzewania (Crone & Dahl, 2012). Istotnym zjawiskiem w kształtowaniu zachowań społecznych jest reorientacja społeczna, która polega na obniżeniu zainteresowania relacjami z rodziną, a zwiększoną motywacją do angażowania się w relacje z rówieśnikami i osobnikami drugiej płci (Nelson i in., 2005). Jest to również



związane z wysoką wrażliwością na interakcje społeczne w okresie dojrzewania. W procesie reorientacji sygnały społeczne występują w nowym kontekście, co wymaga zaangażowania innych procesów kognitywnych do ich przetwarzania i kształtowania na nie odpowiednich reakcji (De Lorme i in., 2013). Zaburzenia w podejmowaniu odpowiednich zachowań społecznych w określonych etapach rozwoju mają istotne znaczenie w odnajdywaniu się w rolach społecznych w dorosłym życiu.

U myszy pierwsze kontakty społeczne obserwowane są już po narodzinach i opierają się na zachowaniach opiekuńczych z matką w gnieździe. We wczesnym dzieciństwie myszy mają tendencję do przebywania w bliskim kontakcie z matką i pozostałymi osobnikami oraz obserwowane jest wzajemne oporządzanie się. Po odstawieniu od matki interakcje społeczne z rówieśnikami stają się intensywniejsze (Williams & Scott, 1954). W środkowym etapie dojrzewania zwierzęta zaczynają interesować się podejmowaniem relacji z osobnikami spoza rodziny. Do inicjacji tego typu zachowań konieczne jest uruchomienie procesów motywacyjnych, które są ściśle związane ze zmianami w podejmowaniu zachowań społecznych podczas różnych etapów życia osobnika (Nelson i in., 2016). Wraz z rozwojem osobnika, inne zachowania społeczne mają charakter nagradzający. Dla przykładu, wraz z obniżeniem reakcji stresowej na separację od matki, wzrasta występowanie zabaw w grupie młodocianych osobników (Hennessy i in., 1995). Podobnie dzieje się w późniejszym etapie dojrzewania, gdy zaangażowanie się w pierwsze interakcje z osobnikami przeciwnej płci obniża zainteresowanie kontaktami z rówieśnikami (Collins i in., 2009). Świadczy to o zmianie wartości nagradzających jednych zachowań kosztem drugich, co w efekcie przyczynia się do prawidłowego rozwoju i osiągnięciu dojrzałości przez osobnika. Szereg badań wskazuje, że kluczową rolę w modulacji przemian społecznych zachodzących podczas okresu dojrzewania odgrywają hormony płciowe oraz oksytocyna z wazopresyną (Insel & Winslow, 1991; Bell, 2018). Natomiast za zmiany w postrzeganiu nagradzających cech bodźców społecznych mogą być odpowiedzialne mechanizmy neuronalne kluczowe dla procesów motywacyjnych.

## **5.2 Zachowania społeczne o charakterze nagradzającym**

Zachowania społeczne obejmują każde kontakty, które oddziałują lub są w zasięgu oddziaływania innych osobników tego samego gatunku. Zawieranie relacji zarówno z rówieśnikami, rodzicami, rodzeństwem czy partnerami seksualnymi jest kluczowe z punktu widzenia reprodukcji i przeżycia osobnika. Istotnym jest, by w badaniach nad zachowaniami społecznymi wziąć pod uwagę czynniki takie jak gatunek zwierzęcia, środowisko naturalne, wiek, płeć i kontekst sytuacyjny. Na złożoność zachowań społecznych składa się również różnorodność regulujących je mechanizmów nerwowych i hormonalnych (Chen & Hong, 2018).

Interakcje społeczne u ssaków takie jak tworzenie więzi partnerskich, zachowania seksualne czy relacje między matką a potomstwem bezpośrednio oddziałują na sukces reprodukcyjny i zdolności adaptacyjne osobnika (Silk, 2007). Szczególnym przypadkiem są zachowania społeczne, które nie prowadzą bezpośrednio do przedłużenia gatunku, a które mają odpowiednio wysoką wartość nagradzającą, by motywować osobnika do ich

powtarzania. Do tych zachowań zaliczamy interakcje z rówieśnikami okazywane między innymi przez gromadzenie się w grupy (Panksepp & Lahvis, 2007). Zabawy wśród młodocianych pozytywnie oddziałują na fizyczną i emocjonalną wrażliwość na niespodziewane wydarzenia i sygnały od innych osobników, co wpływa na radzenie sobie w różnych sytuacjach społecznych w dorosłym życiu (Lahvis i in., 2015). Również podejmowanie zachowań rozpraszających w pewnym wieku rozwojowym ma korzyści adaptacyjne dla usamodzielnionego osobnika – lepszą pozycję w rywalizacji o partnera, dostęp do lepszych zasobów, unikanie chowu wsobnego (Dobson, 1979).

Przetwarzanie informacji o nagrodzie jest złożonym procesem regulowanym na różnych podłożach psychologicznych i biologicznych, które zazwyczaj składają się na zachowania hedonistyczne (lubienie), motywacyjne (chcenie) i kognitywne (uczenie się) (Berridge i in., 2009). Mimo, że nagrody społeczne są istotne w życiu człowieka i zwierząt, neuronalne podłoże motywacji społecznych jest mniej zbadane niż innych nagród naturalnych. Bodźce nagradzające w oddziaływaniach społecznych są złożone i silnie zależne od kontekstu, a nagrodą może być nie sam bodziec, ale wywołany nim stan afektywny. Transmisja dopaminowa prowadząca z neuronów brzuszego pola nakrywki (VTA) do jądra półleżącego (NAc) jest kluczowa dla przetwarzania informacji o nagradzających cechach bodźców. Zarówno nagrody naturalne jak i substancje uzależniające zwiększają ilość dopaminy w jądrze półleżącym (Di Chiara & Imperato, 1988; Berridge & Kringelbach, 2008; Wise & Koob, 2014). Dopamina jest kluczowa do wzbudzania zachowań motywacyjnych, ukierunkowanych na zdobycie bodźców nagradzających lub unikanie bodźców awersyjnych (Wise, 2004; Salamone & Correa, 2012).

### **Rola dopaminy w nagrodzie społecznej**

W tej pracy omówienie roli dopaminy w procesach kierujących zachowaniem zostanie ograniczone do nagrody społecznej. Oddziaływania społeczne są ważną częścią życia osobnika, decydując o jego sukcesie reprodukcyjnym i przetrwaniu gatunku, a do ich przejawiania konieczny jest udział regionów mózgu zaangażowanych w zachowanie motywacyjne (Kelley & Berridge, 2002). Wykazano, że wzrost wydzielanej dopaminy w NAc zwiększa podejmowanie zachowań opiekuńczych i zabaw społecznych (Manduca i in., 2021; Pereira & Morrell, 2011). Z badań z użyciem funkcjonalnego rezonansu magnetycznego u ludzi wynika, że w odpowiedzi na bodźce społeczne o charakterze nagradzającym aktywowane są regiony prążkowiego (Bartels & Zeki, 2000; Rademacher i in., 2010). Również neurony dopaminowe grzbietowych jąder szwu (ang. *dorsal raphe nucleus*, DRN) stają się aktywne, gdy zwierzę szuka kontaktu społecznego, a ich optogenetyczne hamowanie zmniejsza ten efekt (Matthews i in., 2016). Badanie to wyprowadziło hipotezę, że dopaminowe neurony grzbietowych jąder szwu są pobudzane w warunkach izolacji społecznej, motywując w ten sposób zwierzę do eksploracji społecznej. Jednakże do występowania zachowań społecznych transmisja dopaminowa nie jest wystarczająca, a za kluczowe w tych procesach neuroprzekaźniki wskazuje się endogenne peptydy opioidowe (J. Panksepp i in., 1980; Trezza i in., 2011), oksytocynę i serotoninę (Dölen i in., 2013).

Nieprawidłowości w transmisji dopaminowej występujące na szlaku mezolimbicznym mogą prowadzić do zmian w ekspresji nagrody społecznej, co może mieć związek z

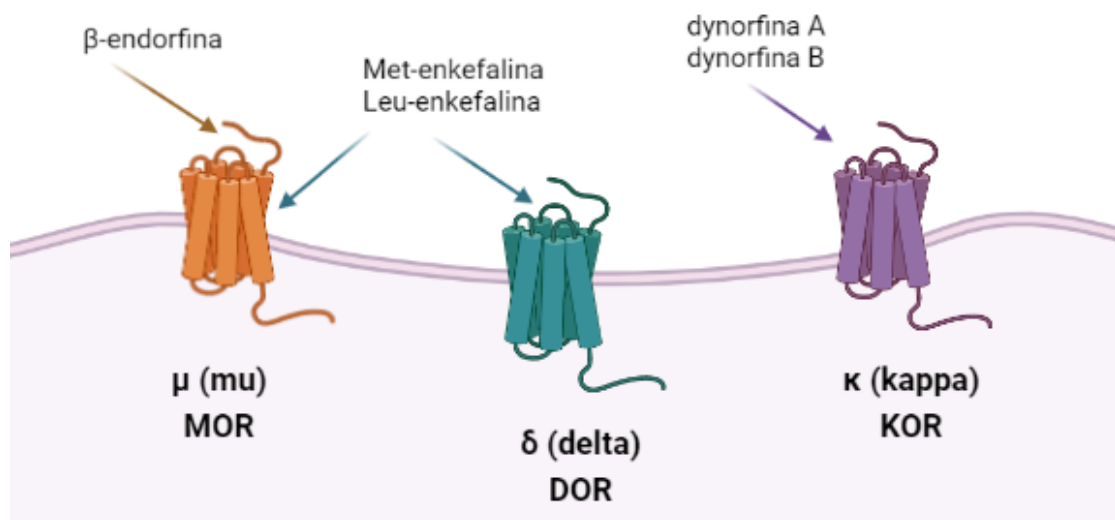
zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD). Kluczowy mechanizm powstawania zaburzeń ze spektrum autyzmu ze względu na jego kompleksowość nie został jeszcze dokładnie określony. Jednymi z proponowanych czynników istotnych w ASD jest Neuroligina 3, białko adhezji synaptycznej, oraz gen *SHANK3*, który koduje białko rusztowania występujące w strefie gęstości postsynaptycznej (PSD) w synapsach glutamatergicznych w VTA. Zaobserwowano, że wrodzona ekspresja i aktywność Neuroliginy 3 jest konieczna dla wywołania warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (sCPP) u myszy (Bariselli, Hörnberg, i in., 2018). Natomiast inne badania wykazały, że myszy z pozbawionym jednym allelem genu *SHANK3* również wykazywały się anormalnym warunkowaniem na kontekst z nowo poznanym osobnikiem (Bariselli, Contestabile, i in., 2018). Niemniej, odkrycia te mogą świadczyć, że różne zaburzenia związane z ASD mogą prowadzić do podobnych nieprawidłowości w zachowaniu społecznym, a ich dokładniejsze poznanie pozwoli na opracowanie odpowiednich terapii.

### **Rola endogenego układu opioidowego w nagrodzie społecznej**

W układzie opioidowym ssaków wyróżniamy trzy główne typy receptorów -  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  – aktywowanych przez endogenne peptydy opioidowe powstające z trzech białek prekursorowych – proopiomelanokortyny, proenkefaliny i prodynorfiny. Schemat przedstawiający typy receptorów opioidowych wraz z ich klasycznymi endogennymi ligandami -  $\beta$ -endorfiną, enkefalinami i dynorfinami - został przedstawiony na Ryc.2. Receptory te należą do rodziny receptorów metabotropowych, sprzężonych z białkami  $G_{i/o}$ , o działaniu hamującym. Po związaniu liganda dochodzi do wymiany GDP na GTP oraz rozpadu kompleksu podjednostek  $G_\alpha$  i  $G_{\beta\gamma}$ , w wyniku czego dochodzi do zahamowania cykazy adenylowej oraz kanałów wapniowych bramkowanych napięciem oraz do aktywacji wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych (GIRK) i fosfolipazy C (Waldhoer i in., 2004).

Mechanizm neuronalny nagradzającego działania opioidów został szerzej zbadany w latach 80. XX wieku (Wise & Bozarth, 1982). Szczury, które otrzymywały podanie nioselektywnych agonistów receptorów opioidowych (morfiny, fentanylu) wprost do brzuszego pola nakrywki, chętniej naciskały na dźwignię w celu ich ponownego otrzymania. W kolejnym doświadczeniu podawano selektywnych agonistów receptorów  $\mu$  (DAMGO) i  $\delta$  (DPDPE) opioidowych do brzuszego pola nakrywki szczurów, co skutkowało reakcją samopodawania przez naciskanie na dźwignię. Co ciekawe, do wywołania takiego efektu potrzebna była stukrotnie większa dawka DPDPE niż DAMGO, co świadczy o większym znaczeniu receptora  $\mu$  opioidowego w mechanizmach wzmacniających na poziomie VTA (Devine & Wise, 1994). Podania selektywnych agonistów receptorów  $\mu$  i  $\delta$  opioidowych wywołały również ekspresję warunkowanej preferencji miejsca (CPP). Najszerzej zbadane zostało działanie morfiny, nioselektywnego agonisty receptorów  $\mu$  opioidowych, która indukuje warunkowaną preferencję miejsca już w małych dawkach (Tzschentke, 2007). Podobne działanie wykazują syntetyczni nioselektywni agonisty receptorów  $\mu$  opioidowych (oksykodon, fentanyl, tramadol). Poznanym mechanizmem pobudzającym wydzielanie dopaminy w VTA jest hamowanie GABAergicznym interneuronów przez aktywowane receptory  $\mu$  opioidowe (Johnson & North, 1992). Z drugiej strony, odwrotni agonisty receptorów opioidowych prowadzą do zmniejszenia ich wyjściowej aktywności, natomiast neutralni

antagoniści nie mają takiego potencjału (Wang i in., 2001). Podania antagonistów receptorów opioidowych w małych dawkach nie wywołują żadnego efektu na preferencję miejsca, natomiast w dużych dawkach wywołują warunkowaną awersję miejsca (CPA). Ponadto, podanie naloksonu lub naltreksonu, odwrotnych agonistów receptorów opioidowych, odwraca powodowany przez morfinę efekt CPP (Shoblock & Maidment, 2006), a podanie neutralnych antagonistów nie wpływa na ekspresję CPP (Raehal i in., 2005).



**Ryc.2. Trzy główne typy receptorów opioidowych i ich główne endogenne ligandy w ośrodkowym układzie nerwowym.**

Opracowanie własne za pomocą narzędzia *biorender.com*

Jedna z pierwszych hipotez o roli endogennych opioidów w nagrodzie społecznej została sformułowana w 1978 roku przez Pankseppa (J. Panksepp i in., 1978). Według niej dystres związany z izolacją społeczną i poszukiwanie interakcji jest spowodowany niewystarczającym poziomem endogennych opioidów. Kontakt społeczny następnie może złagodzić negatywny efekt izolacji społecznej przez wywołanie uwolnienia opioidów. Kluczową rolę w przetwarzaniu informacji o nagrodzie społecznej przypisuje się szczególnie receptorowi opioidowemu typu  $\mu$ . Kolejne badania wskazały na motywacyjne znaczenie układu opioidowego w zabawach społecznych, podczas których podanie nieselektywnego agonisty receptora  $\mu$  opioidowego (morfiny) stymulowało takie zachowania, a podanie nieselektywnego antagonisty (naloksonu) – redukowało (Normansell & Panksepp, 1990). Również podanie selektywnego antagonisty receptora  $\mu$  opioidowego (CTAP) wprost do jądra półleżącego mózgu uniemożliwiło ekspresję warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (Trezza i in., 2011) oraz obniżyło preferencję społecznej nowości, co wspiera hipotezę o roli receptora  $\mu$  opioidowego w nadawaniu nagradzających właściwości interakcjom z osobnikiem nieznanym (Smith i in., 2018). Ponadto, izolacja społeczna w okresie występowania zabaw społecznych u

szczurów (po odstawieniu od matki) nie tylko zmniejszyła zachowania społeczne w dorosłości, ale również podwyższyła aktywność receptorów  $\mu$  i  $\kappa$  opioidowych w regionach mózgu istotnych w przetwarzaniu nagrody społecznej (Berg i in., 1999). Podanie morfiny odwróciło efekt izolacji społecznej, wpływając zarówno na podjęcie interakcji społecznych, jak i na obniżenie aktywności receptorów opioidowych, ale jedynie typu  $\mu$ . Odkrycie to było zgodne z wcześniejszymi badaniami, w których długotrwała izolacja społeczna (rozpoczęta tuż po odstawieniu od matki, trwająca 45 dni) spowodowała mniejsze zagęszczenie w liczbie receptorów opioidowych w mózgu szczurów w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt hodowanych w grupach (Schenk i in., 1982). Badania te wskazują, że również środowisko społeczne ma wpływ na funkcjonowanie endogennego układu opioidowego. Dokładna lokalizacja receptorów opioidowych w mózgu również może determinować sposób ich działania w regulacji nagradzających zachowań społecznych (Resendez i in., 2013). Zablockowanie receptorów  $\mu$  opioidowych w grzbietowym prążkowie prowadziło do zmniejszenia tworzenia więzi i kształtowaniu preferencji względem partnera u nornika preriowego. Natomiast blokada tych samych receptorów w grzbietowo-przyśrodkowej części jądra półleżącego również hamowała preferencję względem partnera, ale nie miała wpływu na tworzenie par. Jest to zgodne z poprzednimi badaniami opisującymi receptory  $\mu$  opioidowe w grzbietowym prążkowie za kierowanie procesami motywacyjnymi, natomiast w grzbietowo-przyśrodkowej skorupie jądra półleżącego – za kierujące pozytywnymi zachowaniami hedonistycznymi (Peciña & Berridge, 2005).

Zmiany w transmisji opioidowej w regionach kluczowych dla układu nagrody mózgu mogą być istotne w zaburzeniach społecznych charakterystycznych dla takich chorób neuropsychiatrycznych jak schizofrenia, ASD, depresja czy zaburzenia osobowości. Ponadto, myszy z genetyczną delecją genu dla receptora  $\mu$  opioidowego (*Oprm1*<sup>-/-</sup>) wykazują się obniżonym zainteresowaniem dla kontaktów społecznych i są mniej narażone na stres wywołany izolacją społeczną (Pellissier i in., 2018). Z racji na prezentowany fenotyp, myszy *Oprm1*<sup>-/-</sup> zostały zaproponowane jako zwierzęcy model zaburzeń ze spektrum autyzmu (Becker i in., 2014). Stwierdzono także, że obecność polimorfizmu A118G w ludzkim genie *OPRM1* prowadzi do zwiększonej wrażliwości na odrzucenie społeczne i nieprawidłowości w zachowaniach społecznych (Carver i in., 2016).

Jednakże złożoność endogennego układu opioidowego i mnogość oddziaływań z innymi neuroprzekaznikami sprawia trudności w jednoznacznym wskazaniu roli receptorów opioidowych w nagradzających efektach interakcji społecznych. Z jednej strony udokumentowane jest negatywne działanie antagonistów receptorów  $\mu$  opioidowych na tworzenie więzi społecznych (J. Panksepp i in., 1978), z drugiej strony opisano wiele przykładów, w których chroniczne podawanie agonistów receptorów  $\mu$  opioidowych prowadzi do hamowania zachowań społecznych. Pacjenci przyjmujący stale niskie dawki leków opioidowych wykazują deficyty poznawczo-społeczne, trudności z rozpoznawaniem emocji i uczucie wykluczenia społecznego (McDonald i in., 2013). W innych badaniach podania agonistów  $\mu$  opioidowych w dużych dawkach zmniejszyły zachowania społeczne i seksualne, zabawy z rówieśnikami oraz zaburzały długotrwałą pamięć społeczną u zwierząt. Przypuszczalnym mechanizmem jest wytworzenie długotrwałej adaptacji na nadmierną stymulację receptorów opioidowych, w efekcie czego ilość produkowanych endogennych peptydów opioidowych jest mniejsza

(Pellissier i in., 2018). Do rozwiązania pozostają kwestie, jakie mechanizmy neuronalne leżą u podstaw zachowań społecznych regulowanych przez endogenne układy opioidowe i w jaki sposób kształtowane są przez kontekst sytuacyjny. Znalezienie odpowiedzi na pytanie o dokładną rolę receptorów opioidowych w kontaktach społecznych może pomóc w zrozumieniu dysfunkcji społecznych, takich jak zaburzenia ze spektrum autyzmu czy nieprawidłowości powstałych w wyniku przyjmowania substancji opioidowych.

## 6. Cel pracy

Celem niniejszej pracy dyplomowej jest przedstawienie zmian w motywacji społecznej podczas okresu dojrzewania u myszy oraz wskazanie neuronalnych mechanizmów odpowiedzialnych za nagradzające efekty interakcji społecznych ze znanymi osobnikami. Celem doświadczeń jest wykazanie, że endogenne układy opioidowe odpowiadają za nagradzające efekty oddziaływań społecznych u dorastających zwierząt. W pracy formułuje się hipotezę o znaczeniu receptora  $\mu$ -opioidowego w reorientacji społecznej podczas okresu dojrzewania.

## 7. Materiały i metody

### 7.1 Zwierzęta

Badania zostały przeprowadzone na myszach (gatunek mysz domowa, *Mus musculus L.*) szczepu C57BL/6J pochodzących z hodowli własnej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Doświadczenia zrealizowano na samcach myszy w wieku między 26 a 42 dniem po urodzeniu (ang. *postnatal day*, PND). Zwierzęta były pod stałą opieką weterynaryjną i posiadały nieograniczony dostęp do wody i pożywienia. Myszy przebywały w klatkach hodowlanych (dł. 325 mm  $\times$  szer. 170 mm) ze wzbogaconym środowiskiem po około 2-6 osobników na klatkę, w stałej temperaturze ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) oraz w cyklu dobowym 12/12 z fazą jasną w godzinach 7-19 i fazą ciemną w godzinach 19-7.

Wszystkie doświadczenia były wykonywane zgodnie z obowiązującymi przepisami w zakresie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz za zgodami o numerach 293/2020 oraz 32/2021 wydanymi przez II Lokalną Komisję Etyczną w Krakowie.

## 7.2 Odczynniki

Zwierzęta z grupy badanej godzinę przed post-testem otrzymały dootrzewnowo zastrzyk zawierający roztwór chlorowodoru cyprodime (1mg/kg, 5 $\mu$ l/g), TOCRIS, nr 2601. Roztwór był przyrządzany poprzez rozpuszczenie leku w fizjologicznym roztworze chlorku sodu (5mg leku/ 5ml soli fizjologicznej). W tym czasie zwierzętom z grup kontrolnych podawano w postaci zastrzyku dootrzewnowo roztwór fizjologiczny soli (Natrium Chloratum 0,9 %, Polpharma).

Cyprodime to wysoce selektywny antagonist receptorów  $\mu$  opioidowych (Lieberman i in., 1999; Schmidhammer i in., 1989), blokujący receptory  $\mu$  bez wywierania wpływu na receptory  $\delta$  i  $\kappa$  (wartości  $K_i$  to odpowiednio 5,4, 244,6 oraz 2187 nM dla  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  receptorów). Stosowany w badaniach cyprodime hamował efekty agonistów receptorów  $\mu$  opioidowych, na przykład znosił przeciwbólowe działanie morfiny (Robinson i in., 2017) czy analgezję wywołaną podaniem PZM21 (Kudła i in., 2019).

## 7.3 Schemat doświadczenia

Test warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (ang. *social conditioned place preference*, sCPP) został przeprowadzony w oparciu o metodę opisaną przez Pankseppa (J. B. Panksepp & Lahvis, 2007) oraz Dölen (Dölen i in., 2013) ze zmianami opisanymi przez Hardą i współpracowników (Harda i in., 2020). W modelu warunkowanej preferencji miejsca bodźce neutralne są kojarzone z występowaniem bodźca nagradzającego lub jego brakiem. W modyfikacji badającej nagradzające właściwości interakcji społecznych jedno ze środowisk zestawione jest z przebywaniem w grupie, natomiast drugie do przebywania w izolacji. W pierwszej fazie testu (pre-test) zwierzęta umieszczane były w aparacie zawierającym dwa przedziały na 30 minut w celu weryfikacji wyjściowej preferencji do dwóch typów środowisk (Ryc.3). Podczas wcześniejszych eksperymentów pilotażowych w naszym laboratorium wybrano dwa neutralne typy ściółek: z buku (Trociny bukowe przesiane gat. 1; producent P.P.H. "WO-JAR".) wraz z klockiem w kształcie prostopadłościanu oraz z celulozy (Biofresh Performance Bedding, Absorption Corp, USA, 1/8' Pelleted Cellulose) z sześciennym klockiem.

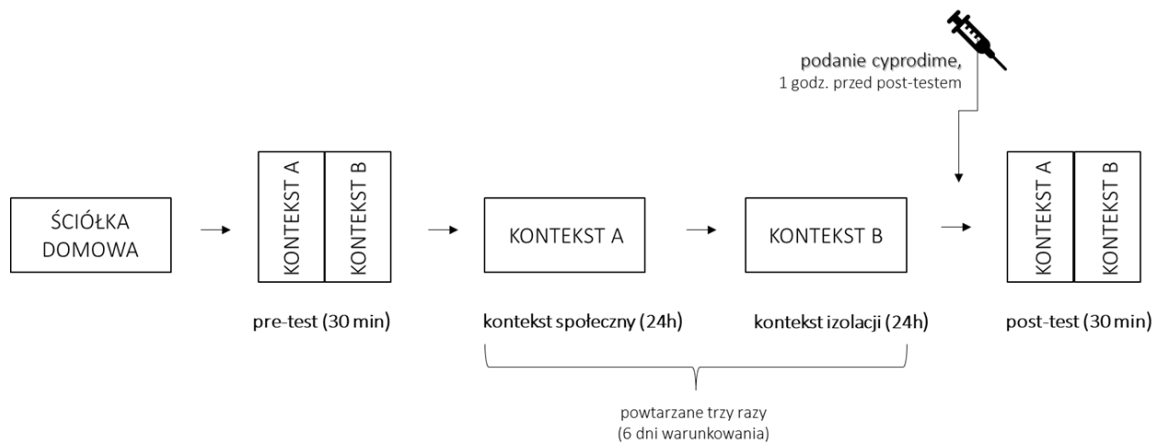


**Ryc.3. Klatka do testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (SCPP).** Przedział u góry: ściółka z buku i długi klocek (kontekst A). Przedział na dole: ściółka z celulozy i kwadratowy klocek (kontekst B). Przejście do drugiego przedziału jest oznaczone pomarańczowym prostokątem. Każdy z przedziałów jest o wymiarach 30 cm x 15 cm.

Źródło: Klimczak, 2019

Następnego dnia zwierzęta rozpoczęły sesje warunkowań – najpierw spędzały 24 godziny w kontekście społecznym w klatce z rówieśnikami, a kolejne 24 godziny oddzielnie w kontekście izolacji społecznej. Po sześciu sesjach warunkowań wykonywany był post-test w sposób analogiczny do etapu pre-testu. Schemat eksperymentu przedstawiono na Ryc.4. W przypadku badania efektów działania leku na ekspresję preferencji kontekstu społecznego, godzinę przed rozpoczęciem post-testu myszy otrzymywały podania cyprodime lub soli fizjologicznej. Mierzono czas przebywania w każdym ze środowisk podczas fazy post-testu i porównywano do wyjściowej preferencji.





#### Ryc.4 Schemat przebiegu testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego.

- A) Pre-test: zwierzę swobodnie eksploruje dwa przedziały z neutralnymi, różnymi od siebie środowiskami.
- B) Po 24h zwierzęta umieszczane są w kontekście społecznym na jednej ze ściółek.
- C) Po upływie 24h zwierzę umieszczane jest w izolacji w innym środowisku.
- D) Post-test: Po 6 sesjach naprzemiennych warunkowań w kontekście społecznym (B) i izolacji (C) zwierzę ponownie umieszczane jest w aparacie do SCPP.

Źródło: Klimczak, 2019.

### 7.4 Analiza statystyczna

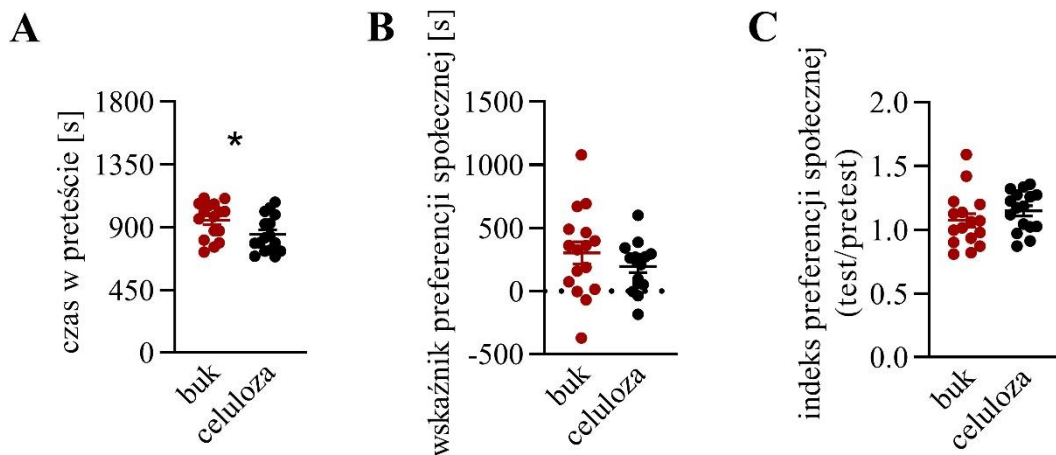
30-minutowe fazy pre- i post-testu były nagrywane za pomocą kamery Basler GigE i analizowane w programie Noldus EthoVision 15.0. W programie GraphPad Prism 9.0 dokonano analiz statystycznych, korzystając z testu t Studenta dla porównań między dwiema grupami, testu nieparametrycznego U Manna-Whitneya (w przypadku, gdy rozkład dla grupy odbiegał od rozkładu normalnego) oraz dwuczynnikowej analizy wariancji w modelu mieszanym (ANOVA) dla porównań więcej niż dwóch grup.

Dla określenia preferencji społecznej zastosowano dwie główne miary. Pierwszą z nich był wskaźnik preferencji społecznej (*score*), definiowany jako różnica czasu spędzonego w post-teście w kontekście społecznym i czasu spędzonego w post-teście w kontekście izolacji. Drugą z nich był indeks preferencji społecznej, używany m.in. przez Pankseppa (J. B. Panksepp & Lahvis, 2007), wyrażany przez iloraz czasu spędzonego w kontekście społecznym w post-teście i czasu spędzonego w kontekście społecznym w pre-teście.

## 8. Wyniki

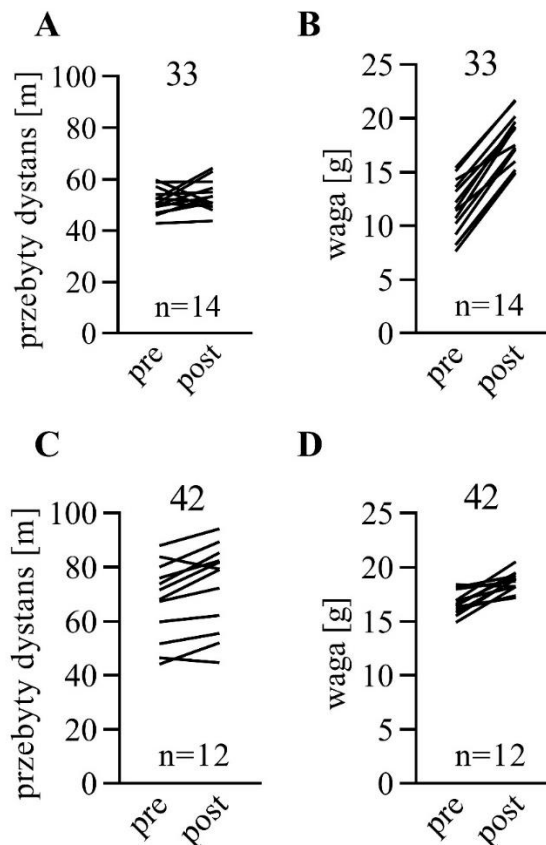
Początkowy etap prac badawczych polegał na ustaleniu dwóch neutralnych kontekstów, dla których wyjściowa preferencja uzyskana w fazie pre-testu będzie wynosić około 50%. Dzięki temu wybór kontekstów przebiegał całkowicie losowo (ang. *unbiased*). Myszy, których wyjściowa preferencja do jednego z typów ściółek wynosiła mniej niż 35%, nie brały udziału w dalszej analizie. Ostatecznie wybrano dwa zestawy ściółek – z buku i z celulozy – które nie odbiegały od siebie preferencją wyjściową w znaczący sposób, co przedstawiono na Ryc.5.

Wyjściowa preferencja dla obu zestawów ściółek została przedstawiona na grupie myszy w wieku 35 dni, których liczebność wynosiła po 16 osobników na grupę. Na wykresie A przedstawiono czas spędzony w preteście na ściółce bukowej i celulozowej, którego wartość oscyluje w przedziale 50% (ok. 900 s). Średni czas spędzony na buku w fazie pre-testu wynosił 949 sekund, a na celulozie 848 sekund (w 95% przedziałach ufności). Jednak różnice te nie wpłynęły istotnie statystycznie na wskaźnik i indeks preferencji społecznej, co obrazują wykresy B i C. Myszy warunkowały się zarówno na buku, jak i celulozie, na co wskazują wartości większe od 0 we wskaźniku preferencji społecznej. W przypadku myszy, dla których kontekstem społecznym była ściółka bukowa, można zauważyć większy rozstrzał wyników niż dla myszy z kontekstem społecznym na celulozie, jednak nie jest to różnica istotna statystycznie. Dla wskaźnika preferencji społecznej wartość p wynosi 0,2889 w teście dwustronnym t Studenta ( $t=1,080$ ,  $df=30$ ), a dla indeksu preferencji społecznej – 0,2600 ( $t=1,148$ ,  $df=30$ ).



**Ryc. 5. Porównanie dwóch rodzajów ściółek – buku i celulozy – w teście warunkowanej preferencji kontekstu społecznego dla myszy w wieku 35 dni (n=16 dla każdej ze ściółek).** Wykres A – czas spędzony w preteście na obu typach ściółek w sekundach. Wykres B – wskaźnik preferencji społecznej dla myszy, których kontekstem społecznym był buk lub celuloza. Wykres C – indeks preferencji społecznej dla myszy, których kontekstem społecznym był buk lub celuloza. Symbol „\*” oznacza  $p < 0,05$  w niesparowanym teście t Studenta. Słupki błędów oznaczają SEM.

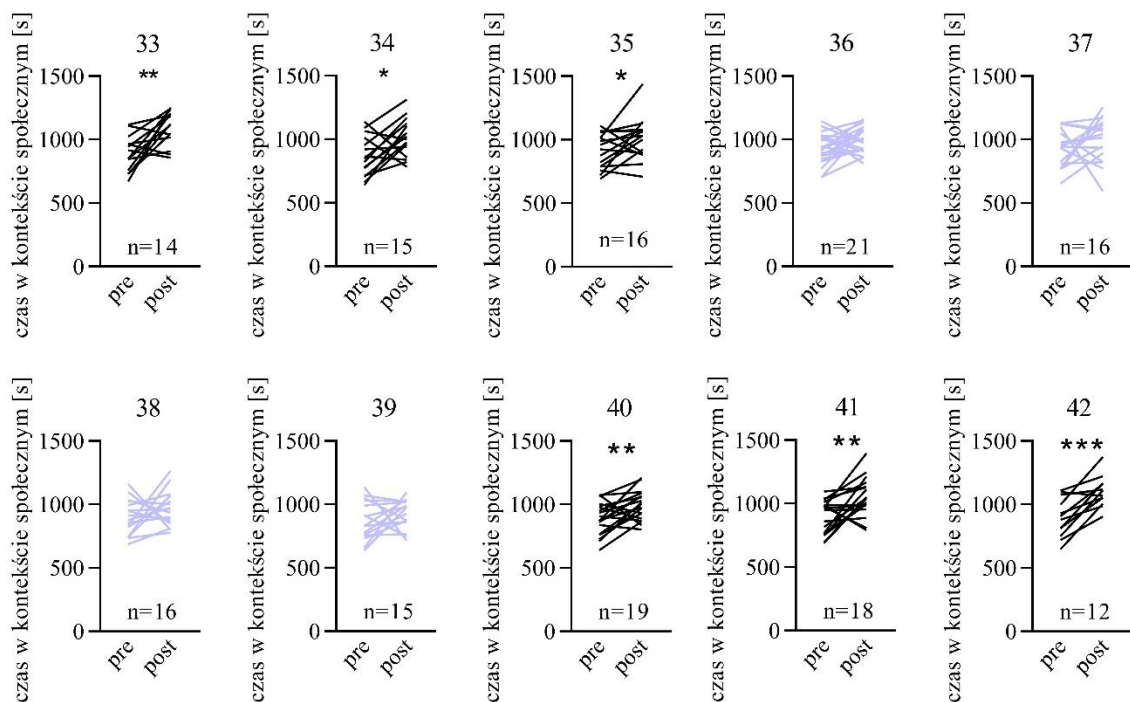
Oprócz preferencji społecznej podczas testu mierzono również wagę oraz przebyty dystans zwierzęcia podczas pre- i post-testu. Służyły one sprawdzeniu, czy rozwój badanych osobników przebiega prawidłowo. Zwierzęta o niskiej sprawności lokomotorycznej i znacznym spadku wagi musiałyby zostać wykluczone z doświadczenia. Na Ryc.6 zostały przedstawione wykresy dla myszy ze skrajnych grup wiekowych, czyli w dniu 33 oraz 42 (wiek podczas post-testu). Starsze osobniki przemierzają większy dystans, z większą średnią prędkością niż myszy młodsze. Średni wzrost przebytego dystansu między pre- a post-testem dla myszy w dniu 33 wynosi 2,3 metra, a dla myszy w dniu 42 - 5,6 metra. Dla myszy z najmłodszej grupy wiekowej średni przyrost masy ciała między dniem pre- i post-testu wynosił 6,6 gramów, a z najstarszej – 2,2. Parametry te mieszczące się we właściwym zakresie nie wpływają na wynik eksperymentu, czyli na czas przebyty w każdym z przedziałów w aparacie do warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (sCPP).



**Ryc.6. Przebyty dystans i waga w czasie pre- i post-testu u myszy w dniu 33 i 42.**

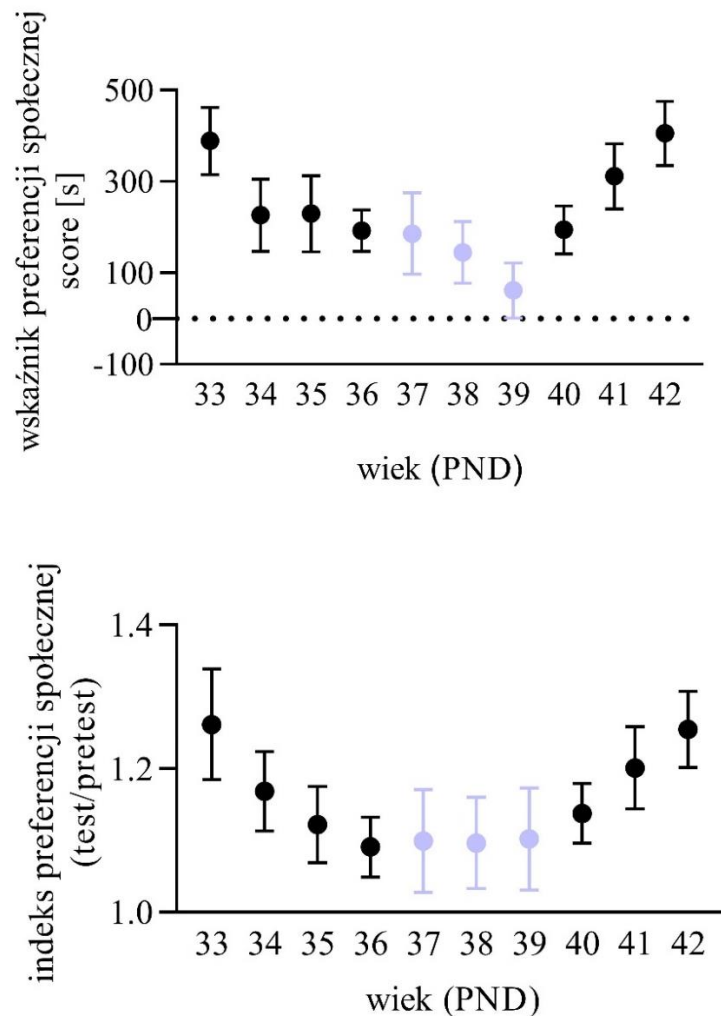
Wykresy A i C przedstawiają przebyty dystans dla myszy kolejno w 33 (n=14) i 42 (n=12) dniu po urodzeniu. Wykresy C i F pokazują przyrost masy ciała w czasie pre- i post-testu dla myszy w dniu 33 i 42 po urodzeniu.

Najistotniejszą miarą obserwowaną w doświadczeniu była zmiana preferencji kontekstu skojarzonego z oddziaływaniami społecznymi u zwierząt w wieku od 33 do 42 dnia po urodzeniu, a więc w okresie dojrzewania. Wykresy pokazują czas spędzony w pre- i post-tescie w sekundach podczas testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (sCPP) dla myszy z 10 grup wiekowych (Ryc.7). Podany wiek odnosi się do wieku osiągniętego przez myszy w czasie post-testu. Wyniki te wskazują, że dla myszy z grup wiekowych 36-39 efekt ten nie jest istotny statystycznie, z widocznym spadkiem preferencji w dniu 39. Od dnia 40 następuje wzrost preferencji kontekstu społecznego.



**Ryc.7.** Wykresy wiekowe dla myszy w 33-42 dniu po urodzeniu (PND) przedstawiające czas spędzony w kontekście społecznym podczas fazy pre- i post-testu. Zaznaczone fioletowym kolorem linie oznaczają brak istotności statystycznej w danej grupie wiekowej. Wartość „n” oznacza liczebność każdej z grup. Symbol „\*” wskazuje na  $p < 0,05$ , „\*\*” na  $p < 0,01$ , a „\*\*\*” na  $p < 0,001$  w teście t-Studenta dla prób zależnych.

Dane te zostały również przedstawione na wykresach zbiorczych z krzywą wiekową (Ryc.8.) Na pierwszym z nich (A) można zaobserwować spadek wskaźnika preferencji kontekstu społecznego (z ang. „*preference score*”, różnica czasu w kontekście społecznym i izolacji w post-teście) w dniu 39. Wskaźniki preferencji społecznej porównano między grupami wiekowymi za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA ( $P= 0,0318$ ,  $F(9,152)= 2,110$ ). Według indeksu wskaźnika preferencji społecznej (iloraz czasu w kontekście społecznym w post-teście i pre-teście), zmiany są bardziej subtelne, a krzywa wiekowa tworzy wykres U-kształtny (B). Indeksy preferencji społecznej porównano między grupami wiekowymi za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA ( $P= 0,3331$ ,  $F(9,152)= 1,147$ ).



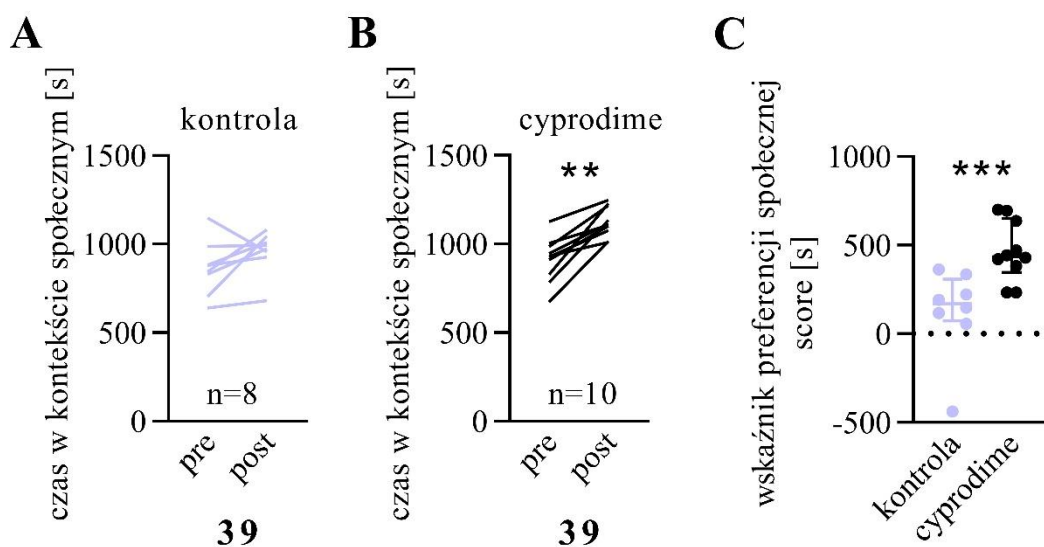
**Ryc.8. Ekspresja warunkowanej preferencji kontekstu społecznego podczas okresu dojrzewania u myszy.**

A - Wskaźnik preferencji społecznej (*score*) dla myszy z 10 grup wiekowych. Na kolor fioletowy zaznaczone zostały punkty, w których wartość preferencji społecznej nie jest istotna statystycznie w teście rangowanych znaków Wilcozona. Słupki błędów oznaczają SEM.

B – Indeks preferencji społecznej (*test/pretest*) dla myszy z 10 grup wiekowych. Na kolor fioletowy zaznaczone zostały punkty, w których wartość preferencji społecznej nie jest istotna statystycznie w teście t-Studenta dla jednej próby. Słupki błędów oznaczają SEM.

Przyjęta hipoteza badawcza wskazywała endogenny układ opioidowy za kluczowy czynnik w neuronalnych mechanizmach odpowiedzialnych za nagradzające działanie interakcji społecznych. W celu weryfikacji hipotezy został przeprowadzony szereg doświadczeń z wykorzystaniem antagonistów receptorów opioidowych, które były podawane bezpośrednio przed post-testem, czyli po fazie warunkowania. Zatem podanie leków pozwoliło ocenić ich wpływ na ekspresję preferencji kontekstu społecznego, a nie na reakcje warunkowania. W pracy przedstawię efekty podania cyprodime - selektywnego antagonisty receptorów  $\mu$  opioidowych.

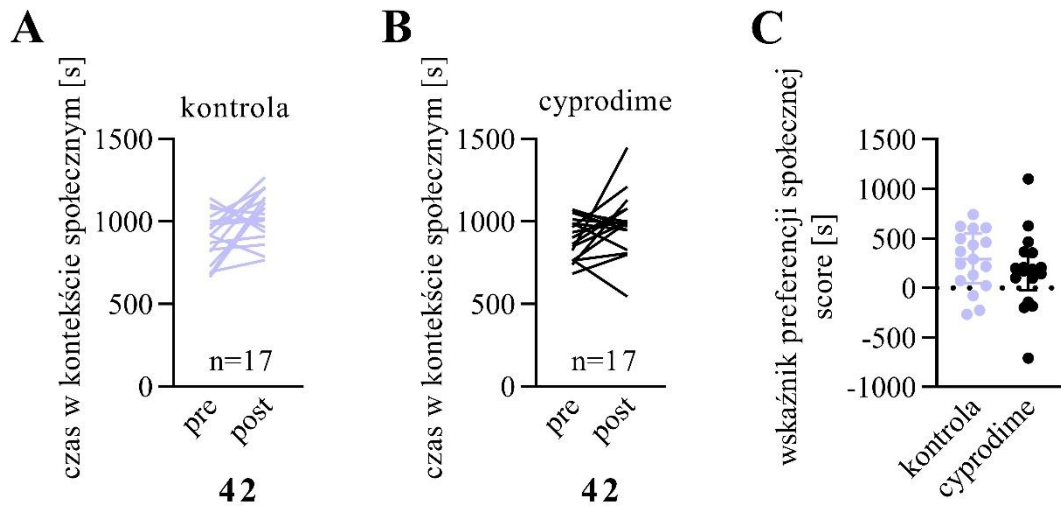
Myszy z grupy badanej przechodziły sesje warunkowań w sposób analogiczny do myszy kontrolnych, by następnie otrzymać podanie leku godzinę przed post-testem. Natomiast myszy w dniu 39, kiedy wskaźnik preferencji społecznej był najniższy, po podaniu cyprodime znacząco statystycznie osiągają wyższą wartość wskaźnika preferencji społecznej, niż pozostałe myszy w tym samym wieku (Ryc.9). W celu porównania grupy kontrolnej i lekowej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, według której nie ma interakcji między próbami ( $F(1,16)= 3,412$ ,  $p= 0,0833$ ). Dla czynnika „faza testu”  $F(1,16)= 22,70$ ,  $p= 0,0002$ , a dla czynnika „lek”  $F(1,16)= 4,812$ ,  $p= 0,0434$ .



**Ryc.9. Wpływ podania cyprodime na ekspresję warunkowanej preferencji kontekstu społecznego u myszy w 39 dniu po urodzeniu.**

A – czas spędzony w pre- i post-teście w kontekście społecznym przez myszy z grup kontrolnych. B - czas spędzony w pre- i post-teście w kontekście społecznym przez myszy z grup lekowych. Symbol „\*\*” wskazuje na  $p<0,01$  na  $p<0,001$  w teście nieparametrycznym Wilcoxona. C – wskaźnik preferencji społecznej (*score*, s) dla myszy kontrolnych i lekowych. Słupki oznaczają medianę z przedziałem międzykwartylowym. Symbol „\*\*\*” wskazuje na  $p<0,001$  w teście U Manna-Whitneya.

W dniach rozwoju, kiedy wskaźnik preferencji kontekstu społecznego jest na wysokim poziomie, myszy nie są istotnie podatne na efekt działania cyprodime, co ilustruje Ryc.10. W dniu 42 podanie antagonisty receptorów  $\mu$  opioidowych nie zmieniało w sposób istotny zachowań społecznych myszy w teście warunkowanej preferencji kontekstu społecznego. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, według której nie występuje interakcja między fazą testu a lekiem ( $F(1,32)= 0,3477$ ,  $p= 0,5596$ ), jak również zastosowanie leku nie jest znaczące (czynniki „lek”,  $F(1,32)= 0,5947$ ,  $p= 0,4463$ ).



**Ryc.10. Wpływ podania cyprodime na ekspresję warunkowanej preferencji kontekstu społecznego u myszy w 42 dniu po urodzeniu.**

A – czas spędzony w pre- i post-teście w kontekście społecznym przez myszy z grup kontrolnych.  
 B - czas spędzony w pre- i post-teście w kontekście społecznym przez myszy z grup lekowych.  
 C – wskaźnik preferencji społecznej (*score*) dla myszy kontrolnych i lekowych. Słupki błędów oznaczają medianę z przedziałem międzykwartylowym.

Z przedstawionych danych wynika, że ekspresja preferencji społecznej u samców myszy C57BL/6J mierzona w teście sCPP jest zależna od dnia rozwoju (Ryc.7). Zaobserwowano, że w okresie środkowej adolescencji następuje spadek zainteresowania oddziaływaniami społecznymi z rodzeństwem (Ryc.8). Efekt ten odwraca podanie selektywnego antagonisty receptorów  $\mu$  opioidowych – cyprodime (Ryc.9). Podanie leku w dniu 42, kiedy ekspresja preferencji społecznej jest na wysokim poziomie, nie wpływa na zmianę zachowania (Ryc.10).

## 9. Dyskusja i wnioski

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy zwraca się szczególną uwagę na zmiany zachodzące podczas okresu dojrzewania i ich wpływ na nagradzające efekty interakcji społecznych. Test warunkowanej preferencji kontekstu społecznego pozwolił na zbadanie ekspresji nagrody społecznej u myszy w kontaktach z rówieśnikami. Zaobserwowano zmiany w preferencji społecznej zależne od dnia rozwoju ze spadkiem zainteresowania kontaktem społecznym w środkowym etapie dojrzewania (36-39 dzień po urodzeniu). Ponadto wykazano, że okres środkowej adolescencji jest szczególnie wrażliwy na działanie selektywnego antagonisty receptorów  $\mu$  opioidowych – cyprodime, ponieważ po podaniu ekspresja preferencji społecznej została przywrócona.

Procedura warunkowanej preferencji kontekstu społecznego została zastosowana w celu weryfikacji występowania nagradzających właściwości oddziaływań społecznych wśród myszy (J. B. Panksepp & Lahvis, 2007). Badania pilotażowe służyły wybraniu dwóch neutralnych rodzajów środowisk, na których prowadzone były kolejne doświadczenia. Ostatecznie zestaw ściółek z celulozy i buku okazał się być odpowiedni do zastosowania w schemacie bez uprzedzeń (ang. „*unbiased*”), gdzie ściółki były przypisywane do kontekstów w sposób losowy. Sprawdzenie parametrów takich jak przebyty dystans czy waga podczas pre- i post-testu pozwoliło na ocenienie, czy zwierzę w czasie trwania eksperymentu rozwijało się prawidłowo. Myszy w okresie wczesnego dojrzewania przybierały na wadze szybciej niż myszy w późnym okresie dojrzewania, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Dutta & Sengupta, 2016). Natomiast myszy starsze z reguły przebywały dłuższy dystans z większą średnią szybkością niż myszy młodsze. Prawdopodobnie jest to spowodowane okresem przyśpieszonego wzrostu podczas wczesnej fazy dojrzewania i jego spowolnieniem w późnym etapie dojrzewania.

### Zmiany w ekspresji preferencji społecznej podczas okresu dojrzewania

Pierwszy etap doświadczeń z użyciem testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego został opisany w mojej pracy licencjackiej (Klimczak, 2019) i dotyczył wpływu leków działających na receptory opioidowe na ekspresję nagrody społecznej. Badania te nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób leki opioidowe modulują nagradzające właściwości interakcji społecznych. Zastosowano wówczas dwa rodzaje leków działających na receptory opioidowe – nalmefen i cyprodime. Podanie nalmefenu, agonisty receptorów  $\mu$  i częściowego agonisty receptorów  $\kappa$  opioidowych, skutkowało spadkiem ekspresji warunkowanej preferencji kontekstu społecznego. Natomiast podanie cyprodime nie wpłynęło na obniżenie preferencji społecznej. Uzyskane wyniki tłumaczono efektem częściowej aktywacji receptorów  $\kappa$  opioidowych przez nalmefen, nie uwzględniając dokładnego wieku badanych myszy. Podczas analizy danych z wielu eksperymentów zwrócono natomiast uwagę na efekt wieku w preferencji kontekstu społecznego. Doświadczenia kontynuowano w celu potwierdzenia hipotezy, że ekspresja preferencji społecznej zależy od dnia rozwoju osobnika. Wyniki wskazują, że myszy we wczesnym i późnym etapie dojrzewania mają wyższe wartości wskaźników preferencji społecznych niż myszy w środkowym etapie dojrzewania (36-39 PND). Obserwacje te okazały się być spójne z poprzednimi badaniami (J. B. Panksepp & Lahvis, 2007; Nardou i in., 2019; Cann i in., 2020), które również pokazywały preferencję



kontekstu społecznego w zależności od wieku. Wykazano, że ekspresję warunkowanej preferencji społecznej możemy obserwować u myszy przed osiągnięciem dorosłości (do ok. 47 dnia po urodzeniu). Jednakże wcześniejsze badania nie sprawdzały preferencji społecznej z dokładnością co do jednego dnia podczas rozwoju.

Wniosek ten wydaje się być potwierdzeniem hipotez dotyczących reorientacji społecznej (van den Bos, 2013), jak również zjawiska buntu młodzieńczego (Larson & Richards, 1991) występującego w połowie okresu dojrzewania. Podobne wyniki zostały zaprezentowane w publikacji na temat okresu krytycznego dla nagrody społecznej, w którym również badano ekspresję preferencji społecznej w procedurze sCPP na przestrzeni wieku myszy, jednak nie z taką dokładnością (Nardou i in., 2019). Zaobserwowany przez nas spadek ekspresji preferencji społecznej w dniu 39 u samców nie został dostrzeżony w tamtej publikacji, ponieważ badano myszy w dniu 35, 42 i 49, czyli wtedy, gdy wskaźniki te są na względnie wysokim poziomie. Natomiast wyniki samic również wskazują na obniżenie preferencji społecznych w środkowym etapie dojrzewania, czyli dniu 42, opierając się na hipotezie, że okres ten jest przesunięty w czasie względem samców. Powyższe wyniki mogą być potwierdzeniem, iż w czasie środkowego etapu dojrzewania następuje spadek zainteresowania kontaktami z rodziną, co może świadczyć, że w tym czasie nie posiadają właściwości nagradzających.

### **Znaczenie receptorów $\mu$ opioidowych w nagrodzie społecznej w okresie dojrzewania**

Kolejna część doświadczeń miała za zadanie wykazać rolę receptorów  $\mu$  opioidowych w nagradzających efektach oddziaływań społecznych. W tym celu podawano selektywnego antagonistę receptorów opioidowych typu  $\mu$  – cyprodime, co pozwoliło na zbadanie efektów zablokowania receptorów tylko jednego rodzaju, bez wywierania wpływu na pozostałe (Schmidhammer i in., 1989). Myszy w środkowym okresie adolescencji (39 PND) okazały się być szczególnie wrażliwe na podanie cyprodime przed post-testem, a obserwowany wcześniej spadek zainteresowania kontaktami społecznej został odwrócony. Podanie cyprodime nie wywoływało efektu na grupie zwierząt w wieku, kiedy preferencja społeczna utrzymywała się już na względnie stałym, wysokim poziomie (42 PND). Obserwacja ta sugeruje, że transmisja opioidowa jest odpowiedzialna za przetwarzanie informacji o nagradzających właściwościach oddziaływań społecznych, a jej efekty są ściśle zależne od dnia rozwoju.

Rola endogenego układu opioidowego w zachowaniach społecznych i afiliacyjnych została opisana już w roku 1978 przez Pankseppa (J. Panksepp i in., 1978). Według jego teorii społeczny dystres indukowany izolacją społeczną oraz w następstwie poszukiwanie kontaktu są modulowane przez niski poziom opioidów. Nawiązanie kontaktu społecznego może odwrócić negatywny efekt dzięki uwolnieniu opioidów (J. Panksepp i in., 1984). Dobrze zbadaną kwestią w kontekście wpływu opioidów na zachowania społeczne są relacje między matką a potomstwem. Zachowania matczyne są pod hamującym wpływem opioidów (Bridges & Grimm, 1982), na co wskazują liczne badania, w których podanie agonistów (morfiny) blokowało kontakty matczyne, a antagonistów (naloksonu) przywracało. Endogeny układ opioidowy moduluje zachowania matczyne na każdym z ich etapów i w zależności od kontekstu, dzięki czemu pozwala utrzymać równowagę podczas opieki nad potomstwem (J. Panksepp i in., 1994). Inną formą interakcji społecznych między potomstwem a matką są wokalizacje

ultradźwiękowe, które również są kontrolowane przez układ opioidowy (D'Amato, 2021). Badania wykazały, że podania agonistów receptorów opioidowych zmniejszają częstotliwość wykonywania wokalizacji ultradźwiękowych przez potomstwo (Winslow & Insel, 1991), a antagonistów – stymulują (J. Panksepp i in., 1980) lub nie wpływają (Carden & Hofer, 1991) na wokalizacje ultradźwiękowe indukowane izolacją społeczną. Wyniki tych badań świadczą o kluczowym znaczeniu endogennego układu opioidowego w regulowaniu zachowań społecznych już na wczesnym etapie rozwoju i w zależności od kontekstu sytuacyjnego.

Rola transmisji opioidowej w kształtowaniu zachowań społecznych o charakterze nagradzającym w zależności od kontekstu została ujęta w tzw. Modelu SOMSOM (The State-dependent  $\mu$ -Opioid Modulation of Social Motivation). Według niego, wyjściowa motywacja osobnika decyduje o faktycznym efekcie działania ligandów na receptory opioidowe na zachowanie (Loseth i in., 2014). Może to po części wyjaśniać, dlaczego w przeprowadzonym badaniu podanie antagonisty opioidowego wywoływało zmiany w zachowaniu zwierzęcia tylko na określonym etapie rozwoju (39 dzień po urodzeniu). Jak wykazano, okres środkowej adolescencji charakteryzuje się obniżonym zainteresowaniem w zawieranie więzi z rodziną, natomiast blokowanie receptorów  $\mu$  opioidowych temu przeciwdziała. Odkrycie to potwierdza znaczenie transmisji  $\mu$  opioidowej w zjawisku reorientacji społecznej, która charakteryzuje się spadkiem zaangażowania w relacje z rodziną. Zmiana kierunku motywacji społecznej jest kluczowa do adaptacji kolejnych zachowań społecznych, włączając w to kontakty z rówieśnikami i partnerami (Nelson i in., 2015).

## **Podsumowanie**

Okres dojrzewania jest czasem szczególnie wrażliwym na zmiany środowiskowe, jak również wewnętrzne stany motywacyjne. Nawet subtelne zmiany w ilości wydzielanych neuroprzekaźników w tym okresie mogą przyczynić się do długotrwałych zmian w zachowaniu. Niniejsza praca pokazuje, jak kształtuje się preferencja społeczna w okresie dojrzewania u myszy z dokładnością co do jednego dnia. Wczesny i późny etap adolescencji charakteryzuje się wysoką ekspresją preferencji społecznej, natomiast podczas środkowego etapu obserwowany jest spadek nagradzających efektów interakcji społecznych, który jednak może być odwrócony przez zablokowanie receptorów  $\mu$  opioidowych. Endogenny układ opioidowy pełni ważną funkcję w zjawisku reorientacji społecznej, a odpowiedni poziom uwalnianych opioidów w czasie rozwoju może stanowić o prawidłowym wykształceniu zachowań społecznych obecnych w życiu dorosłym. Uzyskane wyniki mogą być punktem wyjścia do dalszych badań nad znaczeniem receptorów  $\mu$  opioidowych w zmianie nagradzających wartości bodźców społecznych zależnie od wieku i kontekstu. Do wyjaśnienia pozostaje kwestia, jak dokładnie kształtuje się profil uwalniania endogennych opioidów na poszczególnych etapach życia, co może pomóc zrozumieć zmiany zachodzące w zachowaniu, a także przeciwdziałać zaburzeniom w ekspresji odpowiednich dla danego etapu rozwoju zachowań. Nie ma wątpliwości, że receptory opioidowe są istotne w przetwarzaniu informacji o nagradzających właściwościach interakcji społecznych zależnie od kontekstu, jednak złożoność zachowań społecznych jest pochodną jednoczesnego zaangażowania szeregu innych neuroprzekaźników.

## 10. Spis rycin

- Ryc.1. Cykl życia myszy. **Str.8**
- Ryc.2. Trzy główne typy receptorów opioidowych i ich główne endogenne ligandy w ośrodkowym układzie nerwowym. **Str.12**
- Ryc.3. Klatka do testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego (SCPP). **Str.16**
- Ryc.4 Schemat przebiegu testu warunkowanej preferencji kontekstu społecznego. **Str.17**
- Ryc. 5. Porównanie dwóch rodzajów ściółek – buku i celulozy – w teście warunkowanej preferencji kontekstu społecznego dla myszy w wieku 35 dni. **Str.18**
- Ryc.6. Przebyty dystans i waga w czasie pre- i post-testu u myszy w dniu 33 i 42. **Str.19**
- Ryc.7. Wykresy wiekowe dla myszy w 33-42 dniu po urodzeniu (PND) przedstawiające czas spędzony w kontekście społecznym podczas fazy pre- i post-testu. **Str.20**
- Ryc.8. Ekspresja warunkowanej preferencji kontekstu społecznego podczas okresu dojrzewania u myszy. **Str.21**
- Ryc.9. Wpływ podania cyprodime na ekspresję warunkowanej preferencji kontekstu społecznego u myszy między 36 a 39 dniem po urodzeniu. **Str.22**
- Ryc.10. Wpływ podania cyprodime na ekspresję warunkowanej preferencji kontekstu społecznego u myszy w 42 dniu po urodzeniu. **Str.23**

## 11. Bibliografia

- Adriani, W., & Laviola, G. (2004). Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behavioural Pharmacology*, *15*(5–6), 341–352. <https://doi.org/10.1097/00008877-200409000-00005>
- Bariselli, S., Contestabile, A., Tzanoulinou, S., Musardo, S., & Bellone, C. (2018). SHANK3 Downregulation in the Ventral Tegmental Area Accelerates the Extinction of Contextual Associations Induced by Juvenile Non-familiar Conspecific Interaction. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00360>
- Bariselli, S., Hörnberg, H., Prévost-Solié, C., Musardo, S., Hatstatt-Burklé, L., Scheiffle, P., & Bellone, C. (2018). Role of VTA dopamine neurons and neuroligin 3 in sociability traits related to nonfamiliar conspecific interaction. *Nature Communications*, *9*(1), 3173. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05382-3>
- Bartels, A., & Zeki, S. (2000). The neural basis of romantic love. *Neuroreport*, *11*(17), 3829–3834. <https://doi.org/10.1097/00001756-200011270-00046>
- Becker, J. A. J., Clesse, D., Spiegelhalter, C., Schwab, Y., Le Merrer, J., & Kieffer, B. L. (2014). Autistic-like syndrome in mu opioid receptor null mice is relieved by facilitated mGluR4 activity. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *39*(9), 2049–2060. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.59>
- Bell, M. R. (2018). Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. *Endocrinology*, *159*(7), 2596–2613. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00220>
- Berg, C. L. V. den, Ree, J. M. V., Spruijt, B. M., & Kitchen, I. (1999). Effects of juvenile isolation and morphine treatment on social interactions and opioid receptors in adult rats: Behavioural and autoradiographic studies. *European Journal of Neuroscience*, *11*(9), 3023–3032. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00717.x>
- Berridge, K. C., & Kringelbach, M. L. (2008). Affective neuroscience of pleasure: Reward in humans and animals. *Psychopharmacology*, *199*(3), 457–480. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1099-6>
- Berridge, K. C., Robinson, T. E., & Aldridge, J. W. (2009). Dissecting components of reward: ‘Liking’, ‘wanting’, and learning. *Current Opinion in Pharmacology*, *9*(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.014>
- Blakemore, S.-J., Burnett, S., & Dahl, R. E. (2010). The role of puberty in the developing adolescent brain. *Human Brain Mapping*, *31*(6), 926–933. <https://doi.org/10.1002/hbm.21052>

- Bridges, R. S., & Grimm, C. T. (1982). Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. *Science (New York, N.Y.)*, *218*(4568), 166–168. <https://doi.org/10.1126/science.7123227>
- Brust, V., Schindler, P. M., & Lewejohann, L. (2015). Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Frontiers in Zoology*, *12*(1), S17. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S17>
- Cann, C., Venniro, M., Hope, B. T., & Ramsey, L. A. (2020). Parametric investigation of social place preference in adolescent mice. *Behavioral Neuroscience*, *134*(5), 435–443. <https://doi.org/10.1037/bne0000406>
- Carden, S. E., & Hofer, M. A. (1991). Isolation-induced vocalization in Wistar rat pups is not increased by naltrexone. *Physiology & Behavior*, *49*(6), 1279–1282. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90363-s](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90363-s)
- Carver, C. S., Johnson, S. L., & Kim, Y. (2016). Mu opioid receptor polymorphism, early social adversity, and social traits. *Social Neuroscience*, *11*(5), 515–524. <https://doi.org/10.1080/17470919.2015.1114965>
- Collins, W. A., Welsh, D. P., & Furman, W. (2009). Adolescent romantic relationships. *Annual Review of Psychology*, *60*, 631–652. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.60.110707.163459>
- Crone, E. A., & Dahl, R. E. (2012). Understanding adolescence as a period of social–affective engagement and goal flexibility. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(9), 636–650. <https://doi.org/10.1038/nrn3313>
- D’Amato, F. R. (2021). Evaluation of  $\mu$ -Opioid System Functionality in Mouse Pups: Ultrasonic Vocalizations as an Index of Infant Attachment. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2201*, 259–265. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0884-5\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0884-5_24)
- De Lorme, K., Bell, M. R., & Sisk, C. L. (2013). The Teenage Brain: Social Reorientation and the Adolescent Brain-The Role of Gonadal Hormones in the Male Syrian Hamster. *Current Directions in Psychological Science*, *22*(2), 128–133. <https://doi.org/10.1177/0963721413479607>
- Devine, D. P., & Wise, R. A. (1994). Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *Journal of Neuroscience*, *14*(4), 1978–1984.
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(14), 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Dölen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K. W., & Malenka, R. C. (2013). Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature*, *501*(7466), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature12518>

- Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*, *152*, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>
- Harda, Z., Spyrka, J., Jastrzębska, K., Szumiec, Ł., Bryksa, A., Klimczak, M., Polaszek, M., Gołda, S., Zajdel, J., Misiólek, K., Błasiak, A., & Rodriguez Parkitna, J. (2020). Loss of mu and delta opioid receptors on neurons expressing dopamine receptor D1 has no effect on reward sensitivity. *Neuropharmacology*, *180*, 108307. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108307>
- Hennessy, M. B., Nigh, C. K., Sims, M. L., & Long, S. J. (1995). Plasma cortisol and vocalization responses of postweaning age guinea pigs to maternal and sibling separation: Evidence for filial attachment after weaning. *Developmental Psychobiology*, *28*(2), 103–115. <https://doi.org/10.1002/dev.420280204>
- Insel, T. R., & Winslow, J. T. (1991). Central administration of oxytocin modulates the infant rat's response to social isolation. *European Journal of Pharmacology*, *203*(1), 149–152. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90806-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90806-2)
- Jean-Faucher, C., Berger, M., de Turckheim, M., Veysiere, G., & Jean, C. (1978). Developmental patterns of plasma and testicular testosterone in mice from birth to adulthood. *Acta Endocrinologica*, *89*(4), 780–788. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0890780>
- Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *The Journal of Physiology*, *450*, 455–468. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019136>
- Kelley, A. E., & Berridge, K. C. (2002). The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *The Journal of Neuroscience*, *22*(9), 3306–3311. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03306.2002>
- Krishnamurthy, H., Babu, P. S., Morales, C. R., & Sairam, M. R. (2001). Delay in sexual maturity of the follicle-stimulating hormone receptor knockout male mouse. *Biology of Reproduction*, *65*(2), 522–531. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.2.522>
- Kudła, L., Bugno, R., Skupio, U., Wiktorowska, L., Solecki, W., Wojtas, A., Golembiowska, K., Zádor, F., Benyhe, S., Buda, S., Makuch, W., Przewlocka, B., Bojarski, A. J., & Przewlocki, R. (2019). Functional characterization of a novel opioid, PZM21, and its effects on the behavioural responses to morphine. *British Journal of Pharmacology*, *176*(23), 4434–4445. <https://doi.org/10.1111/bph.14805>
- Larson, R., & Richards, M. H. (1991). Daily companionship in late childhood and early adolescence: Changing developmental contexts. *Child Development*, *62*(2), 284–300. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.1991.tb01531.x>
- Lieberman, M., Doyle, A. B., & Markiewicz, D. (1999). Developmental patterns in security of attachment to mother and father in late childhood and early

- adolescence: Associations with peer relations. *Child Development*, 70(1), 202–213. <https://doi.org/10.1111/1467-8624.00015>
- Loseth, G. E., Ellingsen, D.-M., & Leknes, S. (2014). State-dependent  $\mu$ -opioid modulation of social motivation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 430. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00430>
- Manduca, A., Carbone, E., Schiavi, S., Cacchione, C., Buzzelli, V., Campolongo, P., & Trezza, V. (2021). The neurochemistry of social reward during development: What have we learned from rodent models? *Journal of Neurochemistry*, 157(5), 1408–1435. <https://doi.org/10.1111/jnc.15321>
- Matthews, G. A., Nieh, E. H., Vander Weele, C. M., Halbert, S. A., Pradhan, R. V., Yosafat, A. S., Glober, G. F., Izadmehr, E. M., Thomas, R. E., Lacy, G. D., Wildes, C. P., Ungless, M. A., & Tye, K. M. (2016). Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. *Cell*, 164(4), 617–631. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.040>
- McDonald, S., Darke, S., Kaye, S., & Torok, M. (2013). Deficits in social perception in opioid maintenance patients, abstinent opioid users and non-opioid users. *Addiction (Abingdon, England)*, 108(3), 566–574. <https://doi.org/10.1111/add.12040>
- Morningstar, M., Grannis, C., Mattson, W. I., & Nelson, E. E. (2019). Associations Between Adolescents' Social Re-orientation Toward Peers Over Caregivers and Neural Response to Teenage Faces. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 108. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00108>
- Nardou, R., Lewis, E. M., Rothhaas, R., Xu, R., Yang, A., Boyden, E., & Dölen, G. (2019). Oxytocin-dependent reopening of a social reward learning critical period with MDMA. *Nature*, 569(7754), 116–120. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1075-9>
- Nelson, E. E., Jarcho, J. M., & Guyer, A. E. (2015). Social re-orientation and brain development: An expanded and updated view. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 17, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2015.12.008>
- Nelson, E. E., Jarcho, J. M., & Guyer, A. E. (2016). Social re-orientation and brain development: An expanded and updated view. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 17, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2015.12.008>
- Nelson, E. E., Leibenluft, E., McClure, E. B., & Pine, D. S. (2005). The social re-orientation of adolescence: A neuroscience perspective on the process and its relation to psychopathology. *Psychological Medicine*, 35(2), 163–174. <https://doi.org/10.1017/s0033291704003915>
- Normansell, L., & Panksepp, J. (1990). Effects of morphine and naloxone on play-rewarded spatial discrimination in juvenile rats. *Developmental Psychobiology*, 23(1), 75–83. <https://doi.org/10.1002/dev.420230108>

- Panksepp, J. B., & Lahvis, G. P. (2007). Social reward among juvenile mice. *Genes, Brain, and Behavior*, 6(7), 661–671. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00295.x>
- Panksepp, J., Herman, B., Conner, R., Bishop, P., & Scott, J. P. (1978). The biology of social attachments: Opiates alleviate separation distress. *Biological Psychiatry*, 13(5), 607–618.
- Panksepp, J., Herman, B. H., Vilberg, T., Bishop, P., & DeEsquinazi, F. G. (1980). Endogenous opioids and social behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 4(4), 473–487. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(80\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0149-7634(80)90036-6)
- Panksepp, J., Nelson, E., & Siviy, S. (1994). Brain opioids and mother-infant social motivation. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement*, 397, 40–46. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1994.tb13264.x>
- Panksepp, J., Siviy, S., & Normansell, L. (1984). The psychobiology of play: Theoretical and methodological perspectives. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 8(4), 465–492. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(84\)90005-8](https://doi.org/10.1016/0149-7634(84)90005-8)
- Peciña, S., & Berridge, K. C. (2005). Hedonic Hot Spot in Nucleus Accumbens Shell: Where Do  $\mu$ -Opioids Cause Increased Hedonic Impact of Sweetness? *Journal of Neuroscience*, 25(50), 11777–11786. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2329-05.2005>
- Pellissier, L. P., Gandía, J., Laboute, T., Becker, J. A. J., & Le Merrer, J. (2018).  $\mu$  opioid receptor, social behaviour and autism spectrum disorder: Reward matters. *British Journal of Pharmacology*, 175(14), 2750–2769. <https://doi.org/10.1111/bph.13808>
- Pereira, M., & Morrell, J. I. (2011). Functional Mapping of the Neural Circuitry of Rat Maternal Motivation: Effects of Site-Specific Transient Neural Inactivation. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(11), 1020–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02200.x>
- POCOCK, M. J. O., HAUFFE, H. C., & SEARLE, J. B. (2005). Dispersal in house mice. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84(3), 565–583. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00455.x>
- Rademacher, L., Krach, S., Kohls, G., Irmak, A., Gründer, G., & Spreckelmeyer, K. N. (2010). Dissociation of neural networks for anticipation and consumption of monetary and social rewards. *NeuroImage*, 49(4), 3276–3285. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.089>
- Raehal, K. M., Lowery, J. J., Bhamidipati, C. M., Paolino, R. M., Blair, J. R., Wang, D., Sadée, W., & Bilsky, E. J. (2005). In vivo characterization of  $\beta$ -naltrexol, an opioid ligand with less inverse agonist activity compared with naltrexone and naloxone in opioid-dependent mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(3), 1150–1162. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.082966>



- Resendez, S. L., Dome, M., Gormley, G., Franco, D., Nevárez, N., Hamid, A. A., & Aragona, B. J. (2013).  $\mu$ -Opioid Receptors within Subregions of the Striatum Mediate Pair Bond Formation through Parallel Yet Distinct Reward Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, *33*(21), 9140–9149. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4123-12.2013>
- Robinson, S. A., Erickson, R. L., Browne, C. A., & Lucki, I. (2017). A role for the mu opioid receptor in the antidepressant effects of buprenorphine. *Behavioural brain research*, *319*, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.050>
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2012). The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*, *76*(3), 470–485. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.021>
- Schenk, S., Britt, M. D., & Atalay, J. (1982). Isolation rearing decreases opiate receptor binding in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *16*(5), 841–842. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(82\)90245-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(82)90245-3)
- Schmidhammer, H., Burkard, W. P., Eggstein-Aeppli, L., & Smith, C. F. (1989). Synthesis and biological evaluation of 14-alkoxymorphinans. 2. (-)-N-(cyclopropylmethyl)-4,14-dimethoxymorphinan-6-one, a selective mu opioid receptor antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry*, *32*(2), 418–421. <https://doi.org/10.1021/jm00122a021>
- Shoblock, J. R., & Maidment, N. T. (2006). Constitutively active mu opioid receptors mediate the enhanced conditioned aversive effect of naloxone in morphine-dependent mice. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *31*(1), 171–177. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300782>
- Silk, J. B. (2007). The adaptive value of sociality in mammalian groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *362*(1480), 539–559. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1994>
- Smith, C. J. W., Wilkins, K. B., Li, S., Tulimieri, M. T., & Veenema, A. H. (2018). Nucleus accumbens mu opioid receptors regulate context-specific social preferences in the juvenile rat. *Psychoneuroendocrinology*, *89*, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.12.017>
- Trezza, V., Damsteegt, R., Achterberg, E. J. M., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2011). Nucleus accumbens  $\mu$ -opioid receptors mediate social reward. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(17), 6362–6370. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5492-10.2011>
- Tsuda, M. C., Yamaguchi, N., & Ogawa, S. (2011). Early life stress disrupts peripubertal development of aggression in male mice. *Neuroreport*, *22*(6), 259–263. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328344495a>

- Tzschentke, T. M. (2007). REVIEW ON CPP: Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology*, *12*(3–4), 227–462. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- van den Bos, W. (2013). Neural Mechanisms of Social Reorientation across Adolescence. *The Journal of Neuroscience*, *33*(34), 13581–13582. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2667-13.2013>
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid Receptors. *Annual Review of Biochemistry*, *73*(1), 953–990. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940>
- Wang, D., Raehal, K. M., Bilsky, E. J., & Sadée, W. (2001). Inverse agonists and neutral antagonists at mu opioid receptor (MOR): Possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence. *Journal of Neurochemistry*, *77*(6), 1590–1600. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00362.x>
- Williams, E., & Scott, J. P. (1954). The Development of Social Behavior Patterns in the Mouse, in Relation To Natural Periods 1). *Behaviour*, *6*(1), 35–64. <https://doi.org/10.1163/156853954X00031>
- Winslow, J. T., & Insel, T. R. (1991). Endogenous opioids: Do they modulate the rat pup's response to social isolation? *Behavioral Neuroscience*, *105*(2), 253–263. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.105.2.253>
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(6), 483–494. <https://doi.org/10.1038/nrn1406>
- Wise, R. A., & Bozarth, M. A. (1982). Action of drugs of abuse on brain reward systems: An update with specific attention to opiates. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *17*(2), 239–243. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(82\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(82)90076-4)
- Wise, R. A., & Koob, G. F. (2014). The Development and Maintenance of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology*, *39*(2), 254–262. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.261>