

„RÓŻNICE INDYWIDUALNE W PODATNOŚCI NA UZALEŻNIENIE
OD AMFETAMINY U SZCZURÓW”

Mgr Ewelina Lucyna Kaniuga

Promotor – Dr hab. n. med. Ewa Taracha Prof. IPiN

Promotor pomocniczy – Dr hab. n. med. Janusz Szyndler

STRESZCZENIE

Uzależnienia stanowią jedną z chorób cywilizacyjnych. Przyczyniają się do poważnych problemów zdrowotnych oraz społecznych, prowadzą do destrukcji życia zawodowego i rodzinnego. Dotychczas nie znaleziono skutecznej terapii. Badania prowadzone na poziomie behawioralnym i neurobiologicznym mają na celu zrozumienie mechanizmów prowadzących do rozwoju tego schorzenia, co jest warunkiem koniecznym do opracowania efektywnej farmakoterapii.

CEL: Wiadomo, że podatność na uzależnienie jest zróżnicowana zarówno u ludzi, jak i zwierząt (np. gryzoni laboratoryjnych). Znalezienie różnic behawioralnych czy neurobiologicznych między osobnikami podatnymi i odpornymi, może pomóc w identyfikacji czynników odpowiedzialnych za rozwój uzależnienia. Celem niniejszych badań było poszukiwanie czynników odpowiedzialnych za zróżnicowanie indywidualne odpowiedzi FM 50-kHz USV na amfetaminę (*ang. amphetamine; AMF*) i poszukiwanie powiązań ze zróżnicowaną podatnością na rozwój uzależnienia, a w szczególności: (a) wyodrębnienie podgrup szczurów (LC_{TIPS} i HC_{TIPS}) różniących się podatnością na wytwarzaną w procedurze TIPS (*ang. Two injection protocol of sensitization; TIPS*) sensytyzację odpowiedzi FM 50-kHz USV na AMF, (b) ocena stabilności podziału szczurów na LC_{TIPS} i HC_{TIPS} podczas wielokrotnego, przerywanego podawania AMF, (c) określenie jakich informacji dostarcza pomiar indukowanej AMF FM 50-kHz USV u szczurów LC_{TIPS} i HC_{TIPS} poprzez porównanie z klasycznymi testami stosowanymi do oceny substancji psychoaktywnych: aktywacji lokomotorycznej (*ang. Locomotor activity; LA*), warunkowanej preferencji miejsca (*ang. Conditioned Place Preference; CPP*), samopodawania (*ang. Self-administration; SA*), (d) poszukiwanie powiązań wybranych cech kojarzonych z podatnością na uzależnienie z późniejszym zróżnicowaniem odpowiedzi FM 50-kHz USV na AMF, (e) porównanie nasilenia negatywnych skutków długotrwałego przyjmowania AMF takich jak lęk i depresja, u szczurów LC_{TIPS} i HC_{TIPS}, (f) poszukiwanie różnic pomiędzy szczurami LC_{TIPS} i HC_{TIPS} w zakresie wpływu AMF na: poziomy tkankowe DA i 5-HT oraz ich metabolitów, na zdolność do aktywacji neuronalnej wybranych obszarów mózgu (IHC białka Fos), na uwalnianie DA, na zmiany neuroplastyczne (oznaczanie BDNF (*ang. Brain-derived neurotrophic factor*)), na

odpowieź osi podwzgorze-przysadka-nadnercza HPA (oznaczanie kortykosteronu) oraz ocena potencjalnych terapeutycznych efektów N-acetylocysteiny (NAC) u szczurów LC_{TIPS} i HC_{TIPS}.

METODYKA: Badania wykonano na szczurach Sprague Dawley, podzielonych na podstawie indukowanej AMF sensytyzacji odpowiedzi wokalizacji ultradźwiękowej (*ang. Ultrasonic vocalizations; USV*) w paśmie apetytywnym (50-kHz). Istotnym elementem tego modelu, było wywołanie sensytyzacji w dwuiniekcyjnym protokole sensytyzacji TIPS. Zidentyfikowano szczury o silniejszej (HC_{TIPS}) i słabszej (LC_{TIPS}) sensytyzacji odpowiedzi USV na AMF. W tych dwóch grupach szczurów poszukiwano różnic na poziomie behawioralnym i biochemicznym.

WYNIKI: Wykazano, że najsilniejsze zróżnicowanie odpowiedzi USV u szczurów LC_{TIPS} i HC_{TIPS} występowało przy dawce 1,5 mg/kg AMF. Różnica w wytworzonej w procedurze TIPS sensytyzacji była trwała, utrzymywała się nawet po wielokrotnych podaniach AMF, przerywanych okresami odstawienia. Wskazuje to na stabilność indywidualnych różnic w odpowiedzi USV na AMF. Zróżnicowanie sensytyzacji odpowiedzi LA było nietrwałe. W porównaniu do szczurów LC_{TIPS}, szczury HC_{TIPS} intensywniej wokalizowały w reakcji na AMF i na otoczenie, w którym była podawana AMF (kontekst), odpowiedź USV zaczynała się szybciej, wykazywała dynamiczne zmiany w zależności od stanu sensytyzacji/tolerancji. Szczury te wykazywały większą preferencję miejsca w teście CPP, ale mniej samopodawały AMF w teście SA. Obie grupy wykazywały podobną LA w odpowiedzi na AMF. Grupy te nie różniły się również cechami związanymi z predyspozycją do uzależnień, a mianowicie ocenianą w teście Morris'a (*ang. Morris water maze; MWM*) zdolnością uczenia się oraz ocenianą w teście eksploracji nowego środowiska (*ang. Novelty seeking; NS*) preferencją nowości. Długotrwałe (14 dni) podawanie AMF (w dawce 2,5 mg/kg) nie wpływało na depresyjność ocenianą w teście FST (*ang. Porsolt forced swimming test*) i na lęklivość ocenianą w teście EPM (*ang. Elevated plus Maze*) w żadnej z podgrup.

Podanie AMF w podobny sposób wpłynęło na tkankowe poziomy amin biogennych i ich metabolitów w obu grupach, jedynie stężenie DOPAC w Cg było wyższe u szczurów HC_{TIPS} w porównaniu ze szczurami LC_{TIPS}. Wywołany AMF wzrost uwalniania DA u usensytyzowanych szczurów był nieco większy w podgrupie LC_{TIPS} podczas gdy zmiany DOPAC i HVA były podobne. Szczury HC_{TIPS} silniej odpowiadały wzrostem stężenia kortykosteronu na podanie AMF. Na podstawie immunohistochemicznego znakowania białka Fos wykazano, że AMF wywołuje silniejszą aktywację w większości badanych obszarów mózgu u szczurów HC_{TIPS} w porównaniu do szczurów LC_{TIPS}. Natomiast nie wykazano wpływu AMF na poziom BDNF. Dwutygodniowe podawanie NAC po wielokrotnych podaniach AMF nie wpłynęło na wygaszanie działania nagradzającego ocenianego na podstawie USV w żadnej z badanych grup.

WNIOSKI: FM 50-kHz USV, podobnie jak CPP różnicuje szczury o różnej wrażliwości na nagradzające działanie AMF. Różnice pomiędzy szczurami o małej (LC_{TIPS}) i dużej (HC_{TIPS}) podatności na sensytyzację odpowiedzi FM 50-kHz USV na AMF są trwałe, co może wskazywać, że

u podstaw tego podziału leżą pewne różnice neurobiologiczne. Sensytyzacja odpowiedzi FM 50-kHz USV jest niezależna od sensytyzacji odpowiedzi LA i prawdopodobnie odzwierciedla inne aspekty działania AMF. Szczury HC_{TIPS} w porównaniu do LC_{TIPS}, charakteryzują się większą reaktywnością w odpowiedzi na AMF. Intensywność emisji FM 50-kHz USV w odpowiedzi na AMF nie zależy od uwalniania DA w prążkowiu.

Nie znaleziono jednoznacznych powiązań podatności na uzależnienie z różnicami indywidualnymi w podatności na sensytyzację odpowiedzi FM 50-kHz USV na AMF. Podobne wyniki otrzymane u szczurów LC_{TIPS} i HC_{TIPS} w testach, którym przypisuje się wartość predykcyjną w odniesieniu do podatności na uzależnienie mogą wskazywać na brak takich powiązań. Do innych wniosków prowadzą obserwacje, że szczury LC_{TIPS} w porównaniu do HC_{TIPS} samopodają więcej AMF w teście samopodawania, być może kompensując sobie mniejszą wrażliwość na działanie nagradzające AMF. Niewykluczone, że to może stanowić nowy kierunek dalszych badań w różnicach indywidualnych podatności na uzależnienie.

**INSTITUTE OF PSYCHIATRY AND NEUROLOGY IN WARSAW, DEPARTMENT OF
NEUROCHEMISTRY**

**“INDIVIDUAL DIFFERENCES IN SUSCEPTIBILITY TO ADDICTION
TO AMPHETAMINE IN RATS”**

M.Sc. Ewelina Lucyna Kaniuga

Doctoral supervisor – PhD. Ewa Taracha

Assistant supervisor – PhD. Janusz Szyndler

ABSTRACT

Addictions are one of the diseases of affluence. They contribute to severe health and social problems, leading to the destruction of professional and family life. Research on the development of this disease is conducted on the behavioral and neurobiological levels. So far, no effective therapy has been found. Research conducted at the behavioral and neurobiological levels is aimed at understanding the mechanisms leading to the development of this disease, which is a prerequisite for the development of effective pharmacotherapy.

AIM: Susceptibility to addiction is known to be variable in both humans and animals (e.g. laboratory rodents). Finding behavioral or neurobiological differences between susceptible and resistant individuals can help identify factors responsible for the development of addiction. The aim of this study was to search for factors responsible for the individual differentiation of FM 50-kHz USV responses to amphetamine (AMF) and to search for links with different susceptibility to the development of addiction, in particular: (a) distinguishing between rat subgroups (LC_{TIPS} and HC_{TIPS}) that differed from susceptibility to TIPS (Two injection protocol of sensitization) sensitization of the FM 50-kHz USV response to AMF, (b) assessment of the stability of the division of rats into LC_{TIPS} and HC_{TIPS} during repeated intermittent administration of AMF, (c) determination what information is provided by the measurement of AMF – induced FM 50-kHz USV in LC_{TIPS} and HC_{TIPS} rats by comparison with the classical tests used to assess psychoactive substances: Locomotor activity (LA), Conditioned Place Preference (CPP), self-administration (SA), (d) the search for links selected traits associated with susceptibility to addiction with the subsequent differentiation of FM 50-kHz USV responses to AMF, (e) comparison of the severity of negative effects of long-term AMF intake, such as anxiety and depression, in LC_{TIPS} and HC_{TIPS} rats, (f) searching for differences between LC_{TIPS} and HC_{TIPS} rats in terms of the impact of AMF on: tissue levels of DA and 5-HT and their metabolites, on the ability to neuronal activation of selected areas of the brain (IHC of the Fos protein), on DA release, intensification of the effects of long-term AMF intake and/or withdrawal on neuroplastic

changes (determination of BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)), HPA axis response (corticosterone determination) and evaluation of the potential therapeutic effects of N-acetylcysteine (NAC) in LC_{TIPS} and HC_{TIPS} rats.

METHODS: The studies were performed on Sprague Dawley rats, divided on the basis of AMF – induced sensitization of ultrasonic vocalizations (USV) responses in the appetite band (50-kHz). An important element of this model was the induction of sensitization in the two injection protocol of sensitization (TIPS). Rats with a stronger (HC_{TIPS}) and weaker (LC_{TIPS}) sensitization of the USV response to AMF were identified. In these two groups of rats, differences were sought on the behavioral and biochemical levels.

RESULTS: It was shown that the strongest differentiation of USV responses in LC_{TIPS} and HC_{TIPS} rats occurred at a dose of 1.5 mg/kg AMF. The difference in the sensitization produced by the TIPS procedure was persistent even after repeated AMF administrations, interrupted by withdrawal periods. This finding demonstrates the stability of the individual differences in USV response to AMF. The differentiation in LA sensitization was unstable. Compared to LC_{TIPS} rats, HC_{TIPS} rats vocalized more intensively in response to AMF and to the environment in which AMF was administered (context), the USV response started faster, showed dynamic changes depending on the sensitization/tolerance state. These rats showed a greater place preference in the CPP test, but less self-administered AMF in the SA test. Both groups showed similar LA in response to AMF. These groups also did not differ in the traits associated with the predisposition to addiction, namely learning ability assessed in the Morris water maze (MWM) and the preference for novelty assessed in the test of exploring a new environment (NS). Long-term (14 days) administration of AMF (dose 2.5 mg/kg) had no effect on depression assessed in the FST test (Porsolt forced swimming) and on anxiety assessed in the EPM (Elevated plus Maze) test in any of the subgroups..

Administration of AMF had a similar effect on the tissue levels of biogenic amines and their metabolites in both groups, only the concentration of DOPAC in Cg was higher in HC_{TIPS} rats compared to LC_{TIPS} rats. The AMF – induced increase in DA release in the sensitized rats was slightly greater in the LC_{TIPS} subgroup while the changes in DOPAC and HVA were similar.

HC_{TIPS} rats responded more strongly with an increase in corticosterone concentration to AMF administration. The immunohistochemical determination of Fos protein showed stronger activation of most studied brain regions in HC_{TIPS} rats compared to LC_{TIPS} rats. However, no differences were found in the BDNF levels between LC_{TIPS} and HC_{TIPS} rats. Two-weekly administration of NAC to AMF sensitized rats did not suppress the USV – assessed rewarding effect of any of the treatment groups.

CONCLUSIONS: FM 50-kHz USV, like CPP, differentiates rats with different sensitivities to the rewarding effects of AMF. The differences between the low (LC_{TIPS}) and high (HC_{TIPS}) rats in sensitization of the FM 50-kHz USV response to AMF are persistent, which may indicate that some

neurobiological differences are the basis of the observed variability. The sensitization of the FM 50-kHz USV response is independent of the sensitization of the LA response and is likely to reflect other aspects of AMF performance. HC_{TIPS} rats, compared to LC_{TIPS}, are characterized by greater reactivity in response to AMF. The FM 50-kHz USV emission intensity in response to AMF is independent of the DA release in the striatum.

There was no clear association of susceptibility to addiction with individual differences in susceptibility to sensitization of FM 50-kHz USV response to AMF. Similar results obtained in LC_{TIPS} and HC_{TIPS} rats in tests that are assigned a predictive value for addiction susceptibility may indicate a lack of such associations. To other conclusions, they observe that LC_{TIPS} rats self-administer more AMF in the self-administration test compared to HC_{TIPS}, perhaps compensating for their lower sensitivity to the rewarding effects of AMF. It cannot be ruled out that this may constitute a new direction for further research in individual differences in susceptibility to addiction.

