

*Załącznik 2*

# **AUTOREFERAT**

*Barbara Ziółkowska*

*Zmiany ekspresji wybranych genów w układzie nagrody i związanych z nim strukturach przodomózgowia w zwierzęcych modelach uzależnień*

## 1. Imię i Nazwisko

*Barbara Ziółkowska*

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Magister biologii (dyplom z wyróżnieniem)

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, czerwiec 1991.

Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii (dyplom z wyróżnieniem)

Stopień nadany przez Radę Naukową Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, październik 1999.

Tytuł rozprawy doktorskiej: "Mechanizmy regulacji ekspresji genu proenkefalinowego w wybranych strukturach mózgu".

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

X.1991 - III.1992	doktorant w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie (studia doktoranckie)
IV.1992 - XII.1993	doktorant w Instytucie Fizjologii Uniwersytetu Ludwika Maksymiliana w Monachium (umowa o pracę)
II.1994 - XII.1999	asystent w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie
I.2000 - XII.2008	adiunkt w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie
III.2002 - V.2005	badacz w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (zatrudnienie związane z koordynacją projektu zamawianego "Podstawy neurobiologiczne, mechanizmy i metody profilaktyki oraz leczenia uzależnień")
I.2009 - nadal	asystent w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

**a) tytuł osiągnięcia naukowego**

*Zmiany ekspresji wybranych genów w układzie nagrody i związanych z nim strukturach przodomózgowia w zwierzęcych modelach uzależnień*

**b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)**

1. **Ziółkowska B.** (2001) Pomiary ekspresji indukowalnych czynników transkrypcyjnych w badaniach układu nerwowego. Wykłady Monograficzne., Nr 58. Instytut Farmakologii PAN, Kraków, str. 1-23.
2. **Ziółkowska B, Przewłocki R.** (2002) Methods used in inducible transcription factor studies: focus on mRNA. W: Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 19: Immediate Early Genes and Inducible Transcription Factors in Mapping of the Central Nervous System Function and Dysfunction, red. L. Kaczmarek, H.A. Robertson, Rozdz. 1. Elsevier Science B.V., str. 1-38.
3. **Ziółkowska B, Korostyński M, Piechota M, Kubik J, Przewłocki R:** (2012) Effects of morphine on immediate-early gene expression in the striatum of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Pharmacol. Rep.* 64: 1091-1104.
4. **Ziółkowska B, Gieryk A, Solecki W, Przewłocki R.** (2015) Temporal and anatomic patterns of immediate-early gene expression in the forebrain of C57BL/6 and DBA/2 mice after morphine administration. *Neuroscience* 284: 107–124.
5. **Ziółkowska B, Stefański R, Mierzejewski P, Zapart G, Kostowski W, Przewłocki R.** (2006) Contingency does not contribute to the effects of cocaine self-administration on prodynorphin and proenkephalin gene expression in the rat forebrain. *Brain Res.* 1069: 1-9.
6. **Solecki W, Ziółkowska B, Krówka T, Gieryk A, Filip M, Przewłocki R.** (2009) Alterations of prodynorphin gene expression in the rat mesocorticolimbic system during heroin self-administration. *Brain Res.* 1255: 113-121.
7. **Ziółkowska B, Gieryk A, Bilecki W, Wawrzczak-Bargieła A, Wędzony K, Chocyk A, Danielson PE, Thomas EA, Hilbush BS, Sutcliffe JG, Przewłocki R.** (2005) Regulation of  $\alpha$ -synuclein gene expression in limbic and motor brain regions of morphine-treated mice. *J. Neurosci.* 25: 4996-5003.
8. **Ziółkowska B, Gieryk A, Wawrzczak-Bargieła A, Krówka T, Kamińska D, Korkosz A, Bieńkowski P, Przewłocki R.** (2008)  $\alpha$ -Synuclein expression in the brain and blood

during abstinence from chronic alcohol drinking in mice. *Neuropharmacology* 54: 1239-1246.

### c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

#### Wprowadzenie

Uzależnienie od substancji chemicznych (np. opioidów, psychostymulantów czy alkoholu) jest przewlekłym zaburzeniem psychicznym, którego głównym objawem jest przymus pobierania substancji pomimo negatywnych skutków zdrowotnych, psychologicznych i społecznych, a także brak kontroli nad jej pobieraniem. Charakterystyczną cechą uzależnień jest również ich nawrotowość, tj. pojawianie się - nawet po długich okresach abstynencji - silnego i uporczywego pragnienia zażycia substancji ("głodu"), które często prowadzi do powrotu do nałogu (Koob i Le Moal, 2006). Te charakterystyczne objawy wskazują, że zażywanie substancji uzależniających prowadzi do wytworzenia w mózgu trwałych zmian funkcjonalnych, a być może także strukturalnych, które stanowią biologiczne podłoże związanych z uzależnieniem zaburzeń motywacji i emocji. Jednocześnie podobieństwo podstawowych symptomów uzależnień od różnych substancji sugeruje, że stanowiące ich przyczynę zmiany neuronalne są, przynajmniej częściowo, wspólne dla różnych rodzajów uzależnień.

Badania ostatnich 25 lat doprowadziły do wyodrębnienia charakterystycznych zmian neuroprzebieżności cechujących różne fazy uzależnienia oraz do wskazania struktur mózgu, zaangażowanych w powstawanie oraz ekspresję uzależnień.

I) Uważa się, że przyczyną nagradzającego i pozytywnie wzmacniającego działania wszystkich grup substancji uzależniających jest ich *pobudzający wpływ na przebieżność w mezokortykolimbicznym układzie dopaminowym*, określanym jako układ nagrody. Kluczowym wspólnym efektem działania tych substancji, osiąganym poprzez różne mechanizmy farmakologiczne, wydaje się tu podwyższenie synaptycznego poziomu dopaminy w jądrze półleżącym, stanowiącym znaczną część brzuszno-prądkowia (Di Chiara i Imperato, 1988). Substancje uzależniające zwiększają stężenie tego neuroprzebieżnika także w innych strukturach docelowych układu mezokortykolimbicznego i mezostriałnego – korze przedczołowej, ciele migdałowatym i grzbietowym prądkowiu, choć nie we wszystkich z tych struktur mózgu musi się to wiązać z natychmiastowym działaniem nagradzającym (Di Chiara i Imperato, 1988a; McBride i wsp., 1999).

Pobudzenie przebieżności dopaminowego nie jest jedynym mechanizmem nagrody i pozytywnego wzmocnienia (McBride i wsp., 1999). Inny ważny mechanizm polega na *pobudzeniu receptorów opioidowych typu  $\mu$  ( $i$  / lub  $\delta$ )*, m. in. w jądrze półleżącym, bocznym podwzgórzcu lub bocznym jądrze przegrody; nagradzające działanie opioidów przynajmniej w niektórych z tych struktur nie wymaga obecności dopaminy (Cazala i wsp., 1998; McBride i

wsp., 1999; Hnasko i wsp., 2005). Mechanizm ten (obok stymulacji transmisji dopaminowej) najprawdopodobniej przyczynia się do działania nagradzającego egzogennych substancji opioidowych (np. heroiny, morfiny), ale także alkoholu etylowego i nikotyny, które powodują uwalnianie endogennych agonistów receptorów opioidowych – enkefalin i  $\beta$ -endorfiny (Houdi i wsp., 1991; Mendez i wsp., 2005; Olive i wsp., 2001).

II) Tuż po zaprzestaniu przewlekłego podawania substancji uzależniających przekąźnictwo dopaminowe ulega zahamowaniu, natomiast znacznemu nasileniu w szeregu struktur mózgu ulega pobudzająca transmisja glutaminianergiczna (Rosetti et al., 1992). Te zaburzenia przekąźnictwa są przyczynowo związane z rozwojem zespołów odstawienia, powodując zarówno charakterystyczne i różne dla poszczególnych substancji somatyczne objawy odstawienia, jak i wspólne dla odstawienia różnych substancji negatywne stany afektywne, obejmujące dysfориę, anhedonię i lęk (Markou i wsp., 1998). Wymienione nieprzyjemne emocje, szczególnie lęk, przypisuje się nadmiernemu pobudzeniu środkowego jądra migdałowatego, które następuje w zespołach odstawienia wszystkich substancji uzależniających (Knapp i wsp., 1998; Panagis i wsp., 2000; Gracy i wsp., 2001).

III) Bodźce środowiskowe wcześniej skojarzone z przyjmowaniem narkotyku, przypominająca dawka substancji oraz stres są czynnikami, które mogą wywołać "głód" substancji lub warunkowy zespół odstawienia w okresie abstynencji po przewlekłym przyjmowaniu substancji uzależniających, tj. stany psychosomatyczne leżące u podstaw nawrotu pobierania substancji. Stwierdzono, że stany "głodu" różnych substancji, wywołanego przez powyższe bodźce, wiążą się z aktywacją takich struktur mózgu jak zespół jąder migdałowatych (głównie część podstawno-boczna ciała migdałowatego), kora przedczołowa i w niektórych przypadkach także brzuszne prądkowie (Shaham i wsp., 2003; Bossert i wsp., 2005).

Podsumowana powyżej w wielkim skrócie wiedza wskazuje główne rejony mózgu oraz układy neuroprzekąźnikowe, których zaburzone funkcje najprawdopodobniej leżą u podłoża uzależnień. Wciąż jednak *niejasna pozostaje molekularna natura wywoływanych przez substancje uzależniające zmian na poziomie poszczególnych komórek nerwowych, które prowadzą do rozwoju uzależnienia*. Wydaje się, że zmiany takie polegają na regulacji, w efekcie farmakologicznego działania tych substancji, ekspresji genów i białek zaangażowanych (bezpośrednio lub pośrednio) w neurotransmisję oraz / lub w procesy długotrwałej neuroplastyczności, która może obejmować reorganizację połączeń nerwowych, stanowiąc biologiczną podstawę trwałych zmian zachowania.

## Cel badań

Przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań była regulacja, w różnych modelach uzależnień, ekspresji wybranych genów i białek, które mogą istotnie wpływać na przekaźnictwo lub przyczyniać się do rozwoju zmian neuroplastycznych w mózgowym układzie nagrody i pokrewnych strukturach docelowych układu dopaminowego.

Badania dotyczyły w szczególności:

I) *genów wczesnej odpowiedzi komórkowej*, których ekspresja ulega znacznemu nasileniu (indukcji) w podregionach prążkowiec i / lub kory czołowej natychmiast po podaniu substancji uzależniających, a których białkowe produkty mogą pośredniczyć m. in. w regulacji ekspresji innych genów ważnych dla uzależnień (indukowalne czynniki transkrypcyjne, np. *c-fos*, *zif268*) lub bezpośrednio, na poziomie synaps, uczestniczyć w zjawiskach neuroplastyczności (efektorowe geny wczesne, np. *arc*);

II) *genów peptydów opioidowych proenkefalinowego (PENK) i prodynorfinowego (PDYN)*, ulegających znacznej ekspresji w jądrze półleżącym, grzbietowym prążkowiec i środkowym jądrze migdałowatym, których peptydowe produkty uczestniczą w regulacji transmisji dopaminergicznej oraz mają własne, niezależne od układu dopaminowego, działanie na procesy hedonii (zwłaszcza peptydy pochodzące z PENK);

III)  *$\alpha$ -synukleiny*, presynaptycznego białka występującego obficie m. in. w neuronach dopaminowych, o wykazanym hamującym wpływie na przekaźnictwo dopaminowe.

### I) Regulacja ekspresji genów wczesnej odpowiedzi komórkowej w przodomózgowiu wywołana podaniem morfiny

Geny wczesnej odpowiedzi komórkowej (*immediate-early genes* - IEG; nazywane również genami zależnymi od aktywności) stanowią niejednorodną funkcjonalnie grupę kilkudziesięciu genów, których wspólną cechą jest znaczna, szybka i krótkotrwała regulacja w komórkach nerwowych zachodząca pod wpływem bodźców pobudzających (Morgan i wsp., 1987; Sagar i wsp., 1988; Herdegen i Leah, 1998). Geny te ulegają aktywacji transkrypcyjnej (indukcji) w ważnych dla uzależnień obszarach przodomózgowia w wyniku działania wszystkich substancji uzależniających, a ich aktywacja jest najwcześniejszą – zachodzącą w ciągu minut – odpowiedzią genomową na (choćby jednorazowe) działanie tych substancji (Hitzemann i Hitzemann, 1997; Berke i wsp., 1998; Harlan i Garcia, 1998; Ziolkowska, 2001<sup>\*</sup>; Liu i Crews, 2015).

---

<sup>\*</sup> *Pogrubioną czcionką wyróżniono publikacje stanowiące podstawę niniejszego wniosku habilitacyjnego.*



Z jednej strony, wzrosty ekspresji IEG mogą być traktowane jako wskaźnik pobudzenia neuronów (Morgan i wsp., 1987; Sagar i wsp., 1988; Kaczmarek i Chaudhuri, 1997; **Ziółkowska i Przewłocki, 2002**), a zatem rozmieszczenie indukcji IEG w mózgowiu może służyć jako narzędzie do mapowania jego regionów aktywowanych w różnych fazach uzależnienia.

Z drugiej strony, białkowe produkty genów wczesnych mogą istotnie przyczyniać się do zmian komórkowych odpowiedzialnych za rozwój uzależnień, gdyż znajdują się wśród nich m. in. czynniki transkrypcyjne (np. z rodzin Fos, Jun i Krox (Zif), które mogą regulować ekspresję innych genów), białka zlokalizowane w dendrytach i kolcach dendrytycznych (np. Arc, Homer1a) oraz białka wydzielnicze (tkankowy aktywator plazminogenu – tPA, BDNF) o znanych funkcjach w procesach plastyczności synaptycznej, jak również białka regulujące aktywność wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału (np. MKP-1, Rheb) (Berke i wsp., 1998; Herdegen i Leah, 1998; Lanahan i Worley, 1998). Indukcja IEG może więc definiować obszary mózgu, w których dochodzi do zmian neuroplastycznych i funkcjonalnie ważnych zmian ekspresji genów późnych, dostarczając wglądu zarówno w mechanizmy powstawania, jak i ekspresji uzależnień.

Genów odpowiedzi wczesnej dotyczyły już badania wykonywane do mojego doktoratu, w których indukowalne czynniki transkrypcyjne służyły mi m. in. jako markery do analizy mechanizmów pobudzenia drogi prążkowiowo-bladej (biorącej początek w jednej z dwóch głównych populacji neuronów prążkowiego, GABAergicznym neuronach projekcyjnych zawierających receptor dopaminowy D2) w stanach niedoboru dopaminy (model choroby Parkinsona) oraz po zablokowaniu receptora D2 przez klasyczne neuroleptyki (Ziółkowska i Höllt, 1993; Ziółkowska i wsp., 1995; **Ziółkowska, 2001**). Podejmując po ukończeniu doktoratu problematykę badawczą związaną z uzależnieniami lekowymi, napisałam dwa artykuły przeglądowe dotyczące IEG<sup>†</sup> (**Ziółkowska, 2001, Ziółkowska i Przewłocki, 2002**), w których przeanalizowałam szereg aspektów metodycznych badań nad tymi genami, a także (zwłaszcza w pierwszej z tych publikacji) ich wykorzystanie w badaniach nad działaniem neuroleptyków oraz substancji uzależniających (co stanowiło teoretyczny wstęp do podejmowanych nowych zagadnień). Oba artykuły przedkładałam jako wstępny element mojej pracy habilitacyjnej.

Rozmieszczenie indukcji IEG w mózgowiu wywołanych przez najczęściej używane substancje uzależniające, jak również główne farmakologiczne mechanizmy tych regulacji zostały opisane w latach 90-tych XX wieku. Na podstawie tych badań wiadomo, że charakterystycznym wspólnym miejscem indukcji IEG przez substancje uzależniające jest prążkowie (grzbietowe i / lub brzuszne) i że w efektach tych pośredniczy dopamina. Do wzrostów ekspresji IEG dochodzi (odwrotnie niż po podaniu neuroleptyków) selektywnie w

---

<sup>†</sup> Artykuły te koncentrowały się wyłącznie na indukowalnych czynnikach transkrypcyjnych jako na najwcześniej poznanej grupie IEG. IEG pełniące inne funkcje w komórce zostały opisane dopiero w drugiej połowie lat 90-tych (Berke i wsp., 1998; Lanahan i Worley, 1998) i wkrótce niektóre z nich stały się przedmiotem także naszych badań (Ziółkowska i wsp., 2005, 2011; **Ziółkowska i wsp., 2012**).

drugiej głównej populacji neuronów projekcyjnych prążkowie, zawierających receptor dopaminowy D1 (pozytywnie sprzężony z cyklazą adenylanową poprzez białko  $G_s$ ), ale nie w neuronach zawierających receptor D2 (w których procesy transkrypcyjne są raczej hamowane przez dopaminę, gdyż pobudzenie receptora D2 hamuje aktywność cyklazy adenylanowej poprzez białko  $G_{i/o}$ ) (Graybiel i wsp., 1990; Moratalla i wsp., 1992; Liu i wsp., 1994; Bontempi i Sharp, 1997; Harlan i Garcia, 1998; Ziółkowska, 2001; Enoksson i wsp., 2012). Co ciekawe, pomimo dosyć jednorodnego rozmieszczenia receptora D1 w prążkowie, przestrzenne wzory indukcji IEG przez różne substancje uzależniające w tej strukturze mózgu są bardzo odmienne (Graybiel i wsp., 1990; Moratalla i wsp., 1992; Liu i wsp., 1994; Bontempi i Sharp, 1997). Przyczyny wspomnianych różnic, nie w pełni wyjaśnione, zapewne wiążą się ze zróżnicowanymi mechanizmami stymulacji przekaźnictwa dopaminowego przez różne grupy tych substancji, a także z działaniem wielu z nich na farmakologiczne punkty uchwytu poza układem dopaminowym.

Morfina jest substancją, której pobudzający wpływ na ekspresję IEG ogranicza się do szczególnie małych obszarów prążkowie. We wczesnych badaniach po jednorazowym obwodowym podaniu morfiny stwierdzono indukcję genu *c-fos* (a w mniejszym stopniu także genów *junB* i *c-jun*) przede wszystkim w niewielkim grzbietowo-przyśrodkowym rejonie prążkowie szczura (Chang i wsp., 1988; Liu i wsp., 1994; Garcia i wsp., 1995; Bontempi i Sharp, 1997). Słabsze wzrosty ekspresji *c-fos* obserwowali niektórzy autorzy także w jądrze półleżącym – a spośród innych obszarów przodomózgowia – w brzuszno-bocznej części przegrody, przyśrodkowych i śródblaszkowych jądrach wzgórza oraz w korze mózgowej (Liu i wsp., 1994; Garcia i wsp., 1995; Bontempi i Sharp, 1997). Farmakologiczne mechanizmy indukcji IEG przez morfinę, zbadane rozlegle jedynie dla genu *c-fos* w grzbietowo-przyśrodkowym prążkowie, okazały się dość złożone. Choć indukcja ta jest w dużej mierze zależna od pobudzenia przekaźnictwa dopaminowego po podaniu opioidu (co wynika z odhamowania neuronów dopaminowych pola brzuszno-bocznego nakrywki i istoty czarnej w efekcie działania morfiny na receptory opioidowe  $\mu$  zlokalizowane w tych strukturach na hamujących interneuronach GABAergicznym; Di Chiara i North, 1992) i stymulacji receptorów D1 w prążkowie, wymaga ona *jednoczesnego* pobudzenia przez morfinę receptorów  $\mu$  w przyśrodkowych i śródblaszkowych jądrach wzgórza oraz w grzbietowym jądrze szwu (Liu i wsp., 1994; Bontempi i Sharp, 1997; Frankel i wsp., 1999a,b; Enoksson i wsp., 2012). Równoczesne bezpośrednie działanie morfiny na prążkowie, które obfituje w postsynaptyczne receptory opioidowe  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$ , będące receptorami hamującymi (sprzężonymi z białkiem  $G_{i/o}$ ) (Mansour i wsp., 1987; 1995; Tempel i Zukin, 1987) może znacząco ograniczać możliwość indukcji IEG w neuronach (Schoffelmeer i wsp., 1985; Fuxe i wsp., 1991) i stanowić główną przyczynę niewielkiego zasięgu tej indukcji w prążkowie.

Dotychczasowe badania nad wpływem morfiny na ekspresję IEG dotyczyły niemal wyłącznie najwcześniej poznanych genów czynników transkrypcyjnych z rodzin *fos* i *jun*, zwłaszcza najczęściej stosowanego jako markera aktywacji neuronów genu *c-fos*. W latach 90-



tych zidentyfikowano jednak szereg innych genów zależnych od aktywności neuronalnej, w tym wiele kodujących białka o funkcjach innych niż czynniki transkrypcyjne (tzw. efektorowe geny wczesne; przykłady wymienione w 3. akapicie tego podrozdziału; Berke i wsp., 1998; Lanahan i Worley, 1998). Wiele z nich, ze względu na funkcje lub lokalizację w komórce ich produktów, wydawało się dobrymi kandydatami do roli ‘włączników’ inicjujących stosunkowo trwałe zmiany w neuronach, toteż stały się interesującym przedmiotem w badaniach nad mechanizmami uzależnień. Przy szybko narastającej wiedzy o regulacji ekspresji efektorowych IEG przez psychostymulanty (np. Berke i wsp., 1998), dość mało było badań na temat wpływu opioidów na ich aktywność, dlatego podjęliśmy działania w kierunku uzupełnienia / określenia zestawu IEG regulowanych przez morfinę.

Spośród efektorowych IEG w pierwszej kolejności zwrócił naszą uwagę gen *arc* (*activity-regulated cytoskeleton-associated [protein]*), który wydawał się interesujący ze względu na swoją rolę w procesach plastyczności synaptycznej (Lyford i wsp., 1995; Lanahan i Worley, 1998; Bramham i wsp., 2008), w tym – potencjalnie – także plastyczności neuronalnej wywołanej przez substancje uzależniające. (Niektóre późniejsze badania potwierdziły jego znaczenie w rozwoju długotrwałych zmian behawioralnych wywołanych przez opioidy, takich jak warunkowa preferencja miejsca – Lv i wsp., 2011). Wykonaliśmy wstępne doświadczenia opisujące wpływ morfiny na ekspresję genu *arc* w mózgu, a także w hodowli komórek neuroblastomy zawierających receptor opioidowy  $\mu$ . Badając ekstrakty prądkowia myszy stwierdziliśmy znaczny wzrost poziomu mRNA (a także białka) *arc* w zadziwiająco późnym czasie, 4 godz. po jednorazowym obwodowym podaniu morfiny (Ziółkowska i wsp., 2005). Inne bodźce, w tym środki farmakologiczne, wywołują znacznie szybszy wzrost ekspresji IEG: maksymalne poziomy indukowanych mRNA osiągane są zazwyczaj w ciągu 0.5 - 1 godziny od zadziałania bodźca, i następnie poziomy te wracają do wartości kontrolnych najczęściej w ciągu 2 – 3 godzin (por. Ziółkowska, 2001), co potwierdzają także nasze własne badania w różnych modelach *in vivo* (np. Ziółkowska i Höllt, 1993; Ziółkowska i Przewłocki, 2002; Piechota i wsp., 2010; Ziółkowska i wsp., 2011). Niezgodność czasu indukcji *arc* w prądkowiu z tym zwykłym dla IEG profilem czasowym zmian zapoczątkowała nasze badania nad dynamiką regulacji ekspresji różnych IEG w przedomózgowiu po podaniu morfiny. Zostały one opisane w dwóch spośród publikacji stanowiących podstawę mojego wniosku habilitacyjnego: Ziółkowska i wsp., 2012 oraz Ziółkowska i wsp., 2015.

Wykonane przez nas pomiary ekspresji kilku wybranych IEG w ekstraktach prądkowia metodą RT-PCR, a następnie badania transkryptomu prądkowia przy użyciu mikromacierzy DNA (firmy Affymetrix) potwierdziły obserwację dotyczącą indukcji genu *arc*, a także wskazały, że w czasie 4 godz. po obwodowym podaniu morfiny w prądkowiu myszy podwyższona jest ekspresja także szeregu innych IEG (Ziółkowska i wsp., 2012; Piechota i wsp., 2010). Przeprowadzona na danych pochodzących z mikromacierzy hierarchiczna analiza skupień sugeruje, że część z nich (geny *c-fos*, *fra-2*, *junB*, *egr1* (*zif268*), *egr2*, *NGFIB*, *arc* i *mcp-1*) ulega współregulacji, a analiza promotorów tych genów wskazała czynniki transkrypcyjne CREB i SRF jako potencjalnie zaangażowane w mechanizm jednoczesnej transaktywacji ich transkrypcji w odpowiedzi na

morfinę. Oprócz tej grupy genów, w prążkowie myszy 4 godz. po podaniu morfiny obserwowaliśmy wzrosty ekspresji także kilku innych IEG (*cox-2*, *tPA*, *cykliny 2*), regulowanych najwidoczniej poprzez inne mechanizmy komórkowe, gdyż nie tworzyły one skupienia z wcześniej wymienioną grupą IEG (Ziółkowska i wsp., 2012).

Przeprowadzone w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii PAN badania transkryptomu prążkowie przy użyciu innego typu mikromacierzy (firmy Illumina) potwierdziły obserwację, że 4 godz. po podaniu morfiny, jak i heroiny (innego opioidu o podobnym do morfiny mechanizmie działania) ekspresja całej grupy IEG jest znacznie podwyższona w prążkowie myszy, natomiast wzrosty ekspresji tych genów nie zostały wykryte w badaniu mikromacierzowym we wcześniejszym czasie, 1 godz., który jest zwykłym czasem indukcji mRNA dla IEG (Piechota i wsp., 2010). Było to niezgodne z licznymi danymi literaturowymi, które dowodziły, że morfina wywołuje indukcję przynajmniej niektórych IEG w (ograniczonych co prawda) obszarach prążkowie już 45-60 minut po podaniu (Chang i wsp., 1988; Garcia i wsp., 1995; Erdtmann-Vourliotis i wsp., 1998). W związku z tym wyusunęliśmy hipotezę, że po podaniu morfiny dochodzi do indukcji IEG w prążkowie dwukrotnie, przy czym wczesny epizod indukcji nie był przez nas wykrywany w ekstraktach całego prążkowie (w eksperymentach mikromacierzowych i za pomocą RT-PCR) ze względu na jego bardzo ograniczony zasięg. Ponadto pomiary metodą RT-PCR sugerowały, że sam stres iniekcji (tj. podanie soli fizjologicznej) wywołuje u myszy indukcję IEG, co także mogło utrudniać wykrycie stosunkowo słabego efektu morfiny. Aby wyjaśnić te wątpliwości, podjęłam badania przebiegu czasowego (od 0.5 do 8 godz.) regulacji ekspresji trzech wybranych IEG (*c-fos*, *zif268* i *arc*) po podaniu morfiny w przodomózgowiu, wykorzystując metodę hybrydyzacji *in situ* (Ziółkowska i wsp., 2015). Metoda ta uwidacznia zmiany poziomów mRNA w skrawkach mózgu, a tym samym umożliwia globalną ocenę rozmieszczenia indukcji IEG w tkance o zachowanej strukturze neuroanatomicznej, a także pozwala na wykrycie zmian ekspresji genów zachodzących nawet w niewielkich obszarach tkanki.

Dodatkowo, w tym doświadczeniu zostały wykorzystane dwa wsobne (tj. genetycznie jednorodne) szczepy myszy, C57BL/6 i DBA/2, które różnią się bardzo między sobą pod względem odpowiedzi behawioralnych na morfinę, odzwierciedlających wywołaną przez morfinę stymulację układu dopaminowego, jej działanie nagradzające i uzależniające. W szczepie C57BL/6 podanie morfiny wywołuje silną, trwającą kilka godzin aktywację lokomotoryczną, podczas gdy motoryka myszy DBA/2 jest przez pierwsze 1.5 godz. zahamowana. Dopiero po ok. 4 godz. dochodzi u nich do niewielkiego wzrostu aktywności (Oliverio i Castanello, 1974; Brase i wsp., 1977; Gwynn i Domino, 1984; Murphy i wsp., 2001; Ziółkowska i wsp., 2012; Ziółkowska i wsp., 2015). Szczep C57BL/6 cechuje też większa niż DBA/2 wrażliwość na nagradzające działanie morfiny: wyższe spożycie roztworu morfiny w modelu jej doustnego pobierania oraz wyższa warunkowa preferencja miejsca skojarzonego z podaniem morfiny (Belknap i wsp., 1993; Orsini i wsp., 2005; Solecki i wsp., 2009). Również efekty przewlekłego stosowania morfiny (sensytyzacja lokomotoryczna i uzależnienie fizyczne przejawiające się

zespołem odstawienia po zaprzestaniu podań opioidu) są silniejsze w szczepie C57BL/6 niż DBA/2 (Oliverio i Castellano, 1974; Brase i wsp., 1977; Phillips i wsp., 1994). Porównawcze badania ekspresji IEG na obu szczepach myszy podjęłam w nadziei, że różnice w aktywności podregionów przodomózgowia odpowiedzialne za zróżnicowane zachowania po ostrym podaniu morfiny znajdą odzwierciedlenie w różnym umiejscowieniu i / lub nasileniu indukcji IEG, co pozwoli na identyfikację obszarów funkcjonalnie zaangażowanych w powstanie tych zachowań.

Badania wykazały, że podanie morfiny rzeczywiście wywołuje w przodomózgowiu myszy dwa epizody indukcji mRNA IEG, o częściowo różnym rozmieszczeniu, jeden w czasie ok. 0.5 godz., a drugi po 4-6 godz. od podania opioidu.

Pierwszy epizod indukcji IEG, z maksimum po ok. 0.5 godz., był wcześniej opisany w literaturze w badaniach na szczurach. Nasze doświadczenia wykazały, że także u myszy zachodzą w tym czasie indukcje genu *c-fos* w grzbietowo-przyśrodkowym prążkowie, łupinie jądra półleżącego, korze obręczy oraz bocznej przegrodzie. Uwidocznily również specyficzne dla morfiny indukcje genów *zif268* i *arc* w łupinie jądra półleżącego, a ponadto silne niespecyficzne indukcje tych dwóch genów w grzbietowym prążkowie, przegrodzie i korze mózgowej, wywołane stresem iniekcji (Ziółkowska i wsp., 2015).

Porównanie między szczepami C57BL/6 i DBA/2 efektów występujących selektywnie po morfinie wykazało, że indukcja genu *c-fos* w grzbietowo-przyśrodkowej części grzbietowego prążkowie zachodzi wyłącznie u myszy szczepu C57BL/6. W przedniej części łupiny jądra półleżącego jedynie gen *c-fos* był indukowany w obu szczepach myszy, podczas gdy nasilenie ekspresji genów *zif268* i *arc* zachodziło tylko w szczepie C57BL/6, ale nie DBA/2. Natomiast w tylnej przyśrodkowej części łupiny jądra półleżącego, gdzie obserwowaliśmy zlokalizowany grzbietowo punkt wykazujący szczególnie silną indukcję wszystkich trzech IEG, nie stwierdziliśmy różnic międzyszczepowych w nasileniu indukcji. Poza prążkowie, zróżnicowaną aktywację IEG obserwowaliśmy w bocznym jądrze przegrody, gdzie morfina wywoływała istotną indukcję genu *c-fos* jedynie u myszy szczepu DBA/2 (Ziółkowska i wsp., 2015).

Spośród odpowiedzi behawioralnych na morfinę zachodzących jednocześnie z pierwszym epizodem indukcji IEG, jedynie pobudzenie lokomotoryczne w pełni odróżnia szczepy: jest ono wyraźne i silne u C57BL/6, a całkowicie w tym czasie nieobecne u myszy DBA/2. Podobny profil zmian ekspresji IEG obserwowaliśmy jedynie w grzbietowo-przyśrodkowym prążkowie (tylko dla genu *c-fos*, gdyż pozostałe IEG nie były w tym regionie mózgu aktywowane przez morfinę). Dane sugerują więc, że ten obszar, w wielu wcześniejszych badaniach wskazywany jako główny aktywowany przez morfinę region prążkowie, może pośredniczyć w wywołanej przez morfinę stymulacji lokomotorycznej. Sugestia ta jest zgodna z niektórymi obserwacjami na szczurach wskazującymi, że do aktywacji *c-fos* w grzbietowo-przyśrodkowym prążkowie dochodzi dopiero w odpowiedzi na kolejną z kilku dawek morfiny, wywołującą pobudzenie lokomotoryczne, ale nie na pierwsze podanie leku, które u szczurów wywołuje katalepsję (Curran

i wsp., 1996; Erdtmann-Vourliotis i wsp., 1998; D'Este i wsp., 2002). Jednocześnie, na podstawie naszych danych, aktywacja łupiny jądra półleżącego (mierzona indukcją IEG) nie wydaje się związana z zachowaniem ruchowym po podaniu morfiny, ponieważ zachodziła nie tylko w szczepie C57BL/6, ale również DBA/2, pomimo zupełnego braku stymulacji lokomotorycznej w drugim ze szczepów.

W naszych badaniach, w celu uzyskania jednoznacznego obrazu zmian ekspresji IEG, zastosowaliśmy wysoką dawkę morfiny (20 mg/kg), która działa nagradzająco u obu badanych szczepów myszy, jednak działanie to jest słabsze w szczepie DBA/2 niż C57BL/6 (Solecki i wsp., 2009). W powstaniu efektu nagradzającego mogą więc pośredniczyć te obszary mózgu, które są aktywowane u obu szczepów myszy, ale w niejednakowym stopniu. Taki profil indukcji IEG (z silniejszym efektem w szczepie C57BL/6) obserwowaliśmy w przedniej (ale nie grzbietowo-tylnej) części łupiny jądra półleżącego. Nasze wyniki wskazują więc przednią łupinę jako podregion prążkowiec prawdopodobnie zaangażowany w odczucie przyjemności wywołane podaniem opioidu, co dobrze wpisuje się w pogląd o specyficznym zaangażowaniu łupiny jądra półleżącego w procesy związane z nagrodą i wzmocnieniem pozytywnym (Pontieri i wsp., 1995; Barrot i wsp., 1999; Sellings i wsp., 2006; Shin i wsp., 2008; Duchesne i Boye, 2013). Co więcej, wyniki te są zgodne z opublikowanymi niedawno przez Castro i Berridge'a (2014) obserwacjami, że agoniści receptorów opioidowych wywołują warunkową preferencję miejsca po lokalnym podaniu do przedniej przyśrodkowej, ale nie tylnej przyśrodkowej części łupiny jądra półleżącego szczura.

Ponadto, stwierdzona przez nas różnica międzyszczepowa w zakresie indukcji *c-fos* w bocznej przegrodzie (słabsza indukcja lub jej brak u myszy C57BL/6; por. **Ziółkowska i wsp., 2015**) zwraca uwagę również na tę strukturę jako na potencjalne miejsce zróżnicowanego działania nagradzającego morfiny. Wydaje się to o tyle prawdopodobne, że boczna przegroda jest jednym z regionów przodomózgowia, do których opioidy są lokalnie samopodawane przez gryzonie (Cazala i wsp., 1998), a na jej udział w procesach wzmocnienia pozytywnego wskazuje także silna instrumentalna reakcja samodrażnienia (stymulacji elektrycznej) tej struktury przez szczury i myszy (Olds i Milner, 1954; Cazala i wsp., 1988).

W omawianej pracy (**Ziółkowska i wsp., 2015**) wykazaliśmy, że zachodzące w ciągu 30 min indukcje IEG wywołane morfiną lub samym stresem iniekcji są krótkotrwałe w sposób charakterystyczny dla IEG. Praktycznie we wszystkich analizowanych strukturach przodomózgowia poziomy odpowiednich mRNA były znacząco obniżone już po 1.5 godz. i wracały do wartości kontrolnych w ciągu 4 godz. Jednakże w niektórych częściach mózgu u myszy traktowanych morfiną dochodziło do ponownej indukcji genów *arc* i *zif268*, której maksimum występowało po 4 godz. od podania w szczepie DBA/2, a po 6 godz. w szczepie C57BL/6. Efekt ten był szczególnie silny w znacznej części grzbietowego prążkowiec, jedynej struktury mózgu, gdzie ta późna indukcja wyodrębniła się jednoznacznie jako osobny epizod. Znacznie podwyższone poziomy mRNA *arc* i *zif268* obserwowaliśmy po 4-6 godz. także w korze obręczy, a w niektórych przypadkach również w innych obszarach kory nowej (gen *arc* w szczepie C57BL/6; **Ziółkowska i wsp., 2015**). Przy użyciu metody hybrydyzacji *in situ* nie



wykryliśmy opóźnionego epizodu indukcji dla genu *c-fos*, choć wcześniejsze badania na ekstraktach prądkowia wskazują, że również i on ulega w tej strukturze indukcji w czasie 4-6 godz. po podaniu morfiny (Ziółkowska i wsp., 2012; Piechota i wsp., 2010).

Badania wykazały, że opóźniona indukcja IEG występuje u obu testowanych szczepów myszy, przy czym jest nieco słabsza w szczepie DBA/2 niż C57BL/6<sup>‡</sup>. Uzyskanie uprzednio odmiennych pod tym względem wyników przy użyciu analizy mikromacierzy (porównywalne nasilenie indukcji w szczepach, z pewną nawet przewagą u myszy DBA/2; Ziółkowska i wsp., 2012) było spowodowane faktem, że ekstrakty prądkowia w tym doświadczeniu były badane w czasie 4 godz. po podaniu morfiny, który jedynie dla szczepu DBA/2, ale nie C57BL/6, jest czasem maksymalnej indukcji IEG. Obserwacje te obrazują, jak ważne jest dokładne badanie przebiegów czasowych zmian w przypadku dynamicznej regulacji ekspresji genów.

Seria naszych publikacji (Ziółkowska i wsp., 2005; Ziółkowska i wsp., 2012; Ziółkowska i wsp., 2015; Piechota i wsp., 2010) stanowi pierwszy w literaturze opis opóźnionego epizodu indukcji IEG wywołanego podaniem opioidów. We wcześniejszych badaniach innych autorów nie wykryto takich zmian, gdyż koncentrowano się jedynie na krótkich czasach po podaniu leku (0.5 - 3 godz.). Dopiero ostatnio inni badacze po raz pierwszy wykazali indukcję *c-fos* w prądkowiu szczura 4 godz. po podaniu morfiny oraz dwóch innych substancji opioidowych (Belka i wsp., 2013).

Poznanie mechanizmu powstawania tej opóźnionej indukcji IEG po podaniu morfiny wydaje się interesujące i ważne. Pierwszym naszym przypuszczeniem było, że może ona wynikać z długotrwałej stymulacji glutaminianergicznego drogi korowo-prądkowiowej, związanej z wywołaną przez morfinę aktywacją lokomotoryczną. Temu przypuszczeniu przeczy jednak obserwacja, że wyraźna późna indukcja zachodzi nie tylko w szczepie C57BL/6, ale również DBA/2, który nie wykazuje silnej aktywacji lokomotorycznej po morfinie. Z badań mikromacierzowych wiadomo, że ten opóźniony epizod indukcji IEG występuje tylko po podaniu opioidów (morfiny i heroiny), ale nie innych substancji uzależniających (Piechota i wsp., 2010). Jego zahamowanie przez antagonistę receptorów opioidowych, nalokson, również wskazuje na specyficzny dla opioidów mechanizm (Ziółkowska i wsp., 2005 i dane niepublikowane). Wydaje się, że przyczynę opóźnionej indukcji IEG w prądkowiu może stanowić długotrwała stymulacja przez morfinę receptorów opioidowych zlokalizowanych w tej strukturze, skutkująca wytworzeniem zmian adaptacyjnych w komórkach, które ujawniają się w czasie, gdy stężenie morfiny w mózgu spada w wyniku jej metabolizmu. Najlepiej poznana adaptacją neuronu do długotrwałego działania opioidów jest zwiększenie reaktywności (sensytyzacja) wewnątrzkomórkowej ścieżki sygnałowej obejmującej aktywację cyklazy adenylanowej (CA), syntezę cAMP i, w konsekwencji, aktywację kinazy białkowej A (PKA). (Aktywność tej ścieżki jest hamowana podczas stymulacji receptora opioidowego, gdyż

---

<sup>‡</sup> Różnica ta była istotna statystycznie w przypadku genu *zif268* i na granicy istotności ( $p < 0.06$ ) dla *arc*, jak wykazała nie zamieszczona w publikacji trzyczynnikowa analiza wariancji (szczep x czas x podana substancja) dla czasów 1.5 - 8 godz.; znamieny efekt szczepu.



sprężone z nim białko  $G_{i/o}$  hamuje CA). W omawianej publikacji (Ziółkowska i wsp., 2015) przedstawiamy argumenty przemawiające za tym, że wysokie stężenie morfiny w mózgu po podaniu obwodowym utrzymuje się wystarczająco długo, by doprowadzić do wytworzenia w/w adaptacji komórkowej w neuronach prążkowiec. W chwili, gdy poziom morfiny znacznie spada, mogłoby to skutkować nasiloną odpowiedzią ścieżki sygnałowej CA – cAMP – PKA na obecne w prążkowiec pobudzające neuroprzekaźniki i stymulacją transkrypcji IEG poprzez mechanizmy zależne od PKA i czynnika transkrypcyjnego CREB. Proponujemy również inny mechanizm, związany z aktywacją szlaku kinaz MAP (*mitogen-activated protein*). Opóźniona aktywacja tej drogi sygnałowej obserwowana była w prążkowiec 2-4 godz. po obwodowym podaniu morfiny (Asensio i wsp., 2006 oraz niepublikowane obserwacje naszego zespołu) (Ziółkowska i wsp., 2015). Kinazy MAP aktywują przez fosforylację czynniki transkrypcyjne CREB oraz Elk-1 (działający na to samo miejsce w promotorach genów, co czynnik SRF) i w ten sposób mogą pośredniczyć w indukcji IEG. Wyjaśnienia powyższe wymagają eksperymentalnego potwierdzenia, warto jednak zauważyć, że proponowane mechanizmy są zgodne z wynikami analizy promotorów IEG indukowanych w prążkowiec myszy 4 godz. po podaniu morfiny, które wskazywały na transaktywację tych genów głównie poprzez miejsca wiążące czynniki CREB i SRF (Ziółkowska i wsp., 2012).

Odkryte przez nas opóźnione wzrosty ekspresji IEG w przodomózgowiu – podobnie jak indukcje zachodzące we wcześniejszym czasie po podaniu morfiny – mogą poprzez swoje konsekwencje komórkowe przyczyniać się do rozwoju uzależnienia opioidowego. Ukazują one nie znane dotychczas okno czasowe, w którym zapoczątkowywane są prawdopodobnie bardziej trwałe zmiany na poziomie struktury synaps i / lub ekspresji genów późnych.

Nasilenie indukcji IEG wywołanych przez morfinę może ulegać zmianom w efekcie jej wielokrotnego podawania, spowodowanym przez sensytyzację lub zahamowanie procesów komórkowych zaangażowanych w mechanizm indukcji. Dotychczas wykazaliśmy, że u myszy przewlekle traktowanych morfiną późna odpowiedź IEG na ostatnią z dawek leku była znacznie większa w szczepie C57BL/6 niż w szczepie DBA/2 (Ziółkowska i wsp., 2012). Sugeruje to różnice w rozwoju adaptacji do działania morfiny w tych dwóch szczepach i może iść w parze z różnicami w rozwoju fizycznego uzależnienia opioidowego (które jest silniejsze u myszy C57BL/6J; Oliverio i Castellano, 1974; Brase i wsp., 1977; Phillips i wsp., 1994). Kwestia ta jednak wymaga dalszych badań, gdyż powyższe wyniki uzyskaliśmy w oparciu o pomiar w tylko jednym punkcie czasowym. Może to być niewystarczające, gdyż późniejsze doświadczenia wykazały, że szczepy C57BL/6 i DBA/2 znacznie się różnią czasem, w którym opóźniona indukcja IEG osiąga maksimum.

Podsumowując tę część badań, wykazaliśmy, że obwodowa iniekcja morfiny powoduje w mózgu myszy trzy niezależne procesy indukcji IEG, z których dwa związane są specyficznie z działaniem morfiny, a trzeci spowodowany jest przez stres eksperymentalny. Indukcje te zachodzą w różnych częściach przodomózgowia oraz (częściowo) w różnym czasie. Wczesne

indukcje udaje się częściowo powiązać z behawioralnymi reakcjami na morfinę, natomiast późny epizod jest nowym zjawiskiem o nie do końca wyjaśnionym mechanizmie, lecz potencjalnie istotnym znaczeniu dla uzależnienia opioidowego.

## **II) Regulacja ekspresji genów peptydów opioidowych w modelach uzależnienia od kokainy i heroiny**

Powstawanie uzależnienia w rezultacie wielokrotnego przyjmowania substancji uzależniających sugeruje rozwój postępujących zmian w układach neuronalnych odpowiedzialnych za motywację, stany afektywne oraz automatyzację zachowań. Można sobie wyobrazić, że każda przyjęta dawka substancji wywołuje niewielkie zmiany, które z czasem ulegają akumulacji. Na poziomie pojedynczego neuronu najbardziej elementarną z takich zmian, o względnie trwałym charakterze (godziny - dni), jest zmiana poziomu ekspresji genów ważnych dla neuroprzeżywalności. Pośród nich na szczególną uwagę zasługują geny kodujące neuropeptydy, które regulują przeżywalność w układzie mezokortykolimbicznym i mezostriałnym.

Peptydy opioidowe, enkefaliny (pochodzące głównie z propeptydu proenkefaliny – PENK) i dynorfiny (pochodzące z propeptydu prodynorfiny – PDYN) występują w dużych ilościach w grzbiętym prążkowie i jądrze półleżącym, a także w środkowym jądrze migdałowatym. Są one wytwarzane przez większość miejscowych neuronów projekcyjnych, przy czym w prążkowie przez różne populacje tych komórek: gen PENK ulega ekspresji w populacji neuronów, które zawierają receptor dopaminowy D2 i tworzą projekcję do gałki bladej, natomiast gen PDYN ulega ekspresji w neuronach zawierających receptor dopaminowy D1, tworzących projekcję do części siatkowatej istoty czarnej, pola brzusznej nakrywki oraz jądra wewnątrzkonarowego (Gerfen, 1992). O ile w prążkowie grzbiętym segregacja ekspresji genów peptydów opioidowych jest niemal całkowita, w jądrze półleżącym jest więcej komórek o fenotypach mieszanych, w których geny PENK i PDYN ulegają koekspresji (Curran i Watson, 1995).

Peptydy pochodzące z PENK i PDYN pełnią ważne funkcje w procesach motywacji i hedonii, przy czym działanie tych dwóch grup peptydów jest przeciwstawne: dynorfiny, działające głównie przez receptor opioidowy  $\kappa$ , wywołują efekt awersyjny, natomiast enkefaliny, działające głównie na receptory  $\mu$  i  $\delta$ , mają efekt nagradzający i wywołują pozytywne wzmocnienie (Bals-Kubik i wsp., 1989; McBride i wsp., 1999; Tejada i wsp., 2012). Efekty te częściowo wynikają z wpływu peptydów opioidowych na przeżywalność dopaminową. Dynorfiny syntetyzowane w prążkowie / jądrze półleżącym hamują lokalnie uwalnianie dopaminy poprzez stymulację receptorów  $\kappa$  zlokalizowanych na dochodzących zakończeniach dopaminergicznych (Di Chiara i Imperato, 1988b; Spanagel i wsp., 1992). Enkefaliny (powstające poza prążkowie) pobudzają neurony dopaminowe na poziomie ich ciał komórkowych w polu brzusznej nakrywki i istocie czarnej (gdzie mechanizm polega na zniesieniu hamującego wpływu interneuronów GABAergicznych dzięki pobudzeniu

zlokalizowanych na nich receptorów  $\mu/\delta$ ) (Di Chiara i North, 1992; McBride i wsp., 1999). Ponadto jednak nagradzające działanie enkefalin, syntetyzowanych w podregionach prążkowie, wydaje się związane z pobudzeniem lokalnych receptorów  $\mu$  i  $\delta$ , gdyż podanie ich agonistów do jądra półleżącego wywołuje warunkową preferencję miejsca (Castro i Berridge, 2014) i instrumentalną reakcję samopodawania (Goeders i wsp., 1984). Na niezależny od dopaminy charakter tych efektów wskazuje fakt, iż nagradzające działanie opioidów jest zachowane nawet pod nieobecność dopaminy (Dworkin i wsp., 1988; Hnasko i wsp., 2005).

Analogicznie do dopaminy, enkefaliny prawdopodobnie pośredniczą w efektach nagradzających przynajmniej niektórych substancji uzależniających, ponieważ efekty te są zaburzone przez genetyczny knock-out genu PENK, receptora  $\mu$  lub podanie antagonistów receptorów  $\mu$  i / lub  $\delta$  (przeгляд literatury w pracy Gieryk, Ziółkowska i wsp., 2010). Choć rola mediatora nagrody może wynikać z działania enkefalin w obrębie śródmózgowia (na neurony dopaminowe) oraz innych struktur mózgu (np. podwzgórza), istotne znaczenie wydaje się też mieć zawierająca enkefaliny projekcja z jądra półleżącego do brzusznej części gałki bladej (*ventral pallidum*). Enkefaliny są uwalniane z tych neuronów po podaniu alkoholu, nikotyny, egzogennych opioidów, i prawdopodobnie także kokainy (Houdi i wsp., 1991; Olive i wsp., 1995; Olive i Maidment, 1998; Skoubis i Maidment, 2003; Mendez i wsp., 2005) Nasilenie przekazywania opioidowego w tej drodze działa nagradzająco, a zahamowanie – awersyjnie (Johnson i wsp., 1993; Johnson i Stellar, 1994; Skoubis i Maidment, 2003; Zubieta i wsp., 2003).

Podsumowując, wytwarzane przez neurony prążkowie peptydy opioidowe mogą wpływać na procesy nagrody trojako: (1) hamująco (dynorfiny) poprzez osłabienie przekazywania dopaminowego oraz pobudzająco (enkefaliny) (2) przez stymulację receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  w jądrze półleżącym oraz (3) w brzusznej gałce bladej. Zmiany ekspresji genów PENK i PDYN w podregionach prążkowie zachodzące w wyniku działania substancji uzależniających mogłyby zatem przyczynić się do rozwoju uzależnienia poprzez rozregulowanie w/w mechanizmów neuronalnych.

Ze względu na potencjalnie dużą wagę dla uzależnień, zmiany w układach opioidowych pod wpływem substancji uzależniających były wcześniej rozlegle badane. Liczne wyniki wskazywały, że podawanie tych substancji powoduje nasilenie ekspresji genu PDYN w prążkowie, natomiast wyniki dotyczące wpływu na gen PENK były bardziej zróżnicowane i niejednoznaczne. Do takich wniosków przyczyniły się istotnie uprzednie prace prowadzone przez zespół prof. Przewłockiego i prof. Przewłockiej, w którym podjęłam moje badania nad uzależnieniami (Turchan i wsp., 1997, 1998 oraz inne prace tych autorów).

O ile wcześniejsze badania tego zespołu dotyczyły modeli uzależnień polegających na podawaniu zwierzętom narkotyków przez eksperymentatora, współpraca w ramach projektu zamawianego "Podstawy neurobiologiczne, mechanizmy i metody profilaktyki oraz leczenia uzależnień" dała nam dostęp do modeli samopodawania środków uzależniających, w zakresie których zespoły partnerskie (prof. W. Kostowskiego / dr. R. Stefańskiego i prof. M. Filip) miały duże doświadczenie. W odróżnieniu od modeli, w których narkotyki podawane są zwierzętom przez eksperymentatora, modele samopodawania lepiej odzwierciedlają sposób przyjmowania

środków psychoaktywnych przez ludzi, ponieważ pobieranie substancji kontrolowane jest przez samo zwierzę i uzależnione od jego motywowanego zachowania.

W dwóch kolejnych publikacjach, które przedkładam jako podstawę mojego wniosku habilitacyjnego (Ziółkowska i wsp., 2006; Solecki, Ziółkowska i wsp., 2009), przedstawione są nasze badania, które miały na celu scharakteryzowanie zmian ekspresji genów PDYN i PENK w modelach uzależnień, odpowiednio, od kokainy i heroiny opartych na dożylnym samopodawaniu tych substancji przez szczury. Co więcej, zastosowaliśmy warianty tych modeli obejmujące tzw. sprzężoną kontrolę bierną, gdzie zwierzę samopodające sprzężone jest (poprzez komputerowo sterowaną aparaturę) z innym zwierzęciem, które w tym samym czasie otrzymuje identyczne dawki substancji biernie tj. niezależnie od swoich reakcji behawioralnych. Badania wskazują bowiem, że niektóre efekty substancji uzależniających (w tym także zmiany ekspresji genów) są spowodowane przez procesy kognitywne i motywacyjne związane z ich aktywnym pobieraniem, a nie tylko przez ich działanie farmakologiczne (Jacobs i wsp., 2003). Zastosowanie sprzężonej kontroli biernej umożliwiło rozróżnienie tych dwóch rodzajów efektów, co wcześniej nie było badane w odniesieniu do genów peptydów opioidowych. Do pomiaru ekspresji genów użyliśmy metody hybrydyzacji *in situ*, co pozwoliło na półilościową analizę poziomów odpowiednich mRNA w kilku podregionach prążkowiec oraz w środkowym jądrze migdałowatym.

W rezultacie długotrwałego (5-6 tygodni) dożylnego samopodawania kokainy i heroiny u szczurów, 4-24 godz. po ostatniej sesji samopodawania stwierdziliśmy wzrosty ekspresji genu PDYN w grzbietowym prążkowiec (po kokainie) lub w łupinie jądra półleżącego przegrody (po heroinie). Istotne nasilenie ekspresji genu PDYN zachodziło po heroinie także w środkowym jądrze migdałowatym; po kokainie obserwowaliśmy podobną wyraźną tendencję wzrostową, jednak nieznamienne statystycznie (Ziółkowska i wsp., 2006; Solecki, Ziółkowska i wsp., 2009). Bardziej szczegółowa analiza lokalizacji zmian wywołanych przez kokainę w grzbietowym prążkowiec wykazała, że do wzrostu ekspresji genu PDYN dochodzi w ćwiartkach grzbietowo-bocznej, grzbietowo-przyśrodkowej oraz brzuszno-przyśrodkowej tej struktury, natomiast nie w ćwiartce brzuszno-bocznej (Ziółkowska i wsp., 2006). Warto zauważyć, że lokalizacja zmian wywołanych przez obie substancje w podregionach prążkowiec jest zbliżona do rozmieszczenia indukcji IEG wywołanych ich jednorazowym podaniem. (Ponieważ heroina ma podobny mechanizm działania jak morfina, wywołuje zmiany o podobnym rozmieszczeniu, jak w przypadku wczesnego epizodu indukcji IEG po morfinie, opisanego w poprzednim podrozdziale, z wyraźną aktywacją IEG w łupinie jądra półleżącego [D'Este i wsp., 2002]. Natomiast podanie kokainy powoduje szybką indukcję IEG w przyśrodkowym oraz grzbietowo-bocznym prążkowiec, z wyraźnym pominięciem części brzuszno-bocznej oraz jądra półleżącego; obrazy indukcji genów *arc* i *zif268* po kokainie zamieszczone są w jednej z naszych prac – Ziółkowska i wsp., 2011.) Podobieństwo rozmieszczenia wzrostów ekspresji IEG i genu PDYN można tłumaczyć tym, że w obu przypadkach dochodzi do zmian wyłącznie w populacji neuronów prążkowiec / jądra półleżącego zawierających receptor D1, i za pośrednictwem pobudzenia tego receptora przez dopaminę, której poziom w prążkowiec wzrasta po podaniu kokainy i heroiny (Hanson i wsp., 1987; Graybiel i wsp., 1990; Gerfen, 1992; Moratalla i wsp., 1992; Liu i wsp.,



1994; Cole i wsp., 1995; Bontempi i Sharp, 1997; Harlan i Garcia, 1998; Ziółkowska, 2001; Enoksson i wsp., 2012). Można więc przypuszczać, że do zmian poziomów mRNA IEG i PDYN dochodzi w tych samych komórkach.

Wzrosty ekspresji genu PDYN były identyczne u zwierząt samopodających, jak u sprzężonych szczurów otrzymujących kokainę i heroinę biernie<sup>5</sup>. Dane te wskazują, że obserwowane zmiany wynikają wyłącznie z farmakologicznego działania zastosowanych narkotyków, a nie z procesów kognitywnych i motywacyjnych związanych z ich samopodawaniem (Ziółkowska i wsp., 2006; Solecki, Ziółkowska i wsp., 2009).

Wiele badań wskazuje, że wzrosty poziomu mRNA PDYN w prążkowie prowadzą do podwyższenia poziomów peptydów pochodzących z PDYN, dynorfin (Wee i Koob, 2010; Tejeda i wsp., 2012). Ponieważ, jak wcześniej wspomniano, dynorfiny wpływają hamująco na uwalnianie dopaminy w prążkowie poprzez stymulację presynaptycznych receptorów opioidowych  $\kappa$  na zakończeniach dopaminowych, nasilenie ekspresji genu PDYN przez długotrwałe stosowane narkotyki ma prawdopodobnie istotne znaczenie dla funkcji układu nagrody. Zwiększona ekspresja PDYN może prowadzić do rozwoju tolerancji na nagradzające działanie tej samej substancji (poprzez osłabienie przez dynorfiny odpowiedzi układu dopaminowego na jej kolejne dawki). Ponieważ utrzymuje się ona przez okres do kilku dni po zaprzestaniu pobierania narkotyku (Turchan i wsp., 1997, 1998; Piechota i wsp., 2012), może również przyczyniać się do stanów anhedonii i apatii związanych z zespołami odstawiennymi (poprzez zmniejszenie odpowiedzi układu dopaminowego na wszelkie bodźce nagradzające). Taką rolę PDYN i jej pochodnych peptydów potwierdzają badania farmakologiczne i genetyczne u zwierząt (Wee i Koob, 2010; Tejeda i wsp., 2012). Również nasze własne badania na wsobnych szczepach myszy, różniących się podstawowym poziomem ekspresji PDYN w jądrze półleżącym, wykazały, że zwierzęta o stosunkowo wysokiej ekspresji genu PDYN (szczepy DBA/2 i SWR) są mało wrażliwe na nagradzające efekty narkotyków oraz, że tę genetycznie uwarunkowaną anhedonię można zmniejszyć przez podanie antagonisty receptorów opioidowych  $\kappa$ , który blokuje działanie endogennych dynorfin (Gieryk, Ziółkowska i wsp., 2010). Ponadto, badania polimorfizmów genetycznych u ludzi wskazują na związek genu PDYN (w tym także poziomu jego ekspresji w prążkowie) z podatnością na uzależnienia (Zimprich i wsp., 2000; Dahl i wsp., 2005; Nomura i wsp., 2006; Yuferov i wsp., 2009).

Opisane tu nasilenie ekspresji PDYN w efekcie pobierania kokainy i heroiny interpretujemy jako zmianę kompensacyjną, ograniczającą skutki ponownego przyjęcia narkotyku. Tego typu mechanizm przyczynia się prawdopodobnie do podtrzymywania uzależnienia w fazie aktywnego pobierania substancji, stanowiąc podłoże wzmocnienia negatywnego (unikania „kary”, jaką stanowią objawy odstawienia) oraz utrudnia utrzymywanie

---

<sup>5</sup> W tym samym eksperymencie z kokainą, przy użyciu tej samej metody, udało się wykazać różnice w regulacji innego genu (receptora dopaminowego D<sub>2</sub>) między zwierzętami samopodającymi a sprzężoną kontrolą bierną, co wskazuje, że brak różnic między tymi grupami dla genu PDYN nie wynikał z niedostatecznej czułości metody (Stefański, Ziółkowska i wsp., 2007).



przez osobę uzależnioną abstynencji w jej wczesnym okresie. Nie wydaje się on jednak mieć znaczenia po dłuższym czasie abstynencji, ponieważ, jak wykazały późniejsze badania, poziom ekspresji PDYN wraca do wartości podstawowych w czasie nie przekraczającym 12 dni od zaprzestania podawania narkotyków (Piechota i wsp., 2012).

Element badań dotyczący sprzężonej kontroli biernej sugeruje, że negatywne stany emocjonalne rozwijające się w czasie odstawienia przewlekle podawanych środków uzależniających mogą być niezależne od tego, czy substancja jest aktywnie pobierana, czy podawana biernie. Może mieć to znaczenie zarówno przy ocenie danych ze zwierzęcych modeli uzależnień, jak i w klinice – np. w przypadku pacjentów leczonych analgetykami opioidowymi.

Jednoczesne badania ekspresji genu PENK, kodującego peptydy o działaniu nagradzającym, nie wykazały istotnych zmian jego poziomu w przedomózgowiu w wyniku samopodawania lub biernego otrzymania kokainy lub heroiny. Jakkolwiek w nielicznych modelach uzależnienia od psychostymulantów i opiatów stwierdzono wcześniej regulację ekspresji tego genu, większość danych wskazuje na brak wpływu środków uzależniających na jego ekspresję (przegląd literatury w pracach: Ziółkowska i wsp., 2006; Solecki, Ziółkowska i wsp., 2009). Również inne nasze badania w ostatnich latach nie wykazały zmian ekspresji genu PENK w prądkowiu myszy w efekcie samopodawania alkoholu lub przewlekłych podań morfiny i nikotyny (Gieryk, 2008). Te w przeważającej mierze negatywne wyniki wskazują, że regulacja ekspresji genu PENK przez środki uzależniające nie jest istotnie zaangażowana w mechanizm wspólny dla różnych uzależnień (Ziółkowska i wsp., 2006; Solecki, Ziółkowska i wsp., 2009).

### III) Regulacja ekspresji $\alpha$ -synukleiny w modelach uzależnienia od morfiny i alkoholu

Gen kodujący  $\alpha$ -synukleinę został wybrany do badań w oparciu o wyniki oceny globalnej ekspresji genów wykonanej przy użyciu metody TOGA (*Total Gene Expression Analysis*; Sutcliffe i wsp., 2000) podczas pobytu prof. Przewłockiego w Instytucie Scripps. Badanie to doprowadziło do wskazania transkryptów, w tym m. in. mRNA  $\alpha$ -synukleiny, których poziomy ulegały zmianom w mózgu myszy w modelu uzależnienia opioidowego (kilkudniowa implantacja pelet uwalniających morfina).  $\alpha$ -synukleina jest białkiem występującym bardzo obficie w układzie nerwowym. Jest najbardziej znana ze swojej roli w chorobach neurodegeneracyjnych (zwłaszcza w chorobie Parkinsona, gdzie stanowi główny składnik ciał Lewy'ego), jednak jej fizjologiczna funkcja nie jest w pełni jasna (Vekrellis i wsp., 2004).  $\alpha$ -synukleina jest białkiem wewnątrzkomórkowym i występuje głównie w zakończeniach aksonów, gdzie oddziałuje z pęcherzykami synaptycznymi, a także szeregiem różnych białek (Iwai i wsp., 1995; Clayton i George, 1999; Vekrellis i wsp., 2004). Jest obecna w dużej ilości w neuronach dopaminowych i wydaje się działać jako negatywny regulator przekaźnictwa dopaminowego, ponieważ zmniejsza aktywność i ekspresję enzymów zaangażowanych w syntezę dopaminy, wpływa na funkcję transportera dopaminowego oraz hamuje uwalnianie dopaminy wywołane wielokrotną

stymulacją (Abeliovich i wsp., 2000; Perez i wsp., 2002; Baptista i wsp., 2003; Wersinger i Sidhu, 2003; Yavich i wsp., 2004; Larsen i wsp., 2006). Chociaż w początkowym okresie naszego zainteresowania  $\alpha$ -synukleina były znane tylko niektóre z tych przesłanek, jej prawdopodobny wpływ na aktywność układu dopaminowego oraz wstępnie stwierdzona regulacja jej genu przez morfinę, a także przez psychostymulanty (Brenz Verca i wsp., 2003; Mash i wsp., 2003) skłoniły nas do szerszych badań nad regulacją ekspresji tego genu i białka w modelu uzależnienia od morfiny, a następnie także alkoholu (Ziółkowska i wsp., 2005; Ziółkowska i wsp., 2008).

Nasze badania wykazały, że przewlekle podawana morfina powoduje *obniżenie* poziomu mRNA  $\alpha$ -synukleiny w grzbietowym prążkowie, jądrze półleżącym i podstawno-bocznym jądrze migdałowatym myszy. Jednak, jak wykazaliśmy metodą Western blot, poziom białka  $\alpha$ -synukleiny ulegał w tych strukturach regulacji w przeciwnym kierunku: dochodziło do znacznego *wzrostu* poziomu tego białka w prążkowie (wraz z jądrem półleżącym) oraz zespole jąder migdałowatych. Poziom  $\alpha$ -synukleiny był podwyższony wyłącznie u zwierząt, które wcześniej wielokrotnie otrzymywały wysokie dawki morfiny i były od niej fizycznie uzależnione, ale nie po jednorazowym podaniu leku. Wzrost ten był charakterystyczny dla okresu odstawienia: był obserwowany 48 godz., ale nie 4 godz. po ostatnim podaniu opiatu i nadal wykrywalny 2 tygodnie po ostatnim podaniu morfiny. Natomiast w próbkach śródmózgowia, zawierających ciała neuronów dopaminowych, nie stwierdziliśmy zmian poziomu  $\alpha$ -synukleiny w żadnym punkcie czasowym (Ziółkowska i wsp., 2005). Ponieważ w żadnej części mózgu nie wykryliśmy wzrostu poziomu mRNA  $\alpha$ -synukleiny, obserwowane wzrosty poziomu tego białka przypisujemy raczej zmianom tempa jego translacji lub procesów potranslacyjnych, a nie zmianom transkrypcyjnym.

Choć poziom mRNA  $\alpha$ -synukleiny jest wysoki w prążkowie i podstawno-bocznej części ciała migdałowatego, co wskazuje na transkrypcję genu w neuronach tych struktur, wykonane przez nas badania immunohistochemiczne wykazały, że białko  $\alpha$ -synukleina jest tam zlokalizowane wyłącznie w neurytach, prawdopodobnie w presynaptycznych zakończeniach aksonów. Ponieważ prążkowie i podstawno-boczne jądro migdałowate składają się w przeważającej mierze z neuronów projekcyjnych, wydaje się, że przeciwstawne zmiany poziomów mRNA i białka  $\alpha$ -synukleiny w tych częściach mózgu mogłyby wynikać z regulacji mRNA i białka w różnych populacjach neuronów. Jednocześnie presynaptyczna lokalizacja tego białka sugeruje, że  $\alpha$ -synukleina po odstawieniu opioidów ulega nagromadzeniu w dochodzących do prążkowie i jąder migdałowatych zakończeniach neuronów dopaminowych lub glutaminianergicznym.

Ponieważ  $\alpha$ -synukleina hamuje syntezę i uwalnianie dopaminy, jej akumulacja w strukturach docelowych układu mezokortykolimbicznego mogłaby przyczynić się do następującego w okresie odstawienia opioidów osłabienia przekaźnictwa dopaminergicznego, odpowiedzialnego za związane z odstawieniem negatywne stany afektywne (Ziółkowska i wsp., 2005). Funkcjonalne znaczenie nagromadzenia  $\alpha$ -synukleiny w prążkowie / jądrze półleżącym

byłoby więc podobne do roli wzrostu ekspresji genu PDYN. Przy tym jednak, podwyższony poziom  $\alpha$ -synukleiny utrzymuje się dłużej (co najmniej 2 tygodnie), co pozostaje w zgodzie z kilkutygodniowym – po odstawieniu morfiny - okresem obniżonej zdolności zakończeń dopaminowych do uwalniania neuroprzekaźnika i lokalizacją (przynajmniej niektórych) odpowiedzialnych za to zmian w zakończeniach aksonów, a nie w ciałach neuronów dopaminowych (Tjon i wsp., 1993; Ghosh i wsp., 1998).

W ostatnim czasie duże zainteresowanie wzbudza udział  $\alpha$ -synukleiny także w innych uzależnieniach, zwłaszcza w uzależnieniu od alkoholu. Badania Lianga i wsp. (2003) wykazały, że gen  $\alpha$ -synukleiny jest w genomie szczura położony w obrębie *locus* cechy ilościowej dla poziomu spożycia alkoholu, a ekspresja tego genu w mózgu jest wyższa w linii szczurów o wysokiej preferencji alkoholu niż w linii o niskiej preferencji. Również badania u ludzi wskazują na związek polimorfizmów genu  $\alpha$ -synukleiny z występowaniem alkoholizmu (Bonsch i wsp., 2005b; Foroud i wsp., 2007), a pomiary poziomów mRNA i białka  $\alpha$ -synukleiny we krwi alkoholików wykazały wyższe ich poziomy niż u osób zdrowych. Co więcej, poziomy te były skorelowane z natężeniem „głodu” alkoholowego we wczesnym okresie abstynencji (Bonsch i wsp., 2004, 2005a).

Obserwacje te sugerowały istotne znaczenie  $\alpha$ -synukleiny w uzależnieniu alkoholowym, jednak nie wskazywały żadnego mechanizmu jej działania, który mógłby przyczyniać się do rozwoju tej choroby. W szczególności nie pokazywały, czy spożycie alkoholu wpływa na ekspresję genu i białka  $\alpha$ -synukleiny w mózgu. Pomiarów ich poziomów u ludzi (a także u małp; Walker i Grant, 2006) dokonywano jedynie we krwi, podczas, gdy nie istniały żadne przesłanki wskazujące na ewentualne podobieństwo regulacji  $\alpha$ -synukleiny we krwi i w mózgu.

Aby wyjaśnić te kwestie, zastosowaliśmy prosty model uzależnienia alkoholowego, w którym myszy C57BL/6 przez 5 tygodni pobierały doustnie 8% roztwór alkoholu w układzie dwubutelkowym (polegającym na swobodnym wyborze między roztworem alkoholu a czystą wodą przy stałym dostępie do obu płynów). Szczep C57BL/6 cechuje wysoka preferencja alkoholu i w opisanych warunkach myszy pobierają znaczące jego ilości (Ziółkowska i wsp., 2008). W efekcie długotrwałego pobierania alkoholu nie stwierdziliśmy zmian poziomu mRNA  $\alpha$ -synukleiny w żadnej z badanych struktur mózgowia, tych samych, które wcześniej badaliśmy w uzależnieniu morfinowym. Natomiast, podobnie jak w przypadku odstawienia opioиду, poziom białka  $\alpha$ -synukleiny wzrastał po odstawieniu przewlekle pobieranego alkoholu. Tak jak w poprzednim modelu, zmiany te zachodziły dopiero po pewnym czasie (24 godz. – 48 godz.), ale nie bezpośrednio (2 godz.) po przerwaniu dostępu do alkoholu. W odróżnieniu od odstawienia opioიდowego, do wzrostu poziomu  $\alpha$ -synukleiny dochodziło wyłącznie w zespole jąder migdałowatych, ale nie w prążkowi (Ziółkowska i wsp., 2008).

A zatem akumulacja  $\alpha$ -synukleiny w jądrach migdałowatych wydaje się wspólna dla odstawienia opioიდowego i alkoholowego. Zastosowana przez nas metoda pomiaru (Western blot na ekstraktach całego ciała migdałowatego) nie pozwala stwierdzić dokładnie, w których jądrach zachodziły zmiany, jednak co najmniej dwa jądra migdałowate – środkowe i podstawno-boczne –

mają krytyczne znaczenie dla stanów związanych z abstynencją. Zwiększona aktywność jądra środkowego odpowiada za lęk i dysfориę w zespołach odstawienia wszystkich substancji uzależniających, natomiast aktywacja jądra podstawno-bocznego odpowiada za stany „głodu” substancji, wywołane zwłaszcza przez bodźce warunkowe uprzednio skojarzone z ich pobieraniem (Knapp i wsp., 1998; Panagis i wsp., 2000; Gracy i wsp., 2001; Shaham i wsp., 2003; Bossert i wsp., 2005). Zdolność  $\alpha$ -synukleiny do presynaptycznej regulacji aktywności zakończeń dopaminowych (które są obecne w obu jądrach), a także glutaminianergicznym, oraz udział jąder migdałowatych w powstawaniu w/w objawów odstawienia i łaknienia substancji sugeruje udział  $\alpha$ -synukleiny w tych procesach (Ziółkowska i wsp., 2008).

Choć potwierdzenie takiego znaczenia  $\alpha$ -synukleiny wymaga dalszych badań funkcjonalnych, ukazujące się wyniki kolejnych prac są zasadniczo zgodne z naszymi propozycjami, sugerując, że  $\alpha$ -synukleina ogranicza efekty bodźców nagradzających poprzez zahamowanie przekazywania dopaminergicznego, a jej wysoki poziom predysponuje do nadużywania substancji uzależniających (Liang i wsp., 2003; Oksman i wsp., 2006; Pelkonen i wsp., 2010).

U myszy, które wcześniej długotrwale pobierały alkohol oceniliśmy ekspresję genu  $\alpha$ -synukleiny również we krwi. Stwierdziliśmy wzrost poziomu mRNA  $\alpha$ -synukleiny we krwi po 48 godz. (ale nie 24 godz.) od odstawienia alkoholu. Zmiana ta była ogólnie zgodna z obserwacjami u ludzi i małp (Bonsch i wsp., 2004, 2005a Walker i Grant, 2006), ale wydawała się nie mieć związku ze zmianami ekspresji  $\alpha$ -synukleiny w mózgu, ponieważ zachodziła później oraz poprzez inny mechanizm (regulacja na poziomie transkrypcji, a nie translacji i procesów potranslacyjnych). Wnioskujemy więc, że zmiany ekspresji  $\alpha$ -synukleiny we krwi w okresie odstawienia alkoholowego nie mogą być interpretowane w kontekście jej regulacji i funkcji w mózgu, jak to próbowali czynić badacze naczelnych (Ziółkowska i wsp., 2008).

## Podsumowanie

- Nasze badania indukcji IEG w przodomózgowiu myszy wywołanych jednorazowym podaniem morfiny wykazały, że po podaniu leku do indukcji dochodzi dwukrotnie, po 30 min i 4-6 godz. (Ziółkowska i wsp., 2015).
- Na podstawie różnic w rozmieszczeniu wczesnej indukcji pomiędzy szczepami myszy, które wykazują odmienne odpowiedzi behawioralne na opioidy, wskazaliśmy grzbietowo-przyśrodkową część grzbietowego prążkowiego regionu mózgu prawdopodobnie pośredniczący w aktywacji lokomotorycznej wywołanej przez morfinę. Wyniki sugerują także zaangażowanie przedniej części łupiny jądra półleżącego (ale nie części tylnoprzyśrodkowej) oraz bocznego jądra przegrody w procesy związane z nagradzającym działaniem opioidów (Ziółkowska i wsp., 2015).



- Drugi, opóźniony epizod indukcji IEG po podaniu morfiny jest nowo odkrytym przez nas zjawiskiem. Przy użyciu technik mikromacierzowych wskazaliśmy, które geny zależne od aktywności ulegają w tym czasie indukcji, a w oparciu o analizę ich promotorów zaproponowaliśmy mechanizm transaktywacji ich transkrypcji z udziałem czynników CREB i SRF (Ziółkowska i wsp., 2012). Stosując metodę hybrydyzacji *in situ* opisaliśmy dokładny przebieg czasowy zmian i ich lokalizację w przodomózgowiu, stwierdzając, że do indukcji dochodzi przede wszystkim w grzbietowym prążkowiu, a w mniejszym stopniu także w korze mózgowej (Ziółkowska i wsp., 2015).
- Biorąc pod uwagę funkcje IEG regulowanych po podaniu morfiny oraz lokalizację zmian ich ekspresji, sugerujemy, że oba epizody indukcji mogą mieć znaczenie dla rozwoju uzależnienia opioidowego.
- Badania regulacji ekspresji genów peptydów opioidowych, PDYN i PENK, w wyniku długotrwałego dożylnego samopodawania kokainy i heroiny wykazały wzrosty ekspresji genu PDYN w obszarach grzbietowego lub brzuszego prążkowie (odpowiednio, po kokainie i heroinie) oraz w środkowym jądrze migdałowatym (Ziółkowska i wsp., 2006; Solecki, Ziółkowska i wsp., 2009).
  - Ponieważ peptydy pochodzące z PDYN mają hamujący wpływ na przekąźnictwo dopaminowe, stwierdzona regulacja genu PDYN wydaje się zmianą kompensacyjną, ograniczającą aktywność układu nagrody. Może ona prowadzić do rozwoju tolerancji na nagradzające działanie narkotyków oraz przyczyniać się do negatywnych stanów afektywnych (zwłaszcza anhedonii) we wczesnym okresie odstawienia substancji uzależniających.
  - Wykazaliśmy ponadto, że regulacja ekspresji genu PDYN przez kokainę i heroinę wynika wyłącznie z farmakologicznego działania obu narkotyków, a nie zależy od procesów motywacyjnych i poznawczych związanych z aktywnym pobieraniem obu substancji w tych samych dawkach (Ziółkowska i wsp., 2006; Solecki, Ziółkowska i wsp., 2009).
- Stwierdziliśmy, że w okresie odstawienia (24-48 godz.) po długotrwałym stosowaniu morfiny lub alkoholu dochodzi do akumulacji białka  $\alpha$ -synukleiny w ciele migdałowatym (bez wzrostu poziomu odpowiedniego mRNA). Po odstawieniu morfiny poziom  $\alpha$ -synukleiny wzrastał również w prążkowiu i w obu strukturach wzrost ten utrzymywał się przez co najmniej 2 tygodnie (Ziółkowska i wsp., 2005, 2008).
  - W oparciu o funkcję  $\alpha$ -synukleiny jako negatywnego regulatora przekąźnictwa dopaminowego, działającego wewnątrz zakończeń dopaminowych, proponujemy, że obserwowane wzrosty poziomu  $\alpha$ -synukleiny mogą przyczyniać się do osłabienia transmisji dopaminergicznej, które jest charakterystyczne dla zespołów odstawienia i może utrzymywać się przez kilka tygodni.



- Znaczenie wzrostu poziomu  $\alpha$ -synukleiny, przynajmniej w prążkowie / jądrze półleżącym może więc być podobne do proponowanej roli wzrostu ekspresji genu PDYN, aczkolwiek w przypadku  $\alpha$ -synukleiny efekty są nieco opóźnione i bardziej trwałe. Obie zmiany mogą powodować deficyt funkcji układu nagrody i anhedonię w okresie odstawienia.
- Dwa spośród jąder migdałowatych pełnią ważną rolę w uzależnieniach. Nadaktywność jądra środkowego jest związana z emocjonalnymi objawami odstawienia – lękiem i dysforią, natomiast jądra podstawno-bocznego – ze stanami „głodu” substancji prowadzącymi do nawrotu ich pobierania. Nagromadzenie  $\alpha$ -synukleiny w ciele migdałowatym, jak również wzrost ekspresji genu PDYN w jądrze środkowym wskazują na możliwość udziału  $\alpha$ -synukleiny i dynorfina w powstawaniu stanów awersyjnych po odstawieniu substancji oraz „głodu” u osobników wcześniej długotrwałe przyjmujących narkotyki.
- Zmiany ekspresji genu PDYN oraz  $\alpha$ -synukleiny zachodzące w wyniku przyjmowania narkotyków wydają się więc być czynnikami podtrzymującymi uzależnienie, przyczyniającymi się do powstania negatywnych stanów afektywnych, które utrudniają podjęcie i utrzymanie abstynencji.

*Wspólny dla punktów 4c i 5 spis literatury znajduje się na końcu dokumentu.*

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.**

Moje zainteresowanie neurofarmakologią molekularną i neurobiologią datuje się od okresu studiów. Już pod koniec studiów trafiłam do Instytutu Farmakologii PAN, gdzie w kierowanym przez prof. Ryszarda Przewłockiego Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej (wówczas Zakładzie Badań Neuropeptydów) wykonałam badania do pracy magisterskiej. Z zakładem tym jestem związana do tej pory i dominująca w nim problematyka badawcza w dużej mierze zdeterminowała moje zainteresowania naukowe. Tematem moich prac jest regulacja ekspresji genów w mózgu przez środki psychotropowe, przy czym badania te skupiały się szczególnie na strukturach przodomózgowia związanych z układem dopaminowym i charakterystycznych dla nich genach peptydów opioidowych, genach związanych z przekazywaniem dopaminergicznym, a także genach wczesnej odpowiedzi komórkowej.

W latach 1992-1993 odbyłam dwuletni staż na Uniwersytecie w Monachium, w laboratorium prof. Volkera Höllta. Byłam tam zatrudniona w projekcie dotyczącym schorzeń zwojów podstawy i wykonywałam badania nad wpływem zaburzeń przekazywania dopaminergicznego na ekspresję genów w grzbietowym prążkowie, stosując model choroby Parkinsona polegający na uszkodzeniu istoty czarnej przez neurotoksynę MPTP oraz model zaburzeń pozapiramidowych (parkinsonizmu polekowego) wywołanych podaniem haloperidolu.

- W modelu parkinsonizmu wywołanego MPTP, pomimo znacznego (ok. 90%) spadku poziomu dopaminy w prążkowie nie stwierdziliśmy trwałych zmian ekspresji genów PENK i PDYN, będących markerami dwóch głównych populacji neuronów projekcyjnych tej części mózgu, ani zmian ich reaktywności na pobudzenie mierzone odpowiedzią genu *c-fos* na agonistę receptora D1 lub antagonistę receptora D2 (Ziółkowska i wsp., 1995).
- Silniejszym środkiem modelującym zahamowanie przekaźnictwa dopaminergicznego, wywołującym wyraźne zmiany w neuronach postsynaptycznych w prążkowie okazało się podanie haloperidolu, klasycznego neuroleptyku będącego preferencyjnym antagonistą receptora D2. Jego jednorazowe podanie powodowało indukcję genu *c-fos*, jak również innych IEG, w prążkowie grzbietowym (Ziółkowska i Höllt, 1993; **Ziółkowska, 2001**), a podanie wielokrotne prowadziło do wzrostu ekspresji genu PENK (Ziółkowska i Höllt, 1995).

Obserwacje te zainspirowały mnie do prowadzenia dalszych badań w dwóch kierunkach: 1) wykorzystania indukcji genu *c-fos* wywołanej przez haloperidol jako markera aktywacji neuronów drogi prążkowiowo-bladej (zawierających receptor dopaminowy D2) w celu zbadania udziału różnych obecnych w prążkowie neuroprzekaźników w regulacji aktywności tych neuronów; 2) zbadania potencjalnego udziału białka c-Fos, będącego jednym z komponentów czynnika transkrypcyjnego AP-1, w regulacji ekspresji genu PENK. Badania te, rozpoczęte w Monachium i kontynuowane w Krakowie, w Instytucie Farmakologii, stanowiły podstawę mojej pracy doktorskiej.

- Stwierdziliśmy, że indukcja genu *c-fos* wywołana przez haloperidol jest zależna od stymulacji receptora NMDA przez kwas glutaminowy (Ziółkowska i Höllt, 1993), a późniejsze badania wykazały także zaangażowanie acetylocholiny (działającej przez receptory muskarynowe) oraz tlenu azotu (Ziółkowska, 1999). Podobne mechanizmy regulacji w prążkowie stwierdziliśmy też dla dwóch innych IEG, *junB* i *c-jun* (Ziółkowska, 1999; **Ziółkowska, 2001**).
- Wykazaliśmy, że białko c-Fos nie pośredniczy w transaktywacji transkrypcji genu PENK w prążkowie po podaniu haloperidolu (Ziółkowska i Höllt, 1995), natomiast może pośredniczyć w aktywacji ekspresji genów PENK i PDYN, jaka zachodzi w zwoju zębatym formacji hipokampa podczas drgawek wywołanych przez kwas kainowy (Ziółkowska i wsp., 1998).

Po ukończeniu doktoratu zajęłam się głównie problematyką badawczą związaną z uzależnieniami lekowymi. Wyniki niektórych badań z tego zakresu, które nie stanowią podstawy mojego wniosku habilitacyjnego, ale do których wniosłam znaczący wkład, są wspomniane w głównej części autoreferatu (Ziółkowska i wsp., 2005; Stefański i wsp., 2007; Gieryk i wsp., 2010). Byłam również zaangażowana w badania nad mechanizmami nawrotu samopodawania

kokainy, gdzie poprzez pomiary indukcji IEG mapowaliśmy aktywację struktur mózgowych podczas nawrotu reakcji instrumentalnej wywołanego dawką przypominającą kokainy lub bodźcem warunkowym (Ziółkowska i wsp., 2011).

W latach 2007-2010 uczestniczyłam w realizacji projektu europejskiego PHECOMP, który oprócz uzależnień lekowych dotyczył także modeli zaburzeń kompulsywnych związanych z nadmiernym spożyciem atrakcyjnego pokarmu przez gryzonia, powodującym otyłość. Dokonaliśmy oceny regulacji ekspresji genów peptydów opioidowych i markerów układu dopaminowego w trzech modelach opracowanych przez partnerów z projektu: jeden polegał na instrumentalnym samopodawaniu pelet pokarmu o smaku czekoladowym, a dwa na pobieraniu, w warunkach nieograniczonego dostępu, pokarmu złożonego głównie z czekolady. Porównanie z wynikami uzyskanymi w modelach uzależnień lekowych pozwoliło stwierdzić, że długotrwałe pobieranie atrakcyjnego pokarmu nie prowadzi do wzrostu ekspresji genu PDYN w prążkowiu, który jest typowy dla uzależnień lekowych, natomiast powoduje charakterystyczną regulację poziomu mRNA receptora D<sub>2</sub> w jądrze półleżącym (Martín-García i wsp., 2011 oraz dane jeszcze nie opublikowane).

Brałam udział w badaniach nad aktywnością układów opioidowych w zwierzęcych modelach zaburzeń neurorozwojowych: modelu okresowej separacji noworodków od matki oraz modelu autyzmu wywołanego ekspozycją na kwas walproinowy w okresie prenatalnym. W obu modelach obserwowaliśmy obniżoną ekspresję genu PENK w prążkowiu, przy czym w modelu autyzmu zmiany były trwałe i wydawały się przyczyniać do nasilonego lęku oraz zaburzeń hedonii u zwierząt dorosłych (D'Amato i wsp., 2007; Schneider i wsp., 2007).

Uczestniczyłam w planowaniu i wykonaniu w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej pierwszej globalnej analizy ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy DNA, w której to technice w późniejszym okresie wyspecjalizowali się inni koledzy z Zakładu (Rodriguez Parkitna i wsp., 2004; Piechota i wsp., 2010).

W ostatnim czasie zajmowałam się badaniem rozmieszczenia indukcji IEG w mózgu wywołanych przez leki przeciwdepresyjne o różnych farmakologicznych mechanizmach działania. Celem było 1) poszukiwanie miejsc aktywacji wspólnych dla działania różnych leków przeciwdepresyjnych jako regionów mózgu potencjalnie zaangażowanych w regulację nastroju przez te leki oraz 2) potwierdzenie mechanizmu działania tianeptyny związanego ze stymulacją przekazywania katecholaminergicznego. Wstępne wyniki tych badań zamieszczone są w publikacji Korostyńskiego i wsp. (2013), natomiast rezultaty dokładniejszych analiz przygotowuję obecnie do publikacji.

*B. Ziółkowska*



## Literatura

- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239–252.
- Asensio VJ, Miralles A, Garcí'a-Sevilla JA. (2006) Stimulation of mitogen-activated protein kinase kinases (MEK1/2) by mu-, delta and kappa-opioid receptor agonists in the rat brain: regulation by chronic morphine and opioid withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 539: 49–56.
- Bals-Kubik R, Herz A, Shippenberg TS. (1989) Evidence that the aversive effects of opioid antagonists and kappa-agonists are centrally mediated. *Psychopharmacology* 98: 203–206.
- Baptista MJ, O'Farrell C, Daya S, Ahmad R, Miller DW, Hardy J, Farrer MJ, Cookson MR. (2003) Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *J. Neurochem.* 85: 957–968.
- Barrot M, Marinelli M, Abrous DN, Rougé-Pont F, Le Moal M, Piazza PV. (1999) Functional heterogeneity in dopamine release and in the expression of Fos-like proteins within the rat striatal complex. *Eur. J. Neurosci.* 11: 1155–1166.
- Belkař E, Crété D, Courtin C, Noble F, Marie-Claire C. (2013) Comparison of the transcriptional responses induced by acute morphine, methadone and buprenorphine. *Eur. J. Pharmacol.* 711: 10–18.
- Belknap JK, Crabbe JC, Riggan J, O'Toole LA. (1993) Voluntary consumption of morphine in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology* 112: 352–358.
- Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR. (1998) A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J. Neurosci.* 18: 5301–5310.
- Bonsch D, Greifenberg V, Bayerlein K, Biermann T, Reulbach U, Hillemacher T, Kornhuber J, Bleich S. (2005a) Alpha-synuclein protein levels are increased in alcoholic patients and are linked to craving. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29: 763–765.
- Bonsch D, Lederer T, Reulbach U, Hothorn T, Kornhuber J, Bleich S. (2005b) Joint analysis of the NACP-REP1 marker within the alpha synuclein gene concludes association with alcohol dependence. *Hum. Mol. Genet.* 14: 967–971.
- Bonsch D, Reulbach U, Bayerlein K, Hillemacher T, Kornhuber J, Bleich S. (2004) Elevated alpha synuclein mRNA levels are associated with craving in patients with alcoholism. *Biol. Psych.* 56: 984–986.
- Bontempi B, Sharp FR. (1997) Systemic morphine-induced Fos protein in the rat striatum and nucleus accumbens is regulated by mu opioid receptors in the substantia nigra and ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 17: 8596–8612.
- Bossert JM, Ghitza UE, Lu L, Epstein DH, Shaham Y. (2005) Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: an update and clinical implications. *Eur. J. Pharmacol.* 526: 36–50.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF. (2008) The immediate early gene Arc/Arg3.1: regulation, mechanisms, and function. *J. Neurosci.* 28: 11760–11767.
- Brenz Verca MS, Bahl A, Boyer F, Wagner GC, Dreyer J-L. (2003) Distribution of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -synucleins in the adult rat brain and their modification by high-dose cocaine treatment. *Eur. J. Neurosci.* 18: 1923–1938.
- Brase DA, Loh HH, Way EL. (1977) Comparison of the effects of morphine on locomotor activity, analgesia and primary and protracted physical dependence in six mouse strains. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 201: 368–374.
- Chang SL, Squinto SP, Harlan RE. (1988) Morphine activation of c-fos expression in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 698–704.
- Castro DC, Berridge KC. (2014) Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness "liking" and "wanting". *J. Neurosci.* 34: 4239–4250.
- Cazala P, Galey D, Durkin T. (1988) Electrical self-stimulation in the medial and lateral septum as compared to the lateral hypothalamus: differential intervention of reward and learning processes? *Physiol. Behav.* 44: 53–59.

- Cazala P, Norena A, Le Merrer J, Galey D. (1998) Differential involvement of the lateral and medial divisions of the septal area on spatial learning processes as revealed by intracranial self-administration of morphine in mice. *Behav. Brain Res.* 97: 179–188.
- Chang SL, Squinto SP, Harlan RE. (1988) Morphine activation of c-fos expression in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 698-704.
- Clayton DF, George JM. (1999) Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* 58: 120–129.
- Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE. (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* 14: 813-823.
- Curran EJ, Akil H, Watson SJ. (1996) Psychomotor stimulant- and opiate-induced c-fos mRNA expression patterns in the rat forebrain: comparisons between acute drug treatment and a drug challenge in sensitized animals. *Neurochem. Res.* 21: 1425–1435.
- Curran EJ, Watson SJ Jr. (1995) Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 361: 57-76.
- Dahl JP, Weller AE, Kampman KM, Oslin DW, Lohoff FW, Ferraro TN, O'Brien CP, Berrettini WH. (2005) Confirmation of the association between a polymorphism in the promoter region of the prodynorphin gene and cocaine dependence. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 139B: 106–108.
- D'Amato FR, Barakos E, Ziólkowska B, Obara I, Przewłocka B, Pavone F. (2007) Mild postnatal manipulation reduces proenkephalin mRNA in the striatum in developing mice and increases morphine conditioned place preference in adulthood. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87: 122-129.
- D'Este L, Scontrini A, Casini A, Pontieri FE, Renda TG. (2002) Heroin sensitization as mapped by c-Fos immunoreactivity in the rat striatum. *Brain Res.* 933: 144–149.
- Di Chiara G, Imperato A. (1988a) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5274–5278.
- Di Chiara G, Imperato A. (1988b) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 1067–1080.
- Di Chiara G, North RA. (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 185-193.
- Duchesne V, Boye SM. (2013) Differential contribution of mesoaccumbens and mesohabenular dopamine to intracranial self-stimulation. *Neuropharmacology* 70: 43-50.
- Dworkin SI, Guerin GF, Co C, Goeders NE, Smith JE. (1988) Lack of an effect of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens on intravenous morphine self-administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30: 1051-1057.
- Enoksson T, Bertran-Gonzalez J, Christie MJ. (2012) Nucleus accumbens D2- and D1-receptor expressing medium spiny neurons are selectively activated by morphine withdrawal and acute morphine, respectively. *Neuropharmacology* 62: 2463-2471.
- Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Grecksch G, Höllt V. (1998) Identification of brain regions that are markedly activated by morphine in tolerant but not in naive rats. *Mol. Brain Res.* 61: 51-61.
- Foroud T, Wetherill LF, Liang T, Dick DM, Hesselbrock V, Kramer J, Nurnberger J, Schuckit M, Carr L, Porjesz B, Xuei X, Edenberg HJ (2007) Association of alcohol craving with alpha-synuclein (SNCA). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 31: 537–545.
- Frankel PS, Garcia MM, Harlan RE. (1999a) Infusion of beta-FNA into the thalamus attenuates morphine-induced c-Fos induction in the rat caudate putamen. *Brain Res.* 838: 222-226.
- Frankel PS, Harlan RE, Garcia MM. (1999b) Role of the dorsal raphe nucleus in morphine-induced immediate early gene expression in the rat striatum. *Brain Res.* 842: 220-223.
- Fuxe K, Agnati LF, Rosén L, Bjelke B, Cintra A, Bortolotti F, Tinner B, Andersson C, Hasselroth U, Steinbusch H, et al. (1991) Computer-assisted image analysis techniques allow a characterization of the compartments within the basal ganglia. Focus on



- functional compartments produced by d-amphetamine activation of the c-fos gene and its relationship to the glucocorticoid receptor. *J. Chem. Neuroanat.* 4.:355-372.
- Garcia MM, Brown HE, Harlan RE. (1995) Alterations in immediate-early gene proteins in the rat forebrain induced by acute morphine injection. *Brain Res.* 692: 23-40.
- Gieryk A. (2008) Udział genów opioidowych w mechanizmach uzależnień lekowych. Praca doktorska. Instytut Farmakologii PAN, Kraków.
- Gieryk A, Ziółkowska B, Solecki W, Kubik J, Przewłocki R. (2010) Forebrain PENK and PDYN gene expression levels in three inbred strains of mice and their relationship to genotype-dependent morphine reward sensitivity. *Psychopharmacology (Berl)*. 208: 291-300.
- Gerfen CR. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 15: 133-139.
- Ghosh S, Patel AH, Cousins M, Grasing K. (1998) Different effects of opiate withdrawal on dopamine turnover, uptake, and release in the striatum and nucleus accumbens. *Neurochem. Res.* 23: 875– 885.
- Goeders NE, Lane JD, Smith JE. (1984) Self-administration of methionine enkephalin into the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20: 451-455.
- Gracy KN, Dankiewicz LA, Koob GF. (2001) Opiate withdrawal-induced Fos immunoreactivity in the rat extended amygdala parallels the development of conditioned place aversion. *Neuropsychopharmacology* 24: 152–160.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA. (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6912-6916.
- Gwynn GJ, Domino EF. (1984) Genotype-dependent behavioral sensitivity to mu vs. kappa opiate agonists. I. Acute and chronic effects on mouse locomotor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231: 306-311.
- Hanson GR, Merchant KM, Letter AA, Bush L, Gibb JW. (1987) Methamphetamine-induced changes in the striatal-nigral dynorphin system: role of D1 and D2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 144: 245-246.
- Harlan RE, Garcia MM. (1998) Drugs of abuse and immediate-early genes in the forebrain. *Mol. Neurobiol.* 16: 221-267.
- Herdegen T, Leah JD. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB / ATF proteins. *Brain Res. Rev.* 28: 370-490.
- Hitzemann B, Hitzemann R. (1997) Genetics ethanol and the Fos response: a comparison of the C57BL/6J and DBA/2J inbred mouse strains. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21: 1497-1507.
- Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD. (2005) Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature* 438: 854-857.
- Houdi AA, Pierzchala K, Marson L, Palkovits M, Van Loon GR. (1991) Nicotine-induced alteration in Tyr-Gly-Gly and Met-enkephalin in discrete brain nuclei reflects altered enkephalin neuron activity. *Peptides* 12: 161–166.
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T. (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14: 467–475.
- Jacobs EH, Smit AB, de Vries TJ, Schoffelmeer AN. (2003) Neuroadaptive effects of active versus passive drug administration in addiction research. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 566–573.
- Johnson PL, Stellar JR. (1994) Comparison of delta opiate receptor agonist induced reward and motor effects between the ventral pallidum and dorsal striatum. *Neuropharmacology* 33: 1171–1182.
- Johnson PL, Stellar JR, Paul AD. (1993) Regional reward differences within the ventral pallidum are revealed by microinjections of a mu opiate receptor agonist. *Neuropharmacology* 32: 1305–1314.
- Kaczmarek L, Chaudhuri A. (1997): Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res. Rev.* 23: 237-256.

- Knapp DJ, Duncan GE, Crews FT, Breese GR. (1998) Induction of Fos-like proteins and ultrasonic vocalizations during ethanol withdrawal: further evidence for withdrawal-induced anxiety. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22: 481–493.
- Koob GF, Le Moal M. (2006) What is addiction? In: *Neurobiology of Addiction*. Elsevier, 2006, Ch. 1, pp. 1-22.
- Korostyński M, Piechota M, Dzbek J, Młynarski W, Szklarczyk K, Ziółkowska B, Przewłocki R. (2013) Novel drug-regulated transcriptional networks in brain reveal pharmacological properties of psychotropic drugs. *BMC Genomics* 14: 606.
- Lanahan A, Worley P. (1998) Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70: 37-43.
- Larsen KE, Schmitz Y, Troyer MD, Mosharov E, Dietrich P, Quazi AZ, Savalle M, Nemani V, Chaudhry FA, Edwards RH, Stefanis L, Sulzer D. (2006) Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J. Neurosci.* 26: 11915–11922.
- Liang ., Spenc, J, Liu L, Strother WN, Chang HW, Ellison JA, Lumeng L, Li TK, Foroud T, Carr LG. (2003) Alpha-synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4690–4695.
- Liu W, Crews FT. (2015) Adolescent Intermittent ethanol exposure enhances ethanol activation of the nucleus accumbens while blunting the prefrontal cortex responses in adult rat. *Neuroscience* 293: 92-108.
- Liu J, Nickolenko J, Sharp FR. (1994) Morphine induces c-fos and junB in striatum and nucleus accumbens via D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8537-8541.
- Lv XF, Xu Y, Han JS, Cui CL. (2011) Expression of activityregulated cytoskeleton-associated protein (Arc/Arg3.1) in the nucleus accumbens is critical for the acquisition, expression and reinstatement of morphine-induced conditioned place preference. *Behav. Brain Res.* 223: 182–191.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14: 433-45.
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 18: 22-29.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. (1987) Autoradiographic Differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7: 2445-2464.
- Markou A, Kosten TR, Koob GF. (1998) Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18: 135–174.
- Martin-García E, Burokas A, Kostrzewa E, Gieryk A, Korostyński M, Ziółkowska B, Przewłocka B, Przewłocki R, Maldonado R. (2011) New operant model of reinstatement of food-seeking behavior in mice. *Psychopharmacology* 215: 49-70.
- Mash DC, Ouyang Q, Pablo J, Basile M, Izenwasser S, Lieberman A, Perrin RJ. (2003) Cocaine abusers have an overexpression of  $\alpha$ -synuclein in dopamine neurons. *J. Neurosci.* 23: 2564 –2571.
- McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S. (1999) Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav. Brain Res.* 101: 129-152.
- Mendez M, Barbosa IG, Perez JM, Cupo A, Oikawa I. (2005) Ethanol differentially stimulates the in vivo release of met-enkephalin from the rat nucleus accumbens. *ISN, J. Neurochem.* 94:(Supl 12) 94.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM. (1992) Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. *J. Neurosci.* 12: 2609-2622.
- Morgan JJ, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. (1987): Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237: 192-197.
- Murphy NP, Lam HA, Maidment NT. (2001) A comparison of morphine-induced locomotor activity and mesolimbic dopamine release in C57BL6, 129Sv and DBA2 mice. *J. Neurochem.* 79: 626-635.

- Nomura A, Ujike H, Tanaka Y, Otani K, Morita Y, Kishimoto M, Morio A, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiya T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S. (2006) Genetic variant of prodynorphin gene is risk factor for methamphetamine dependence. *Neurosci. Lett.* 400: 158–162.
- Oksman M, Tanila H, Yavich L. (2006) Brain reward in the absence of alpha-synuclein. *Neuroreport* 17: 1191–1194.
- Oliverio A, Castellano C. (1974) Genotype-dependent sensitivity and tolerance to morphine and heroin: dissociation between opiate-induced running and analgesia in the mouse. *Psychopharmacologia* 39: 13-22.
- Olds J, Milner P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 47 :419–427.
- Olive MF, Bertolucci M, Evans CJ, Maidment NT. (1995) Microdialysis reveals a morphine-induced increase in pallidal opioid peptide release. *Neuroreport* 6: 1093–1096.
- Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW. (2001) Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J. Neurosci.* 21:RC184.
- Olive MF, Maidment NT (1998) Opioid regulation of pallidal enkephalin release: bimodal effects of locally administered mu and delta opioid agonists in freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 28: 1310–1316.
- Orsini C, Bonito-Oliva A, Conversi D, Cabib S. (2005) Susceptibility to conditioned place preference induced by addictive drugs in mice of the C57BL/6 and DBA/2 inbred strains. *Psychopharmacology* 181: 327-336.
- Panagis G, Hildebrand BE, Svensson TH, Nomikos GG. (2000) Selective c-fos induction and decreased dopamine release in the central nucleus of amygdala in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Synapse* 35: 15–25.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.* 22: 3090–3099.
- Phillips TJ, Dickinson S, Burkhart-Kasch S. (1994) Behavioral sensitization to drug stimulant effects in C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Behav. Neurosci.* 108: 789-803.
- Pelkonen A, Hiltunen M, Kiiianmaa K, Yavich L. (2010) Stimulated dopamine overflow and alpha-synuclein expression in the nucleus accumbens core distinguish rats bred for differential ethanol preference. *J. Neurochem.* 114: 1168-76.
- Piechota M, Korostynski M, Sikora M, Golda S, Dzbek J, Przewlocki R. (2012) Common transcriptional effects in the mouse striatum following chronic treatment with heroin and methamphetamine. *Genes Brain Behav.* 11: 404-414.
- Piechota M, Korostynski M, Solecki W, Gieryk A, Ślęzak M, Bilecki W, Ziolkowska B, Kostrzewa E, Cymerman I, Swiech L, Jaworski J, Przewlocki R. (2010) The dissection of transcriptional modules regulated by various drugs of abuse in the mouse striatum. *Genome Biol.* 11: R48.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12304-12308.
- Rodriguez Parkitna JM, Bilecki W, Mierzejewski P, Stefański R, Ligeza A, Bargieła A, Ziolkowska B, Kostowski W, Przewlocki R. (2004) Effects of morphine on gene expression in the rat amygdala. *J. Neurochem.* 91: 38-48.
- Rosetti ZL, Hmaidan Y, Gessa GL. (1992) Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 221: 227–234.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. (1988): Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240: 1328-1331.
- Schneider T, Ziolkowska B, Gieryk A, Tyminska A, Przewlocki R. (2007) Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone and emotional responses in an animal model of autism. *Psychopharmacology* 193: 547-555.

- Schoffelmeer AN, Hansen HA, Stoof JC, Mulder AH. (1985) Inhibition of dopamine-stimulated cyclic AMP efflux from rat neostriatal slices by activation of mu- and delta-opioid receptors: a permissive role for D-2 dopamine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 118: 363-366.
- Sellings LH, McQuade LE, Clarke PB. (2006) Evidence for multiple sites within rat ventral striatum mediating cocaine-conditioned place preference and locomotor activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317: 1178-1187.
- Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J. (2003) The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology* 168: 3-20.
- Shin R, Qin M, Liu ZH, Ikemoto S. (2008) Intracranial self-administration of MDMA into the ventral striatum of the rat: differential roles of the nucleus accumbens shell, core, and olfactory tubercle. *Psychopharmacology* 198: 261-270.
- Skoubis PD, Maidment NT. (2003) Blockade of ventral pallidal opioid receptors induces a conditioned place aversion and attenuates acquisition of cocaine place preference in the rat. *Neuroscience* 119:241-249.
- Solecki W, Turek A, Kubik J, Przewlocki R. (2009) Motivational effects of opiates in conditioned place preference and aversion paradigm--a study in three inbred strains of mice. *Psychopharmacology* 207: 245-255.
- Solecki W, Ziółkowska B, Krówka T, Gieryk A, Filip M, Przewlocki R. (2009) Alterations of prodynorphin gene expression in the rat mesocorticolimbic system during heroin self-administration. *Brain Res.* 1255: 113-121.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS. (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2046-2050.
- Stefański R, Ziółkowska B, Kuśmider M, Mierzejewski P, Wyszogrodzka E, Kołomańska P, Dziedzicka-Wasylewska M, Przewlocki R, Kostowski W. (2007) Active versus passive cocaine administration: differences in the neuroadaptive changes in the brain dopaminergic system. *Brain Res.* 1157: 1-10.
- Tejeda HA, Shippenberg TS, Henriksson R. (2012) The dynorphin/ $\kappa$ -opioid receptor system and its role in psychiatric disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* 69: 857-896.
- Tempel A, Zukin RS. (1987) Neuroanatomical patterns of the  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4308-4312.
- Tjon GHK, De Vries TJ, Wardeh G, Hogenboom F, Mulder AH, Schoffelmeer ANM. (1993) Long-lasting reciprocal changes in striatal dopamine and acetylcholine release upon morphine withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 235: 321-322.
- Turchan J, Lasoń W, Budziszewska B, Przewlocka B. (1997) Effects of single and repeated morphine administration on the prodynorphin, proenkephalin and dopamine D2 receptor gene expression in the mouse brain. *Neuropeptides* 31: 24-28.
- Turchan J, Przewlocka B, Lasoń W, Przewlocki R. (1998) Effects of repeated psychostimulant administration on the prodynorphin system activity and kappa opioid receptor density in the rat brain. *Neuroscience* 85:1051-1059.
- Vekrellis K, Rideout HJ, Stefanis L. (2004) Neurobiology of  $\alpha$ -synuclein. *Mol. Neurobiol.* 30: 1-22.
- Walker SJ, Grant KA. (2006) Peripheral blood alpha-synuclein mRNA levels are elevated in cynomolgus monkeys that chronically self-administer ethanol. *Alcohol* 38: 1-4.
- Wee S, Koob GF. (2010) The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology* 210: 121-135.
- Wersinger C, Sidhu A. (2003) Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* 340: 189-192.
- Yavich L, Tanila H, Vepsäläinen S, Jakala P. (2004) Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J. Neurosci.* 24: 11165-11170.



- Yuferov V, Ji F, Nielsen DA, Levran O, Ho A, Morgello S, Shi R, Ott J, Kreek MJ. (2009) A functional haplotype implicated in vulnerability to develop cocaine dependence is associated with reduced PDYN expression in human brain. *Neuropsychopharmacology* 34: 1185–1197.
- Zimprich A, Kraus J, Wöltje M, Mayer P, Rauch E, Höllt V. (2000) An allelic variation in the human prodynorphin gene promoter alters stimulus-induced expression. *J. Neurochem.* 74: 472–477.
- Ziółkowska B.** (1999) Mechanizmy regulacji ekspresji genu proenkefalinowego w wybranych strukturach mózgu. Praca doktorska. Instytut Farmakologii PAN, Kraków.
- Ziółkowska B.** (2001) Pomiary ekspresji indukowalnych czynników transkrypcyjnych w badaniach układu nerwowego. Wykłady Monograficzne., Nr 58. Instytut Farmakologii PAN, Kraków, str. 1-23.
- Ziółkowska B,** Gieryk A, Bilecki W, Wawrzczak-Bargieła A, Wędzony K, Chocyk A, Danielson PE, Thomas EA, Hilbush BS, Sutcliffe JG, Przewłocki R. (2005) Regulation of  $\alpha$ -synuclein gene expression in limbic and motor brain regions of morphine-treated mice. *J. Neurosci.* 25: 4996-5003.
- Ziółkowska B,** Gieryk A, Solecki W, Przewłocki R. (2015) Temporal and anatomic patterns of immediate-early gene expression in the forebrain of C57BL/6 and DBA/2 mice after morphine administration. *Neuroscience* 284: 107–124.
- Ziółkowska B,** Gieryk A, Wawrzczak-Bargieła A, Krówka T, Kamińska D, Korkosz A, Bieńkowski P, Przewłocki R. (2008)  $\alpha$ -Synuclein expression in the brain and blood during abstinence from chronic alcohol drinking in mice. *Neuropharmacology* 54: 1239-1246.
- Ziółkowska B,** Horn G, Kupsch A, Höllt V. (1995) The expression of proenkephalin and prodynorphin genes and the induction of c-fos gene by dopaminergic drugs are not altered in the striatum of MPTP-treated mice. *J. Neural Transm. (P-D Sect.)* 9: 151-164.
- Ziółkowska B,** Höllt V. (1993) The NMDA receptor antagonist MK-801 markedly reduces the induction of c-fos gene by haloperidol in the mouse striatum. *Neurosci. Lett.* 156: 39-42.
- Ziółkowska B,** Höllt V. (1995) Fos is not involved in the regulation of the proenkephalin gene by haloperidol in the mouse striatum. *Mol. Brain Res.* 34: 351-354.
- Ziółkowska B,** Kielbiński M, Gieryk A, Soria G, Maldonado R, Przewłocki R. (2011) Regulation of the immediate-early genes arc and zif268 in a mouse operant model of cocaine seeking reinstatement. *J. Neural Transm.* 118: 877-887.
- Ziółkowska B,** Korostyński M, Piechota M, Kubik J, Przewłocki R. (2012) Effects of morphine on immediate-early gene expression in the striatum of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Pharmacol. Rep.* 64: 1091-1104.
- Ziółkowska B,** Przewłocka B, Mika J, Łabuz D, Przewłocki R. (1998) Evidence for Fos involvement in the regulation of proenkephalin and prodynorphin gene expression in the rat hippocampus. *Mol. Brain Res.* 54: 243-251.
- Ziółkowska B,** Przewłocki R. (2002) Methods used in inducible transcription factor studies: focus on mRNA. W: Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 19: Immediate Early Genes and Inducible Transcription Factors in Mapping of the Central Nervous System Function and Dysfunction, red. L. Kaczmarek, H.A. Robertson, Rozdz. 1. Elsevier Science B.V., str. 1-38.
- Ziółkowska B,** Stefański R, Mierzejewski P, Zapart G, Kostowski W, Przewłocki R. (2006) Contingency does not contribute to the effects of cocaine self-administration on prodynorphin and proenkephalin gene expression in the rat forebrain. *Brain Res.* 1069: 1-9.
- Ziółkowska B,** Urbański MJ, Wawrzczak-Bargieła A, Bilecki W, Przewłocki R. (2005) Morphine activates Arc expression in the mouse striatum and in mouse neuroblastoma Neuro2A MOR1A cells expressing mu-opioid receptors. *J. Neurosci. Res.* 82: 563-570.
- Zubieta JK, Ketter TA, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Young EA, Koeppe RA. (2003) Regulation of human affective responses by anterior cingulate and limbic mu-opioid neurotransmission. *Arch. Gen. Psychiatry* 60: 1145–1153.

B Ziółkowska