UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Neurobiologia

Charakterystyka szczepu myszy Oprk1^{Tph2CreERT2}

Julia Netczuk

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

Kraków 2024

Podziękowania

Chciałabym wyrazić moją dozgonną wdzięczność za cierpliwość, służenie nieustanną pomocą w trakcie wszystkich wyzwań związanych z realizowaniem niniejszej pracy i dzielenie się wielką pasją do świata neuronauki, mojemu Opiekunowi, prof. dr hab. Janu Rodriguezowi Parkitnie.

Szczególne podziękowania kieruję do mojej Mentorki, mgr (niebawem dr) Klaudii Misiołek, która była dla mnie ogromnym wsparciem w trudnych chwilach, dodając otuchy i motywując do działania, a także udzielając stale nieocenionej pomocy w trakcie prowadzonych badań.

Serdeczne podziękowania składam Pani prof. dr hab. Krystynie Gołembiowskiej za owocną współpracę w zakresie wykonania analiz kulometrycznych.

Dziękuję ogromnie mgr Łukaszowi Szumcowi, który pokazał mi tajniki pracy ze zwierzętami i narzędzia neurobiologii molekularnej, oferując cenną pomoc i wskazówki na każdym etapie.

Kieruję swoje podziękowania również całemu zespołowi Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN za podtrzymywanie na duchu i wsparcie dobrym słowem.

Dziękuję Nelis, za nadawanie sensu mojemu życiu i bycie ze mną w najgorszych momentach.

Spis treści

Wykaz skrótów - 3 -

Streszczenie - 4 -

Abstract - 5 -

1. Wstęp - 6 -

1.1 Odkrycie endogennego układu opioidowego - 6 -

1.2 Rola endogennego układu opioidowego - 7 -

1.3 Układ KOR - dynorfiny - 11 -

1.4 Interakcje układu serotonergicznego i KOR - 14 -

1.5 Różnice płciowe w działaniu układu serotonergicznego i KOR - 15 -

2. Cel pracy - 18 -

3. Materiały i metody - 19 -

3.1 Zwierzęta doświadczalne - 19 -

3.2 Genotypowanie - 20 -

3.3 Chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną - 22 -

3.4 Testy behawioralne - 22 -

3.4.1 Test otwartego pola - 24 -

3.4.2 Test jasnego-ciemnego pudełka - 25 -

3.4.3 Test preferencji sacharyny - 25 -

3.4.4 Test pamięci społecznej - 26 -

3.5 Analiza statystyczna - 27 -

4. Wyniki - 28 -

4.1 Ilościowa analiza wybranych monoamin w korze czołowej i prążkowiu u myszy szczepu Oprk1^{Tph2CreERT2} - 28 -

4.2 Fenotyp behawioralny myszy szczepu Oprk1^{Tph2CreERT2} - 31 -

4.2.1 Ocena zachowań eksploracyjnych w teście otwartego pola - 31 -

4.2.2 Badanie reakcji lękowej w teście jasnego-ciemnego pudełka - 32 -

4.2.3 Ocena objawów anhedonii w teście preferencji sacharyny - 34 -

4.2.4 Test rozpoznawania nowego partnera - 35 -

5. Dyskusja i wnioski - 37 -

6. Piśmiennictwo - 45 -

Wykaz skrótów

ANOVA – analiza wariancji

DA – dopamina

HPA – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza

HVA - kwas homowanilinowy

KOR – receptory opioidowe κ

NA - noradrenalina

(P)FC – kora (przed)czołowa

SSRI – inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny

STR - prążkowie

3-MT – 3-metoksytyramina

5-HIAA - kwas 5-hydroksyindolooctowy

5-HT – 5-hydroksytryptamina (serotonina)

Streszczenie

Endogenna sygnalizacja opioidowa odgrywa kluczową rolę w licznych procesach fizjologicznych, a receptory κ-opioidowe (KOR) są istotnie zaangażowane w regulację odpowiedzi na stres i odgrywają ważną rolę w zachowaniach związanych z lękiem. Działanie KOR stanowi obecnie cel wielu badań w kontekście rozwoju skutecznych i bezpiecznych metod leczenia zaburzeń psychicznych. Istnieją doniesienia na temat roli KOR w obrębie neuronów serotonergicznych (5-HT), kluczowych modulatorów stanów emocjonalnych, jednak dotychczas nie opisano ich dokładnej funkcji w tym obszarze. W niniejszej pracy zbadano zależny od płci wpływ delecji KOR na neuronach serotoninergicznych na fenotyp behawioralny i molekularny szczepu myszy $Oprk1^{Tph2CreERT2}$. Analiza monoamin przeprowadzona za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykazała spadek stężenia 5-HT w korze czołowej (FC) samców zmutowanych myszy w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy u samic nie zaobserwowano zmian. Wstępna charakterystyka behawioralna wykazała brak widocznych efektów mutacji, normalną aktywność w otwartym polu i nienaruszoną preferencję słodkiego smaku. Zaobserwowano jednak znaczący wpływ interakcji genotypu i płci na zachowania lękowe w teście jasnego-ciemnego pudełka. Z kolei test pamięci społecznej wykazał, że samce mutantów cechowały się upośledzoną pamięcią społeczną w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki wskazują, że delecja KOR na neuronach 5-HT ma znaczący wpływ na zawartość monoamin w śródmózgowiu i nie zaburza zachowań eksploracyjnych i hedonistycznych. Zaobserwowałam istotny wpływ interakcji (genotyp x płeć) na parametry behawioralne: latencję do pierwszego wejścia jasnego przedziału w teście jasnego-ciemnego pudełka, i na parametry molekularne: zawartość 5-HT w FC. Obserwacje te wskazują, że KOR bezpośrednio moduluje funkcję 5-HT i pośrednio zachowania lękowe w sposób zależny od płci. W przyszłości uzyskane wyniki wspomogą rozwój farmakoterapii zaburzeń neuropsychiatrycznych uwzględniając aspekt płci.

Abstract

Endogenous opioid signalling plays a key role in numerous physiological processes, and κ-opioid receptors (KOR) are significantly involved in regulating the stress response and in anxiety-related behaviours. The action of KOR is currently a target of intensive research in the context of developing effective and safe treatments for psychiatric disorders. There are some reports on the role of KORs within serotonergic (5-HT) neurons, key modulators of emotional states, but their precise function in this area has not yet been described. In the present study, we investigated the gender-dependent effects of KOR deletions on serotonergic neurons on the behavioural and molecular phenotype of the Oprk1^{Tph2CreERT2} mouse strain. Monoamine analysis by high-performance liquid chromatography showed a decrease in 5-HT in the frontal cortex (FC) of male mutant mice compared to the control group. At the same time, no change was observed in females. Preliminary behavioural characterization showed no apparent effects of the mutation, normal open-field activity and an intact preference for sweet taste. However, a significant effect of interaction of genotype and sex was observed on anxiety behaviour in the light-dark box test. On the other hand, social memory test showed that male mutants exhibited impaired social memory compared to the control group. The results indicate that deletion of KOR on 5-HT neurons affects midbrain monoamine content and has no significant effect on exploratory or hedonic behaviour. I found a significant effect of interaction (genotype x sex) on behavioural parameters: latency to the first enter the bright compartment in the light-dark box test and molecular parameters: 5-HT content in the FC. These observations show that KOR directly modulates 5-HT function and indirectly anxiety-responsive behaviour in a gender-dependent manner. Perhaps in the future, the results obtained will support the development of gender-sensitive pharmacotherapy for neuropsychiatric disorders.

1. Wstęp

Receptory κ-opioidowe (ang. *κ-opioid receptors*, dalej „KOR") są wyrażane obficie zarówno w obwodowym jak i ośrodkowym układzie nerwowym, w tym na neuronach serotonergicznych (wydzielających serotoninę, dalej „5-HT") w grzbietowych i przyśrodkowych jądrach szwu (ang. *dorsal and median raphe nuclei*) (Wright i in. 2018). KOR odgrywają ważną rolę w regulacji aktywności układu serotonergicznego mózgu; są zlokalizowane pre- i postsynaptycznie, a ich aktywacja przekłada się na hamowanie wydzielania 5-HT i zmniejszenie aktywności neuronów poprzez hiperpolaryzację (Berger i in. 2006; Coutens i Ingram 2023; Kalyuzhny i Wessendorf 1999). Zarówno układ κ-opioidowy jak i 5-HT są silnie powiązane z modulacją emocji, nastroju i reakcji na stres, w związku z czym receptory KOR i 5-HT od dawna badane są jako potencjalny cel farmakologiczny leczenia zaburzeń lękowych, depresji czy uzależnień (D'Addario i in. 2007; Van't Veer i Carlezon 2013). Liczne doniesienia wskazują na występowanie istotnych różnic płciowych w funkcjonowaniu KOR (Chartoff i Mavrikaki 2015; Gear i in. 1996; Taylor i in. 2022) oraz układu serotonergicznego (Goel i Bale 2010; Jones i Lucki 2005; Nishizawa i in. 1997). Jednakże wpływ płci na funkcjonowanie obu układów, a w szczególności na interakcję KOR z neuronami 5-HT, nadal pozostają niewystarczająco poznane. Dokładne zrozumienie powyższych mechanizmów umożliwiłoby opracowanie nowych strategii leczenia chorób psychicznych związanych z negatywnym afektem wywołanym stresem. W związku z tym w niniejszej pracy skupiłam się na zbadaniu wpływu braku KOR na neuronach serotoninergicznych na występowanie różnic płciowych w zachowaniu (eksploracyjne, lękowe, związane z hedonią) oraz wydzielaniu monoamin (serotoniny, dopaminy i ich metabolitów) wykorzystując szczep myszy transgenicznych Oprk1^{Tph2CreERT2}.

1.1 Odkrycie endogennego układu opioidowego

Opiaty, izolowane z maku lekarskiego, interesowały ludzkość od tysiącleci, będąc jednym z pierwszych leków na ból, stosowanym od czasów starożytnych Sumerów (Bandyopadhyay 2019). Zainteresowanie to przełożyło się na intensywne badania nad profilem działania tych substancji w organizmie, a co za tym idzie odkryciem endogennego układu opioidowego.

Pierwsze doniesienia, potwierdzające istnienie receptorów opioidowych zostały zaprezentowane w 1954 roku przez Arnolda Becketta i A.F. Casy'ego, gdzie autorzy wskazali istnienie wspólnych miejsc wiązania dla różnych rodzajów opioidowych leków przeciwbólowych (Beckett i Casy 1954). Natomiast obecność receptorów opioidowych w tkance nerwowej wykazano dopiero w latach 70. XX wieku, dzięki odkryciu Candace Pert i Solomona Snydera z Uniwersytetu Johna Hopkinsa. Opisali oni wówczas specyficzne wiązanie antagonisty opioidowego (naloksonu) z receptorami opioidowymi w homogenacie tkanki nerwowej gryzoni przy pomocy nowo opracowanej wówczas techniki wiązania radioaktywnych ligandów (Pert i Snyder 1973). Dalsze badania umożliwiły klasyfikację receptorów opioidowych na trzy główne typy: μ (mu dla morfiny z greki; dalej jako "MOR"), δ (delta od odpowiedzi fizjologicznej obserwowanej w nasieniowodach - *vas deferens* u myszy; dalej "DOR") oraz κ (kappa dla ketocyklazocyny, będącej pierwszym znanym ligandem) została zaproponowana po raz pierwszy w 1976 r. przez Martina i współpracowników, co stworzyło podstawy do bardziej szczegółowych badań potencjalnych różnic funkcjonalnych pomiędzy tymi klasami (Martin i in. 1976). Podobnie prezentuje się podział endogennych agonistów receptorów opioidowych: dzielą się na trzy główne grupy neuropeptydów (receptor μ - β-endorfiny, receptor μ i δ – Met- i Leuenkefaliny, receptor κ - dynorfiny) będące produktami proteolitycznego cięcia enzymatycznego trzech białek prekursorowych, kolejno proopiomelanokortyny, preproenkefaliny i prodynorfiny (Drolet i in. 2001; Marx 1983). Geny kodujące receptory (*OPRM1, OPRD1* i *OPRK1*) i peptydy (*POMC, PENK* i *PDYN*) opioidowe u ludzi są ewolucyjnie zachowane - ich ortologi występują u innych ssaków, w tym u myszy i szczurów, co wskazuje, że pełnią niezbędne biologiczne funkcje (Stevens 2009).

1.2 Rola endogennego układu opioidowego

Jedną z najważniejszych ról układu opioidowego, kontrolowanych poprzez działanie wszystkich grup opioidów, jest regulacja nocycepcji. Peptydy opioidowe (enkefaliny, endorfiny i dynorfiny) wiążą się z receptorami w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, hamując przekazywanie sygnałów bólowych, co skutkuje analgezją. Pomimo, iż pobudzenie wszystkich typów receptorów opioidowych ma działanie analgetyczne, za większość efektów przeciwbólowych oraz skutków ubocznych występujących podczas ich stosowania (depresja oddechowa, tolerancja, potencjał

uzależniający) odpowiada aktywacja receptorów MOR (Bagley i Ingram 2020; Higginbotham i in. 2022). Aktywacja MOR tłumi sygnały bólowe na poziomie mózgu i rdzenia kręgowego, skutecznie lecząc ostry ból, zaś DOR i KOR działają w sposób lokalny dając mniej silne efekty przeciwbólowe (Darcq i Kieffer 2018). Pobudzenie KOR jest przede wszystkim związane z analgezją w trzewnych szlakach bólowych, termicznych czy związanych z wystąpieniem stanu zapalnego. Z drugiej strony silne pobudzenie receptorów KOR może prowadzić do wystąpienia niepożądanych skutków, takich jak dysforia, sedacja oraz diureza (Dalefield i in. 2022). Natomiast w przypadku aktywacji DOR obserwujemy umiarkowaną analgezję, co skutkuje mniejszą skutecznością w uśmierzaniu ostrego bólu w porównaniu z aktywacją MOR. Innym aspektem aktywacji DOR jest ich rola w przetwarzaniu chronicznego bólu, co zbadano w teście warunkowanej awersji miejsca poprzez podanie antagonisty DOR (naltrindolu) u myszy z modelem obwodowego uszkodzenia nerwów. Podanie selektywnego antagonisty tych receptorów spowodowało warunkowaną awersję miejsca w grupie z wywołanym neuropatycznym bólem, z kolei w grupie kontrolnej nie zaobserwowano podobnych efektów (Cahill i in. 2022).

Kolejną istotną funkcją układu opioidowego jest regulacja nagrody i motywacji oraz procesów uczenia się. Opioidy modulują działanie mózgowego układu nagrody, w tym zarówno wrażliwość na nagrody naturalne takie jak zachowania związane z przyjmowaniem pokarmu, zachowania seksualne, kontakty społeczne jak i substancje uzależniające (Bodnar 2024). Shippenberg i Herz w 1986 opisali zróżnicowane zaangażowanie MOR i KOR w przebieg mechanizmów motywacyjnych, wykorzystując test warunkowanej preferencji miejsca. Procedura ta opiera się na uczeniu zwierząt skojarzenia kontekstu środowiskowego (np. konkretnego obszaru klatki eksperymentalnej) z efektem wywołanym podawanym lekiem (w tym przypadku agonistą KOR lub MOR). Podanie agonisty KOR, U-69593, lub antagonisty, naloksonu, doprowadziło do warunkowanej awersji miejsca, natomiast warunkowanie zwierząt wywołane agonistą MOR – morfiną - skutkowało warunkowaną preferencją miejsca (Shippenberg i Herz 1986). Wynika z tego, że aktywacja MOR jest związana z pozytywnym wzmocnieniem i nagrodą, aktywacja KOR zwykle wywołuje efekty awersyjne i reakcje podobne do stresu, co może zmniejszyć motywację do zdobywania nagrody.

KOR odgrywają kluczową rolę w modulowaniu negatywnych aspektów uzależnienia – takich jak stan odstawienia lub krótkotrwała bądź wydłużona abstynencja. Układ KOR-dynorfina działają jako swoisty system „anty-nagrodowy", którego działanie nasila się podczas stresu, a co za tym idzie promuje poszukiwanie nagrody skutkujące emocjonalnym ukojeniem (Darcq i Kieffer 2018).

DOR również pełnią ważną rolę w procesach uczenia się i zapamiętywania związanych z nagrodą. Podobnie, udowodniono to wykorzystując test warunkowanej preferencji miejsca. Myszy z usuniętym genem kodującym DOR wykazywały upośledzone warunkowanie do miejsca, zarówno w warunkach apetytywnych (po podaniu morfiny), jak i awersyjnych (po podaniu litu) (Le Merrer i in. 2011). Aktywacja DOR wzmacnia kontekstowe zapamiętywanie, wpływając w ten sposób na procesy warunkowania, ale nie wpływa na zwiększanie właściwości nagradzających morfiny. Mutanty bez DOR równie chętnie jak zwierzęta kontrolne sięgały po tę substancję. Receptory te modulują m.in. nagradzające efekty występujące podczas jedzenia, co wskazuje na ich udział w hedonicznych aspektach pobierania pokarmu (Bodnar 2004). Ich rola jest również obecna w przypadku tworzenia i przywoływania wspomnień kojarzonych z nagrodą (Klenowski, Morgan, i Bartlett 2015).

Endogenny układ opioidowy odgrywa także istotną rolę w regulacji nastroju i reakcji emocjonalnych, wpływając na patofizjologię zaburzeń psychicznych. Agoniści MOR mogą łagodzić objawy depresji, ale ich silne działanie na skutki uboczne i potencjał uzależniający utrudniają ich wykorzystanie w terapii (Lutz i Kieffer 2013). Dowiedziono, że osoby z ciężkim zaburzeniem depresyjnym często wykazują zmienioną, obniżoną aktywność MOR. Zwiększone poziomy endogennych agonistów MOR (takich jak β-endorfina) mogą być związane ze zmniejszeniem objawów depresyjnych (zmniejszona hedonia, problemy ze snem, obniżony nastrój). Jednakże przewlekły stres może prowadzić do desensytyzacji MOR, przyczyniając się do anhedonii, głównego objawu depresji (Nummenmaa i in. 2020). W zespole stresu pourazowego (PTSD), spadek aktywności MOR może zaostrzać objawy, takie jak nadmierne pobudzenie i natrętne wspomnienia, poprzez modulację osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) (Meier, Eikemo, i Leknes 2021). W zespole nadpobudliwości ruchowej z deficytem uwagi (ADHD) aktywacja receptorów MOR zwiększa impulsywność i wrażliwość na nagrodę (Olmstead, Ouagazzal, i Kieffer 2009). W związku z tym opisane zmiany w aktywności receptorów MOR mogą przyczyniać się do impulsywnych zachowań

charakterystycznych dla tego zaburzenia. Rola MOR w lęku jest złożona. Podczas gdy ostra aktywacja może zmniejszać zachowania podobne do lęku, przewlekła aktywacja receptorów może prowadzić do tolerancji i efektów odstawienia, które nasilają objawy lękowe (Colasanti i in. 2011). Myszy z wyłączonym genem MOR wykazują zwiększony niepokój w odpowiedzi na stres, co sugeruje, że MOR odgrywają ochronną rolę w regulacji emocji (Drolet i in. 2001).

DOR mogą odgrywać rolę w rozwijaniu odporności na stres. Zaobserwowano, że zmniejszona dostępność DOR w miejscu sinawym występuje po ostrej ekspozycji na stres, przyczyniającej się do krótko- i długotrwałych zachowań lękowych (Tkaczynski, Borodovitsyna, i Chandler 2022). Ta właściwość jest szczególnie istotna w terapii PTSD, gdzie aktywacja DOR może łagodzić objawy nadmiernego pobudzenia i promować odporność na stres. Podanie selektywnego agonisty DOR zmniejszyło zachowania lękowe w modelach zwierzęcych (Kawaminami i in. 2023). Wykazano również, że myszy bez DOR lub enkefalin wykazywały wyższy poziom lęku w odpowiedzi na stresowy bodziec (Drolet i in. 2001). Podobnie jak w przypadku lęku, aktywacja DOR może również przyczyniać się do działania przeciwdepresyjnego. Badania przedkliniczne na myszach sugerują, że agonisty DOR mogą poprawiać nastrój i zmniejszać objawy depresyjne poprzez modulację układów neuroprzekaźników zaangażowanych w regulację nastroju (Olson i in. 2023).

Aktywacja KOR charakteryzuje się wywoływaniem negatywnych stanów emocjonalnych i dysforią. Receptory KOR są powiązane z patofizjologią stanów depresyjnych (Dalefield i in. 2022). Podwyższone poziomy dynorfiny obserwowano u osób z głęboką depresją, co sugeruje, że aktywacja KOR może przyczyniać się do objawów depresyjnych poprzez wywoływanie anhedonii i negatywnych emocji (Knoll i Carlezon 2010). Aktywacja KOR została powiązana również ze nasileniem zachowań podobnych do lęku. Badania wskazują, że stres może prowadzić do zwiększonego uwalniania dynorfiny, co aktywuje KOR i promuje reakcje lękowe (Reed, Butelman, i Kreek 2022). Antagoniści KOR wykazali się obiecującą skutecznością w łagodzeniu skutków stresu w modelach przedklinicznych zaburzeń neuropsychiatrycznych (Carlezon i Krystal 2016). Układ KOR odgrywa rolę w modulacji osi HPA podobnie jak MOR, ale często z przeciwnymi efektami. Podczas gdy aktywacja MOR ma tendencję do tłumienia reakcji na stres, aktywacja KOR może je zaostrzać, co prowadzi do zwiększonej wrażliwości na czynniki stresujące i zwiększonej podatności na zaburzenia nastroju.

Przykładowo, jednym z badań po jednorazowym podaniu selektywnego agonisty KOR (U50,488) szczurom, zaobserwowano podniesione ilości hormonów stresowych w surowicy zwierząt w ciągu pierwszych 6 godzin (Varastehmoradi i in. 2023).

Obecnie trwają również badania kliniczne, rozważające możliwość wykorzystania selektywnego antagonisty KOR, aticaprantu, jako terapię wspomagającą leczenie farmakologiczne depresji (Schmidt i in. 2024). Pierwsze wyniki wydają się być obiecujące – uczestnicy chorujący na przewlekłe zaburzenia depresyjne, a nie wykazujący dostatecznej odpowiedzi na leki z grupy inhibitorów zwrotnego wychwytu serotoniny, wykazali znaczące zmniejszenie objawów choroby. Dodatkowo, nie zaobserwowano poważnych działań niepożądanych, co umożliwia kontynuowanie badań z wykorzystaniem większych dawek. Ostatnie doniesienia skupiają się także na navacaprantcie, które są w fazie rozwoju jako leczenie depresji, a pierwsze zdają się być obiecujące (Wong i in. 2024). Badania kliniczne wczesnej fazy wykazały znaczną poprawę objawów depresji i korzyści w zakresie anhedonii. Zgodnie z doniesieniami autorów oba środki wydają się dobrze tolerowane i wykazują łagodne działania niepożądane wśród pacjentów.

Pomimo wielu lat, które upłynęły od odkrycia układu opioidowego i mnogości zebranych danych, wciąż do odkrycia pozostało dużo niewiadomych na temat sposobów modulacji poszczególnych zachowań i procesów fizjologicznych, a w szczególności jego roli w schorzeniach o podłożu psychicznym. Trwające badania dążą do odkryć nowych aspektów tego układu, które umożliwiłyby opracowanie skutecznych leków o wysokim profilu bezpieczeństwa i szerokim spektrum działania. Tutaj właśnie receptory kappa i ich ligandy – dynorfiny – są brane pod uwagę jako mogące odgrywać kluczową rolę w rozwoju i patofizjologii objawów lękowych, depresyjnych czy stresowych.

1.3 Układ KOR - dynorfiny

Gen kodujący KOR, *Oprk1*, znajduje się na chromosomie 1 u myszy, a jego ludzki ortolog *OPRK1* na chromosomie 8 (OPRK1) (Ensembl; Jackson Laboratory). Mysi gen kodujący sekwencję białka KOR składa się z czterech eksonów, podczas gdy u ludzi opisano trzy. Chociaż *Oprk1* dzieli swoją podstawową architekturę ekson-intron z innymi genami receptorów opioidowych, takimi jak *Oprm1* (MOR) i *Oprd1* (DOR), wykazuje wyraźne różnice, szczególnie w regionach kodujących sekwencje, które determinują specyficzność ligandu i wiązanie wewnątrzkomórkowych białek G. Różnice występują

w sekwencjach obejmujących pętle zewnątrzkomórkowe i domeny receptora („kieszeń") wiążące ligand, które wpływają na powinowactwo KOR do ligandów, takich jak specyficzne dla KOR dynorfiny (Kieffer 2000). Organizacja strukturalna genu wysoce konserwowana u różnych gatunków, podkreślając jej ewolucyjne znaczenie w utrzymaniu kluczowych funkcji receptora opioidowego (Yuferov i in. 2004). Wysoki stopień zachowania struktury między gatunkami sugeruje, że gen *Oprk1* odgrywa istotną rolę fizjologiczną u kręgowców.

KOR mają wspólną dla wszystkich receptorów opioidowych architekturę siedmiu transbłonowych helis i są sprzężone z hamującym białkiem $G_{i/o}$. Aktywacja receptora KOR rozpoczyna się od przyłączenia ligandu pod wpływem którego zachodzą specyficzne zmiany konformacji sprzyjające sprzęganiu z białkami G. Aktywowany KOR promuje wymianę guanozyno-5′-difosforanu (GDP) na guanozyno-5′-trifosforan (GTP), co powoduje dysocjację białka Gi/o na dwa aktywne składniki: podjednostkę Gα i dimer βγ. Następnie podjednostka Gα wpływa na zahamowanie tworzenia cyklazy adenylowej, obniżenia poziomu wewnątrzkomórkowego cyklicznego adenozyno-3′,5′-monofosforanu (cAMP), a następnie zmniejszenie aktywności PKA (kinazy białkowej A). Podjednostki βγ aktywują prostownicze kanałów potasowe oraz hamują kanałów wapniowe, obniżając ostatecznie pobudliwość neuronów (Al-Hasani i Bruchas 2011; Bruchas i Chavkin 2010).

Drugim ważnym szlakiem aktywacji KOR jest sygnalizacja zależna od arestyn. Po aktywacji przez ligandy, KOR ulegają fosforylacji w określonych resztach seryny w obrębie domeny C-końcowej. Ta potranslacyjna modyfikacja jest niezbędna do rekrutacji β-arestyny 2, kluczowego białka, które pośredniczy zarówno w desensytyzacji, jak i internalizacji receptora. Wiązanie β-arestyny z fosforylowanymi KOR prowadzi do odłączenia receptorów od białek G, kończąc w ten sposób szlaki sygnałowe wzbudzane przez białko G. Proces ten zachodzi szybko — często w ciągu kilku minut — powodując utrzymujące się osłabienie odpowiedzi komórkowej na późniejszą stymulację agonistą (Jacobson i in. 2020). Po desensytyzacji, receptory KOR są internalizowane poprzez endocytozę za pośrednictwem klatryn. Mechanizm ten nie tylko usuwa receptory KOR z błony plazmatycznej, ale także umożliwia ich sortowanie w obrębie przedziałów endosomalnych. Los zinternalizowanych receptorów KOR może być różny; mogą one zostać ponownie umieszczone na powierzchni komórki lub zostać skierowane do degradacji za pośrednictwem szlaków lizosomalnych. Desensytyzacja i internalizacja

receptorów KOR pełni kilka kluczowych funkcji biologicznych, np. zapobiega nadmiernej stymulacji poprzez zmniejszenie liczby aktywnych receptorów na powierzchni komórki. Receptory KOR są zaangażowane w analgezję i modulację zachowań związanych ze stresem. Ich internalizacja może zmieniać szlaki sygnalizacji bólu, potencjalnie przyczyniając się do rozwoju tolerancji przy przewlekłym stosowaniu opioidów. Ostatnie odkrycia wskazują, że internalizacja KOR może zapewnić ochronę przed takimi stanami jak niedobór tlenu i glukozy. Ten mechanizm ochronny jest mediowany przez aktywację β-arestyn i późniejsze zaangażowanie szlaku sygnałowego kinazy Akt, który promuje przeżycie komórek podczas stresu metabolicznego (Xu i in. 2020). Dodatkowo pozwala to komórkom dostosować się do poziomu stężenia ligandu, zapewniając odpowiednie reakcje fizjologiczne na zmiany środowiskowe.

Głównymi endogennymi ligandami KOR są dynorfiny. Mysi gen prodynorfiny (*Pdyn*) koduje kilka rodzajów dynorfin: odkrytą jako pierwszą dynorfinę A, dynorfinę B, α/β-neoendorfinę czy leumorfinę (Fricker i in. 2020; PubChem b.d.). Dodatkowo, gdy prodynorfina nie jest w pełni przetworzona, może również powstawać „duża dynorfina", 32-aminokwasowa cząsteczka, która zawiera zarówno dynorfinę A, jak i B (Tejeda, Shippenberg, i Henriksson 2012). Kiedy prodynorfina zostanie przecięta przez endopeptydazę - konwertazę prohormonów 2 (PC2), aktywne peptydy są uwalniane przez depolaryzację błonową z pęcherzyków presynaptycznych (Schwazer 2009). Pod względem powinowactwa do KOR, działanie dynorfin jest zróżnicowane. Dynorfina A wykazuje wyższą selektywność dla KOR w porównaniu do dynorfiny B. „Duża" dynorfina ma wyższe powinowactwo do KOR niż dynorfina A, dzięki czemu jest bardziej skuteczna w aktywacji tego receptora (Chavkin 2013).

Zarówno KOR jak i ich endogenne ligandy - dynorfiny występują w całym organizmie, w tym praktycznie w każdej strukturze ośrodkowego układu nerwowego. Analiza dystrybucji KOR i dynorfin przeprowadzona za pomocą pomiaru ekspresji mRNA, hybrydyzacji i technik immunologicznych pokazała, że podczas gdy mRNA jest obecny w ciałach komórkowych, a poziomy białka mogą się różnić w zależności od przemieszczania się receptora do zakończeń neuronalnych czy wydzielenia peptydów w pęcherzykach synaptycznych (Fricker i in. 2020). KOR w przodomózgowiu występuje obficie m.in. w prążkowiu (skorupa i jądro półleżące), w brzusznym polu nakrywki, jądrze półleżącym, korze przedczołowej i ciele migdałowatym (Cahill i in. 2022). Obszary te mają kluczowe znaczenie dla przetwarzania emocji, nagrody i motywacji.

KOR występujący w podwzgórzu są zaangażowanie w regulację neuroendokrynną. Przedmurze, które uważa się za zaangażowane w wytwarzanie świadomości, wykazuje szczególnie wysoką ekspresję KOR, chociaż specyficzne funkcje, które pełnią pozostają niejasne. W kontekście endogennych ligandów KOR, wszystkie peptydy opioidowe najczęściej są wydzielane lokalnie, stąd miejsca występowania dynorfin pokrywają się z ekspresją receptorów. Jedynymi miejscami w mózgu, gdzie nie ma dynorfin są móżdżek i grzbietowe wzgórze (Mansour i in. 1988).

1.4 Interakcje układu serotonergicznego i KOR

Serotonina (5-hydroksytryptamina) neurotransmiter z grupy monoamin, powstaje w neuronach jąder szwu (łac. *nuclei raphe*) w wyniku przekształcenia L-tryptofanu w 5-hydroksytryptofan za pośrednictwem hydroksylazy tryptofanowej (Sinenko i in. 2023; Walther i in. 2003). Rozmieszczenie KOR i zakończeń neuronów serotoninowych (5-HT) wykazuje znaczną kolokalizację w kluczowych obszarach mózgu zaangażowanych w regulację emocjonalną, pamięć i homeostazę. KOR wykazują wysoką ekspresję w strukturach takich jak kora przedczołowa, hipokamp, podwzgórze i ciało migdałowate, które są również bogate w projekcje serotoninergiczne z jąder szwu (Crowley i Kash 2015). Zarówno u myszy, jak i u ludzi, systemy KOR i 5-HT mają silną interakcję w obrębie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA), wpływając na reakcje na stres i regulację nastroju (Van't Veer i Carlezon 2013). Istnieją pewne znaczące różnice gatunkowe w połączeniach anatomicznych, ale ogólne wzorce dystrybucji pozostają zachowane zarówno u ludzi jak i u myszy. U obu gatunków neurony serotoninergiczne koncentrują się głównie w jądrach szwu, szczególnie w grzbietowym i środkowym jądrze szwu, które mają szeroki zasięg w przodomózgowiu, w tym w korze przedczołowej, hipokampie, ciele migdałowatym i podwzgórzu (Awasthi i in. 2020; Hornung 2003). Podobnie, neurony 5-HT są również liczne projekcje w korze, hipokampie, prążkowiu, podwzgórzu i ciele migdałowatym (DePaoli i in. 1994; Simonin i in. 1995).

Funkcjonalnie interakcja KOR-5HT odgrywa istotną rolę w procesach behawioralnych, takich jak dysforia wywołana stresem, zaburzenia nastroju i modulacja pamięci. W grzbietowym jądrze szwu aktywacja KOR jest niezbędna do przywracania poszukiwania nagrody w kokainowym teście preferencji miejsca (Crowley i Kash 2015; Land i in. 2009). Wynika z tego, że uwalnianie dynorfin w procesie odstawienia od substancji uzależniającej prowadzi do aktywacji KOR, co w następstwie może wpływać

na modulację szlaków serotonergicznych zaangażowanych w przetwarzanie emocjonalnie nagrody.

Aktywacja KOR hamuje działanie neuronów serotoninergicznych, co koreluje ze zwiększonymi zachowaniami lękowymi i depresyjnymi. Na przykład Land i in. (2009) wykazali, że wywołana stresem porażki społecznej przez dominującą mysz aktywacja sygnalizacji KOR w grzbietowego jądra szwu (DRN) spowodowała obniżenie poziomu serotoniny, prowadząc do dysforii i wycofania społecznego. Jednak inaktywacja serotoninergicznych KOR poprzez podanie selektywnego antagonisty norBNI (norbinaltorfimina) do DRN, zablokowała awersyjne zachowania wywoływane podaniem agonisty KOR U50,488, co w konsekwencji zablokowało wywołane stresem przywrócenie preferencji miejsca warunkowanej kokainą. Układ KOR-dynorfina negatywnie reguluje wydzielanie serotoniny, promując zachowania związane z negatywnymi stanami afektywnymi.

Konsekwencją aktywacji KOR jest nasilenie objawów dysforii, charakterystycznych dla zaburzeń nastroju (Sundaramurthy i in. 2017). Niedawne doniesienie, wykorzystujące *ex vivo* agonistę KOR, U50,488 oraz selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego 5-HT – escitalopram, potwierdza osłabienie tego procesu w istocie czarnej przez KOR. Sam U50488 zmniejszał uwalnianie i wychwyt 5-HT, a sam escitalopram zwiększał uwalnianie serotoniny i spowalniał wychwyt zwrotny. Z kolei wstępne podanie U50,488 osłabiało zarówno uwalnianie, jak i wychwyt escitalopramu. Badanie to wykazało, że układ KOR moduluje sygnalizację 5-HT w istocie czarnej (West, Holleran, i Jones 2023).

Hamowanie neuronów serotoninergicznych poprzez aktywację KOR prowadzi do zwiększonego lęku i wycofania społecznego. Dokładnie zrozumienie funkcji i mechanizmów działania tego szlaku może potencjalnie przyczynić się do powstania nowych terapii farmakologicznych, których celem będzie selektywne hamowanie działania KOR.

1.5 Różnice płciowe w działaniu układu serotonergicznego i KOR

U kobiet obserwuje się wyższy podstawowy poziom 5-HT, a u mężczyzn wyższy wskaźnik syntezy 5-HT i ogólnie wyższy poziom o około 50% niż u kobiet (Jamu i Okamoto 2022). Zaobserwowano także, że mężczyźni mogą wykazywać większą dostępność KOR w niektórych regionach mózgu, prawdopodobnie związaną ze zmianami hormonalnymi, które wpływają na funkcjonowanie receptorów opioidowych i aktywność

serotoninergiczną (Vijay i in. 2016). Zostało to potwierdzone w 2016 r. przez zespół Vijay'a, który przebadał za pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej. Obszary z większą objętością dystrybucji u panów obejmowały: przednią korę obręczy, korę czołową, wyspę, korę skroniową, zakręt przedśrodkowy, bruzdę Rolanda i zakręt wrzecionowaty. Różnice te mogą przyczyniać się do specyficznej dla płci podatności na zaburzenia nastroju, takie jak depresja.

W coraz większym stopniu podnoszony jest temat różnic płciowych w farmakologii zaburzeń neuropsychiatrycznych. Jednym z dobrze udokumentowanych przykładów jest zróżnicowana reakcja na selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI), które są szeroko stosowane w leczeniu zarówno depresji, jak i zaburzeń lękowych (Kornstein i in. 2000; Maeng i Milad 2015). Badania wykazały, że kobiety często lepiej reagują na SSRI, potencjalnie z powodu interakcji hormonalnych z układem serotoninergicznym. Na przykład Kornstein i in. (2000) stwierdzili, że kobiety częściej niż mężczyźni reagowały pozytywnie na leczenie SSRI, podczas gdy u mężczyzn zaobserwowano większą skuteczność w przypadku trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, które działają zarówno na transmisję serotonergiczne, jak i noradrenergiczną. Ponadto badania wykazały, że zaburzenia lękowe, częściej występują u kobiet. Różnice te podkreślają jak ważne jest dostosowywanie podejść farmakologicznych w zależności od płci, ponieważ skuteczność leczenia i profile skutków ubocznych mogą się różnić. W związku z tym, zrozumienie w jaki sposób KOR modulują działanie układu serotonergicznego wiąże się z nadzieją na wykorzystanie tej zależności w opracowaniu skutecznych metod farmakoterapii zaburzeń lękowych czy depresji dostosowanych do płci pacjenta.

W literaturze znalazłam jedną pracę bezpośrednio opisującą różnice płciowe w działaniu KOR na neuronach 5-HT. Badanie przeprowadzone na myszach kalifornijskich wykazało, że aktywacja KOR w grzbietowym jądrze szwu (DRN) ma odmienny wpływ na zachowania lękowe w zależności od płci (Wright i in. 2018). W pracy posłużono się selektywnym agonistą KOR - U50,488, który został podany bezpośrednio do DRN, a zwierzęta zostały poddane stresorowi w postaci rezydenta-intruza (do klatki domowej myszy rezydenta umieszcza się obcą mysz – intruza). W przypadku samców kontrolnych (niezestresowanych) aktywacja KOR za pomocą niższych dawek leku powodowała zachowania podobne do lęku, zaś u zestresowanych samców wyższe dawki U50,488 działały anksjolitycznie. Dawka leku, bez względu na stężenie i stresor, nie wywoływała

znaczących różnic u samic myszy. Sugeruje to, że modulacja układu serotoninergicznego przez KOR może działać poprzez różne mechanizmy w zależności od płci.

Dostępna obecnie literatura nie wyjaśnia w wyczerpujący sposób jakie funkcje pełni modulacja neuronów 5-HT przez KOR w pośrednictwie patogenezy chorób neuropsychiatrycznych, których symptomy obejmują lęk, anhedonię czy wycofanie społeczne. W szczególności, wciąż nie wiadomo czy efekty aktywacji KOR na neuronach 5-HT różnią się w zależności od płci.

W celu próby przybliżenia się do odpowiedzi na powyższe pytania w niniejszej pracy przeprowadziłam eksperymenty zarówno na samcach i samicach szczepu myszy transgenicznych Oprk1^{Tph2CreERT}, u których selektywnie wyłączono KOR na neuronach 5-HT. Wykonałam analizę zawartości wybranych monoamin w korze czołowej i prążkowiu za pomocą chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną, a także analizę behawioralną w testach otwartego pola, jasnego-ciemnego pudełka, preferencji sacharyny i pamięci społecznej.

Główna hipoteza badawcza zakłada, że brak receptorów KOR wyłącznie na neuronach serotonergicznych prowadzi do zmian w zawartości monoamin w ośrodkowym układzie nerwowym, co w następstwie przyczynia się do zmian w zachowaniu w zależności od płci. Spodziewano się, że u mutantów zostanie zaobserwowane podwyższone stężenie monoamin w przodomózgowiu (korze czołowej i prążkowiu), a w szczególności serotoniny ze względu na brak hamowania jej wydzielania przez KOR. Ze względu na rolę układu KOR-dynorfiny w zachowaniach związanych ze stresem, zakładano, że wystąpi istotne obniżenie zachowań podobnych do lęku w teście jasnego-ciemnego pudełka, bez istotnych różnic w zachowaniach eksploracyjnych mierzonych za pomocą testu otwartego pola oraz nienaruszona preferencja sacharyny, świadcząca o niezaburzonej hedonii. Dodatkowo, ze względu na dane literaturowe wskazujące, że brak endogennych dynorfin przyczynia się do polepszenia pamięci społecznej, przewiduje się, że mutacja potencjalnie wpływa na zachowania społeczne, skutkując lepszą pamięcią nowego, pierwotnie nieznanego osobnika po jednorazowej interakcji społecznej.

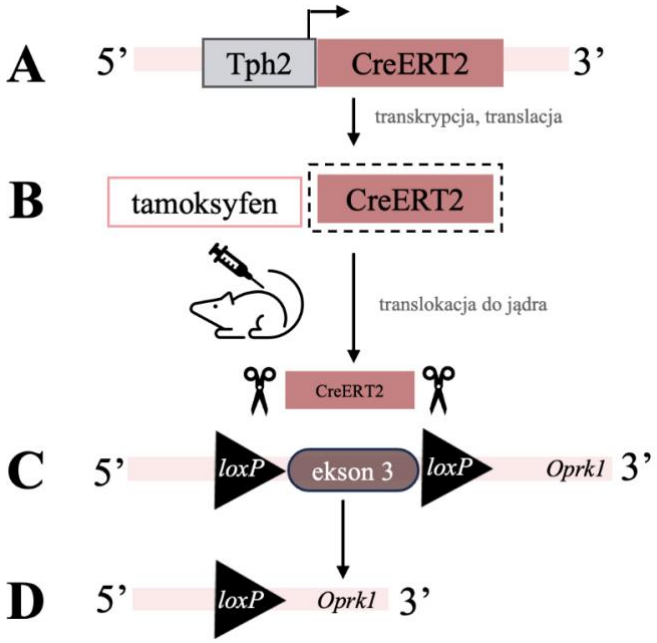
2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy magisterskiej jest charakterystyka fenotypu behawioralnego i molekularnego myszy transgenicznych Oprk1^{Tph2CreERT2}, uwzględniając różnice płciowe poprzez określenie zawartości monoamin (serotoniny, dopaminy, noradrenaliny i ich metabolitów) w korze czołowej i prążkowiu wykonanej za pomocą chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną oraz analizy zachowania w testach otwartego pola, jasnego-ciemnego pudełka, preferencji sacharyny, a także pamięci społecznej.

3. Materiały i metody

3.1 Zwierzęta doświadczalne

W doświadczeniach wykorzystano dorosłe genetycznie modyfikowane samce i samice myszy szczepu Oprk1^{Tph2CreERT2} *(Mus musculus L.)* kongeniczne do szczepu C57BL/6N u których przeprowadzana jest indukowana delecja genu receptora opioidowego kappa (*Oprk1*) selektywnie w komórkach wyrażających gen hydroksylazy tryptofanowej 2 (*Tph2*). Szczep zostały wygenerowany w pracowni modeli transgenicznych Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie przy użyciu szczepów myszy Tph2CreERT2 oraz linii myszy Oprk1 flox (Oprk1$^{tm2.1Kff}$/J) importowanych z The Jackson Laboratory (Stany Zjednoczone). U myszy Oprk1^{Tph2CreERT2} występuje mutacja oparta na systemie Cre/loxP (Ehrich i in. 2015; Weber i in. 2009), gdzie miejsca loxP flankują ekson 3 genu *Oprk1*, a rekombinaza CreERT2, której aktywność jest indukowana przez tamoksyfen, znajduje się pod promotorem genu *Tph2*. Po podaniu tamoksyfenu następuje selektywna rekombinacja genów z udziałem izomerazy Cre typu I w neuronach serotonergicznych 5-HT wszystkich jąder szwu, w wyniku której ekspresja *Oprk1* zostaje zniesiona (Ryc.1).



Ryc. 1. Schemat przedstawiający indukcję mutacji tamoksyfenem. (A) Allel genu *Tph2*: rekombinaza CreERT2 znajduje się pod promotorem genu Tph2. **(B)** Podanie dootrzewnowe tamoksyfenu

indukuje translokację CreERT2 do jądra komórkowego. **(C)** W jądrze CreERT2 rekombinuje docelowe miejsca *loxP* eksonu 3 genu *Oprk1*. **(D)** Wycięcie eksonu 3 w obrębie genu *Oprk1*.

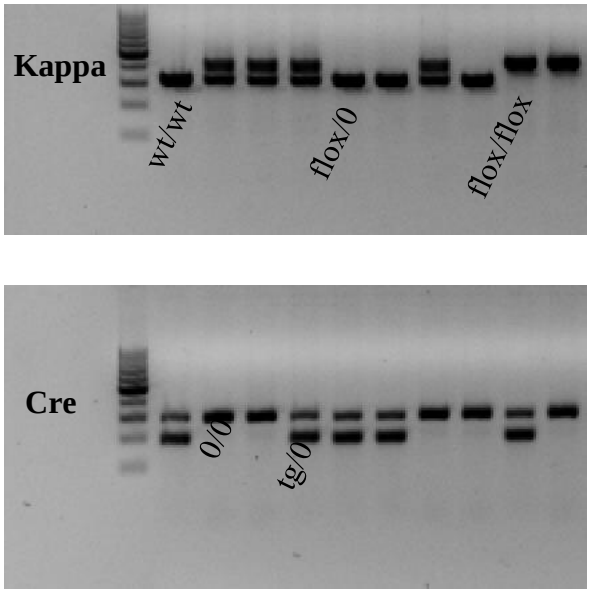
Indukcja mutacji została wywoływana u dorosłych zwierząt (8–10 tygodni, o minimalnej masie ciała 18 g) poprzez podanie tamoksyfenu (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone) rozpuszczonego w oleju słonecznikowym, przefiltrowanego przez membranę o średnicy 0,22 μm i podanego dootrzewnowo raz dziennie przez 5 kolejnych dni w dawce 100 mg/kg i objętości 5 μl/g przez mgr. Łukasza Szumca z Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN. Po zakończeniu podawania tamoksyfenu wszystkie zwierzęta odpoczywały w klatkach domowych przez co najmniej 3 tygodnie przed rozpoczęciem procedur behawioralnych.

Zwierzęta były trzymane w grupach (po 2-6 osobników, rodzeństwo tej samej płci), w klatkach domowych z pleksiglasu (dł. 325 mm x szer. 170 mm) wysłanych ściółką osikową ze wzbogaconym środowiskiem w postaci bloków drewnianych do gryzienia i materiału gniazdowego. W pokojach bytowych utrzymywana była stała temperatura (22 ± 2°C), poziom wilgotności (40-60%) i cykl dobowy 12h faza jasna /12h faza ciemna (z fazą jasną rozpoczynającą się o godzinie 7:00). W trakcie doświadczeń myszy były pod stałą opieką weterynaryjną i posiadały nieograniczony dostęp do wody i pokarmu (Labofeed H, WPiK, Polska). Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (numery zgód 27/2022, 230/2023), w tym zgodnie z wytycznymi Parlamentu Europejskiego i Rady Europejskiej dotyczącymi opieki i wykorzystania zwierząt laboratoryjnych (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych) i wymaganym zezwoleniem Ministerstwa Środowiska na import i wytwarzanie nowych szczepów myszy genetycznie zmodyfikowanych zgodnie z ustawą z dnia 22 czerwca 2001 r. o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych (Dz. U. z 2019 r. poz. 706 oraz Dz. U. z 2020 r. poz. 322).

3.2 Genotypowanie

Procedurę rozpoczęto od wykonania 1-2 mm biopsji końcówki ogona 4-tygodniowych, odstawionych od matki myszy, a następnie spryskania miejscowego

koloidalną zawiesiną aluminium w sprayu (Alu Spray, Medivet). Następnie tkankę poddano lizie poprzez zanurzenie ich na noc w roztworze DirectPCR Lysis Reagent (Tail) (Viagen Biotech; cat#102-T) w temperaturze 55°C i objętości 0,2 ml. Kolejnego dnia rano próbki inkubowano przez 45 min w 85°C, aby unieczynnić proteinazę K. Następnie przeprowadzono łańcuchową reakcję polimerazy (PCR – ang. *polymerase chain reaction*) z użyciem 1µl lizatów. Użyto dwóch par starterów dla genotypu Cre (starter przedni GTG CAA GCT GAA CAA CAG GA oraz starter wsteczny CCA GCA TCC ACA TTC TCC TT) i Kappa (starter przedni AGG CAC CAA AGT CAG GGA AG oraz starter wsteczny CCA GGG CAT ATA CTC TTC TCG). PCR przeprowadzono w ilości 40 cykli, składających się z etapu denaturacji wstępnej (95°C, 3min), denaturacja nici (95°C, 30s), przyłączania starterów (58°C, 30s), elongacji (72°C, 1min; x40 cykli) i ostatniego wydłużenia (72°C, 3min). Wyniki analizowano wykonując elektroforezę w 3g żelu agarozowym (2% wg. /obj.) i 150 ml 1-krotnie stężonego buforu TAE (2M Tris pH 8,3; 1M octan sodu oraz 50 mM EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) o pH 8) z dodatkiem 10 µl bromku etydyny, przy stałym napięciu 120V. Elektroforeza była prowadzona przez około 60 min.



Ryc. 2. Zdjęcia żelu z genotypowania. Wynik reakcji PCR potwierdzający ekspresję *Oprk1* i Cre u myszy Oprk1-Cre. W górnym panelu widoczny jest żel elektroforezy do genotypowania genu *Oprk1* – „Kappa", który pokazuje trzy możliwe genotypy: wt/wt (typ dziki), flox/0 (heterozygotyczny dla floksowanego genu *Oprk1*) i flox/flox (homozygotyczny floksowany gen *Oprk1*). Każdy prążek odpowiada obecności lub braku miejsc loxP. Dolny panel przedstawia obecność transgenu Cre w genotypie: 0/0 (typ

dziki, bez transgenu Cre) i tg/0 (heterozygoty dla transgenu Cre). Prążki wskazują, czy transgen rekombinazy Cre jest obecny w genomie.

3.3 Chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *ultrahigh-performance liquid chromatography* UHPLC) z detekcją kulochemiczną została wykonana we współpracy z prof. dr hab. Krystyną Gołembiowską z Zakładu Farmakologii Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN przy użyciu detektora systemu Dionex UltiMate 3000 (ThermoFisher Scientific, Stany Zjednoczone). Wykonano pomiary tkankowe monoamin NA, DA, 5-HT oraz ich metabolitów DOPA, HVA, 3-MT oraz 5-HIAA w strukturach prążkowia (ang. *striatum* - STR) oraz korze czołowej (ang. *frontal cortex* -FC) samic i samców myszy szczepu Oprk1^{Tph2CreERT2}. Rozdział związków, po ich zautomatyzowanym podaniu za pomocą próbkopobieraka, następował na kolumnie Hypersil Golf 100 x 3mm z fazą odwróconą C18 i uziarnieniu 3 μm, wyposażoną w przedkolumnę Hypersil Gold 10 x 3 mm, uziarnienie 3 μm. Do wykrywania substancji posłużono się ochronną celką o potencjale 600 mV, a kolejno celką kulometryczną o potencjale redukcji E1 = - 50 mV i utleniania o potencjale E = + 300 mV. Faza ruchoma składała się z 0.1 M diwodorofosforanu potasu, 0.5 mM Na 2 EDTA, 100 mg/l 1-oktanosulfonianu sodu (pH 3.8) i 2% metanolu. Szybkość przepływu podczas analizy wynosiła 0.6 ml/min. Otrzymane dane chromatograficzne były analizowane za pomocą oprogramowania komputerowego Chromeleon v.7 (ThermoFisher Scientific, Stany Zjednoczone). Granica wykrywalności NA, DA,5-HT, DOPA, HVA, 3-MT i 5-HIAA w dializatach wynosiła ok. 0,02 - 0,04 pg/μl.

3.4 Testy behawioralne

W testach wykorzystano zarówno samce jak i samice szczepu Oprk1^{Tph2CreERT2} o genotypach w przypadku mutantów: Tph2Cre Tg/0 (mysz heterozygotyczna dla transgenu *Tph2Cre*); Kappa flox/flox (mysz homozygotyczna dla genu *Oprk1*) oraz w przypadku kontroli: Tph2Cre 0/0 (mysz nieposiadająca kopii transgenu *Tph2Cre*); Kappa flox/flox. Celem wykorzystania jak najmniejszej liczby zwierząt testy behawioralne zostały przeprowadzone w ustalonej kolejności przedstawionej na schemacie (Ryc.4).

Przeprowadzono dwie baterie testów („A” i „B”) na osobnych kohortach myszy. W baterii testów „A” przeprowadzonej zarówno na samcach, jak i na samicach, jako pierwszy wykonano test otwartego pola (ang. *open-field test*), będący standardowym testem używanym do badania ogólnego poziomu lęku i zachowań eksploracyjnych. Następnie przeprowadzono test jasnego-ciemnego pudełka (ang. *light-dark box test*), mierzący poziom lękliwości zwierząt wykorzystując naturalne skłonności myszy do preferowania ciemnych i unikania jasnych przestrzeni, a na koniec test preferencji sacharyny (ang. *saccharine preference test*), badający poziom anhedonii zwierząt biorąc pod wagę wrodzoną tendencję do wybierania słodkiego roztworu od niesłodzonej wody. W baterii „B”, wykonanej wyłącznie na osobnikach płci męskiej, przeprowadzono test pamięci społecznej (ang. *two trial direct interaction task*), który sprawdza czy mysz badana zapamiętała innego osobnika po jednorazowej, bezpośredniej interakcji społecznej w nowej klatce. Pomiędzy każdym testem w baterii „A” zastosowano tydzień przerwy od eksperymentów.

Ryc. 4. Schemat przedstawiający kolejność wykonywania podstawowych testów behawioralnych. (A) Pierwsza bateria testów wykonywana zarówno na samcach jak i samicach w następującej kolejności: test otwartego pola (czas trwania 30 min), test jasnego-ciemnego pudełka (czas trwania 5 min), test preferencji sacharyny (czas trwania 24 godz.) Testy zostały wykonane w

tygodniowych odstępach. **(B)** Test pamięci społecznej wykonany na osobnej kohorcie zwierząt, tylko na samcach (czas trwania test 1: 2 min, odstęp między testami:18h, test 2: 2 min).

Wszystkie testy zostały przeprowadzone w fazie jasnej cyklu dobowego myszy (godziny 7:00 – 19:00). Przed przystąpieniem do procedury eksperymentalnej zwierzęta były przyzwyczajane do eksperymentatora przez minimum 3 dni poprzez branie na ręce na kilka minut (ang. *handling*) w celu zmniejszenia stresu w trakcie późniejszych doświadczeń. Raz na 3 dni na ogonie każdego zwierzęcia markerem zostaną namalowane (lub poprawione) czarne kreski, oznaczające numer zwierzęcia w celu jego identyfikacji. Zwierzęta były przenoszone do pokoju eksperymentalnego na 30 min przed rozpoczęciem każdego eksperymentu w celu habituacji. Zawsze w tle było włączone radio, aby zminimalizować wpływ ewentualnego hałasu pochodzącego z zewnątrz na zachowanie myszy w trakcie testu. Zachowania zarejestrowane zostały za pomocą kamery (acA1300 – 60 gm, Basler, Niemcy), a analizowane w programie EthoVision v11.5 (Noldus, Holandia) lub za pomocą oprogramowania BORIS Behavioral Observation Research Interactive Software v8.25 (Uniwersytet Turyński, Włochy). Grupy eksperymentalne i całkowita liczba wykorzystanych zwierząt została przedstawiona w Tabeli 3.

3.4.1 Test otwartego pola

Celem testu było określenie poziomu aktywności lokomotorycznej myszy oraz analiza tendencji eksploracyjnych (Gould, Dao, i Kovacsics 2009; Simon, Dupuis, i Costentin 1994). Test rozpoczynał się od umieszczenia myszy w centrum białej klatki eksperymentalnej (40 x 40 x 40 cm), zawierającej 0,5 cm ściółki osikowej, takiej jak domowa (ABEDD, Łotwa) przy natężeniu światła białego około 6-10 lux (słabe oświetlenie). W tle było włączone radio, aby zminimalizować wpływ ewentualnego hałasu na zachowanie myszy w trakcie testu. Myszy mogły swobodnie eksplorować klatkę przez 30 min. W celu zbadania tendencji myszy do unikania przebywania na otwartej przestrzeni (centrum klatki) wyznaczono na nagraniu środkowy obszar, uznawany jako centrum klatki, określanego jaki kwadrat odsunięty od ścian klatki o 5 cm. Parametry, które zostały uwzględnione w trakcie analizy to: całkowita przebyta odległość podczas testu, średnie przyspieszenie, czas przebywania wewnątrz obszaru centralnego oraz poza nim. Mysz była automatycznie identyfikowana przez program (zakres wartości czerni wynosił 48 lub 49 do 255). Parametry, które analizowano obejmowały: czas spędzony w środku klatki – w odległości min 5 cm od ścianek [s],

całkowita odległość pokonana w trakcie testu [m], uśredniona prędkość poruszania się [cm/s].

3.4.2 Test jasnego-ciemnego pudełka

W teście zmierzono poziomu lękliwości myszy, które naturalnie wolą przebywać w ciemniejszych przestrzeniach i unikają jasnych, otwartych przestrzeni (Crawley i Goodwin 1980; Takayo i Miyakawa 2006). Procedura została wykonana w aparacie, składającym się z dwóch części, pomiędzy którymi zwierzęta mogły swobodnie przechodzić – jasnej i ciemnej (każda o wymiarach 18 x 16 x 20 cm). Jasna część była oświetlana białym światłem o natężeniu 400 lux, a ciemna światłem o natężeniu 50 lux. Myszy umieszczano pojedynczo w ciemnej części klatki i mogły są swobodnie eksplorować przez 5 min. Zachowanie było analizowane pod kątem: całkowitego dystansu i średniej prędkości w jasnym przedziale, całkowitej ilości czasu spędzanego w każdej części aparatu i latencji wejścia do jasnej części.

3.4.3 Test preferencji sacharyny

Test ten ma na celu zbadanie preferencji słodkiego roztworu u myszy, gdzie jej obniżenie interpretowane jest jako objaw anhedonii (Papp, Willner, i Muscat 1991). Dobę przed wykonaniem testu zwierzęta zostały umieszczone pojedynczo w przezroczystych klatkach (26 × 20 × 13,5 cm) ze ściółką jak domowa (ABEDD, Łotwa) materiałem gniazdowym, drewnianym gryzakiem i z dostępem do dwóch poideł miarowych o pojemności 25 ml wypełnionych wodą w celu habituacji. W dniu testu obie butelki zostały wypełnione świeżym roztworem: jedna butelka zwierała wodę, a druga 0,1% (wag. /obj.) roztwór sacharyny. Strona umieszczania butelek była wybrana losowo, tak aby połowa zwierząt miała butelkę ze słodkim roztworem z lewej strony, a druga z prawej strony klatki. Dostęp do jedzenia był nieograniczony w trakcie całej procedury. Po 24 godz. zmierzono ilość wypitego płynu z każdej butelki, a myszy umieszczono z powrotem w klatkach domowych. Analizowano ilość wypitej wody z obu butelek dobę przed testem, aby wykluczyć ewentualną preferencję strony umieszczanej butelki. Podczas testu analizowano ilość wypitej wody i roztworu sacharyny oraz całkowitą ilość wypitych płynów. Na tej podstawie po zakończeniu testu obliczono % preferencję sacharyny (objętość wypitej sacharyny/całkowita ilość wypitych płynów * 100).

3.4.4 Test pamięci społecznej

Test dwukrotnej bezpośredniej interakcji służy pomiarowi w jakim stopniu myszy badane wchodzą w interakcje społeczne oraz zapamiętują pierwotnie nieznanego osobnika po jednorazowej, bezpośredniej interakcji społecznej w klatce badawczej (Donegan, Stefanini, i Meira 2024). W tym teście jako partnerów interakcji („bodziec społeczny") wykorzystano młode osobniki tej samej płci - samców (Cum i in. 2024), aby zminimalizować agresywne, terytorialne zachowania. Test rozpoczęto od umieszczenia myszy badanej w nowej klatce ze ściółką z osiki (ABEDD, Łotwa) identyczną do standardowej klatki domowej (26 × 20 × 13,5 cm) na 30 min w słabym oświetleniu (około 12 lux) w celu habituacji. Następnie w klatce umieszczono partnera interakcji na 2 min (test 1), podczas których obie myszy mogą swobodnie i bezpośrednio wchodzić w interakcje. Po zakończeniu testu 1 obie myszy wróciły do klatek domowych i zostały ponownie umieszczone w pokoju bytowym.

W celu sprawdzenia czy badana mysz zapamiętała partnera interakcji, test powtarzany jest po wybranym interwale czasowym. Wybrano interwał 18 h od pierwszej interakcji, ponieważ założono, że po tym czasie myszy kontrolne nie będą już pamiętać myszy partnerów. We wcześniejszych doświadczeniach zaprezentowanych w pracy (Bilkei-Gorzo i in. 2014) autorzy posłużyli się interwałami czasowymi 16 i 24 h. Badacze sprawdzali rolę dynorfiny w pamięci społecznej wskazując, że myszy z wyłączonym genem prodynorfiny dłużej pamiętają partnera interakcji niż myszy kontrolne. W związku z tym założono, że u myszy badanych w pracy dyplomowej, u których usunięto selektywnie KOR (będące głównym celem działania dynorfin) zaobserwujemy podobnie lepszą pamięć społeczną. Na tej podstawie ustalono, że interwał 18 godzinny pozwoli zaobserwować oczekiwane wyniki, ponieważ po dobie myszy kontrolne nie pamiętały już partnera, zaś po 14 godzinach jeszcze tak.

Po 18 godzinach test rozpoczęto ponownie od umieszczenia myszy badanej w nowej klatce przypominającą standardową klatkę domową na 30 min. Następnie w klatce umieszczono tego samego partnera interakcji, co poprzedniego dnia na 2 min (test 2), podczas których obie myszy mogą swobodnie i bezpośrednio wchodzić w interakcje. Mierzono jedynie interakcje inicjowane przez mysz badaną. Jako interakcję uznawano łączny czas: wąchania okolic pyska/odbytu/narządów płciowych przez mysz badaną, czyszczenia (ang. *grooming*) partnera interakcji przez mysz badaną, pogoni partnera interakcji przez mysz badaną oraz wspinanie się (ang. *mounting*) na partnera interakcji

przez mysz badaną (Donegan, Stefanini, i Meira 2024). Ze względu na naturalne skłonności myszy do eksploracji nowych, nieznanych bodźców, miarą pamięci społecznej jest skrócenie czasu interakcji z partnerem przez mysz badaną podczas drugiej próby. Mniejsze zainteresowanie partnerem w teście 2 niż w teście 1 interpretowane jest jako uznanie go przez mysz badaną za znanego. W teście zastosowano dwa kryteria wykluczenia: 1) występowanie zachowań agresywnych 2) łączny czas interakcji < 20 sekund. Żaden z 15 badanych osobników nie został wyeliminowany z analizy.

3.5 Analiza statystyczna

Analizę wieku i wagi osobników zmutowanych i kontrolnych wykorzystanych podczas testów behawioralnych wykonano za pomocą testu T studenta dla prób niezależnych, wykorzystując rozkład dwustronny i wariancję (nierówną dla dwóch prób).

Do analizy danych uzyskanych w analizie chromatografii cieczowej i testach behawioralnych posłużono się programem Prism 10 (GraphPad Software, Stany Zjednoczone). W celu identyfikacji znamiennych odstępstw od rozkładu normalnego zastosowano test Shapiro-Wilka. W celu sprawdzenia efektu genotypu, płci oraz interakcji obu czynników na badane parametry posłużono się dwuczynnikową analizą wariancji (ANOVA). Za kryterium istotności przyjęto wartości „p” poniżej 0,05, zaś za trend $0,05 < p < 0,01$. Do wielokrotnych porównań między grupami wykorzystano test post-hoc Tukey’a. Do wykrycia wartości odstających użyto testu Grubbs’a i na tej podstawie odrzucono myszy: w teście jasnego-ciemnego pudełka w parametrze latencja do pierwszego wejścia, 1 samiec kontrolny; średnia prędkość poruszania się, 1 samica kontrolna, w teście preferencji sacharyny w parametrze % spożytego roztworu sacharyny, 1 samiec kontrolny oraz 1 samica kontrolna.

4. Wyniki

4.1 Ilościowa analiza wybranych monoamin w korze czołowej i prążkowiu u myszy szczepu Oprk1^{Tph2CreERT2}

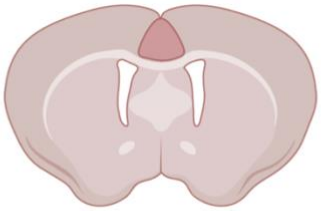
Do zbadania, czy wyłączenie KOR na neuronach 5-HT wpłynęło na zmiany w ilości monoamin w korze czołowej (ang. *frontal cortex*, FC) oraz prążkowiu (ang. *striatum*, STR) wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową. Analiza została przeprowadzona we współpracy z prof. dr hab. Krystyną Gołembiowską z Zespołu II Zakładu Farmakologii Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk. W wyizolowanych obszarach mózgu analizie poddano wybrane monoaminy: serotoninę (5-HT), dopaminę (DA), noradrenalinę (NA) oraz ich metabolity kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA), kwas homowanilinowy (HVA), 3-metoksytyramina (3-MT).

Pierwszym zbadanym obszarem była FC. W Tabeli 1 kolorem różowym oznaczono wynik dotyczący ilości 5-HT: zaobserwowano istotny efekt płci (Tab.1, $F_{1,22} = 4{,}790$; $p = 0{,}0395$) oraz istotny efekt interakcji (płeć x genotyp) na ilość 5-HT w tej strukturze (Tab.1, $F_{1,22} = 4{,}611$; $p = 0{,}0430$), przy czym sam czynnik genotypu nie osiągnął istotności (Tab.1, $p > 0{,}05$). U samców kontrolnych odnotowano wyższe podstawowe stężenie 5-HT ($p = 0{,}0343$) niż u samic kontrolnych. Zaobserwowano również trend wskazujący, że u samców mutantów jest mniej serotoniny w FC niż u samców kontrolnych ($p = 0{,}0956$). Z kolei u samic nie zaobserwowano podobnego trendu - poziom tego neuroprzekaźnika oscylował na zbliżonym poziomie, niezależnie od genotypu ($p > 0{,}05$).

W FC, płeć miała także wpływ na ilość jednego z metabolitów serotoniny, 5-HIAA (Tab.1, $F_{1,22} = 7{,}268$; $p = 0{,}0132$). Analiza wykazała, że ogólnie samice miały więcej 5-HIAA w tkance niż samce, jednak testy post-hoc nie osiągnęły istotności statystycznej. Zaobserwowano trend, wskazujący, że w u samców mutantów może znajdować się mniej 5-HIAA niż u samic z indukowaną mutacją ($p = 0{,}0784$). Zbadano także stosunki wybranych metabolitów monoamin w FC. Pierwszym z nich był stosunek 5-HIAA do 5-HT, który można interpretować jako poziom metabolizmu serotoniny. Odnotowano istotny efekt płci w stosunku 5-HIAA do 5-HT (Tab.1, $F_{1,20} = 15{,}50$, $p = 0{,}0008$) wskazujący, że parametr ten jest ogólnie wyższy u samic niż u samców niezależnie

Tabela 1. Stężenia monoamin w korze czołowej.

Struktura: Kora czołowa



związek	♀ kontrola (n=6)	♀ mutant (n=7)	♂ kontrola (n=6)	♂ mutant (n=7)	Dwuczynnikowa ANOVA Stopnie swobody
5-HT	355,8 ± 8,7	364,4 ± 10,58	400,8 ± 11,12	364,9 ± 10,49	genotyp (p=0,2), płeć (p=0,04), genotyp x płeć (p=0,04)
5-HIAA	124,5 ± 4,36	123,3 ± 5,80	112 ± 4,68	108 ± 5,20	genotyp (p=0,62), płeć (p=0,01), genotyp x płeć (p=0,79)
5-HIAA/5-HT	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,01	genotyp (p=0,96), płeć (p=0,01), genotyp x płeć (p=0,43)
DA	627 ± 50,71	556 ± 18,07	646,2 ± 30,52	602,4 ± 54,68	genotyp (p=0,11), płeć (p=0,28), genotyp x płeć (p=0,51)
3-MT	NA	NA	NA	NA	NA
HVA	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,03	genotyp (p=0,49), płeć (p=0,38), genotyp x płeć (p=0,65)
HVA/DA	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,003	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	genotyp (p=0,31), płeć (p=0,07), genotyp x płeć (p=0,95)
NA	254 ± 4,31	262,7 ± 5,89	269,7 ± 4,85	270 ± 6,26	genotyp (p=0,42), płeć (p=0,05), genotyp x płeć (p=0,46)

Tabela 2. Stężenia monoamin w prążkowiu.

Struktura: Prążkowie

związek	♀ kontrola (n=6)	♀ mutant (n=7)	♂ kontrola (n=6)	♂ mutant (n=7)	Dwuczynnikowa ANOVA Stopnie swobody
5-HT	319,3 ± 9,02	327,9 ± 15,36	297,3 ± 12,42	301,4 ± 8,14	genotyp (p=0,6), płeć (p=0,05), genotyp x płeć (p=0,85)
5-HIAA	227,5 ± 10,93	231,6 ± 6,45	175,2 ± 7,68	169,3 ± 20,51	genotyp (p=0,95), płeć (p=0,01), genotyp x płeć (p=0,71)
5-HIAA/5-HT	0,71 ± 0,03	0,7157 ± 0,04	0,59 ± 0,02	0,56 ± 0,06	genotyp (p=0,72), płeć (p=0,01), genotyp x płeć (p=0,68)
DA	7919 ± 203,6	7623 ± 340,4	7407 ± 181,9	7015 ± 238,3	genotyp (p=0,18), płeć (p=0,03), genotyp x płeć (p=0,85)
3-MT	476,5 ± 16,51	468 ± 32,61	266,8 ± 29,88	256,3 ± 21,23	genotyp (p=0,72), płeć (p=0,01), genotyp x płeć (p=0,97)
HVA	834 ± 62,78	816,1 ± 25,39	676 ± 49,49	607 ± 25,70	genotyp (p=0,31), płeć (p=0,01), genotyp x płeć (p=0,55)
HVA/DA	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,003	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	genotyp (p=0,94), płeć (p=0,01), genotyp x płeć (p=0,7)
NA	51 ± 1,92	73,43 ± 9,43	46,5 ± 5,31	70,43 ± 5,4	genotyp (p=0,01), płeć (p=0,39), genotyp x płeć (p=0,68)

W Tabeli 1, skupiającej się na korze czołowej oraz w Tabeli 2, obejmującej prążkowie przedstawiono stężenia tkankowe [pg/µl] wybranych monoamin, ich metabolitów oraz ilościowych stosunków. Symbolami „♀" i „♂" oznaczono kolejno samice i samce. Genotyp zwierząt określono jako „kontrola" (zwierzęta kontrolne) oraz „mutant" (Oprk1^{Tph2CreERT2}), wielkości grup oznaczono w nawiasach. Dane przedstawiono w postaci średniej ± błąd standardowy średniej (SEM). Kolorem różowym oznaczono wyniki wydzielania 5-HT. Skróty, jakimi się posłużono obejmują: **5-HT** – 5-hydroksytryptamina, **5-HIAA** - kwas 5-hydroksyindolooctowy, **DA** – dopamina, **3-MT** – 3-metoksytyramina, **HVA** - kwas homowanilinowy, **NA** – noradrenalina

od genotypu. W teście post-hoc zaobserwowano istotnie wyższy stosunek 5-HIAA/5-HT u samic kontrolnych w porównaniu z samcami kontrolnymi ($p = 0,0153$). Pozostałe testy post-hoc nie wykazały znamiennych różnic między grupami ($p > 0,05$). Analiza stosunku HVA do DA nie wykazała znamiennych efektów mutacji na równowagę między syntezą i rozkładem DA ($p > 0,05$). Zaobserwowano, także że płeć może mieć wpływ na ilość NA w FC, wskazując, że ogólnie ilość NA jest większa niż u samców niż u samic niezależnie od genotypu, jednak wynik był na granicy istotności statystycznej (Tab.1, $F_{1,22} = 4,287$; $p = 0,0503$). W przypadku pozostałych monoamin i ich metabolitów nie stwierdzono istotnego wpływu płci, genotypu czy interakcji obu czynników na ich ilość w FC (Tab.1, ANOVA, $p > 0,05$).

Kolejnym zbadanym obszarem było STR. W Tabeli 2 różowym kolorem oznaczono wynik wydzielania NA: zaobserwowano istotny efekt genotypu (Tab.2, $F_{1,22} = 9,894$; $p = 0,0047$), przy czym efekt płci i interakcja obu czynników była nieistotna (Tab.2, ANOVA, $p > 0,05$). Wynik ten wskazuje, że niezależnie od płci ilość NA w STR była większa u mutantów niż u zwierząt kontrolnych. W teście post-hoc zauważono ciekawy trend, wskazujący na zróżnicowanie w poziomie tego neuroprzekaźnika pomiędzy samcami mutantami a samcami kontrolnymi – samce mutanty miały nieco więcej NA niż osobniki kontrolne ($p = 0,0839$). Efekt ten jednak nie był znamienny w przypadku samic, ponieważ ilość NA oscylowała na zbliżonym poziomie niezależnie od genotypu ($p > 0,05$). Płeć miała istotny wpływ na stężenie tkankowe DA w STR (Tab.2, $F_{1,24} = 5,081$; $p = 0,0336$), wskazując, że jest ono wyższe u samic niż u samców niezależnie od genotypu, jednak testy post hoc nie osiągnęły istotności statystycznej ($p > 0,05$).

W przypadku ilości 5-HT w STR odnotowano, że efekt płci, wskazujący, że u samic ilość tej monoaminy jest większa niż u samców niezależnie od genotypu, był na granicy istotności statystycznej (Tab.2, $F_{1,22} = 4,220$; $p = 0,0520$). Z kolei w przypadku metabolitów serotoniny, HIAA ($F1,22 = 18,84$; $p = 0,0003$) oraz HVA ($F_{1,22} = 19,43$; $p = 0,0002$), zaobserwowano istotnie statystyczne efekty płci w tej strukturze. W przypadku obu monoamin zaobserwowano ich istotnie mniejszą ilość u samców mutantów niż u samic mutantów (5-HIAA; $p = 0,0108$, HVA; $p = 0,0064$). Porównując ilości obu wspomnianych metabolitów u zwierząt kontrolnych zauważono trendy wskazujące, że może być ich istotnie więcej u samic niż u samców (5-HIAA; $p = 0,0585$, HVA; $p = 0,0740$). Nie zaobserwowano statystycznie istotnego wpływu płci, genotypu

oraz interakcji obu czynników na ilość pozostałych monoamin i ich metabolitów w STR (Tab.2, $p > 0,05$).

Podsumowując, przedstawione wyniki pokazują, że indukowana delecja KOR na neuronach 5-HT ma subtelny wpływ na zawartość monoamin oraz ich metabolitów w FC oraz STR. Zaobserwowano, że największe zmiany wynikające z indukcji mutacji występują w ilości 5-HT w FC (efekt interakcji czynników genotyp-płeć) oraz w ilości NA w STR (efekt genotypu). Szczególnie ciekawą obserwacją jest istotne obniżenie ilości 5-HT w FC, na której wydzielanie KOR ma bezpośredni wpływ, jedynie u samców mutantów. Może to świadczyć o tym, że mechanizm modulacji wydzielania 5-HT przez KOR w FC jest zależny od płci.

4.2 Fenotyp behawioralny myszy szczepu Oprk1^{Tph2CreERT2}

Do zbadania efektów mutacji na zachowanie zwierząt wykorzystano podstawowe testy behawioralne: w baterii testów A – otwarte pole, jasne-ciemne pudełko i preferencja sacharyny – zbadano samce i samice, zaś w baterii B, obejmującej test pamięci społecznej, wyłącznie samce. Zarówno samce jak i samice z indukowaną mutacją nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku i wagi w porównaniu do zwierząt kontrolnych oraz nie wykazywały żadnych oczywistych zaburzeń (Tab. 3).

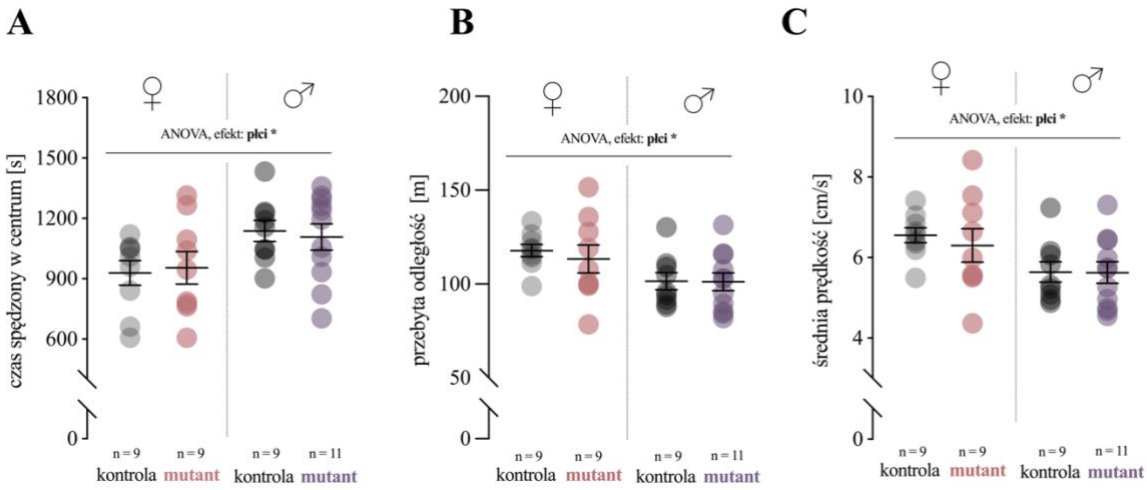
Tabela 3. Grupy zwierząt wykorzystane w testach behawioralnych. W tabeli przedstawiono grupy zwierząt wykorzystane w testach behawioralnych. Symbolami „♀" i „♂" oznaczono kolejno samice i samce. Genotyp zwierząt określone jako „kontrola" (zwierzęta kontrolne) oraz „mutant" (zwierzęta z indukowaną mutacją Oprk1^{Tph2CreERT2}). Dane przedstawione są w postaci średniej ± SEM. .

Płeć	Zestaw testów	Genotyp	Liczba zwierząt	**Wiek** na początku procedury [tyg]			**Waga** na początku procedury [g]		
				średnia ± SEM	zakres	Test t wartość p	średnia ± SEM	zakres	Test t wartość p
♀	A. otwarte pole, jasne ciemne-pudełko, preferencja sacharyny	kontrola	9	18,5 ± 2,94	15-21	0,49	22,8 ± 1,22	21,4-24,2	0,5
		mutant	9	18 ± 1,39	15-21		22,5 ± 1,39	19,4-23,9	
♂	A. otwarte pole, jasne ciemne-pudełko, preferencja sacharyny	kontrola	9	17,7 ± 2,46	15-21	0,65	27,7 ± 1,3	25,6-29,1	0,34
		mutant	11	18,5 ± 2,53	15-21		27,9 ± 1,61	25,6-30,6	
	B. pamięć społeczna	kontrola	7	13,4 ± 0,86	13-15	0,99	24,2 ± 3,11	19,4-26	0,84
		mutant	8	16 ± 2,32	14-20		26 ± 1,92	23,1-28,4	

4.2.1 Ocena zachowań eksploracyjnych w teście otwartego pola

W teście otwartego pola nie zaobserwowano istotnych statystycznie (ANOVA, $p > 0,05$) efektów mutacji oraz interakcji genotypu z płcią na: czas spędzony w centrum klatki, całkowitą przebytą odległość ani średnią prędkość z jaką zwierzęta się poruszały (Ryc.5A-C). Zauważono natomiast istotne efekty płci wskazujące, że niezależnie od

genotypu samice spędziły mniej czasu w centrum pola ($F_{1,34} = 7{,}424$; $p = 0{,}0101$), pokonały większą odległość ($F_{1,34} = 7{,}401$; $p = 0{,}0102$) oraz poruszały się z większą



średnią prędkością ($F_{1,34} = 7{,}433$, $p = 0{,}0101$) niż samce (Ryc.5A-C). Jednakże wykonane testy post-hoc nie osiągnęły istotności statystycznej.

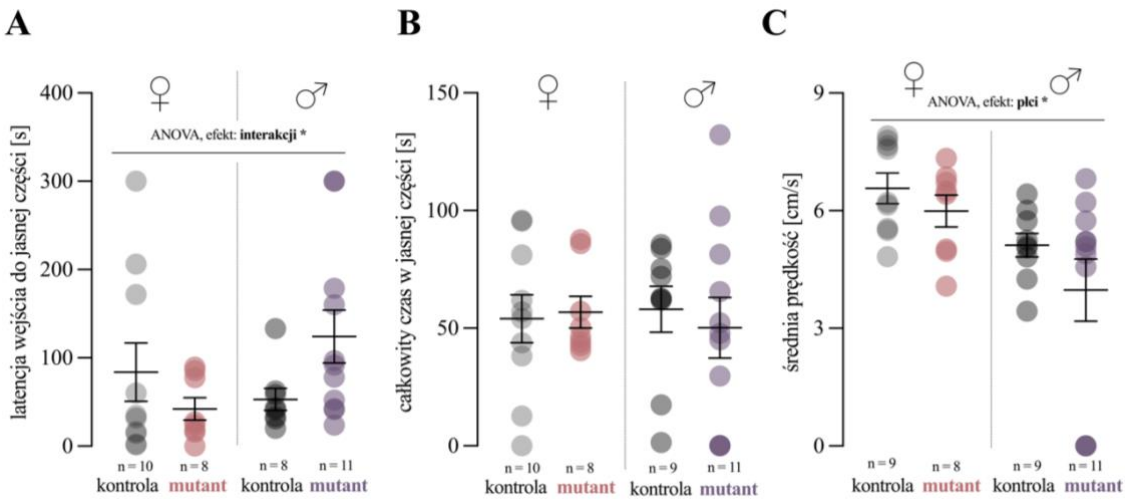
Ryc.5. Myszy Oprk1^{Tph2CreERT2} (mutant) wykazują niezmienione zachowania eksploracyjne w otwartym polu w porównaniu do myszy kontrolnych (kontrola). (A) Całkowity czas spędzony w centrum pola [s]**. (B)** Całkowita odległość przebyta w trakcie testu, [m]**. (C)** Średnia prędkość z jaką zwierzęta się poruszały. Symbolami ♀ i ♂ oznaczono kolejno samice i samce, a przerywana linia wyznacza granicę między płciami. Kolorami szarym i czarnym oraz różowym i fioletowym oznaczono kolejno zwierzęta kontrolne i mutanty. Każdy punkt oznacza wynik pojedynczej myszy. Słupki błędów reprezentują wartości średniej ± sem.

Opisane obserwacje dowodzą, że zachowania eksploracyjne są na podobnym poziomie u zwierząt kontrolnych i mutantów. Świadczy to tym, że wprowadzona mutacja nie wpływa istotnie na zachowania lękowe na nieznanym, otwartym i słabo oświetlonym obszarze. W przypadku wszystkich badanych parametrów zauważono istotne efekty płci, co wskazuje, że zachowanie samic i samców w teście różniło się niezależnie od genotypu zwierząt. Ciekawą obserwacją wydaje się zwiększony czas przebywania w centrum klatki przez samce, poruszające się jednak średnio wolniej, co tym samym mogło przełożyć się na mniejszą pokonaną odległość w porównaniu z samicami.

4.2.2 Badanie reakcji lękowej w teście jasnego-ciemnego pudełka

W dwukomorowym teście jasnego-ciemnego pudełka zaobserwowano istotny efekt interakcji czynnika genotypu i płci ($F_{1,33} = 4{,}441$, $p = 0{,}0428$) na latencję do pierwszego wejścia do jasnego obszaru pudełka (Ryc.6A). Wynik ten wskazuje na to, że mutacja

miała odmienny wpływ na zwierzęta w zależności od płci, sugerując zwiększoną latencję do pierwszego wejścia do jasnej części u samców mutantów w porównaniu z samcami kontrolnymi, jednak testy post-hoc nie osiągnęły istotności statystycznej ($p > 0,05$). Odnotowano także istotny wpływ płci na średnią prędkość poruszania się zwierząt w jasnej części pudełka ($F_{1,34} = 4,441$, $p = 0,0101$), wskazujący, że samice poruszają się w teście średnio szybciej niż samce, przy czym analiza post-hoc nie wykazała istotnych różnic między grupami (Ryc.6C, $p > 0,05$).

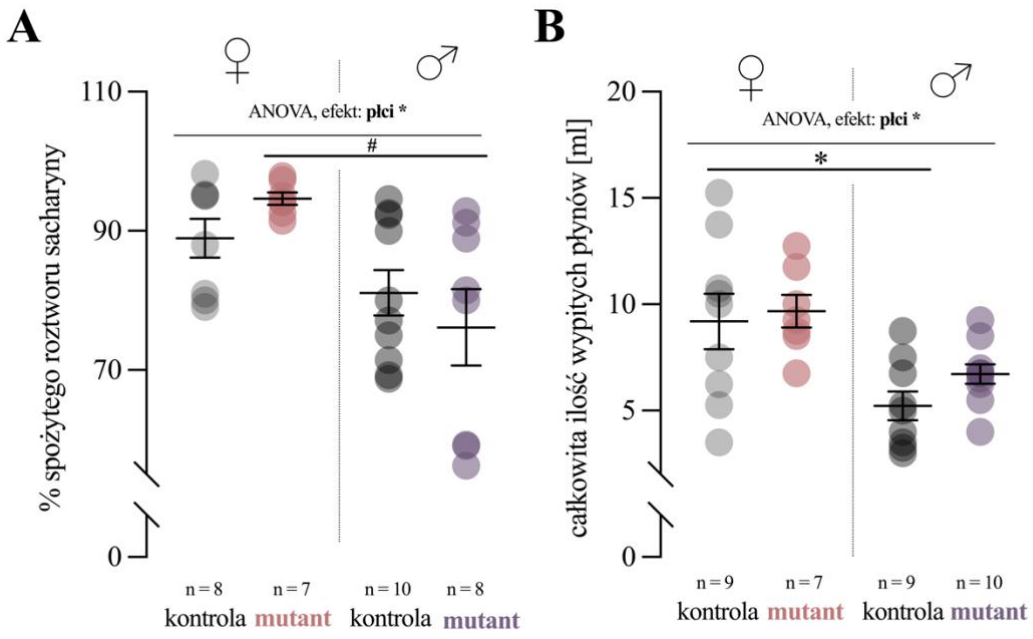


Ryc.6. Wykresy obrazujące parametry mierzone w teście jasnego-ciemnego pudełka. (A) Latencja pierwszego wejścia do jasnej części pudełka. **(B)** Całkowity czas spędzony w jasnej części klatki. **(C)** Średnia prędkość poruszania się. Symbolami ♀ i ♂ oznaczono samice i samce; przerywana linia wyznacza granicę między płciami. Kolorami szarym i czarnym oraz różowym i fioletowym oznaczono kolejno zwierzęta kontrolne i mutanty. Każdy punkt oznacza wynik pojedynczej myszy. Słupki błędów reprezentują wartości średniej ± sem. Odrzucono jeden pomiar w parametrze latencji do pierwszego wejścia praz jeden pomiar ze średniej prędkości poruszania się w oparciu o analizę wyników odstających testem Grubbs'a.

Powyższe wyniki wskazują, że usunięcie KOR na neuronach 5-HT nie zmienia istotnie zachowań lękowych w teście jasnego-ciemnego pudełka. Największy wpływ wprowadzonej mutacji na zachowanie zaobserwowano w latencji do pierwszego wejścia do jasnej części aparatu testowego (efekt interakcji czynników genotyp-płeć). Pomimo braku istotnych różnic statystycznych wyniki wskazują, że samce mutanty mogą wykazywać większy lęk przed pierwszym wejściem do jasno oświetlonej części aparatu. Może to świadczyć o tym, że KOR na neuronach 5-HT są odmiennie zaangażowane w przetwarzanie sygnałów w zachowaniach podobnych do lęku w zależności od płci.

4.2.3 Ocena objawów anhedonii w teście preferencji sacharyny

Płeć miała istotny wpływ na % spożycia słodkiego roztworu (Ryc.7A, $F_{1,29} = 7{,}433$, $p = 0{,}0011$) oraz całkowitą objętość wypitych płynów przez zwierzęta (Ryc.7B, $F_{1,31} = 16{,}09$, $p = 0{,}0004$), sugerując, że niezależnie od genotypu samice spożyły większą ilość płynów oraz że w porównaniu do samców, większą ich część stanowił roztwór sacharyny. W wyniku analizy porównań między grupami zaobserwowano trend, wskazujący, że u samic mutantów słodki roztwór stanowił większy % z całkowitej objętości spożytych płynów niż u samców mutantów (Ryc.7A, $p = 0{,}089$), przy podobnej całkowitej objętości spożytych roztworów (Ryc.7B, $p > 0{,}05$). Z kolei w grupie kontrolnej zaobserwowano, że spożycie słodkiego roztworu w stosunku do niesłodzonej wody nie różniło się istotnie między płciami (Ryc.7A, $p > 0{,}05$), jednak samice spożyły większą całkowitą objętość roztworów niż samce (Ryc.7B, $p = 0{,}0115$).



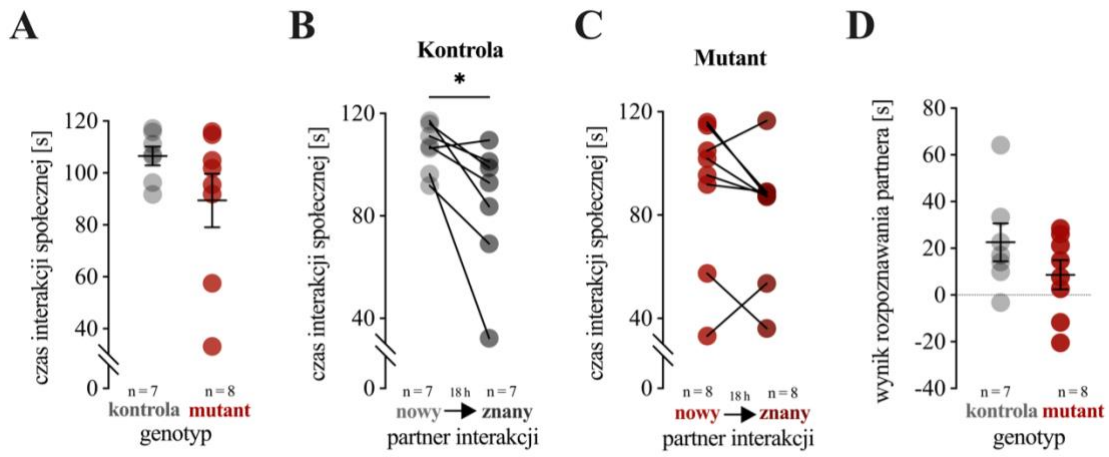
Ryc.7. Myszy Oprk1^{Tph2CreERT2} (mutant) wykazują zróżnicowanie płciowe w % spożycia roztworu sacharyny w teście dwóch butelek w porównaniu do myszy kontrolnych (kontrola). (A) % spożytego roztworu sacharyny. **(B)** Całkowita ilość wypitych płynów [ml]. Symbolami ♀ i ♂ oznaczono kolejno samice i samce; przerywana linia wyznacza granicę między płciami. Kolorami szarym i czarnym oraz różowym i fioletowym oznaczono kolejno zwierzęta kontrolne i mutanty. Każdy punkt oznacza wynik pojedynczej myszy. Słupki błędów reprezentują wartości średniej ± sem. Wartości $p < 0{,}05$ oznaczono symbolem "*", zaś wartości $0{,}05 < p < 0{,}1$ symbolem "#". Odrzucono dwa pomiary w parametrze % spożytego roztworu sacharyny w oparciu o analizę wyników odstających testem Grubbs'a.

Podsumowując, nie stwierdzono istotnego wpływu badanej mutacji na anhedonię mierzoną w teście preferencji sacharyny. Odnotowano istotny efekt płci wskazujący, że u samic większy % z całkowitej objętości spożytych płynów stanowił roztwór sacharyny i, co zaskakujące, spożyły one średnio większą całkowitą objętość płynów niż samce. Opisane powyżej obserwacje mogą świadczyć o tym, że KOR na neuronach 5-HT w warunkach podstawowych nie wpływają istotnie na preferencją sacharyny.

4.2.4 Test rozpoznawania nowego partnera

Dwuetapowy test pamięci społecznej zademonstrował czy badana mysz zapamiętała nieznaną, młodocianą mysz po jednorazowym kontakcie. Pierwszym sprawdzonym parametrem był całkowity czas jaki badany samiec spędził na wchodzeniu w interakcję z nowym, nieznanym dotąd partnerem interakcji. Zaobserwowano podobny poziom towarzyskości zarówno u zwierząt kontrolnych jak i mutantów (Ryc. 8A, $p > 0,05$).

Kolejnym badanym parametrem był całkowity czas jaki mysz badana spędziła na interakcji społecznej z tym samym, znanym partnerem, którego pierwszy raz spotkała w teście pierwszym, po upływie 18 h od ostatniego kontaktu. Zaobserwowano, że przy kolejnym kontakcie samce kontrolne spędzały istotnie mniej czasu na interakcji społecznej z partnerem (Ryc. 8B, $p = 0,0318$), w czasie, gdy samce mutanty spędzały na interakcji podobną ilość czasu w obu testach (Ryc. 8C, $p > 0,05$). Pomimo zaobserwowanych różnic w zachowaniu nie odnotowano istotnie statystycznej różnicy we wskaźniku rozpoznawania między samcami mutantami, a kontrolnymi (Ryc. 8D, $p > 0,05$).



Ryc.8. Porównanie wpływu interakcji z partnerem przed i po upływie 18 godz. dla samców myszy Oprk1^{Tph2CreERT2} (mutant) i myszy kontrolnych (kontrola). (A) Porównanie poziomu "towarzyskości" u zwierząt kontrolnych i mutantów (kolejno, „kontrola", „mutant") mierzonego poprzez czas całkowity spędzony na interakcji społecznej przy pierwszym kontakcie z nowym, nieznanym partnerem [s]. **(B, C)** Całkowity czas spędzony na interakcji z nowym, nieznanym partnerem („nowy") oraz ponownie z tym samym, już znanym partnerem po upływie 18 h („znany"), kolejno dla grupy kontrolnej („Kontrola") i mutantów („Mutant"). **(D)** Wynik rozpoznawania partnera interakcji: czasu interakcji z nowo poznanym osobnikiem [s] minus całkowity czas interakcji z osobnikiem znanym po 18 h [s]. Kolorami szarym i bordowym oznaczono kolejno zwierzęta kontrolne i mutanty. Każdy punkt oznacza wynik pojedynczej myszy. Liniami połączono wyniki tego samego osobnika powtórzone w czasie. Pola błędu pokazują wartości średniej ± sem. Symbolem „*" oznaczono wartości $p < 0,05$.

Powyższe wyniki wskazują, że wprowadzona mutacja miała istotny wpływ na pamięć społeczną, jednocześnie nie wpływając na lęk przed interakcją społeczną z nowym, nieznanym osobnikiem. Przy bezpośrednim porównaniu zachowania samców kontrolnych i samców mutantów w parametrze rozpoznawania partnera nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami. Jednakże wyniki przedstawiające zmianę czasu interakcji w zależności od znajomości partnera (partner vs nieznany) dla każdego z genotypów wskazują, że jedynie samce kontrolne zapamiętały pierwotnie nieznaną mysz. Może świadczyć to o tym, że KOR na neuronach 5-HT są kluczowe dla procesów związanych z pamięcią społeczną, sugerując ich rolę w zapamiętywaniu bądź przywoływaniu pamięci o innym osobniku.

5. Dyskusja i wnioski

Wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy dyplomowej pokazują, że brak receptorów KOR selektywnie na neuronach 5-HT prowadzi do subtelnych zmian w zawartości monoamin w wybranych strukturach przodomózgowia i nie prowadzi do powstawania istotnych zaburzeń w zachowaniu. Ważną obserwacją w niniejszej pracy było potwierdzenie, że płeć miała istotny wpływ na ekspresję niektórych efektów wprowadzonej mutacji. Po pierwsze, analiza biochemiczna wykazała odmienny wpływ mutacji na ilość 5-HT w korze czołowej, wskazując na zmniejszenie jej ilości u samców mutantów w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy u samic poziom 5-HT pozostał niezmieniony. Zaobserwowano także, że ilość NA w prążkowiu była mniejsza u zwierząt z wprowadzoną mutacją niż u zwierząt kontrolnych, jednak efekt ten był niezależny od płci. Po drugie, w teście jasnego-ciemnego pudełka zaobserwowano, że mutacja miała wpływ na latencję do pierwszego wejścia do jasnej części w zależności od płci. Pomimo braku istotnych różnic między grupami, wyniki sugerują, że latencja ta może być zwiększona u samców mutantów w porównaniu z innymi grupami. Ponadto, co sprzeczne z pierwotnymi założeniami, w teście pamięci społecznej wykazano pogorszoną pamięć społeczną u samców mutantów w porównaniu z samcami kontrolnymi.

Wpływ mutacji na wydzielanie monoamin analizowano zarówno w FC, jak i STR, strukturach mózgu integralnie związanych z regulacją nastroju i przetwarzaniem nagrody. Uzyskane wyniki wskazują, że ilość 5-HT w FC w warunkach kontrolnych jest zależna od płci; większa u samców niż u samic. Zaobserwowano także istotny efekt płci na ilość metabolitu 5-HIAA w FC, wskazujący, że jego ilość jest ogólnie większa u samic niż u samców. Świadczy to o zwiększonym metabolizmie 5-HT u płci żeńskiej niezależnie od genotypu. Wyniki te są zgodne z literaturą sugerującą, że kobiety mają wyższy podstawowy ton serotoninergiczny niż mężczyźni (Carlsson i Carlsson 1988). KOR moduluje szlaki serotonergiczne, zmniejszając wychwyt 5-HT po aktywacji (Pomrenze i in. 2022; Sundaramurthy i in. 2017), stąd spodziewano się, że u mutantów, niezależnie od płci zaobserwujemy zmniejszony poziom 5-HT. Zaobserwowano jednak, że mutacja ma większy wpływ na równowagę tkankową między syntezą i wydzielaniem 5-HT u samców niż u samic; ilość 5-HT w grupie samic była na podobnym poziomie niezależnie od genotypu, z kolei u samców mutantów ilość 5-HT była mniejsza w porównaniu z grupą kontrolną. Wydaje się także, że mutanty płci męskiej mają niższe poziomy 5-HIAA i HVA, co może odzwierciedlać odpowiednio zmniejszony metabolizm serotoninergiczny

i dopaminergiczny u tych zwierząt. Obserwacja ta jest szczególnie ważna, ponieważ dostępnych jest niewiele danych na temat modulacji działania neuronów serotoninergicznych przez KOR w sposób specyficzny dla płci. W kontekście opisywanych wyników w niniejszej pracy dyplomowej nie znaleziono danych literaturowych opisujących różnice w wydzielaniu monoamin pod wpływem KOR w zależności od płci. Badania obejmujące obie płcie są kluczowe, ponieważ pomimo, iż ogólnie zdolności poznawcze i funkcje fizjologiczne ośrodkowego układu są podobne niezależnie od płci, to jednak możemy znaleźć różnice w regulacji hormonalnej, ekspresji genetycznej i aktywności receptorów u kobiet i mężczyzn (Jamu i Okamoto 2022). Różnice te mogą z kolei przełożyć się na postępowanie i symptomy chorób neuropsychiatrycznych, a także na skuteczność farmakoterapii. Potencjalnym wyjaśnieniem dla obserwowanych zmian może być działanie estrogenów. Estrogeny regulują ekspresję hydroksylazy tryptofanu (Rubinow, Schmidt, i Roca 1998), co wpływa na syntezę serotoniny i co stanowiłoby potencjalne wyjaśnienie dla wpływu płci na zawartość monoamin. Idąc dalej tym tokiem rozumowania, należy pamiętać, że indukcję mutacji przeprowadza się za pomocą bardzo wysokich dawek tamoksyfenu, częściowego agonisty receptorów estrogenowych. Jakkolwiek, testy przeprowadzone zostały kilka tygodni po indukcji mutacji, nie można wykluczyć długotrwałych zmian w równowadze działania receptorów estrogenowych. Aby zweryfikować te przypuszczenia koniecznym byłoby dodanie w przyszłych doświadczeniach grup kontrolnych nietraktowanych tamoksyfenem.

Z kolei w prążkowiu mutacja miała znaczący wpływ na poziom NA, wskazując na większą zawartość tkankową obserwowaną u mutantów w porównaniu do zwierząt kontrolnych, niezależnie od płci. Biorąc pod uwagę lokalizację, wynik ten wydaje się nieoczekiwany, gdyż w neuroanatomii przeważał pogląd, że STR zawiera niewiele noradrenaliny lub nie zawiera jej wcale (Ferrucci i in. 2013). Jednak pojawiające się badania wskazują, że rzeczywiście istnieje niewielka ilość aferentów NA z miejsca sinawego do STR (Gobert i in. 2004). Badacze używając metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej, potwierdzili, obecność NA w STR z projekcji adrenergicznych. Miejsce sinawe jest uznawane za główne źródło NA w mózgu, a jego neurony wysyłają projekcje do różnych regionów, w tym jądra półleżącego i części STR. Inni badacze wykazali też, że neurony katecholaminergiczne wyrażające hydroksylazę tyrozynową obecne w STR, przyczyniają się do lokalnej dynamiki NA (Bupesh i in.

2014). Uzyskany przeze mnie wynik wydaje się zgodny z wcześniejszą wiedzą na temat udziału KOR w modulowaniu układów monoaminergicznych. Wiadomo, że KOR wpływają na regulację neuroprzekaźników, w tym NA, a ich brak może prowadzić do deregulacji w określonych regionach mózgu (Bruijnzeel 2009). KOR wywierają hamujący wpływ na uwalnianie neuroprzekaźników, stąd obserwowany wzrost NA u mutantów może odzwierciedlać braku hamowania wydzielania NA przez neurony noradrenergiczne. Potwierdzenie powyższych mechanizmów możemy znaleźć w literaturze. Przykład jednego z badań wskazuje, że podanie selektywnego agonisty KOR (U50,488H), hamowało wydzielanie NA w skrawkach kory świnki morskiej (Werling, Brown, i Cox 1987). Brak znaczącego wpływu genotypu na inne monoaminy (DA, NA i ich metabolity) w obu strukturach sugeruje bardziej złożoną rolę KOR w tych układach neuroprzekaźników.

Przechodząc do omówienia wyników behawioralnych, pierwszym badanym parametrem były zachowania eksploracyjne. Myszy preferują przebywanie przy ścianach klatki i unikanie jasnych, otwartych przestrzeni w obawie przed drapieżnikiem występującym w warunkach naturalnych (Longland i Price 1991). Badana mutacja nie wpłynęła istotnie na zmiany w tym zachowaniu, o czym świadczy brak m.in. znaczących różnic w teście otwartego pola. Sugeruje to, że mutacja nie zmieniła wrodzonych tendencji tych myszy do eksploracji lub unikania otwartych przestrzeni. Jest to nieco zaskakujące, biorąc pod uwagę, że KOR są zaangażowane w modulowanie lęku i reakcji na stres, które są krytycznymi czynnikami wpływającymi na zachowania eksploracyjne. Antagoniści KOR zmniejszają lęk i zwiększają zachowania eksploracyjne w różnych modelach zwierzęcych, co sugeruje, że aktywność KOR może hamować eksplorację z powodu zwiększonego poziomu lęku (Crowley i Kash 2015). Prawdopodobnie zastosowany wariant testu otwartego pola przy słabym oświetleniu nie był silnie anksjogenny dla badanych zwierząt. Gdyby myszy te zostały poddane uprzedniemu bodźcu stresowemu (np. stres unieruchomienia, porażka społeczna) wyniki mogłyby być inne. Wiadomo, że KOR mają istotną rolę w odpowiedzi na stres, co wpływa na zachowanie, często nasilając reakcje lękowe i zmniejszając tendencje eksploracyjne (Hang i in. 2015). W stanie stresu zwierzęta bez KOR mogłyby wykazywać mniejszy niepokój i tendencję do unikania otwartych przestrzeni niż myszy bez zmienionego genotypu. Biorąc pod uwagę sam czynni płci, literatura istotnie wskazuje, że samce szczurów charakteryzują się dłuższym opóźnieniem wejścia na otwartą przestrzeń i

mniejszą liczbą wejść w teście obronnego wycofania (ang. *defensive withdrawal test*) mierzącym zachowania podobne do lęku (Roman i Arborelius 2009).

Wykonany w pierwszej kolejności test otwartego pola posłużył jako szeroka ocena aktywności lokomotorycznej i zachowań eksploracyjnych. Aby zbadać zachowania podobne do lęku (unikanie jasno oświetlonych miejsc, a preferencja tych z mniejszą ilością światła), wykonano test jasnego-ciemnego pudełka. W teście jasnego-ciemnego pudełka usunięcie KOR miało odmienny wpływ na latencję wejścia do oświetlonej części aparatu testowego (efekt interakcji czynników genotyp-płeć) w zależności od płci. Choć wyniki post-hoc nie wykazały istotnych statystycznie różnic, dane wydają się wskazywać, że samce z mutacją wykazywały dłuższą latencję niż osobniki kontrolne, podczas gdy takiej rozbieżności nie wychwycono u samic. Słabe różnice w zachowaniu mogą, podobnie jak w przypadku testu otwartego pola, wynikać ze względu na to, że KOR pełnią ważną rolę szczególnie w warunkach silnego stresu, którego zwierzęta badane nie doświadczyły. Wynik testu mógłby być inny, gdyby mutanty Oprk1^{Tph2CreERT2} przed rozpoczęciem procedur doświadczyły stresowego bodźca, który mógłby uwypuklić działanie KOR. Co ciekawe w literaturze istnieje jedno badanie, które porusza podobne zagadnienie co w opisywanych wynikach. W badaniu przeprowadzonym przez Wright i in. (2018) badacze skupili się na tym, jak aktywacja KOR na neuronach serotoninergicznych poprzez podanie do selektywnego agonisty KOR (U50,488) bezpośrednio do DRN wpłynęła na zachowania wywołane stresem, a dokładnie porażką społeczną. Zaobserwowali oni odmienne działanie KOR na 5-HT w zależności od płci. Niższe dawki agonisty KOR wywołały reakcje podobne do lęku u niezestresowanych (kontrolnych) samców myszy, podczas gdy u zestresowanych samców, wyższe dawki U50,488 (wynikające prawdopodobnie z tego, że stres wpłyną na desensytyzację KOR), miały odwrotny skutek, zmniejszając lęk. Z kolei efekt podania U50,488 u samic był niewielki, bez względu na wielkość dawki. Chociaż to badanie skupiało się na aktywacji KOR, a nie na jego usunięciu, wyniki te pokrywają się z moimi obserwacjami, wskazując, że KOR mogą odgrywać większą rolę w modulacji serotoninergicznej i zachowań związanych ze stresem u samców. Niemniej, opisany efekt działania KOR nie jest spójny z uzyskanymi przeze mnie wynikami. Nawet niewielkie dawki U50,488, aktywujące KOR w DRN, sprawiały, że samce były bardziej lękliwe, z kolei w niniejszej pracy dyplomowej, brak KOR na neuronach 5-HT u samców sprawił nie tylko, że zachowania lękowe były zachowane, ale nawet potencjalnie silniejsze niż u samców kontrolnych.

Podkreśla to, jak ważny jest kontekst, w którym bada się działanie KOR – w warunkach kontrolnych czy w warunkach silnego stresu. Wywołane stresem uwalnianie dynorfiny aktywuje KOR, który następnie tłumi aktywność serotoniny, przyczyniając się w ten sposób do dysforii, co nie dzieje się w warunkach podstawowych. Z kolei w innym badaniu wskazującym, że kontekst (warunki stresowe lub ich brak) w jakim bada się działanie KOR jest istotny (Fontaine'a i in. 2022), wykazano, że u samców aktywacja KOR podczas stresu prowadziła do obniżenia tonu 5-HT w jądrze półleżącym, promując awersję i zwiększając warunkowaną preferencję kokainy. Co więcej, podwyższona ekspresja receptorów 5-HT1B po ekspozycji na stres sugerowała rolę KOR w regulacji szlaków serotoninergicznych. Jednak badanie skupiało się jedynie na samcach, stąd różnice płciowe w tym zachowaniu nie są jeszcze znane.

Szereg doniesień wskazuje, że KOR są zaangażowane w modulację zachowań lękowych (Tejeda, Shippenberg, i Henriksson 2012), jednakże wciąż badane jest, które obszary spośród rozległej dystrybucji KOR, mają kluczowe znaczenie w kontekście działania tego receptora na różne aspekty odpowiedzi na stres. Opisano na przykład, że delecja KOR wyłącznie na neuronach DA, podobnie jak w przypadku delecji KOR na neuronach 5-HT, nie upośledzała podstawowej charakterystyki behawioralnej. Natomiast zwierzęta wykazywały istotnie zmniejszony poziom lęku mierzony mniejszą latencją do pierwszego wejścia do jasnej części aparatu niż zwierzęta kontrolne (Van't Veer i in. 2013). Jest to szczególnie ciekawe, ponieważ w niniejszej pracy dyplomowej, gdzie KOR były usunięte na neuronach wydzielających inną monoaminę – 5-HT, w tym samym parametrze behawioralnym zaobserwowano przeciwstawne wyniki, co świadczy specyfice działania KOR w zależności od lokalizacji. Jednak autorzy badali jedynie samce, stąd nadal brakuje informacji czy w tym przypadku występują różnice płciowe w funkcji KOR.

Test preferencji sacharyny, stosowany do pomiaru anhedonii, nie wykazał znaczącego wpływu mutacji na preferencje zwierząt dotyczące słodkiego roztworu ani na całkowitą objętość spożytych płynów. Sugeruje to, że mutacja nie wywołuje anhedonii, ale również nie sprawia, że mutanty w większym stopniu preferują słodki smak. Tak więc, mutacja nie narusza istotnie odczuwania przyjemności, co jest zgodne z pierwotnymi założeniami. Analogicznie, wcześniejsze doniesienia wskazywały, że preferencja sacharozy nie zmienia się istotnie bez wprowadzenia bodźca stresowego, tym samym bez aktywacji KOR przez dynorfiny lub przez egzogennych agonistów. Podawanie nieselektywnych i selektywnych antagonistów KOR bez kontekstu stresowego nie

wpływała istotnie na zmianę preferencji słodkiego roztworu przez samce myszy (Sakamoto i in. 2015). Sytuacja ta przypomina warunki eksperymentalne w niniejszej pracy dyplomowej – brak wprowadzenia stresora, stąd różnice w działaniu KOR w tym zachowaniu mogły nie zostać uwidocznione. Literatura wskazuje, że aktywacja KOR jest niezbędna do wystąpienia dysforii wywołanej stresem i może częściowo modulować wpływ bodźców awersyjnych na zachowania związane z odczuwaniem przyjemności (Land i in., 2008), tłumiąc tym samym preferencję słodkiego smaku. Wykazano, że selektywny antagonista KOR (JNJ-67953964) odwraca spadek preferencji sacharozy wywołany chronicznym, nieprzewidzianym stresem u dorosłych samców myszy. W związku z tym, możliwe, że gdyby w niniejszej pracy przed testem preferencji sacharyny, zwierzęta zostały zestresowane, wyniki mogłyby pokazać obniżoną preferencję sacharyny przez zwierzęta kontrolne, a zachowaną preferencję przez mutanty. Dodatkowo, zaobserwowano znaczący wpływ płci na wyniki – u samic samic większy % z całkowitej objętości stanowił roztwór sacharyny w porównaniu z samcami. Większe spożycie sacharyny u samic dorosłych myszy zostało wcześniej potwierdzone (Wei i in. 2021) i może odzwierciedlać różnice między płciami, napędzane wpływami hormonalnymi (estrogenu i progesteronu). Jednak cykl nie był monitorowany, więc nie może zostać to jednoznacznie potwierdzone.

Ostatnie badania podkreślają zaangażowanie KOR w modulację zachowań społecznych. Pomrenze i in. (2022) opisali, że aktywacja KOR w jądrze półleżącym jest niezbędna, aby obserwować efekty zmniejszonej chęci do interakcji z drugim osobnikiem podczas odstawienia opioidów. Podobnie, Robles i in. (2014) wykazali, że KOR negatywnie regulują interakcje społeczne w różnych kontekstach. Podanie U50488, agonisty KOR, podobnie zmniejszyło interakcje społeczne zarówno u samców, jak i samic myszy kalifornijskich. Z kolei neurony 5-HT odgrywają rolę w modulowaniu pamięci społecznej (Wu i in. 2021). Niedawne badanie wykazało, że modulacja 5-HT jądra przyśrodkowego przegrody wpływa na stabilność pamięci społecznej, wykazując, że zwiększona aktywność neuronów w tym obszarze jest związana z interakcjami społecznymi. Mimo wszystko, wciąż pozostaje niejasne, w jaki sposób KOR na neuronach 5-HT przyczyniają się do tej modulacji. Co więcej, potencjalny wpływ płci na te mechanizmy nie został dokładnie zbadany, pozostawiając ważną lukę w zrozumieniu pełnego zakresu funkcji 5-HT w dynamice pamięci społecznej. Stąd szczególnie interesującą obserwacją, opisaną w niniejszej pracy, był wpływ mutacji na pamięć

społeczną, oceniany za pomocą dwuetapowego testu mierzącego bezpośrednią interakcję społeczną z partnerem. Eksperymenty behawioralne nie są jeszcze zakończone, stąd w niniejszej pracy dyplomowej zostały opisane wyniki eksperymentów przeprowadzone tylko na samcach. Myszy kontrolne wykazywały oczekiwany wzorzec zachowania - skrócony czas interakcji ze znajomym partnerem w porównaniu z nowym, co wskazuje na nienaruszoną pamięć społeczną. Z kolei zmutowane samce nie wykazywały podobnego zachowania, co sugeruje upośledzoną pamięć społeczną. Co ważne, nie odnotowano znaczących różnic w poziomie „towarzyskości" interpretowanym jako całkowita ilość czasu spędzona na interakcji społecznej przy pierwszym kontakcie zwierząt. Stąd wiadomo, że obserwowane różnice w zachowaniu wynikają prawdopodobnie z pogorszonej pamięci społecznej, a nie z lęku przed nawiązywaniem kontaktu z nieznanym wcześniej osobnikiem. Dotychczas udowodniono, że aktywacja MOR poprzez podanie morfiny w niskich dawkach samcom szczurów poprawiała długotrwałą pamięć społeczną (Bianchi, Menicacci, i Ghelardini 2013), jednak doniesienia na temat zaangażowania KOR w ten proces są ograniczone. Dynorfiny odgrywają kluczową rolę w tłumieniu reakcji emocjonalnych związanych z interakcjami społecznymi. Bilkei-Gorzo i wsp. (2014) pokazali, że farmakologiczna blokada KOR u myszy kontrolnych wzmacnia pamięć społeczną, podczas gdy aktywacja KOR ją osłabiała. W przeciwieństwie do tego, myszy pozbawione genu prodynorfiny (Pdyn-/-) wykazywały lepszą pamięć społeczną, co wskazuje, że dynorfiny zmniejszają siłę wspomnień społecznych. Biorąc pod uwagę powyższe dowody literaturowe spodziewałam się, że u myszy bez KOR na neuronach 5-HT zaobserwuję podobne lepszą pamięć społeczną. Zaobserwowałam natomiast upośledzoną pamięć społeczną u samców myszy szczepu Oprk1^{Tph2CreERT2}, może mieć kilka potencjalnych wyjaśnień. W przypadku pracy Bilei-Gorzo myszy Pdyn-/- miały nieselektywne wyłączenie genu *Pdyn* od urodzenia, zaś aktywacja/hamowanie farmakologiczne KOR odbywało się poprzez obwodowe podanie ago- i antagonistów. Stąd obserwowane przez badaczy wyniki dotyczyły niespecyficznej modulacji KOR, na różnych neuronach i w różnych strukturach jednocześnie. Badane przeze mnie myszy Oprk1^{Tph2CreERT2}, miały indukowaną selektywną mutację, ograniczającą się do wyłączenia KOR wyłącznie w obrębie neuronów 5-HT. Może to wyjaśniać rozbieżne wyniki uzyskane w tym teście.

W celu zrozumienia funkcji KOR na neuronach 5-HT, uwzględnienie czynników stresowych do przyszłych eksperymentów może istotnie wpłynąć na uwypuklenie

skutków mutacji, które nie są widoczne w warunkach podstawowych. Ponadto we wszystkich testach behawioralnych powinny zostać uwzględnione obie płcie, aby w pełni zrozumieć mechanizmy działania KOR, zaś u samic dodatkowym atutem byłoby monitorowanie fazy cyklu w ciągu wykonywania eksperymentów. Włączenie dodatkowych testów, takich jak test pamięci obiektu (badający inny rodzaj pamięci, niż pamięć społeczna) czy test preferencji miejsca warunkowany kontekstem społecznym (badanie nagradzających właściwości interakcji społecznych), zapewniłoby lepsze zrozumienie wpływu mutacji na zachowanie. Koniecznie jest sprawdzenie efektywności zajścia mutacji, co jest w trakcie wykonywania za pomocą hybrydyzacji *in situ* metodą RNAscope. Dodatkowym atutem byłoby zbadanie mechanizmów komórkowych i molekularnych leżących u podstaw obserwowanych wyników poprzez przykładowo sprawdzenie zmian w ekspresji genów czy zastosowanie selektywnych ago-/antagonistów KOR.

Podsumowując, praca ta wskazuje, że mutacja Oprk1^{Tph2CreERT2} ogólnie wywołuje subtelny wpływ na zmiany w ilości monoamin w przodomózgowiu (FC i STR) i podstawowe zachowania. Zaobserwowano jednak różnice płciowe w ekspresji mutacji: wydaje się, że brak KOR na neuronach 5-HT, prowadzi do zmniejszenia ilości 5-HT w korze czołowej, subtelnie nasila zachowania lękowe i osłabia pamięć społeczną u samców z wprowadzoną mutacją. Wyniki te podkreślają złożoność sygnalizacji KOR w mózgu i sugerują, że jej rola jest zależna od wielu czynników w tym płci, kontekstu środowiskowego (warunki stresowe) czy typu komórki na której KOR są zlokalizowane. Opisane obserwacje wskazują jak istotne jest uwzględnienie różnic płciowych i warunków eksperymentalnych w badaniach neurobiologicznych i dalej, neuropsychiatrycznych. Wiedza ta jest szczególnie ważna, w kontekście farmakoterapii zaburzeń neuropsychiatrycznych, w tym depresji czy zaburzeń lękowych, w których stosowane są leki oddziałujące na neurony 5-HT. Biorąc pod uwagę, że coraz więcej badaczy wskazuje na różnice w skuteczności farmakoterapii w zależności od płci pacjenta, badania podobne jak niniejszej pracy dyplomowej są potrzebne, aby w dalszej przyszłości rozwijać nowe kierunki terapeutyczne takie jak gałąź medycyny spersonalizowanej.

6. Piśmiennictwo

Al-Hasani, Ream, i Michael R. Bruchas. 2011. „Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior". *Anesthesiology* 115: 1363–81. doi:10.1097/ALN.0b013e318238bba6.

Awasthi, Janak R., Kota Tamada, Eric T. N. Overton, i Toru Takumi. 2020. „Comprehensive Topographical Map of the Serotonergic Fibers in the Mouse Brain". : 2020.03.18.997775. doi:10.1101/2020.03.18.997775.

Bagley, Elena E., i Susan L. Ingram. 2020. „Endogenous opioid peptides in the descending pain modulatory circuit". *Neuropharmacology* 173: 108131. doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108131.

Bandyopadhyay, Sankar. 2019. „An 8,000-year History of Use and Abuse of Opium and Opioids: How That Matters For A Successful Control Of The Epidemic ? (P4.9-055)". *Neurology* 92(15_supplement): P4.9-055. doi:10.1212/WNL.92.15_supplement.P4.9-055.

Beckett, A. H., i A. F. Casy. 1954. „Synthetic Analgesics: Stereochemical Considerations". *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(12): 986–1001. doi:10.1111/j.2042-7158.1954.tb11033.x.

Berger, Benjamin, Anna Katharina Rothmaier, Franziska Wedekind, Josef Zentner, Thomas J Feuerstein, i Rolf Jackisch. 2006. „Presynaptic Opioid Receptors on Noradrenergic and Serotonergic Neurons in the Human as Compared to the Rat Neocortex". *British Journal of Pharmacology* 148(6): 795–806. doi:10.1038/sj.bjp.0706782.

Bianchi, Enrica, Cristina Menicacci, i Carla Ghelardini. 2013. „Dual Effect of Morphine in Long-Term Social Memory in Rat". *British Journal of Pharmacology* 168(8): 1786–93. doi:10.1111/bph.12060.

Bilkei-Gorzo, A., D. Mauer, K. Michel, i A. Zimmer. 2014. „Dynorphins Regulate the

Strength of Social Memory". *Neuropharmacology* 77: 406–13. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.023.

Bodnar, Richard J. 2004. „Endogenous Opioids and Feeding Behavior: A 30-Year Historical Perspective". *Peptides* 25(4): 697–725. doi:10.1016/j.peptides.2004.01.006.
Bodnar, Richard J. 2024. „Endogenous Opiates and Behavior: 2023". *Peptides* 179: 171268. doi:10.1016/j.peptides.2024.171268.

Bruchas, Michael R., i Charles Chavkin. 2010. „Kinase Cascades and Ligand-Directed Signaling at the Kappa Opioid Receptor". *Psychopharmacology* 210(2): 137–47. doi:10.1007/s00213-010-1806-y.

Bruijnzeel, Adrie W. 2009. „Kappa-opioid receptor signaling and brain reward function". *Brain research reviews* 62(1): 127–46. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.09.008.

Bupesh, Munisamy, Alba Vicario, Antonio Abellán, Ester Desfilis, i Loreta Medina. 2014. „Dynamic expression of tyrosine hydroxylase mRNA and protein in neurons of the striatum and amygdala of mice, and experimental evidence of their multiple embryonic origin". *Brain Structure & Function* 219(3): 751–76. doi:10.1007/s00429-013-0533-7.

Cahill, Catherine M., Sarah V. Holdridge, Steve Liu, Lihua Xue, Claire Magnussen, Edmund Ong, Patrick Grenier, Anne Sutherland, i Mary C. Olmstead. 2022. „Delta Opioid Receptor Activation Modulates Affective Pain and Modality-Specific Pain Hypersensitivity Associated with Chronic Neuropathic Pain". *Journal of neuroscience research* 100: 129. doi:10.1002/jnr.24680.

Cahill, Catherine, Hugo A. Tejeda, Mariana Spetea, Chongguang Chen, i Lee-Yuan Liu-Chen. 2022. „Fundamentals of the Dynorphins / Kappa Opioid Receptor System: From Distribution to Signaling and Function". *Handbook of experimental pharmacology* 271: 3–21. doi:10.1007/164_2021_433.

Carlezon, William A., i Andrew D. Krystal. 2016. „Kappa-Opioid Antagonists for

Psychiatric Disorders: From Bench to Clinical Trials". *Depression and Anxiety* 33: 895–906. doi:10.1002/da.22500.

Carlsson, M., i A. Carlsson. 1988. „A Regional Study of Sex Differences in Rat Brain Serotonin". *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 12: 53–61. doi:10.1016/0278-5846(88)90061-9.

Chartoff, Elena H., i Maria Mavrikaki. 2015. „Sex Differences in Kappa Opioid Receptor Function and Their Potential Impact on Addiction". *Frontiers in Neuroscience* 9. doi:10.3389/fnins.2015.00466.

Chavkin, Charles. 2013. „Dynorphin–Still an Extraordinarily Potent Opioid Peptide". *Molecular Pharmacology* 83(4): 729–36. doi:10.1124/mol.112.083337.

Colasanti, A, EA Rabiner, A Lingford-Hughes, i DJ Nutt. 2011. „Opioids and Anxiety". *Journal of Psychopharmacology* 25(11): 1415–33. doi:10.1177/0269881110367726.

Coutens, Basile, i Susan L. Ingram. 2023. „Key differences in regulation of opioid receptors localized to presynaptic terminals compared to somas: Relevance for novel therapeutics". *Neuropharmacology* 226: 109408. doi:10.1016/j.neuropharm.2022.109408.

Crawley, J., i F. K. Goodwin. 1980. „Preliminary Report of a Simple Animal Behavior Model for the Anxiolytic Effects of Benzodiazepines". *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 13: 167–70. doi:10.1016/0091-305790067-2.

Crowley, Nicole A., i Thomas L. Kash. 2015. „Kappa Opioid Receptor Signaling In the Brain: Circuitry and Implications for Treatment". *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 62: 51–60. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.01.001.

Cum, Meghan, Jocelyn A. Santiago Pérez, Erika Wangia, Naeliz Lopez, Elizabeth S. Wright, Ryo L. Iwata, Albert Li, Amelia R. Chambers, i Nancy Padilla-Coreano. 2024. „A Systematic Review and Meta-Analysis of How Social Memory Is Studied".

Scientific Reports 14(1): 2221. doi:10.1038/s41598-024-52277-z.

D'Addario, C., M. Di Benedetto, S. Izenwasser, S. Candeletti, i P. Romualdi. 2007. „Role of serotonin in the regulation of the dynorphinergic system by a κ-opioid agonist and cocaine treatment in rat CNS". *Neuroscience* 144(1): 157–64. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.09.008.

Dalefield, Martin L., Brittany Scouller, Rabia Bibi, i Bronwyn M. Kivell. 2022. „The Kappa Opioid Receptor: A Promising Therapeutic Target for Multiple Pathologies". *Frontiers in Pharmacology* 13: 837671. doi:10.3389/fphar.2022.837671.

Darcq, Emmanuel, i Brigitte Lina Kieffer. 2018. „Opioid Receptors: Drivers to Addiction?" *Nature Reviews Neuroscience* 19(8): 499–514. doi:10.1038/s41583-018-0028-x.

DePaoli, A. M., K. M. Hurley, K. Yasada, T. Reisine, i G. Bell. 1994. „Distribution of Kappa Opioid Receptor mRNA in Adult Mouse Brain: An in Situ Hybridization Histochemistry Study". *Molecular and Cellular Neurosciences* 5(4): 327–35. doi:10.1006/mcne.1994.1039.

Donegan, Stefanini, i Meira. 2024. „Coding of social novelty in the hippocampal CA2 region and its disruption and rescue in a 22q11.2 microdeletion mouse model | Nature Neuroscience". https://www.nature.com/articles/s41593-020-00720-5 (22 wrzesień 2024).

Drolet, Guy, Éric C. Dumont, Isabelle Gosselin, Richard Kinkead, Sylvie Laforest, i Jean-François Trottier. 2001. „Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response". *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 25(4): 729–41. doi:10.1016/S0278-5846(01)00161-0.

Ehrich, Jonathan M., Daniel I. Messinger, Cerise R. Knakal, Jamie R. Kuhar, Selena S. Schattauer, Michael R. Bruchas, Larry S. Zweifel, i in. 2015. „Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38 MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons". *The Journal of Neuroscience* 35(37): 12917–31. doi:10.1523/JNEUROSCI.2444-15.2015.

„Ensembl”. http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000025905;r=1:5658689-5676354 (22 wrzesień 2024).

Fontaine, Harrison M., Phillip R. Silva, Carlie Neiswanger, Rachelle Tran, Antony D. Abraham, Benjamin B. Land, John F. Neumaier, i Charles Chavkin. 2022. „Stress Decreases Serotonin Tone in the Nucleus Accumbens in Male Mice to Promote Aversion and Potentiate Cocaine Preference via Decreased Stimulation of 5-HT1B Receptors”. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 47(4): 891–901. doi:10.1038/s41386-021-01178-0.

Fricker, Lloyd D., Elyssa B. Margolis, Ivone Gomes, i Lakshmi A. Devi. 2020. „Five Decades of Research on Opioid Peptides: Current Knowledge and Unanswered Questions”. *Molecular Pharmacology* 98(2): 96–108. doi:10.1124/mol.120.119388.

Gear, Robert W., Christine Miaskowski, Newton C. Gordon, Steven M. Paul, Philip H. Heller, i Jon D. Levine. 1996. „Kappa–Opioids Produce Significantly Greater Analgesia in Women than in Men”. *Nature Medicine* 2(11): 1248–50. doi:10.1038/nm1196-1248.

Gobert, Alain, Rodolphe Billiras, Laetitia Cistarelli, i Mark J. Millan. 2004. „Quantification and Pharmacological Characterization of Dialysate Levels of Noradrenaline in the Striatum of Freely-Moving Rats: Release from Adrenergic Terminals and Modulation by Alpha2-Autoreceptors”. *Journal of Neuroscience Methods* 140(1–2): 141–52. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.04.040.

Goel, Nirupa, i Tracy L. Bale. 2010. „Sex Differences in the Serotonergic Influence on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stress Axis”. *Endocrinology* 151(4): 1784–94. doi:10.1210/en.2009-1180.

Gould, Todd D., David T. Dao, i Colleen E. Kovacsics. 2009. „The open field test”. W *Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests*, Totowa, NJ, US: Humana Press/Springer Nature, 1–20. doi:10.1007/978-1-60761-303-9_1.

Hang, Ai, Yu-jun Wang, Ling He, i Jing-gen Liu. 2015. „The role of the dynorphin/κ

opioid receptor system in anxiety". *Acta Pharmacologica Sinica* 36(7): 783–90. doi:10.1038/aps.2015.32.

Higginbotham, Jessica A., Tamara Markovic, Nicolas Massaly, i Jose A. Morón. 2022. „Endogenous Opioid Systems Alterations in Pain and Opioid Use Disorder". *Frontiers in Systems Neuroscience* 16: 1014768. doi:10.3389/fnsys.2022.1014768.

Hornung, Jean-Pierre. 2003. „The Human Raphe Nuclei and the Serotonergic System". *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26(4): 331–43. doi:10.1016/j.jchemneu.2003.10.002.

„Jackson Laboratory". https://www.informatics.jax.org/marker/MGI:97439 (22 wrzesień 2024).

Jacobson, Moriah L., Sarah C. Simmons, Hildegard A. Wulf, Huaiyan Cheng, Ying-Hong Feng, Fereshteh S. Nugent, Caroline A. Browne, i Irwin Lucki. 2020. „Protracted Effects of Ketamine Require Immediate Kappa Opioid Receptor Activation and Long-Lasting Desensitization". *The FASEB Journal* 34(S1): 1–1. doi:10.1096/fasebj.2020.34.s1.04214.

Jamu, Isabella Marie, i Haruko Okamoto. 2022. „Recent Advances in Understanding Adverse Effects Associated with Drugs Targeting the Serotonin Receptor, 5-HT GPCR". *Frontiers in Global Women's Health* 3. doi:10.3389/fgwh.2022.1012463.

Jones, Michelle D., i Irwin Lucki. 2005. „Sex Differences in the Regulation of Serotonergic Transmission and Behavior in 5-HT Receptor Knockout Mice". *Neuropsychopharmacology* 30(6): 1039–47. doi:10.1038/sj.npp.1300664.

Kalyuzhny, Alexander E. i Wessendorf, Martin W. 1999. „Serotonergic and GABAergic neurons in the medial rostral ventral medulla express *κ*-opioid receptor immunoreactivity". *Neuroscience* 90: 229–34. doi:10.1016/S0306-4522(98)00376-5.

Kawaminami, Ayako, Daisuke Yamada, Toshinori Yoshioka, Azumi Hatakeyama, Moeno Nishida, Keita Kajino, Tsuyoshi Saitoh, Hiroshi Nagase, i Akiyoshi Saitoh.

2023. „The delta opioid receptor agonist KNT-127 relieves innate anxiety-like behavior in mice by suppressing transmission from the prelimbic cortex to basolateral amygdala". *Neuropsychopharmacology Reports* 44(1): 256–61. doi:10.1002/npr2.12406.

Kieffer, Brigitte L. 2000. „Opioid receptors: From genes to mice". *The Journal of Pain* 1(3, Supplement): 45–50. doi:10.1054/jpai.2000.9823.

Klenowski, Paul, Michael Morgan, i Selena E Bartlett. 2015. „The role of δ-opioid receptors in learning and memory underlying the development of addiction". *British Journal of Pharmacology* 172(2): 297–310. doi:10.1111/bph.12618.
Knoll, Allison T., i William A. Carlezon. 2010. „Dynorphin, stress, and depression". *Brain research* 1314C: 56. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.074.

Kornstein, S. G., A. F. Schatzberg, M. E. Thase, K. A. Yonkers, J. P. McCullough, G. I. Keitner, A. J. Gelenberg, i in. 2000. „Gender Differences in Treatment Response to Sertraline versus Imipramine in Chronic Depression". *The American Journal of Psychiatry* 157(9): 1445–52. doi:10.1176/appi.ajp.157.9.1445.

Land, Benjamin B., Michael R. Bruchas, Julia C. Lemos, Mei Xu, Erica J. Melief, i Charles Chavkin. 2008. „The Dysphoric Component of Stress Is Encoded by Activation of the Dynorphin κ-Opioid System". *The Journal of Neuroscience* 28(2): 407–14. doi:10.1523/JNEUROSCI.4458-07.2008.

Land, Benjamin B., Michael R. Bruchas, Selena Schattauer, William J. Giardino, Megumi Aita, Daniel Messinger, Thomas S. Hnasko, Richard D. Palmiter, i Charles Chavkin. 2009. „Activation of the kappa opioid receptor in the dorsal raphe nucleus mediates the aversive effects of stress and reinstates drug seeking". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 19168–73. doi:10.1073/pnas.0910705106.

Le Merrer, Julie, Ainhoa Plaza-Zabala, Carolina Del Boca, Audrey Matifas, Rafael Maldonado, i Brigitte L. Kieffer. 2011. „Deletion of the δ Opioid Receptor Gene Impairs Place Conditioning but Preserves Morphine Reinforcement". *Biological*

Psychiatry 69: 700–703. doi:10.1016/j.biopsych.2010.10.021.

Longland, William S. i Price, Mary V. 1991. „Direct Observations of Owls and Heteromyid Rodents: Can Predation Risk Explain Microhabitat Use?" *Ecology*. 72, 6: 2261–73. doi: 10.2307/1941576.

Lutz, Pierre-Eric, i Brigitte L. Kieffer. 2013. „Opioid receptors: distinct roles in mood disorders". *Trends in neurosciences* 36(3): 195–206. doi:10.1016/j.tins.2012.11.002.

Maeng, Lisa Y., i Mohammed R. Milad. 2015. „Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones". *Hormones and Behavior* 76: 106–17. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.04.002.

Mansour, Alfred, Henry Khachaturian, Michael E. Lewis, Huda Akil, i Stanley J. Watson. 1988. „Anatomy of CNS opioid receptors". *Trends in Neurosciences* 11(7): 308–14. doi:10.1016/0166-2236(88)90093-8.

Martin, William R., C. G. Eades, Thompson, Jennifer A., R. E. Huppler, i Gilbert, Paul E. 1976. „The Effects of Morphine- and Nalorphine- like Drugs in the Nondependent and Morphine-Dependent Chronic Spinal Dog". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 197: 517–32.

Marx, Jean L. 1983. „Synthesizing the Opioid Peptides". *Science (New York, N.Y.)* 220: 395–97. doi:10.1126/science.6836282.

McLaughlin, Jay P, Shuang Li, Joseph Valdez, Theodore A Chavkin, i Charles Chavkin. 2006. „Social Defeat Stress-Induced Behavioral Responses are Mediated by the Endogenous Kappa Opioid System". *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31: 1241–48. doi:10.1038/sj.npp.1300872.

Meier, Isabell M., Marie Eikemo, i Siri Leknes. 2021. „The Role of Mu-Opioids for Reward and Threat Processing in Humans: Bridging the Gap from Preclinical to Clinical Opioid Drug Studies". *Current Addiction Reports* 8: 306–18.

doi:10.1007/s40429-021-00366-8.

Nishizawa, Sadahiko, Benkelfat, Chawki, Young, Simon N., Leyton, Marco, Mzengeza, Shadrek, de Montigny, Charles, Blier, Pierre i Diksic, Mirko. 1997. „Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 5308–13. doi: 10.1073/pnas.94.10.5308

Nummenmaa, Lauri, Tomi Karjalainen, Janne Isojärvi, Tatu Kantonen, Jouni Tuisku, Valtteri Kaasinen, Juho Joutsa, i in. 2020. „Lowered endogenous mu-opioid receptor availability in subclinical depression and anxiety". *Neuropsychopharmacology* 45: 1953–59. doi:10.1038/s41386-020-0725-9.

Olmstead, Mary C., Abdel-Mouttalib Ouagazzal, i Brigitte L. Kieffer. 2009. „Mu and Delta Opioid Receptors Oppositely Regulate Motor Impulsivity in the Signaled Nose Poke Task". *PLoS ONE* 4: e4410. doi:10.1371/journal.pone.0004410.

Olson, Keith M., Todd M. Hillhouse, Gwendolyn E. Burgess, Joshua L. West, James E. Hallahan, Isaac J. Dripps, Allison G. Ladetto, i in. 2023. „Delta Opioid Receptor-Mediated Antidepressant-Like Effects of Diprenorphine in Mice". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 384: 343–52. doi:10.1124/jpet.122.001182.

Papp, Mariusz, Paul Willner, i Richard Muscat. 1991. „An Animal Model of Anhedonia: Attenuation of Sucrose Consumption and Place Preference Conditioning by Chronic Unpredictable Mild Stress". *Psychopharmacology* 104: 255–59. doi:10.1007/BF02244188.

Pert, Candace B., i Solomon H. Snyder. 1973. „Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue". *Science* 179: 1011–14. doi:10.1126/science.179.4077.1011.

Pomrenze, Matthew B., Daniel F. Cardozo Pinto, Peter A. Neumann, Pierre Llorach, Jason M. Tucciarone, Wade Morishita, Neir Eshel, Boris D. Heifets, i Robert C. Malenka. 2022. „Modulation of 5-HT Release by Dynorphin Mediates Social Deficits

during Opioid Withdrawal". *Neuron* 110: 4125-4143.e6. doi:10.1016/j.neuron.2022.09.024.

PubChem. „Pdyn - Prodynorphin (House Mouse)". https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/Pdyn/mouse (dostęp: 22 września 2024).

Reed, Brian, Eduardo R. Butelman, i Mary Jeanne Kreek. 2022. „Kappa Opioid Receptor Antagonists as Potential Therapeutics for Mood and Substance Use Disorders". *Handbook of Experimental Pharmacology* 271: 473–91. doi:10.1007/164_2020_401.

Robles, Cindee F., Marissa Z. McMackin, Katharine L. Campi, Ian E. Doig, Elizabeth Y. Takahashi, Michael C. Pride, i Brian C. Trainor. 2014. „Effects of kappa opioid receptors on conditioned place aversion and social interaction in males and females". *Behavioural Brain Research* 262: 84–93. doi:10.1016/j.bbr.2014.01.003.

Roman, Erika, i Lotta Arborelius. 2009. „Male but Not Female Wistar Rats Show Increased Anxiety-like Behaviour in Response to Bright Light in the Defensive Withdrawal Test". *Behavioural Brain Research* 202: 303–7. doi:10.1016/j.bbr.2009.04.019.

Rubinow, David R., Schmidt, Peter J. i Roca, Catherine A. 1998. „Estrogen-Serotonin Interactions: Implications for Affective Regulation". *Biological Psychiatry* 44: 839–50. doi:10.1016/s0006-3223(98)00162-0.

Sakamoto, Kazuhiro, Tatsuya Okahashi, Shigenobu Matsumura, Yoko Okafuji, Shin-ichi Adachi, Satoshi Tsuzuki, Kazuo Inoue, i Tohru Fushiki. 2015. „The opioid system majorly contributes to preference for fat emulsions but not sucrose solutions in mice". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 79: 658–63. doi:10.1080/09168451.2014.991688.

Schmidt, Mark E., Iva Kezic, Vanina Popova, Rama Melkote, Peter Van Der Ark, Darrel J. Pemberton, Guy Mareels, i in. 2024. „Efficacy and Safety of Aticaprant, a Kappa Receptor Antagonist, Adjunctive to Oral SSRI/SNRI Antidepressant in Major

Depressive Disorder: Results of a Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study". *Neuropsychopharmacology* 49(9): 1437–47. doi:10.1038/s41386-024-01862-x.

Schwazer, Christoph. 2009. „30 Years of Dynorphins – New Insights on Their Functions in Neuropsychiatric Diseases". *Pharmacology & therapeutics* 123: 353–70. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.05.006.

Shippenberg, T. S., i A. Herz. 1986. „Differential Effects of Mu and Kappa Opioid Systems on Motivational Processes". *NIDA research monograph* 75: 563–66.
Simon, P., R. Dupuis, i J. Costentin. 1994. „Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions". *Behavioural Brain Research* 61(1): 59–64. doi:10.1016/0166-4328(94)90008-6.

Simonin, Frederic C., Gavériaux-Ruff, K Befort, H Matthes, B Lannes, G Micheletti, M G Mattéi, i in. 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: 7006–10.

Sinenko, Sergey A., Andrey A. Kuzmin, Elena V. Skvortsova, Sergey V. Ponomartsev, Evgeniya V. Efimova, Michael Bader, Natalia Alenina, i Alexey N. Tomilin. 2023. „Tryptophan Hydroxylase-2-Mediated Serotonin Biosynthesis Suppresses Cell Reprogramming into Pluripotent State". *International Journal of Molecular Sciences* 24: 4862. doi:10.3390/ijms24054862.

Stevens, Craig W. 2009. „The evolution of vertebrate opioid receptors". *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 14: 1247–69.

Sundaramurthy, Santhanalakshmi, Balasubramaniam Annamalai, Devadoss J. Samuvel, Toni S. Shippenberg, Lankupalle D. Jayanthi, i Sammanda Ramamoorthy. 2017. „Modulation of Serotonin 1Transporter Function by kappa-Opioid Receptor Ligands". *Neuropharmacology* 113: 281–92. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.10.011.

Takayo, Keizo i Miyakawa, Tsuyoshi. 2006. „Light/dark Transition Test for Mice”. Journal of visualized experiments : JoVE ,1 104. doi:10.3791/104

Taylor, Anna M. W., Caylin I. Chadwick, Sadaf Mehrabani, Haley Hrncir, Arthur P. Arnold, i Christopher J. Evans. 2022. „Sex Differences in Kappa Opioid Receptor Antinociception Is Influenced by the Number of X Chromosomes in Mouse”. *Journal of Neuroscience Research* 100(1): 183–90. doi:10.1002/jnr.24704.

Tejeda, H. A., T. S. Shippenberg, i R. Henriksson. 2012. „The Dynorphin/κ-Opioid Receptor System and Its Role in Psychiatric Disorders”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(6): 857–96. doi:10.1007/s00018-011-0844-x.

Tkaczynski, John A., Olga Borodovitsyna, i Daniel J. Chandler. 2022. „Delta Opioid Receptors and Enkephalinergic Signaling within Locus Coeruleus Promote Stress Resilience”. *Brain Sciences* 12(7): 860. doi:10.3390/brainsci12070860.

Van’t Veer, Ashlee, Anita J. Bechtholt, Sara Onvani, David Potter, Yujun Wang, Lee-Yuan Liu-Chen, Günther Schütz, i in. 2013. „Ablation of Kappa-Opioid Receptors from Brain Dopamine Neurons Has Anxiolytic-Like Effects and Enhances Cocaine-Induced Plasticity”. *Neuropsychopharmacology* 38(8): 1585–97. doi:10.1038/npp.2013.58.

Van’t Veer, Ashlee, i William A. Carlezon. 2013. „Role of Kappa-Opioid Receptors in Stress and Anxiety-Related Behavior”. *Psychopharmacology* 229: 435–52. doi:10.1007/s00213-013-3195-5.

Varastehmoradi, Bardia, Karen L. Smith, Heidi Kaastrup Müller, Betina Elfving, Connie Sanchez, i Gregers Wegener. 2023. „Kappa opioid activation changes protein profiles in different regions of the brain relevant to depression”. *European Neuropsychopharmacology* 72: 9–17. doi:10.1016/j.euroneuro.2023.03.010.

Vijay, Aishwarya, Shuo Wang, Patrick Worhunsky, Ming-Qiang Zheng, Nabeel Nabulsi, Jim Ropchan, Suchitra Krishnan-Sarin, Yiyun Huang, i Evan D. Morris. 2016. „PET imaging reveals sex differences in kappa opioid receptor availability in humans, in vivo”. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 6: 205–14.

Walther, Diego J., Jens-Uwe Peter, Saleh Bashammakh, Heide Hörtnagl, Mechthild Voits, Heidrun Fink, i Michael Bader. 2003. „Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform". *Science (New York, N.Y.)* 299: 76. doi:10.1126/science.1078197.

Weber, Tillmann, Gerald Böhm, Elke Hermann, Günther Schütz, Kai Schönig, i Dusan Bartsch. 2009. „Inducible Gene Manipulations in Serotonergic Neurons". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2: 24. doi:10.3389/neuro.02.024.2009.

Wei, Shoupeng, Sarah Hertle, Rainer Spanagel, i Ainhoa Bilbao. 2021. „Female Mice Are More Prone to Develop an Addictive-like Phenotype for Sugar Consumption". *Scientific Reports* 11: 7364. doi:10.1038/s41598-021-86797-9.

Werling, L. L., S. R. Brown, i B. M. Cox. 1987. „Opioid Receptor Regulation of the Release of Norepinephrine in Brain". *Neuropharmacology* 26(7B): 987–96. doi:10.1016/0028-390890077-3.

West, Alyssa M., Katherine M. Holleran, i Sara R. Jones. 2023. „Kappa Opioid Receptors Reduce Serotonin Uptake and Escitalopram Efficacy in the Mouse Substantia Nigra Pars Reticulata". *International Journal of Molecular Sciences* 24: 2080. doi:10.3390/ijms24032080.

Wong, Sabrina, Gia Han Le, Shreya Vasudeva, Kayla M. Teopiz, Lee Phan, Shakila Meshkat, Angela T. H. Kwan, i in. 2024. „Preclinical and clinical efficacy of kappa opioid receptor antagonists for depression: A systematic review". *Journal of Affective Disorders* 362: 816–27. doi:10.1016/j.jad.2024.07.030.

Wright, Emily C., Tiffany V. Parks, Jonathon O. Alexander, Rajesh Supra, i Brian C. Trainor. 2018. „Activation of Kappa Opioid Receptors in the Dorsal Raphe Have Sex Dependent Effects on Social Behavior in California Mice". *Behavioural brain research* 351: 83–92. doi:10.1016/j.bbr.2018.05.011.

Wu, Xiaoting, Wade Morishita, Kevin T. Beier, Boris D. Heifets, i Robert C. Malenka.

2021. „5-HT modulation of a medial septal circuit tunes social memory stability”. *Nature* 599: 96–101. doi:10.1038/s41586-021-03956-8.

Xu, Jihong, Fang Chen, Shuyan Wang, Nicholas S. Akins, Md Imran Hossain, Yi Zhou, Jinxi Huang, i in. 2020. „Kappa opioid receptors internalization is protective against oxygen-glucose deprivation through β-arrestin activation and Akt-mediated signaling pathway”. *Neurochemistry International* 137: 104748. doi:10.1016/j.neuint.2020.104748.

Yuferov, Vadim, David Fussell, K. Steven LaForge, David A. Nielsen, Derek Gordon, Ann Ho, Suzanne M. Leal, Jurg Ott, i Mary Jeanne Kreek. 2004. „Redefinition of the human kappa opioid receptor gene (OPRK1) structure and association of haplotypes with opiate addiction”. *Pharmacogenetics* 14: 793–804. doi: 10.1097/00008571-200412000-00002