

15. Carmichael MS, Humbert R, Dixen J, Palmisano G, Greenleaf W, Davidson JM. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. *J. Clin. Endocrinol Metab* 1987, 64, 27–31.
16. Light, K. C., Grewen, K. M., Amico, J. A. More frequent partner hugs and higher oxytocin levels are linked to lower blood pressure and heart rate in premenopausal women. *Biol. Psychol.* 2005, 69, 5–21.
17. Miller, S., C., Kennedy, C., Devoe, D., Hickey, M., Nelson, T., Kogan, L. An Examination of changes in oxytocin levels in men and women before and after interaction with a bonded dog. *Anthrozoös* 2009, 22, 31–42
18. Uvnäs-Moberg, K. Massage, relaxation and well-being: a possible role for oxytocin as an integrative principle?, in *Touch and Massage in Early Child Development*, ed. T. Field (Calverton, NY: Johnson & Johnson Pediatric Institute) 2004
19. Lupoli B, Johansson B, Uvnäs-Moberg K, Svennersten-Sjaunja K. Effect of suckling on the release of oxytocin, prolactin, cortisol, gastrin, cholecystokinin, somatostatin and insulin in dairy cows and their calves. *J Dairy Res.* 2001, 68, 175–187.
20. Ohlsson B, Forsling ML, Rehfeld JF, Sjölund K. Cholecystokinin stimulation leads to increased oxytocin secretion in women. *Eur J Surg.* 2002, 168, 114–118
21. Boyd R, Gintis H, Bowles S, Richerson PJ. The evolution of altruistic punishment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100, 3531–3535.
22. de Quervain DJ, Fischbacher U, Treyer V, Schellhammer M, Schnyder U, Buck A, Fehr E. The neural basis of altruistic punishment. *Science.* 2004, 305, 1254–1258.
23. Spitzer M., Fischbacher U, Herrnberger B, Grön G, Fehr E. The neural signature of social norm compliance. *Neuron.* 2007, 56, 185–196.

Prof. dr hab. Jerzy Vetulani jest profesorem w Małopolskiej Szkole Wyższej im. J. Dietla i w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. E-mail: nfvetula@cyfronet.pl



ZWIERZĘCE MODELE UZALEŻNIENIA OD ALKOHOLU

Zofia Mijakowska i Katarzyna Radwańska (Warszawa)

Streszczenie

Do niedawna większość badań nad biologicznym podłożem uzależnień prowadzonych na zwierzętach skupiała się na jednym, wybranym aspekcie zachowania związanego z zażywaniem substancji uzależniającej. W ostatnich latach pojawiły się dwa kompleksowe, tzn. uwzględniające różne aspekty choroby, zwierzęce modele uzależnienia. W pracy tej wyjaśniamy, z czego wynika konieczność stosowania modeli zwierzęcych w badaniach nad biologicznymi przyczynami chorób psychicznych. Następnie przedstawiamy podstawowe informacje na temat tradycyjnych metod badania mózgowego podłoża zachowań związanych z uzależnieniem na zwierzętach. Potem omawiamy kompleksowe modele uzależnień, w tym model stosowany w naszym laboratorium. Na koniec przedstawiamy wyniki prowadzonych przy użyciu tego modelu badań eksperymentalnych nad biologicznym podłożem uzależnienia od alkoholu.

Abstract

Until recently, most animal models of addiction focused on one particular aspect of addiction-like behavior. Lately, two complex, i.e. taking into consideration several aspects of the disease, animal models of addiction

were developed. In this paper, we explain the necessity of using animal models in search for biological causes of psychiatric disease. Next, we provide basic information on traditional methods used in animal research on the brain basis of addiction. Later, we describe complex animal models of addiction, including the one used in our laboratory. Finally, we present experimental findings concerning biological basis of alcohol addiction gathered using this model.

Wprowadzenie

Gdy tylko w klatce nastanie mrok, myszy budzą się i rozpoczynają swoje codzienne zajęcia. Mysz numer 1 zaraz po przebudzeniu biegnie do przedziału klatki, w którym przez ostatnie dwa miesiące znajdowała butelkę z alkoholem. Próbuje, tak jak zawsze, otworzyć nosem drzwi prowadzące do butelki. Jednak nic z tego. Tym razem drzwi ani drgną. Mysz nie poddaje się. Stuka w drzwi jeszcze kilkadziesiąt razy. Drzwi pozostają zamknięte. Mysz wybiega z przedziału alkoholowego i biega w kółko po przestrzeni mieszkalnej, w której jej towarzyszki właśnie jedzą śniadanie. Co pewien czas energicznie rozgrzebuje wiórki, jakby czegoś szukając. Potem wraca do przedziału z alkoholem i znów próbuje otworzyć drzwi. Tego samego dnia ponawia próbę otwarcia drzwi kilkaset razy.

Mysz numer 2 również zaczyna dzień od wizyty w przedziale klatki, w którym wcześniej piła alkohol. Tak samo jak mysz nr 1, próbuje otworzyć drzwi. Jednak gdy okazuje się to niemożliwe, wychodzi i razem ze swoimi towarzyszkami spokojnie zjada śniadanie. W ciągu dnia wraca jeszcze kilka razy do miejsca z alkoholem, ale za każdym razem szybko z niego wychodzi, zorientowawszy się, że drzwi są nadal zamknięte. Myszy 1 i 2 są prawie identyczne pod względem genetycznym i były poddane takim samym zabiegom eksperymentalnym. Co więc je różni? Dlaczego jedna z nich nie może się pogodzić z tym, że zabrano jej alkohol, a druga wykazuje względną obojętność wobec tego faktu?

Opisane tu zachowania myszy są wiernym, choć zbeletryzowanym i zantropomorfizowanym przedstawieniem obserwacji dokonanych przez autorki niniejszego artykułu (11, 15). Badania prowadzone przez nas w Laboratorium Molekularnych Podstaw Zachowania Instytutu im. M. Nenckiego PAN służą wyjaśnieniu biologicznego podłoża uzależnienia od alkoholu. Opisane tu różnice w zachowaniu myszy są modelem różnic pomiędzy ludźmi. Metoda stosowana w naszym laboratorium jest nowatorska i unikalna w skali światowej. Jakich odkryć udało nam się dokonać przy użyciu tej metody? Zanim odpowiemy na to pytanie, zastanowimy się, z czego

wynika konieczność stosowania modeli zwierzęcych w badaniach nad chorobami psychicznymi, w tym uzależnieniami. Przedstawimy też podstawowe informacje na temat tradycyjnych metod badania biologicznego podłoża zachowań związanych z uzależnieniem na zwierzętach.

Do czego służą zwierzęce modele chorób psychicznych?

Aby zbadać biologiczne podłoże jakiejś choroby psychicznej, można oczywiście porównać mózgi zmarłych cierpiących na tę chorobę z mózgami ludzi zdrowych. Takie badania są prowadzone od dawna i przyniosły wiele ciekawych wyników. Nie dają one jednak definitywnych odpowiedzi na temat związków przyczynowo-skutkowych. Dlaczego? Posłużmy się tu przykładem alkoholizmu. Osoby, które zmarły po wielu latach nadużywania alkoholu, często także źle się odżywiały. Niektóre zmiany obserwowane w ich mózgach wynikają zatem nie z nadużywania alkoholu, ale z braku witamin czy substancji odżywczych. Nie ma sposobu na odróżnienie jednych od drugich. Eksperymenty na zwierzętach pozwalają natomiast na testowanie hipotez dotyczących roli jednego, konkretnego czynnika w badanym zjawisku. Dodatkową zaletą eksperymentów na zwierzętach w porównaniu z badaniami na ludziach jest możliwość zastosowania wielu technik eksperymentalnych, których ze względów etycznych bądź praktycznych nie można zastosować na ludziach.

Tradycyjne zwierzęce modele uzależnień

Do niedawna większość badań nad biologicznym podłożem uzależnień prowadzonych na zwierzętach skupiała się na jednym, wybranym aspekcie zachowania związanego z zażywaniem substancji uzależniającej. Jakże były to aspekty i jak je badano? Posłużmy się tu przykładem nabywania preferencji miejsca skojarzonego z tymi środkami. Co to znaczy? Każdy z nas lubi wracać do miejsc, w których przydarzyło mu się coś przyjemnego. Kojarzenie zdarzeń emocjonalnych z miejscami jest niewątpliwie przydatne, ale ma także ciemną stronę. Na przykład alkoholicy, którym udało się na jakiś czas odstawić alkohol,

często wracają do picia, gdy znajdują się w miejscu, które kojarzy im się z alkoholem (12). Dlatego w poznaniu neuronalnego podłoża procesów kojarzenia miejsc z doznaniem wywołanym przez alkohol i inne środki uzależniające uczeni upatrują szansy na opracowanie lepszych leków zapobiegających nawrotom. Powstawanie skojarzeń pomiędzy substancją a miejscem, w którym substancja ta była przyjmowana, można stosunkowo łatwo zbadać na gryzoniach za pomocą specjalnie skonstruowanej klatki, podzielonej na przedziały (4). Klatka ta pozwala na sprawdzenie, czy zwierzę chętniej przebywa w tym przedziale, w którym wcześniej otrzymało substancję.

Neurobiolodzy starają się odpowiedzieć na pytanie, od jakich struktur mózgu zależy to zachowanie. W tym celu blokują działanie wybranej struktury, na przykład za pomocą środków farmakologicznych, i sprawdzają, czy zwierzęta po takim zabiegu nabywają preferencję miejsca skojarzonego z substancją tak samo łatwo, jak zwierzęta kontrolne. W ten sposób wykazano na przykład, że niebagatelną rolę w procesie kojarzenia miejsc z kokainą czy morfiną pełni struktura mózgu zwana hipokampem (7, 10). Neurobiolodzy szukają także odpowiedzi na pytanie, od jakich procesów molekularnych zależy nabywanie preferencji miejsca. W tym celu na przykład tworzą zwierzęta modyfikowane genetycznie pozbawione wybranego genu, podejrzanego o udział w regulacji tego zachowania, i sprawdzają, czy zwierzęta te nabywają preferencję miejsca skojarzonego ze środkiem uzależniającym szybciej lub wolniej niż zwierzęta kontrolne (6).

Uzależnienie to jednak o wiele więcej niż zbiór pojedynczych zachowań związanych z działaniem substancji, jak preferencja miejsca skojarzonego z alkoholem. W następnych paragrafach rozważymy, czym jest uzależnienie u ludzi oraz odpowiemy na pytanie, czy można modelować to zjawisko na zwierzętach w całej jego złożoności.

Czym jest uzależnienie?

Co to znaczy, że ktoś się uzależnił? Opinia psychiatrów na ten temat istotnie zmieniła się w ciągu ostatnich trzydziestu lat (1, 14). Kiedyś uważano, że najważniejsze objawy uzależnienia to tolerancja (potrzeba przyjmowania wyraźnie zwiększających się ilości substancji w celu osiągnięcia pożądanego skutku) oraz zespół abstynencyjny (nieprzyjemne objawy odstawienia). Dziś przyjmuje się, że objawy te mogą,

ale nie muszą wystąpić u osoby uzależnionej. Obecnie za najważniejsze kryteria uzależnienia uznaje się utratę kontroli nad spożywaniem substancji oraz negatywny wpływ zażywania substancji na inne aspekty życia. Człowiek uzależniony od alkoholu chciałby przestać pić albo ograniczyć picie, ale nie może. Zaniedbuje przez to rodzinę, pracę, popada w prawne tarapaty. Pełna lista kryteriów stosowanych obecnie przez psychiatrów przy diagnozowaniu zaburzeń związanych z zażywaniem substancji przedstawiona jest w Tabeli 1.

Ważną cechą uzależnienia, o której muszą pamiętać neurobiolodzy zajmujący się modelowaniem tego procesu na zwierzętach, jest też czas potrzebny do jego wykształcenia. U ludzi uzależnienia rozwijają się stopniowo, często przez wiele lat. Według zaproponowanego niedawno przez francuskich badaczy modelu uzależnienia, Piera Vincenzo Piazzę i Véronique Derroche-Gamonet, proces ten jest trzystopniowy (14). Najpierw człowiek zażywa substancję w celach rekreacyjnych, sporadycznie. Następnie zaczyna zażywać regularnie większe ilości, ale ciągle jeszcze kontroluje spożycie i jest w stanie sprostać obowiązkom życiowym. Dopiero na trzecim etapie traci kontrolę nad spożyciem substancji. Zdobywanie i zażywanie substancji zaczynają dominować nad wszystkimi innymi aspektami życia. Wtedy człowiek staje się w pełni uzależniony. Schemat ten może być bardzo pomocny przy konstrukcji i ocenie zwierzęcych modeli uzależnień. Przed przystąpieniem do badań z zastosowaniem jakiegoś modelu badacze zawsze powinni najpierw odpowiedzieć sobie na pytanie, który etap rozwoju uzależnienia ich model reprezentuje.

Przedstawiony schemat rozwoju uzależnienia nasuwa pytanie, czy następstwo faz rozwoju uzależnienia jest nieuniknione? Innymi słowy – czy każdy, kto zaczyna nadużywać jakiejś substancji skazany jest na uzależnienie?

Czy wystarczy nadużywać, aby się uzależnić?

W cywilizacji zachodniej ogromna większość ludzi pije alkohol. W USA 87% osób powyżej 18 roku życia przynajmniej raz próbowało tej substancji¹. Wśród amerykańskiej młodzieży w wieku studenckim aż 30–40% miewa epizody picia na umór (ang. *binge drinking*, definiowane jako wypicie pięciu lub więcej drinków przy jednej okazji). Jednak tylko niewielka część osób pijących, a nawet nadużywających alkoholu, uzależnia się od tej substancji. Kryteria

¹ Dane pochodzą ze strony internetowej Narodowego Instytutu Zdrowia w USA: <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/alcohol-facts-and-statistics>

uzależnienia od alkoholu spełnia zaledwie 7% dorosłych Amerykanów. Zatem samo picie czy naduży-

Większość kryteriów uzależnienia u człowieka odnosi się do subiektywnego poczucia utraty kontro-

Tabela 1. Objawy uzależnienia od substancji według klasyfikacji zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego, DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Fifth Edition, DSM-V)(1)

Objawy	Diagnoza
Powtarzające się zażywanie substancji powodujące zaniedbywanie ważnych obowiązków	zaburzenia spowodowane używaniem alkoholu łagodne: 2-3 objawy umiarkowane: 4-5 objawów ciężkie: ≥ 6 objawów
Ponawiające się zażywanie substancji w sytuacjach, kiedy może to stworzyć zagrożenie fizyczne	
Powtarzające się problemy natury prawnej związane z zażywaniem substancji	
Niezaprzymanie zażywania substancji pomimo ciągłych lub nawracających problemów interpersonalnych	
Tolerancja	
Zespół abstynencyjny	
Częste zażywanie substancji w większych dawkach i przez dłuższy okres, niż było to zamierzone	
Utrzymujące się pragnienie lub bezskuteczne wysiłki, by kontrolować zażywanie substancji	
Głód substancji	
Poświęcanie dużej ilości czasu na aktywność niezbędną do uzyskania, spożywania lub niwelowania skutków zażywania substancji	
Zaprzestanie lub ograniczenie z powodu zażywania substancji ważnych aktywności społecznych, zawodowych lub rekreacyjnych	
Kontynuacja zażywania substancji mimo świadomości problemów somatycznych i psychicznych, spowodowanych lub pogłębionych przez jej działanie	

wanie alkoholu nie wystarczy, żeby się uzależnić. Potrzeba czegoś więcej. Tylko czego?

Odpowiedzi na to pytanie naukowcy poszukują od dawna. Może ona leżeć w czynnikach zewnętrznych, takich jak na przykład stres (17) albo wewnętrznych, związanych z samą osobą uzależnioną. Czynniki zewnętrznymi nie będziemy się tu zajmować, ponieważ temat ten wykracza poza ramy niniejszego artykułu. Interesują nas czynniki wewnętrzne. Czynniki te można podzielić na dwie główne grupy. Pierwsza grupa to różnice w podatności na uzależnienie, genetyczne czy temperamentalne, występujące jeszcze zanim człowiek się uzależni. Zgromadzono na ten temat bardzo wiele danych (13, 18). Druga grupa czynników wewnętrznych to różnice w tym, jakie zmiany powstają w mózgu pod wpływem długotrwałego przyjmowania substancji uzależniających. W pełni kontrolowane badania nad tymi różnicami nie są oczywiście możliwe do przeprowadzenia na ludziach. Aby zbadać te zmiany w sposób eksperymentalny, należy posłużyć się modelem zwierzęcym. Uzależnienie jest jednak zjawiskiem bardzo złożonym. Czy zatem możliwe jest modelowanie uzależnienia na zwierzętach w całej jego złożoności, z uwzględnieniem różnic indywidualnych?

li nad spożywaniem substancji albo do pogorszenia funkcjonowania społecznego osoby uzależnionej. W związku z tym niemożliwe jest opracowanie zwierzęcego modelu uzależnienia, który w pełni oddawałby istotę tego zaburzenia (16). Istnieją jednak kryteria uzależnienia, które można z powodzeniem modelować na zwierzętach. Do cech takich należy motywacja do poszukiwania substancji uzależniającej, gdy dostęp do niej jest uniemożliwiony lub utrudniony, lub spożycie substancji mimo negatywnych konsekwencji. Opracowano dwa modele zwierzęce, które biorą pod uwagę różne aspekty uzależnienia (5, 11, 15). Takie modele będziemy dalej nazywać kompleksowymi modelami uzależnień.

Kompleksowe modele uzależnień

Czym różni się kompleksowy model uzależnienia od tradycyjnych metod modelowania uzależnień na zwierzętach? Po pierwsze, postuluje się, że taki model powinien mierzyć nie jedną, a kilka cech związanych z uzależnieniem obserwowanych u ludzi (14, 16). Po drugie, jak wspomniano wcześniej, tylko u niewielkiej części osób przyjmujących substancje psychoaktywne wykształca się uzależnienie. Model kompleksowy powinien więc pozwalać na pomiar

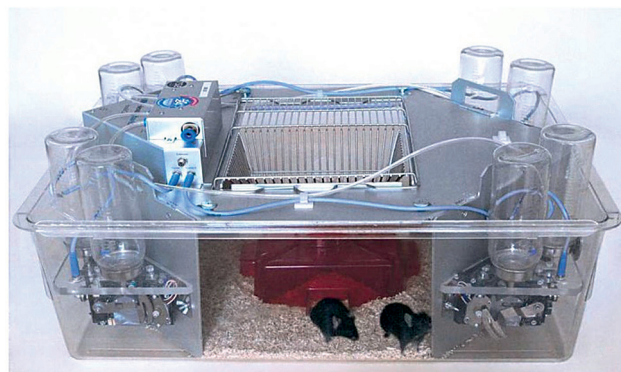
różnic indywidualnych w zachowaniach związanych z uzależnieniem i wyróżnienie grupy zwierząt, które utraciły kontrolę nad spożywaniem substancji. Obserwacja rozwoju uzależnienia u ludzi wskazuje ponadto, że jest to proces długotrwały. Podkreśla się zatem także, że w całościowym modelu uzależnienia zwierzęta powinny mieć dostęp do substancji uzależniającej przez dłuższy czas (14).

Pierwszy kompleksowy model uzależnienia opracowali w 2004 wspomniani już wcześniej badacze, Deroche-Gamonet i Piazza (5). Pozwolili oni grupie szczurów zażywać kokainę przez trzy miesiące. Po tym czasie zmierzili zachowania związane z uzależnieniem: motywację, wytrwałość w poszukiwaniu kokainy, przyjmowanie narkotyku mimo negatywnych konsekwencji (delikatnego rażenia prądem). Okazało się, że wszystkie te cechy korelują ze sobą. Znaczy to, że im wyższy wynik osiągnął dany szczur w jednej skali, tym większe miał szanse na osiągnięcie wysokiego wyniku także w pozostałych skalach. Następny krok polegał na wyróżnieniu grupy szczurów, które spełniają wszystkie trzy badane kryteria uzależnień: wykazują wysoką motywację, wytrwałość, oraz przyjmują kokainę mimo negatywnych konsekwencji. Przyjęto, że zwierzę spełnia dane kryterium, jeśli jego wynik w teście należy do 33% najwyższych. Okazało się, że 17% szczurów spełnia wszystkie wymienione kryteria. Wskaźnik ten jest podobny do wskaźnika uzależnienia od kokainy wśród osób używających tej substancji (15%), co uznano za potwierdzenie trafności modelu.

Pierwszy kompleksowy model uzależnienia od alkoholu został opracowany przez dr hab. Katarzynę Radwańską i prof. Leszka Kaczmarka w 2012 roku (11, 15). Model ten wykorzystuje klatki IntelliCage (Ryc. 1). Klatki te są w pełni zautomatyzowane. Ich unikalność polega na tym, że pozwalają na prowadzenie bardzo długich eksperymentów na myszach żyjących w grupie prawie bez ingerencji eksperymentatora. Klatka IntelliCage służy jednocześnie za mieszkanie dla myszy, jak i urządzenie, w którym można przeprowadzać rozmaite testy mierzące skomplikowane zachowania zwierząt. Jak to możliwe? Każda z myszy ma pod skórą mikroczip służący do identyfikacji. Urządzenia takie stosuje się także do identyfikacji zwierząt domowych lub hodowlanych. W rogach klatki wydzielone są specjalne pomieszczenia (zwane dalej po prostu „rogami”), w których znajdują się anteny odbierające sygnał z mikroczipów. W rogach znajdują się także butelki z płynem. Dostęp do butelek ograniczony jest drzwiczkami. Drzwiczki otwierają się, gdy mysz stuknie w nie nosem. Można je jednak zaprogramować tak, aby otwierały się

dopiero po wykonaniu przez mysz określonej liczby uderzeń nosem (tzw. nosopuków). Komputer, do którego podłączona jest klatka, automatycznie rejestruje wszystkie wizyty myszy w rogu, nosopuki oraz liżnięcia z butelki.

A. Klatka IntelliCage

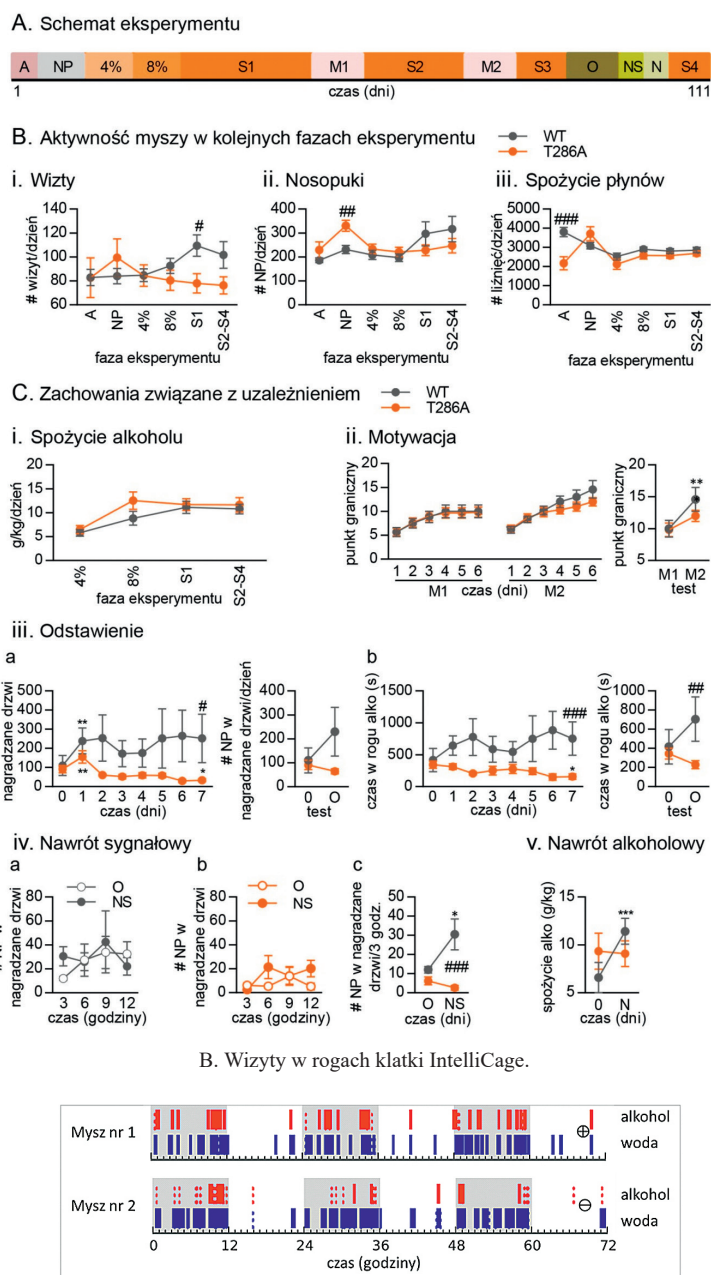


B. Róg klatki IntelliCage



Ryc. 1. Automatyczne klatki IntelliCage.

Rycina 2 przedstawia schemat prowadzonych przez nas eksperymentów. W stosowanym przez nas modelu zwierzęta, po okresie adaptacji do klatki (A), mają swobodny dostęp do alkoholu przez trzy miesiące (okres S1). W czasie swobodnego dostępu do alkoholu za każdym razem, gdy mysz wejdzie do rogu alkoholowego, zapala się w nim światło. Światło to nazywamy „bodźcem/sygnałem skojarzonym z alkoholem”. W ostatnim miesiącu dostęp do alkoholu jest przerywany testami mierzącymi następujące cechy związane z uzależnieniem: motywację do poszukiwania alkoholu (gdy dostęp do niego jest utrudniony, testy M1 i M2), reakcję na odstawienie alkoholu (O), nawrót poszukiwania alkoholu wywołany przez bodziec skojarzony z alkoholem (test NS) oraz nawrót spożywania alkoholu po okresie odstawienia (test N). Ryc. 2 pokazuje reakcje dwóch myszy opisanych w początkowych akapitach tego artykułu w czasie testu na motywację. Każda czerwona pionowa linia oznacza jedną wizytę w rogu z alkoholem, niebieska w rogu z wodą. Gdy mysz piła



Ryc. 2. A. Schemat doświadczenia w klatce IntelliCage. B. Wizyty w rogach klatki IntelliCage w czasie testu na motywację. Kolor czerwony symbolizuje wizyty w rogu z alkoholem, kolor niebieski w rogu z wodą. Szare pola to noc. Myszy, jako zwierzęta nocne, śpią w dzień, a wizytują rogi klatki w nocy.

w czasie wizyty linia jest ciągła, jeśli nie piła użyto linii przerywanych. Proszę zwrócić uwagę, że mysz 1 wykonywała o wiele więcej wizyt do rogu z alkoholem niż mysz 2. W czasie większości wizyt piła alkohol. Na podstawie wyników przeprowadzonych testów wyróżnia się grupy myszy o największym i najmniejszym nasileniu cech związanych z uzależnieniem (zwanych dalej, odpowiednio, „uzależnionymi” i „nieuzależnionymi”).

Na czym polegają i co mierzą wymienione testy?

Jednym z kryteriów uzależnienia jest poświęcanie dużej ilości czasu na aktywność niezbędną do uzyskania środka uzależniającego. Tę właśnie cechę można modelować za pomocą testu na motywację. W teście tym liczba nosopuków w drzwi alkoholowe, które zwierzę musi wykonać w celu otrzymania jednej porcji alkoholu, rośnie w czasie. Miara motywacji jest liczba reakcji, przy której zwierzę rezygnuje z dalszego wysiłku, tzw. punkt graniczny (ang. *breakpoint*). Stosując test odstawienia badamy natomiast

wytrwałość w poszukiwaniu substancji, gdy dostęp do niej jest uniemożliwiony. W teście tym drzwi do alkoholu są zamknięte. Światło sygnalizujące dostęp do alkoholu jest wyłączone. Miara poszukiwania alkoholu jest znowu liczba nosopuków w drzwi alkoholowe. Test nawrotu indukowanego przez bodziec skojarzony z alkoholem jest modelem wspomnianej wcześniej sytuacji, w której alkoholicy zaczynają odczuwać głód alkoholowy i w konsekwencji wracają do picia, kiedy natkną się na miejsca czy przedmioty kojarzące się z alkoholem. W teście tym róg alkoholowy jest zaprogramowany tak, jak w czasie swobodnego dostępu do alkoholu (znów zapala się światło-sygnal oraz otwierają się drzwi), ale butelki z alkoholem nie są dostępne. Tu także miarą poszukiwania alkoholu jest liczba nosopuków w drzwi alkoholowe, choć można także mierzyć czas spędzony przez zwierzę w rogu klatki kojarzonej z alkoholem. I wreszcie test nawrotu spożywania alkoholu po okresie abstynencji modeluje nawrót u ludzi. Polega on na ponownym podaniu butelki z alkoholem. Zwierzęta, tak jak ludzie, mają tendencje do tego, żeby w pierwszym dniu po okresie abstynencji spożywać więcej alkoholu, niż przed tym okresem (16). Miara nawrotu jest spożycie alkoholu w początkowym okresie nawrotu.

Co się dzieje w mózgu „uzależnionej” myszy?

Opisany model zastosowaliśmy do zbadania zmian, jakie zachodzą pod wpływem długotrwałego spożywania alkoholu w połączeniach między komórkami nerwowymi. Połączenia te nazywa się synapsami. W synapsach chemicznych sygnałem za pomocą którego przekazywana jest informacja są cząsteczki związku chemicznego (neurotransmitera). Na błonie komórki odbierającej sygnał znajdują się specjalnie białka zwane receptorami, do których przyłączają się cząsteczki neurotransmitera.

W naszych badaniach skupiliśmy się na synapsach pobudzających, czyli takich, w których uwolnienie neurotransmitera powoduje zwiększenie prawdopodobieństwa pobudzenia komórki odbierającej sygnał. Oprócz nich w układzie nerwowym występują także synapsy hamujące. Badaliśmy synapsy, w których występuje neurotransmitter zwany glutaminianem (tzw. glutaminianergiczne). Są one umiejscowione na kolcach dendrytycznych – małych wypustkach komórek nerwowych. Uważa się, że zmiany kształtu i gęstości kolców dendrytycznych są strukturalnym podłożem uczenia i pamięci (2, 3). Uzależnienie można natomiast uważać za patologiczną formę pamięci. Postanowiliśmy zatem przeanalizować zmiany liczby i kształtu kolców dendrytycznych występujące

u myszy „uzależnionych” w porównaniu do „nieuzależnionych” (praca w przygotowaniu).

Synapsy glutaminianergiczne mogą być milczące (inaczej ciche), to znaczy niezdolne do pobudzenia. Czym różni się synapsa milcząca od „rozmownej”? Synapsy rozmowne zawierają dwa typy receptorów dla glutaminianu, AMPA – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy i NMDA – kwas-N-metylo-D-asparaginowy. Aby receptor NMDA mógł zadziałać, najpierw musi nastąpić pobudzenie receptora AMPA. Synapsom milczącym brakuje receptorów typu AMPA, nie mogą więc być pobudzone. Badania prowadzone przez inne zespoły wykazały, że kokaina powoduje powstawanie cichych synaps w strukturach mózgu znanych już wcześniej z kodowania informacji o przyjemnych doznaniach (8, 9). W ramach badań prowadzonych w naszym zespole mgr Maria Nalberczak-Skóra oraz dr Anna Suska-Beuron postanowiły sprawdzić, czy mózgi myszy „uzależnionych” różnią się od myszy „nieuzależnionych” poziomem cichych synaps. Zarówno ciche synapsy, jak i kolce dendrytyczne, badałyśmy w hipokampie.

W opisywanym eksperymencie myszy zostały uśmiercone w dwóch punktach czasowych – w czasie swobodnego dostępu do alkoholu oraz nawrotu poszukiwania alkoholu indukowanego przez bodziec skojarzony z alkoholem. Zadałyśmy pytanie, czy mózgi myszy „uzależnionych” i „nieuzależnionych” uśpionych w tych momentach różnią się od siebie. Wśród myszy uśmierconych w czasie swobodnego dostępu do alkoholu nie zanotowałyśmy różnic pomiędzy myszami o różnym nasileniu cech związanych z uzależnieniem ani w parametrach kolców dendrytycznych, ani w poziomie cichych synaps. Wśród myszy uśmierconych w czasie nawrotu zanotowano natomiast istotne różnice. Myszy „uzależnione” miały dłuższe kolce dendrytyczne oraz więcej cichych synaps niż myszy „nieuzależnione”. Uzyskane przez nas wyniki świadczą o tym, że u podłoża poszukiwania alkoholu w czasie nawrotu (i różnic w zachowaniu między Myszą 1 i 2) leżą zmiany w synapsach pobudzających w hipokampie. Są to pierwsze dane eksperymentalne na temat neuronalnego podłoża uzależnienia od alkoholu w rozumieniu kompleksowym. Liczymy na to, że w przyszłości dane te przyczynią się do opracowania lepszych metod leczenia alkoholizmu.

Bibliografia

1. American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Washington, DC.
2. Bourne, J. & Harris, K.M., 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17, 381–386.
3. Caroni, P., Donato, F. & Muller, D., 2012. Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 13, 478–490.
4. Cunningham, C.L., Gremel, C.M. & Groblewski, P. A., 2006. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nature protocols*, 1, 1662–1670.
5. Deroche-Gamonet, V., Belin, D. & Piazza, P.V., 2004. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science (New York, N.Y.)*, 305, 1014–7.
6. Easton, A. C. et al., 2014. α CaMKII controls the establishment of cocaine's reinforcing effects in mice and humans. *Translational Psychiatry*, 4, 457.
7. Fan, G.H. et al., 1999. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Molecular pharmacology*, 56, 39–45.
8. Koya, E. et al., 2012. Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. *Nature Neuroscience*, 15, 1556–62.
9. Ma Y.Y. et al., 2014. Bidirectional modulation of incubation of cocaine craving by silent synapse-based remodeling of prefrontal cortex to accumbens projections. *Neuron*, 84, 1344–5.
10. Meyers, R. A, Zavala, A.R. & Neisewander, J.L., 2003. Dorsal, but not ventral, hippocampal lesions disrupt cocaine place conditioning. *Neuroreport*, 14, 2127–2131.
11. Mijakowska, Z. et al., 2015. Autophosphorylation of alpha isoform of calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates alcohol addiction-related behaviors. *Addiction Biology* (praca w wersji elektronicznej, oczekująca na wydruk)
12. O'Brien, C.P. et al., 1992. Classical conditioning in drug-dependent humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 654, 400–15.
13. Oniszczenko W., Dragan W. Ł., *Genetyka zachowania w psychologii i psychiatrii*, Wydawnictwo Naukowe Scholar, Warszawa 2008
14. Piazza, P.V. & Deroche-Gamonet, V., 2013. A multistep general theory of transition to addiction. *Psychopharmacology*, 229, 387–413.
15. Radwanska, K. & Kaczmarek, L., 2012. Characterization of an alcohol addiction-prone phenotype in mice. *Addiction Biology*, 17, 601–612.
16. Sanchis-Segura, C. & Spanagel, R., 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: An overview. *Addiction Biology*, 11, 2–38.
17. Sinha, R., 2008. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141, 105–130.
18. Verdejo-García, A., Lawrence, A.J. & Clark, L., 2008. Impulsivity as a vulnerability marker for substance-use disorders: Review of findings from high-risk research, problem gamblers and genetic association studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32, 777–810.