



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie

Wydział Biologii

Neurobiologia

## **Rola układu dynorfinowego w pamięci społecznej**

Aleksandra Rzeszut

Praca licencjacka

wykonana pod opieką

dr Zofii Hardej

w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej

Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Kraków 2024

*Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania mojej Promotorce,  
dr Zofii Hardej,  
za niezwykle możliwość realizacji tej pracy,  
Jej nieocenione wsparcie, ogromną wiedzę  
oraz cierpliwość w stosunku do mojej osoby.  
Jej merytoryczne wsparcie oraz konstruktywne uwagi  
miały ogromny wpływ na rozwój i jakość mojej pracy.  
Dzięki Jej zaangażowaniu i profesjonalizmowi  
każdy etap tego projektu nabrał nowego wymiaru,  
a Jej pomoc była dla mnie kluczowa.*

*Szczególne podziękowania kieruję również do  
prof. Jana Rodrigueza Parkitny,  
którego ogromna wiedza i inspirujące podejście do tematu  
miały kluczowe znaczenie dla rozwoju mojej pracy.  
Jego entuzjazm i pasja do nauki były dla mnie źródłem motywacji.  
Dziękuję także za cierpliwość do mojej osoby*

*Moje podziękowania kieruję również do  
Klaudii Misiólek oraz Łukasza Szumca,  
za ich nieocenioną pomoc w prowadzeniu eksperymentów  
z udziałem zwierząt oraz za cenne informacje.  
Ich wsparcie w realizacji badań oraz gotowość do  
dzielenia się wiedzą były dla mnie niezwykle ważne.*

Część badawcza pracy była dofinansowana ze środków  
z projektu grantowego OPUS2019/35/B/NZ7/03477  
przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.

# SPIS TREŚCI

Streszczenie.....	4
Abstract.....	5
Wykaz skrótów.....	6
<b>1. Wstęp.....</b>	<b>7</b>
1.1. Znaczenie pamięci społecznej: adaptacja mózgu do funkcjonowania w grupie.....	7
1.2. Dynorfina: neuromodulator innych neuromodulatorów.....	11
1.3. Oksytocyna jako architekt pamięci społecznej.....	15
1.4. Dynorfina, oksytocyna i pamięć społeczna.....	19
<b>2. Cel i założenia pracy.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Materiały i metody.....</b>	<b>21</b>
3.1. Zwierzęta.....	21
3.2. Testy behawioralne.....	22
3.2.1. Test rozpoznawania partnera oraz skłonność do interakcji społecznych (ang. <i>Sociability</i> ).....	23
3.2.2. Poziom lęklivosti i aktywność w otwartym polu.....	23
3.3. Analiza statystyczna.....	24
<b>4. Wyniki.....</b>	<b>24</b>
4.1. Rola płci w aktywności lokomotorycznej, lęklivosti, skłonności do wchodzenia w interakcje społeczne oraz pamięci społecznej u myszy o genotypie dzikim.....	25
4.2. Samce z selektywną dezaktywacją KOR w obrębie neuronów oksytocynowych nie wykazują istotnych różnic względem szczepu typu dzikiego.....	28
4.3. Samice z selektywną dezaktywacją receptora KOR w neuronach oksytocynowych wykazują poprawę pamięci społecznej.....	30
<b>5. Dyskusja i wnioski.....</b>	<b>32</b>
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>36</b>

## Streszczenie

Utrzymywanie skomplikowanych relacji społecznych jest jedną z fundamentalnych zdolności zarówno ludzi, jak i innych zwierząt żyjących w grupach a dysfunkcje społeczne obecne są w wielu zaburzeniach neurologicznych oraz psychiatrycznych. Efektywne życie w grupie możliwe jest dzięki zdolności do rozpoznawania znajomych osobników własnego gatunku, określanej jako pamięć społeczna. Jest to umiejętność kluczowa z ewolucyjnego punktu widzenia, ponieważ pozwala na uruchomienie optymalnej reakcji na napotkanego osobnika, co z kolei sprzyja przetrwaniu i adaptacji w środowisku społecznym.

Wcześniejsze badania wskazują na udział układu opioidowego  $\kappa$  w utrzymywaniu śladów pamięci społecznej. Wykazano, że myszy ( $Pdyn^{-/-}$ ) pozbawione genu kodującego prodynorfina, będącą ligandem receptora opioidowego  $\kappa$  (KOR), zachowują ślady pamięci społecznej dłużej niż myszy typu dzikiego. Jednak mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska nie został jeszcze poznany. Wiadomo, że dynorfina moduluje szereg procesów w różnych częściach mózgu. W związku z tym powstaje pytanie: który z nich jest krytyczny dla pamięci społecznej? Jednym z najlepiej poznanych neurohormonów zaangażowanych w formowanie i modulowanie interakcji społecznych jest oksytocyna. Można zatem przypuszczać, że interakcja między układem dynorfinowym a oksytocynowym jest jednym z mechanizmów modulujących pamięć społeczną.

Dlatego też w niniejszej pracy zbadano pamięć społeczną u nowo wygenerowanego szczepu  $Oprk1^{OxtCre}$  charakteryzującego się selektywną dezaktywacją receptorów KOR na neuronach z ekspresją oksytocyny. Wstępne wyniki wskazują, że mutanty  $Oprk1^{OxtCre}$ , podobnie jak wspomniane wyżej myszy  $Pdyn^{-/-}$  przejawiają dłuższą pamięć społeczną niż myszy typu dzikiego. Wyniki te sugerują, że modulacja systemu oksytocynowego przez układ dynorfina/KOR odgrywa ważną rolę w przechowywaniu śladu pamięci społecznej. Zaobserwowano ponadto różnicę pomiędzy płciami. Konieczne są dalsze badania, aby w pełni zrozumieć rolę współdziałania pomiędzy systemem dynorfinowym a oksytocyną w pamięci społecznej.

**Słowa kluczowe:** dynorfina, oksytocyna, endogenne układy opioidowe, pamięć społeczna

## Abstract

Forming complex social relationships is one of the fundamental abilities of both humans and other group-living animals, and social dysfunctions are present in many neurological and psychiatric disorders. The advantage conferred by acting as a group is made possible by the ability to recognize familiar individuals of the same species, known as social memory. This skill is crucial from an evolutionary perspective because it allows for the activation of optimal responses to encountered individuals, which in turn supports survival and adaptation in a social environment.

Previous research indicates the involvement of the  $\kappa$  opioid system in maintaining social memory traces. It has been shown that mice ( $Pdyn^{-/-}$ ) lacking the gene encoding prodynorphin, an endogenous ligand for the  $\kappa$  opioid receptor (KOR), retain social memory traces longer than wild-type mice. However, the mechanism underlying this phenomenon is not yet fully understood. Dynorphin is known to modulate a range of processes in various parts of the brain. Therefore, the question arises: which of these processes are critical for social memory? One of the best-known neurohormones involved in forming and modulating social interactions is oxytocin. It can therefore be assumed that the interaction between the dynorphin/KOR system and the oxytocin system could be the mechanisms modulating social memory.

Therefore, this study investigated social memory in a newly generated  $Oprk1^{OxtCre}$  strain characterized by selective inactivation of KOR receptors on oxytocin-expressing neurons. Preliminary results suggest that  $Oprk1^{OxtCre}$  mutants, similar to the aforementioned  $Pdyn^{-/-}$  mice, exhibit longer social memory than wild-type mice. These findings suggest that modulation of the oxytocin system by the dynorphin/KOR system plays a key role in social memory trace retention. An unexpected difference between sexes was also observed. Further research is needed to fully understand the interplay between the dynorphin system and oxytocin in social memory.

**Keywords:** dynorphin, oxytocin, endogenous opioid system, social memory

## Wykaz skrótów

AOB – *Accessory Olfactory Bulb* – Dodatkowa opuszka węchowa/Narząd womeronasalny

AOS – *Accessory Olfactory System* – Dodatkowy system węchowy

DG – *Dentate Gyrus* – Zakręt zębaty

Dyn – *Dynorphin* – Dynorfina

EC – *Entorhinal Cortex* – Kora śródwęchowa

KO – *Knock-out* – unieczynnienie danego genu

KOR – *κ/kappa opioid receptor* – receptor κ/kappa opioidowy

MeA – *Medial Amygdala* – Przyśrodkowa część ciała migdałowatego

MOR – *μ/mu Opioid Receptor* – Receptor μ/mu opioidowy

MOS – *Main Olfactory System* – Główny system węchowy

MUP – *Major Urinary Proteins*

NorBNI – *Norbinaltorphimine* – Norbinaltorfimina

OB – *Olfactory Bulb* – Opuszka węchowa

OXT – *Oxytocin* – Oksytocyna

OXTR – *Oxytocin Receptor* – Receptor oksytocyny

Pdyn – *Prodynorphin* – Prodynorfina

PVN – *Paraventricular Nucleus* – Jądro przykomorowe podwzgórza

SON – *Supraoptic Nucleus* – Jądro nadwzrokowe podwzgórza

TG – *Transgenic* – myszy zmodyfikowane genetycznie

WT – *Wild type* – myszy typu dzikiego

## Wstęp

### 1.1. Znaczenie pamięci społecznej: adaptacja mózgu do funkcjonowania w grupie

Kodowanie cech nowo napotkanego osobnika poprzez obserwację i interakcję umożliwia przechowywanie i przywoływanie informacji o nim. Mechanizm ten, zwany pamięcią społeczną, jest kluczowy dla rozpoznawania i dostosowywania reakcji w grupie, co optymalizuje zachowanie zwierząt w skomplikowanych relacjach społecznych. Pamięć społeczna odgrywa kluczową rolę ewolucyjną, umożliwiając łączenie się w pary, ustalanie hierarchii, wychowywanie potomstwa oraz rozpoznawanie rywali i zagrożeń (Camatas, 2017). Pamięć społeczna umożliwia także przechowywanie informacji o stanie zdrowia innych osobników, co jest szczególnie istotne, gdyż gryzonie potrafią odróżniać osobniki chore od zdrowych (Choleris, 2009). Pasożyty i infekcje mogły odegrać znaczącą rolę w rozwoju tej pamięci, wywierając selekcyjną presję, co tłumaczy preferowanie towarzystwa osobników znajomych i stronięcie od obcych osobników przez wiele gatunków zwierząt, w tym ludzi. Rozpoznawanie członków grupy ma również istotne znaczenie ewolucyjne w kontekście unikania krzyżowania się w bliskim pokrewieństwie. Zasada unikania kaziurodzstwa chroni zdrowie genetyczne populacji: wiele gatunków, zarówno samce, jak i samice, preferuje unikanie reprodukcji z blisko spokrewnionymi osobnikami (Choleris, 2009).

Wiele gatunków zwierząt, które naturalnie tworzą grupy społeczne, wykazuje zdolność do rozpoznawania osobników własnego gatunku. W warunkach laboratoryjnych neuronalne podłoże pamięci społecznej bada się głównie na szczurach i myszach. Jednym z najpopularniejszych modeli laboratoryjnych są myszy szczepu C57BL/6 oraz szczury Wistar. Mimo różnic w zdobywaniu informacji o otoczeniu, zarówno gryzonie, jak i ludzie używają podobnych obszarów mózgu do rozpoznawania społecznego. Dzięki temu gryzonie są doskonałym modelem do badania neurobiologicznego podłoża pamięci społecznej w normie i patologii.

Test badający pamięć społeczną został zaproponowany pierwotnie przez Thor i Hallaway (1982). Wykorzystuje on naturalną tendencję gryzoni do intensywnego badania nowego osobnika, która maleje przy kolejnych spotkaniach (tzw. sesjach). Różnice w zachowaniu między pierwszym a kolejnym spotkaniem służą do oceny pamięci społecznej. Test ten pozwala między innymi na obserwację wpływu substancji zmieniających działanie układu nerwowego i modyfikacji genetycznych na pamięć społeczną. Choć powstało wiele wariantów tego testu, wszystkie opierają się na analizie eksploracji innego osobnika (tzw. partnera). Warto

zauważyć, że różne laboratoria stosują różne długości trwania sesji, interwałów czasowych pomiędzy sesjami i różne bodźce społeczne (Camatas, 2015). Ponieważ ocena pamięci na podstawie różnicy w czasie obwąchiwania może być kontrowersyjna, niektórzy badacze wyznaczają dodatkowe kryteria, takie jak pomiar wokalizacji (Cum, 2024). U szczurów i myszy, oprócz różnic w czasie interakcji, można zaobserwować różnice w długości pojedynczej interakcji – z spotkanym wcześniej partnerem interakcje są częstsze, ale krótsze (Netser, 2020).

Pamięć społeczna wyraźnie różni się od innych typów pamięci: jest dłuższa od pamięci roboczej (około 30 minut), ale krótsza od pamięci przestrzennej, która utrzymują się dłużej (wykrywana jest nawet po 24 godzinach). W związku ze złożonością sieci społecznych, pamięć społeczna może działać niezależnie od pamięci obiektów nieożywionych. U gryzoni pamięć społeczną można podzielić na krótkotrwałą i długotrwałą (Noack, 2010). Jednak w literaturze istnieją duże rozbieżności, jeśli chodzi o przedział czasowy, który odróżniałby te dwa rodzaje pamięci. Ponieważ większość badań stosuje interwał czasowy pomiędzy sesjami eksperymentalnymi mniejszy niż 6 h, przyjmuje się, że badają one pamięć krótkotrwałą (Cum, 2024). Pomimo rozbieżności w rozumieniu pojęć „pamięć krótkotrwałą” i „pamięć długotrwałą” u gryzoni potwierdzono, że występuje istotna różnica w mechanizmach neuronalnych zaangażowanych w oba rodzaje pamięci: pamięć krótkotrwałą operuje innymi ścieżkami neuronalnymi niż pamięć długotrwałą. Dlatego określenie typu badanej pamięci jest kluczowe dla uzyskania wiarygodnych wyników i ich odpowiednich interpretacji. W niniejszej pracy badano pamięć długotrwałą.

Gryzonie korzystają głównie ze zmysłu węchu, by orientować się w swoim otoczeniu, w tym także w relacjach społecznych. Rozpoznają członków grupy dzięki zapachom przetwarzanym przez dwa oddzielne szlaki neuronalne: główny (ang. *main olfactory system*, MOS), który wykrywa substancje lotne i dodatkowy system węchowy (ang. *accessory olfactory system*, AOS), który wykrywa substancje nielotne (Noack, 2010). Myszy i szczury z uszkodzeniami węchu lub opuszki węchowej mają zaburzenia pamięci społecznej (Popik, 1991; Noack, 2010). Każdy osobnik ma unikalny "zestaw zapachowy", składający się z substancji lotnych i nielotnych (Popik, 1991). Kluczową rolę w procesie wzajemnego rozpoznawania się osobników odgrywają białka MUP (ang. *major urinary proteins*) (Hurst, 2001). Białka te mają charakter nielotny, u zwierząt dzikich cechują się dużym polimorfizmem i występują w moczu w znacznych ilościach, co pozwala na efektywną komunikację chemiczną między osobnikami. Jednakże, ze względu na chów wsobny myszy takie jak C57BL/6 cechują się ograniczoną zmiennością genetyczną białek MUP (Cheetham, 2008). Dlatego prawdopodobnie myszy z



hodowli wsobnych przy rozpoznawaniu osobnika polegają nie tylko na bodźcach chemicznych, ale także integracji wrażeń węchowych, somatosensorycznych i słuchowych. Badania pokazują, że myszy mają trudności z rozróżnieniem nowych partnerów od znanych, jeśli te były wcześniej poddane anestezji (de la Zerda, 2022). Pomimo dostępu do zapachów, myszy nie potrafią przypisać ich do konkretnego osobnika, jeśli ten nie był aktywny w interakcji. To sugeruje, że pełne rozpoznanie danego osobnika wymaga dynamicznej interakcji i integracji różnych charakterystycznych dla niego sygnałów sensorycznych.

Pierwszym poziomem przetwarzania bodźców chemicznych jest opuszka węchowa (OB – *olfactory bulb*), która odbiera i przesyła informacje do struktur korowych i podkorowych, z których większość ma trójwarstwową budowę. W przeciwieństwie do innych zmysłów, informacja węchowa dociera do kory mózgowej bezpośrednio, omijając wzgórze. Do OB docierają połączenia z korowych i podkorowych systemów neuromodulujących, zgodnie ze schematem określanym jako „top-down” (Bhattarai, 2022; Lefevre, 2021), które mogą zwiększać poziom uwagi kierowanej na bodźce społeczne (Oetl, 2016).

Pamięć jest nierozzerwalnie związana z hipokampem, kluczową strukturą mózgu, która odgrywa centralną rolę w przetwarzaniu i konsolidacji pamięci, w tym pamięci społecznej. Już we wczesnych badaniach potwierdzono, że u myszy hipokamp odgrywa istotną rolę w przechowywaniu informacji o interakcjach społecznych (Kogan, 2000). U ludzi najbardziej znanym przykładem zaangażowania hipokampa w pamięć społeczną jest przypadek słynnego pacjenta HM, który po usunięciu części hipokampa nie był w stanie zapamiętać twarzy nowo poznanych osób (Corkin, 1984). Wiadomo, że konsolidacja pamięci długotrwałej, w przeciwieństwie do pamięci krótkotrwałej, wymaga syntezy białek. Podobnie jest z pamięcią społeczną (Kogan, 2000), która prawdopodobnie wymaga dwóch odrębnych etapów syntezy białek. Ogólnoustrojowe podanie anizomycyny (ANI), substancji blokującej syntezę białek u eukariontów, 20 minut przed oraz bezpośrednio po pierwszej sesji interakcji, prowadziło do upośledzenia pamięci po 24 godzinach. Podobny efekt zaobserwowano po podaniu ANI 6 godzin po sesji, ale nie po 3 ani 18 godzinach (Richter, 2005). W innym badaniu podanie ANI po 9, 12 i 15 godzinach również zaburzało konsolidację pamięci społecznej (Wanisch, 2008). Sugeruje to, że pierwsza faza konsolidacji trwa przez pierwsze 1-2 godziny, a druga rozpoczyna się około 6-7 godzin po kodowaniu i trwa około 12 godzin. W rezultacie ślad pamięci społecznej osiąga stabilność po około 18 godzinach od momentu kodowania. Właśnie taki interwał czasowy pomiędzy sesjami eksperymentalnymi zastosowano w niniejszych badaniach.

Poszukiwano także odpowiedzi na pytanie, jakie struktury mózgu są odpowiedzialne za opisane powyżej skutki zaburzenia syntezy białek. Podanie ANI bezpośrednio po sesji lub 6 godzin później do opuszki węchowej (OB) prowadziło do upośledzenia pamięci społecznej. Z kolei podanie ANI do grzbietowego hipokampa, a konkretnie do obszaru CA1, upośledzało pamięć tylko wtedy, gdy substancja została podana 3 godziny po sesji (Pena, 2014). Wyniki te sugerują, że zarówno hipokamp, jak i OB są kluczowe dla konsolidacji pamięci, jednak w różnych przedziałach czasowych. Warto również zauważyć, że krótkotrwała pamięć społeczna nie wymaga syntezy białek w omawianych strukturach, ponieważ podanie ANI do OB lub hipokampa zaraz po pierwszej sesji nie zaburzało rozpoznawania osobnika po 90 minutach (Pena, 2014).

Jednym z kluczowych odkryć w badaniach nad pamięcią społeczną było opisanie fundamentalnej roli niewielkiego regionu hipokampa, CA2, który odgrywa fundamentalną rolę w tej formie pamięci. Badania wykazały, że pole CA2 jest wyspecjalizowane w przetwarzaniu pamięci społecznej. Myszy z genetycznie dezaktywowanymi komórkami piramidowymi w tym regionie tracą zdolność rozpoznawania innych osobników, podczas gdy inne rodzaje pamięci pozostają u nich nienaruszone (Hitti i Siegelbaum, 2014). Wiadomo ponadto, że każda interwencja w regionie CA2, czy to optogenetyczna, farmakologiczna, czy genetyczna, ma bezpośredni wpływ na pamięć społeczną (Smith, 2016). Region CA2 charakteryzuje się specyficzną elektrofizjologią, ekspresją genów oraz połączeniami z innymi strukturami mózgu (Dudek, 2016). CA2 jest także silnie unerwione przez jądro przykomorowe podwzgórza (ang. paraventricular nucleus, PVN) (Lee, 2008; Cui i in., 2013; Tzakis i Holahan, 2019). Neurony piramidowe w CA2 wykazują wysoką ekspresję receptorów neuropeptydów związanych z zachowaniami społecznymi, takich jak oksytocyna i wazopresyna. Do pola CA2 dochodzą również połączenia z kory śródwęchowej, która przetwarza informacje węchowe z opuszki węchowej i kory gruszkowatej. W efekcie CA2 integruje bodźce węchowe z informacjami społecznymi, co pozwala na adekwatne reakcje behawioralne. (Dudek i in., 2016; Cui i in., 2013). CA2 odgrywa ważną rolę w rozróżnianiu nowego kontekstu od znanego, co jest istotne dla elastycznego dostosowywania się do zmian w otoczeniu i relacjach społecznych (Tzakis & Holahan, 2019). Plastyczność CA2 związana jest z pobudzeniem wejść z kory śródwęchowej i kory kolaterali Schaffera oraz aktywnością receptora  $\delta$ -opiodowego w tym regionie (Leroy, 2017). Przez wzgląd na to jak krytyczne funkcje pełni w pamięci społecznej spekuluje się, że dysfunkcja CA2 może leżeć u podłoża deficytów społecznych obserwowanych w przebiegu chorób neuropsychiatrycznych, takich jak schizofrenia (Dudek, 2016).

Interakcje społeczne są nierozzerwalnie związane z emocjami, a ciało migdałowate odgrywa kluczową rolę w przetwarzaniu tych emocji, szczególnie strachu. Jest to struktura mózgu niezbędna dla szerokiego zakresu zachowań społecznych. Uszkodzenia ciała migdałowatego u ludzi mogą prowadzić do trudności w rozpoznawaniu emocji, co utrudnia funkcjonowanie społeczne (Adolphs, 2010). Dysfunkcje w tej części mózgu są również związane z zaburzeniami, takimi jak autyzm, w których występują problemy z interpretacją sygnałów społecznych i emocjonalnych (Adolphs, 2010). Ciało migdałowate współpracuje z innymi strukturami mózgu, takimi jak kora przedczołowa, co umożliwia złożone przetwarzanie informacji społecznych. W kontekście bodźców węchowych u gryzoni, kluczową rolę odgrywa przyśrodkowa część ciała migdałowatego (ang. *Medial Amygdala*, MeA). Większość neuronów w MeA aktywuje się podczas przetwarzania informacji społecznych (Li, 2017). Sygnały z AOB docierają bezpośrednio do MeA, dalej informacje przekazywane są do struktur podwzgórza związanych z zachowaniami społecznymi (Keshavarzi, 2014). MeA funkcjonuje więc jako stacja przekaźnikowa między opuszką węchową a innymi obszarami mózgu, modulując ślady pamięciowe.

Podsumowując, pamięć społeczna jest niezbędna dla funkcjonowania w grupie, umożliwiając rozpoznawanie oraz odpowiednią reakcję na inne osobniki. Badania na gryzoniach dostarczają cennych informacji o mechanizmach neurobiologicznych tego procesu, a struktury takie jak hipokamp i ciało migdałowate odgrywają w nim kluczową rolę. Zrozumienie tych mechanizmów ma istotne znaczenie nie tylko dla lepszego poznania funkcjonowania mózgu, ale także dla zidentyfikowania potencjalnych przyczyn zaburzeń społecznych w chorobach neuropsychiatrycznych, co może przyczynić się do rozwoju nowych metod terapeutycznych.

## **1.2. Dynorfina: neuromodulator innych neuromodulatorów**

Odkrycia endogennych opioidów dokonane w latach 70 i 80. ubiegłego wieku dramatycznie zmieniły postrzeganie funkcji i struktury neuropeptydów. Decydującą rolę w tych pionierskich badaniach nad opioidami odegrał dr Avram Goldstein, który pracując na ekstraktach z bydlęcej i świńskiej przysadki, odkrył związek chemiczny o niezwykle dużym powinowactwie do receptorów opioidowych. Na podstawie tego odkrycia Goldstein postanowił nazwać nowo odkrytą substancję dynorfiną. Nazwa ta pochodzi od greckiego słowa „*dynamis*” mającego podkreślić jej wysokie powinowactwo i dużą siłę działania oraz końcówki -orfina wskazującej na jej opioidową naturę (Goldstein, 1979; Chavkin, 2013).

Dynorfina (Dyn), podobnie jak inne neuropeptydy, powstaje z nieaktywnego prekursora, prodynorfiny (pDyn), kodowanego przez gen *Pdyn*. Prekursor ulega przekształceniu przez endopeptydazy, takie jak konwertaza prohormonu 1, konwertaza prohormonu 2 i karboksypeptydaza E, w efekcie czego powstają biologicznie aktywne produkty. Z pDyn powstaje zestaw zróżnicowanych peptydów opioidowych, w tym duże pośrednie peptydy (big-dynorphin i leumorfina), selektywne formy dla receptorów (dynorfina A, dynorfina B, alfa-neoendorfina) oraz krótkie, nieselektywne formy (dynorfina A (1-8)). Każdy z tych produktów ma inny profil powinowactwa do receptorów opioidowych (Cahill, 2022; Fricker, 2020).

Według klasycznego modelu, przetwarzanie pDyn rozpoczyna się w dalszych częściach aparatu Golgiego i kontynuowane jest w pęcherzykach transportowanych do zakończeń (Fricker, 2020). Uwolnienie produktów pDyn z pęcherzyków o dużym rdzeniu następuje pod wpływem egzocytozy zależnej od jonów wapnia. Ponieważ zaobserwowano obecność zarówno prodynorfiny, jak i dynorfiny w tym samym zakończeniu aksonalnym, a nawet w tym samym pęcherzyku, możliwe jest, że pDyn transportowana jest w pęcherzykach do zakończenia synaptycznego a rozpoczęcie jej przetwarzania zachodzi dopiero w odpowiedzi na bodziec zewnętrzny. Taki mechanizm zapewniałby lokalną regulację transmisji synaptycznej w zależności od potrzeby komórki (Yakovleva, 2006). Dynorfina może być też uwalniana niekonwencjonalnie z zakończeń dendrytycznych czy z ciała komórkowego neuronu. Ma to szczególne znaczenie np. w przekaźnictwie sygnału w warstwie ziarnistej hipokampa. Dynorfina uwolniona do przestrzeni międzykomórkowej wiąże się ze swoim głównym receptorem: receptorem  $\kappa$  opioidowym (KOR), do którego wykazuje największe powinowactwo. Ponadto wykazano, że dynorfina może też wiązać się innymi receptorami opioidowymi ( $\mu$  i  $\delta$ ), jednak z mniejszym powinowactwem.

Receptor  $\kappa$  opioidowy (KOR) należy do rodziny receptorów posiadających 7 helis transbłonowych (ang. *7 transmembrane, 7TM*) sprzężonych z białkami G. Aktywacja KOR prowadzi do wymiany GDP na GTP w podjednostce  $G\alpha_i$  oraz dysocjacji podjednostek  $G\beta\gamma$  od  $G\alpha$ . Aktywowany  $G\alpha_i$  hamuje cyklazę adenylową, co zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP, hamując wewnątrzkomórkowe kaskady przekazywania sygnału. Podjednostki  $G\beta\gamma$  aktywują kanały potasowe GIRKs (ang. *G-protein coupled inwardly rectifying potassium channels, GIRK*) oraz hamuje kanały wapniowe, co obniża pobudliwość neuronu (Dong, 2024; Wang, 2023; Liu-Chen, 2022; Chavkin, 2013). Sekwencja genu KOR wykazuje dużą

homologię między ludźmi a szczurami i myszami – 94% aminokwasów jest identycznych. To umożliwia efektywne przenoszenie wyników badań z gryzoni na ludzi (Simonin, 1995).

System Dyn/KOR jest powszechnie uznawany za kluczowy regulator wydzielania innych neuromodulatorów. Moduluje on uwalnianie dopaminy w obszarach takich jak jądro brzuszne nakrywki i jądro połączone (Crowley, 2015; Clark, 2019), serotoniny w grzbietowym jądrze szwu (Crowley, 2015) oraz oksytocyny w jądrze przykomorowym (PVN) i nadwzrostowym (SON) podwzgórza (Bicknell, 1982). Dzięki temu dynorfina pełni rolę „neuromodulatora neuromodulatorów,” co oznacza, że jej działanie wpływa na aktywność niemal całego ośrodkowego układu nerwowego.

Dynorfina postrzegana jest jako jeden z mediatorów zachowań związanych ze stresem i lękiem (Bilkei-Gorzo, 2012). Przypisuje się jej również dużą rolę w mechanizmie powstawania uzależnień. Zaburzone funkcjonowanie układu κ obserwuje się w przebiegu wielu schorzeń takich jak depresja, epilepsja czy schizofrenia (Chavkin, 2016). Dlatego środki farmakologiczne selektywne wobec KOR mogą być obiecującymi lekami w przebiegu terapii tych schorzeń (Crowley 2015; Clark, 2019).

Aktywacja receptora κ opioidowego jest związana z pogorszeniem pamięci i zdolności uczenia się. Stres u myszy prowadzi do deficytów w uczeniu się i pamięci związanych z aktywacją KOR, a podanie norbinaltorfiminu (ang. *Norbinaltorphimine*, NorBNI), czyli antagonisty tego receptora, skutecznie zapobiega tym problemom (Carey, 2009). Aktywacja KOR ogranicza długotrwały potencjał synaptyczny w hipokampie, czyli zjawisko fizjologiczne leżące u podłoża uczenia się oraz zmniejsza wydzielanie neuroprzekaźników takich jak glutaminian czy dopamina (Wagner, 1993; Weisskopf, 1993; Yang, 2022). Dodatkowo, system Dyn/KOR wpływa na związane z wiekiem osłabienie pamięci i funkcji poznawczych. Myszy pozbawione dynorfiny ( $P_{dyn}^{-/-}$ ) nie wykazywały spadku wydajności poznawczej ani trudności w uczeniu się związanych ze starzeniem się, a starsze myszy  $P_{dyn}^{-/-}$  uzyskiwały wyniki porównywalne z młodszymi myszami kontrolnymi w testach rozpoznawania obiektu i pamięci przestrzennej (Ménard, 2013). Wyniki badań dotyczących wpływu dynorfiny na pamięć i uczenie się nie zawsze są jednak jednoznaczne. Pewne jest natomiast, że system Dyn/KOR odgrywa istotną rolę w regulacji plastyczności synaptycznej.

Dotychczas na temat roli układu Dyn/KOR w pamięci społecznej ukazała się tylko jedna praca: Bilkei-Gorzo i współpracownicy (2014) udowodnili, że dynorfina odgrywa kluczową rolę w pamięci społecznej myszy. W badaniu tym wykazano, że maksymalna długość pamięci

społecznej u myszy kontrolnej wynosi około 4 godziny, podczas gdy u myszy  $Pdyn^{-/-}$  aż 24 godziny. Co więcej, podanie NorBNI myszom z normalnym poziomem prodynorfiny ( $Pdyn^{+/+}$ ) wydłużyło ich pamięć społeczną do poziomu obserwowanego u myszy  $Pdyn^{-/-}$ . Natomiast myszy  $Pdyn^{-/-}$ , którym podano agonistę KOR U-50488, wypadły gorzej w testach pamięci społecznej. Mimo znacznego polepszenia w pamięci społecznej, w teście rozpoznawania obiektu myszy  $Pdyn^{-/-}$  osiągnęły wyniki podobne do grupy kontrolnej. To sugeruje, że wpływ dynorfiny jest swoisty dla pamięci społecznej. W omawianej pracy autorzy oznaczyli także zmiany poziomu dynorfiny w reakcji na kontakt z nieznanym osobnikiem oraz obiektem przy pomocy barwienia immunochemicznego. Interakcja z nieznanym osobnikiem zaraz po teście powodowała zwiększenie poziomu dynorfiny A (Dyn A) w hipokampie oraz ciele migdałowatym w porównaniu do eksploracji nowego bodźca niespołeczny. W przypadku dynorfiny B (Dyn B) zwiększenie odnotowano tylko w hipokampie (Bilkei-Gorzo, 2014).

Jak już wspomniano, dynorfiny w układzie nerwowym są powszechnie postrzegane jako mediatory zachowań związanych z lękiem, uzależnieniem, dysforią i depresją. Tradycyjnie uważano, że modulacja tych zachowań przez receptor KOR wynika z jego roli w systemie negatywnej walencji. Nowsze badania wydają się jednak podważać tę hipotezę. Podanie NorBNI przyspieszyło uczenie się u myszy w teście ze wzmocnieniem negatywnym, jak i w drugim teście ze wzmocnieniem pozytywnym (Farahbakhsh, 2023). To sugeruje, że wpływ modulacji KOR na szybkość uczenia się jest niezależny od walencji bodźca. Efekt ten dotyczył szybkości nabywania i nie wpływał na końcowy wynik ani na liczbę popełnianych błędów. Dodatkowo, antagonizm KOR zwiększał eksplorację nowych bodźców, co może tłumaczyć szybsze uczenie się oraz zmiany w motywacji. Autorzy przedstawili nową hipotezę, wyjaśniającą rolę systemu Dyn/KOR w uczeniu, zgodnie z którą system Dyn/KOR może odgrywać ważniejszą rolę w modulacji przetwarzania nowych bodźców niż w przetwarzaniu bodźców o negatywnej walencji i związanych ze stresem, w efekcie zahamowanie tego systemu może przyczyniać się do szybszego tempa dyskryminacyjnego uczenia się (Farahbakhsh, 2023).

W innym badaniu wykazano, że dynorfiny w prążkowie regulują długotrwałą plastyczność synaptyczną oraz ogólną plastyczność poznawczą osobnika (Yang, 2022; Olusakin, 2023). Myszy z selektywną inaktywacją genu dynorfiny w prążkowie ( $Pdyn$  cKO) nie różniły się pod względem lęku, aktywności ruchowej czy pamięci roboczej od myszy kontrolnych, ale szybciej uczyły się rozróżniania bodźców, lepiej dostosowywały się do nowych sytuacji i popełniały mniej błędów. Zmiany te nie były związane z motywacją czy

wartością nagrody. Natomiast podanie agonisty KOR obniżało plastyczność poznawczą u tych myszy. Elastyczność poznawcza modulowana przez KOR nie ogranicza się jednak tylko do prążkowiec, ponieważ wydzielanie dynorfin w korze przedczołowej również powiązane z zaburzeniami poznawczymi u myszy (Abraham, 2021). Warto również zauważyć, że myszy *Pdyn<sup>-/-</sup>* wykazywały dłuższy czas interakcji z partnerem oraz intensywniejszą eksplorację obiektów (Bilkei-Gorzo, 2014), a także większe tempo spadku eksploracji partnera oraz obiektu w kolejnych sesjach. Wyniki te wsparły hipotezę Farahbakhsh i współautorów (2023), zanim jeszcze została sformułowana.

Opisane wyniki eksperymentów na zwierzętach wydają się zgodne z obserwacjami u ludzi. U pacjentów z zaburzeniami nastroju, którzy uczestniczyli w badaniach klinicznych nad nowym antagonistą KOR, zauważono zwiększoną plastyczność poznawczą oraz szybsze uczenie się bez wpływu na poczucie szczęścia związane z nagrodą (Pizzagalli, 2020). Z kolei warianty alleli genu *PDYN* kodujące wyższe poziomy dynorfiny u ludzi były powiązane z mniejszą elastycznością poznawczą oraz trudnościami w uczeniu się w zmieniających się warunkach (Votinov, 2015).

Podsumowując, system Dyn/KOR odgrywa kluczową rolę w modulacji funkcji poznawczych i behawioralnych poprzez wpływ na inne układy neuromodulatorowe. Jego udział w regulacji plastyczności synaptycznej, uczenia się i pamięci – zwłaszcza pamięci społecznej – stawia go w centrum badań nad mechanizmami odpowiedzialnymi za adaptację do nowych bodźców i zachowanie pod wpływem stresu.

### **1.3. Oksytocyna jako architekt pamięci społecznej**

Oksytocyna (OXT) to nonapeptyd, który mimo swojej skromnej wielkości kryje za sobą długą historię. To właśnie oksytocyna była pierwszym hormonem, którego sekwencję z sukcesem poznano, a następnie zsyntetyzowano w laboratorium, co przyniosło amerykańskiemu biochemikowi Vincentowi du Vigneaudowi Nagrodę Nobla w 1955 roku. Jak podkreślają Jurek i Neumann (2018), dzięki długiej historii badań oksytocyna jest prawdopodobnie jednym z najlepiej poznanych neuropeptydów. Oksytocyna powstaje z białkowego prekursora jako produkt genu *OXT*, w tandemie z neurofizyną. Po procesie syntezy i posttranslacyjnych modyfikacjach zostaje zapakowana do pęcherzyków o dużym rdzeniu i transportowana do zakończeń aksonalnych oraz dendrytycznych. Co ciekawe, istnieją dowody na to, że oksytocyna może być syntetyzowana lokalnie w zakończeniach aksonów i dendrytów,

o czym świadczy obecność mRNA OXT w tych strukturach (Jurek, B. i Neumann, 2018). Taka lokalna synteza, zwłaszcza w dendrytach, może odgrywać istotną rolę w plastyczności synaptycznej, wpływając na zdolność mózgu do adaptacji i kształtowania nowych połączeń.

Wydzielanie oksytocyny do przestrzeni synaptycznej z pęcherzyków w zakończeniach aksonalnych odbywa się zgodnie z klasycznym procesem egzocytozy kontrolowanym przez jony wapnia. Podobny proces zachodzi w dendrytach, gdzie uwalnianie oksytocyny zależy od kanałów wapniowych typu N i L. Tym samym mechanizm somatodendrycznego wydzielania oksytocyny przypomina ten obserwowany w przypadku dynorfin. Oksytocyna wiąże się wyłącznie do receptora dla oksytocyny (ang. *Oxytocin Receptor*, *OXTR*), który jest klasycznym receptorem metabotropowym powiązany z białkiem G. Gdy podjednostka  $G_q\alpha$  tego receptora zostaje aktywowana, prowadzi to do uruchomienia fosfolipazy C i uwolnienia wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$ . Proces desensytyzacji i internalizacji receptora jest z kolei związany z przyłączeniem  $\beta$ -arestyny do ufosforylowanego OXTR. Internalizacja receptora jest kluczowym krokiem w aktywacji szlaku sygnalizacyjnego kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *Mitogen-activated protein kinases*, MAPK), który odgrywa istotną rolę w regulacji odpowiedzi komórkowych.

Oksytocyna jest wytwarzana przez komórki jądra przykomorowego oraz nadwzrokowego podwzgórza. U kręgowców peptyd ten pełni dwie zasadnicze role: jako hormon uwalniany przez tylny płat przysadki wpływa na procesy, takie jak poród, laktacja czy też na szereg innych zjawisk metabolicznych i fizjologicznych. Oksytocyna nie ogranicza się jednak tylko do obwodowego działania – w ośrodkowym układzie nerwowym może funkcjonować jako neuromodulator, oddziałując na rozmaite aspekty zachowań i emocji (Jurek, B. i Neumann, 2018; Love, 2014).

Wczesne badania sugerowały, że oksytocyna promuje zachowania prospołeczne i partnerskie (Leng, 2022), co sprawiło, że peptyd ten zyskał miano „hormonu miłości” w kulturze popularnej. W rezultacie pojawiły się propozycje stosowania oksytocyny w leczeniu zaburzeń takich jak autyzm czy antyspołeczne zaburzenie osobowości (Gordon, 2013; Gedeon, 2019). Z biegiem czasu okazało się jednak, że oksytocyna może mieć niewiele wspólnego z przypisywaną jej modulacją romantycznych uczuć. U osób poddanych terapii oksytocyną peptyd ten nie zawsze wspierał uczucia miłości i empatii. Wręcz przeciwnie – niektórzy uczestnicy badania zgłaszali większe uczucie zawiści wobec partnerów w grach, gdy przegrywali oraz większe zadowolenie z niepowodzeń przeciwników, określane jako *schadenfreude*. Dodatkowo, wysoki poziom endogennej oksytocyny powiązано z trudnościami



interpersonalnymi oraz cierpieniem w nieudanych relacjach (Shamay, 2015). W przypadku terapii oksytocyną osób z antyspołecznym zaburzeniem osobowości wyniki były mieszane: choć u niektórych pacjentów OXT rzeczywiście zwiększała prospołeczne zachowania, u innych prowadziła do wzrostu skłonności do przemocy (Gedeon, 2019).

W świetle rosnącej liczby dowodów na niejednoznaczne i czasami sprzeczne działanie oksytocyny, pojawiła się nowa hipoteza: oksytocyna może zwiększać wrażliwość na sygnały społeczne (ang. *social salience*) niezależnie od ich walencji, w zależności od kontekstu (Shamay, 2015) a badania zarówno na ludziach, jak i zwierzętach, zdają się potwierdzać tę tezę. Optogenetyczna aktywacja neuronów oksytocynowych nie tylko zwiększała zachowania społeczne, ale także nasilała agresję u myszy (Apilov, 2020), wspierając tym samym omawianą hipotezę. Oksytocyna pełni więc rolę dynamicznego mediatora w procesie dostosowywania zachowań do sytuacji, wzmacniając znaczenie bodźców społecznych. Jej działanie sprawia, że bodźce społeczne nabierają większej wagi, co prowadzi do bardziej ukierunkowanych i adaptacyjnych reakcji w interakcjach społecznych (Menon, 2023). Nie jest zatem zaskoczeniem, że oksytocyna została uznana za kluczowy element w rozpoznawaniu i pamięci społecznej.

Już we wczesnych pracach autorstwa Ferguson oraz Young (2000) wykazano, że myszy pozbawione genu kodującego oksytocynę ( $Oxt^{-/-}$ ) cierpią na amnezję społeczną oraz tracą zdolność rozpoznawania innych osobników, przy czym nie odnotowano u nich innych deficytów pamięci ani problemów z przetwarzaniem bodźców. Co istotne, mimo tych ograniczeń, myszy te potrafiły odróżnić zapach moczu dwóch różnych osobników, gdy bodźce były prezentowane osobno, na kawałkach waty. Sugeruje to, że myszy  $Oxt^{-/-}$  są zdolne do rozpoznawania i różnicowania zapachów, jednak brak oksytocyny uniemożliwia im przypisanie konkretnego zapachu do danego osobnika (Ferguson, 2002). Autorzy udowodnili tym samym, że pamięć społeczna ma inne podstawy neuronalne niż inne formy pamięci. Oksytocyna działa selektywnie w fazie kodowania informacji o osobniku, co potwierdzają eksperymenty, w których dokomorowe podanie OXT w małych dawkach myszy  $Oxt^{-/-}$  przed testem przywracało im zdolność rozpoznawania osobników. Z kolei podanie OXT 10 minut po teście nie wywoływało żadnych zmian.

W przytoczonych pracach zbadano także ekspresję genu wczesnej odpowiedzi komórkowej c-Fos podczas interakcji społecznych. Najbardziej znaczącą różnicę w aktywacji c-fos między myszami  $Oxt^{+/+}$  a  $Oxt^{-/-}$  zauważono w obszarze MeA, który charakteryzuje się wysoką ekspresją receptorów dla oksytocyny. Podanie OXT w tym regionie przywróciło

funkcje pamięci społecznej u myszy z delecją, podczas gdy interwencja ta w innych obszarach mózgu nie przyniosła podobnych rezultatów (Ferguson, 2001). Analogicznie do wcześniejszych wyników podanie antagonisty receptorów oksytocyny do komórek mózgu lub bezpośrednio do MeA zakłócało pamięć społeczną u myszy kontrolnych (Ferguson, 2000, 2001).

Włókna pochodzące z jądra przykomorowego docierają do kluczowych regionów układu limbicznego takich jak opuszka węchowa, ciało migdałowate i hipokamp – obszarów odgrywających centralną rolę w mechanizmach pamięci społecznej (Son, 2022; Lefevre, 2021). Obszary te charakteryzują się ekspresją receptorów oksytocyny, co wskazuje na ich istotny udział w przetwarzaniu informacji społecznych. Wiadomo także, że oksytocyna wywiera znaczący wpływ modulacyjny na hipokamp, który charakteryzuje się wysoką ekspresją receptorów oksytocyny. Aktywacja OXTR w hipokampie wpływa na pobudliwość neuronów, aktywność oscylacyjną sieci neuronowej oraz plastyczność synaptyczną (Talpo, 2023; Zagrean, 2022). Ekspresja receptorów dla oksytocyny w hipokampie charakteryzuje się swoistym wzorcem, ograniczającym się głównie do neuronów piramidowych w obszarach CA2 i CA3. Badania wykazały, że OXTR w przedniej części hipokampa (aDG oraz aCA2/CA3) odgrywa kluczową rolę w dyskryminacji bodźców społecznych (Raam, 2017). Myszy, u których selektywnie usunięto OXTR w obszarze CA2/CA3a, wykazywały deficyty w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym między korą śródwęchową a CA2, co upośledzało długotrwałą pamięć społeczną (Lin, 2018). Dodatkowo, oksytocyna zmienia wzorzec aktywności w CA2, zwiększając częstotliwość wyładowań (Tirko, 2018). Poza hipokampem oksytocyna indukuje plastyczność neuronalną w korze mózgowej, co ułatwia rozróżnianie między neuronalnymi reprezentacjami osobników znanych i nieznanymi (Wolf, 2024).

Neurony wydzielające oksytocynę wysyłają swoje włókna również do korowych obszarów przetwarzających informacje zmysłowe, takich jak kora słuchowa, węchowa czy somatosensoryczna. Oksytocyna uwalniana w tych regionach sprzyja przetwarzaniu bodźców o znaczeniu społecznym, zwiększając efektywność wyłapywania takich sygnałów z otoczenia. Ten efekt jest wyraźnie widoczny u gryzoni, gdzie uwolnienie oksytocyny w przednim jądrze węchowym aktywuje mechanizm znany jako top-down w opuszce węchowej, co z kolei wzmacnia uwagę skierowaną na zapach nowego osobnika, a optogenetyczna stymulacja tych włókien poprawia pamięć społeczną (Oettl, 2016).

Chociaż ludzie rozpoznając znajome osoby polegają na innych zmysłach niż gryzonie, badania wykazują, że związek między oksytocyną a zdolnością rozpoznawania innych

osobników jest uniwersalny wśród ssaków. W jednym z badań na ludziach donosowe podanie oksytocyny w postaci aerozolu przed testem skutkowało lepszymi wynikami w rozpoznawaniu twarzy, podczas gdy pamięć bodźców niespołecznych po podaniu oksytocyny nie różniła się od wyników uzyskanych po podaniu placebo (Rimmele, 2009). Co ciekawe, poprawa wyników w grupie otrzymującej oksytocynę była niezależna od ekspresji emocjonalnej twarzy (pozytywna, neutralna, negatywna). To badanie pokazało, że oksytocyna nasila uwagę skierowaną na bodźce społeczne niezależnie od ich emocjonalnej walencji. Tym samym wyniki te wspierają hipotezę „social salience” (Shamay, 2015). Stwierdzono ponadto, że u ludzi polimorfizm pojedynczego nukleotydu w genie kodującym receptor dla oksytocyny jest powiązany z gorszymi wynikami w testach rozpoznawania twarzy (Skuse, 2013). Co istotne, te wyniki nie były zależne od obecności zaburzeń ze spektrum autyzmu ani od poziomu inteligencji badanych.

Podsumowując, oksytocyna jest jednym z kluczowych neuromodulatorów w procesach poznawczych i emocjonalnych. Jej zdolność do wzmacniania znaczenia bodźców społecznych, zarówno poprzez oddziaływanie na struktury limbiczne, takie jak hipokamp, jak i poprzez modulację aktywności w obszarach sensorycznych, sprawia, że oksytocyna pełni funkcję dynamicznego mediatora w adaptacyjnych reakcjach społecznych. Choć jej działanie jest kontekstualne i nie zawsze jednoznaczne, wyniki badań potwierdzają, że oksytocyna odgrywa kluczową rolę w zdolności rozpoznawania i pamięci społecznej.

#### **1.4. Dynorfina, oksytocyna i pamięć społeczna**

Zadziwiające jest, jak dynorfina i oksytocyna, mimo znaczących podobieństw w procesach syntezy, wydzielania i właściwościach modulujących, mogą wywoływać tak odmienne efekty behawioralne. Wydzielanie oksytocyny jest silnie modulowane przez inne neuropeptydy, w tym endogenne peptydy opioidowe (Putnam, 2022). Neurony oksytocynowe posiadają receptory opioidowe typu  $\mu$  i  $\kappa$  (ale nie  $\delta$ ), co sprawia, że endogenne opioidy mogą hamować ich aktywność elektryczną i wydzielniczą. U szczurów uzależnionych od morfiny podanie antagonisty opioidowego naloksonu prowadziło do gwałtownej aktywacji neuronów w jądrze nadwzrokowym oraz wydzielania OXT do krwi w dużych ilościach (Bicnell, 1988). Jądro okołokomorowe i nadwzrokowe podwzgórza zawierają znaczące ilości prodynorfiny oraz wykazują ekspresję receptorów  $\kappa$  opioidowych (Burke, 2006; Chen, 2020). Co więcej, to właśnie neurony oksytocynowe, a nie wazopresynowe podlegają modulacyjnemu wpływowi endogennych opioidów, które wpływają na ich wydzielanie oraz pobudliwość (Bicknell, 1982).

Opioidy nie tylko bezpośrednio hamują sekrecję oksytocyny z neuronów podwzgórza u ssaków, ale również zmniejszają ich aktywność. Mogą ponadto regulować poziom ekspresji oksytocyny (You, 2000). Regulacja sygnalizacji oksytocynowej pozostaje zatem pod dużym wpływem modulacyjnego i wielopoziomowego oddziaływania dynorfin.

Wgląd w to, jak interakcja między systemem opioidowym a przekaźnictwem oksytocynowym wpływa na poznanie społeczne, oferuje badanie przeprowadzone przez Monte (2017) na małpach, u których zastosowano jednocześnie oksytocynę oraz nioselektywnego antagonistę receptorów opioidowych – nalokson. Małpy poddane działaniu obu substancji wykazywały znacznie większą uwagę skierowaną na wyświetlane twarze innych osobników, szczególnie na okolice oczu prezentowanej twarzy. Co więcej, jednoczesne podanie oksytocyny i naloksonu miało silniejsze działanie niż suma efektów oddzielnych podań oksytocyny lub naloksonu. Podanie naloksonu w obecności oksytocyny prawdopodobnie zwiększało poziom endogennej oksytocyny poprzez blokadę hamującego wpływu receptorów opioidowych na neurony oksytocynowe oraz jednoczesne pobudzenie receptorów oksytocynowych, co prowadziło do synergistycznego efektu. Efekt ten był związany z działaniem naloksonu na receptory  $\mu$  i  $\kappa$  znajdujące się na neuronach oksytocynowych. Na obserwowane zjawisko najprawdopodobniej większy wpływ miały receptory  $\mu$  niż  $\kappa$ , z uwagi na wyższe powinowactwo naloksonu do tych receptorów. Modułacja układu oksytocynowego przez środki działające na receptory opioidowe może stanowić obiecującą drogę do potencjalnego zwiększenia skuteczności terapii oksytocyną. Ponieważ neurony oksytocynowe w podwzgórzu wykazują podobny poziom ekspresji receptorów  $\mu$  i  $\kappa$ , teoretycznie blokowanie KOR powinno przynieść podobne efekty jak opisane w badaniu.

Do tej pory brakuje jednak badań, które w sposób kompleksowy analizowałyby interakcje między układem opioidowym  $\kappa$  a systemem oksytocynowym w kontekście pamięci społecznej, co pozostawia istotną lukę w zrozumieniu mechanizmów neurobiologicznych leżących u podstaw tych procesów.

## Cel i założenia pracy

Coraz więcej badań wskazuje na kluczową rolę układu Dyn/KOR w regulacji zachowań społecznych oraz jego potencjalny wpływ na pamięć społeczną. Pozytywny wpływ oksytocyny na pamięć społeczną został natomiast już szeroko zbadany i udokumentowany. Wiadomo również, że neurony oksytocynowe posiadają receptory KOR, co sugeruje, że dynorfina może modulować działanie układu oksytocynowego. Dotychczasowe badania nie wyjaśniają jednak w pełni, jak ta modulacja wpływa na zachowania społeczne, szczególnie w kontekście pamięci społecznej. Dlatego celem niniejszej pracy jest zbadanie wpływu braku receptorów  $\kappa$  opioidowych na neuronach oksytocynowych na długotrwałą pamięć społeczną. Przyjęto hipotezę, że myszy z mutacją  $Oprk1^{OxtCre}$ , dzięki zwiększonej wrażliwości na bodźce społeczne, będą lepiej zapamiętywać partnerów interakcji. W zaplanowanych badaniach uwzględniono też analizę efektów płci, kluczowego czynnika kształtującego zachowania społeczne.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Zwierzęta

Eksperyment przeprowadzono na dorosłych (9-22 tygodni) samcach i samicach myszy szczepu  $Oprk1^{OxtCre}$  (genotyp:  $OxtCre$  [wt/ki];  $Oprk1$  flox [flox/flox], określanych dalej w tekście jako mutanty lub *TG*) z selektywną delecją eksonu 3 genu *Oprk1*. Mutacja ta powoduje delecję w genie *Oprk1* za pomocą rekombinazy (Cre) wyrażanej pod promotorem genu kodującego oksytocynę. Szczep powstał poprzez skrzyżowanie dwóch szczepu myszy importowanych z Jackson Laboratories  $OxtCre$  (Ryan i in., 2017) z szczepem  $Oprk1$  flox (Ehrlich i in., 2015).

Myszy  $OxtCre$  [wt/ki] (pełna nazwa szczepu:  $OxtCre$  ( $Oxt^{tm1.1(cre)Dolsn/J}$ ) charakteryzują się ekspresją rekombinazy pod promotorem oksytocyny, co powoduje selektywną ekspresję Cre w neuronach oksytocynowych. Myszy  $Oprk1$  (pełna nazwa:  $Oprk1^{tm2.1Kff/J}$ ) posiadają sekwencje loxP flankujące egzon 3 genu *Oprk1*. Oba szczepy były krzyżowane kongenicznie z C57BL/6N i hodowane w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Jako grupa kontrolna posłużyły myszy o genotypach:  $OxtCre$  [wt/wt];  $Oprk1$ /flox [wt/flox] oraz  $OxtCre$  [wt/wt];  $Oprk1$ /flox [wt/wt] z tych samych miotów co mutanty. Genotyp

osobników ustalono poprzez genotypowanie z zastosowaniem techniki PCR na lizowanych biopsjach kośćcówki ogona.

Jako partnerów interakcji wykorzystano myszy szczepu C57BL/6 w wieku od 4 do 5 tygodni, pochodzących z hodowli Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, pierwotnie sprowadzonych z Charles River Laboratories. Każdej myszy badanej przypisano partnera, w taki sposób, aby różnica wagi między myszami w parze była jak najmniejsza. Niektórzy partnerzy zostali przypisani do więcej niż jednej myszy badanej, ale nigdy nie brali udziału w dwóch testach tego samego dnia.

Zwierzęta były trzymane w grupach od 2 do 5 osobników na klatkę, z nieograniczonym dostępem do wody i pokarmu. W pomieszczeniu bytowym zwierząt utrzymywana była temperatura  $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  oraz stały cykl dobowy światło-ciemność 12-12 (od 6.00 do 18.00). Doświadczenia zostały przeprowadzone zgodnie ze zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie o nr 230/2023.

### **3.2. Testy behawioralne**

W ramach przeprowadzonego badania, zgodnie z opisanym poniżej paradygmatem, przebadano 7 samców i 5 samic typu dzikiego oraz 4 samice i 3 samce mutanty. Samce i samice badano w oddzielnych dniach eksperymentalnych.

Myszy biorące udział w badaniu były przyzwyczajane do eksperymentatora (ang. *handling*) przynajmniej 2 dni przed rozpoczęciem procedur. Wszystkie myszy biorące udział w teście habituowane były do pokoju eksperymentalnego przynajmniej godzinę przed rozpoczęciem właściwego eksperymentu. Oświetlenie w pokoju miało natężenie 20 luksów. Dodatkowo, w pokoju doświadczalnym włączone było przez cały czas radio.

Podczas eksperymentu lub analizy wykluczono 7 samic (4 osobniki agresywne, 3 osobniki które uciekły z klatki eksperymentalnej lub próbowały uciec) oraz 7 samców (5 osobników agresywnych, jeden osobnik z za niską wagą, jeden który zmarł przed rozpoczęciem eksperymentu) będących osobnikami testowymi.

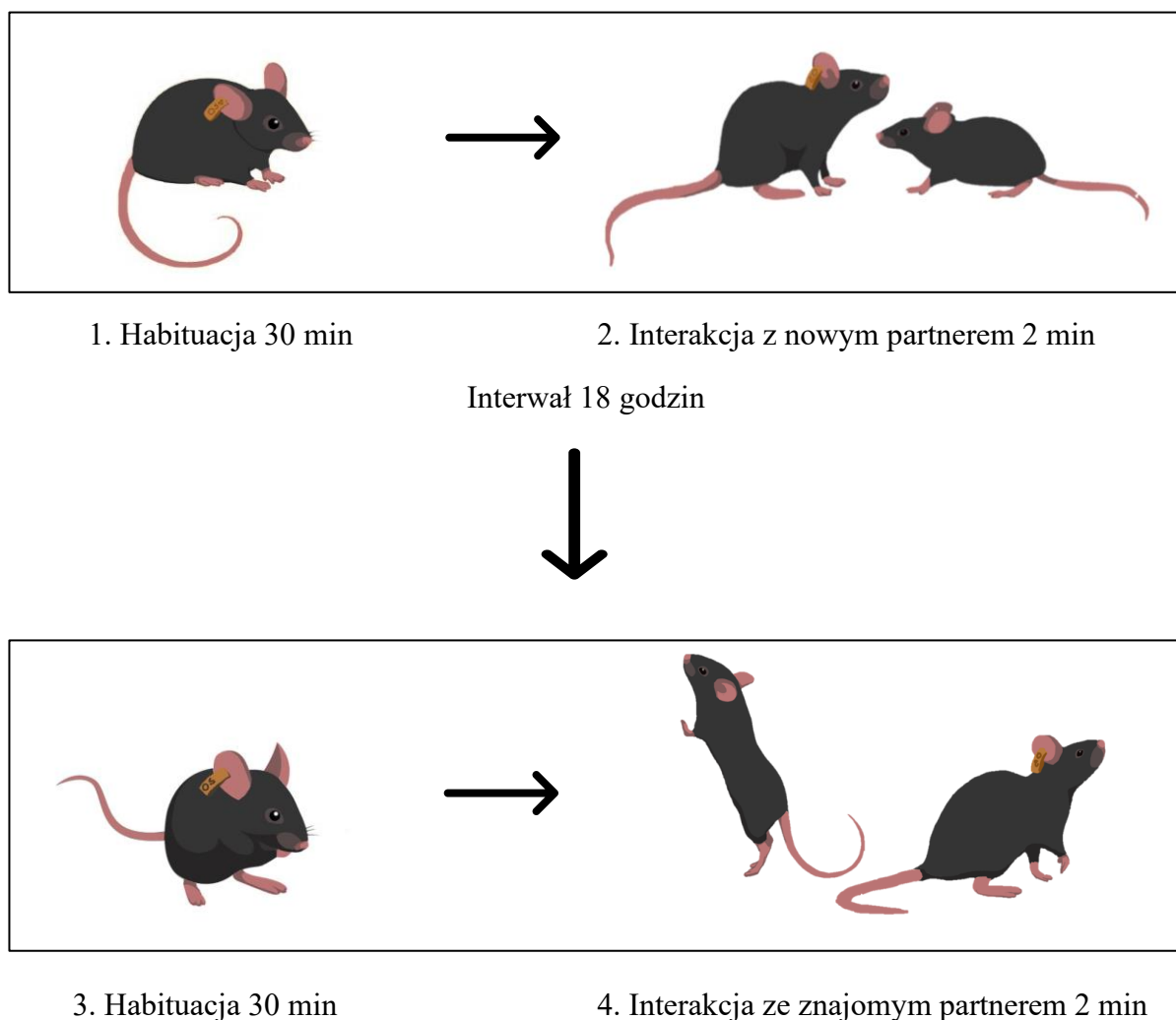
### **3.2.1. Test rozpoznawania partnera oraz skłonność do interakcji społecznych (ang. *Sociability*)**

Test składał się z dwóch sesji eksperymentalnych. Podczas pierwszej sesji, osobnika badanego przeniesiono do klatki eksperymentalnej o wymiarach: dł. 325 mm x szer. 170 mm z czystym podłożem o grubości od 0,5 cm do 1 cm i pozostawiono na 30 minut w celu habituacji. Po habituacji do klatki wprowadzono partnera, czyli nowego, nieznanego osobnika tej samej płci co mysz badana. Przez 2 minuty mysz badana mogła swobodnie wchodzić w interakcję z partnerem, po czym partner został przeniesiony do swojej klatki bytowej. Po upływie 18 godzin od pierwszego spotkania, procedura została powtórzona z udziałem tego samego partnera w czystej klatce eksperymentalnej. Interwał czasowy między sesjami wynoszący 18 godzin wybrano na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań pilotażowych. Jeśli osobnik badany przejawiał zachowania agresywne wobec partnera, eksperyment był przerywany. Interakcję oraz habituację nagrano za pomocą kamery Basler GigE wykorzystując program Noldus EthoVision 15.0. Wyniki analizowane były przez eksperymentatora z wykorzystaniem oprogramowania BORIS (v 8.23). Eksperymentator nie znał genotypów analizowanych zwierząt. Mierzono każdą interakcję społeczną, jaką mysz badana przejawia wobec partnera, za wyjątkiem zachowań agresywnych. Wskaźnik pamięci obliczono jako  $T2 - T1$ , gdzie T1 oznacza zmierzony całkowity czas interakcji podczas sesji 1, a T2 czas interakcji podczas sesji 2 (po 18 godzinach).

Dodatkowo, niezależnie od testu pamięci społecznej, przeanalizowano skłonność badanych myszy do wchodzenia w interakcję z partnerem, określaną jako „sociability”. W celu oceny sociability za miarę przyjęto całkowity czas, jaki myszy spędziły na interakcjach z partnerem podczas pierwszej sesji nagrań testu pamięci społecznej, opisanego powyżej.

### **3.2.2. Poziom lęklivości i aktywność w otwartym polu**

Aby ocenić poziom lęklivości badanych zwierząt, zmierzono procent czasu, jaki myszy spędzały w wyznaczonej strefie centralnej o wymiarach: 8 x 16 cm, podczas 30-minutowej sesji habituacji w pierwszym i drugim dniu eksperymentalnym. Aktywność lokomotoryczna, czyli skłonności do eksploracji nowego otoczenia, została określona na podstawie łącznego dystansu pokonanego przez myszy podczas obu sesji habituacji. Oba parametry analizowano za pomocą programu Noldus EthoVision 15.0.



**Ryc.1 Schemat przebiegu testu pamięci społecznej.** Źródło: opracowanie własne

### 3.3. Analiza statystyczna

Do zbadania znamiennego odstępstwa od rozkładu normalnego zastosowano test Shapiro-Wilka. Porównanie wartości pamięci społecznej oraz skłonności do interakcji społecznych między grupami przeprowadzono przy użyciu testu t dla grup niezależnych. Natomiast do porównania więcej niż dwóch parametrów między sesjami eksperymentalnymi w grupach badanych zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem Šídáka post-hoc. Jako próg istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ . Dodatkowo obliczono miarę siły efektu za pomocą wskaźnika d Cohena. Analizę statystyczną oraz wizualizację wyników w postaci wykresów przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 9.0.0.



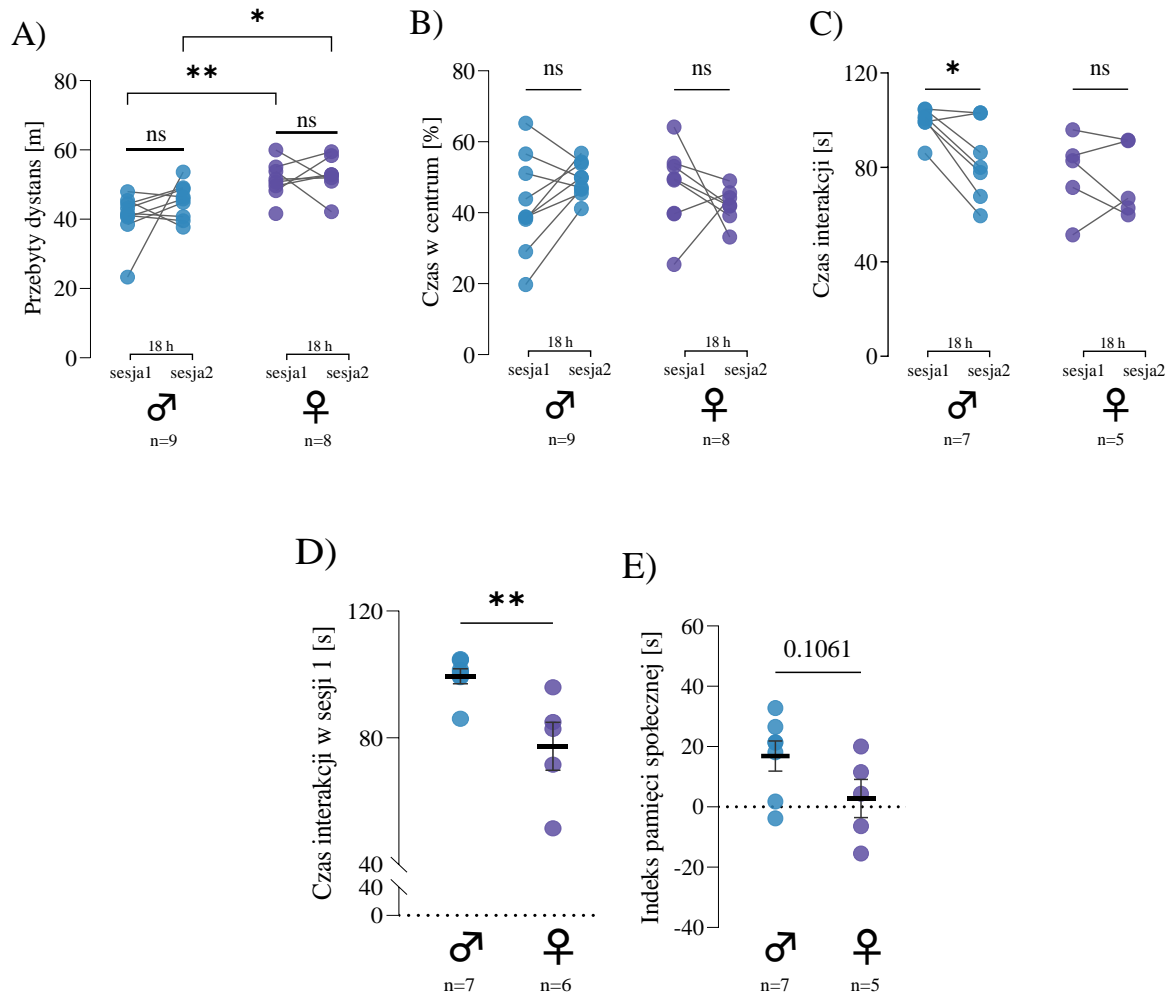
## Wyniki

Na podstawie istniejących badań, które ukazują antagonistyczne działanie oksytocyny i dynorfiny na pamięć społeczną, sformułowano hipotezę, że selektywne usunięcie receptorów  $\kappa$ -opiodowych na neuronach oksytocynowych może zwiększyć wrażliwość myszy na bodźce społeczne, co z kolei pozytywnie wpłynie na długość śladu pamięciowego dotyczącego nowo poznanego osobnika. Aby przetestować tę hipotezę, przeprowadzono eksperyment, który opiera się na naturalnym zachowaniu gryzoni – ich wrodzonej ciekawości wobec nowych, nieznanymi osobników. W warunkach laboratoryjnych, jeśli mysz zapamiętała napotkanego partnera, przy kolejnych interakcjach jej zainteresowanie tym bodźcem maleje, co pozwala na precyzyjne oszacowanie wskaźnika pamięci społecznej. Aby upewnić się, że wyniki uzyskane przez myszy z mutacją w zakresie pamięci społecznej nie są wynikiem ogólnych zmian w zachowaniu, które mogłyby komplikować interpretację wyników, badanie poprzedzono analizą ich zachowania podczas habituacji. W ramach tego wstępnego etapu obserwowano aktywność lokomotoryczną zwierząt oraz oceniano ich poziom lęklności.

### **4.1 Rola płci w aktywności lokomotorycznej, lęklności, skłonności do wchodzenia w interakcje społeczne oraz pamięci społecznej u myszy o genotypie dzikim**

Większość badań dotyczących pamięci społecznej u myszy koncentruje się głównie na samcach. Co więcej, badania te, w zależności od zastosowanej metody testowej, zazwyczaj ograniczają się do interwału czasowego nieprzekraczającego 6 godzin (Cum i in., 2024). W związku z tym postanowiono na początek przeanalizować zachowanie myszy typu dzikiego, uwzględniając różnice płciowe. Podczas habituacji nie zaobserwowano różnic między płciami, jeśli chodzi o czas spędzony w centrum, a tym samym poziom lęklności (Ryc. 1A). Samice wykazywały większą skłonność do eksploracji nowego otoczenia zarówno w pierwszej ( $p=0,0017$ ), jak i w drugiej sesji ( $p=0,0345$ ), co było widoczne w przebytych dystansie (Ryc. 1B). Niemniej jednak w obrębie grupy nie zaobserwowano istotnych różnic w dystansie pokonanym między sesjami. Podczas pierwszej sesji samce przejawiały większą skłonność do kontakt z nowym osobnikiem w porównaniu do samic ( $p = 0,0051$ ) (Ryc.1C i 1D). Różnice w przebytych dystansie u samic oraz wyższy bazowy czas interakcji u samców są jednak zgodne z wcześniejszymi danymi na temat zachowania myszy C57BL/6N w teście pamięci społecznej (Karlsson i in., 2015). Po upływie 18 godzin, samce wykazywały zauważalny spadek zainteresowania tym samym partnerem, podczas gdy czas interakcji samic pozostał na poziomie

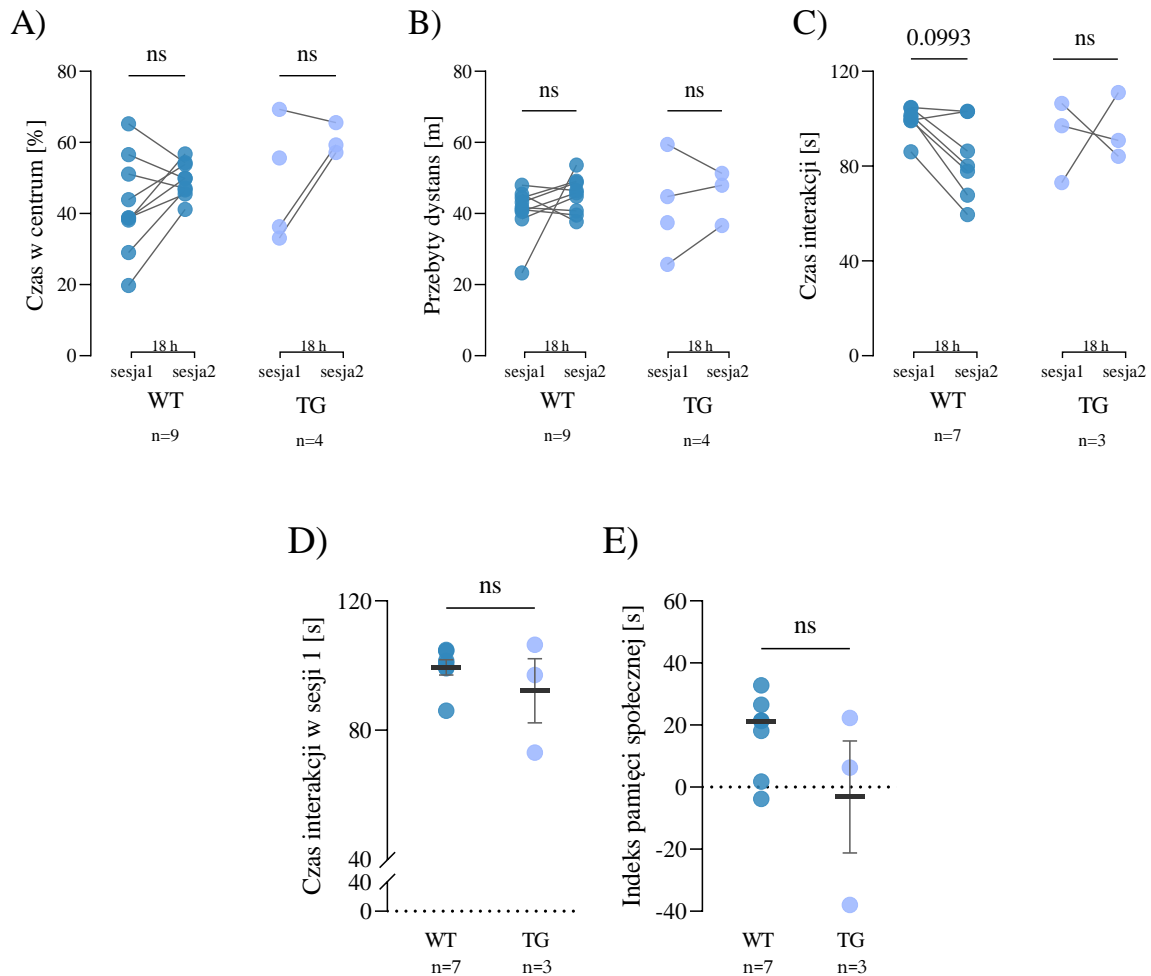
zbliżonym do pierwszej sesji. Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) ujawniła istotny wpływ sesji eksperymentalnej na czas interakcji ( $F(1, 10) = 6,148, p = 0,0326$ ), wskazując na znaczące różnice między sesjami. Dodatkowo, zaobserwowano trend statystyczny w przypadku efektu płci ( $F(1, 10) = 4,298, p = 0,0649$ ), ale nie stwierdzono istotnej interakcji między płcią a sesją eksperymentalną ( $F(1, 10) = 3,149, p = 0,1064$ ; Ryc. 1D). Wyniki testu post-hoc ujawniły, że samce spędzały znacząco mniej czasu na interakcji z partnerem w drugiej sesji w porównaniu do pierwszej ( $p = 0,0162$ ). Sugeruje to, że samce WT potrafią zapamiętać osobnika nawet po 18 godzinnej przerwie, co jest zaskakujące w kontekście wcześniejszych założeń i badań sugerujących krótszy okres pamięci społecznej. Z kolei wyniki uzyskane u samic WT były zgodne z przewidywaniami. Obserwowany wyraźniejszy spadek czasu interakcji u samców z sesji na sesję przekładał się na wyższy wskaźnik pamięci społecznej w tej grupie w porównaniu do samic (Ryc. 1E), choć różnica nie osiągnęła istotności statystycznej ( $p = 0,1061$ ). Mimo to, miara efektu Cohena ( $d = 1,03$ ) sugeruje związek między płcią a wynikami uzyskiwanymi przez myszy w teście pamięci społecznej. Wcześniejsze badania sugerują, że myszy typu dzikiego tracą pamięć o swoim partnerze interakcji po 16 godzinach (Bilkei-Gorzo, 2014). Zaskakujące wyniki wstępne tego badania wskazują, jednak na to, że samce myszy typu dzikiego mogą rozpoznać swojego partnera nawet po 18 godzinach. W związku z tym podjęto decyzję o przeprowadzeniu oddzielnej analizy wpływu mutacji na samce i samice, aby dokładniej zbadać, jak płeć wpływa na mechanizmy pamięci społecznej i uzyskać pełniejszy obraz badanych zjawisk.



**Ryc. 1 Porównanie samców i samic myszy kontrolnych.** **A)** Łączny % czasu spędzonego w wyznaczonym centrum podczas habituacji przez samce (♂; kolor niebieski) i samice (♀; kolor fioletowy) myszy kontrolnych w sesji pierwszej oraz w sesji drugiej. **B)** Łączny dystans [m] przebyty przez osobnika badanego podczas 30 minutowej habituacji. **C)** Czas [s] spędzony na całkowitej interakcji z partnerem podczas pierwszej i drugiej sesji eksperymentalnej. **D)** czas spędzany na interakcji z nieznanym partnerem podczas sesji pierwszej. **E)** Indeks pamięci społecznej: różnica czasu interakcji między sesją drugą a sesją pierwszą (S1 – S2) wraz z średnią oraz SEM dla obu grup. Symbol \* wskazuje na  $p < 0,05$  a ns brak istotności statystycznej.

#### 4.2 Samce z selektywną dezaktywacją KOR w obrębie neuronów oksytocynowych nie wykazują istotnych różnic względem szczepu typu dzikiego

Jest dobrze udokumentowane, że samce myszy szczepu *Oxt KO* mają upośledzoną pamięć społeczną (Ferguson, 2000), podczas gdy samce *Pdyn<sup>-/-</sup>* wykazują jej poprawę (Bilkei-Gorzo, 2014). W związku z tym postanowiono zbadać, czy różnice w pamięci społecznej u samców są związane z hamującym wpływem dynorfiny na układ oksytocynowy. W przypadku samców nie zaobserwowano różnic w czasie spędzonym w centrum klatki ani w aktywności lokomotorycznej, niezależnie od szczepu czy sesji habituacji (zob. Ryc. 2A i 2B). Wyniki testu skłonności do wchodzenia w interakcje z nowym osobnikiem również nie ujawniły różnic (Ryc. 2D). Samce WT wykazywały tendencję do zapamiętywania wcześniej napotkanego osobnika, co było widoczne na poziomie trendu statystycznego. Czas ich interakcji z partnerem interakcji skracał się w kolejnych sesjach, sugerując, że pamiętają one wcześniej poznanego osobnika. Z kolei u samców TG nie zaobserwowano skrócenia czasu interakcji, co wskazuje na brak pamięci o swoim partnerze z wcześniejszej sesji. Analiza dwuczynnikowa (ANOVA) wykazała: wpływ sesji na czas interakcji był istotny ( $F(1, 8) = 1,059$ ,  $p = 0,03335$ ), podczas gdy wpływ genotypu był bliski granicy istotności ( $F(1, 8) = 0,1904$ ,  $p = 0,06741$ ), a interakcja między sesją a genotypem nie była istotna ( $F(1, 8) = 2,254$ ,  $p = 0,1716$ ) (Ryc. 2C). Na obecnym etapie badania wielkość próby, zwłaszcza dla mutantów, jest zbyt mała, aby jednoznacznie ocenić wpływ mutacji na pamięć społeczną u samców. Mimo to wstępne wyniki wskazują, że samce typu dzikiego mogą kodować ślady społeczne niezależnie od hamującego wpływu dynorfiny na układ oksytocynowy. Wynik ten wskazuje, że delecja receptora  $\kappa$ -opiodowego na neuronach oksytocynowych nie wpływa znacząco na zdolność samców z mutacją do rozpoznawania i pamiętania bodźców społecznych. Na pierwszy rzut oka wyniki te mogą wydawać się zaskakujące, szczególnie w kontekście wcześniejszych danych literaturowych, które sugerowały silne powiązanie między dynorfiną a układem oksytocynowym w regulacji pamięci społecznej. Możliwe więc, że ze względu na odmienną strukturę społeczną samców, układ oksytocynowy nie jest głównym celem neuromodulującego działania dynorfiny w kontekście długości śladu pamięciowego dotyczącego innych osobników.

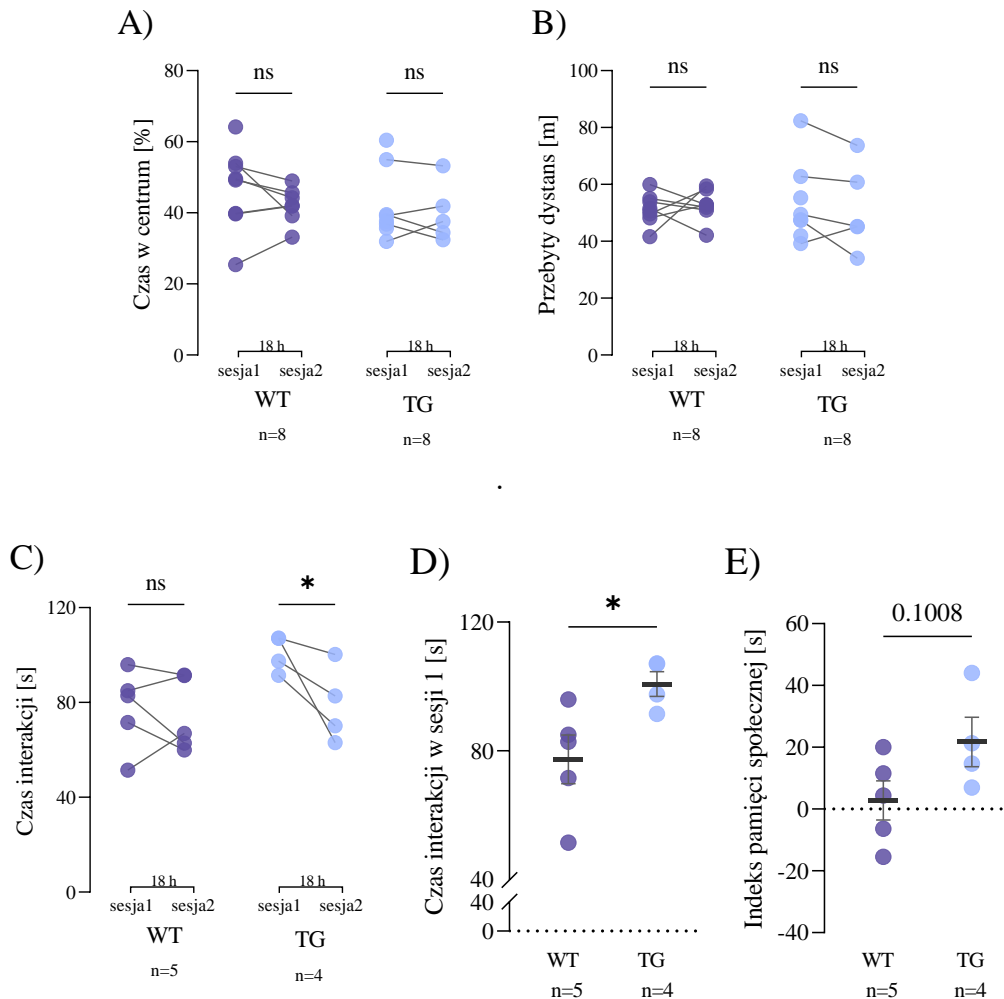


**Ryc. 2 Porównanie samców WT i samców TG.** **A)** Łączny % czasu spędzonego w wyznaczonym centrum podczas habituacji przez samce typu dzikiego (WT; kolor niebieski) i samce mutanty (TG; kolor jasnoniebieski) myszy kontrolnych w sesji pierwszej oraz w sesji drugiej. **B)** Łączny dystans [m] przebyty przez osobnika badanego podczas 30 minutowej habituacji. **C)** Czas [s] spędzony na całkowitej interakcji z partnerem podczas pierwszej i drugiej sesji eksperymentalnej. **D)** czas spędzany na interakcji z nieznanym partnerem podczas sesji pierwszej. **E)** Indeks pamięci społecznej: różnica czasu interakcji między sesją drugą a sesją pierwszą (S1 – S2) wraz z średnią oraz SEM dla obu grup. Symbol \* wskazuje na  $p < 0,05$  a ns brak istotności statystycznej.

### 4.3 Samice z selektywną dezaktywacją receptora KOR w neuronach oksytocynowych wykazują poprawę pamięci społecznej.

Biorąc pod uwagę różnice w zaangażowaniu układu oksytocynowego w proces pamięci społecznej (Gabor, 2012) oraz odmienne reakcje na podanie agonisty  $\kappa$  w kontekście interakcji społecznych (Robles, 2014) u samców i samic, zdecydowano się zbadać, czy wpływ mutacji jest uzależniony od płci. Zachowanie samic podczas obu sesji habituacji, w tym poziom lęklivosti oraz eksploracja nowego otoczenia, nie wykazało istotnych różnic między szczepem typu dzikiego a szczepem transgenicznym (zob. Ryc. 3A i 3B). Brak wpływu mutacji na podstawowe aspekty behawioralne sugeruje, że zaobserwowane w dalszej części badania różnice mogą być bezpośrednio związane ze specyficznym efektem mutacji, a nie z ogólnymi zmianami w zachowaniu. Co istotne, samice TG podczas pierwszej sesji wykazywały większą chęć do interakcji z partnerem w porównaniu do samic WT ( $p = 0.0383$ ; zob. Ryc. 3C i 3D). Może to sugerować, że samice szczepu Oprk1<sup>OxtCre</sup> są bardziej wrażliwe na bodźce społeczne, co skutkuje zwiększoną skłonnością do nawiązywania kontaktu w początkowej fazie interakcji. Interesujące jest jednak to, że ten wzrost wrażliwości nie przekłada się na kolejne interakcje, co może wskazywać, że efekt mutacji jest specyficzny dla pierwszego kontaktu z nowym bodźcem społecznym. Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła istotny statystycznie wpływ sesji eksperymentalnej (zob. Ryc. 3C; dwuczynnikowa ANOVA: sesja  $F(1, 7) = 5,997$ ,  $p = 0,0442$ ). Nie stwierdzono jednak istotnego wpływu genotypu ani interakcji między genotypem a sesją eksperymentalną (genotyp  $F(1, 7) = 2,623$ ,  $p = 0,1493$ ; sesja  $\times$  genotyp  $F(1, 7) = 3,570$ ,  $p = 0,1008$ ). Analiza wyników ujawniła, że samice TG wykazywały istotny spadek czasu interakcji po 18 godzinach ( $p = 0,0453$ ), podczas gdy u samic WT czas ten pozostawał stabilny między sesjami, co było zgodne z wcześniej przyjętymi założeniami. Samice TG wydają się zachowywać pamięć o partnerze interakcji nawet po 18 godzinach przerwy, co sugeruje, że mutacja wpływa na ich zdolność do długoterminowego przechowywania śladów pamięci społecznej. Analiza wyników wykazała, że samice TG osiągnęły wyższy indeks pamięci społecznej w porównaniu do samic WT (zob. Ryc. 3E), chociaż różnica ta nie była statystycznie istotna ( $p = 0,1008$ , istotność dwustronna). Pomimo braku statystycznej istotności, miara efektu Cohena ( $d = 1,25$ ) sugeruje związek między obecnością mutacji a wynikami testu pamięci społecznej. Powyższe wyniki sugerują, że dezaktywacja receptorów  $\kappa$ -opiodowych na neuronach oksytocynowych u samic sprzyja większej uwadze skierowanej na nowe bodźce społeczne. Zwiększona uwaga w początkowej fazie interakcji prowadzi do bardziej efektywnego kodowania śladów pamięciowych na etapie nabywania (ang. *acquisition*), co z

kolei skutkuje dłuższym ich zachowaniem i lepszymi wynikami w testach pamięci społecznej. Możliwe więc, że u samic w przeciwieństwie do samców długość śladu pamięciowego o charakterze społecznym jest silniej zależna od sygnalizacji oksytocynowej, co czyni je bardziej podatnymi na neuromodulacyjny wpływ dynorfiny na ten układ.



**Ryc. 3 Porównanie samic WT i samic TG.** **A)** Łączny % czasu spędzonego w wyznaczonym centrum podczas habituacji przez samice typu dzikiego (WT; kolor fioletowy) i samice mutanty (TG; kolor jasnoniebieski) myszy kontrolnych w sesji pierwszej oraz w sesji drugiej. **B)** Łączny dystans [m] przebyty przez osobnika badanego podczas 30 minutowej habituacji. **C)** Czas [s] spędzony na całkowitej interakcji z partnerem podczas pierwszej i drugiej sesji eksperymentalnej. **D)** czas spędzany na interakcji z nieznanym partnerem podczas sesji pierwszej. **E)** Indeks pamięci społecznej: różnica czasu interakcji między sesją drugą a sesją pierwszą (S1 – S2) wraz z średnią oraz SEM dla obu grup. Symbol \* wskazuje na  $p < 0,05$  a ns brak istotności statystycznej.

## Dyskusja i wnioski

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że dynorfina, wpływając na układ oksytocynowy, moduluje długość i intensywność śladów pamięciowych o charakterze społecznym. U samic z mutacją  $Oprk1^{OxtCre}$ , zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowano wydłużenie czasu trwania śladu pamięciowego o innym osobniku, jak i większą skłonność do wchodzenia w interakcję z partnerem podczas pierwszego spotkania, co może stać za mechanizmem ich lepszego wyniku w teście pamięci społecznej. W przypadku samców z mutacją  $Oprk1^{OxtCre}$  nie zaobserwowano jednak spodziewanego wydłużenia pamięci społecznej. Dodatkowo wykazano, że samce myszy typu dzikiego, w przeciwieństwie do samic, są w stanie pamiętać swojego partnera interakcji aż do 18 godzin, co stoi w sprzeczności z założoną hipotezą oraz danymi z literatury.

Samice z mutacją  $Oprk1^{OxtCre}$  charakteryzowały się wyższym indeksem pamięci społecznej oraz wyższą skłonnością do interakcji w pierwszej sesji. Można przypuszczać, że mutacja spowodowała zwiększenie przekazywania oksytocynowego. To z kolei wpłynęło na uwagę skierowaną ku bodźcom społecznym, ale jedynie w pierwszej sesji, co sugeruje, że zmiana ta nie była związana z typowym wzrostem socjalności czy nagradzającym wpływem bodźca społecznego. W przeciwnym razie należałoby oczekiwać zwiększonej skłonności do interakcji także w drugiej sesji. Podobny efekt zaobserwowali Bilkei-Gorzo ze współautorami (2014) u samców  $Pdyn^{-/-}$ , które również przejawiały zwiększoną eksplorację zarówno partnera, jak i obiektu w początkowych sesjach. Również badania Farahbakhsh wraz ze współautorami (2023) wykazały, że długotrwały antagonizm receptorów  $\kappa$  u samców myszy prowadził do zwiększenia eksploracji nowego bodźca, ale nie już znajomego, oraz przyspieszenia tempa uczenia się.

Łącząc powyższe obserwacje z hipotezą 'Social salience' (Shamay-Tsoory, 2016), która sugeruje, że oksytocyna sprzyja kierowaniu uwagi na bodźce społeczne, można przypuszczać, że samice TG wykazują unikalny fenotyp, który łączy oba te zjawiska. Hipoteza 'Social salience' zakłada, że oksytocyna zwiększa wyrazistość bodźców społecznych, co prowadzi do większej uwagi wobec tych bodźców i w konsekwencji do ich lepszego rozpoznawania. W przypadku samic TG, może to oznaczać, że w porównaniu do myszy kontrolnych lepiej eksplorują one nowe bodźce społeczne, szybciej uczą się i utrwalają informacje związane z tymi bodźcami, co prowadzi do szybszej habituacji do nowych osobników. W skrócie oznacza to, że samice TG mogą łączyć w sobie zwiększoną eksplorację bodźców społecznych,



efektywniejsze przetwarzanie pamięci oraz szybszą adaptację do obecności nowych osobników.

Wyniki uzyskane u samców TG są wstępne: wielkość grupy eksperymentalnej zbyt mała, aby formułować ostateczne wnioski. Niemniej jednak, słabsze od samców WT wyniki w teście pamięci społecznej uzyskane przez samce TG mogą być rezultatem różnych czynników. Jednym z nich jest fakt, że w przeciwieństwie do samic, samce tworzą hierarchie społeczne, w których pozycja jest określana na podstawie zachowań agresywnych. Zgodnie z przewidywaniami, mutacja mogła prowadzić do zwiększonego przekąźnictwa układu oksytocynowego, co z kolei mogło obniżyć poziom agresji — efekt często obserwowany po podaniu oksytocyny (Tan, 2019). Niższy poziom agresji u samców jest z kolei związany z niższą pozycją w hierarchii społecznej, co może prowadzić do wyższego poziomu stresu, zmienionej ekspresji genów i mniejszej odporności na stres (Horii, 2017; LeClair, 2021), co również mogło wpłynąć na uzyskane wyniki.

Szereg doniesień wskazuje, że układ oksytocynowy jest regulowany przez hormony płciowe, co może mieć istotne konsekwencje dla jego roli w różnych procesach behawioralnych. Różnice płciowe w efektach badanej mutacji mogą wynikać z dymorfizmu płciowego w liczbie neuronów produkujących oksytocynę w jądrze przykomorowym (Okabe, 2013) oraz z wpływu testosteronu. Samice cechują się większą liczbą neuronów OXT-pozytywnych. Testosteron natomiast, może bezpośrednio hamować działanie układu oksytocynowego oraz zmniejszać ekspresję receptora oksytocynowego u myszy (Okabe, 2013). Takie różnice w regulacji układu oksytocynowego między płciami mogą tłumaczyć zaobserwowane w niniejszej pracy rozbieżności w efekcie mutacji u samców i samic Oprk1<sup>OxtCre</sup>.

Jak wspomniano, różnice w pamięci społecznej zaobserwowano również między samcami i samicami WT. Samice WT miały krótszy od samców czas interakcji w pierwszej sesji, co mogło wpłynąć na długość i intensywność śladu pamięciowego. U samców WT, w przeciwieństwie do samic, zaobserwowano utrzymywanie się śladu pamięciowego przez 18 godzin. Wynik ten nie jest zaskakujący w świetle innych badań, które pokazały, że samice myszy WT wykazują mniejszy spadek czasu interakcji z sesji na sesję w porównaniu do samców (Cum, 2024). Różnica obserwowana między samcami i samicami typu dzikiego może wynikać z faktu, że myszy obu płci lepiej zapamiętują partnera-samca, niż samicę (Beaver, 2024).

Obserwacja, że samce WT mogą pamiętać swojego partnera interakcji aż do 18 godzin stoi w pewnym kontraście do wyników opublikowanych przez Bilkei-Gorzo (2014), które sugerowały, że maksymalna długość pamięci społecznej u samców typu dzikiego wynosi 4h. Różnice te mogą wynikać z odmiennych modeli eksperymentalnych zastosowanych w badaniach. W przytaczanej pracy samce typu dzikiego były testowane podczas kilku sesji eksperymentalnych przeprowadzanych w kolejnych dniach, z różnymi interwałami czasowymi oraz różnymi partnerami. W niniejszej pracy myszy brały udział w teście tylko raz. Czas interakcji z partnerem w pracy Bilkei-Gorzo wynosił ponadto 5 minut, podczas gdy w niniejszej pracy czas ten ograniczono do 2 minut. Choć wszystkie warianty testu pamięci społecznej opierają się na mierzeniu czasu interakcji osobnika z partnerami, stosowane interwały czasowe między sesjami, długość pojedynczej sesji, wybór bodźca społecznego oraz sposób jego prezentacji znacząco różnią się w poszczególnych publikacjach (Cum, 2024). Te różnice mogą tłumaczyć rozbieżności między wynikami tego badania a innymi. Jednocześnie wprowadza to trudności w interpretacji i porównywaniu wyników.

Na różnice w długości śladu pamięciowego u samców WT w niniejszej pracy i pracy Bilkei-Gorzo (2014) można spojrzeć także w świetle przytoczonych wcześniej badań, które wskazują, że długotrwała konsolidacja pamięci wymaga dwóch faz przetwarzania informacji i syntezy białek (Wanisch, 2008; Richter, 2005; Pena, 2014). W efekcie stabilność śladu pamięciowego osiągnięta jest właśnie po upływie około 18 godzin. Najdłuższe interwały czasowe zastosowane w badaniu Bilkei-Gorzo (2014) wynosiły 16 oraz 24 godziny. Wykazano, że w okresie konsolidacji społeczny ślad pamięciowy jest szczególnie podatny na interferencje i zakłócenia (Camatas, 2015; Eagleman, 2009; Perna, 2015). Dlatego też stosowanie różnych interwałów czasowych, wielokrotnych sesji lub wprowadzenie więcej niż jednego partnera może teoretycznie zaburzyć ten proces. Możliwe więc, że zastosowana w niniejszym badaniu wersja testu idealnie odpowiadała tym krytycznym wymaganiom, co pozwoliło na wykazanie, że ślad pamięciowy u samców WT utrzymuje się nawet po 18 godzinach.

Niemniej jednak, biorąc pod uwagę dotychczasowe obserwacje u samców WT, przyszłe badania mogą wymagać rozważenia modyfikacji testu, aby lepiej uchwycić specyfikę tych wyników i ich potencjalne implikacje. Modyfikacja może obejmować wydłużenie interwału czasowego u badanych samców lub wykorzystanie paradygmatu dyskryminacji (Engelmann, 1995). Ta wersja testu opiera się na tym, że w drugiej sesji wprowadza się jednego osobnika znajomego z sesji pierwszej oraz drugiego nieznanego, a wartość pamięci społecznej oblicza się na podstawie różnicy między czasem interakcji z osobnikiem nieznanym a czasem

interakcji z osobnikiem znajomym w trakcie sesji drugiej, a nie na podstawie różnicy między czasem interakcji w sesji pierwszej a czasem interakcji w sesji drugiej tylko z jednym partnerem.

W badaniach nad pamięcią społeczną istotne jest uwzględnienie także innych form pamięci, aby sprawdzić, czy wpływ badanej zmiennej ogranicza się wyłącznie do rozpoznawania osobników. Dlatego też równoległe z testem pamięci społecznej przeprowadza się testy rozpoznawania obiektów lub testy pamięci przestrzennej. W niniejszym badaniu również przeprowadzono test rozpoznawania nowych obiektów (ang. *Novel object recognition*, NOR), zgodnie z procedurą opisaną przez Skupio i współautorów (2023). Z powodu faktu, że większość myszy spędzała na eksploracji obiektów mniej niż 20 sekund, co uniemożliwiło uzyskanie miarodajnych wyników, zdecydowano się jednak nie uwzględniać tych danych w analizie. Obecnie opracowywany jest nowy wariant testu, który będzie lepiej dostosowany do potrzeb myszy z naszego Instytutu, co w przyszłości pozwoli na bardziej precyzyjne badanie pamięci obiektów u omawianego szczepu myszy.

Chociaż nasze badania dostarczyły istotnych wyników, istnieją pewne ograniczenia, które należy uwzględnić. Na uzyskane w tej pracy wyniki mógł wpłynąć fakt, iż mutacja *Oprk1<sup>OxtCre</sup>* była obecna od urodzenia, co mogło prowadzić do kompensacyjnych zmian w układzie opioidowym w trakcie rozwoju osobników TG. Biorąc pod uwagę, że dynorfina wykazuje, choć słabsze, powinowactwo do innych typów receptorów opioidowych, istnieje możliwość, że ich ekspresja uległa zwiększeniu, co mogło częściowo kompensować brak receptorów KOR i maskować efekty mutacji. Ważne jest również uwzględnienie potencjalnego wpływu mutacji na rozwój behawioralny osobników, co mogło prowadzić do wystąpienia deficytów lub unikalnych adaptacji behawioralnych, które również mogą wpływać na wyniki badania.

Jest to pierwsze badanie, w którym podjęto temat jak interakcja między systemem Dyn/KOR a układem oksytocynowym wpływa na długość śladu pamięciowego o innym osobniku u myszy, co może stanowić istotne uzupełnienie dotychczasowych badań nad pamięcią społeczną. Niniejsza praca może dostarczyć nowego spojrzenia na interakcję między dwoma neuropeptydami — dynorfiną i oksytocyną — w kontekście zachowań społecznych, ze szczególnym uwzględnieniem pamięci społecznej.

## Bibliografia

- Abraham, A. D., Casello, S. M., Schattauer, S. S., Wong, B. A., Mizuno, G. O., Mahe, K., Tian, L., Land, B. B., & Chavkin, C. (2021). Release of endogenous dynorphin opioids in the prefrontal cortex disrupts cognition. *Neuropsychopharmacology*, 46(13). <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01168-2>
- Adolphs, R. (2010). What does the amygdala contribute to social cognition? In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1191). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05445.x>
- Anpilov, S., Shemesh, Y., Eren, N., Harony-Nicolas, H., Benjamin, A., Dine, J., Oliveira, V. E. M., Forkosh, O., Karamihalev, S., Hüttl, R. E., Feldman, N., Berger, R., Dagan, A., Chen, G., Neumann, I. D., Wagner, S., Yizhar, O., & Chen, A. (2020). Wireless Optogenetic Stimulation of Oxytocin Neurons in a Semi-natural Setup Dynamically Elevates Both Pro-social and Agonistic Behaviors. *Neuron*, 107(4). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.05.028>
- Beaver, J. N., Nicodemus, M. M., Spalding, I. R., Dutta, S., Jasnow, A. M., & Gilman, T. L. (2024). Male and female mice respectively form stronger social aversive memories with same and different sex conspecifics. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2024.08.12.607663. <https://doi.org/10.1101/2024.08.12.607663>
- Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., & Dulac, C. (2014). Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *ELife*, 3. <https://doi.org/10.7554/elife.02743>
- Bhattacharai, J. P., Etyemez, S., Jaaro-Peled, H., Janke, E., Leon Tolosa, U. D., Kamiya, A., Gottfried, J. A., Sawa, A., & Ma, M. (2022). Olfactory modulation of the medial prefrontal cortex circuitry: Implications for social cognition. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 129). <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.03.022>
- Bicknell, R. J., & Leng, G. (1982). Endogenous opiates regulate oxytocin but not vasopressin secretion from the neurohypophysis. *Nature*, 298(5870). <https://doi.org/10.1038/298161a0>
- Bicknell, R. J., Leng, G., Lincoln, D. W., & Russell, J. A. (1988). Naloxone excites oxytocin neurones in the supraoptic nucleus of lactating rats after chronic morphine treatment. *The Journal of Physiology*, 396(1). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016963>
- Bilkei-Gorzo, A., Erk, S., Schürmann, B., Mauer, D., Michel, K., Boecker, H., Scheef, L., Walter, H., & Zimmer, A. (2012). Dynorphins regulate fear memory: From mice to men. *Journal of Neuroscience*, 32(27). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1034-12.2012>

- Bilkei-Gorzo, A., Mauer, D., Michel, K., & Zimmer, A. (2014). Dynorphins regulate the strength of social memory. *Neuropharmacology*, 77. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.10.023>
- Burke, M. C., Letts, P. A., Krajewski, S. J., & Range, N. E. (2006). Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 498(5). <https://doi.org/10.1002/cne.21086>
- Cahill, C., Tejada, H. A., Spetea, M., Chen, C., & Liu-Chen, L. Y. (2022). Fundamentals of the Dynorphins/Kappa Opioid Receptor System: From Distribution to Signaling and Function. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 271). [https://doi.org/10.1007/164\\_2021\\_433](https://doi.org/10.1007/164_2021_433)
- Camats Perna, J., & Engelmann, M. (2016). Recognizing others: Rodent's social memories. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (Vol. 30). [https://doi.org/10.1007/7854\\_2015\\_413](https://doi.org/10.1007/7854_2015_413)
- Carey, A. N., Lyons, A. M., Shay, C. F., Dunton, O., & McLaughlin, J. P. (2009). Endogenous  $\kappa$  opioid activation mediates stress-induced deficits in learning and memory. *Journal of Neuroscience*, 29(13). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6146-08.2009>
- Chavkin, C. (2013). Dynorphin--still an extraordinarily potent opioid peptide. In *Molecular pharmacology* (Vol. 83, Issue 4). <https://doi.org/10.1124/mol.112.083337>
- Chavkin, C., & Koob, G. F. (2016). Dynorphin, dysphoria, and dependence: The stress of addiction. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 41, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/npp.2015.258>
- Cheetham, S. A., Smith, A. L., Armstrong, S. D., Beynon, R. J., & Hurst, J. L. (2009). Limited variation in the major urinary proteins of laboratory mice. *Physiology and Behavior*, 96(2). <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.10.005>
- Chen, C., Willhouse, A. H., Huang, P., Ko, N., Wang, Y., Xu, B., Huang, L. H. M., Kieffer, B., Barbe, M. F., & Liu-Chen, L. Y. (2020). Characterization of a knock-in mouse line expressing a fusion protein of  $\kappa$  opioid receptor conjugated with tdTomato: 3-dimensional brain imaging via clarity. *ENeuro*, 7(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0028-20.2020>
- Choleris, E., Clipperton-Allen, A. E., Phan, A., & Kavaliers, M. (2009). Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 30, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.003>

- Clark, S. D., & Abi-Dargham, A. (2019). The Role of Dynorphin and the Kappa Opioid Receptor in the Symptomatology of Schizophrenia: A Review of the Evidence. In *Biological Psychiatry* (Vol. 86, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.05.012>
- Corkin, S. (1984). Lasting Consequences of Bilateral Medial Temporal Lobectomy: Clinical Course and Experimental Findings in H.M. *Seminars in Neurology*, 4(02). <https://doi.org/10.1055/s-2008-1041556>
- Crowley, N. A., & Kash, T. L. (2015). Kappa opioid receptor signaling in the brain: Circuitry and implications for treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 62. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.01.001>
- Cui, Z., Gerfen, C. R., & Young, W. S. (2013). Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 521(8). <https://doi.org/10.1002/cne.23263>
- Cum, M., Santiago Pérez, J. A., Wangia, E., Lopez, N., Wright, E. S., Iwata, R. L., Li, A., Chambers, A. R., & Padilla-Coreano, N. (2024). A systematic review and meta-analysis of how social memory is studied. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52277-z>
- de la Zerda, S. H., Netser, S., Magalnik, H., Briller, M., Marzan, D., Glatt, S., Abergel, Y., & Wagner, S. (2022). Social recognition in laboratory mice requires integration of behaviorally-induced somatosensory, auditory and olfactory cues. *Psychoneuroendocrinology*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2022.105859>
- Dudek, S. M., Alexander, G. M., & Farris, S. (2016). Rediscovering area CA2: Unique properties and functions. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.22>
- Dong, C., Gowrishankar, R., Jin, Y., He, X. J., Gupta, A., Wang, H., Sayar-Atasoy, N., Flores, R. J., Mahe, K., Tjahjono, N., Liang, R., Marley, A., Or Mizuno, G., Lo, D. K., Sun, Q., Whistler, J. L., Li, B., Gomes, I., Von Zastrow, M., Tejada, H. A., ... Tian, L. (2024). Unlocking opioid neuropeptide dynamics with genetically encoded biosensors. *Nature neuroscience*, 27(9), 1844–1857. <https://doi.org/10.1038/s41593-024-01697-1>
- Ehrich, J. M., Messinger, D. I., Knakal, C. R., Kuhar, J. R., Schattauer, S. S., Bruchas, M. R., Zweifel, L. S., Kieffer, B. L., Phillips, P. E. M., & Chavkin, C. (2015). Kappa opioid receptor-

induced aversion requires p38 MAPK activation in VTA dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*, 35(37). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2444-15.2015>

Engelmann, M. (2009). Competition between two memory traces for long-term recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(1). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.08.009>

Engelmann, M., Wotjak, C. T., & Landgraf, R. (1995). Social discrimination procedure: An alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiology and Behavior*, 58(2). [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)00053-L](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)00053-L)

Farahbakhsh, Z. Z., Song, K., Branthwaite, H. E., Erickson, K. R., Mukerjee, S., Nolan, S. O., & Siciliano, C. A. (2023). Systemic kappa opioid receptor antagonism accelerates reinforcement learning via augmentation of novelty processing in male mice. *Neuropsychopharmacology*, 48(6). <https://doi.org/10.1038/s41386-023-01547-x>

Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R., & Young, L. J. (2001). Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *Journal of Neuroscience*, 21(20). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-20-08278.2001>

Ferguson, J. N., Young, L. J., Hearn, E. F., Matzuk, M. M., Insel, T. R., & Winslow, J. T. (2000). Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature Genetics*, 25(3). <https://doi.org/10.1038/77040>

Ferguson, J. N., Young, L. J., & Insel, T. R. (2002). The neuroendocrine basis of social recognition. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 23(2). <https://doi.org/10.1006/frne.2002.0229>

Fricker, L. D., Margolis, E. B., Gomes, I., & Devi, L. A. (2020). Five decades of research on opioid peptides: Current knowledge and unanswered questions. In *Molecular Pharmacology* (Vol. 98, Issue 2). <https://doi.org/10.1124/MOL.120.119388>

Gabor, C. S., Phan, A., Clipperton-Allen, A. E., Kavaliers, M., & Choleris, E. (2012). Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition. *Behavioral Neuroscience*, 126(1). <https://doi.org/10.1037/a0026464>

Gedeon, T., Parry, J., & Völlm, B. (2019). The role of oxytocin in antisocial personality disorders: A systematic review of the literature. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 10, Issue FEB). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00076>

- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L. I., Hunkapiller, M., & Hood, L. (1979). Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.76.12.6666>
- Gordon, I., vander Wyk, B. C., Bennett, R. H., Cordeaux, C., Lucas, M. v., Eilbott, J. A., Zagoory-Sharon, O., Leckman, J. F., Feldman, R., & Pelphrey, K. A. (2013). Oxytocin enhances brain function in children with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(52). <https://doi.org/10.1073/pnas.1312857110>
- Gothard, K. M. (2020). Multidimensional processing in the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(10). <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0350-y>
- Hitti, F. L., & Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, *508*(1). <https://doi.org/10.1038/nature13028>
- Horii, Y., Nagasawa, T., Sakakibara, H., Takahashi, A., Tanave, A., Matsumoto, Y., Nagayama, H., Yoshimi, K., Yasuda, M. T., Shimoi, K., & Koide, T. (2017). Hierarchy in the home cage affects behaviour and gene expression in group-housed C57BL/6 male mice. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07233-5>
- Hurst, J. L., Payne, C. E., Nevison, C. M., Marie, A. D., Humphries, R. E., Robertson, D. H. L., Cavaggioni, A., & Beynon, R. J. (2001). Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature*, *414*(6864). <https://doi.org/10.1038/414631a>
- Jurek, B., & Neumann, I. D. (2018). The oxytocin receptor: From intracellular signaling to behavior. *Physiological Reviews*, *98*(3). <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2017>
- Karlsson, S. A., Haziri, K., Hansson, E., Kettunen, P., & Westberg, L. (2015). Effects of sex and gonadectomy on social investigation and social recognition in mice. *BMC Neuroscience*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0221-z>
- Keshavarzi, S., Sullivan, R. K. P., Ianno, D. J., & Sah, P. (2014). Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *Journal of Neuroscience*, *34*(26). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-14.2014>
- Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Silva, A. J. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*, *10*(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(2000\)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6)



- Leclair, K. B., Chan, K. L., Kaster, M. P., Parise, L. F., Burnett, C. J., & Russo, S. J. (2021). Individual history of winning and hierarchy landscape influence stress susceptibility in mice: Social rank and stress susceptibility. *ELife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/eLife.71401>
- Lee, H. J., Caldwell, H. K., Macbeth, A. H., Tolu, S. G., & Young, W. S. (2008). A conditional knockout mouse line of the oxytocin receptor. *Endocrinology*, *149*(7). <https://doi.org/10.1210/en.2007-1710>
- Lefevre, A., Benusiglio, D., Tang, Y., Krabichler, Q., Charlet, A., & Grinevich, V. (2021). Oxytocinergic Feedback Circuitries: An Anatomical Basis for Neuromodulation of Social Behaviors. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 15). <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.688234>
- Lehr, A. B., Kumar, A., Tetzlaff, C., Hafting, T., Fyhn, M., & Stöber, T. M. (2021). CA2 beyond social memory: Evidence for a fundamental role in hippocampal information processing. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 126). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.020>
- Leng, G., Leng, R. I., & Ludwig, M. (2022). Oxytocin-a social peptide? Deconstructing the evidence. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 377, Issue 1858). <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0055>
- Leroy, F., Brann, D. H., Meira, T., & Siegelbaum, S. A. (2017). Input-Timing-Dependent Plasticity in the Hippocampal CA2 Region and Its Potential Role in Social Memory. *Neuron*, *95*(5). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.036>
- Li, Y., Mathis, A., Grewe, B. F., Osterhout, J. A., Ahanonu, B., Schnitzer, M. J., Murthy, V. N., & Dulac, C. (2017). Neuronal Representation of Social Information in the Medial Amygdala of Awake Behaving Mice. *Cell*, *171*(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.015>
- Lin, Y. T., Hsieh, T. Y., Tsai, T. C., Chen, C. C., Huang, C. C., & Hsu, K. Sen. (2018). Conditional deletion of hippocampal CA2/CA3a oxytocin receptors impairs the persistence of long-term social recognition memory in mice. *Journal of Neuroscience*, *38*(5). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1896-17.2017>
- Liu-Chen, L.-Y., & Inan, S. (2022). *The kappa opioid receptor*. Springer.
- Love, T. M. (2014). Oxytocin, motivation and the role of dopamine. In *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (Vol. 119). <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.06.011>

- Ménard, C., Tse, Y. C., Cavanagh, C., Chabot, J. G., Herzog, H., Schwarzer, C., Wong, T. P., & Quirion, R. (2013). Knockdown of prodynorphin gene prevents cognitive decline, reduces anxiety, and rescues loss of group 1 metabotropic glutamate receptor function in aging. *Journal of Neuroscience*, *33*(31). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0290-13.2013>
- Menon, R., & Neumann, I. D. (2023). Detection, processing and reinforcement of social cues: regulation by the oxytocin system. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 24, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/s41583-023-00759-w>
- Monte, O. D., Piva, M., Anderson, K. M., Tringides, M., Holmes, A. J., & Chang, S. W. C. (2017). Oxytocin under opioid antagonism leads to supralinear enhancement of social attention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.1702725114>
- Netser, S., Meyer, A., Magalnik, H., Zylbertal, A., de la Zerda, S. H., Brilller, M., Bizer, A., Grinevich, V., & Wagner, S. (2020). Distinct dynamics of social motivation drive differential social behavior in laboratory rat and mouse strains. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19569-0>
- Noack, J., Murau, R., & Engelmann, M. (2015). Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice. *Frontiers in Neuroscience*, *9*(APR). <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00152>
- Noack, J., Richter, K., Laube, G., Haghgoo, H. A., Veh, R. W., & Engelmann, M. (2010). Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *94*(4). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.09.013>
- Oettl, L. L., Ravi, N., Schneider, M., Scheller, M. F., Schneider, P., Mitre, M., da Silva Gouveia, M., Froemke, R. C., Chao, M. v., Young, W. S., Meyer-Lindenberg, A., Grinevich, V., Shusterman, R., & Kelsch, W. (2016). Oxytocin Enhances Social Recognition by Modulating Cortical Control of Early Olfactory Processing. *Neuron*, *90*(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.033>
- Okabe, S., Kitano, K., Nagasawa, M., Mogi, K., & Kikusui, T. (2013). Testosterone inhibits facilitating effects of parenting experience on parental behavior and the oxytocin neural system in mice. *Physiology and Behavior*, *118*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.017>

- Olusakin, J., & Lobo, M. K. (2023). An endogenous opioid alters neuronal plasticity to constrain cognitive flexibility. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 28, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02204-x>
- Pena, R. R., Pereira-Caixeta, A. R., Moraes, M. F. D., & Pereira, G. S. (2014). Anisomycin administered in the olfactory bulb and dorsal hippocampus impaired social recognition memory consolidation in different time-points. *Brain Research Bulletin*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.10.009>
- Perna, J. C., Wotjak, C. T., Stork, O., & Engelmann, M. (2015). Timing of presentation and nature of stimuli determine retroactive interference with social recognition memory in mice. *Physiology and Behavior*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.029>
- Pizzagalli, D. A., Smoski, M., Ang, Y. S., Whitton, A. E., Sanacora, G., Mathew, S. J., Nurnberger, J., Lisanby, S. H., Iosifescu, D. v., Murrough, J. W., Yang, H., Weiner, R. D., Calabrese, J. R., Goodman, W., Potter, W. Z., & Krystal, A. D. (2020). Selective kappa-opioid antagonism ameliorates anhedonic behavior: evidence from the Fast-fail Trial in Mood and Anxiety Spectrum Disorders (FAST-MAS). *Neuropsychopharmacology*, 45(10). <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0738-4>
- Popik, P., Vetulani, J., Bisaga, A., & van Ree, J. M. (1991). Recognition cue in the rat's social memory paradigm. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 2(4). <https://doi.org/10.1515/JBCPP.1991.2.4.315>
- Putnam, P. T., & Chang, S. W. C. (2022). Interplay between the oxytocin and opioid systems in regulating social behaviour. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 377, Issue 1858). <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0050>
- Raam, T., McAvoy, K. M., Besnard, A., Veenema, A., & Sahay, A. (2017). Hippocampal oxytocin receptors are necessary for discrimination of social stimuli. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02173-0>
- Richter, K., Wolf, G., & Engelmann, M. (2005). Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learning and Memory*, 12(4). <https://doi.org/10.1101/lm.97505>
- Rimmele, U., Hediger, K., Heinrichs, M., & Klaver, P. (2009). Oxytocin makes a face in memory familiar. *Journal of Neuroscience*, 29(1). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4260-08.2009>

- Robles, C. F., McMackin, M. Z., Campi, K. L., Doig, I. E., Takahashi, E. Y., Pride, M. C., & Trainor, B. C. (2014). Effects of kappa opioid receptors on conditioned place aversion and social interaction in males and females. *Behavioural Brain Research*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.003>
- Ryan, P. J., Ross, S. I., Campos, C. A., Derkach, V. A., & Palmiter, R. D. (2017). Oxytocin-receptor-expressing neurons in the parabrachial nucleus regulate fluid intake. *Nature Neuroscience*, 20(12). <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0014-z>
- Shamay-Tsoory, S. G., & Abu-Akel, A. (2016). The Social Salience Hypothesis of Oxytocin. In *Biological Psychiatry* (Vol. 79, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.020>
- Simonin, F., Gavériaux-Ruff, C., Befort, K., Matthes, H., Lannes, B., Micheletti, G., Mattéi, M. G., Charron, G., Bloch, B., & Kieffer, B. (1995).  $\kappa$ -Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.7006>
- Skupio, U., Welte, J., Serrat, R., Eraso-Pichot, A., Julio-Kalajzić, F., Gisquet, D., Cannich, A., Delcasso, S., Matias, I., Fundazuri, U. B., Pouvreau, S., Pagano Zottola, A. C., Lavanco, G., Drago, F., Ruiz de Azua, I., Lutz, B., Bellocchio, L., Busquets-Garcia, A., Chaouloff, F., & Marsicano, G. (2023). Mitochondrial cannabinoid receptors gate corticosterone impact on novel object recognition. *Neuron*, 111(12). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.04.001>
- Skuse, D. H., Lori, A., Cubells, J. F., Lee, I., Conneely, K. N., Puura, K., Lehtimäki, T., Binder, E. B., & Young, L. J. (2014). Common polymorphism in the oxytocin receptor gene (OXTR) is associated with human social recognition skills. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1302985111>
- Smith, A. S., Williams Avram, S. K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J., & Young, W. S. (2016). Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Molecular Psychiatry*, 21(8). <https://doi.org/10.1038/mp.2015.189>
- Son, S., Manjila, S. B., Newmaster, K. T., Wu, Y. T., Vanselow, D. J., Ciarletta, M., Anthony, T. E., Cheng, K. C., & Kim, Y. (2022). Whole-Brain Wiring Diagram of Oxytocin System in Adult Mice. *Journal of Neuroscience*, 42(25). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0307-22.2022>
- Talpo, F., Spaiardi, P., Castagno, A. N., Maniezzi, C., Raffin, F., Terribile, G., Sancini, G., Pisani, A., & Biella, G. R. (2023). Neuromodulatory functions exerted by oxytocin on different

populations of hippocampal neurons in rodents. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 17). <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1082010>

Tan, O., Musullulu, H., Raymond, J. S., Wilson, B., Langguth, M., & Bowen, M. T. (2019). Oxytocin and vasopressin inhibit hyper-aggressive behaviour in socially isolated mice. *Neuropharmacology*, *156*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.016>

Thor, D. H., & Holloway, W. R. (1982). Social memory of the male laboratory rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *96*(6). <https://doi.org/10.1037/0735-7036.96.6.1000>

Tirko, N. N., Eyring, K. W., Carcea, I., Mitre, M., Chao, M. v., Froemke, R. C., & Tsien, R. W. (2018). Oxytocin Transforms Firing Mode of CA2 Hippocampal Neurons. *Neuron*, *100*(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.008>

Tzakis, N., & Holahan, M. R. (2019). Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>

Votinov, M., Pripfl, J., Windischberger, C., Moser, E., Sailer, U., & Lamm, C. (2015). A functional polymorphism in the prodynorphin gene affects cognitive flexibility and brain activation during reversal learning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*(July). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00172>

Wagner, J. J., Terman, G. W., & Chavkin, C. (1993). Endogenous dynorphins inhibit excitatory neurotransmission and block LTP induction in the hippocampus. *Nature*, *363*(6428). <https://doi.org/10.1038/363451a0>

Wang, Y., Zhuang, Y., DiBerto, J. F., Zhou, X. E., Schmitz, G. P., Yuan, Q., Jain, M. K., Liu, W., Melcher, K., Jiang, Y., Roth, B. L., & Xu, H. E. (2023). Structures of the entire human opioid receptor family. *Cell*, *186*(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.026>

Wanisch, K., Wotjak, C. T., & Engelmann, M. (2008). Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behavioural Brain Research*, *186*(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.008>

Weigelt, S., Koldewyn, K., & Kanwisher, N. (2012). Face identity recognition in autism spectrum disorders: A review of behavioral studies. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 36, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.008>

Weigelt, S., Koldewyn, K., & Kanwisher, N. (2013). Face recognition deficits in autism spectrum disorders are both domain specific and process specific. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074541>

Weisskopf, M. G., Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1993). Erratum: The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fibre synapses and modulates long-term potentiation (*Nature* (1993) 362 (423-427)). In *Nature* (Vol. 365, Issue 6442). <https://doi.org/10.1038/365188a0>

Wolf, D., Hartig, R., Zhuo, Y., Scheller, M. F., Articus, M., Moor, M., Grinevich, V., Linster, C., Russo, E., Weber-Fahr, W., Reinwald, J. R., & Kelsch, W. (2024). Oxytocin induces the formation of distinctive cortical representations and cognitions biased toward familiar mice. *Nature communications*, 15(1), 6274. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50113-6>

Yakovleva, T., Bazov, I., Cebers, G., Marinova, Z., Hara, Y., Ahmed, A., Vlaskovska, M., Johansson, B., Hochgeschwender, U., Singh, I. N., Bruce-Keller, A. J., Hurd, Y. L., Kaneko, T., Terenius, L., Ekström, T. J., Hauser, K. F., Pickel, V. M., Bakalkin, G., Yakovleva, T., Bakalkin, G. (2006). Prodynorphin storage and processing in axon terminals and dendrites. *The FASEB Journal*, 20(12). <https://doi.org/10.1096/fj.06-6174fje>

Yang, R., Tuan, R. R. L., Hwang, F. J., Bloodgood, D. W., Kong, D., & Ding, J. B. (2023). Dichotomous regulation of striatal plasticity by dynorphin. *Molecular Psychiatry*, 28(1). <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01885-0>

You, Z. D., Li, J. H., Song, C. Y., Wang, C. H., & Lu, C. L. (2000). Chronic morphine treatment inhibits oxytocin synthesis in rats. *NeuroReport*, 11(14). <https://doi.org/10.1097/00001756-200009280-00015>

Zagrean, A. M., Georgescu, I. A., Iesanu, M. I., Ionescu, R. B., Haret, R. M., Panaitescu, A. M., & Zagrean, L. (2022). Oxytocin and vasopressin in the hippocampus. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 118). <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2021.11.002>