

**Wiktoria Mrozek**

**Badanie roli ko-transmisji serotonergicznej  
i glutaminianergicznej w ciele migdałowatym jako  
neuromodulatora emocji w uzależnieniu**

Praca doktorska  
wykonana w Pracowni Pamięci Przestrzennej  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**  
**dr hab. Adam Hamed**

**PROMOTOR POMOCNICZY:**  
**dr Miron Kursa**

Warszawa, 2024



## **Podziękowania**

*Niniejszą pracę doktorską pragnę zadedykować wszystkim, którzy przyczynili się do jej powstania, wspierając mnie w różnorodny sposób na drodze do zdobycia stopnia doktora.*

*Przede wszystkim chciałabym serdecznie podziękować mojemu promotorowi, dr hab. Adamowi Hamedowi, za jego nieoceniony mentoring, niezłomny optymizm i kształtowanie mnie jako naukowca. Jestem ogromnie wdzięczna za wszystkie cenne wskazówki, inspirujące dyskusje i motywację do ciągłego rozwoju.*

*Szczególne podziękowania kieruję również do mojego promotora pomocniczego, dr Mirona Kursy, za jego bezcenną pomoc w zawiłościach obliczeń statystycznych oraz mnóstwo ciekawostek opowiadanych podczas dyskusji naukowych, które stale pobudzały moją ciekawość świata.*

*Z całego serca dziękuję mojemu mężowi, Michałowi, za to, że jest najwspanialszym słuchaczem moich teorii naukowych, opowieści związanych z pracą i marudzenia podczas pisania.*

*Chciałabym serdecznie podziękować dr hab. Rafałowi Czajkowskiemu oraz moim współpracownikom z Pracowni Pamięci Przestrzennej za ogrom ciekawych rozmów, inspirującej wymiany myśli i tworzenie środowiska zachęcającego do pracy.*

*Na koniec pragnę złożyć największe podziękowania moim rodzicom, Urszuli i Rafałowi, oraz moim siostram, Laurze i Glorii, za bycie moimi największymi kibicami przez całą drogę do zdobycia stopnia doktora. Dziękuję wam za nieustanną wiarę w moje możliwości i niezachwiane przekonanie, że uda mi się osiągnąć sukces.*

**Badania zrealizowane w niniejszej pracy doktorskiej wykonano w ramach projektu badawczego OPUS 2018/29/B/NZ7/02021 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.**



N A R O D O W E   C E N T R U M   N A U K I



## Spis treści

<b>Streszczenie</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Wykaz stosowanych skrótów oraz ważnych pojęć</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Wstęp</b> .....	<b>14</b>
1.1. Zaburzenia związane z używaniem substancji.....	14
1.1.1. Nadużywanie opioidów w ujęciu globalnym.....	16
1.2. Uzależnienie w ujęciu behawioralnym .....	18
1.2.1. Wzmocnienie pozytywne.....	19
1.2.2. Tolerancja .....	20
1.2.3. Głód narkotykowy .....	21
1.2.4. Inkubacja głodu narkotykowego (pragnienia) .....	22
1.3. Selektywna manipulacja aktywnością neuroprzekaźników przy użyciu wektorów wirusowych DREADD .....	23
1.3.1. System neuroprzekaźnictwa.....	24
1.3.2. Receptory .....	26
1.3.2.1. Receptory jonotropowe.....	27
1.3.2.2. Receptory metabotropowe .....	28
1.3.3. Chemogenetyka.....	30
1.3.4. Technika DREADD .....	30
1.3.4.1. Wektory wirusowe .....	31
1.3.4.2. Syntetyczne ligandy aktywujące receptory DREADD .....	34
1.4. Układ nagrody i struktury mózgowie modulujące uzależnienie .....	35
1.5. Modelowanie uzależnień .....	38
1.5.1. Klasyczne modele badania uzależnień.....	38
1.5.2. Modele behawioralne w ujęciu współczesnym – wokalizacje ultradźwiękowe szczurów .....	39
1.5.3. Wokalizacje ultradźwiękowe w badaniach nad uzależnieniami.....	44
1.6. Hipoteza dotycząca roli ko-transmisji serotonergiczno – glutaminianergicznj	45
<b>2. Cele pracy</b> .....	<b>48</b>
<b>3. Materiały i metody</b> .....	<b>49</b>
3.1. Szczury rasy Long-Evans .....	49
3.2. Leki, odczynniki i wybrane substancje chemiczne.....	49
3.3. Klatka eksperymentalna.....	52
3.4. Rejestracja wokalizacji ultradźwiękowych.....	52
3.5. Procedury eksperymentalne .....	53
3.5.1. Handling (Oswajanie) .....	53
3.5.2. Procedura Ticklingu (Łaskotania).....	54
3.5.3. Operacje stereotaktyczne iniekcji konstruktów wirusowych.....	54
3.5.4. Warunkowanie miejsca i okres odstawienia .....	57
3.5.5. Test odpowiedzi kontekstowej.....	57

3.6. Przetwarzanie danych behawioralnych.....	58
3.6.1. Dane audio .....	58
3.6.2. Dane video .....	59
3.7. Przygotowanie tkanek do analizy .....	60
3.8. Analiza ilościowa poziomu wybranych monoamin i aminokwasów z wykorzystaniem spektrometrii masowej.....	62
3.9. Barwienia immunohistochemiczne .....	63
3.9.1. Przygotowanie tkanek do barwienia .....	63
3.9.2. Barwienia immunohistochemiczne.....	64
3.9.3. Barwienie neuronów serotonergicznyc	
tryptofanowej .....	65
3.10. Analiza statystyczna.....	66
3.10.1. Przygotowanie wykresów pudełkowych i obliczanie istotności statystycznej.....	66
3.10.2. Korelacje .....	66
3.10.3. Algorytm Boruta .....	67
3.10.4. Graf korelacji neurochemicznych .....	69
<b>4. Wyniki.....</b>	<b>71</b>
4.1. Analiza behawioralna.....	72
4.1.1. Analiza wokalizacji ultradźwiękowych .....	72
4.1.2. Analiza dystansu .....	74
4.2. Analiza relacji behavior – neurochemia (z wykorzystaniem algorytmu Boruta) 76	
4.2.1. Analiza neurochemii w kontekście wokalizacji ultradźwiękowych 76	
4.2.2. Analiza neurochemii w kontekście dystansu .....	78
4.3. Analiza neurochemii w badanych strukturach mózgowych .....	82
4.3.1. Neurochemia ciała migdałowatego.....	82
4.3.2. Neurochemia jądra półleżącego .....	91
4.3.3. Neurochemia prążkowie .....	100
4.3.4. Neurochemia pola brzusznej nakrywki.....	109
4.3.5. Neurochemia przyśrodkowej kory przedczołowej.....	118
4.3.6. Neurochemia hipokampa .....	127
4.3.7. Neurochemia kory retrosplenialnej.....	136
4.3.8. Analiza korelacji neuroprzekazników w badanych strukturach .....	145
<b>5. Dyskusja.....</b>	<b>148</b>
5.1. Wpływ manipulacji chemogenetycznych na odpowiedź kontekstową mierzona liczbą emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych .....	148
5.1.1. Relacja między odpowiedzią kontekstową a ticklingiem .....	150
5.2. Wpływ manipulacji chemogenetycznych na odpowiedź kontekstową mierzona przebytym dystansem.....	153
5.3. Relacja między wokalizacjami ultradźwiękowymi a przebytym dystansem jako miarami odpowiedzi kontekstowej .....	155
5.4. Relacja między wokalizacjami ultradźwiękowymi a neurochemią .....	156

5.4.1. Grupa "5-HT-": możliwe mechanizmy neurochemiczne leżące u podstaw redukcji liczby wokalizacji ultradźwiękowych .....	157
5.4.2. Grupa "Glu+5-HT+": możliwe mechanizmy neurochemiczne leżące u podstaw zwiększenia liczby wokalizacji ultradźwiękowych .....	161
5.4.3. Grupa "Glu+5-HT-": możliwe mechanizmy neurochemiczne leżące u podstaw redukcji wokalizacji ultradźwiękowych .....	162
5.4.4. Między strukturalne relacje systemów neurotransmisyjnych .....	165
<b>6. Podsumowanie i wnioski.....</b>	<b>167</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>170</b>
<b>8. Publikacje .....</b>	<b>206</b>
<b>9. Suplement .....</b>	<b>207</b>

## Streszczenie

Głód narkotykowy to intensywne pragnienie lub potrzeba zaangażowania się w określone zachowanie związane z używaniem substancji psychoaktywnych. Inkubacja głodu narkotykowego to zjawisko stopniowego wzrostu nasilenia objawów głodu narkotykowego w czasie zwiększające prawdopodobieństwo nawrotu po ekspozycji na bodźce skojarzone z przyjmowaniem substancji. Badania wykazały, że ponowna ekspozycja na kontekst skojarzony z podaniem morfiny, po okresie odstawienia, wywołuje zwiększoną emisję wokalizacji ultradźwiękowych (USV) w paśmie "50-kHz" u szczurów. Wokalizacje te interpretowane są jako markery pozytywnych stanów afektywnych.

Niniejsze badanie miało na celu zbadanie roli ko-transmisji serotoninerdycznej i glutaminianergicdnej w ciele migdałowatym w modulacji zachowań w odpowiedzi na ponowną ekspozycję na kontekst związany z substancją uzależniającą (morfina), po okresie odstawienia. Ciało migdałowate to struktura mózgu zaangażowana w reakcje emocjonalne zarówno związane z bodźcami awersyjnymi, jak i apetytywnymi. Zastosowano klasyczny model zwierzęcy warunkowania miejsca oraz technikę chemogenetyczną DREADD (z zastosowaniem receptorów hM3Dq i/lub hM4Di), w celu manipulacji aktywnością neuronów serotoninerdycznych i/lub glutaminianergicdnych w ciele migdałowatym. Oceniono wpływ tych modyfikacji chemogenetycznych na liczbę emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych i dystans pokonywany przez szczury w teście odpowiedzi kontekstowej. Dodatkowo zbadano wpływ tych modyfikacji na poziomy monoamin ich metabolitów, aminokwasów i neuromodulatorów w wybranych strukturach mózgu oraz między strukturalne zależności układów neurotransmisyjnych, a także ich relacje ze zmianami behawioralnymi.

Badanie to wykazało istotną rolę ko-transmisji serotoninerdyczno-glutaminianergicdnej w ciele migdałowatym w kształtowaniu reakcji emocjonalnej na kontekst skojarzony z nagrodą farmakologiczną. Nie wykryto silnej korelacji między liczbą wokalizacji ultradźwiękowych a dystansem pokonany przez szczury, co sugeruje, że mogą one odzwierciedlać różne aspekty odpowiedzi kontekstowej (USV – emocjonalny, dystans – motywacyjny). Zaobserwowano istotny wpływ modyfikacji chemogenetycznych na liczbę wokalizacji ultradźwiękowych w teście ponownej ekspozycji na kontekst skojarzony z morfina: istotny statystycznie spadek liczby USV w grupach "5-HT-" (hamowanie systemu sygnalizacji serotoninerdycznej) i "Glu+5-HT-" (jednoczesna aktywacja systemu sygnalizacji glutaminianergicdnej i hamowanie systemu sygnalizacji

serotoninerгіcznej), oraz wzrost w grupie "Glu+5-HT+" (jednoczesna aktywacja systemu sygnalizacji glutaminianergicznej i serotoninerгіcznej). Ponadto, modyfikacje chemogenetyczne ujawniły złożoną sieć zależności i korelacji neurochemicznych. Dalsza analiza wykazała zróżnicowane podłoże neurochemiczne ekspresji stanu afektywnego, potwierdzając, że ten sam efekt behawioralny może wynikać z aktywności współdziałania wielu różnych systemów neuroprzekaźników. Niniejszy eksperyment uwydatnił złożoność neurobiologicznych podstaw uzależnienia, podkreślając potrzebę holistycznego podejścia w badaniu tego zjawiska.

## **Abstract**

Drug craving is an intense desire or need to engage in specific behaviors related to psychoactive substance use. The phenomenon known as incubation of craving is characterized by a gradual increase in the intensity of craving symptoms over time, which increases the likelihood of relapse triggered by spatial cues associated with substance intake. Previous research has shown that re-exposure to a morphine-paired context after withdrawal elicits increased “50-kHz” ultrasonic vocalizations (USVs) in rats, which are interpreted as markers of positive affective states.

This study investigated the role of serotonergic and glutamatergic co-transmission in the amygdala in modulating drug-paired context-induced behavioral responses after withdrawal. The amygdala is a brain structure involved in emotional responses to both aversive and appetitive stimuli. A classical animal model of place conditioning and a DREADD chemogenetic technique (using hM3Dq and/or hM4Di receptors) to manipulate the activity of the serotonergic and glutamatergic neurons in the amygdala, were employed. The impact of these chemogenetic manipulations on the number of ultrasonic vocalizations emitted and the distance travelled by rats during the context response was assessed. Additionally, the effects of these manipulations on levels of monoamines, their metabolites, amino acids, and neuromodulators in selected brain structures were investigated, along with the relationships between the neurochemical systems and their association with behavioral changes.

This study demonstrated a significant role of serotonergic-glutamatergic co-transmission in the amygdala in shaping the drug-paired context-induced response. No strong correlation was found between the number of ultrasonic vocalizations and the distance traveled by rats, suggesting that these measures may reflect different aspects of the context response (USV – emotional, while distance – motivational). A significant effect of the chemogenetic modifications on the number of ultrasonic vocalizations in the context response test was observed: a statistically significant reduction in the number of USVs in the "5-HT-" (inhibition of serotonergic signaling) and "Glu+5-HT-" (simultaneous activation of glutamatergic signaling and inhibition of serotonergic signaling) groups and increase in the "Glu+5-HT+" (simultaneous activation of glutamatergic and serotonergic signaling) group. Moreover, the study revealed a complex network of neurochemical associations and correlations. Further analysis revealed a diverse neurochemical basis for the expression of the affective state, confirming that the same behavioral effect can result

from the activity of a number of distinct neurotransmitter system networks. This experiment highlighted the complexity of the neurobiological basis of addiction, emphasizing the need for a holistic approach in studying this phenomenon.

## Wykaz stosowanych skrótów oraz ważnych pojęć

3-MT – 3-metoksytyramina

5-HIAA – kwas 5-hydroksyindoloctowy

5-HT – serotonina, 5-hydroksytryptamina

AAV – wirus typu AAV (ang. adeno-associated viruses)

ADV – adenowirus (ang. adenovirus)

Ala – L-alanina

AMP – adenozybonofosforan

Amy – ciało migdałowate (ang. amygdala)

AP – potencjał czynnościowy (ang. action potential)

B-Ala –  $\beta$ -alanina

BBB – bariera krew-mózg (ang. blood-brain barrier)

BLA – jądra podstawno-boczne ciała migdałowatego (ang. basolateral amygdala)

C21 – “Compound 21”

CA1, CA2, CA3 – regiony hipokampu (łac. *cornu Ammonis*)

cAMP – cykliczny adenozybonofosforan

CeA – centralne jądro ciała migdałowatego (ang. central nucleus of the amygdala)

CNO – N-tlenek klozapiny (ang. clozapine N-oxide)

CPA – warunkowana awersja miejsca (ang. conditioned place aversion)

CPP – warunkowana preferencja miejsca (ang. conditioned place preference)

CPu – prążkowie (ang. Caudate – Putamen)

CREB – białko wiążące element odpowiedzi na cAMP (ang. cAMP Response Element-Binding Protein)

DA – dopamina

DAG – diacyloglicerol

DCZ – deschloro klozapina (DCZ, ang. deschloroclozapine)

DG – zakręt zębaty (ang. dentate gyrus)

DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenyloctowy (ang. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid)

DREADD – receptory modyfikowane w oparciu o inżynierię genetyczną, których aktywacja indukowana jest wyłącznie przez specyficznje zaprojektowane, syntetyczne ligandy (ang. Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs)

ERK – kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. extracellular signal-regulated kinases)



fMRI – funkcjonalny rezonans magnetyczny (ang. functional magnetic resonance imaging)

GABA – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, kwas gamma-aminomasłowy (ang.  $\gamma$ -aminobutyric acid, gamma-aminobutyric acid)

Gln – glutamina

Glu – glutaminian, kwas glutaminowy

Gly – glicyna

GPCR – receptor sprzężony z białkiem G (ang. G protein-coupled receptor)

Hipp – hipokamp (ang. hippocampus)

HSV – wirus opryszczki pospolitej (ang. herpes simplex virus)

HVA – kwas homowanilinowy

IP<sub>3</sub> – trisfosforan inozytolu

LA – jądra boczne ciała migdałowatego (ang. lateral amygdala)

LTD – długotrwała depresja (ang. long-term depression)

LTP – długotrwałe wzmocnienie (ang. long-term potentiation)

LV – lentiwirus (ang. lentivirus)

MA – jądro środkowe ciała migdałowatego (ang. medial nucleus of the amygdala)

MAPK – kinazy białkowy aktywowane mitogenem (ang. mitogen-activated protein kinases)

MHPG – 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikol (ang. 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol)

mPFC – przyśrodkowa kora przedczołowa (ang. medial prefrontal cortex)

MSN – średnie neurony kolczaste (ang. medium spiny neurons)

NA – noradrenalina / norepinefryna

NAcc – jądro półleżące (ang. nucleus accumbens)

NT – neuroprzekazniki / neurotransmitery (ang. neurotransmitter)

ODD – zaburzenia związane z używaniem substancji opioidowych (ang. opioid use disorder)

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PBS – roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (ang. phosphate-buffered saline)

PFA – paraformaldehyd (ang. paraformaldehyde)

PIP2 – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan

PKA – kinaza białkowa A (ang. protein kinase A)

PKC – kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)

RSC – kora retrosplenialna (ang. retrosplenial cortex)

SUD – zaburzenia związane z używaniem substancji (ang. substance use disorder)

TPH – hydroksylaza tryptofanowa (ang. tryptophan hydroxylase)

TPH2 – hydroksylaza tryptofanowa typu drugiego (ang. tryptophan hydroxylase type 2)

USV – wokalizacje ultradźwiękowe (ang. ultrasonic vocalizations)

VTA – pole brzuszne nakrywki (ang. ventral tegmental area)

# 1. Wstęp

## 1.1. Zaburzenia związane z używaniem substancji

DSM-5 to szeroko stosowany w diagnostyce klinicznej i badaniach naukowych podręcznik zapewniający standardową klasyfikację zaburzeń psychicznych [1], który definiuje „zaburzenia związane z używaniem substancji” (SUD) jako zespół objawów kognitywnych, behawioralnych i fizjologicznych, świadczących o kontynuowaniu używania substancji pomimo występowania poważnych problemów wynikających z tego używania [2]. Diagnostowanie SUD obejmuje rozpoznanie oraz kompleksową ocenę patologicznych wzorców zachowań związanych z używaniem substancji.

Zgodnie z informacjami zawartymi w tabeli 1, w DSM-5 zdefiniowanych jest jedenaście kryteriów oceny tych wzorców, obejmujących upośledzenie kontroli, problemy społeczne, ryzykowne używanie oraz efekty fizjologiczne. Nasilenie zaburzenia ocenia się na podstawie liczby spełnionych kryteriów, wyróżniając trzy stopnie: łagodne (2–3 objawy), umiarkowane (4–5 objawów) oraz ciężkie (6 lub więcej objawów). Chociaż kryteria diagnostyczne koncentrują się głównie na identyfikacji patologicznych wzorców zachowań, należy podkreślić, że zaburzenia związane z używaniem substancji indukują również trwałe zmiany w adaptacjach neuronalnych oraz obwodach mózgowych, które mogą utrzymywać się nawet po detoksykacji.

Warto odnotować, że termin “uzależnienie” nie jest stosowany w formalnej terminologii diagnostycznej ze względu na brak jednoznacznej, powszechnie akceptowanej definicji oraz związane z nim negatywne piętno [2].

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne zaburzeń związanych z używaniem substancji (SUD) oraz przedstawione obok dla porównania kryteria diagnostyczne zaburzeń związanych z używaniem substancji opioidowych (OUD) cytowane z DSM-5 [2] (przetłumaczone z języka angielskiego). Ponieważ OUD jest podkategorią SUD, kryteria są niemal identyczne, różniąc się jedynie bardziej precyzyjnymi efektami fizjologicznymi (kryteria 10 i 11) związanymi specyficznie z opioidami.

Kryteria diagnostyczne zaburzeń związanych z używaniem substancji (SUD)	Kryteria diagnostyczne zaburzeń związanych z używaniem opioidów (OUD)
<b>Kryterium A</b> można uznać za mieszczące się w ogólnych kategoriach upośledzenia kontroli, upośledzenia społecznego, ryzykownego używania i efektów farmakologicznych.	Problematyczny wzorzec używania opioidów prowadzący do klinicznie istotnego upośledzenia stanu zdrowia lub cierpienia (ang. distress), charakteryzujący się wystąpieniem co najmniej

	dwoma z poniższych objawów, występującymi w ciągu 12 miesięcy.
1. Osoba może przyjmować substancję w większych ilościach lub przez dłuższy czas niż pierwotnie zamierzała.	1. Zażywanie opioidów w większych ilościach lub przez dłuższy czas niż pierwotnie zamierzano.
2. Osoba może wyrażać uporczywe pragnienie ograniczenia lub kontrolowania używania substancji i może zgłaszać wielokrotne nieudane próby zmniejszenia lub zaprzestania używania.	2. Występuje uporczywe pragnienie lub nieudane próby ograniczenia lub kontrolowania używania opioidów.
3. Osoba może spędzać dużo czasu na zdobywaniu substancji, używaniu jej lub dochodzeniu do siebie po jej działaniu.	3. Poświęcanie dużej ilości czasu na czynności niezbędne do zdobycia opioidu, jego użycia lub powrotu do zdrowia po jego działaniu.
4. Głód objawia się intensywnym pragnieniem lub potrzebą zażycia narkotyku, które mogą wystąpić w dowolnym momencie, ale ich pojawienie się jest bardziej prawdopodobne w środowisku, w którym narkotyk był wcześniej uzyskany lub używany.	4. Głód narkotykowy, czyli silne pragnienie lub potrzeba użycia opioidów.
5. Powtarzające się używanie substancji, które może skutkować niemożnością wypełniania podstawowych obowiązków w pracy, szkole lub w domu.	5. Powtarzające się używanie opioidów skutkujące niemożnością wypełniania podstawowych obowiązków w pracy, szkole lub w domu.
6. Osoba może kontynuować używanie substancji pomimo utrzymujących się lub nawracających problemów społecznych lub interpersonalnych spowodowanych lub zaostrzonych przez jej działanie.	6. Kontynuowanie używania opioidów pomimo utrzymujących się lub nawracających problemów społecznych lub interpersonalnych spowodowanych lub zaostrzonych przez ich działanie.
7. Ważne czynności społeczne, zawodowe lub rekreacyjne mogą zostać porzucone lub ograniczone z powodu używania substancji.	7. Porzucenie lub ograniczenie ważnych czynności społecznych, zawodowych lub rekreacyjnych z powodu używania opioidów.
8. Powtarzające się używanie substancji w sytuacjach, w których jest to fizycznie niebezpieczne.	8. Powtarzające się używanie opioidów w sytuacjach, w których jest to fizycznie niebezpieczne.
9. Kontynuowanie używania substancji pomimo posiadania wiedzy o utrzymującym się lub nawracającym problemie fizycznym lub psychicznym, który prawdopodobnie został spowodowany lub zaostrzony przez substancję.	9. Kontynuowanie używania opioidów pomimo wiedzy o utrzymującym się lub nawracającym problemie fizycznym lub psychicznym, który prawdopodobnie został spowodowany lub zaostrzony przez substancję.
10. Tolerancja jest sygnalizowana przez konieczność znacznego zwiększenia dawki substancji w celu osiągnięcia pożądanego efektu lub znacznego zmniejszenia efektu po spożyciu zwykłej dawki.	10. Tolerancja, definiowana jako jedno z poniższych: a. Potrzeba znacznego zwiększenia ilości opioidów w celu osiągnięcia stanu odurzenia lub pożądanego efektu. b. Znacznie zmniejszony efekt przy ciągłym stosowaniu tej samej ilości opioidu. <i>Uwaga: To kryterium nie jest uznawane za spełnione w przypadku osób przyjmujących opioidy wyłącznie pod odpowiednim nadzorem medycznym.</i>
11. Objawy odstawienne to zespół objawów, który występuje, gdy stężenie substancji we krwi lub tkankach spada u osoby, która przez dłuższy czas intensywnie używała tej substancji.	11. Objawy odstawienne, objawiające się jednym z poniższych: a. Charakterystyczny zespół odstawienia opioidów (patrz kryteria A i B zestawu kryteriów dla

	<p>odstawienia opioidów, str. 547-548 w podręczniku [2]).  b. Przyjmowanie opioidów (lub podobnej substancji) w celu złagodzenia lub uniknięcia objawów odstawiennych.</p>
--	--

Termin „zaburzenia związane z używaniem substancji” odnosi się do nadużywania różnorodnych substancji psychoaktywnych. W DSM-5 substancje te podzielone są na dziesięć odrębnych klas, z uwzględnieniem ich właściwości chemicznych, potencjału uzależniającego oraz zakresu indukowanych zmian psychicznych i/lub fizycznych. Przykładowo, zaburzenia związane z używaniem substancji opioidowych (OUD) stanowią odrębną podkategorię w ramach szerszej grupy, tj. „zaburzenia wynikające z używania substancji i uzależnienia” (ang. substance-related and addictive disorders), charakteryzującą się szczegółowymi kryteriami diagnostycznymi (przedstawionymi w tabeli 1) oraz odpowiadającym im kodem ICD-10-CD [3]. Wyodrębnienie to akcentuje unikalne cechy i wyzwania związane z uzależnieniem od opioidów, umożliwiając klinicystom precyzyjną ocenę stanu pacjenta i dobór właściwej strategii terapeutycznej [2].

### 1.1.1. Nadużywanie opioidów w ujęciu globalnym

Obecnie, Stany Zjednoczone mają najwyższe wskaźniki nadużywania opioidów, uzależnień i zgonów z powodu przedawkowań, jednak kryzys opioidowy ma charakter globalny. Ograniczony dostęp do wiarygodnych danych epidemiologicznych na skalę światową sprawia, że historia epidemii opioidowej w USA stanowi cenne źródło informacji.

Od końca lat 90. obserwuje się systematyczny wzrost liczby zgonów związanych z przedawkowaniem opioidów, a skala tego zjawiska stale rośnie [4, 5]. Geneza kryzysu opioidowego jest złożona i wynika z połączenia wielu czynników. Przede wszystkim należy do nich zaliczyć agresywny marketing opioidowych leków przeciwbólowych, prowadzony przez firmy farmaceutyczne, które w sposób nierzetelny reklamowały je jako bezpieczne i nieuzależniające [6, 7]. Równocześnie upowszechnił się pogląd o konieczności priorytetyzacji leczenia bólu w ramach polityki zdrowia publicznego [8–10], co doprowadziło do zwiększonego popytu i wzrostu preskrypcji recept na leki opioidowe [4, 7, 11]. Istotnym czynnikiem równoległe sprzyjającym eskalacji kryzysu był brak adekwatnych regulacji prawnych dotyczących przepisywania leków opioidoch, co

skutkowało ich szeroką dostępnością i przyczyniło się do początkowego wzrostu nadużywania oraz liczby zgonów z powodu przedawkowania[6].

W 2010 roku kryzys ewoluował, a nielegalnie pozyskiwana heroina stała się główną przyczyną gwałtownego wzrostu liczby zgonów [4, 5]. Trzy lata później sytuacja uległa kolejnej zmianie wraz z pojawieniem się na czarnym rynku syntetycznych opioidów, takich jak fentanyl, które charakteryzują się znacznie większą siłą działania, a tym samym stanowią poważniejsze zagrożenie dla zdrowia i życia [4, 5, 7, 12]. Według Centers for Disease Control and Prevention (CDC), w 2022 roku ponad 75% z niemal 107 000 śmiertelnych przedawkowań narkotyków było związanych z opioidami [4, 13].

W 2020 roku National Survey on Drug Use and Health oszacował, że 2,7 miliona Amerykanów w wieku 12 lat i starszych zmagало się z OUD, przy czym większość przypadków – około 2,3 miliona – wynikała z nadużywania opioidów przepisywanych na receptę [14]. Epidemia opioidowa dotknęła różne grupy demograficzne i regiony [14–16], generując nowe wyzwania społeczno-ekonomiczne, w tym wzrost kosztów opieki zdrowotnej [17, 18], wzrost wskaźników przestępczości [19, 20] oraz obniżenie poziomu dobrobytu społeczności [21–23].

Kryzys opioidowy wywarł również znaczący wpływ na społeczeństwo kanadyjskie, w szczególności w prowincjach takich jak Kolumbia Brytyjska, która ogłosiła stan zagrożenia zdrowia publicznego [24], a także w Alberte i Ontario, gdzie wskaźniki zgonów związanych z opioidami należą do najwyższych [25]. Głównym czynnikiem napędzającym tę sytuację jest rosnące nadużywanie nielegalnego fentanylu i innych syntetycznych opioidów [25].

Kryzys opioidowy stanowi globalny problem. Afganistan, do 2022 roku będący największym producentem opium na świecie, zmagа się z wieloma złożonymi wyzwaniami, takimi jak nielegalna produkcja i handel narkotykami, ubóstwo, konflikty zbrojne oraz ograniczony dostęp do opieki zdrowotnej. Czynniki te przyczyniają się do powszechnego nadużywania opioidów i wysokiego poziomu uzależnień [26]. Społeczeństwa w krajach Azji Środkowej, w tym Kazachstanu, Kirgistanu, Tadżykistanu i Turkmenistanu, położone na szlakach przemytu narkotyków z Afganistanu, charakteryzują się wysokim stopniem używania nielegalnej heroiny [26, 27]. Zgodnie z danymi Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA), heroina pozostaje jednym z najczęściej używanych nielegalnych opioidów w Europie [28]. Niepokojące tendencje związane z nadużywaniem opioidów obserwuje się również w Europie Wschodniej i na Bałkanach [29].

Również w Australii, szkody związane z opioidami przepisywanymi na receptę, a także czarnorynkowa heroina oraz fentanyl stanowią poważny problem dla zdrowia publicznego [30, 31]. Natomiast, w Afryce Zachodniej i Środkowej rosnący problem stanowi tramadol, syntetyczny opioid często kierowany z legalnego rynku do użytku pozamedycznego [32, 33]. Choć sytuacja związana z opioidami w Ameryce Łacińskiej wciąż się rozwija, dostęp do kompleksowych danych na temat ich używania jest ograniczony, co utrudnia pełną ocenę skali problemu [34, 35].

Te tendencje podkreślają skalę trwającego globalnego kryzysu opioidowego i wskazują na konieczność zastosowania strategii zapobiegania oraz ograniczania szkód, a także na potrzebę prowadzenia szeroko zakrojonych badań i rozwoju nowych, skutecznych metod leczenia uzależnienia od substancji psychoaktywnych.

## **1.2. Uzależnienie w ujęciu behawioralnym**

Brak uniwersalnej, powszechnie akceptowanej definicji medycznej uzależnienia [2] może prowadzić do rozbieżności w rozumieniu i stosowaniu tego terminu [36]. Niektórzy badacze używają go zamiennie z umiarkowanym lub ciężkim “zaburzeniem używania substancji” [37–40]; należy jednak podkreślić, że uzależnienie może obejmować szerokie spektrum kompulsywnych zachowań, takich jak hazard, seks czy granie w gry komputerowe. W szerszym kontekście, uzależnienie to złożony stan, będący rezultatem interakcji wielu czynników: biologicznych, psychologicznych i społeczno-środowiskowych [41–43]. Kluczowe znaczenie ma kompulsywny charakter zachowań związanych z bodźcami nagradzającymi, które utrzymują się pomimo wystąpienia negatywnych konsekwencji, utraty kontroli oraz głodu narkotykowego, który uznaje się obecnie za główny czynnik przyczyniający się do kontynuacji zachowań związanych z poszukiwaniem substancji psychoaktywnych (lub innego czynnika uzależniającego) i nawrotów po okresach abstynencji [37, 44, 45].

Współczesna neurobiologia koncentruje się na badaniu zmian i neuroadaptacji o charakterze czasowym, które ukazują procesy neurochemiczne leżące u podstaw dynamiki uzależnienia [46]. Warto zauważyć, że pojęcie ‘uzależnienia’ może różnić się pod względem cech i implikacji w modelach zwierzęcych w porównaniu z badaniami prowadzonymi na ludziach [47–49].

W literaturze dotyczącej uzależnień wyróżnia się cztery główne etapy rozwoju uzależnienia od substancji opioidowych [46]. Należą do nich:

1. Faza inicjacji, w której początkowa ekspozycja na substancję psychoaktywną wywołuje pozytywne efekty, takie jak euforia. Te doświadczenia mogą motywować do dalszego używania substancji.
2. Faza podtrzymywania, w której używanie substancji staje się kompulsywne, co wskazuje na rozwój uzależnienia.
3. Faza odstawienia, następująca wraz ze spadkiem stężenia substancji w organizmie np. w okresach abstynencji. W tej fazie mogą wystąpić objawy odstawienne.
4. Faza głodu narkotykowego i nawrotu, charakteryzująca się intensywnym pragnieniem zażycia substancji (głodem), a następnie powrotem do zachowań związanych z jej poszukiwaniem i nałogowym używaniem, zwłaszcza pod wpływem bodźców skojarzonych z substancją lub stresorów.

Powyższe etapy (konceptje behawioralne) wykorzystuje się w modelowaniu zachowań uzależnieniowych u gryzoni, również w odniesieniu do innych substancji psychoaktywnych [50–56].

### **1.2.1. Wzmocnienie pozytywne**

W teorii warunkowania instrumentalnego wzmocnienie to proces, w którym doświadczanie nagradzających właściwości bodźca zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia danego zachowania w przyszłości [57–59]. Jak podkreśla W. Schultz, kluczowym aspektem nagrody jest jej wpływ na zachowanie [60, 61]. Wzmocnienie pozytywne odgrywa fundamentalną rolę w rozwoju i utrzymywaniu uzależnienia [62]. Substancje psychoaktywne aktywują ‘układ nagrody’ w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz pobudzają ścieżki neuronalne łączące obwody odpowiedzialne za przetwarzanie informacji o nagrodzie z obszarami mózgu zaangażowanymi w procesy uczenia się i pamięci, tworząc tzw. obwód wzmocnienia (ang. reinforcement circuit) [63, 64]. Doświadczanie pozytywnych emocji, przyjemności, czy euforii, jest kluczowym czynnikiem warunkującym wczesne stadia uzależnienia, co prowadzi do wzmocnienia zachowań związanych z zażywaniem substancji i zwiększa prawdopodobieństwo ponownego ich użycia [65, 66].

Powtarzające się zażywanie substancji psychoaktywnych wzmacnia asocjacje między substancją (lub zachowaniem) a pozytywnymi efektami, indukując silne i trwałe zmiany w sieciach neuronowych [56, 67]. Substancje uzależniające działają jako silne



modulatory obwodów układu nagrody, wpływając na motywację i stopniowo skupiając uwagę jednostki na poszukiwaniu i zażywaniu substancji, co z czasem może przerodzić się w zachowania kompulsywne [62, 68, 69].

Koob postulował, że w kontekście uzależnienia należy rozróżnić wzmocnienie pozytywne, opisane powyżej, od negatywnego [70]. Zauważył, że na późniejszych etapach uzależnienia, osoby uzależnione często stają się podatne na negatywne stany emocjonalne, co zmienia motywację do dalszego zażywania substancji – z poszukiwania przyjemności na łagodzenie negatywnych objawów [62]. W związku z czym, Koob promował teorię negatywnego wzmocnienia jako uzupełniający proces, w którym usunięcie awersyjnego bodźca zwiększa prawdopodobieństwo kontynuacji lub powtarzania danego zachowania [36, 41].

Niezależnie od tego, czy nagroda pochodzi z bezpośredniego doświadczania przyjemności, czy z łagodzenia dolegliwości psychicznych i/lub fizjologicznych, wzmocnienie odgrywa kluczową rolę w rozwoju i nasilaniu się patologicznych zachowań związanych z uzależnieniem od narkotyków.

### **1.2.2. Tolerancja**

Tolerancja to zjawisko, w którym wielokrotna ekspozycja na substancję psychoaktywną prowadzi do zmniejszonej odpowiedzi lub wymaga znacznego zwiększenia dawki albo częstotliwości jej przyjmowania w celu uzyskania początkowych lub pożądaných efektów nagradzających [2, 71, 72]. Nie wszystkie substancje uzależniające indukują tolerancję, a neurobiologiczne podstawy tego zjawiska pozostają w dużej mierze niewyjaśnione [73, 74]. Mechanizmy tolerancji są najlepiej poznane w przypadku opioidów. Tolerancja opioidowa rozwija się głównie w wyniku zmian w układach receptorów opioidowych w mózgu oraz adaptacji metabolicznych [75–78].

Tolerancja na opioidy może dotyczyć dwóch rodzajów utraty skuteczności agonisty: tolerancji ostrej (ang. acute), rozwijającej się w ciągu sekund lub minut od ekspozycji na substancję, oraz tolerancji przewlekłej, wynikającej z długotrwałego stosowania opioidów [75, 76, 79, 80]. Tolerancja ostra jest związana z szybką desensytyzacją receptorów  $\mu$ -opiodowych (MOR) i, w niektórych przypadkach, ich internalizacją [76, 81–84]. Internalizacja jest bardziej widoczna w przypadku niektórych syntetycznych opioidów, takich jak DAMGO (syntetyczny peptyd opioidowy) [85].

Natomiast morfina, powszechnie stosowany opioid, wywołuje znikomą [86] internalizację w większości neuronów [83, 84, 87].

Długotrwała ekspozycja na opioidy prowadzi do rozwoju tolerancji poprzez trwałe adaptacje w szlakach sygnałowych komórek oraz sieciach neuronalnych. Do kluczowych mechanizmów należą: przedłużona desensytyzacja receptorów  $\mu$ -opiodowych oraz ich ograniczona recyrkulacja [81, 82, 88–91]. Jednocześnie, dochodzi do adaptacji w obrębie szlaku cAMP-PKA (cykliczny adenylozynomonofosforan - kinaza białkowa A), co przyczynia się zarówno do rozwoju tolerancji, jak i objawów odstawiennych [80, 82, 92–94]. Przewlekłe przyjmowanie opioidów może również aktywować dodatkowe szlaki kinazowe, takie jak kinazy białkowe aktywowane mitogenem (MAPK) [95–98], w tym kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK) [74, 99, 100], oraz kinazy białkowej C (PKC) [74, 101–103], które modyfikują funkcję receptorów i strukturę neuronalną. Dodatkowo, dysregulacja białka wiążącego element odpowiedzi na cAMP (CREB) spowodowana długotrwałą ekspozycją na opioidy, zmienia ekspresję genów, co prowadzi do trwałego zwiększenia pobudliwości neuronów [80, 104–109].

Na poziomie sieci neuronalnych opioidy wpływają na plastyczność synaptyczną, modulując długotrwałe wzmocnienie (LTP) i depresję (LTD) w obszarach mózgu związanych z układem nagrody, co wzmacnia zachowania związane z poszukiwaniem substancji psychoaktywnych [110–116]. Adaptacje komórkowe i sieciowe leżące u podstaw tolerancji prowadzą do konieczności stosowania coraz wyższych dawek opioidów w celu osiągnięcia pożądanego efektu [76, 80, 117].

### **1.2.3. Głód narkotykowy**

Głód narkotykowy (ang. drug craving) to intensywne pragnienie lub potrzeba zaangażowania się w określone zachowanie, zwykle związane z używaniem substancji psychoaktywnych lub podejmowaniem innych czynności uzależniających [2]. Jest to subiektywne doświadczenie charakteryzujące się silną tęsknotą, pragnieniem lub potrzebą przyjęcia substancji lub wykonania danego zachowania [66, 118]. Nasze rozumienie uzależnienia znacząco rozwinęło się w ostatnich dziesięcioleciach [118], a głód narkotykowy został uznany za kluczowy element teorii uzależnień [119, 120]. Odgrywa on istotną rolę w podtrzymywaniu zachowań związanych z poszukiwaniem substancji oraz w nawrotach po okresach abstynencji [51]. Jego zrozumienie jest fundamentalne do badania motywacji narkotykowej i zaburzeń związanych z używaniem substancji [118, 121].

Głód narkotykowy to złożone zjawisko neurobiologiczne, w które zaangażowane są różnorodne układy neuroprzebieżników oraz obwody neuronalne. Badania wskazują, że głód narkotykowy rozwija się podczas odstawienia substancji uzależniającej, zarówno u ludzi [122–129], jak i u zwierząt [130–136]. Intensywność głodu narkotykowego i podatność na nawroty wywołane przez wskazówki (m.in. przestrzenne) [137, 138] mogą różnić się u poszczególnych osób i zależą od wielu czynników, takich jak wyjściowa oraz nabyta wrażliwość na bodźce, stan emocjonalny oraz kontekst środowiskowy [139].

#### **1.2.4. Inkubacja głodu narkotykowego (pragnienia)**

Inkubacja głodu narkotykowego to zjawisko polegające na stopniowym wzroście nasilenia objawów głodu narkotykowego w czasie. Proces ten obejmuje neuroadaptacje w strukturach mózgu związanych z nagrodą i motywacją [140–150]. Amplifikacja objawów głodu narkotykowego, obserwowana podczas okresu odstawienia, zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu wywołanego wskazówkami, m.in. przestrzennymi, powiązanimi z przyjmowaniem substancji psychoaktywnych [130, 151, 152]. Pierwsze doniesienia o tym zjawisku pochodzą z badań nad ludźmi [122], ale zaobserwowano je również u szczurów [130].

Średnie neurony kolczaste (ang. medium spiny neurons – MSN) jądra półleżącego, otrzymujące projekcje ze struktur korowych i limbicznych, odgrywają kluczową rolę w różnych aspektach przetwarzania nagrody, w tym w zachowaniach związanych z poszukiwaniem substancji uzależniających [141]. Samo jądro półleżące to centralna struktura układu limbicznego, silnie związana z przetwarzaniem informacji o nagrodzie [153–155], a także z wzmocnieniem zachowań związanych z używaniem substancji psychoaktywnych [156] oraz emisją wokalizacji ultradźwiękowych w paśmie “50 kHz” [157, 158]. Wykazano m. in. związek między opóźnionym wzrostem ekspresji receptorów AMPA przepuszczalnych dla jonów wapnia (CP-AMPA) w synapsach pobudzających na średnich neuronach kolczastych w jądrze półleżącym a inkubacją głodu narkotykowego [142]. Ponadto, receptory AMPA w obu podregionach jądra półleżącego – rdzeniu (ang. core) i skorupie (ang. shell) – są niezbędne dla manifestacji inkubacji głodu narkotykowego [140, 142–144, 147, 149, 159].

Udowodniono również, że wielokrotna ekspozycja na kokainę lub morfinę może prowadzić do powstawania tzw. “cichych synaps” (ang. silent synapses) w jądrze półleżącym i innych strukturach związanych z układem nagrody [144, 159–161]. Ciche

synapsy to niefunkcjonalne synapsy, które zawierają receptory NMDA, ale nie posiadają receptorów AMPA, kluczowych dla dalszego przekazywania sygnałów [162–164]. W zależności od substancji w okresie odstawienia dochodzi do dalszych specyficznych modyfikacji synaptycznych w obrębie projekcji neuronalnych [144, 160]. Ciche synapsy mogą “dojrzewać”, tj. stawać się aktywne poprzez wzbogacenie w receptory AMPA, lub zanikać, co redefiniuje strukturę sieci neuronalnej i przyczynia się do inkubacji głodu narkotykowego i wzrostu ryzyka nawrotu [140, 144, 159–161, 165].

Wykazano również kluczową rolę centralnego jądra ciała migdałowatego (CeA) w inkubacji głodu zarówno narkotykowego, jak i innych czynników uzależniających [146, 166, 167]. Hamowanie aktywności neuronalnej CeA zmniejsza inkubację głodu substancji takich jak nikotyna, kokaina, metamfetamina oraz sacharoza [146, 166, 168–171]. Badania funkcjonalnego rezonansu magnetycznego (fMRI) z udziałem ludzi potwierdziły kluczową rolę ciała migdałowatego w generowaniu głodu opioidowego wywołanego bodźcem (ang. cue-elicited) [127, 172–175]. Ponadto stwierdzono, że hamowanie aktywności neuronalnej w CeA za pomocą mechanizmów GABAergicznym prowadzi do redukcji ekspresji zachowań związanych z głodem narkotykowym [146]. Dodatkowo wykazano, że odstawienie etanolu obniża poziom GABA w przyśrodkowej korze przedczołowej, jednocześnie zwiększając poziom glutaminianu i glutaminy w jądrze półleżącym [176]. Wykazano, że ponowna ekspozycja na kontekst podawania morfiny po okresie odstawienia zwiększała liczbę epizodów USV w paśmie “50 kHz”, które często interpretowane są jako wskaźniki pozytywnych stanów afektywnych, a następnie zilustrowano specyficzne dla struktur mózgu zmiany neuroprzekaźników związane z inkubacją głodu narkotykowego [177, 136].

Zrozumienie neurobiologicznych podstaw głodu narkotykowego, mechanizmów jego regulacji oraz poszukiwanie substancji, które mogą go złagodzić, ma kluczowe znaczenie dla pogłębienia wiedzy na temat procesów uzależnienia i opracowania skutecznych interwencji terapeutycznych w leczeniu zaburzeń związanych z używaniem substancji psychoaktywnych.

### **1.3. Selektywna manipulacja aktywnością neuroprzekaźników przy użyciu wektorów wirusowych DREADD**

Zrozumienie funkcjonowania mózgu wymaga zbadania wpływu sygnalizacji komórkowej na aktywność obwodów neuronalnych oraz jej implikacji dla zachowań zarówno

“normalnych”, jak i patologicznych [178]. Podstawowymi jednostkami strukturalnymi i funkcjonalnymi układu nerwowego są neurony – elektrycznie pobudliwe komórki wyspecjalizowane w odbiorze, integracji i transmisji sygnałów elektrycznych i chemicznych [179]. Komunikacja międzyneuronalna odbywa się w wyspecjalizowanych obszarach kontaktu zwanych synapsami [180]. Aktywacja neuronu presynaptycznego stymuluje syntezę i uwalnianie neuroprzekaźników – związków chemicznych, które są uwalniane do szczeliny synaptycznej i wiążą się z receptorami na neuronie postsynaptycznym [181–183]. Po związaniu neuroprzekaźnika, aktywacja tych receptorów przekazuje sygnały do odpowiednich elementów efektorowych w komórce, inicjując kaskadę zdarzeń wewnątrzkomórkowych, które ostatecznie wpływają na pobudliwość neuronu postsynaptycznego [183].

### 1.3.1. System neuroprzekaźnictwa

Neuroprzekaźniki (NT) to wyspecjalizowane cząsteczki, które pośredniczą w przekazywaniu sygnałów między neuronami, odgrywając kluczową rolę w komunikacji neuronalnej [181]. Zgodnie z klasyczną definicją substancja musi spełniać cztery określone kryteria, aby mogła być sklasyfikowana jako klasyczny neuroprzekaźnik: (1) musi być syntetyzowana przez neuron presynaptyczny i magazynowana w pęcherzykach synaptycznych aż do momentu uwolnienia; (2) jej uwolnienie musi być wywołane przez potencjał czynnościowy, zależny od napływu jonów wapnia; (3) w błonie postsynaptycznej muszą istnieć specyficzne receptory dla tej substancji, a substancja powinna być uwalniana w ilościach wystarczających do wywołania określonego działania w neuronie postsynaptycznym lub narządzie efektorowym; (4) musi istnieć specyficzny mechanizm usuwania substancji ze szczeliny synaptycznej [181, 184–186].

**Tabela 2. Podsumowanie kluczowych neuroprzekaźników sklasyfikowanych na podstawie ich cech strukturalnych** [181, 184]. Neuropeptydy, w zależności od źródła, mogą nie być sklasyfikowane jako ”klasyczne” neuroprzekaźniki [187].

<b>NEUROPRZEKAŹNIKI</b>		
neuroprzekaźniki <b>małocząsteczkowe</b>	neuroprzekaźniki <b>peptydowe</b> (zwykle 3-30 aminokwasów)	neuroprzekaźniki <b>"niekonwencjonalne"</b> – neuromodulatory
<b>Acetylocholina</b>	<b>Opioidy</b>	<b>Endokannabinoidy</b>

<i>Aminy biogenne</i> katecholaminy <b>Dopamina</b> <b>Noradrenalina (norepinefryna)</b> <b>Adrenalina (epinefryna)</b> indoloamina <b>Serotonina</b> imidazoloamina <b>Histamina</b>  <i>Aminokwasy</i> <b>Glutaminian</b> <b>GABA (kwas <math>\gamma</math>-aminomasłowy)</b> <b>Asparaginian</b> <b>Glicyna</b>  <i>Puryny</i> <b>ATP (adenozynotrójfosforan)</b> <b>Adenozyzna</b>	Opiokortyny Enkefaliny Dynorfiny FMRFamidy  <b>Hormony przysadki mózgowej</b> Wazopresyna Oksytocyna Neurofizyny  <b>Tachykininy</b> Substancja P  <b>Sekretyny</b> Sekretyna Glukagon  <b>Insuliny</b> Insulina Insulinopodobne czynniki wzrostu IGF-1 i IGF-2  <b>Somatostatyny</b> Somatostatyny Polipeptyd trzustkowy (PP) <b>Gastryny</b> Gastryna Cholecystokinina	Anandamid 2-arachidonyloglicerol (2-AG)  <b>Tlenek azotu (NO)</b>  <b>Tlenek węgla (CO)</b>  <b>Sarkozyna</b>
--	---	--

Od czasu odkrycia acetylocholino w 1921 roku [188] zidentyfikowano wiele neuroprzekaźników, choć ich dokładna liczba wciąż pozostaje nieznana [189]. Neuroprzekaźniki (NT) klasyfikuje się zazwyczaj według wielkości, dzieląc je na NT o małych cząsteczkach – do których należy acetylocholina, pojedyncze aminokwasy, aminy biogenne i puryny – oraz neuropeptydy, czyli większe cząsteczki złożone z co najmniej trzech aminokwasów. Liczba substancji małowcząsteczkowych spełniających wszystkie kryteria klasycznego neuroprzekaźnika jest ograniczona, klasyfikacja neuropeptydów jako neuroprzekaźników “klasycznych” lub jako odrębnej grupy zależy od przyjętej definicji [181, 184, 187]. Ponadto, cząsteczki uczestniczące w sygnalizacji międzyneuronalnej, które nie spełniają wszystkich tradycyjnych kryteriów neuroprzekaźników, są często określane jako neuroprzekaźniki ”niekonwencjonalne” [133, 181, 190, 191] lub neuromodulatory [192, 193]. W tabeli 2 przedstawiony został przegląd głównych cząsteczek sygnalizacyjnych pełniących funkcje neuroprzekaźników.

Każdy neuroprzekaźnik charakteryzuje się specyficznymi cechami funkcjonalnymi, obejmującymi proces syntezy, sposób magazynowania w pęcherzykach synaptycznych (jeśli dotyczy) oraz mechanizm usuwania z szczeliny synaptycznej [181].

Ponadto każdy neuroprzekaźnik pełni określoną rolę w chemicznej transmisji synaptycznej, wywierając działanie pobudzające lub hamujące, w zależności od typu i lokalizacji docelowego receptora [194, 195]. Neuroprzekaźniki mają zatem fundamentalne znaczenie dla funkcjonowania mózgu, modulując szeroki zakres procesów fizjologicznych i zachowań [189].

### 1.3.2. Receptory

Tabela 3. Przegląd receptorów dla wybranych neuroprzekaźników [181, 196, 197].

Neuroprzekaźnik	Receptory metabotropowe	Receptory jonotropowe
<b>Glutaminian</b>	Grupy I – mGlu <sub>1</sub> , mGlu <sub>5</sub> Grupy II – mGlu <sub>2</sub> , mGlu <sub>3</sub> Grupy III – mGlu <sub>4</sub> , mGlu <sub>5</sub> , mGlu <sub>6</sub> , mGlu <sub>7</sub> , mGlu <sub>8</sub>	<b>AMPA</b> – GluA1, GluA2, GluA3, GluA4 (podjednostki receptorów AMPA)  <b>NMDA</b> – GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A, GluN3B (podjednostki receptorów NMDA)  <b>Kainianowe</b> – GluK1, GluK2, GluK3, GluK4, GluK (podjednostki receptorów kainianowych)
<b>Serotonina</b>	5-HT <sub>1A</sub> , 5-HT <sub>1B</sub> , 5-HT <sub>1D</sub> , 5-HT <sub>1E</sub> 5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2B</sub> , 5-HT <sub>2C</sub> 5-HT <sub>4</sub> 5-HT <sub>5A</sub> , 5-HT <sub>5B</sub> 5-HT <sub>6</sub> 5-HT <sub>7</sub>	5-HT <sub>3A</sub> , 5-HT <sub>3B</sub> , 5-HT <sub>3C</sub> , 5-HT <sub>3D</sub> , 5-HT <sub>3E</sub>
<b>Acetylocholina</b>	muskarynowe receptory cholinergiczne (mAChR) M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub> , M <sub>5</sub>	nikotynowe receptory cholinergiczne (nAChR) nACh $\alpha$ <sub>1-10</sub> , nACh $\beta$ <sub>1-4</sub> , nACh $\gamma$ , nACh $\delta$ , nACh $\epsilon$
<b>Dopamina</b>	D <sub>1</sub> , D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub> , D <sub>5</sub>	
<b>GABA</b>	receptory GABA typu B: GABA <sub>B1</sub> GABA <sub>B2</sub>	receptory GABA typu A: GABA $\alpha$ <sub>1-6</sub> GABA $\beta$ <sub>1-3</sub> GABA $\gamma$ <sub>1-3</sub> GABA $\delta$ GABA $\epsilon$ GABA $\theta$ GABA $\eta$ GABA $\rho$ <sub>1-3</sub>
<b>Glicyna</b>		Gly $\alpha$ <sub>1-6</sub> Gly $\beta$
<b>Opioidy</b>	$\delta$ (receptor opioidowy delta, OP1, DOP) $\kappa$ (receptor opioidowy kappa, OP2, KOP) $\mu$ (receptor opioidowy mi, OP3, MOP)	

Receptory stanowią niezbędny element wewnątrzkomórkowej transmisji sygnałów. Te wyspecjalizowane białka, zlokalizowane na powierzchni błony komórkowej lub wewnątrz komórek, odgrywają kluczową rolę w komunikacji międzykomórkowej [181, 184]. Aktywacja receptorów presynaptycznych reguluje dynamikę neuroprzekaźników, hamując ich syntezę oraz indukując uwalnianie już zsyntetyzowanych neuroprzekaźników [198]. Natomiast aktywacja receptorów postsynaptycznych umożliwia propagację sygnałów elektrycznych przez neurony, co pozwala na kontynuację transmisji synaptycznej [184].

Wśród receptorów presynaptycznych, *autoreceptory* są wrażliwe na neuroprzekaźniki syntetyzowane i uwalniane wyłącznie przez neuron, w którego błonie są osadzone. Pełnią funkcję regulatorów sprzężenia zwrotnego, zapobiegając nadmiernej stymulacji neuronu [199]. Natomiast *heteroreceptory*, również zlokalizowane presynaptycznie, wiążą neuroprzekaźniki uwalniane przez sąsiednie neurony. Ta interakcja pozwala heteroreceptorom modulować uwalnianie różnych neuroprzekaźników, co zwiększa elastyczność (ang. flexibility) synaptyczną i komunikację krzyżową w obwodach nerwowych [199, 200]. Zarówno autoreceptory, jak i heteroreceptory kontrolują sygnalizację neuronalną i homeostazę układu nerwowego [196, 201, 202].

Receptory wiążą w sposób specyficzny cząsteczki sygnalizacyjne lub ligandy – takie jak neuroprzekaźniki, hormony czy czynniki wzrostu – wyzwalając kaskadę zdarzeń molekularnych, modulujących odpowiedzi komórkowe [196, 203]. Wyróżnia się ligandy endogenne (pochodzące z organizmu, np. neuroprzekaźniki i neuropeptydy) oraz egzogenne (pochodzące spoza organizmu, np. leki czy toksyny) [184, 204]. Agoniści to ligandy o wysokim powinowactwie i skuteczności, które są zdolne do aktywacji receptorów. Z kolei antagoniści również wykazują wysokie powinowactwo do receptorów, ale blokując ich zdolność wiązania, zapobiegają w ten sposób aktywacji receptorów przez agonistów [184].

### **1.3.2.1. Receptory jonotropowe**

Receptory jonotropowe (kanały jonowe bramkowane ligandem) można podzielić na dwa podstawowe typy w oparciu o ich strukturę białkową, szybkość transdukcji sygnału i mechanizm propagacji sygnału do dalszych układów efektorowych [205]. Przegląd receptorów zidentyfikowanych dla wybranych neuroprzekaźników przedstawiony został w tabeli 3. Receptory jonotropowe funkcjonują jako kanały jonowe i pośredniczą w szybkiej



transmisji synaptycznej. Są to zazwyczaj białka oligomeryczne, złożone z kilku podjednostek zawierających segmenty transbłonowe, które razem tworzą centralny por przewodzący jony [181, 206].

Aktywacja receptora jonotropowego wywołuje zmianę konformacyjną, umożliwiającą natychmiastowe przenikanie określonych jonów przez kanał. Napływ jonów zmienia potencjał błonowy neuronu, co prowadzi do depolaryzacji (napływ jonów dodatnich i/lub odpływ jonów ujemnych) lub hiperpolaryzacji (odpływ jonów dodatnich i/lub napływ jonów ujemnych), modulując prawdopodobieństwo wygenerowania potencjału czynnościowego (AP, ang. action potential) [181, 184].

### 1.3.2.2. Receptory metabotropowe

Receptory metabotropowe, powszechnie znane jako receptory sprzężone z białkiem G (GPCR), stanowią drugą główną klasę receptorów. Te serpentynowe glikoproteiny zbudowane są z siedmiu transmembranowych domen polipeptydowych, połączonych pętlami zewnątrzkomórkowymi i cytoplazmatycznymi. W części zewnątrzkomórkowej znajduje się miejsce wiążące ligand, podczas gdy przeciwległy region wewnątrzkomórkowy odpowiada za interakcję z białkami G [207, 208].

Białka G, wiążące nukleotydy guaninowe, to heterotrimery złożone z trzech podjednostek:  $G_\alpha$ ,  $G_\beta$  i  $G_\gamma$ . Klasyfikacja białek G opiera się głównie na właściwościach podjednostki  $\alpha$ , wyróżniając cztery główne rodziny:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  i  $G_{12}$  [209]. Każda z tych rodzin jest związana z określonymi szlakami sygnałowymi i funkcjami fizjologicznymi, które zostały przedstawione w tabeli 4. Białka G pełnią rolę pośredników w przekazywaniu sygnałów przez błonę komórkową [196, 210].

**Tabela 4. Opis szlaków sygnałowych aktywowanych przez cztery klasy białek G ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  i  $G_{12}$ ) oraz powiązanych efektów fizjologicznych [196, 209, 211, 212].**

Białko G	Ścieżka sygnałowa	Efekty fizjologiczne
$G_s$	Aktywacja cyklazy adenylanowej, enzymu katalizującego konwersję ATP do cAMP.	Wzrost stężenia cAMP, aktywacja PKA.  Może prowadzić do różnorodnych efektów, w tym regulacji transkrypcji genów i metabolizmu komórkowego.
$G_i$	Hamowanie cyklazy adenylanowej, zmniejszenie produkcji cAMP.	Spadek stężenia cAMP, hamowanie aktywności PKA.

		Efekty przeciwne do tych indukowanych przez białka G <sub>s</sub> , np. zmniejszenie pobudliwości komórkowej i zmiany w uwalnianiu neuroprzekaźników.
G <sub>q</sub>	Aktywacja fosfolipazy C typu β, hydroliza fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP <sub>2</sub> ) do dwóch wtórnych przekaźników: trisfosforanu inozytoli (IP <sub>3</sub> ) i diacyloglicerolu (DAG).	IP <sub>3</sub> mobilizuje wewnątrzkomórkowy wapń z retikulum endoplazmatycznego, DAG aktywuje PKC.  Modulacja procesów takich jak: skurcz mięśni i regulację enzymów.
G <sub>12</sub>	Aktywacja małych GTPaz, często poprzez szlaki GTPaz z rodziny Rho, zaangażowanych w przebudowę cytoszkieletu.	Regulacja wzrostu, ruchu i różnicowania komórek poprzez wpływ na organizację cytoszkieletu aktynowego i ekspresję genów.

Wiązanie ligandu z receptorem GPCR inicjuje kaskadę zdarzeń wewnątrzkomórkowych [196]. Interakcja agonisty z receptorem powoduje zmianę konformacyjną białka, co wyzwala wymianę GDP na GTP w podjednostce G $\alpha$ . Wymiana nukleotydu prowadzi do dysocjacji białka G na dimer G $\beta\gamma$  oraz podjednostkę G $\alpha$ -GTP, co aktywuje białko G. Aktywowane białko G oddziałuje następnie z białkami efektorowymi, takimi jak kanały jonowe czy enzymy, indukując syntezę wtórnych przekaźników, takich jak cykliczny AMP (cAMP), trisfosforan inozytoli (IP<sub>3</sub>), diacyloglicerol (DAG), oraz powodując zmiany stężenia jonów, takich jak wapniowe (Ca<sup>2+</sup>) i potasowe (K<sup>+</sup>). Wtórne przekaźniki uczestniczą następnie w różnych szlakach sygnałowych, prowadząc ostatecznie do różnorodnych odpowiedzi komórkowych i modulacji aktywności neuronów [196, 213, 214].

Pomimo wspólnego mechanizmu działania, receptory metabotropowe charakteryzują się niezwykłą różnorodnością swoich ligandów. Reagują one na szeroką gamę bodźców, w tym neuroprzekaźniki (aminy biogenne, aminokwasy, peptydy), a także na światło, substancje zapachowe, hormony i jony wapnia w przestrzeni pozakomórkowej [215]. Różnorodność ligandów pozwala receptorom sprzężonym z białkiem G pełnić kluczowe role w wielu funkcjach fizjologicznych, m.in. w przetwarzaniu emocji, procesach poznawczych i percepcji sensorycznej [216, 217]. Ze względu na szeroki zakres funkcji receptory GPCR stanowią cele farmakologiczne dla wielu leków stosowanych klinicznie, w tym opioidowych leków przeciwbólowych i leków przeciwpsychotycznych [218–221]. Odgrywają one istotną rolę w różnych obszarach terapeutycznych i są przedmiotem intensywnych badań w rozwoju nowych leków [218, 220].

### 1.3.3. Chemogenetyka

Techniki chemogenetyczne to narzędzia badawcze umożliwiające precyzyjną analizę sygnalizacji komórkowej i jej wpływu na aktywność sieci neuronalnych oraz zachowanie. Chemogenetyka polega na inżynierskiej modyfikacji białek w taki sposób, aby nie wykazywały aktywności w naturalnych systemach biologicznych, a ich aktywacja następowała wyłącznie w wyniku interakcji z specyficznymi ligandami małowcząsteczkowymi [178]. Podejście to umożliwia precyzyjną i odwracalną manipulację aktywnością neuronów w wybranych komórkach docelowych, co pozwala na badanie fizjologicznych i behawioralnych skutków aktywacji określonych szlaków sygnałowych *in vivo*. Białka wykorzystywane w technikach chemogenetycznych obejmują receptory sprzężone z białkiem G, kinazy, enzymy niekinazowe oraz kanały jonowe [178, 222].

### 1.3.4. Technika DREADD

W badaniach neurobiologicznych najczęściej stosowaną techniką chemogenetyczną są narzędzia oparte na receptorach sprzężonych z białkiem G, znane jako DREADD (ang. Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) [223]. Te receptory, zmodyfikowane metodami inżynierii genetycznej, wiążą się selektywnie z syntetycznymi, egzogennymi ligandami, które nie występują naturalnie w organizmie. Ogólnoustrojowe podanie specyficznego ligandu DREADD umożliwia precyzyjną aktywację lub hamowanie sygnalizacji neuronalnej, co w konsekwencji wpływa na syntezę i uwalnianie neuroprzekaźników. DREADD pozwalają na kontrolę funkcji mózgu w czasie rzeczywistym u swobodnie poruszających się zwierząt. Są one szeroko wykorzystywane w badaniach nad modulacją aktywności specyficznych obszarów mózgu, która wpływa na zmiany w obwodach neuronalnych i zachowanie. Zdolność receptorów DREADD do selektywnego manipulowania aktywnością specyficznych neuronów docelowych stwarza możliwości analizowania obwodów neuronalnych w ujęciu “struktura – funkcja – zachowanie”, czyniąc je nieocenionym narzędziem do mapowania funkcji mózgu oraz badania neurobiologicznych podstaw zachowania [178, 224, 225].

Receptory DREADD wywodzą się z muskarynowych receptorów acetylocholinyl (szczegóły w tabeli 5) i są klasyfikowane ze względu na aktywowany przez nie szlak sygnałowy białka G. Do najczęściej stosowanych receptorów DREADD należą: receptory sprzężone z białkiem G<sub>q</sub> hM3Dq, których aktywacja zwiększa aktywność neuronów, oraz receptory sprzężone z białkiem G<sub>i</sub> hM4Di, których aktywacja hamuje aktywność neuronów

[226]. Dodatkowo, w badaniach aktywujących szlaki sygnałowe cAMP można również wykorzystać rzadziej stosowany receptor DREADD sprzężony z białkiem  $G_s$  rM3Ds [227]. Najważniejsze cechy GPCR-DREADD podsumowane zostały w tabeli 5.

**Tabela 5. Charakterystyka różnych typów receptorów DREADD wykorzystywanych w badaniach neurobiologicznych [178, 227].**

receptory DREADD sprzężone z białkami G	receptor DREADD sprzężony z białkiem $G_i$	receptor DREADD sprzężony z białkiem $G_q$	receptor DREADD sprzężony z białkiem $G_s$
Pochodzenie	zmutowane receptory muskarynowe M2- i M4	zmutowane receptory muskarynowe M1, M3 i M5	zmutowany receptor chimeryczny złożony z receptorów muskarynowego M3 i $\beta$ -adrenergicznego
Najpopularniejszy wariant	hM4Di	hM3Dq	rM3Ds
Działa za pośrednictwem	szlak sygnałowy $G_i$	szlak sygnałowy $G_q$	szlak sygnałowy $G_s$
Cel	hamowanie aktywności neuronalnej	zwiększenie aktywności neuronalnej	zwiększenie aktywności neuronalnej
Możliwe ligandy	N-tlenek klozapiny (CNO) Deschloro klozapina (DCZ, ang. <i>Deschloroclozapine</i> ) Compund 21 (C21) JHU37160 (J60)		

#### 1.3.4.1. Wektory wirusowe

Dostarczanie genów kodujących receptory chemogenetyczne m. in. DREADD *in vivo* można zrealizować poprzez iniekcję wektora wirusowego lub wykorzystanie genetycznie zmodyfikowanych szczepów myszy. Wektory wirusowe, oparte na naturalnie występujących wirusach i skonstruowane w celu skutecznego dostarczania genów, specyficzności względem komórek docelowych oraz stabilnej ekspresji transgenu, są szeroko stosowane zarówno w terapii genowej, jak i badaniach neurobiologicznych. W zastosowaniach chemogenetycznych wektory wirusowe zazwyczaj zawierają co najmniej dwa podstawowe, funkcjonalnie odrębne składniki genetyczne: (1) sekwencję transgenu kodującą docelowe białko, np. receptor DREADD, oraz (2) sekwencję promotora poprzedzającą transgen [228]. W wielu projektach eksperymentalnych do plazmidu włącza się również sekwencję genu reporterowego kodującego białko fluorescencyjne, co ułatwia wizualizację rozprzestrzeniania się wirusa i ekspresji receptora.

Wektory wirusowe są starannie projektowane, aby zapewnić specyficzną względem komórek docelowych (tropizm), zminimalizować odpowiedź immunologiczną oraz utrzymać pożądaną poziomą ekspresji genów przez dłuższy czas [228–231]. Po wniesieniu do komórki wektory wirusowe wykorzystują endogenne szlaki transkrypcyjne do transkrypcji zakodowanych genów na mRNA. Synteza kodowanego białka jest regulowana przez sekwencje promotorowe obecne w genomie wirusa, co wpływa na poziom ekspresji transgenu [228, 232, 233]. W zależności od zastosowanego promotora ekspresja genów może być aktywowana szeroko w różnych typach komórek lub bardziej specyficznie, zależnie od dostępności wewnątrzkomórkowych czynników transkrypcyjnych [228]. Przykłady możliwych promotorów i ich cechy zostały przedstawione w tabeli 6.

**Tabela 6. Wybór kilku z wielu możliwych promotorów używanych do budowy wektorów wirusowych stosowanych w metodach chemogenetycznych.**

Promotor	Pochodzenie	Cel	Referencje
CMV	ludzki cytomegalowirus	różne typy komórek, w tym neurony i głą	[234]
hSyn	ludzka synapsyna-1	specyficzne dla komórek - neuronów	[235, 236]
CaMIIa	mysia kinaza białkowa zależna od Ca <sup>2+</sup> i kalmoduliny	specyficzny dla komórek - neuronów pobudzających* (glutaminergicznych)	[236–238] *[239]
TPH2	ludzka hydroksylaza tryptofanowa typu 2	specyficzny dla komórek - neuronów serotonergicznych	[240]

Każdy system wektorów wirusowych charakteryzuje się unikalnym zestawem zalet i ograniczeń. Jednym z najczęściej wykorzystywanych wektorów w terapii genowej [233, 241] i badaniach neurobiologicznych [242, 243] jest wirus AAV (ang. adeno-associated virus). Wektory AAV to małe, niepatogenne wirusy, zdolne indukowania stabilnej i długotrwałej ekspresji genów, w szczególności w komórkach nieproliferujących [230, 244–246]. Ze względu na korzystny profil bezpieczeństwa biologicznego i minimalną immunogenność wektory AAV są szczególnie przydatne w leczeniu przewlekłych chorób genetycznych i znajdują szerokie zastosowanie w terapiach genowych [231, 233, 247]. Głównym ograniczeniem wektorów AAV jest jednak ich stosunkowo mała pojemność,

zazwyczaj poniżej 5 kilobaz, co ogranicza możliwy rozmiar dostarczanego materiału genetycznego [230, 233, 248, 249].

Oprócz AAV, w badaniach na gryzoniach, do zbliżonych celów wykorzystuje się również inne wektory wirusowe, takie jak wektory adenowirusowe (ADV), wirusy opryszczki pospolitej (HSV) oraz wektory lentiwirusowe (LV) [250]. Wektory ADV cechują się wysoką wydajnością transdukcji zarówno w komórkach dzielących się, jak i niedzielących się oraz mają większą pojemność pakowania materiału genetycznego, sięgającą do 37 kb [251]. Należy jednak wspomnieć, że ADV często wywołują silne reakcje zapalne, co ogranicza ich zastosowanie do krótkoterminowej ekspresji genów lub tymczasowych interwencji terapeutycznych [230, 252]. Wektory HSV, będące dużymi wirusami otoczkowymi, wyróżniają się znaczną pojemnością. Pomimo silnego tropizmu do neuronów, mogą one także indukować przejściową ekspresję genów w komórkach nie-neuronalnych oraz wywoływać odpowiedzi immunologiczne [230, 253, 254].

Wektory lentiwirusowe (LV), należące do retrowirusów, charakteryzują się zdolnością do pakowania około 8–10 kilobaz materiału genetycznego, co umożliwia dostarczanie większych sekwencji w porównaniu z wektorami AAV [250, 255]. Skutecznie transdukują zarówno komórki proliferujące, jak i nie proliferujące, co prowadzi do stabilnej i długotrwałej ekspresji transgenu [230, 256, 257]. Pomimo dużego potencjału terapeutycznego wektorów LV, podczas oceny ich długoterminowego profilu bezpieczeństwa należy wziąć pod uwagę doniesienia o potencjalnych skutkach ubocznych, takich jak onkogeneza [230, 258–260].

W badaniach chemogenetycznych, na przykład z wykorzystaniem receptorów DREADD, materiał genetyczny często jest dostarczany do organizmu poprzez iniekcje *in vivo* [236]. W modelach zwierzęcych standardową metodą są stereotaktyczne zabiegi neurochirurgiczne, umożliwiające precyzyjne dostarczenie wektora wirusowego do wybranych obszarów mózgu [261, 262]. Ekspresja transgenu zazwyczaj rozpoczyna się po 2–3 tygodniach od iniekcji, choć czas ten może się różnić w zależności od użytego wektora wirusowego, promotora, obszaru docelowego oraz gatunku zwierzęcia [263–270]. Po ekspresji receptory DREADD lokalizują się na błonie komórkowej neuronów, co umożliwia kontrolowaną modulację ich aktywności [271]. Chociaż transdukcja wirusowa zazwyczaj ogranicza się do miejsca iniekcji, niektóre wektory wirusowe mogą rozprzestrzeniać się wzdłuż projekcji aksonalnych za pośrednictwem transportu anterogradowego, stopniowo rozszerzając ekspresję transgenu w czasie [271–277].

### 1.3.4.2. Syntetyczne ligandy aktywujące receptory DREADD

Receptory DREADD są projektowane tak, aby nie aktywować się pod wpływem endogennych ligandów, takie jak acetylocholina, co pozwala na ich selektywną aktywację za pomocą syntetycznych ligandów [178, 278, 279]. Opracowano kilka związków przeznaczonych do podawania ogólnoustrojowego w celu aktywacji receptorów DREADD. Każdy z nich charakteryzuje się unikalnym profilem farmakologicznym, różniąc się siłą działania, przenikalnością bariery krew-mózg (BBB) oraz stabilnością metaboliczną [226, 279, 280].

N-tlenek klozapiny (CNO) to najczęściej stosowany ligand receptorów DREADD. Jego popularność wynika z ugruntowanej selektywności i skuteczności w aktywacji różnorodnych obwodów nerwowych. Chociaż jego ograniczona przepuszczalność przez barierę krew-mózg zmniejsza ryzyko wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych, badania wykazały, że CNO może ulegać wtórnemu metabolizmowi do klozapiny – metabolitu o wyższej reaktywności, zdolnego do aktywacji receptorów innych niż docelowe DREADD. Ograniczona stabilność metaboliczna CNO, obserwowana w niektórych modelach zwierzęcych i u ludzi, może powodować niespecyficzną zmienność w poziomach aktywacji mózgu, budząc wątpliwości co do zasadności stosowania CNO w badaniach chemogenetycznych. Pomimo krytyki, CNO pozostaje najczęściej wykorzystywanym aktywatorem DREADD, stanowiąc podstawę licznych badań chemogenetycznych [178, 226, 279, 281–283].

Deschloro klozapina (DCZ) została opracowana w celu wyeliminowania ograniczeń związanych ze stosowaniem CNO. DCZ, jako silniejszy ligand, wykazuje większą selektywność wobec receptorów DREADD, co pozwala na efektywną aktywację neuronów przy niższych dawkach. Ponadto DCZ jest mniej podatna na konwersję do aktywnych metabolitów, co minimalizuje niepożądane efekty i zwiększa precyzję eksperymentalną. Chociaż DCZ jest szczególnie użyteczna w przedklinicznych modelach zwierzęcych, gdzie precyzyjna kontrola dawki ma kluczowe znaczenia, konieczne są dalsze badania w celu oceny jej długoterminowego bezpieczeństwa i skuteczności, zwłaszcza w kontekście jej potencjalnych zastosowań u ludzi [284, 285].

“Compound 21” (C21) jest kolejną alternatywą dla CNO, oferując wysoką selektywność wobec receptorów DREADD przy minimalnym wpływie na endogenną sygnalizację. Pomimo niższego ryzyka wystąpienia efektów innych niż docelowe, C21

charakteryzuje się ograniczoną penetracją BBB i stosunkowo niską siłą działania w porównaniu z nowszymi ligandami [279, 280, 286–291].

JHU37160 to nowy ligand DREADD o wysokiej selektywności wobec receptorów DREADD i zdolności do przenikania bariery krew-mózg. Jego siła działania i specyficzność są porównywalne z DCZ, a stabilny profil farmakokinetyczny umożliwia spójną aktywację/inhibicję neuronów u różnych gatunków. Właściwości te sprawiają, że JHU37160 jest szczególnie obiecujący w zastosowaniach eksperymentalnych wymagających precyzyjnej modulacji obwodów neuronalnych. Konieczne są jednak dalsze badania w celu oceny jego skuteczności i bezpieczeństwa stosowania u ludzi [226, 279, 290–292].

Receptory DREADD stanowią ważne narzędzie chemogenetyczne w badaniach neurobiologii, umożliwiające precyzyjną kontrolę komórkowych szlaków sygnałowych oraz selektywną manipulację określonymi populacjami komórkowymi, zarówno neuronalnymi, jak i nieneuronalnymi [178, 222, 279, 293]. Technologia ta ma szczególne znaczenie w identyfikacji kluczowych szlaków sygnałowych oraz w analizie roli określonych podtypów komórek w funkcjonowaniu neuronów, zachowaniu i rozwoju chorób [222, 224, 278, 294–296]. Dzięki możliwości ukierunkowanej aktywacji lub hamowania wybranych populacji komórek, technika DREADD umożliwia zgłębienie roli poszczególnych systemów transmisji na poziomie komórkowym i obwodowym w złożone zachowania oraz funkcje neurologiczne [224, 269, 271, 296–298]. Badanie systemów neuroprzekaźników i mapowanie powiązanych z nimi obwodów neuronalnych jest kluczowe dla zrozumienia podstawowych mechanizmów komunikacji neuronalnej zarówno w zdrowych organizmach, jak i stanach patologicznych [189, 299–301]. Taka wiedza może okazać się niezbędna dla zrozumienia etiologii różnych zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych oraz do opracowania nowych, skutecznych metod leczenia [301, 302].

#### **1.4. Układ nagrody i struktury mózgowe modulujące uzależnienie**

Układ nagrody to złożona sieć struktur mózgowych odpowiedzialnych za pośredniczenie w fizjologicznych i poznawczych procesach kojarzenia różnorodnych bodźców z doświadczeniem przyjemności i nagrody [303]. Układ nagrody obejmuje obszary podwzgórza, układu limbicznego i kory mózgowej, a jego funkcjonowanie jest modulowane przez uwalnianie różnych neuroprzekaźników, głównie dopaminy [304], a



także serotoniny [305], glutaminianu [306], noradrenaliny [307], i endogennych peptydów opioidowych [308]. Spośród tych neuroprzekaźników dopamina jest powszechnie uznawana za kluczowy czynnik w regulacji procesów związanych z nagrodą, odgrywając istotną rolę w przewidywaniu nagrody [309], motywacji [310], wzmocnieniu pozytywnym [311] i uczeniu się [312]. Tym samym, struktury związane z układem nagrody są zlokalizowane wzdłuż głównych szlaków dopaminergicznych mózgu [303].

Mezolimbiczny szlak dopaminergiczny jest uznawany za centralny element układu nagrody. Tworzą go projekcje neuronów dopaminergicznych śródmózgowia, zlokalizowanych w obrębie pola brzuszno-nakrywkowego (VTA), docierające do kluczowych struktur mózgu, takich jak: prążkowie, kora przedczołowa, ciało migdałowate, hipokamp i inne struktury układu limbicznego. W prążkowie kluczową rolę odgrywa jądro półleżące (NAcc), zaangażowane w odczuwanie nagrody [153–155, 313], motywację [154, 313] oraz efekt placebo [314]. Wzajemne połączenia między tymi obszarami mózgu mają istotne znaczenie w przetwarzaniu informacji o nagrodzie, kształtowanie motywacji i w procesach uczenia się.

Ciało migdałowate to struktura charakteryzująca się zróżnicowaną budową, składająca się z: jądra centralnego (CeA), jądra środkowego (MA), jąder bocznych (LA) lub jąder podstawno-bocznych (BLA) (podziały mogą różnić się w zależności od źródła [315, 316]), wyspecjalizowana w przetwarzaniu bodźców emocjonalnych [317], związanych ze głównie ze strachem, ale również nagrodą [318]. Ciało migdałowate zaangażowane jest w przetwarzanie zewnętrznych informacji sensorycznych pochodzących ze wzgórza i kory czuciowej i jest centrum obustronnych projekcji do regionów korowych, hipokampu i obszarów kory asocjacyjnej, wpływając na zachowanie poprzez połączenia z jądrem półleżącym [318]. Ciało migdałowate odgrywa kluczową rolę w neuroadaptacjach strukturalnych i funkcjonalnych związanych z używaniem substancji narkotycznych, takich jak inkubacja głodu narkotykowego (rozdz. [1.2.3.1](#)) oraz procesów uczenia się [319] i pamięci [320] związanych z substancjami uzależniającymi.

Hipokamp (Hipp) pełni kluczową rolę w kodowaniu, konsolidacji i odzyskiwaniu informacji z pamięci [321, 322]. Hipokamp tworzy złożone sieci połączeń zarówno w obrębie swoich podregionów – takich jak zakręt zębaty (DG), regiony CA1, CA2, CA3 (łac. *cornu Ammonis*) i subikulum – jak i z innymi obszarami mózgu, w tym korą śródwęczową, korą przedczołową, ciałem migdałowatym i wzgórzem [323, 324]. Te połączenia zapewniają podstawy funkcjonalne dla wielu procesów poznawczych [325–328], od pamięci przestrzennej i nawigacji po regulację emocjonalną i podejmowanie

decyzji. Hipokamp uczestniczy także, pośrednio, w rozwoju i podtrzymywaniu uzależnienia [329]. Współdziałanie hipokampu z innymi strukturami szlaku mezolimbicznego wpływa na przetwarzanie informacji o nagrodzie oraz związane z nią procesy motywacyjne, uczenie się i uzależnienia.

Szlak mezkortyczny, stanowiący kolejny istotny szlak dopaminergiczny, rozpoczyna się w polu brzusznej nakrywki i biegnie do obszarów kory mózgowej, głównie do płatów czołowych [330]. Szlak ten odgrywa kluczową rolę w funkcjach poznawczych wyższego rzędu, takich jak podejmowanie decyzji i kontrola wykonawcza [331, 332], które są modulowane przez bodźce nagradzające [333–335]. Należy podkreślić, że najważniejsza pętla sprzężenia zwrotnego między VTA a przyśrodkową korą przedczołową obejmuje m. in. transmisję glutaminianergiczną [306].

Przyśrodkowa kora przedczołowa (mPFC) integruje sygnały dopaminergiczne z VTA oraz projekcje z innych obszarów korowych i podkorowych, w tym z jądra przyśrodkowego grzbietowego wzgórza, jąder podstawno-bocznych ciała migdałowatego i części brzusznej hipokampu [336, 337]. Modulacja układu nagrody przez mPFC odbywa się głównie poprzez pobudzające projekcje glutaminianergiczne, które wpływają na aktywność jądra półleżącego [338–340] i VTA [337, 341]. Pojawiają się również dowody wskazujące na istnienie hamujących projekcji GABAergicznych z mPFC do NAcc [342], które również mogą pełnić funkcje regulacyjne. Badania eksperymentalne wykazały, że mPFC jest zaangażowana w reakcje związane z substancjami psychoaktywnymi [343] oraz w nawroty [344]. Rola przyśrodkowej kory przedczołowej w tych procesach różni się w zależności od rodzaju substancji i podregionu mPFC, co wskazuje na złożoną i specyficzną rolę tej struktury w uzależnieniu [337].

W niniejszym badaniu uwzględniliśmy dwa dodatkowe obszary mózgu spoza klasycznego mezkortykolimbicznego układu nagrody, ze względu na ich potencjalne znaczenie w procesach związanych z uzależnieniem.

Pierwszym z nich jest prążkowie grzbietowe (ang. dorsal striatum), które obejmuje jądro ogoniaste (ang. caudate nucleus) i skorupę (ang. putamen) (CPU). Struktury te pełnią istotną rolę w zachowaniach ukierunkowanych na cel oraz w kształtowaniu nawyków, co może przyczyniać się do rozwoju i podtrzymaniu uzależnienia [69, 345].

Drugim obszarem jest kora retrosplenialna (ang. retrosplenial cortex, RSC), ściśle połączona z hipokampem. Struktura ta bierze udział w procesach pamięci i uczenia się, zwłaszcza w kontekstach przestrzennych oraz związanych z konkretnymi wskazówkami [346–348]. Ponieważ wskazówki przestrzenne mogą być jednocześnie powiązane ze

stanem emocjonalnym towarzyszącym ich kodowaniu (uczeniu się) [349], RSC może odgrywać rolę w głodzie narkotykowym indukowanym przez takie wskazówki.

Badanie neurochemii wymienionych wyżej struktur może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów uzależnienia.

## **1.5. Modelowanie uzależnień**

U ludzi substancje uzależniające często prowadzą do naprzemiennych cykli samodzielnego przyjmowania i abstynencji, co skutkuje złożonymi wzorcami używania i odstawienia. Modelowanie uzależnień u gryzoni dostarcza kluczowych informacji na temat neurobiologicznych, behawioralnych i genetycznych czynników związanych z zaburzeniami używania substancji, co jest niezbędne do pełnego zrozumienia tego zjawiska. Modele zwierzęce pozwalają na odtworzenie tych wzorców w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, umożliwiając badanie procesów uzależnienia. W ostatnich dekadach modele zwierzęce stały się powszechnie stosowanymi narzędziami w badaniach nad uzależnieniami, znacząco poszerzając wiedzę na temat neurobiologicznych mechanizmów uzależnień i przyczyniając się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych [55, 350–353].

### **1.5.1. Klasyczne modele badania uzależnień**

Modele zwierzęce oparte na samopodawaniu stanowią powszechnie stosowane narzędzie badawcze umożliwiające ocenę nagradzających właściwości substancji, a także badanie procesów wzmocnienia, zachowań poszukiwawczych oraz głodu narkotykowego [47, 48, 55, 353–356]. W roku 1962 opracowano paradygmat warunkowania instrumentalnego, polegający na samodzielnym podawaniu przez zwierzę substancji będącej czynnikiem wzmacniającym (ang. reinforcer) [357]. Zazwyczaj gryzoni uczone są kojarzenia określonego zachowania, takiego jak naciskanie dźwigni lub dotykanie określonego elementu nosem, z podaniem substancji [354]. Wprowadzenie manipulacji eksperymentalnych pozwala na ocenę wpływu różnych czynników na behawioralne aspekty procesów związanych z uzależnieniem. Do najczęstszych modyfikacji należą: włączenie sygnałów związanych z substancją, interwencje farmakologiczne oraz wprowadzenie wymuszonych okresów abstynencji [354, 356, 358–361]. Modele te dostarczają cennych informacji na temat molekularnych i neurobiologicznych

mechanizmów zachowań związanych z przyjmowaniem substancji uzależniających, co jest szczególnie przydatne w badaniach podstawowych nad uzależnieniami [353].

Paradygmat warunkowej preferencji miejsca (ang. conditioned place preference, CPP) to alternatywne podejście do badania nagradzających lub awersyjnych (conditioned place aversion, CPA) właściwości bodźców [362]. Wywodzący się z warunkowania klasycznego [363], CPP jest ugruntowaną metodą powszechnie stosowaną w badaniach nad uzależnieniami w celu określenia efektów nagradzających różnych substancji [362, 364–369]. W procedurach CPP zwierzęciu podaje się substancję w określonym, rozróżnialnym kontekście środowiskowym, co umożliwia mu wykształcenie skojarzeń między działaniem substancji a tym kontekstem [349, 353, 370, 371]. Nabyte preferencje są następnie mierzone za pomocą różnych parametrów, co pozwala na ocenę wzmacniających lub awersyjnych właściwości bodźców (np. substancji psychoaktywnych), zachowań, roli wskazówek kontekstowych itp. [146, 349, 368, 372–374] CPP jest cennym narzędziem do badania neurobiologicznych podstaw pamięci i motywacji [364, 366, 370, 375–379].

Innym istotnym modelem badawczym w analizie zjawiska uzależnienia jest komora warunkowania instrumentalnego, opracowana przez B.F. Skinnera i powszechnie znana jako "klatka Skinnera" (ang. Skinner box) [380]. Zgodnie z jego poglądem, że "uczenie się" zachodzi w wyniku konsekwencji zachowania w środowisku zewnętrznym, Skinner zaprojektował to urządzenie do badania reakcji behawioralnych [57]. Kluczowe komponenty klatki obejmują *manipulandum*, czyli element obsługiwany przez badany obiekt, który wywołuje reakcję ze środowiska, oraz mechanizm wzmacniający, który dostarcza natychmiastowe nagrody lub kary [59]. Całość funkcjonuje w kontrolowanym środowisku, które minimalizuje zmienne zewnętrzne. Klatka Skinnera stanowi wszechstronne narzędzie do badania procesów uczenia się i wpływu różnych bodźców na zachowanie [381–388]. Model ten umożliwia analizę złożonych interakcji między różnymi czynnikami leżącymi u podstaw procesu uzależnienia, co ostatecznie przyczynia się do lepszego zrozumienia tego zjawiska [389–392].

### **1.5.2. Modele behawioralne w ujęciu współczesnym – wokalizacje ultradźwiękowe szczurów**

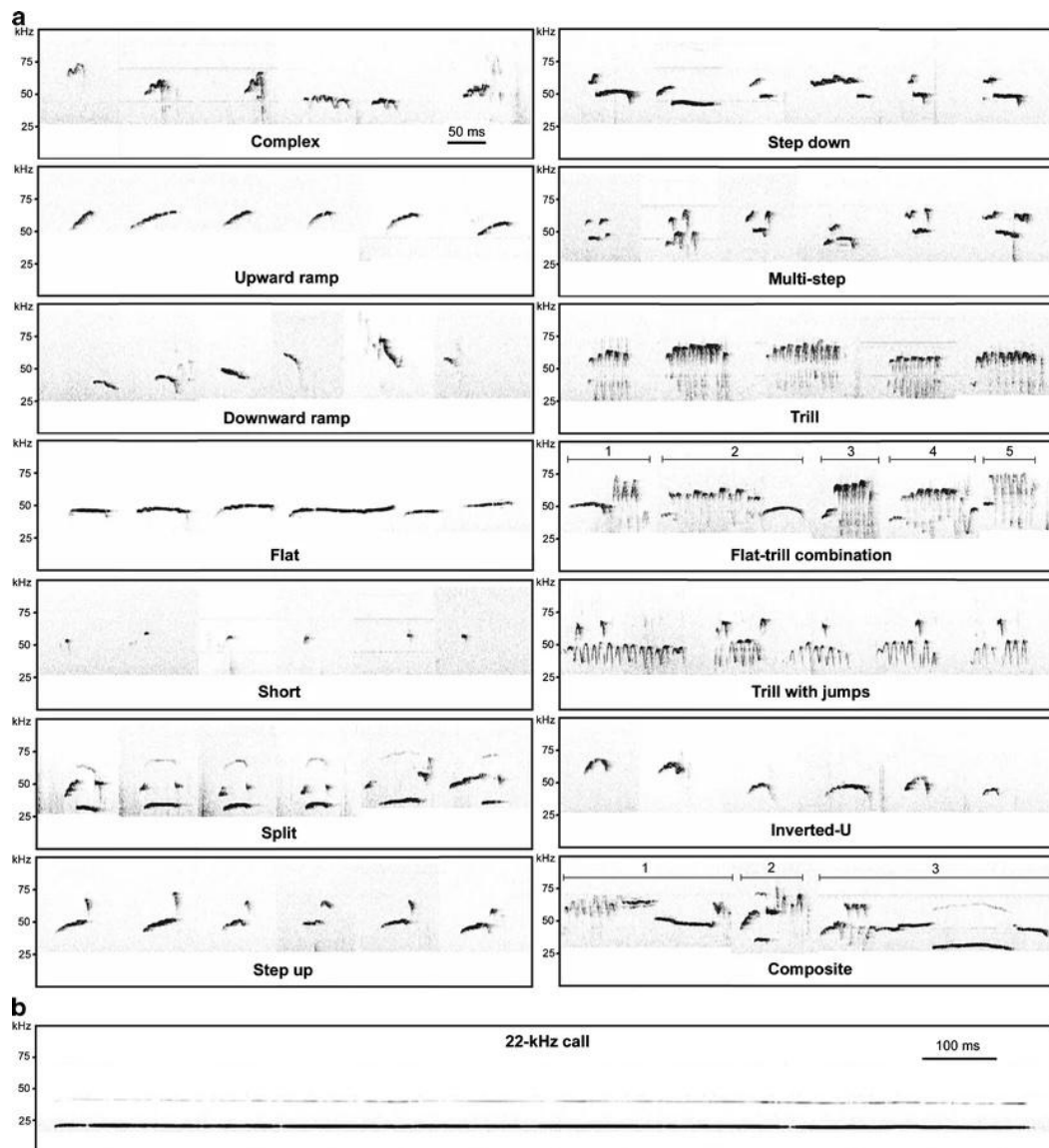
Wokalizacje ultradźwiękowe (USV) to dźwięki emitowane przez zwierzęta w częstotliwościach powyżej 20 kHz, sięgających nawet do 100 kHz [393, 394]. Niesłyszalne

dla ludzkiego ucha USV stanowią ważny element komunikacji u wielu gatunków zwierząt, w szczególności gryzoni [395–400]. Szczury i myszy emitują dźwięki w zakresie słyszalnym, takie jak "piski" (ang. squeaks) [401, 402], jednak formą komunikacji głosowej gryzoni są wokalizacje ultradźwiękowe [395, 403, 404]. Wokalizacje szczurów, klasyfikowane na podstawie ich średniej szczytowej lub dominującej częstotliwości, przedmiotem intensywnych badań ze względu na ich korelację z ekspresją funkcjonalnie odrębnych emocjonalnych: pozytywnych (apetytywnych, euforycznych) lub negatywnych (dysforycznych, awersyjnych) [404–409]. Wyróżnia się trzy główne klasy USV szczurów: "22-kHz", "40-kHz" i "50-kHz" [405, 410].

Wokalizacje ultradźwiękowe typu "40-kHz" to ogólne określenie dźwięków mieszczących się zazwyczaj w zakresie częstotliwości od 30 do 70 kHz, emitowanych przez szczurze oseski [411–413]. Wokalizacje te są głównie wywoływane przez bodźce awersyjne lub stresujące. W badaniach nad "40-kHz" USV najczęściej badanym paradygmatem jest separacja osesków od matki i gniazda [411]. Oprócz izolacji, do czynników indukujących te wokalizacje należą: niskie temperatury, szorstkie traktowanie (ang. handling), leki anksjogenne czy odstawienie opioidów [414–427]. Chociaż możliwość interpretacji USV o częstotliwości 40 kHz jako bezpośrednich markerów strachu lub lęku jest ograniczona [405, 415, 418, 423, 428], zmiany częstotliwości i czasu trwania tych dźwięków mogą być wykorzystywane jako wskaźniki poziomu stresu u szczurzych osesków [411, 429].

Wśród głównych wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych przez młode i dorosłe szczury wyróżnia się dźwięki o częstotliwościach "22-kHz" i "50-kHz", reprezentujące dwie odrębne klasy sygnałów związanych z różnymi stanami afektywnymi [393, 430]. Wokalizacje "22-kHz", zazwyczaj mieszczące się w zakresie częstotliwości od 20 do 35 kHz, charakteryzują się minimalną modulacją częstotliwości i długim czasem trwania [393]. Chociaż zazwyczaj przekraczają 300 ms, krótsze sygnały mogą występować w specyficznych warunkach, takich jak hiperwentylacja wywołana paniką [430, 431]. Przykładowy spektrogram przedstawiony został na rys. 1. Emisja wokalizacji "22-kHz" wskazuje na zwiększone pobudzenie w odpowiedzi na bodźce awersyjne lub negatywne [432, 433]. Dowody sugerują, że wokalizacje te mogą pełnić zarówno funkcję indywidualnej ekspresji awersyjnego stanu emocjonalnego, jak i sygnałów społecznych, ostrzegających osobniki tego samego gatunku o potencjalnym niebezpieczeństwie [431, 434–437].

Szczury emitują wokalizacje ultradźwiękowe w klasie “22-kHz” w odpowiedzi na stresujące interakcje społeczne, takie jak obecność drapieżników [437, 438], spotkania z agresywnymi osobnikami tego samego gatunku [439], lub kontakt z nieznanymi eksperymentatorami [440]. Wokalizacje te są również emitowane podczas ekspozycji na bodźce awersyjne, jak podmuchy powietrza [433, 441] czy bodźce elektryczne [442, 443] stosowane w paradygmatach warunkowania strachu. “22-kHz” USV mogą być także emitowane w odpowiedzi na fizjologiczną dysfориę lub dyskomfort, na przykład w czasie doświadczania bólu [444] i po odstawieniu substancji psychoaktywnych [445, 446]. Dodatkowo, wokalizacje te mogą być emitowane w oczekiwaniu na bodźce awersyjne, co potwierdza ich związek z negatywnymi stanami emocjonalnymi [447]. Ze względu na silną korelację z doświadczeniami o charakterze negatywnym wokalizacje z klasy “22-kHz” są uznawane za wiarygodne markery awersyjnego pobudzenia u szczurów. W 2019 roku Brudzynski zasugerował, że emisja tych wokalizacji może być traktowana jako ewolucyjny homolog ludzkiego płaczu, choć ograniczony do funkcji sygnalizowania niepokoju i lęku, ponieważ stany emocjonalne zwierząt nie pokrywają się z ludzkimi [448].



**Rys. 1.** Klasyfikacja wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych przez dorosłe szczury w pasmach częstotliwości: (a) “50-kHz” – markery apetytywnych stanów emocjonalnych i (b) “22-kHz – markery awersyjnych stanów emocjonalnych, wraz ze spektrogramami przykładowych dźwięków z każdej podkategorii pochodząca z Wright et al. [449].

Wokalizacje ultradźwiękowe w klasie “50-kHz” są markerem pobudzenia związanego z nagrodą oraz pozytywnych stanów emocjonalnych [395, 404, 450, 451]. Są to krótkie dźwięki o czasie trwania zazwyczaj poniżej 30–40 ms, mieszczące się w zakresie częstotliwości od 35 do 75 kHz, choć czasami mogą osiągać nawet około 100 kHz [393]. W klasie “50-kHz” można wyróżnić dźwięki o stałej oraz modulowanej częstotliwości (rysunek 1) [452, 453]. Wiele z nich wykazuje różne wzorce modulacji, co pozwala na ich dalszą klasyfikację na podtypy, takie jak "trill", "complex", "step-up" czy "step-down". Dźwięki charakteryzujące się brakiem znaczącej modulacji częstotliwości to

typy "short" i "flat". Funkcjonalne znaczenie tych podtypów, o ile istnieje, pozostaje nieznane.

Te apetytywne wokalizacje są często związane z pozytywnymi interakcjami społecznymi, takimi jak: nieagresywny kontakt [454–456] lub zabawa z innymi osobnikami [457, 458] oraz interakcje z znanymi eksperymentatorami [451]. W celu wywołania "50-kHz" USV, badacze często stosują procedurę "łaskotania" (ang. tickling), naśladującą zabawy młodych szczurów [459–461]. Wysoka skuteczność tej metody nasunęła sugestii, że wokalizacje "50-kHz" mogą sygnalizować pozytywny afekt, analogiczny do prymitywnych form ludzkiego śmiechu [451, 462, 463]. Hipoteza pozostaje przedmiotem dyskusji. Istnieją dowody wskazujące, że choć porównanie nie jest całkowicie nietrafione, relacja między apetytywnymi wokalizacjami szczurów a ludzkim śmiechem jest znacznie bardziej złożona [464]. Niemniej jednak dźwięki z klasy "50-kHz" potocznie zwane są "śmiechem szczurów".

Wokalizacje ultradźwiękowe "50-kHz" nie są ograniczone wyłącznie do kontekstów społecznych. Pojawiają się również w odpowiedzi na sztuczne bodźce nagradzające, takie jak podanie substancji psychoaktywnych [177, 465, 466] czy optogenetyczna lub farmakologiczna stymulacja niektórych obszarów mózgu, np. jądra półleżącego [467] lub pola brzusznej nakrywki [468]. Wokalizacje te można zaobserwować także w zadaniach angażujących procesy poznawcze, na przykład w paradigmatkach pamięci i uczenia się [469–472]. Ponadto, oczekiwanie na nagrody, takie jak zabawa [473], elektryczna stymulacja mózgu [474] czy substancje psychoaktywne [465, 475], również może wywoływać "50-kHz" USV. Obserwacje te potwierdzają, że wokalizacje "50-kHz" odzwierciedlają szeroki zakres stanów apetytywnego pobudzenia.

U szczurów, podobnie jak u ludzi, występuje zmienność osobnicza. Różnice indywidualne przejawiają się np. w podstawowych poziomach wokalizacji ultradźwiękowych, zwłaszcza w zakresach "50-kHz" i "22-kHz" [406]. Zmienność ta obejmuje szereg czynników, wykraczających poza częstotliwość i czas trwania dźwięków, przyczyniając się do złożonego repertuaru wokalnego każdego osobnika. Istotną rolę w tej zmienności odgrywają np. czynniki genetyczne, o czym świadczy selektywna hodowla szczurów charakteryzujących się wysokimi wskaźnikami wokalizacji ultradźwiękowych [422, 476]. Ponadto występują różnice zależne od płci – samce szczurów zazwyczaj wykazują wyższe wskaźniki wokalizacji niż samice podczas interakcji społecznych [410]; a także różnice związane z wiekiem – młodsze osobniki emitują zazwyczaj więcej



wokalizacji w zakresie “50-kHz”, szczególnie podczas zabaw w czasie kontaktów społecznych [463].

Doświadczenia poszczególnych osobników również wywierają znaczący wpływ na wzorce wokalizacji ultradźwiękowych. Przykładowo, wcześniejsza ekspozycja na bodźce awersyjne lub izolacja społeczna mogą zmieniać zachowania wokalne [431, 477]. Zaobserwowano również różnice indywidualne w warunkowanej odpowiedzi kontekstowej u szczurów poddanych temu samemu protokołowi podawania morfiny [136]. Najnowsze badania sugerują, że szczury, podobnie jak ludzie, mogą posiadać odrębne cechy osobowości wpływające na ich wzorce emisji wokalizacji ultradźwiękowych [478]. Na przykład w kontekstach nagradzających, szczury przejawiające więcej optymistycznych zachowań emitowały więcej “50-kHz” USV w porównaniu do bardziej ostrożnych lub “pesymistycznych” osobników [479]. Uwzględnianie tych różnic indywidualnych pozwala na bardziej zniuansowane spojrzenie na komunikację i zachowanie szczurów, co umożliwia dokładniejszą interpretację emisji wokalizacji ultradźwiękowych w badaniach eksperymentalnych.

### **1.5.3. Wokalizacje ultradźwiękowe w badaniach nad uzależnieniami.**

Analiza emisji wokalizacji ultradźwiękowych znajduje szerokie zastosowanie w naukach neurobiologicznych. USV dorosłych szczurów dają wgląd w ich stany emocjonalne [393], co pozwala lepiej zrozumieć zachowania społeczne, funkcje i dysfunkcje emocjonalne oraz wpływ czynników środowiskowych i fizjologicznych. Wartość komunikacyjna USV czyni je użytecznym narzędziem w badaniach nad podstawami zachowań społecznych oraz stanów psychologicznych, takich jak zaburzenia afektywne i uzależnienia [405, 413, 480, 481].

W modelach eksperymentalnych parametry ilościowe i jakościowe wokalizacji ultradźwiękowych mogą być powiązane z określonymi zmianami kontekstowymi lub istotnymi bodźcami wewnętrznymi i zewnętrznymi, a także mogą odzwierciedlać adaptacje w systemach percepcyjnych i/lub fizjologicznych [413, 482, 483].

Kwantyfikacja USV jest powszechnie stosowana do oceny zmian we wzorcach wokalizacji w odpowiedzi na różne warunki eksperymentalne, terapię czy do oceny różnic indywidualnych. W badaniach nad uzależnieniami porównanie liczby i rodzajów, a także analiza czasu trwania, częstotliwości czy typów USV emitowanych przez szczury pozwala ocenić wpływ substancji psychoaktywnych na stany afektywne. Dostarcza to ważnych

informacji na temat indywidualnej wrażliwości na substancje nagradzające oraz umożliwiając dynamiczną obserwację przetwarzania emocjonalnego w czasie oczekiwania lub przyjmowania substancji [136, 484, 485]. Analiza zmian we wzorcach USV umożliwia ocenę wpływu substancji uzależniającej, odstawienia i głodu narkotykowego na emocje, co przyczynia się do głębszego zrozumienia zachowań związanych z uzależnieniem.

Hamed *i in.* [177] przedstawili wpływ wielokrotnych podań morfiny na występowanie i intensywność wokalizacji ultradźwiękowych u szczurów. Codzienne podawanie morfiny przez 14 dni spowodowało wzrost liczby epizodów USV zarejestrowanych w 14 dniu w porównaniu z 1 i 7 dniem. Co istotne, po 14-dniowym okresie abstynencji, szczury wykazywały zwiększoną emisję USV w paśmie “50-kHz” po ponownej ekspozycji na kontekst związany z podaniem morfiny. Natomiast, emisja wokalizacji ultradźwiękowych mierzona tuż przed podaniem 14 dawki (przed rozpoczęciem okresu odstawienia) była znikoma. Zjawisko nasilonej emisji “50-kHz” USV po okresie odstawienia substancji uzależniającej, wywołanej ponowną ekspozycją na kontekst związany z podawaniem substancji, jest zgodne ze zjawiskiem inkubacji głodu narkotykowego (więcej w sekcji 1.2.4). Badanie to potwierdza przydatność USV jako behawioralnej miary procesów uzależnienia, podkreślając ich potencjał w uchwyceniu zależnych od czasu zmian w głodzie narkotykowym i stanach motywacyjnych.

## **1.6. Hipoteza dotycząca roli ko-transmisji serotonergiczno – glutaminianergicznej**

Po raz pierwszy serotoninę (5-hydrokсыtryptamina, 5-HT) wyizolowano z płytek krwi w 1948 roku i zidentyfikowano jako czynnik wazokonstrykcyjny [486]. W organizmie człowieka około 90% serotoniny znajduje się w komórkach przewodu pokarmowego, głównie w komórkach enterochromafinowych, podczas gdy 8-10% jest magazynowane w płytkach krwi, a jedynie 1-2% występuje w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) [196]. Neurony serotonergiczne, występujące najliczniej w jądrach szwu – grzbietowym i pośrodkowym – oraz w sąsiadujących jądrach dolnej części pnia mózgu, tworzą rozległe projekcje do różnych obszarów mózgu, w tym ciała migdałowatego, jądra półleżącego i kory mózgowej, oraz do obwodowego układu nerwowego [181, 487]. Serotonina wpływa na liczne procesy fizjologiczne i behawioralne, m.in. nastrój [488, 489], cykle snu i czuwania [490], regulację emocji [491], przetwarzanie sensoryczne [492], oraz funkcje poznawcze [488, 493, 494].

Serotonina to indoloamina syntetyzowaną z aminokwasu tryptofanu [495]. W jej działaniu pośredniczy co najmniej 14 podtypów receptorów serotonergicznych, które dzielą się na siedem rodzin. Receptory 5-HT przedstawione zostały w tabeli 3. Wszystkie podtypy receptorów charakteryzują się specyficzną dystrybucją i funkcją, umożliwiając serotoninie modulację wielu złożonych procesów fizjologicznych i behawioralnych, np. regulację apetytu [496], lub zachowań związanych z używaniem substancji psychoaktywnych i uzależnieniami [497, 498].

Układ serotonergiczny stanowi kluczowy cel dla wielu leków terapeutycznych stosowanych w neurofarmakologii [187, 499, 500]. Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI), powszechnie stosowane w leczeniu depresji i zaburzeń lękowych, zwiększają stężenie serotoniny w synapsach poprzez hamowanie jej wychwytu zwrotnego, co nasila przekaźnictwo serotonergiczne [501]. Badania wykazały, że SSRI modulują preferencję miejsca uwarunkowaną kokainą u myszy z niedoborem dopaminy. Sugeruje to, że serotonina lub związane z nią mechanizmy mogą brać udział w przetwarzaniu nagrody w sytuacji deficytu dopaminergicznego [136, 502]. Niektóre leki przeciwpsychotyczne, przeciwłkowe i substancje psychodeliczne oddziałują na specyficzne podtypy receptorów serotonergicznych, co podkreśla znaczenie serotoniny w terapii i modulacji zaburzeń psychiatrycznych i neurologicznych.

Glutaminian jest najpowszechniej występującym neuroprzekaźnikiem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym, pełniącym kluczową rolę w transmisji i plastyczności synaptycznej [503]. Uczestniczy w wielu funkcjach poznawczych, takich jak uczenie się i pamięć [189, 504, 505]. Glutaminian jest syntetyzowany z aminokwasu glutaminy [506] i działa poprzez wiązanie się z różnymi podtypami receptorów, które zostały przedstawione w tabeli 3. Transmisja glutaminianergiczna jest modulowana przez szereg czynników [507–509], w tym glicynę, która pełni rolę ko-agonisty receptora NMDA [510], oraz sarkozynę – inhibitor transportera glicyny, mający znaczenie w terapii schizofrenii [511, 512].

Wychwyt zwrotny glutaminianu jest krytycznym procesem, który zapobiega nadmiernemu gromadzeniu się tego neuroprzekaźnika w szczeliny synaptycznej. Nadmiar glutaminianu prowadzi do intensywnej stymulacji receptorów glutaminianergicznych i ekscytotoksyczności [508, 513, 514]. Neurony glutaminianergiczne występują w całym mózgu, dzięki czemu glutaminian może wpływać na liczne obszary OUN, w tym te związane z kontrolą motoryczną [515], emocjami [505] i funkcjami poznawczymi wyższego rzędu [516].

Dysregulacja sygnalizacji glutaminianergiczej jest powiązana z wieloma zaburzeniami i chorobami neurologicznymi i psychiatrycznymi, takimi jak: choroba Alzheimera [517], schizofrenia [516], depresja [518] i epilepsja [519, 520]. Glutaminian odgrywa również kluczową rolę w neurobiologii uzależnień, modulując zachowania związane z poszukiwaniem substancji [521], głodem narkotykowym [140, 522] oraz nawrotami. Wzmacnia nawyki związane z przyjmowaniem substancji uzależniających poprzez udział w mechanizmach neuroplastyczności [523, 524] i uwrażliwia szlaki neuronalne układu nagrody na bodźce związane z substancjami psychoaktywnymi [525, 526]. Przewlekła ekspozycja na substancje uzależniające, takie jak opioidy, stymulanty czy alkohol, prowadzi do neuroadaptacyjnych zmian w szlakach glutaminianergicznym [527, 528]. W stanach uzależnienia chroniczna dysregulacja sygnalizacji glutaminianergiczej ma działanie neurotoksyczne, uszkadzając obszary kluczowe dla kontroli impulsów i pamięci, co utrwała i/lub nasila patologiczne zachowania związane z uzależnieniem [529–531].

W 2018 r. Hamed i Kurasa [136] wykazali pozytywną korelację między poziomami serotoniny i glutaminianu w ciele migdałowatym szczurów warunkowanych morfiną. Ponadto poziom serotoniny w ciele migdałowatym istotnie korelował z liczbą apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych (odpowiedź wywołana kontekstem). Oba neuroprzekazniki odgrywają kluczowe role w procesach uzależnienia, a ciało migdałowate jest strukturą zaangażowaną w wyrażanie emocji i wyuczonych zachowań emocjonalnych. W związku z tymi danymi hipotetyzujemy, że ko-transmisja serotoninergiczno-glutaminianergiczna w ciele migdałowatym może działać jako modulator stanu afektywnego w reakcji wywołanej kontekstem związanym z substancją psychoaktywną.

## 2. Cele pracy

Celem niniejszej pracy była analiza roli ko-transmisji serotonergicznej i glutaminergicznej w ciele migdałowatym w kontekście związanym z podaniem opioidowej substancji uzależniającej. Wykorzystano klasyczny, zwierzęcy model warunkowania miejsca oraz technikę chemogenetyczną z zastosowaniem receptorów DREADD hM3Dq i hM4Di, ukierunkowanych na neurony serotonergiczne i/lub glutaminergiczne w ciele migdałowatym w celu weryfikacji wpływu modulacji aktywności tych systemów neurotransmisyjnych na zachowanie szczurów w teście odpowiedzi kontekstowej. Odpowiedź kontekstową oceniano na podstawie liczby epizodów wokalizacji ultradźwiękowych i przebytego dystansu w reakcji na kontekst. Dodatkowym celem była próba ustalenia podłoża neurochemicznego badanych reakcji.

W ramach pracy poddano analizie następujące zagadnienia:

1. Wpływ manipulacji chemogenetycznych na zachowanie szczurów, mierzone liczbą emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych i przebytem dystansem, w trakcie ponownej ekspozycji na kontekst związany z morfiną, po okresie odstawienia.
2. Zależność między przebytem dystansem a liczbą emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych.
3. Neurochemiczne podłoże ekspresji stanów afektywnych.
4. Ocenę ingerencji chemogenetycznych w kontekście potencjału terapeutycznego w leczeniu uzależnień i próbę określenia szlaków neurochemicznych leżących u podstaw redukcji oraz wzrostów stanów afektywnych.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Szczury rasy Long-Evans

We wszystkich badaniach wykorzystane zostały naiwne eksperymentalnie samce szczurów odmiany Long-Evans, pochodzące z hodowli prowadzonej przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk. Zwierzęta żyły w standardowych klatkach domowych o wymiarach 56 cm (długość) × 37 cm (szerokość) × 20 cm (wysokość), ze wzbogaconym środowiskiem (rys. 2 C i E), w losowo przydzielonych grupach liczących 4 osobników. Szczury przebywały w standardowych warunkach laboratoryjnych obejmujących: stałą temperaturę  $21 \pm 2$  °C, wilgotność powietrza 40-60%, cyklu światło-ciemność 12/12 oraz swobodny dostęp do pożywienia i wody przez cały czas trwania eksperymentów. Wszystkie doświadczenia zostały przeprowadzone zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r., po uzyskaniu zgody nr 539/2018 od I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń nad Zwierzętami w Warszawie.

#### 3.2. Leki, odczynniki i wybrane substancje chemiczne

Tabela 7. Leki i inne substancje.

Nazwa	Identyfikator
0,9% fizjologiczny roztwór soli	Physiodose Gilbert NaCl 0,9%, Laboratoires Gilbert
<i>Acidum tolfenamicum</i> (kwas tolfenamowy) 40 mg/ml	Tolfine®; Vetoquinol S.A.; ID prod. leczn.: 100166996
Butorfanol (butorfanol winianu) 10 mg/ml	Butomidor®; Orion Pharma; ID prod. leczn.: 100168564
<i>Carbomerum</i> (karbomer w żelu) 2 mg/g	Vidisic®; Dr. Gerhard Mann Chem.-Pharm. Fabrik GmbH; kod prod.: ID-2187
Enrofloksacyna 25 mg/ml	Baytrill®; Bayer Animal Health GmbH; ID prod. leczn.: 100184600
<i>Heparinum natricum</i> (Heparyna) 5000 IU/ml	Heparinum WZF; Polfa Warszawa S.A.; ID prod. leczn.: 100028610
<i>Isofluranum</i> (Izofluran) 1000 mg/g płyn do sporządzania inhalacji parowej	Iso-Vet; Piramal Critical Care B.V.; ID prod. leczn.: 100263512
JHU37160 dihydrochloride (DREADD ligand) (water soluble)	Hello Bio; nr CAS: 2369979-68-8

<i>Solutio Iodi Spirituosa</i> , 7,5 g/250 g, płyn na skórę <b>(Jodyna)</b>	<b>Biowet Drwalew Sp. z o.o.</b> ; 100167330
<i>Ketaminum (Ketamina)</i> 100 mg/ml	<b>Biowet Puławy Sp. z o.o.</b> , ID prod. leczn.: 100171394
<i>Lidocaini hydrochloridum (lidokaina w żelu)</i>	Lignocainum Jelfa 20 mg/g Żel; <b>Busch Health Ireland Limited</b> ; ID prod. leczn.: 100037655
<i>Medetomidine hydrochloride</i> (chlorowodorek <b>medetomidyny</b> ) 1,0 mg/ml	Cepetor®; <b>ScanVet cp-pharma</b> ; ID prod. leczn.: 100238603
<i>Morphini Hydrochloridum</i> (chlorowodorek <b>morfiny</b> )	<b>Fagron sp. z.o.o.</b>
Pentobarbital sodowy 133,3 mg/ml	Morbital®; <b>Biowet Puławy Sp. z o.o.</b> ; ID prod. leczn.: 100171098
Pentobarbital 26,7 mg/ml	

**Tabela 8. Wektory wirusowe, surowice i przeciwciała**

Nazwa	Identyfikator
AAV-CamKII-hM3Dq-mCherry	<b>Addgene</b> ; nr kat.: 50476-AAV5
AAV-CamKII-hM4Di-mCherry	<b>Addgene</b> ; nr kat.: 50477-AAV5
LV-TPH2-hM3Dq-mCitrine	konstrukty wirusowe wykonane na specjalne zamówienie przez dr Agatę Klejman w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN; niedostępne w powszechnej sprzedaży
LV-TPH2-hM4Di-mCitrine	
normalna surowica kozia (NGS)	Normal Goat Serum Blocking Solution (S-1000); <b>Vector Laboratories</b>
normalna surowica ośła (NGS)	Normal Donkey Serum ab7475; <b>Abcam</b>
pierwszorzędowe przeciwciała mCherry Polyclonal Antibody	<b>ThermoFisher Scientific</b> ; nr kat.: # PA5-34974
przeciwciała pierwszorzędowe anty-5-HT	Goat anti 5-HT antibody; <b>Immunostar</b> ; nr. kat.: 20079
przeciwciała pierwszorzędowe anty-5-TPH	Sheep anti-Tryptophan Hydroxylase antibody (polyclonal); <b>Millipore</b> ; nr. kat.: AB1541
przeciwciała drugorzędowe Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit	Goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) ab150077; <b>Abcam</b> ;
przeciwciała drugorzędowe Alexa Fluor 546 Goat Anti-Rabbit	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Alexa Fluor® 546) ab150077; <b>Abcam</b> ;
przeciwciała drugorzędowe Alexa Fluor 488 Donkey anti-sheep	Donkey anti-sheep IgG (H+L) AB Alexa Fluor® 488; <b>Life Technologies</b> ; nr. kat.: A11015
przeciwciała drugorzędowe Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat	Donkey anti-goat IgG (H+L) AB Alexa Fluor® 488; <b>Life Technologies</b> ; nr. kat.: A11015

**Tabela 9. Wybrane odczynniki chemiczne**

Nazwa	Identyfikator
Alkohol etylowy bezwodny 99,8%	<b>Avantor Performance Materials Poland S.A.</b> ; nr CAS: 64-17-5;
Fluoromount-G™ Mounting Medium, with DAPI (medium zabezpieczające z DAPI)	<b>Invitrogen</b> ; nr. kat.: 00-4959-52
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	<b>Sigma-Aldrich</b> ; nr CAS: 30525-89-4
Gibco™ PBS (Phosphate-Buffered Saline)	<b>Life Technologies Limited</b> ; nr kat.: 181912-014
<b>Sacharoza</b>	<b>Sigma-Aldrich</b> ; nr CAS: 57-50-1
Surgipath FSC 22 Clear Frozen Section Media (medium do mrożenia tkanek)	<b>Leica Biosystems</b> ; nr kat.: 3801480
<b>Triton™ X-100</b>	<b>Sigma-Aldrich</b> ; nr CAS: 9036-19-5
<b>Tween® 20</b>	<b>Sigma-Aldrich</b> ; nr CAS: 9005-64-5

**Tabela 10. Wybrane materiały oraz sprzęt eksperymentalny.**

Nazwa	Identyfikator
Igły NanoFil™ (35G)	<b>World Precision Instruments</b>
Mikropompa Perfuzyjna NanoFil™	
Strzykawka NanoFil™ (10 µl)	
Kriostat	model: CM1850UV-1-1; <b>Leica</b> ; nr kat.: 047140228
Kulki (cyrkoniowe) do rozcierania tkanek (do homogenizacji)	1.4mm Zirconium oxide beads (325g); <b>Bertin Technologies</b> ; nr kat.: P000927-LYSK0-A.0
	2.8mm Zirconium oxide beads (325g); <b>Bertin Technologies</b> ; nr. kat.: P000926-LYSK0-A.0-BER
Probówki (polipropylenowe) do homogenizacji	Empty 2mL tubes and caps with O-ring (qty 500), <b>Bertin Corp</b> ; nr kat.: 50-154-2961
Płytki testowe 12-dółkowe	<b>Biologix Europe GmbH</b> ; nr kat.: 07-6012
Pompa perystaltyczna	Peristaltic Pump type pp1-05; <b>Zalimp</b>
Szkiełka nakrywkowe Menzel – wym. 24 × 50 mm	<b>Epredia</b> , Gerhard Menzel B.V. & Co. KG; nr kat.: BB02400500A113MNZ0
Szkiełka Superfrost™ Plus Adhesion Microscope Slides	<b>Epredia</b> , Gerhard Menzel B.V. & Co. KG; nr kat.: J1800AMNZ
Wiertło stomatologiczne	model: STRONG 207B; <b>Saeshin Precision Co., LTD.</b>



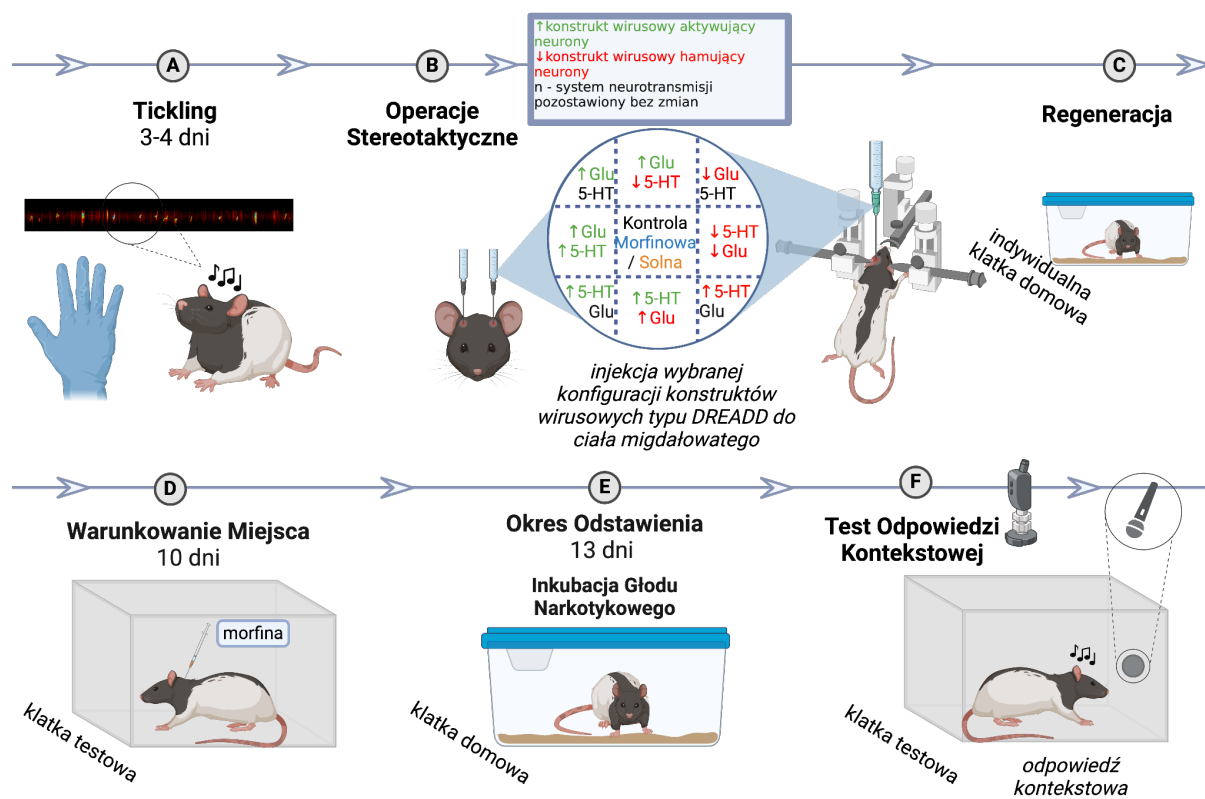
### **3.3. Klatka eksperymentalna**

W badaniach nad odpowiedzią kontekstową zachowanie identycznych warunków doświadczalnych w trakcie całego eksperymentu ma kluczowe znaczenie. Procedury eksperymentalne zostały przeprowadzone w specjalnie przystosowanych do tego celu pomieszczeniach behawioralnych z ograniczonym dostępem, co umożliwiło to redukcję nieznanych bodźców zapachowych oraz dźwiękowych. Istotne etapy eksperymentalne, takie jak wielokrotne podania morfiny (rys. 2 D) oraz test behawioralny (rys. 2 F), zostały przeprowadzone w trójwarstwowej, izolowanej akustycznie klatce o wymiarach 48 x 48 x 50 cm, wyłożonej szarym tworzywem sztucznym. Kontekst eksperymentalny obejmował wskazówki przestrzenne w postaci oświetlenia generowanego przez ledowe panele Aurory Nanoleaf, podwieszane pod sufitem. Panele emitowały jednolite, żółte światło. Dodatkowo, wokół klatek, na całej wysokości pomieszczenia, zamontowano czarne, materiałowe kurtyny, które odgradzały miejsce prowadzonych eksperymentów od światła zewnętrznego i innych, potencjalnie rozpraszających bodźców. Zachowanie zwierząt rejestrowano za pomocą kamery (Abus Security-Center, TVCC50511), umieszczonej nad klatkami.

### **3.4. Rejestracja wokalizacji ultradźwiękowych**

Do rejestracji wokalizacji ultradźwiękowych zostały wykorzystane mikrofony pojemnościowe Avisoft-UltraSoundGate CM16/CPA (Avisoft Bioacoustics). Mikrofony umieszczono na ścianie bocznej każdej klatki, na wysokości ok. 25 cm od dna (ilustracja na rys. 2F i rys. 3). Mikrofony te umożliwiają rejestrację dźwięków w zakresie częstotliwości od 15 do 180 kHz, z płaską charakterystyką częstotliwościową (6 dB) w przedziale między 25 a 140 kHz. Mikrofony podłączono do interfejsu UltraSoundGate 416H (Avisoft Bioacoustics), a następnie do komputera. Nagrania wykonano przy użyciu oprogramowania Avisoft-RECORDER, a pliki zapisano w formacie .wav.

### 3.5. Procedury eksperymentalne



**Rys. 2** Schemat eksperymentu badania roli ko-transmisji serotonergiczno-glutaminianergicznej jako neuromodulatora emocji w uzależnieniu. Każdy szczur został poddany następującym procedurom: (A) *tickling* w 20 s sesjach przez 3 dni; (B) iniekcja konstruktów wirusowych do ciała migdałowatego i rekonwalescencja pooperacyjnej (C) (z wyjątkiem osobników zakwalifikowanych do grup kontrolnych); (D) warunkowanie miejsca (kontekstu) poprzez 10-dniowe podania soli fizjologicznej (grupy kontrolna solna) lub morfiny (pozostałe grupy); (E) 13-dniowy okres odstawienia od substancji; oraz (F) test odpowiedzi kontekstowej, podczas którego rejestrowano emitowane wokalizacje ultradźwiękowe i zachowanie.

Badanie roli ko-transmisji serotonergiczno-glutaminianergicznej jako neuromodulatora emocji w odpowiedzi na kontekst związany z podaniem substancji psychoaktywnej przeprowadziliśmy zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 2.

#### 3.5.1. Handling (Oswajanie)

Przed rozpoczęciem eksperymentów wszystkie zwierzęta zostały poddane siedmiodniowej procedurze osuwajania (ang. *handling*) z eksperymentatorem. Pierwszego dnia eksperymentator wstawiał dłonie (w rękawiczkach) do klatki, by umożliwić szczurom oswojenie się z jego obecnością i zapachem w warunkach minimalnego stresu. W

kolejnych dniach zwierzęta były delikatnie brane na ręce i głaskane. Sesje osławiania trwały około 10 minut dziennie dla każdego szczura. Celem procedury była redukcja prawdopodobieństwa wywołania stresu u zwierząt podczas późniejszych interakcji z eksperymentatorem.

### **3.5.2. Procedura *Ticklingu* (Łaskotania)**

W pierwszym etapie badania wszystkie zwierzęta zostały poddane procedurze *ticklingu* (łaskotania) (rys. 2 A). *Tickling* to technika behawioralna stosowana na szczurach, oparta na metodzie opracowanej przez Jeffrey'a Burgdorfa [485], imitująca naturalną formę zabawy młodych i dorosłych osobników, przypominającą szczurze zapasy (ang. rough-and-tumble). W warunkach laboratoryjnych ręka eksperymentatora naśladowuje szczurzego partnera w zabawie [451, 459–461]. Prawidłowo przeprowadzona procedura wywołuje szereg pozytywnych efektów, takich jak emisja apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych w paśmie "50-kHz" oraz wzmocnienie pozytywnej więzi pomiędzy zwierzęciem a eksperymentatorem. Najlepsze efekty przynosi krótkie i powtarzalne wykonywanie procedury w ciągu kilku dni [461].

Wszystkie szczury biorące udział w badaniu zostały poddane procedurze *ticklingu* w sesjach trwających 20 s, codziennie przez trzy dni. *Tickling* polegał na wykonywaniu dynamicznych ruchów dłonią (w rękawiczce ochronnej), przypominających łaskotanie, po brzuchu i okolicach przednich kończyn oraz grzbiecie zwierzęcia. Wokalizacje ultradźwiękowe emitowane podczas wykonywania procedury każdorazowo rejestrowano u poszczególnych szczurów.

Procedura została przeprowadzona w celu oceny indywidualnej reaktywności układu nagrody u szczurów. *Tickling* wykonywano każdorazowo w klatkach domowych przetransportowanych do pokoju behawioralnego, co umożliwiło szczurom dodatkowe oswojenie się z transportem oraz nowym otoczeniem przy jednoczesnej minimalizacji ryzyka wystąpienia stresu.

### **3.5.3. Operacje stereotaktyczne iniekcji konstruktów wirusowych**

Wszystkie zwierzęta, z wyjątkiem szesnastu losowo wybranych samców zakwalifikowanych do grup kontrolnych, poddano stereotaktycznym iniekcjom konstruktów wirusowych do ciała migdałowatego (rys. 2 B). Podczas zabiegów chirurgicznych zastosowano następujące konstrukty wirusowe: AAV–CamKII–hM3Dq–

mCherry, AAV-CamKII-hM4Di-mCherry, LV-TPH2-hM3Dq-mCitrine oraz LV-TPH2-hM4Di-mCitrine, zgodnie z modyfikacjami przedstawionymi w tabeli 11. Wykorzystanie różnych typów wektorów wirusowych było uzasadnione rozmiarem promotora TPH2, którego sekwencja nie mieściła się w wektorze AAV. Więcej informacji na temat wektorów wirusowych znajduje się w sekcji [1.3.4.1](#). Wszystkie operacje przeprowadzono zgodnie z tym samym protokołem, z użyciem sterylnych narzędzi chirurgicznych.

Procedura stereotaktycznej iniekcji konstruktów wirusowych przebiegała następująco: zwierzę wprowadzano w anestezję izofluranem (w mieszaninie z tlenem, indukcja 5 %, podtrzymanie 2% w tlenie) i umieszczano w aparacie stereotaktycznym. Następnie golono sierść na głowie szczura, a skórę odkażano dwukrotnie (naprzemiennie 70% roztworem etanolu i jodyną). Oczy zabezpieczano przed wysychaniem żelem Vidisic®. Podskórnie podawano: środek przeciwbólowy (stężenie 3,3 mg/kg masy ciała; objętość iniekcji: 1 ml/kg masy ciała; Butomidol® w 0,9% roztworze NaCl; igła 0,5 mm x 16 mm), działający przeciwbólowo i przeciwzapalnie kwas tolfenamowy (stężenie 4 mg/kg masy ciała; objętość iniekcji: 1 ml/kg masy ciała; Tolfine® w 0,9% roztworze NaCl; igła 0,5 mm x 16 mm) oraz antybiotyk enrofloksacynę (stężenie 5 mg/kg masy ciała; objętość iniekcji: 1 ml/kg masy ciała; Baytrill® w 0,9% roztworze NaCl; igła 0,5 mm x 16 mm).

Po upewnieniu się, że zwierzę jest w głębokiej anestezji, skórę miejscowo znieczulano lidokainą w żelu i wykonywano nacięcie skóry długości około 1.5 cm wzdłuż czaszki (na linii szwów czołowego i strzałkowego), a następnie oczyszczano powierzchnię kości. Kolejnym krokiem było zlokalizowanie bregmy (punktu anatomicznego w obszarze ciemiączka przedniego na przecięciu szwu strzałkowego ze szwem wieńcowym), w odniesieniu do której poziomowano czaszkę i wyznaczono miejsca iniekcji.

Koordynaty iniekcji zostały wyznaczone zostały na podstawie atlasu mózgu szczura Paxions & Watson [316]: -2.52/AP (łac. *anterior-posterior*); ±4.8/ML (łac. *medial-lateral*); i -9/DV (łac. *dorsal-ventral*) (głębokość mierzona od powierzchni czaszki). Współrzędne stereotaktyczne wyznaczono na powierzchni czaszki w odniesieniu do punktu 0.0 (bregma).

Następnie, w czaszce wykonywano niewielkie otwory wiertłem stomatologicznym w wyznaczonych punktach. Obustronnie, zgodnie z wyznaczonymi koordynatami iniekcji, do ciała migdałowatego podawano zawiesinę nośników wirusowych w objętości 700 lub 1400 nl (objętość i wykorzystywane konstrukty zależne były od modyfikacji, które wraz z liczbą osobników zostały przedstawione w tabeli 11) z prędkością 100 nl/min za pomocą

igły, strzykawki i mikropompy perfuzyjnej NanoFil™. Po upływie 5 min od zakończenia iniekcji, umożliwiającym swobodną dyfuzję w tkance wstrzykniętego płynu z nośnikami wirusowymi, igłę powoli i delikatnie wyciągano. Następnie zakładano szwy i odkażano je jodyną. Brzegi zszytej rany ponownie miejscowo znieczulano lidokainą w żelu i odkażano jodyną. Na koniec podawano podskórną 1 ml fizjologicznego roztworu soli aby zapobiec odwodnieniu, i umieszczano zwierzę w standardowej klatce.

Podczas zabiegu i wybudzania pooperacyjnego temperaturę ciała zwierzęcia utrzymywano na stałym poziomie przy pomocy mat grzewczych. Czas rekonwalescencji, trwający około 7 dni, odbywał się w izolacji w standardowych klatkach domowych (rys. 2 C). Po zregenerowaniu szczura dołączano ponownie do grupy.

**Tabela 11. Liczba osobników w grupach, podzielonych zgodnie z wprowadzonymi manipulacjami chemogenetycznymi.** Objętość wprowadzanej zawiesiny z danymi nośnikami wirusowymi wynosiła 700 nl lub 1400 nl, odpowiednio w przypadkach wprowadzania pojedynczych konstruktów lub ich mieszaniny.

konstrukt wirusowy	aktywujący neurony glutaminianergiczne AAV-CamKII-hM3Dq-mCherry [v = 700 nl]	hamujący neurony glutaminianergiczne AAV-CamKII-hM4Di-mCherry [v = 700 nl]	- [v = 0 nl]
aktywujący neurony serotoninerdyczne LV-TPH2-hM3Dq-mCitrine [v = 700 nl]	<b>10</b> <b>grupa: "Glu+5-HT+"</b> (jednoczesna aktywacja systemu sygnalizacji glutaminianergicznej i serotoninerdycznej)	<b>8</b> <b>grupa: "Glu-5-HT+"</b> (jednoczesne hamowanie systemu sygnalizacji glutaminianergicznej i aktywacja systemu sygnalizacji serotoninerdycznej)	<b>10</b> <b>grupa: "5-HT+"</b> (aktywacja systemu sygnalizacji serotoninerdycznej)
hamujący neurony serotoninerdyczne LV-TPH2-hM4Di-mCitrine [v = 700 nl]	<b>8</b> <b>grupa: "Glu+5-HT-"</b> (jednoczesna aktywacja systemu sygnalizacji glutaminianergicznej i hamowanie systemu sygnalizacji serotoninerdycznej)	<b>13</b> <b>grupa: "Glu-5-HT-"</b> (jednoczesne hamowanie systemu sygnalizacji glutaminianergicznej i serotoninerdycznej)	<b>11</b> <b>grupa: "5-HT-"</b> (hamowanie systemu sygnalizacji serotoninerdycznej)
- [v = 0 nl]	<b>12</b> <b>grupa: "Glu+"</b> (aktywacja systemu sygnalizacji glutaminianergicznej)	<b>12</b> <b>grupa: "Glu-"</b> (hamowanie systemu sygnalizacji glutaminianergicznej)	<b>16</b> <b>grupy kontrolne: morfinowa i solna</b> (brak ingerencji)

### 3.5.4. Warunkowanie miejsca i okres odstawienia

Po aklimatyzacji zwierząt w grupie rozpoczynano procedurę warunkowania miejsca (rys. 3 D). Przez 10 kolejnych dni szczur, raz dziennie, podawano roztwór morfiny (podanie podskórne w okolice karku; 1 ml/kg masy ciała; morfina w 0,9% roztworze NaCl; igła 0,5 mm x 16 mm), zgodnie z dawkowaniem przedstawionym w tabeli 12, w stałym kontekście przestrzennym w pokoju behawioralnym. Wyjątek stanowiło 8 osobników losowo przydzielonych do grupy kontrolnej solnej, którym podawano fizjologiczny roztwór soli (0,9% NaCl) w objętości 1 ml/kg masy ciała. Po iniekcji zwierzęta umieszczano do klatek testowych w podgrupach, ograniczonych do współdomowników z klatek domowych w celu ograniczenia stresu związanego ze zmianą miejsca oraz izolacją.

**Tabela 12. Dawkowanie morfiny.** Niższa dawka w ciągu pierwszych 3 dni pozwoliła szczurom budować tolerancję i ograniczyć ryzyko śmierci w wyniku depresji oddechowej spowodowanej zbyt wysoką początkową dawką morfiny.

Dzień	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dawka morfiny [mg / kg masy ciała]	7	8	9	10	10	10	10	10	10	10

Okres odstawienia (rys. 2 E) rozpoczynał się dzień po ostatniej iniekcji morfiny lub soli fizjologicznej, w zależności od grupy, i trwał 13 dni. W tym czasie zwierzęta przebywały w swoich klatkach domowych. Okres ten stanowił czas inkubacji głodu opioidowego.

### 3.5.5. Test odpowiedzi kontekstowej

W dzień po zakończeniu okresu odstawienia zwierzęta poddawano testowi odpowiedzi kontekstowej zgodnie z następującą procedurą.

Trzydzieści minut przed rozpoczęciem testu behawioralnego szczurowi podawano dootrzewnowo iniekcję roztworu liganda aktywującego receptory DREADD – JHU37160 (0,3 mg/kg masy ciała; objętość iniekcji: 1 ml/kg masy ciała; JHU37160 w 0,9% roztworze NaCl; igła 0,5 mm x 16 mm).

Zastosowanie JHU37160 było podyktowane jego obiecującym profilem farmakologicznym (więcej informacji w sekcji 1.3.4.2). Agonistę receptorów DREADD podano wszystkim zwierzętom, w tym osobnikom z grup kontrolnych, w celu zapewnienia

maksymalnej jednolitości eksperymentalnej do późniejszych porównań biochemii mózgow w badaniach *post-mortem*.

Po 30 minutach od iniekcji zwierzę umieszczano w kontekście związanym z podawaniem substancji, tj. w tej samej klatce, w której wcześniej otrzymywało podania morfiny lub soli fizjologicznej. Przed reekspozycją na kontekst klatkę dezynfekowano 70% roztworem etanolu w celu usunięcia nieczystości oraz śladów zapachowych. Test odpowiedzi kontekstowej trwał 20 minut. W tym czasie szczur mógł się swobodnie poruszać po klatce. Zachowanie zwierzęcia oraz emitowane przez nie wokalizacje ultradźwiękowe rejestrowano przez cały czas trwania testu behawioralnego (szczegółowe informacje dotyczące wykorzystywanego sprzętu opisane zostały w [p.3.3](#) i [p. 3.4](#)).

Po zakończeniu testu odpowiedzi kontekstowej szczura usypiano (5 % izofluranu w powietrzu), a następnie uśmiercano przez dekapitację. Mózg ekstrahowano i natychmiast mrożono techniką *flash-frozen* (umieszczano bezpośrednio *n*-heptanie zmrożonym suchym lodem). Tak przygotowany mózg zabezpieczano w folii aluminiowej i przechowywano w temperaturze -80 °C.

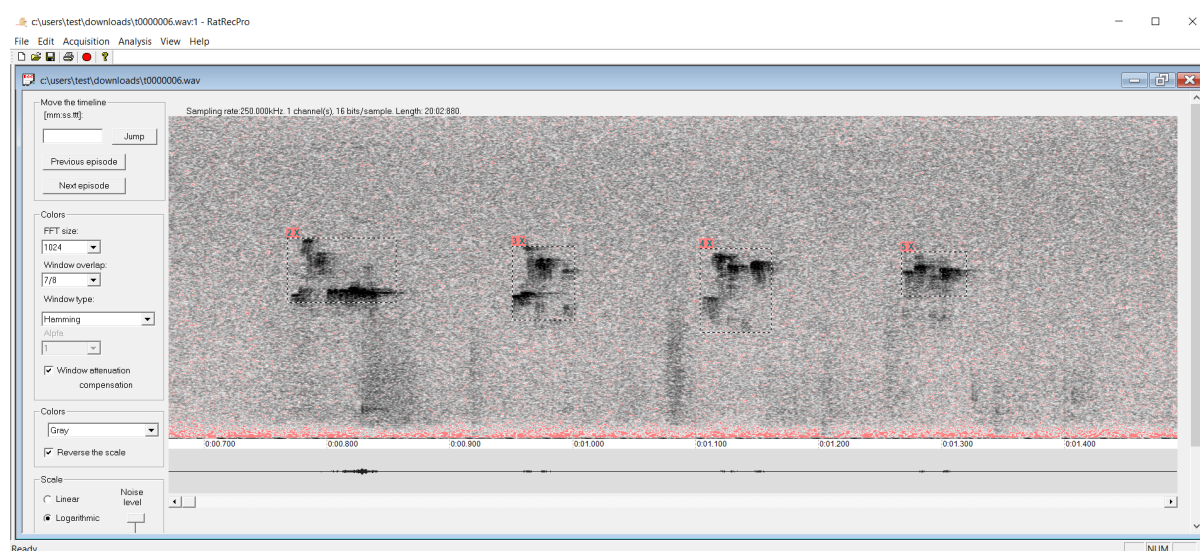
Z uwagi na planowaną analizę stężenia neuroprzekaźników i neuromodulatorów w tkankach mózgowych metodą spektrometrii mas zrezygnowano z perfuzyjnego utrwalenia tkanek, aby wykluczyć potencjalny wpływ substancji chemicznych używanych w tym procesie na ilości monoamin i aminokwasów.

## **3.6. Przetwarzanie danych behawioralnych**

### **3.6.1. Dane audio**

Wszystkie nagrania audio zarejestrowane w trakcie eksperymentów przetworzono przy użyciu oprogramowania RAT-REC Pro 7.5. Do analizy zarejestrowanych sygnałów dźwiękowych zastosowano dyskretną transformatę Fouriera (1024 próbki, okno Hamminga), co umożliwiło ich wizualizację w postaci spektrogramów w wybranej skali kolorystycznej (rys. 3). Każdy epizod USV został następnie zidentyfikowany i oznaczony ręcznie odpowiednią etykietą, umożliwiając automatyczny pomiar następujących parametrów: liczba wokalizacji ultradźwiękowych, całkowity czas trwania wokalizacji (s), średnią długość wokalizacji (s), szerokość pasma częstotliwości (kHz), liczbę przerw, średnią długość przerwy (s) oraz średnią częstotliwość szczytowa (kHz). Pliki formatu .epz eksportowano do dalszej analizy statystycznej. Spośród wszystkich analizowanych

parametrów do analiz statystycznych wybrano ten najbardziej znaczący, czyli liczbę emitowanych epizodów USV podczas 20 minutowej sesji testowej.

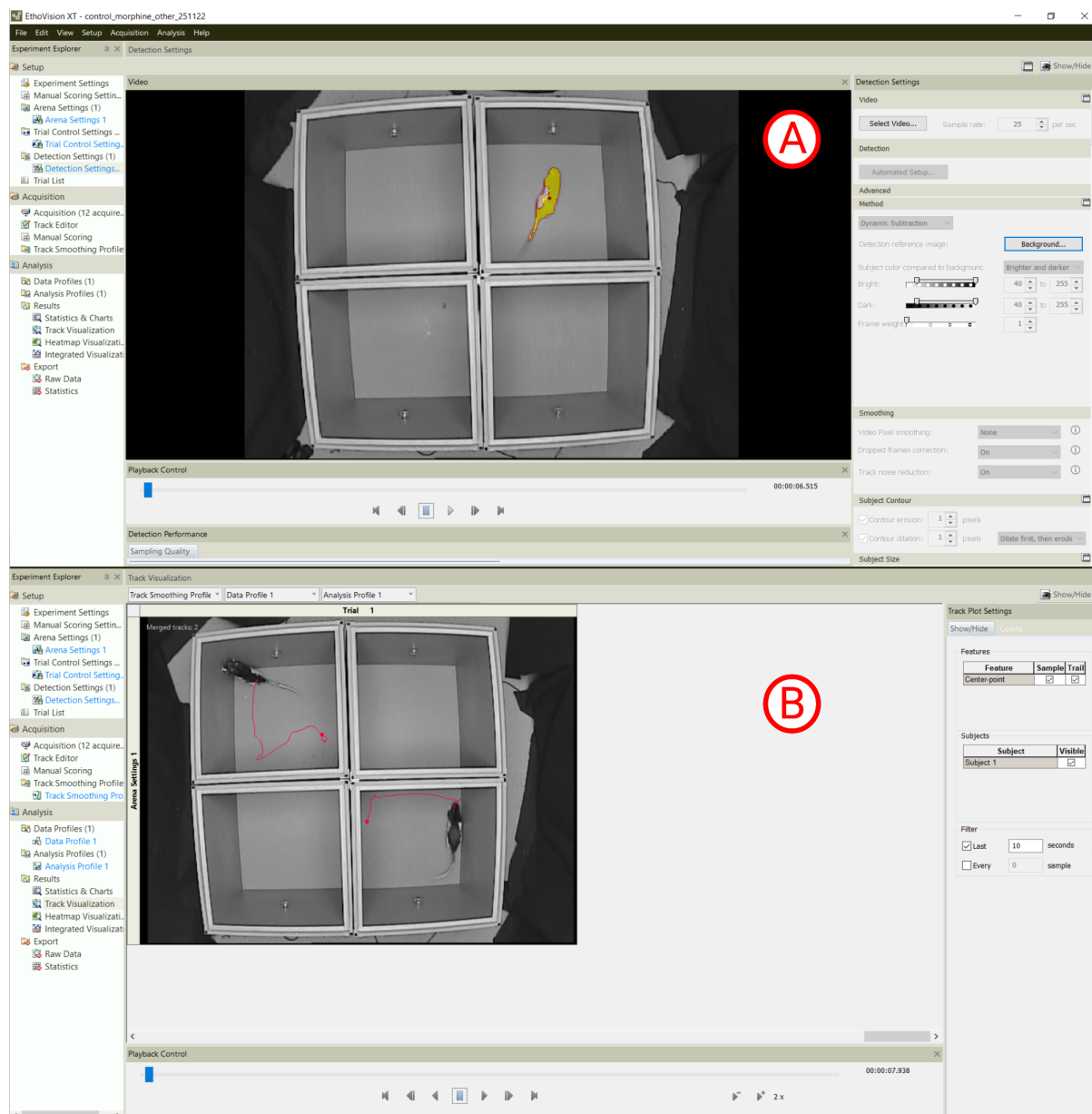


**Rys. 3.** Przykładowy zrzut ekranu z programu RAT-REC Pro 7.5, przedstawiający wokalizacje ultradźwiękowe z klasy “50-kHz”, zarejestrowane w trakcie testu odpowiedzi kontekstowej, oraz etykiety poszczególnych epizodów USV.

### 3.6.2. Dane video

Przetwarzanie nagrań przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Ethovision 15.0.1418. W celu uzyskania szczurów zastosowano tryb “center-point detection”, przyjmując jednego osobnika (“obiekt”) na arenę. Dla każdego nagrania zdefiniowano 4 areny, po jednej na każdą z czterech klatek, dopasowując je do rzeczywistego środowiska eksperymentalnego (rys. 4). Do detekcji szczura i śledzenia jego trajektorii wykorzystano metodę detekcji kontrastu “Dynamic Subtraction” z opcją porównywania obiektu “Brighter and darker”, która identyfikowała szczura na podstawie różnicy w jasności między nim a tłem. Ustawienia te okazały się optymalne dla szczurów rasy Long-Evans o białoczarnym umaszczeniu. Wizualizację działania detekcji przedstawiono na rysunku 4 A. Po akwizycji danych zweryfikowano wykryte trajektorie. Przykładowe trajektorie przedstawiono na rysunku 4. Do dalszej analizy statystycznej wyeksportowano również automatycznie obliczone parametry ruchu, takie jak: przebyta odległość (cm), prędkość (cm/s) i przyspieszenie (cm/s<sup>2</sup>). Do analiz statystycznych wybrano parametr przebytego dystansu (cm) w trakcie 20 minutowej sesji testowej.



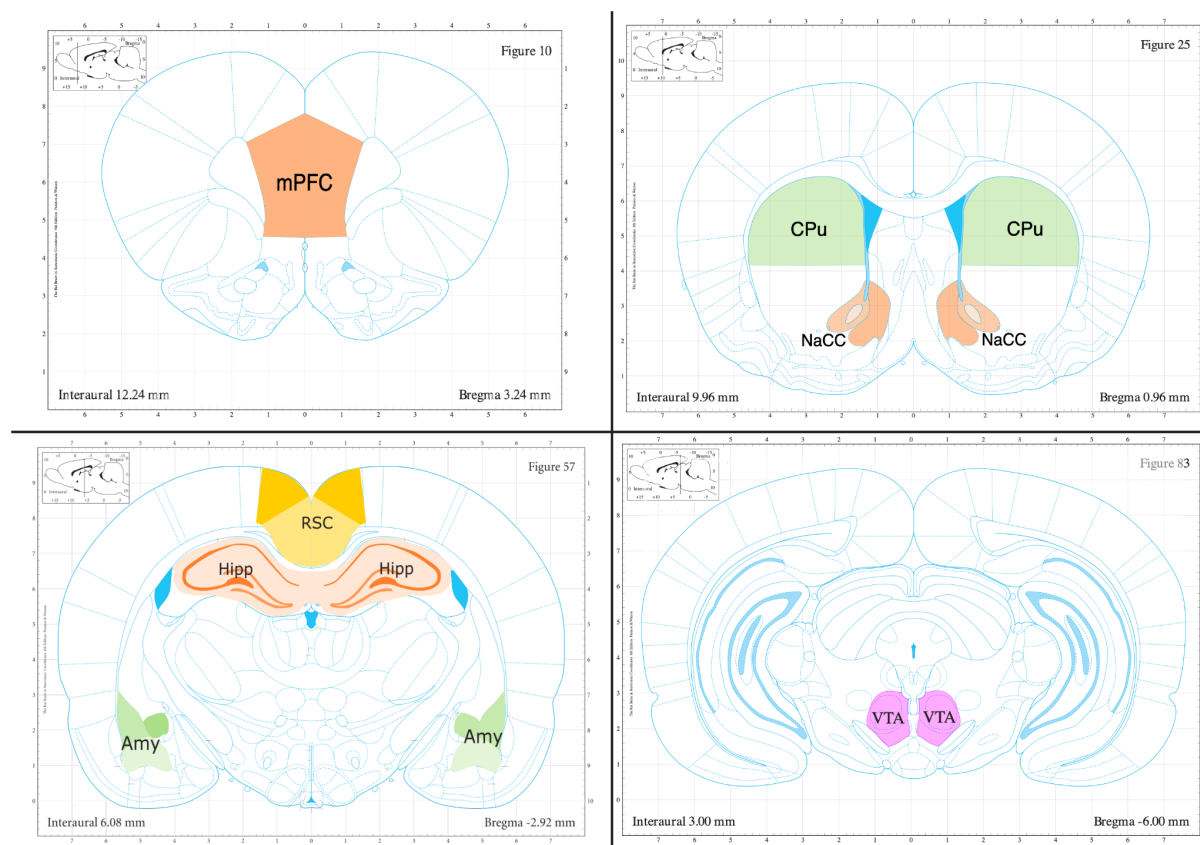


**Rys. 4. Analiza nagrań wideo w oprogramowaniu Ethovision 15.0.1418 (A) Efekty detekcji szczura przeprowadzonej w oprogramowaniu Ethovision, przy wykorzystaniu metody detekcji kontrastu “Dynamic Substraction”. Część z dodatkowych parametrów pokazana jest po prawej stronie. (B) Przykładowe trajektorie z oprogramowania Ethovision wykryte w pierwszych 7 s nagrania.**

### 3.7. Przygotowanie tkanek do analizy

Przygotowanie materiału do dalszych analiz przebiegało zgodnie z następującym protokołem. Mózg, po przeniesieniu z zamrażarki (-80 °C) do kriostatu, pozostawiano w nim na około 2 godz. do osiągnięcia przez tkankę do temperatury około -22 do -20 °C. Następnie mózg przytwierdzano do tarczy kriostatu przy użyciu medium do mrożenia tkanek (Surgipath FSC 22 Clear Frozen Section Media).

Po rozmrożeniu mózg krojono w płaszczyźnie koronalnej na skrawki o grubości 40  $\mu\text{m}$ , pobierając, w zależności od możliwości, jeden lub dwa przekroje zawierające ciało migdałowate (rys. 5, lewa dolna figura) do barwienia immunohistochemicznego. Do analizy za pomocą spektrometrii mas preparowano struktury mózgowo zilustrowane na rys. 3. Tkanki z obu półkul mózgowych ekstrahowano skalpelem i umieszczano w osobnych, 2-mililitrowych probówkach polipropylenowych do homogenizacji, zawierających cyrkoniowe kulki do rozcierania tkanek (1 struktura wycinana obustronnie / 1 probówkę; 7 struktur / 1 mózg). Każdą probówkę ważono dwukrotnie na wadze analitycznej: przed i po dodaniu struktury, w celu obliczenia ostatecznej masy tkanki. Tak przygotowane materiały mrożono ponownie w temperaturze  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i przechowywano do późniejszych analiz.



**Rys. 5.** Na rysunku przedstawiono cztery przekroje szczurzego mózgu [316] z zaznaczeniem struktur ekstrahowanych do spektrometrii mas: przyśrodkowej kory przedczołowej (mPFC), prążkowie (CPu), jądra półleżącego (NAcc), ciała migdałowatego (Amy), hipokampu (Hipp), kory retrosplenialnej (RSC) i pola brzusznej nakrywki (VTA). Z każdego mózgu preparowano siedem struktur. Każdą strukturę wycinano skalpelem z obu półkul mózgowych, a następnie umieszczano w probówce do homogenizacji do dalszej analizy przy wykorzystaniu spektrometrii mas. Dodatkowo, w zależności od możliwości, pobierano jeden lub dwa skrawki o grubości 40  $\mu\text{m}$  zawierające ciało migdałowate (przekrój w lewym dolnym rogu) do barwienia immunohistochemicznego.

### **3.8. Analiza ilościowa poziomu wybranych monoamin i aminokwasów z wykorzystaniem spektrometrii masowej**

Analiza ilościowa poziomu wybranych monoamin i aminokwasów z wykorzystaniem spektrometrii masowej została wykonana w Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas działającego w Zakładzie Biofizyki IBB PAN. Badanie przebiegało według następującego protokołu.

Do próbek zawierających wyekstrahowane struktury dodano odpowiednią objętość 5% kwasu trichlorooctowego będącego buforem do homogenizacji (1  $\mu$ L buforu na 1 mg tkanki). Próbki homogenizowano przez 10 min przy wykorzystaniu homogenizatora orbitalnego Cryolyss Evolution Tissue Homogenizer (PreCellys) utrzymującego stałą temperaturę 4°C. Następnie homogenaty wirowano przez 10 min w temperaturze 4°C z prędkością 14 000 obrotów na minutę. Supernatant przeniesiono do nowej polipropylenowej próbki.

Stężenie 7 neuroprzebieżników: dopaminy (DA), 3-metoksytyraminy (3-MT), dihydroksyfenyl kwasu octowego (DOPAC), noradrenaliny (NA), serotoniny (5-HT), kwasu homowanilinowego (HVA) oraz kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA), oznaczono z zastosowaniem ultrasprawniej chromatografii cieczowej (Waters Acquity UPLC) sprzężonej ze spektrometrią mas (Waters Xevo-TQS). 30  $\mu$ L supernatantu dodano do nowej polipropylenowej próbki. Następnie dodano 70  $\mu$ L mieszaniny znakowanych izotopowo standardów wewnętrznych (dopamina-d<sub>4</sub>, 3- metoksytyramina-d<sub>4</sub>, dihydroksyfenyl kwas octowy-d<sub>5</sub> noradrenalina-d<sub>3</sub>, serotonina-d<sub>6</sub>, 5-hydroksyindol kwas octowy-d<sub>5</sub>, kwas homowanilinowy-d<sub>5</sub>) w 50% acetonitrylu z dodatkiem 2.5% kwasu mrówkowego. Próbki wytrząsano przez 10 min przy prędkości 1 500 obrotów na minutę w temperaturze pokojowej. Następnie próbki wirowano przez 10 min z prędkością 14 000 obrotów na minutę. Uzyskany supernatant przeniesiono do polipropylenowego viala chromatograficznego. Rozdział chromatograficzny analitów przeprowadzono przy użyciu kolumny UPLC HSS T3 (1.7 $\mu$ m, 2.1mm x 100mm) (Waters). Analizę danych ilościowych wykonano z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania MassLynx (Waters).

Stężenia aminokwasów, neuromodulatorów i metabolitu noradrenaliny: L-alaniny (Ala),  $\beta$ -alaniny (B-Ala), sarkozyny, tauryny, glicyny (Gly), glutaminy (Gln), kwasu glutaminowego (Glu), kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), oraz 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikolu (MHPG), oznaczono z zastosowaniem ultrasprawniej

chromatografii cieczowej (Waters Acquity UPLC) sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (Waters Xevo-TQS). Procedura przygotowania próbek opierała się na upochodnieniu związków chlorkiem dnasyli. Do dedykowanych dołków na 96-dołkowej płytce dodano 10  $\mu$ L homogenatu tkanek mózgu, 20  $\mu$ L mieszaniny znakowanych izotopowo standardów wewnętrznych (alanina- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ , sarkozyna- $^{13}\text{C}^3$ , tauryna-D4, glicyna- $^{13}\text{C}^2$ , kwas glutaminowy-D5, kwas gamma-aminomasłowy- D6) w 2.5% kwasie mrówkowym, 30  $\mu$ L 0,5M dwuwęglanu sodu i 30  $\mu$ L chlorku dnasyli (stężenie 5mg/ml w acetonie). Próbki wytrząsano przez 30 min przy prędkości 900 obrotów na minutę w 60°C. Następnie próbki wirowano przez 10 min z prędkością 14 000 obrotów na minutę. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono przy użyciu kolumny UPLC HSS T3 (1.7 $\mu$ m, 2.1mm x 100mm) (Waters). Analizę danych ilościowych wykonano z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania MassLynx (Waters).

### **3.9. Barwienia immunohistochemiczne**

#### **3.9.1. Przygotowanie tkanek do barwienia**

Do wyznakowania konstruktów wirusowych oraz neuronów serotonergicznym wykorzystano dodatkową grupę zwierząt, niezwiązaną z głównym eksperymentem. Szczury poddano operacjom stereotaktycznym opisanym w sekcji 3.5.3. Po upływie ponad trzech tygodni od zabiegu zwierzęta znieczulano dootrzewnowo mieszaniną ketaminy (roztwór 100 mg/ml; objętość iniekcji: 0,75 ml/kg masy ciała; ketamina w 0,9% roztworze NaCl; igła 0,5 mm x 16 mm) i medetomidyny (stężenie 1 mg /ml; objętość iniekcji: 1 ml/kg masy ciała; Cepetor® w 0,9% roztworze NaCl; igła 0,5 mm x 16 mm), a następnie podawano im dootrzewnowo mieszaninę pentobarbitalu sodowego i pentobarbitalu (stężenia w tabeli 7; objętość iniekcji: 1 ml/kg masy ciała; Morbital® w 0,9% roztworze NaCl; igła 0,5 mm x 16 mm) w celu rozpoczęcia procedury perfuzji przezsercowej. Po ustaniu oddechu oraz zaniku reakcji na bodźce przez lewą komorę serca wprowadzano, za pomocą pompy perystaltycznej, schłodzony, 1% roztwór heparyny w zbuforowanym fosforanem roztworze soli fizjologicznej (PBS) (pH 7.4), a prawy przedsionek nacinano. Po usunięciu krwi oraz płynów ustrojowych z układu krążenia tkanki utrwalano poprzez wpompowanie 4% roztworu paraformaldehydu (PFA) w PBS (pH 7.4). Po wstępnym utrwalaniu mózg umieszczano na noc w 4% roztworze PFA w temperaturze 4 °C, a następnie przenoszono do 30% roztworu sacharozy i przechowywano w temperaturze 4 °C

do momentu opadnięcia mózgu na dno falkonu (około 3 – 7 dni) w celu dalszego utrwalenia tkanek.

Po tym czasie mózgi przytwierdzano, przy użyciu specjalnego medium (Surgipath FSC 22 Clear Frozen Section Media), do tarczy kriostatu, zamrażano do temperatury około  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i krojono w płaszczyźnie koronalnej na  $40\text{ }\mu\text{m}$  plastry za pomocą kriostatu. Część skrawków z przekrojami przedstawionymi na rys. 5 przytwierdzano na szkiełkach Superfrost™, zabezpieczano w dedykowanym pudełku i przechowywano w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do późniejszych procedur barwienia. Pozostały materiał do barwień przechowywano w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  w 12-dołkowych płytkach testowych w roztworze krioprotekcyjnym (ang. antifreeze), grupując po kilkanaście skrawków z tymi samymi strukturami w każdym z dołków.

### **3.9.2. Barwienia immunohistochemiczne**

Skrawki tkanek przeznaczone do barwienia znaczników mCherry wybierano skrawki tkanek przeniesiono do 12-dołkowej płytki testowej. Tkanki płukano ( $6 \times 6$  minut) w PBS (pH 7.4), a następnie blokowano niespecyficzne miejsca wiązania przez 60 minut w roztworze zawierającym 5% normalnej surowicy koziej (NGS) i 0,3% Triton™ X-100 w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej PBS (pH 7.4). W kolejnym kroku skrawki inkubowano przez noc w ciemności, w temperaturze  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , w roztworze pierwszorzędowego przeciwciała poliklonalnego mCherry w rozcieńczeniu 1:1000 w 0,3% Triton™ X-100 z 5% NGS w PBS (pH 7.4).

Następnego dnia tkanki płukano w PBS ( $3 \times 5$  minut), a następnie inkubowano przez 2 godz. w roztworze drugorzędowego przeciwciała Alexa Fluor 546® Goat Anti-Rabbit w rozcieńczeniu 1:500 w 0,3% Tween® 20 w PBS, w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po kolejnym płukaniu ( $3 \times 5$  minut) w PBS skrawki przytwierdzano do szkiełek Superfrost™ Plus, zabezpieczano medium zawierającym DAPI (Fluoromount-G™), nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i pozostawiano do wyschnięcia.

Fluorescencję wybarwionych preparatów obrazowano za pomocą mikroskopu Olympus VS 1100, z wykorzystaniem suchego obiektywu U PLAN 20x (NA = 0.75). Do wzbudzenia fluorescencji użyto lampy fluorescencyjnej z filtrem fluorescencyjnym typu Cy3® (ang. Cyanine 3) ze wzbudzeniem maksymalnym przy długości fali 555/20 nm. Sygnał rejestrowano za pomocą kamery kolorowej Hamamatsu ORCA Flash4.0 V2, w zakresie detekcji sygnału 575 – 620 nm. Przykładowy skan przedstawiono na rysunku 6.

### **3.9.3. Barwienie neuronów serotonergicznycy i hydroksylazy tryptofanowej**

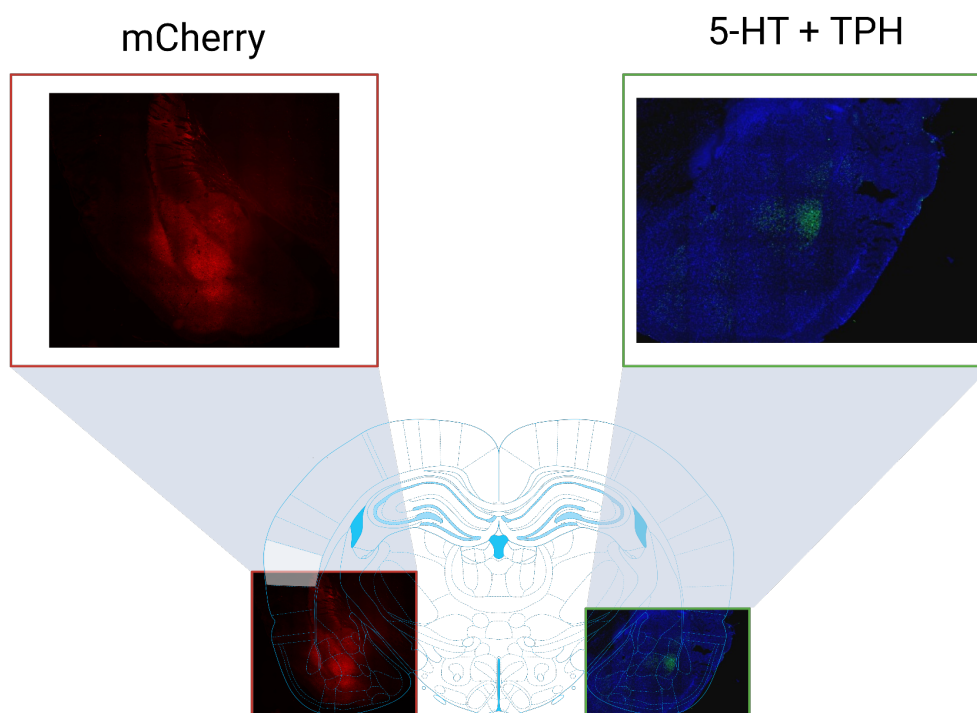
Ze względu na szczątkową liczbę doniesień literaturowych dotyczących obecności neuronów serotoninowych w ciele migdałowatym, przeprowadzono dodatkowe barwienia immunohistochemiczne w celu uwidocznienia obecności neuronów i projekcji serotonergicznycy w tej strukturze. Zastosowane przeciwciała wybrano do zobrazowania ciał komórkowych (przeciwciała anty-TPH) oraz aksonów i ich zakończeń synaptycznych (przeciwciała anty-5-HT) neuronów serotonergicznycy.

Barwienie przeprowadzono zgodnie z następującą procedurą. Skrawki tkanek na wybranych preparatach (zawierające przekroje z ciałem migdałowatym) otoczono markerem hydrofobowym, a następnie inkubowano w PBS przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Niespecyficzne miejsca wiązania blokowano w roztworze zawierającym 10% normalnej surowicy oślej (NDS) i 0,5% Triton™ X-100 w PBS przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki płukano w PBS (3 × 15 min, w temperaturze pokojowej) i inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi: przeciwciałem anty-TPH (hydroksylaza tryptofanowa) w rozcieńczeniu 1:200 oraz przeciwciałem anty-5-HT (serotonina) w rozcieńczeniu 1:1000, w roztworze z 2% NDS i 0,3% Triton™ X-100 w PBS, przez 16 godzin w wilgotnej komorze w temperaturze 4°C.

Następnego dnia preparaty płukano w PBS (3 × 15 min, w ciemności, w temperaturze pokojowej) i inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi: Alexa Fluor 488® Donkey anti-sheep w rozcieńczeniu 1:1000 oraz Alexa Fluor 488® Donkey anti-goat w rozcieńczeniu 1:1000, w roztworze z 2% NDS i 0,1% Triton™ X-100 w PBS, przez 2 godziny w ciemności w temperaturze pokojowej. Po inkubacji preparaty ponownie płukano w PBS (2 × 15 minut, w ciemności, w temperaturze pokojowej), zabezpieczano medium zawierającym DAPI (Fluoromount-G™), nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i pozostawiono do wyschnięcia w lodówce.

Fluorescencję wybarwionych preparatów obrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM780, z wykorzystaniem olejowego, apochromatycznego obiektywu PLAN 20x (NA = 0.8 M27). Do wzbudzenia fluorescencji użyto lasera argonowego o długości fali 405 nm (DAPI) i 488 nm (AF). Sygnał rejestrowano za pomocą modułu skanującego z 34 kanałami do jednoczesnego zliczania fluorescencji konfokalnej z wysoce czułymi fotometrami PMT o niskim poziomie szumu ciemnego (2x) i GaAsP

(32x). Zakres detekcji widmowej ustawiono na 410 – 493 (DAPI – 451 emission) i 497 – 573 nm (AF – 535 emission). Przykładowy skan przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Na rysunku przedstawiono przykładowe wyniki barwień immunohistochemicznych.

### 3.10. Analiza statystyczna

#### 3.10.1. Przygotowanie wykresów pudełkowych i obliczanie istotności statystycznej

Do wizualizacji rozkładów wartości zebranych danych wykorzystano wykresy pudełkowe, wygenerowane w środowisku R. Analizę istotności statystycznej przeprowadzono również w R, z zastosowaniem testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Conovera (o ile nie zaznaczono inaczej). Na wszystkich wykresach pudełkowych przygotowanych w ramach niniejszej pracy porównania wykonywano w odniesieniu do grupy kontrolnej morfinowej.

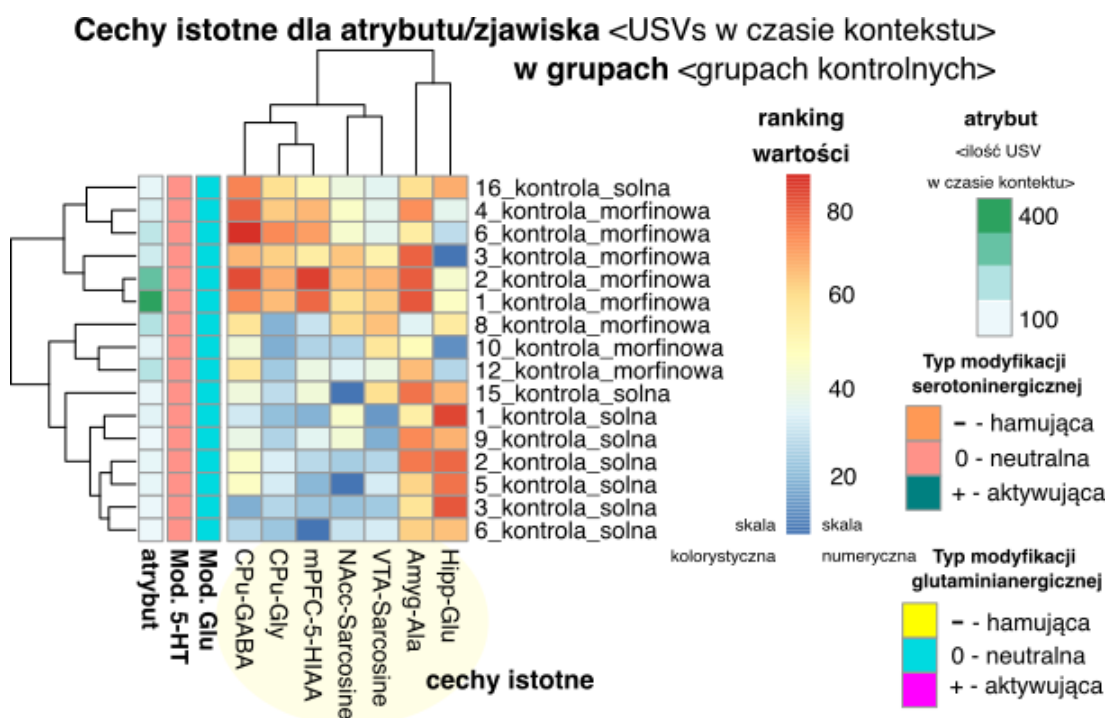
#### 3.10.2. Korelacje

Siłę związków liniowych pomiędzy zestawami danych obrazowano wartością współczynnika  $r$  korelacji Spearmana.

### 3.10.3. Algorytm Boruta

Do badania efektów modyfikacji chemogenetycznych na układ neuroprzekaźników wykorzystano algorytmu Boruta. Jest to algorytm oparty o systemy uczące się, opracowany w 2010 [532], umożliwiający wyszukiwanie wieloelementowych i nieliniowych interakcji w danych. W algorytmie Boruta wykorzystuje się metodę lasu losowego (ang. Random Forest) do modelowania oraz przeprowadza się test istotności oparty na porównaniu przydatności badanych cech z losowo wygenerowanymi “cechami cieniami” (ang. shadow features). Metoda ta jest szeroko stosowana w różnych dziedzinach nauki – do tej pory wykorzystano ją w 2961 publikacjach, w tym w 1604 z dziedziny nauk biomedycznych (Scopus, stan na listopad 2024).

W niniejszej pracy algorytm Boruta zaimplementowano z wykorzystaniem standardowego algorytm lasu losowego z 50 000 drzew decyzyjnych w połączeniu z transdapterem imputacyjnym [533], który umożliwia pracę z brakami danych bez konieczności stosowania odrębnej metody imputacji. Cechy zaklasyfikowane jako niepewne (ang. tentative) zostały połączone z cechami potwierdzonymi. W celu stabilizacji rezultatów procedurę powtarzano trzydzieści razy. Za ostatecznie istotne uznano cechy, które pojawiły się co najmniej w połowie prób.



Rys. 7. Przykładowy wykres wykonany na potrzeby tej pracy z wynikami analizy statystycznej przeprowadzonej przy wykorzystaniu algorytmu Boruta, umożliwiającego wybranie najważniejszych



**cech (zmiennych) wpływających na badany atrybut (zjawisko) w wybranych grupach.** Wykres przedstawia mapę ciepła stężeń neurotransmiterów w strukturach (cechy), które algorytm uznał za wpływające istotnie statystycznie na liczbę apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych w trakcie testu odpowiedzi kontekstowej (atrybut) w dwóch wybranych grupach kontrolnych (wybrane grupy).

Rysunek 7 przedstawia przykładowy wykres z wynikami analizy statystycznej z wykorzystaniem algorytmu Boruta, reprezentatywny dla innych wykresów tego typu zawartych w niniejszej pracy. Poniżej znajduje się opis interpretacji wykresu:

1. Oś:

a. Oś pozioma (X) od lewej:

- i. Pierwsza kolumna ilustruje wartości analizowanego atrybutu z wykorzystaniem skali kolorystycznej. Na rys. 7 jest to wizualizacja ilości apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych (patrz legenda po prawej stronie), gdzie jasnozielony i ciemnozielony kolor oznaczają odpowiednio ilość bliską 100 i 400.
- ii. Następnie zobaczyć można kolumny przedstawiające graficznie modyfikacje serotonergiczne i glutaminianergiczne osobników z grup wybranych do analizy. Na przykładowym wykresie (rys. 7), prezentowana jest analiza przeprowadzona wyłącznie dla grup kontrolnych, wobec czego kolory są jednorodnie 'neutralne'.
- iii. Dalej są cechy istotne (zmiennie) uznane przez algorytm Boruta za statystycznie istotne dla wyjaśnienia wybranego zjawiska (atrybutu). Każda kolumna reprezentuje inną cechę. Na rysunku 7 widoczne są neurotransmitery w strukturach (np. "Hipp-Glu" – glutaminian w hipokampie, "CPu-GABA" – GABA w prążkowiu), istotnie wpływające na ilość apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych w czasie trwania testu odpowiedzi kontekstowej przez wybrane grupy kontrolne.

- b. Oś pionowa (Y) – przedstawia wyniki grup, które zostały przebadane (np. kontrola solna i kontrola morfinowa z rys. 6). Każdy wiersz odpowiada innemu osobnikowi.

2. Kolory:

- a. Kolor w komórkach cech reprezentuje wartość danej cechy (w niniejszej pracy są to zawsze stężenia neuroprzebieżników w strukturach) dla danego

osobnika. Wartość jest zobrazowana na skali barwnej, gdzie niebieski oznacza niską, a czerwony wysoką wartość. Wartości zostały przeskalowane do rankingu w ramach każdej cechy w celu zwiększenia czytelności wykresów.

- b. Legenda: Poza mapą ciepła danego zjawiska (atrybutu), kolorowe paski opisane w legendzie po prawej stronie wykresu informują o typie modyfikacji. Na rysunku 7 ilustrują one:
  - i. "Typ modyfikacji serotoninerdycznej": Określa, czy układ serotoninerdyczny jest hamowany (-), aktywowany (+) czy neutralny (0), czyli pozostawiony bez ingerencji chemogenetycznej).
  - ii. "Typ modyfikacji glutaminianerdycznej": analogicznie dla układu glutaminianerdycznego.

### 3. Klastrowanie:

- a. Dendrogramy: Linie tworzące "drzewka" na osiach wykresu to dendrogramy. Pokazują, jak grupy i cechy łączą się w klastry na podstawie podobieństwa. Grupy/cechy, które są bliżej siebie na dendrogramie, są bardziej do siebie podobne. Na przykładowym wykresie (rys. 7) widać, że grupy kontrolne dobrze rozdzieliły się pod względem podobieństwa, z wyjątkiem osobnika nr 16 z kontroli solnej, który pod względem poziomów neuroprzeźników w wyłonionych strukturach przypomina bardziej zwierzęta z grupy kontroli morfinowej.

Podsumowując, wykres z rys. 7 pokazuje mapę ciepła neuroprzeźników w strukturach istotnych statystycznie dla liczby apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych zarejestrowanych w trakcie testu odpowiedzi kontekstowej w dwóch wybranych grupach kontrolnych. Klastrowanie umożliwia dodatkowo ocenę podobieństwa między osobnikami.

#### 3.10.4. Graf korelacji neurochemicznych

W celu zilustrowania korelacji między stężeniami neuroprzeźników w poszczególnych strukturach mózgu przygotowano graf korelacji neurochemicznych, w których wierzchołki (węzły) odpowiadają parze neuroprzeźnik – struktura, a krawędzie – istotnym korelacjom między wszystkimi zmierzonymi wartościami. Test Spearman wykonano dla

każdej pary atrybutów, a następnie zastosowano poprawkę Holma na wielokrotne testowanie. Na rysunku 78 przedstawiono graf korelacji istotnych na poziomie 0,01. Korelacje dodatnie zilustrowano za pomocą czarnych krawędzi, a ujemne – czerwonych. Układ grafu uzyskano przy pomocy programu Graphviz z wykorzystaniem algorytmu neato.

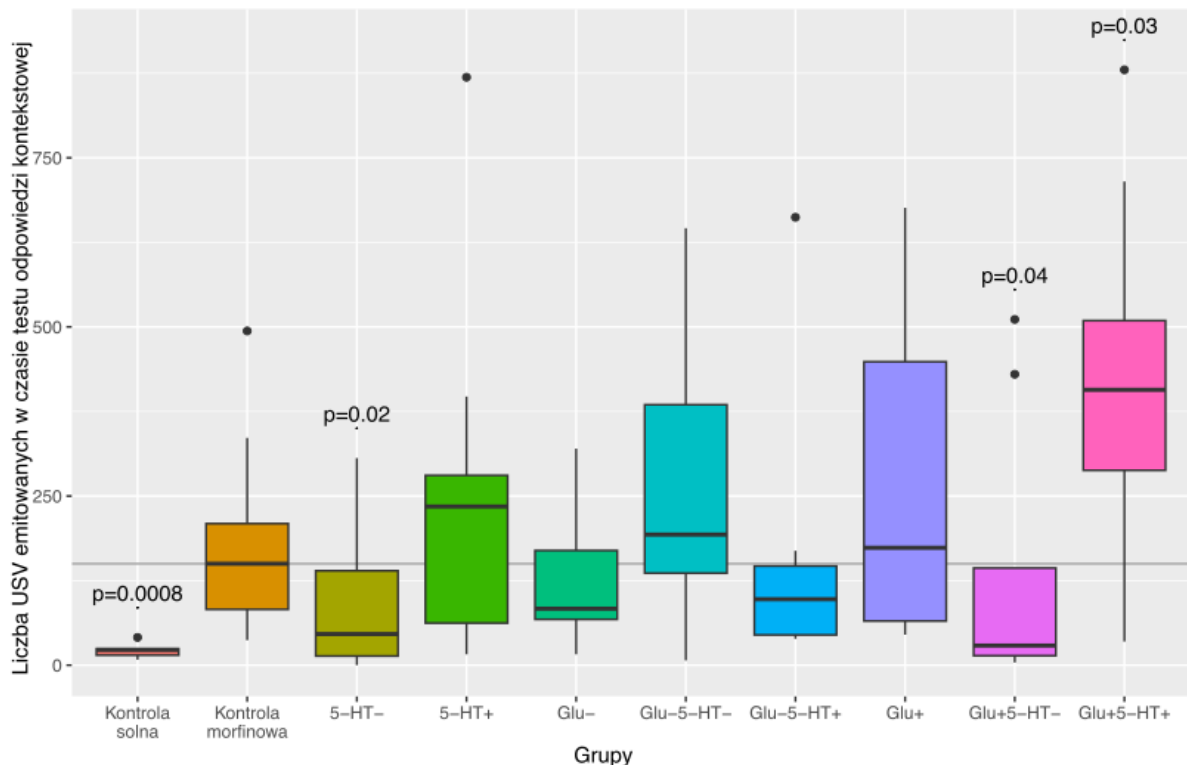
## 4. Wyniki

W opisie wyników stosowane są nazwy grup przedstawione w tabeli 11. **“Grupa kontrolna solna” / “kontrola solna”** – odnosi się do grupy szczurów, które nie były poddawane ingerencjom chemogenetycznym i otrzymywały fizjologiczny roztwór soli podczas procedury warunkowania miejsca. Pozostałe to grupy warunkowane morfiną. **“Grupa kontrolna morfinowa” / “kontrola morfinowa”** to grupa szczurów, które nie były poddawane ingerencjom chemogenetycznym. Nazwy pozostałych grup to skróty odpowiadające docelowym skutkom zastosowanych ingerencji chemogenetycznych:

- **"5-HT-"**: aktywacja receptorów DREADD HM4Di na neuronach serotonergicznym, co skutkuje hamowaniem aktywności tych neuronów.
- **"5-HT+"**: aktywacja receptorów DREADD hM3Dq na neuronach serotonergicznym, co skutkuje wzrostem aktywności tych neuronów.
- **"Glu-"**: aktywacja receptorów DREADD HM4Di na neuronach glutaminergicznym, co skutkuje hamowaniem aktywności tych neuronów.
- **"Glu+"**: aktywacja receptorów DREADD hM3Dq na neuronach glutaminergicznym, o skutkuje wzrostem aktywności tych neuronów;
- **"Glu-5-HT-"**: jednoczesna aktywacja receptorów DREADD HM4Di na neuronach glutaminergicznym i DREADD HM4Di na neuronach serotonergicznym, hamująca aktywność obu typów neuronów.
- **"Glu-5-HT+"**: jednoczesna aktywacja receptorów DREADD HM4Di na neuronach glutaminergicznym (hamująca aktywność) i receptorów DREADD hM3Dq na neuronach serotonergicznym (zwiększająca aktywność).
- **"Glu+5-HT-"**: jednoczesna aktywacja receptorów DREADD hM3Dq na neuronach glutaminergicznym (zwiększająca aktywność) i receptorów DREADD HM4Di na neuronach serotonergicznym (hamująca aktywność).
- **"Glu+5-HT+"**: – jednoczesna aktywacja receptorów DREADD hM3Dq na neuronach glutaminergicznym i DREADD hM3Dq na neuronach serotonergicznym, zwiększająca aktywność obu typów neuronów w ciele migdałowatym.

## 4.1. Analiza behawioralna

### 4.1.1. Analiza wokalizacji ultradźwiękowych

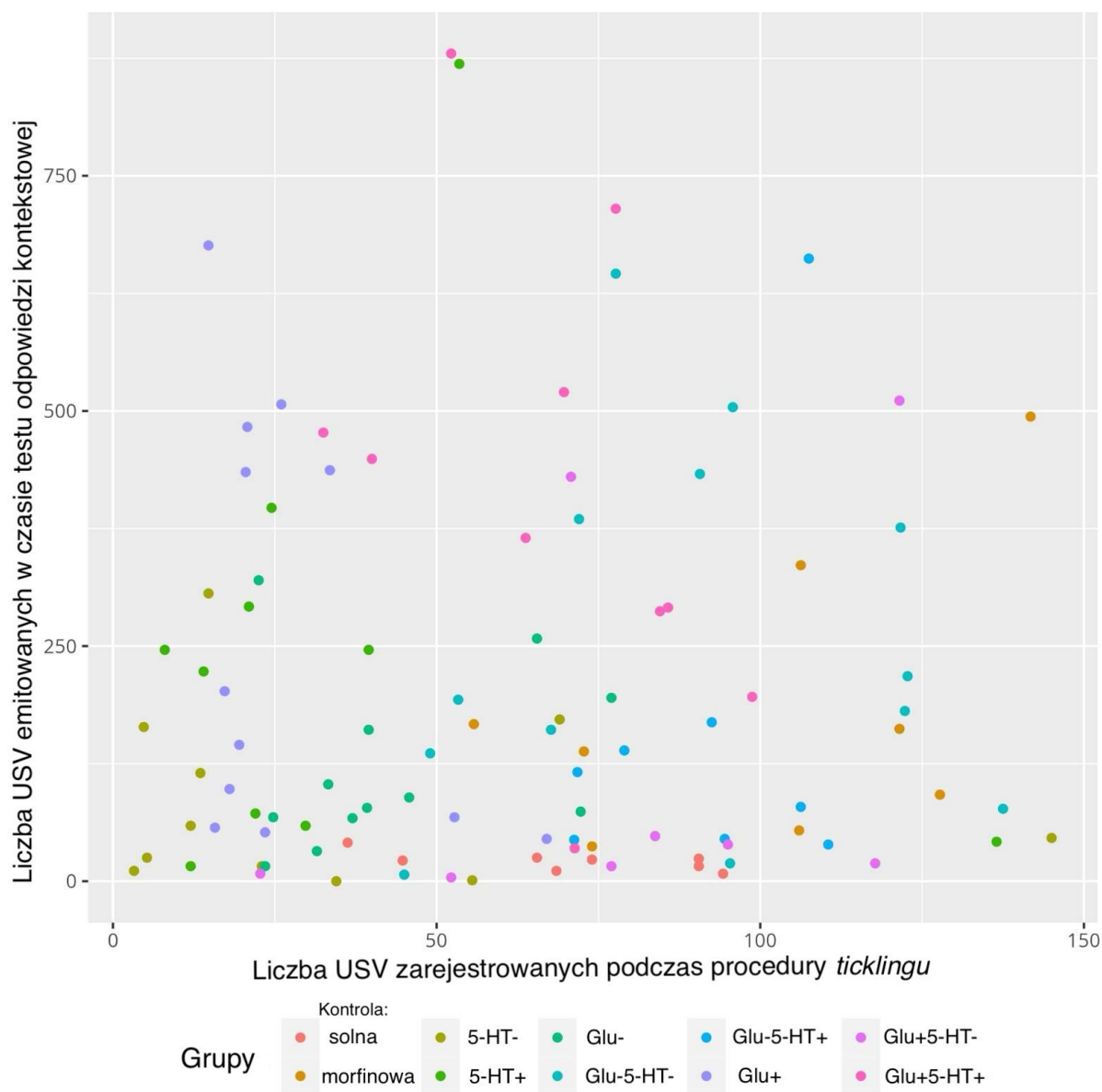


**Rys. 8. Wpływ modyfikacji chemogenetycznych transmisji serotonergiczno–glutaminianergicznej w ciele migdałowatym na liczbę apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych podczas testu reekspozycji na kontekst związany z podaniem substancji po okresie odstawienia. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

Analiza behawioralna wokalizacji ultradźwiękowych (rys. 8) wykazała wzrost odpowiedzi kontekstowej zwierząt, mierzonej liczbą emitowanych USV podczas ponownej ekspozycji na kontekst po okresie odstawienia, w grupie kontrolnej morfinowej w stosunku do kontroli solnej ( $p < 0,001$ ).

Zaobserwowano statystycznie istotny spadek liczby apetytywnych epizodów USV, zarejestrowanych podczas testu reekspozycji na kontekst związany z podaniem morfiny po okresie odstawienia, w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej, w dwóch grupach: "5-HT-" ( $p < 0,05$ ) oraz "Glu+5-HT-" ( $p < 0,05$ ).

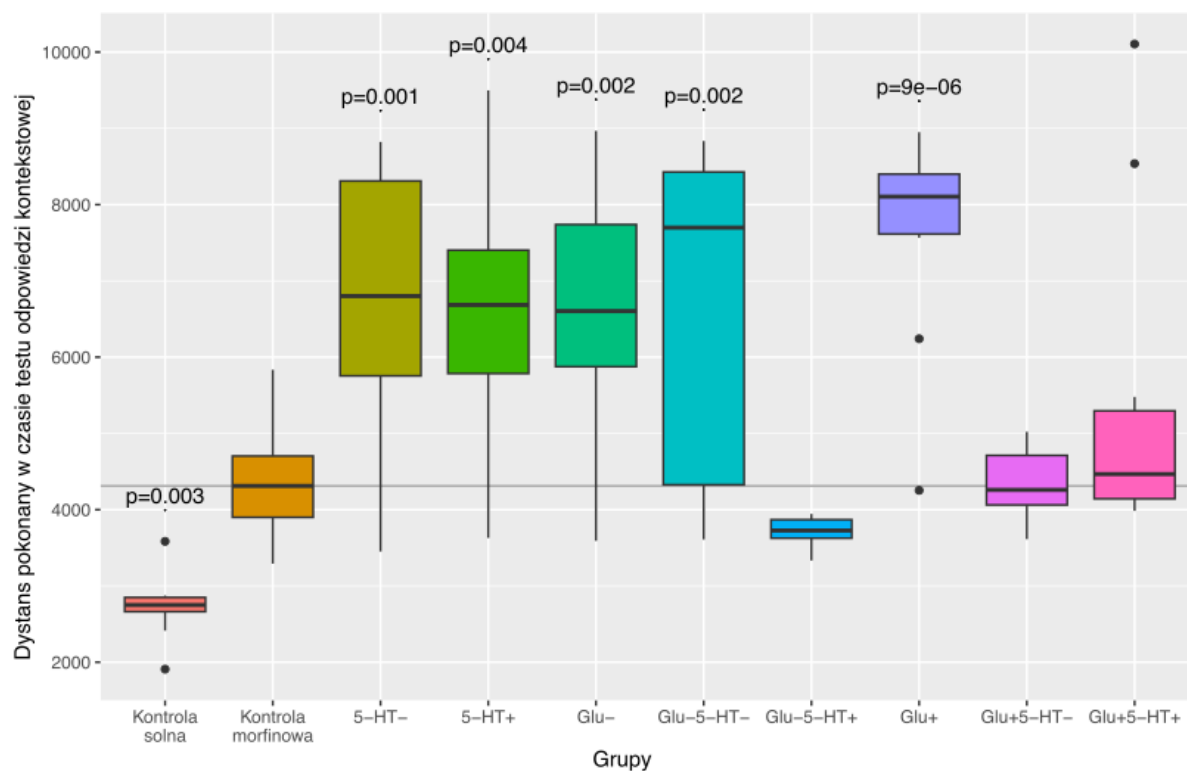
Natomiast, w grupie "Glu+5-HT+" ( $p < 0,05$ ) odnotowano istotny statystycznie wzrost liczby wokalizacji ultradźwiękowych w paśmie “50-kHz”.



**Rys. 9.** Wykres pokazuje zależność pomiędzy emitowanymi wokalizacjami ultradźwiękowymi w czasie testu odpowiedzi kontekstowej oraz procedury *ticklingu*. Współczynnik korelacji r-Spearmana  $r=0,04$ .

Nie stwierdzono istotnej korelacji ( $r=0,04$ ) pomiędzy liczbą wokalizacji emitowanych w czasie procedury *ticklingu* i testu odpowiedzi kontekstowej (rys. 9).

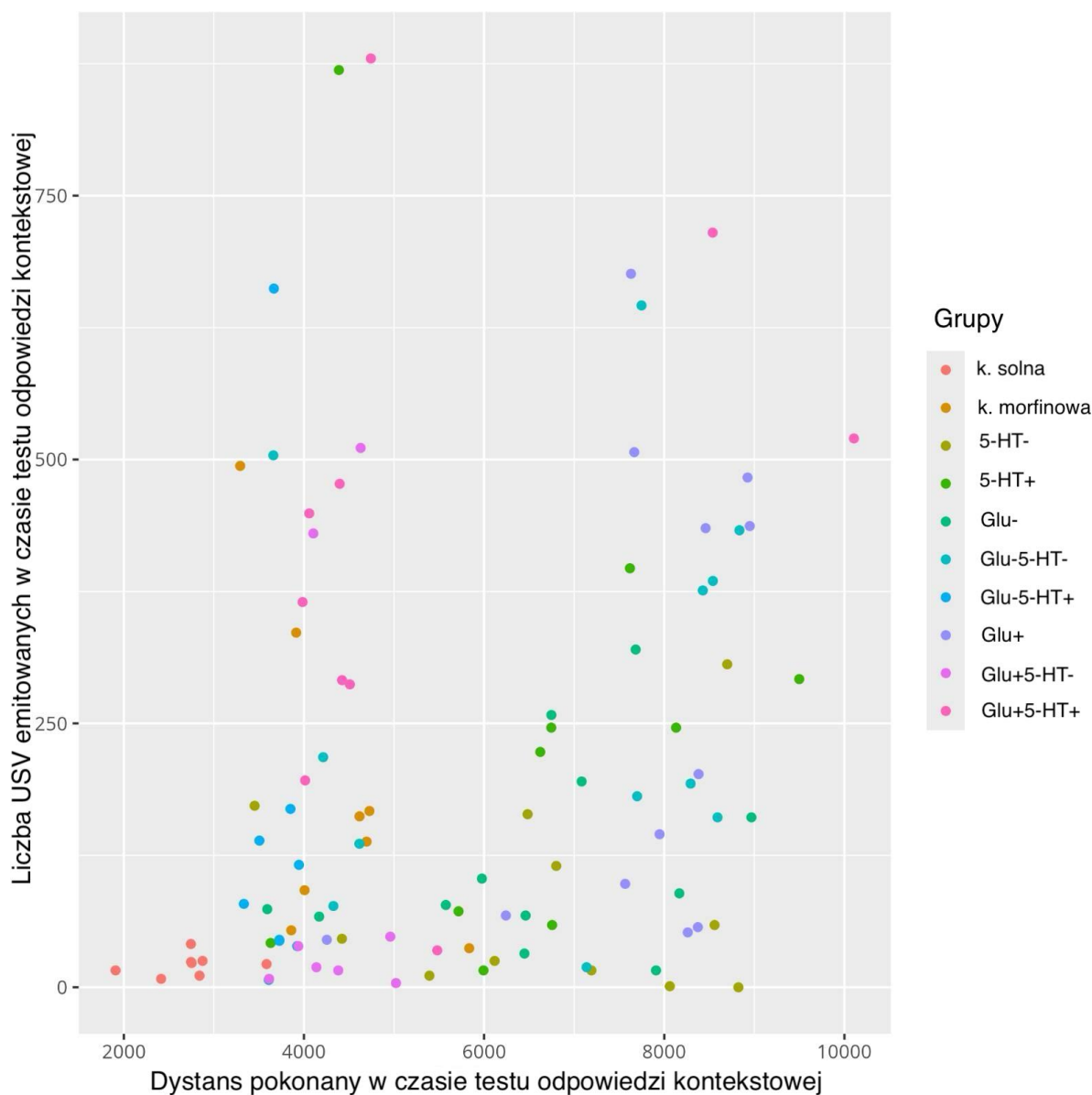
#### 4.1.2. Analiza dystansu



**Rys. 10.** Wpływ modyfikacji chemogenetycznych transmisji serotonergiczno–glutaminianergicznej w ciele migdałowatym na dystans pokonany podczas testu reekspozycji na kontekst związany z podaniem substancji po okresie odstawienia przez badane grupy. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej. Wartości dystansu [cm] przeskalowano.

Analiza poziomu aktywności lokomotorycznej (rys. 10) wykazała statystycznie istotny wzrost przebytego dystansu [cm] podczas testu odpowiedzi kontekstowej w grupie kontrolnej morfinowej w porównaniu do kontroli solnej ( $p < 0,01$ ).

Istotny statystycznie wzrost przebytego dystansu [cm] w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w pięciu grupach: "5-HT-" ( $p = 0,001$ ), "5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+" ( $p < 0,001$ ), "Glu-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu-5-HT-" ( $p < 0,01$ ).



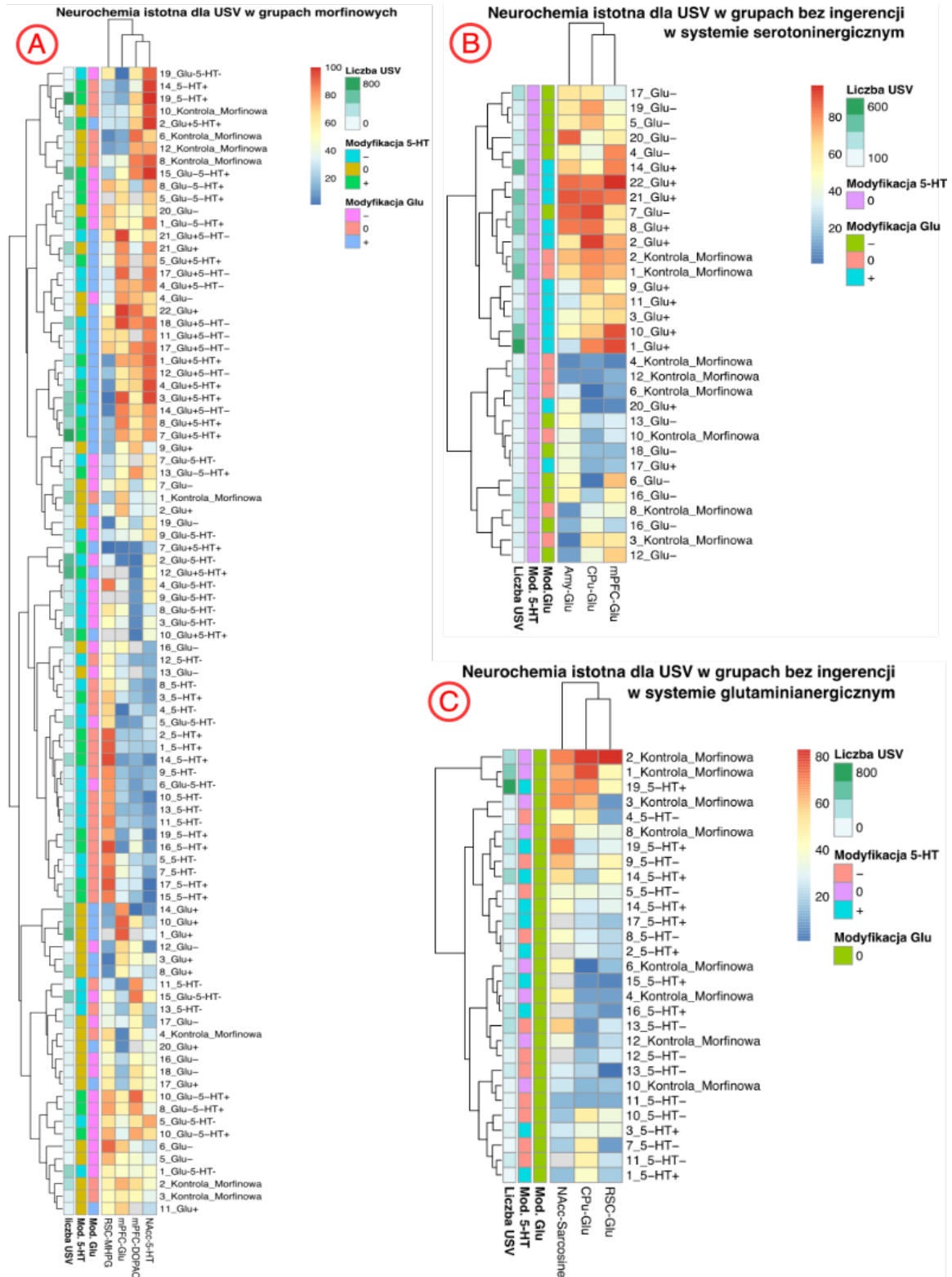
**Rys. 11. Wykres pokazuje zależność pomiędzy emitowanymi wokalizacjami ultradźwiękowymi oraz przebytego dystansu w czasie testu odpowiedzi kontekstowej (wszystkie grupy). Współczynnik korelacji r-Spearmana  $r=0,31$ . Wartości dystansu [cm] przeskalowano dla zwiększenia czytelności wykresu.**

Stwierdzono brak silnej korelacji ( $r=0,31$ ) między liczbą emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych a dystansem pokonanym przez szczury w teście odpowiedzi kontekstowej podczas ponownej ekspozycji na kontekst związany z podaniem morfiny, po okresie odstawienia (rys. 11).



## 4.2. Analiza relacji behavior – neurochemia (z wykorzystaniem algorytmu Boruta)

### 4.2.1. Analiza neurochemii w kontekście wokalizacji ultradźwiękowych



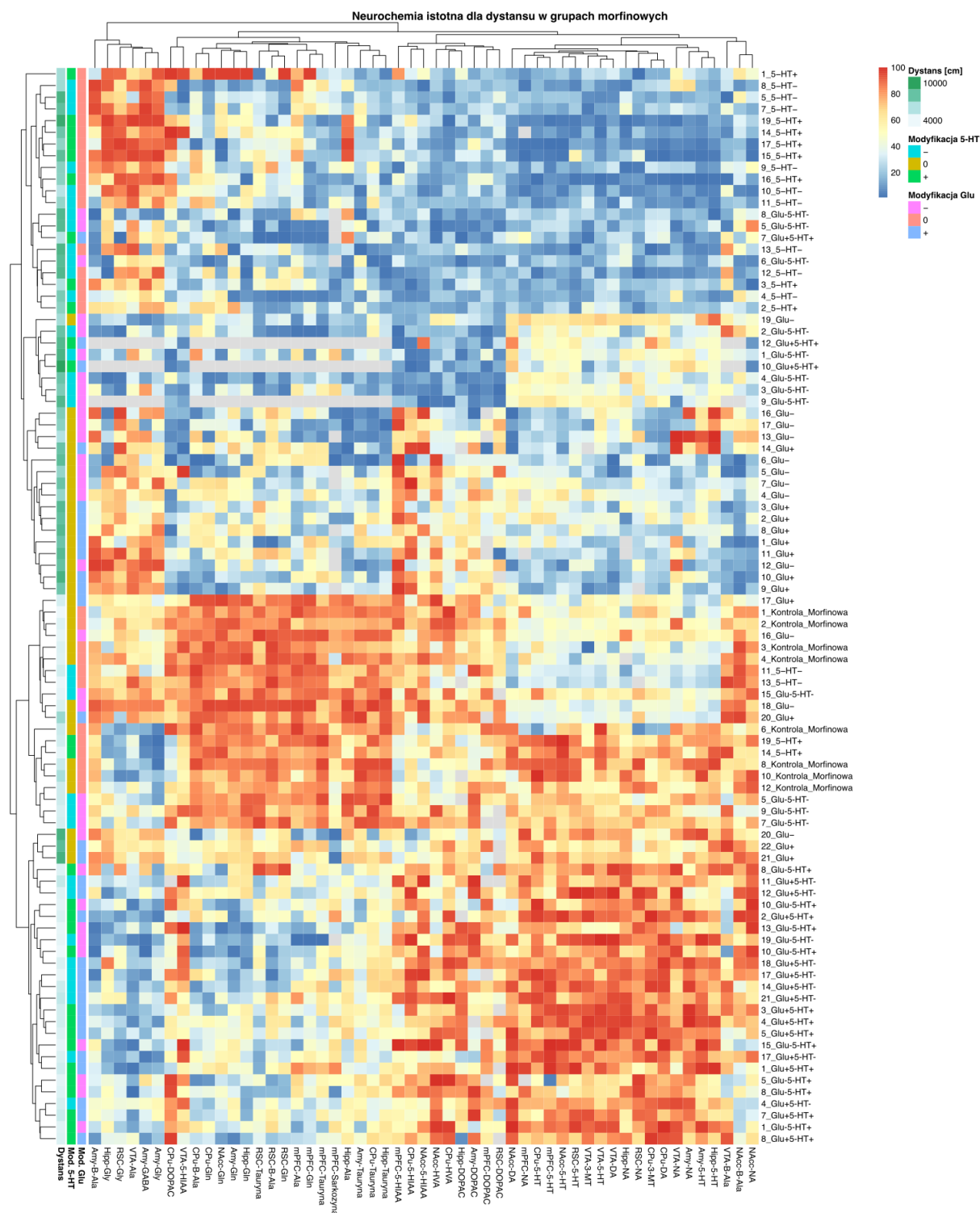
**Rys. 12. Wykresy przedstawiające stężenie neuroprzekaźników w strukturach, które istotnie statystycznie wpływają na liczbę apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych w trakcie testu odpowiedzi kontekstowej (A) we wszystkich grupach morfinowych, (B) w grupach, które nie podlegały modyfikacjom serotonergicznym, oraz (C) w grupach, które nie podlegały modyfikacjom glutaminianergicznym.**

Analiza neurochemii z wykorzystaniem algorytmu Boruta badanej pod kątem istotności względem wokalizacji ultradźwiękowych wykazała, że dla grup otrzymujących morfinę: 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikol (MHPG) w korze retrosplenialnej; glutaminian i kwasu dihydroksyfenylooctowy (DOPAC) w przyśrodkowej korze przedczołowej oraz serotonina w jądrze półleżącym, istotnie wpływają na ilość apetytywnych USV emitowanych w czasie trwania testu odpowiedzi kontekstowej (rys. 12 A).

Natomiast w grupach, w których nie stosowano modyfikacji chemogenetycznych w obrębie systemu neurotransmisji serotonergicznej istotnym względem ilości wokalizacji ultradźwiękowych okazał się poziom glutaminianu w trzech strukturach: ciele migdałowatym, prążkowie oraz przyśrodkowej korze przedczołowej (rys. 12 B).

W grupach, w których nie stosowano modyfikacji chemogenetycznych w obrębie systemu neurotransmisji glutaminianergicznej neuroprzekaźnikami istotnymi pod kątem ilości wokalizacji ultradźwiękowych okazały się glutaminian w prążkowie oraz korze retrosplenialnej i sarkozyna w jądrze półleżącym (rys. 12 C).

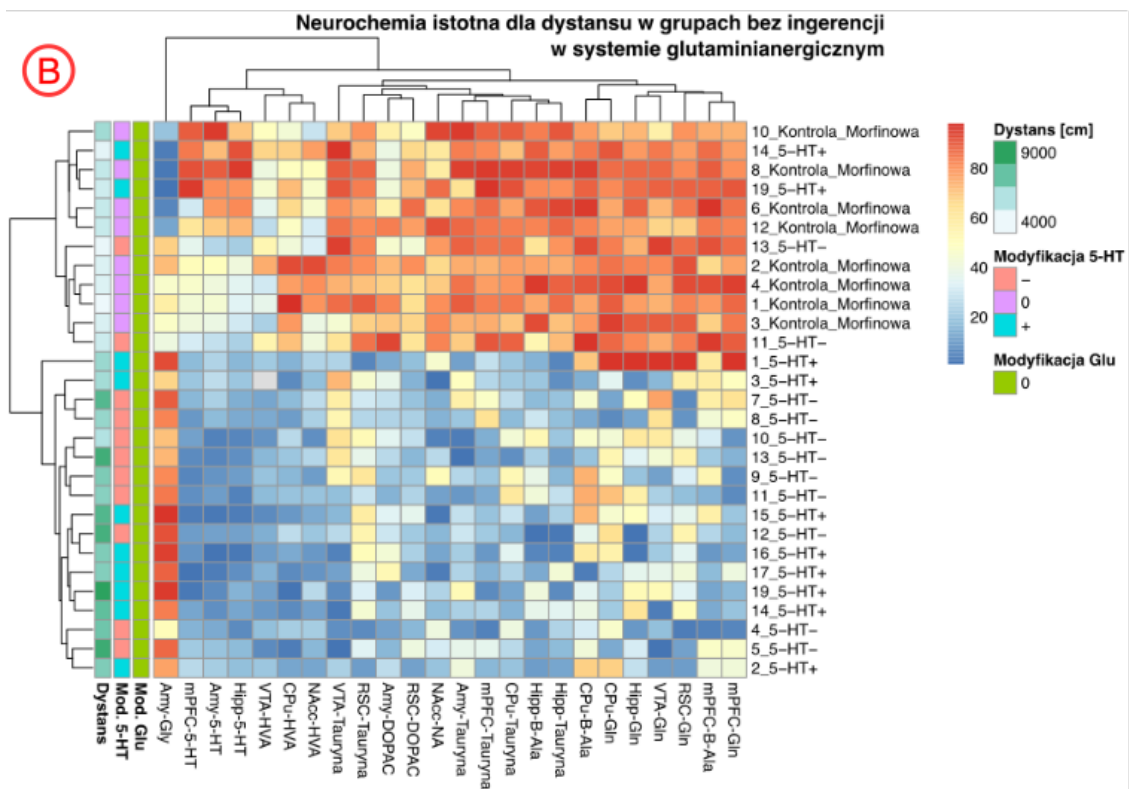
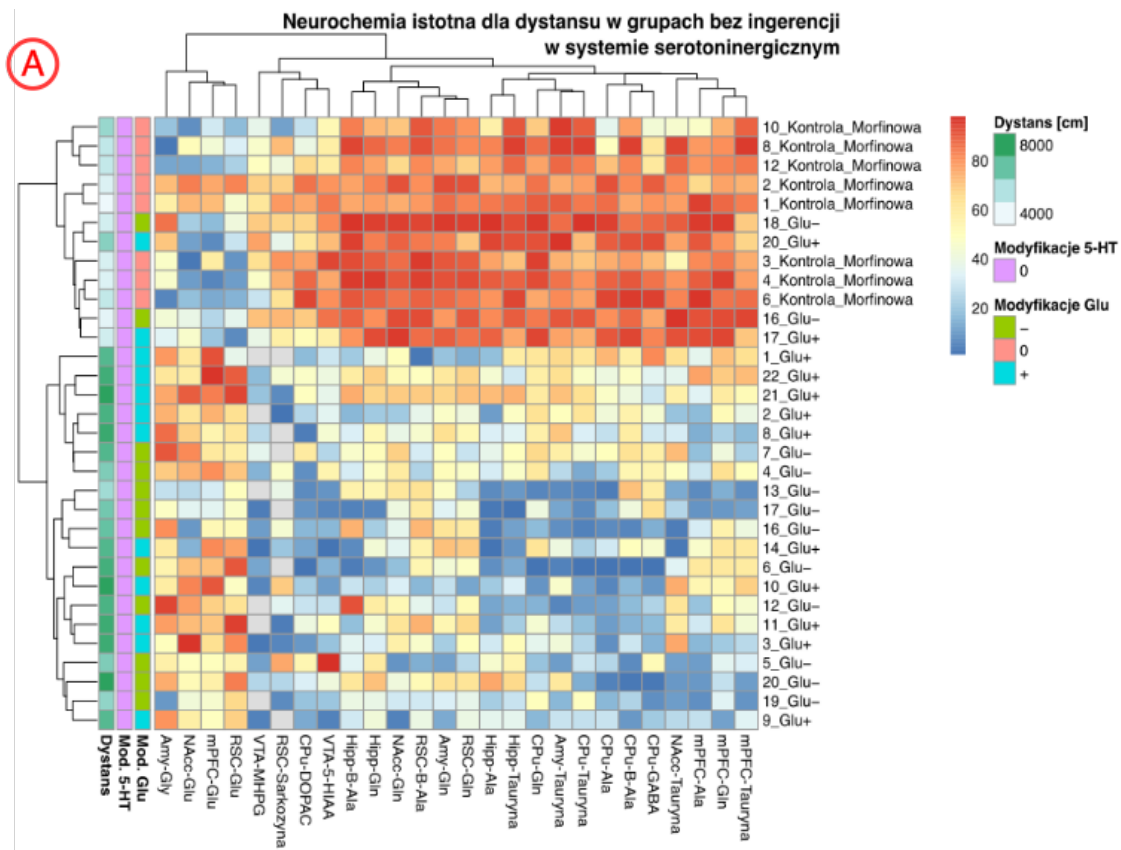
## 4.2.2. Analiza neurochemii w kontekście dystansu



Rys. 13. Wykres przedstawiający stężenie neuroprzekaźników w strukturach, które istotnie statystycznie wpływają na przebyty dystans w trakcie testu odpowiedzi kontekstowej we wszystkich grupach morfinowych.

Analiza neurochemii z wykorzystaniem algorytmu Boruta badanej pod kątem istotności względem pokonanego dystansu w czasie trwania testu odpowiedzi kontekstowej wykazała monoaminy, aminokwasy i metabolity neuroprzekaźników istotne statystycznie we wszystkich badanych strukturach (rys. 13). Są to:

1. W **ciele migdałowatym**:  $\beta$ -alanina, kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC), kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), glicyna, glutamina, noradrenalina, tauryna i serotonina. W jądrze pólleżącym statystycznie istotnymi okazały się:  $\beta$ -alanina, dopamina, glutamina, noradrenalina, **serotonina**, kwas homowanilinowy (HVA) i kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA).
2. W **jądrze pólleżącym**:  $\beta$ -alanina, dopamina, glutamina, noradrenalina, **serotonina**, kwas homowanilinowy (HVA) i kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA).
3. W **prążkowie**:  $\beta$ -alanina, DOPAC, dopamina, 3-metoksytyramina (3-MT), glutamina, tauryna, **serotonina**, kwas homowanilinowy (HVA) i kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA).
4. W **polu brzusznej nakrywki**: L-alanina,  $\beta$ -alanina, dopamina, 3-MT, noradrenalina, **serotonina** i kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA).
5. W **przyśrodkowej korze przedczołowej**: L-alanina, DOPAC, glutamina, noradrenalina, tauryna, sarkozyna, **serotonina** i kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA).
6. W **hipokampie**: L-alanina, DOPAC, glicyna, glutamina, noradrenalina, tauryna i **serotonina**.
7. W **korze retrosplinalnej**:  $\beta$ -alanina, DOPAC, glicyna, glutamina, noradrenalina, tauryna i **serotonina**.



Rys. 14. Wykresy przedstawiające stężenie neuroprzekaźników w strukturach, które istotnie statystycznie wpływają na przebyty dystans w trakcie testu odpowiedzi kontekstowej (A) w grupach, które nie podlegały modyfikacjom serotonergicznym, oraz (B) w grupach, które nie podlegały modyfikacjom glutaminianergicznym.

W grupach, w których nie stosowano modyfikacji chemogenetycznych w obrębie systemu neurotransmisji serotoninerгіcznej monoaminami, aminokwasami i metabolitami neuroprzekaźników statystycznie istotnymi względem dystansu przebytego w czasie trwania testu odpowiedzi kontekstowej okazały się (rys. 14 A):

1. W **ciele migdałowatym**: glicyna, glutamina i tauryna.
2. W **jądrze półleżącym**: **glutaminian**, glutamina i tauryna.
3. W **prążkowie**: L-alanina,  $\beta$ -alanina, kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC), kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), glutamina i tauryna,
4. W **polu brzuszonym nakrywki**: 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikol (MHPG) i kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA).
5. W **przysrodkowej korze przedczołowej**: L-alanina, **glutaminian**, glutamina i tauryna.
6. W **hipokampie**: L-alanina,  $\beta$ -alanina, glutamina i tauryna.
7. W **korze retrospleniałnej**:  $\beta$ -alanina, **glutaminian**, glutamina i sarkozyna.

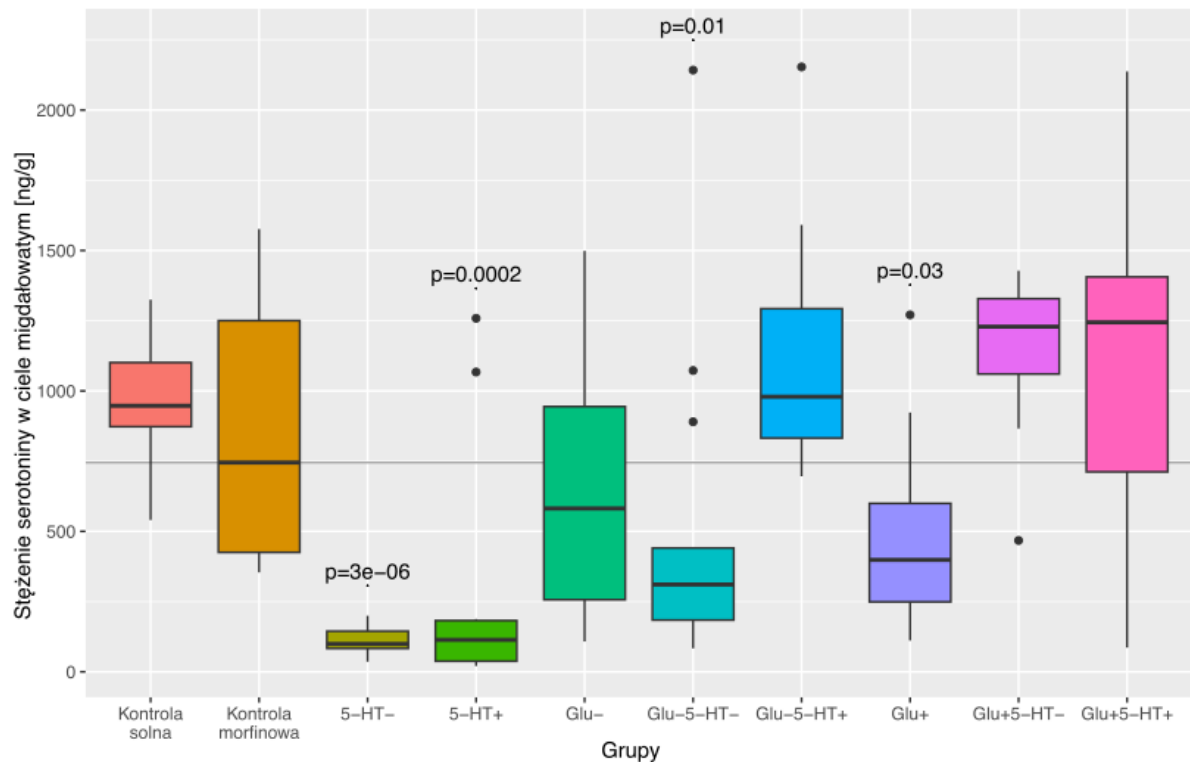
Natomiast analiza w grupach, w których nie stosowano modyfikacji chemogenetycznych w obrębie systemu neurotransmisji glutaminianergicznej monoaminami, aminokwasami i metabolitami neuroprzekaźników statystycznie istotnymi pod kątem dystansu przebytego w czasie trwania testu odpowiedzi kontekstowej są (rys. 14 B):

1. W **ciele migdałowatym**: kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC), glicyna, tauryna i **serotonina**.
2. W **jądrze półleżącym**: noradrenalina i kwas homowanilinowy (HVA).
3. W **prążkowie**:  $\beta$ -alanina, glutamina, tauryna i HVA.
4. W **polu brzuszonym nakrywki**: glutamina, tauryna i HVA.
5. W **przysrodkowej korze przedczołowej**:  $\beta$ -alanina, glutamina, tauryna i **serotonina**.
6. W **hipokampie**:  $\beta$ -alanina, glutamina, tauryna i **serotonina**.
7. W **korze retrospleniałnej**: DOPAC, glutamina i tauryna.

### 4.3. Analiza neurochemii w badanych strukturach mózgowych

Analiza poziomu neuroprzekaźników pomiędzy grupami wykazała następujące różnice w badanych strukturach.

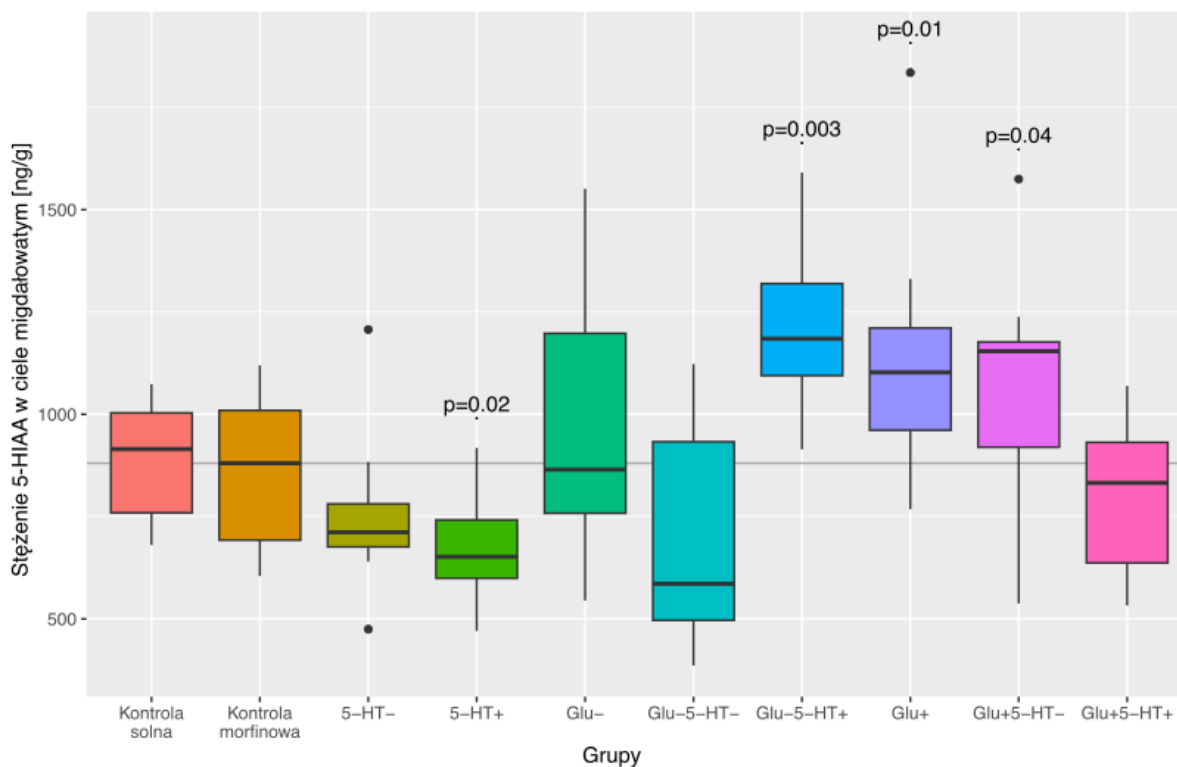
#### 4.3.1. Neurochemia ciała migdałowatego



**Rys. 15. Rozkłady stężenia serotoniny w ciele migdałowatym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Serotonina (rys. 15):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie serotoniny w ciele migdałowatym między grupą kontroli morfinowej a grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu serotoniny w ciele migdałowatym w następujących czterech grupach: "5-HT-" ( $p < 0,001$ ), "5-HT+" ( $p < 0,001$ ), "Glu-5-HT-" ( $p = 0,01$ ) i "Glu+" ( $p < 0,05$ ).

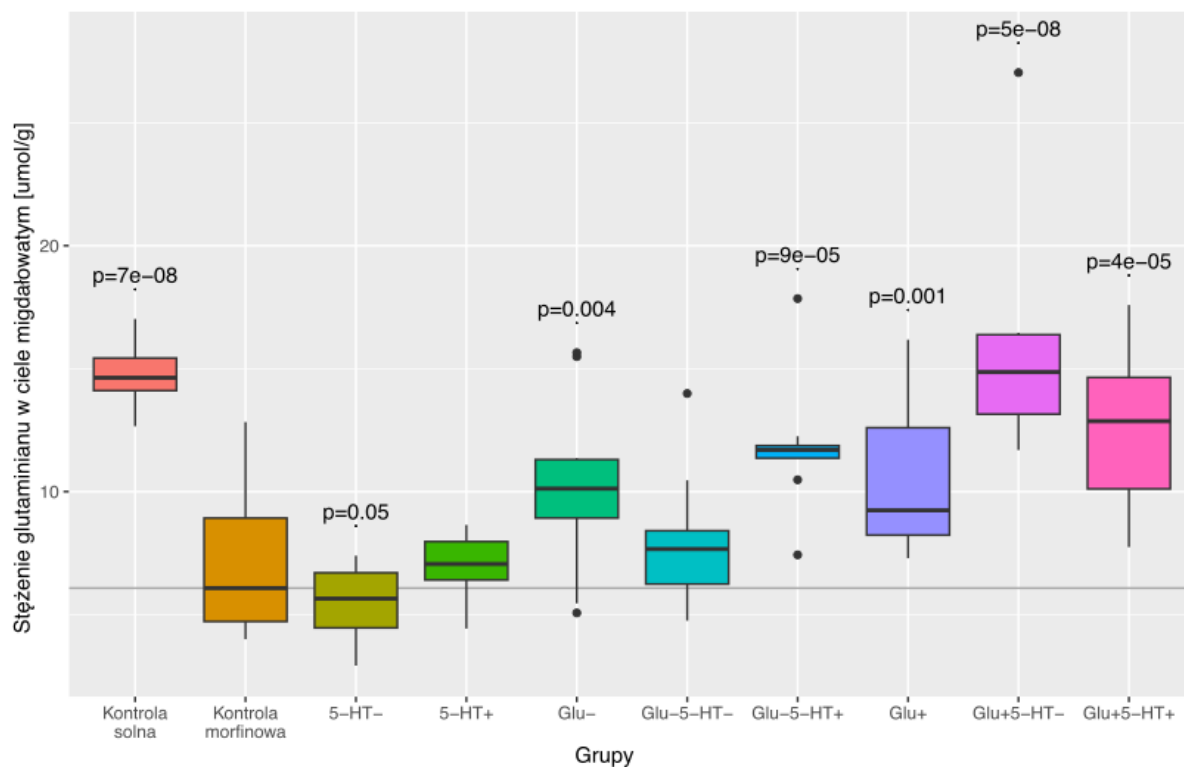


**Rys. 16. Rozkłady stężenia kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w ciele migdałowatym w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

**Kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA) (rys. 16):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 5-HIAA w ciele migdałowatym pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu 5-HIAA w ciele migdałowatym w grupie "5-HT+" ( $p < 0,05$ ). Natomiast, istotny statystycznie wzrost poziomu 5-HIAA w ciele migdałowatym zaobserwowano w trzech grupach: "Glu-5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+" ( $p = 0,01$ ) i "Glu+5-HT-" ( $p < 0,05$ ) w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej.

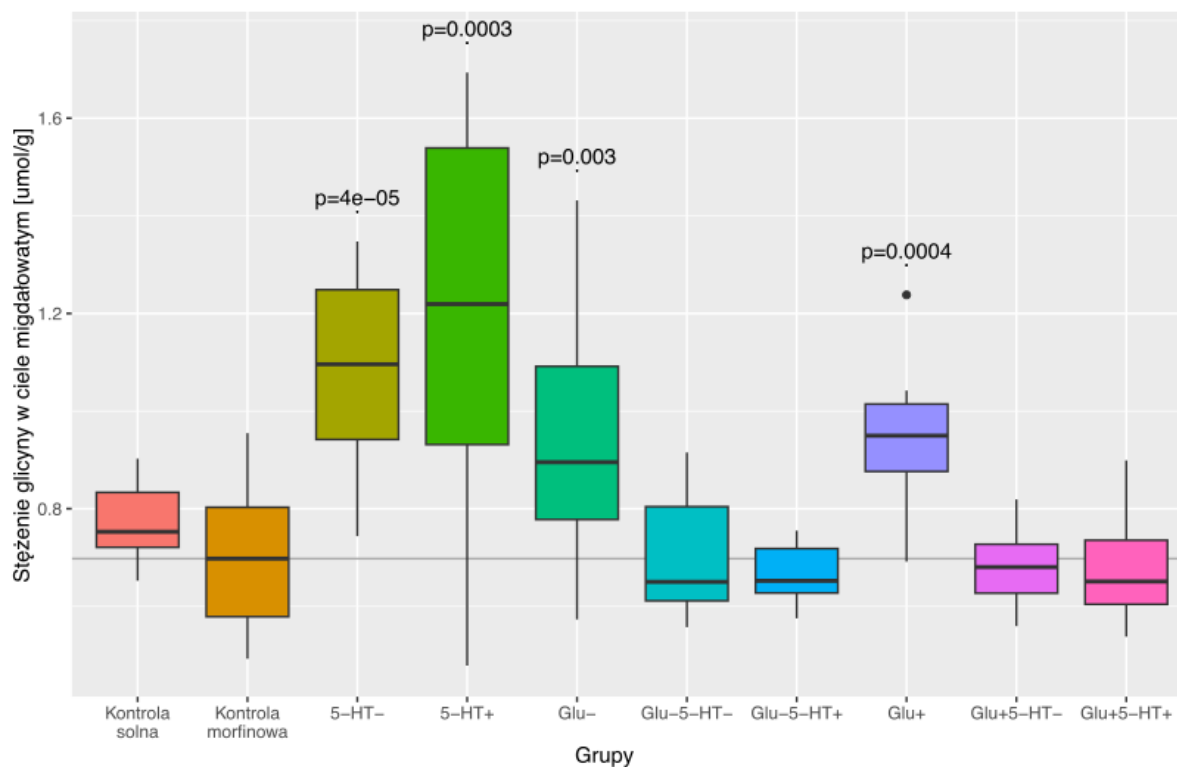




**Rys. 17. Rozkłady stężenia glutaminianu w ciele migdałowatym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Glutaminian** (rys. 17):

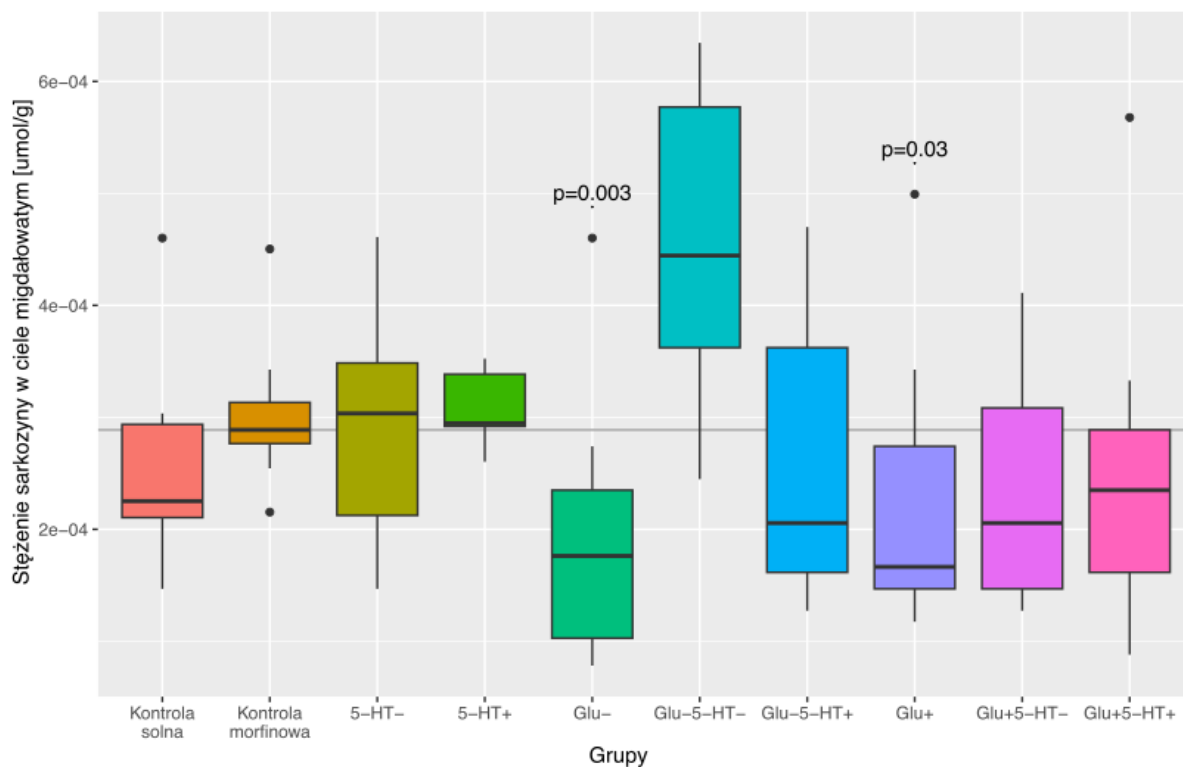
W porównaniu do grupy kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,001$ ) spadek poziomu glutaminianu w ciele migdałowatym w grupie kontroli morfinowej. W grupie "5-HT-" ( $p = 0,05$ ) zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu glutaminianu w ciele migdałowatym w stosunku do kontroli morfinowej. Natomiast, w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu glutaminianu w ciele migdałowatym w pięciu grupach: "Glu-" ( $p < 0,01$ ), "Glu-5-HT+" ( $p < 0,001$ ), "Glu+" ( $p = 0,001$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p < 0,001$ ).



**Rys. 18. Rozkłady stężenia glicyny w ciele migdałowatym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### Glicyna (rys. 18):

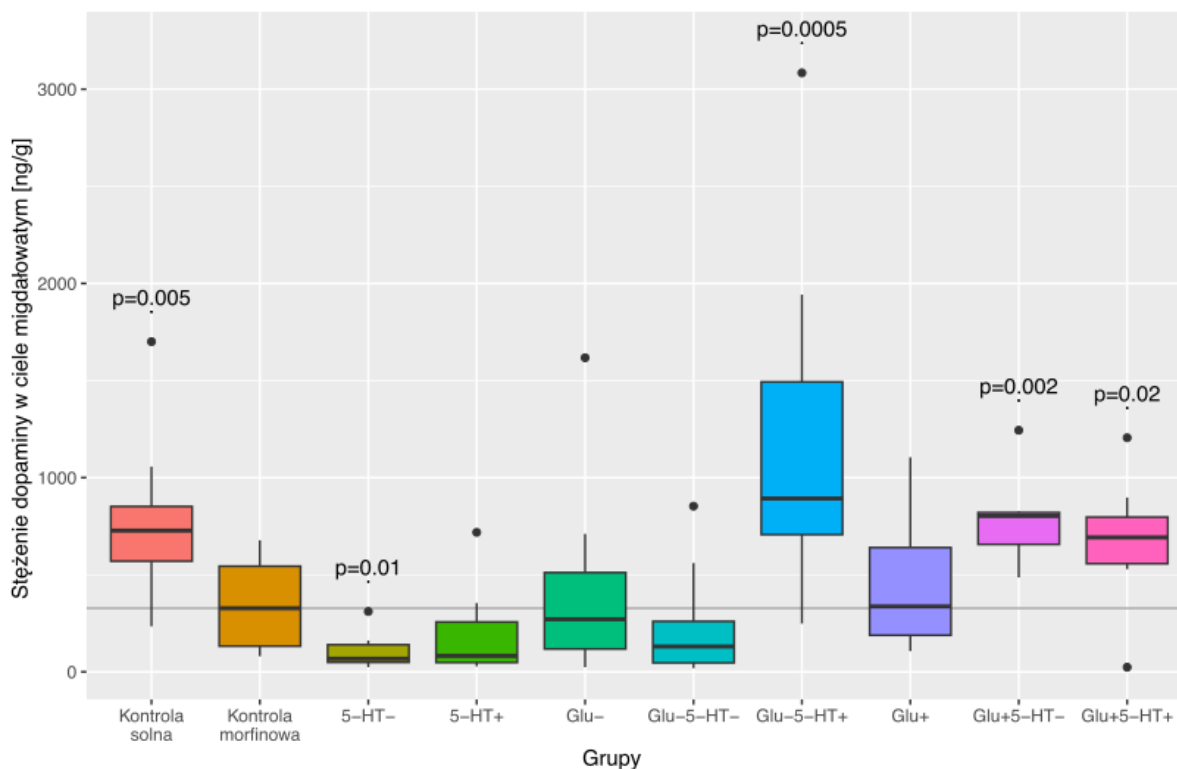
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie glicyny w ciele migdałowatym między grupą kontroli morfinowej a grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost poziomu glicyny w ciele migdałowatym w następujących czterech grupach: "5-HT-" ( $p < 0,001$ ), "5-HT+" ( $p < 0,001$ ), "Glu-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu+" ( $p < 0,001$ ).



**Rys. 19. Rozkłady stężenia sarkozyny w ciele migdałowatym w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Sarkozyna (rys. 19):**

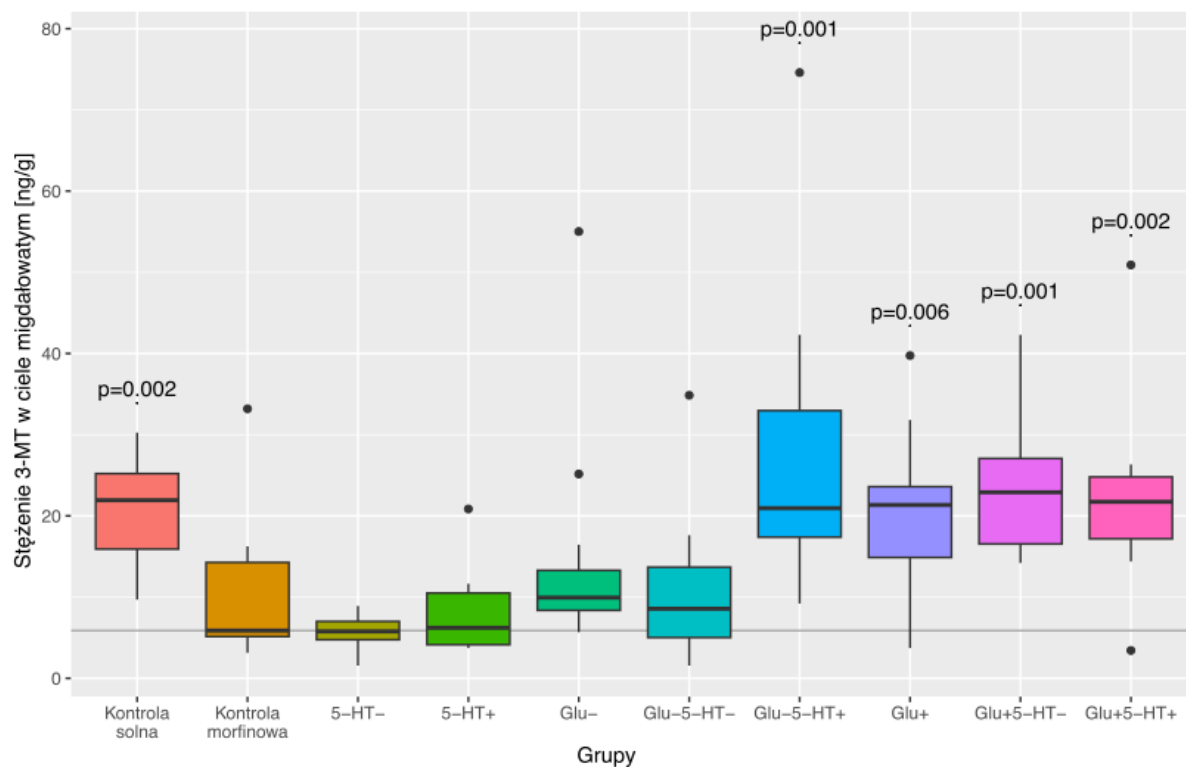
Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w poziomie sarkozyny w ciele migdałowatym pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W stosunku do kontroli morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu sarkozyny w ciele migdałowatym zaobserwowano w dwóch grupach "Glu-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu+" ( $p < 0,05$ ).



**Rys. 20. Rozkłady stężenia dopaminy w ciele migdałowatym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### Dopamina (rys. 20):

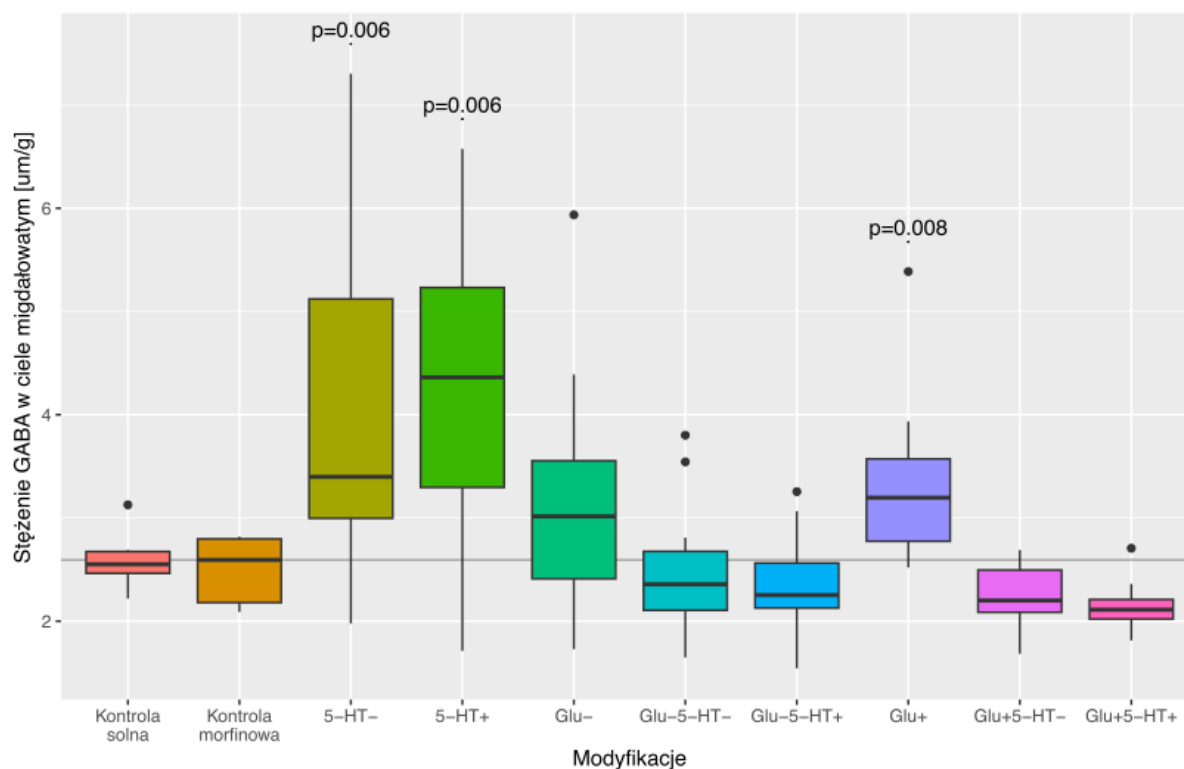
W porównaniu do grupy kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,01$ ) spadek poziomu dopaminy w ciele migdałowatym w grupie kontroli morfinowej. W porównaniu do kontroli morfinowej w grupie "5-HT-" ( $p = 0,01$ ) zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu dopaminy w ciele migdałowatym. Natomiast, istotny statystycznie wzrost poziomu dopaminy w ciele migdałowatym zaobserwowano w trzech grupach: "Glu-5-HT+" ( $p < 0,001$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p < 0,05$ ) w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej.



**Rys. 21. Rozkłady stężenia 3-metoksytyraminy (3-MT) w ciele migdałowatym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **3-metoksytyramina (3-MT) (rys. 21):**

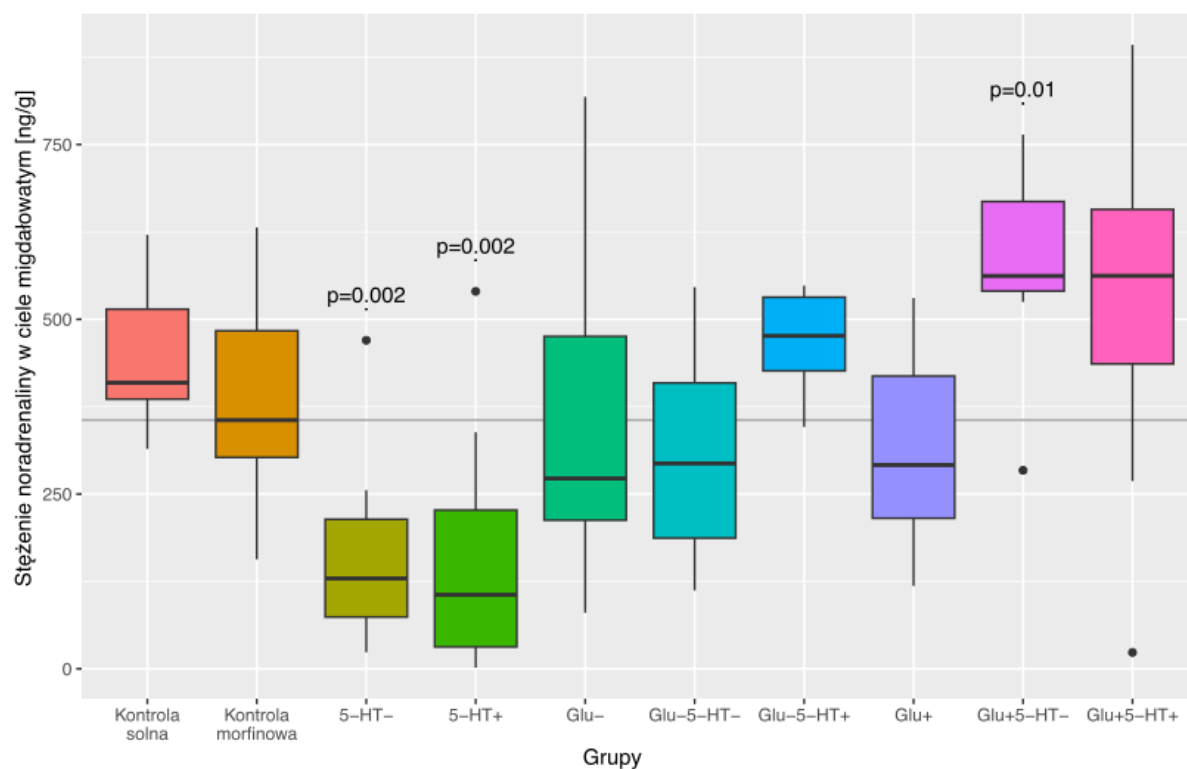
W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,01$ ) spadek poziomu 3-MT w ciele migdałowatym w grupie kontroli morfinowej. W czterech grupach: "Glu-5-HT+" ( $p = 0,001$ ), "Glu+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p = 0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p < 0,01$ ) zaobserwowano statystycznie istotny wzrost poziomu 3-MT w ciele migdałowatym w porównaniu do kontroli morfinowej.



**Rys. 22. Rozkłady stężenia kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) w ciele migdałowatym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Kwas $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) (rys. 22):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie GABA w ciele migdałowatym między grupą kontroli morfinowej a grupą kontroli solnej. W stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu GABA w ciele migdałowatym w trzech następujących grupach: "5-HT-" ( $p < 0,01$ ), "5-HT+" ( $p < 0,01$ ) i "Glu+" ( $p < 0,01$ ).

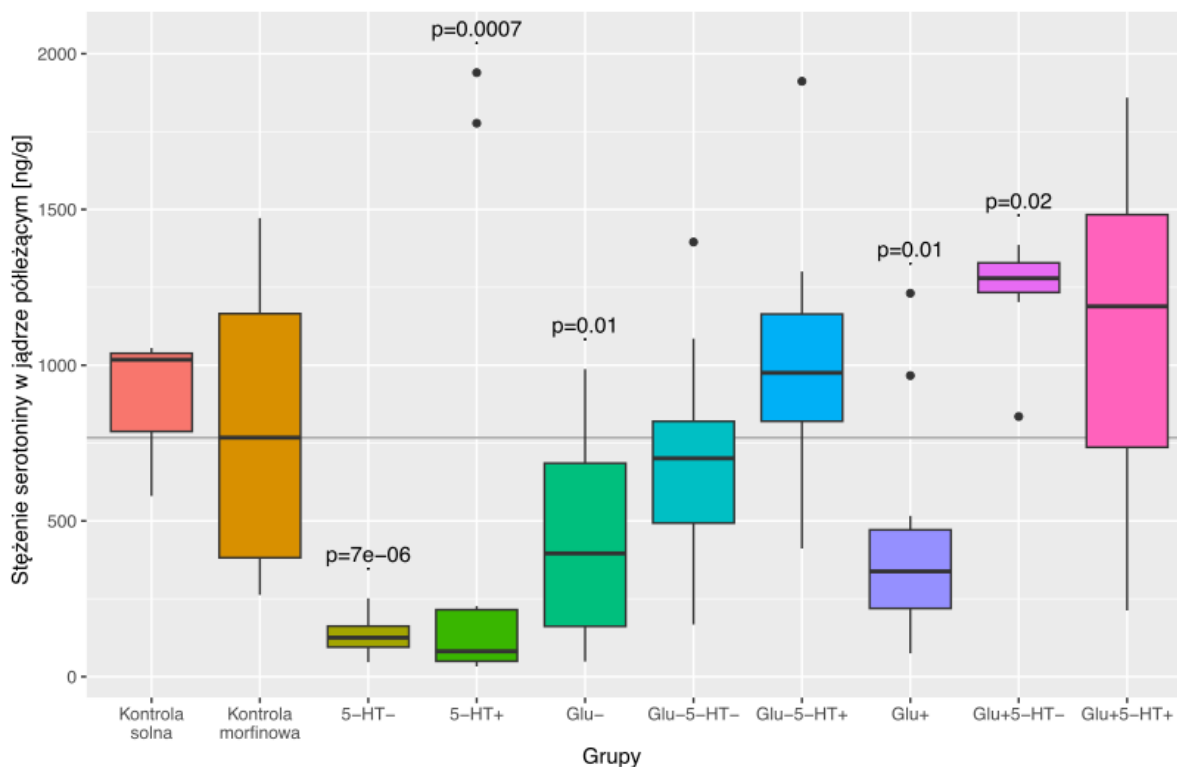


**Rys. 23. Rozkłady stężenia noradrenaliny w ciele migdałowatym w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### Noradrenalina (rys. 23):

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie noradrenaliny w ciele migdałowatym pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do kontroli morfinowej istotnie statystyczny spadek poziomu noradrenaliny w ciele migdałowatym zaobserwowano w dwóch grupach: "**5-HT-**" ( $p < 0,01$ ) i "**5-HT+**" ( $p < 0,01$ ). Natomiast, w grupie "**Glu+5-HT-**" ( $p = 0,01$ ) zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu noradrenaliny w ciele migdałowatym w stosunku do kontroli morfinowej.

### 4.3.2. Neurochemia jądra półleżącego

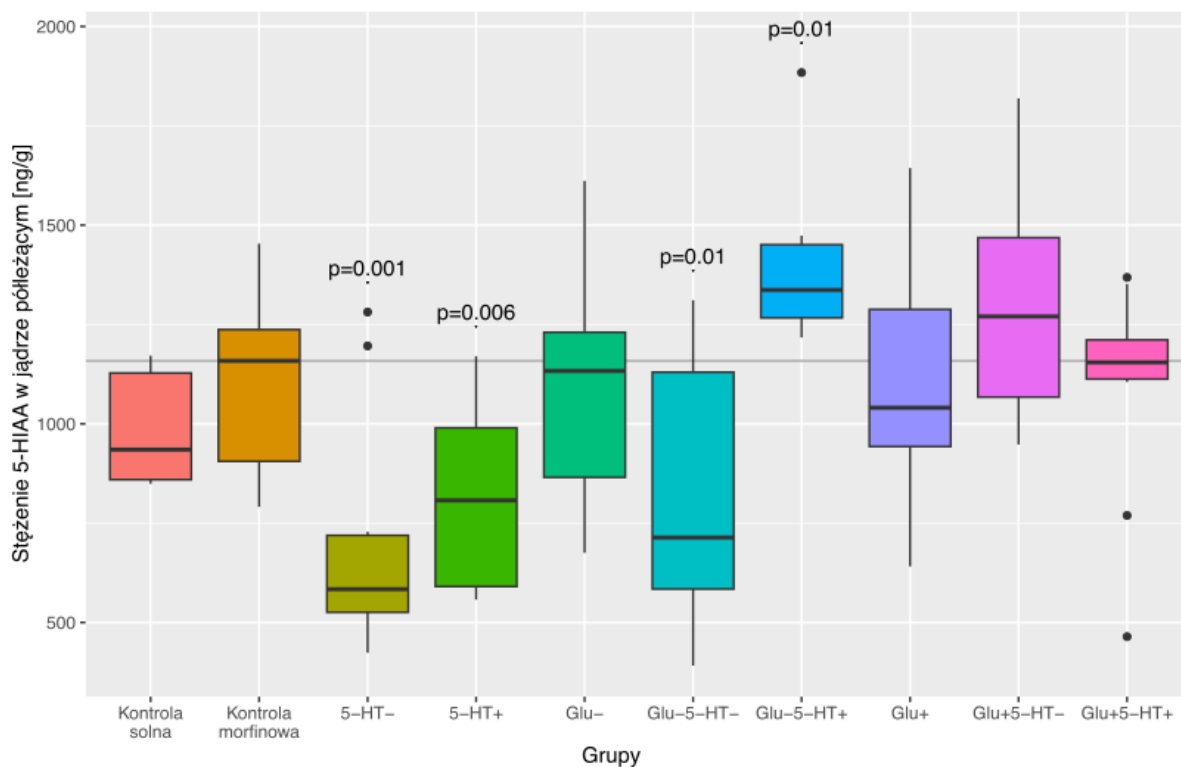


**Rys. 24. Rozkłady stężenia serotoniny w jądrze półleżącym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Serotonina** (rys. 24):

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie serotoniny w jądrze półleżącym między grupą kontroli morfinowej a grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu serotoniny w jądrze półleżącym w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w czterech następujących grupach: "5-HT-" ( $p < 0,001$ ), "5-HT+" ( $p < 0,001$ ), "Glu-" ( $p = 0,01$ ) i "Glu+" ( $p = 0,01$ ). Natomiast, w grupie "Glu+5-HT-" ( $p < 0,05$ ), zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu serotoniny w jądrze półleżącym w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej.

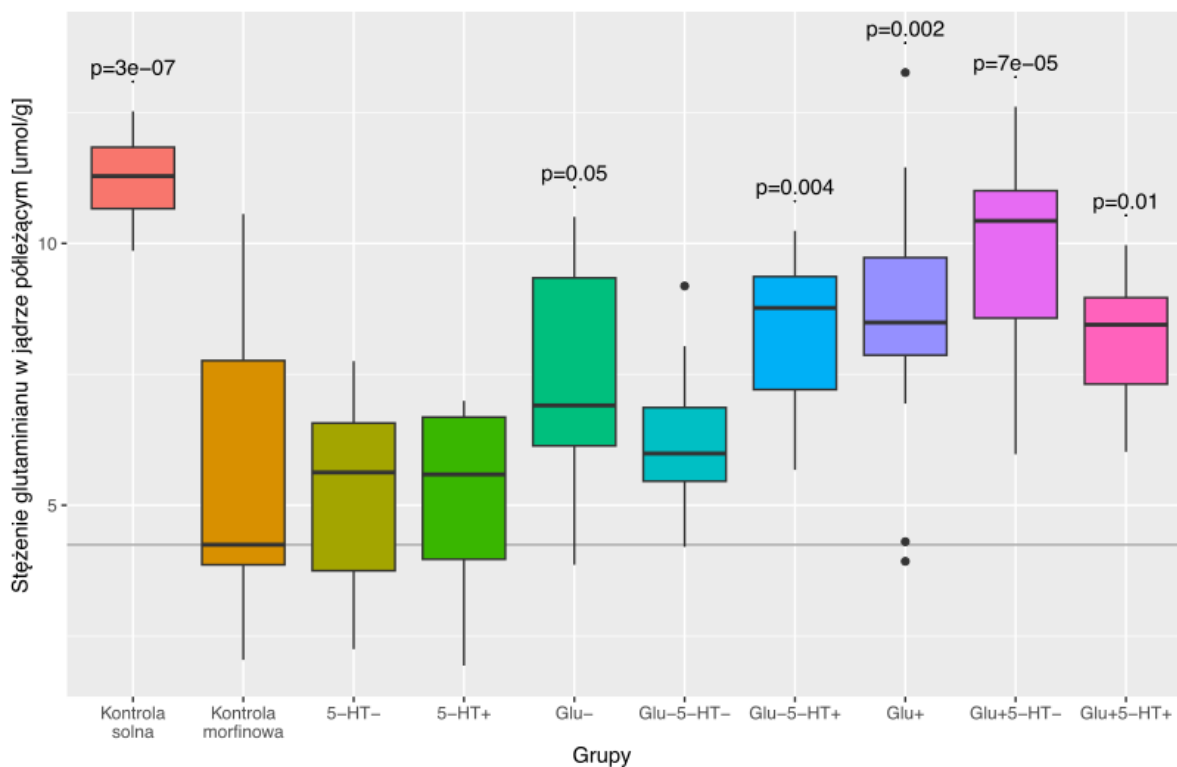




Rys. 25. Rozkłady stężenia kwasu 5-hydroksyindoloocetowego (5-HIAA) w jądrze półleżącym w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### Kwas 5-hydroksyindoloocetowy (5-HIAA) (rys. 25):

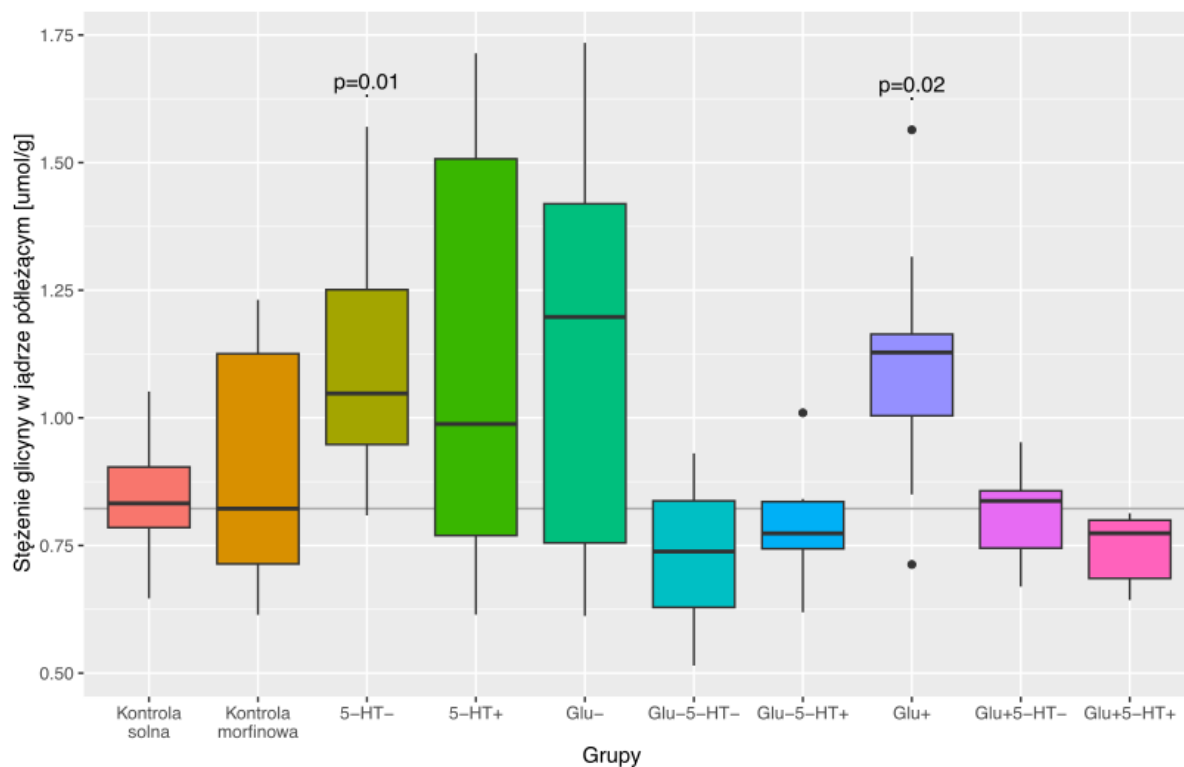
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 5-HIAA w jądrze półleżącym pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu 5-HIAA w jądrze półleżącym w trzech grupach: "5-HT-" ( $p=0,001$ ), "5-HT+" ( $p<0,01$ ) i "Glu-5-HT-" ( $p=0,01$ ). Natomiast w grupie "Glu-5-HT+" ( $p=0,01$ ) zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 5-HIAA w jądrze półleżącym w stosunku do kontroli morfinowej.



**Rys. 26. Rozkłady stężenia glutaminianu w jądrze półleżącym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Glutaminian** (rys. 26):

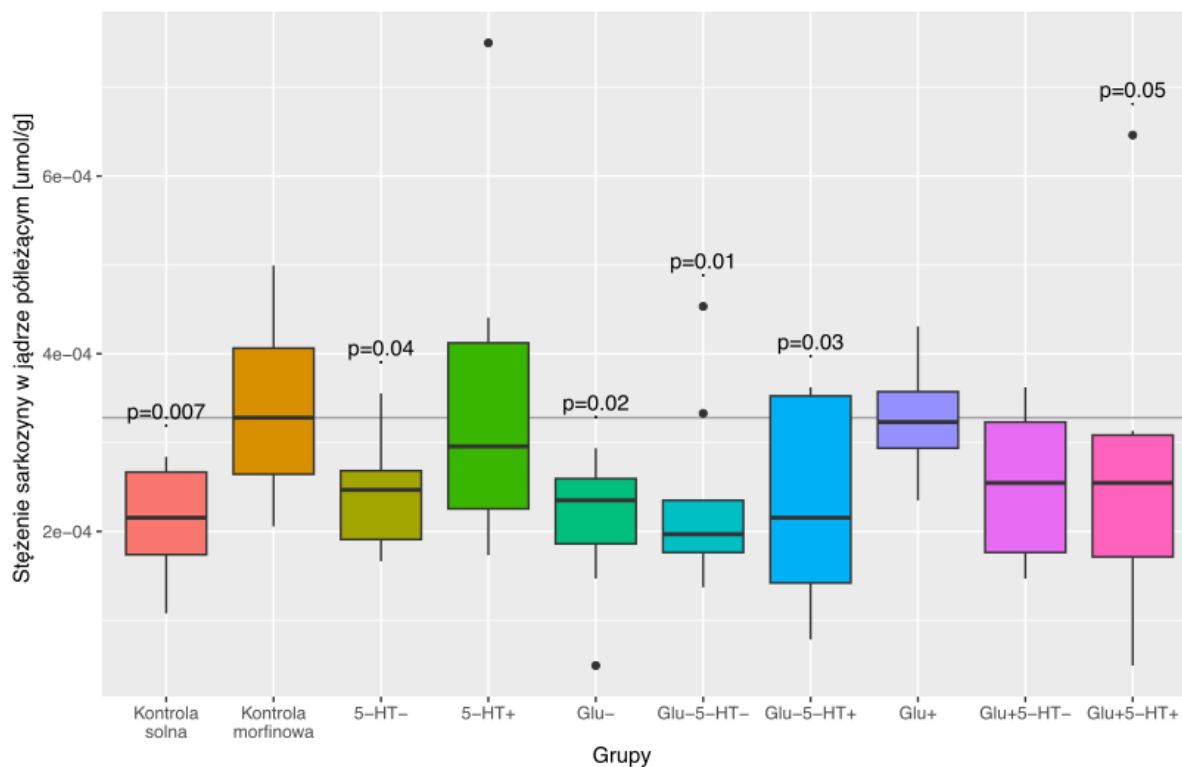
Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,001$ ) spadek poziomu glutaminianu w jądrze półleżącym w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu glutaminianu w jądrze półleżącym w pięciu grupach: "Glu-" ( $p=0,05$ ), "Glu-5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p=0,01$ ).



**Rys. 27. Rozkłady stężenia glicyny w jądrze półleżącym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Glicyna (rys. 27):**

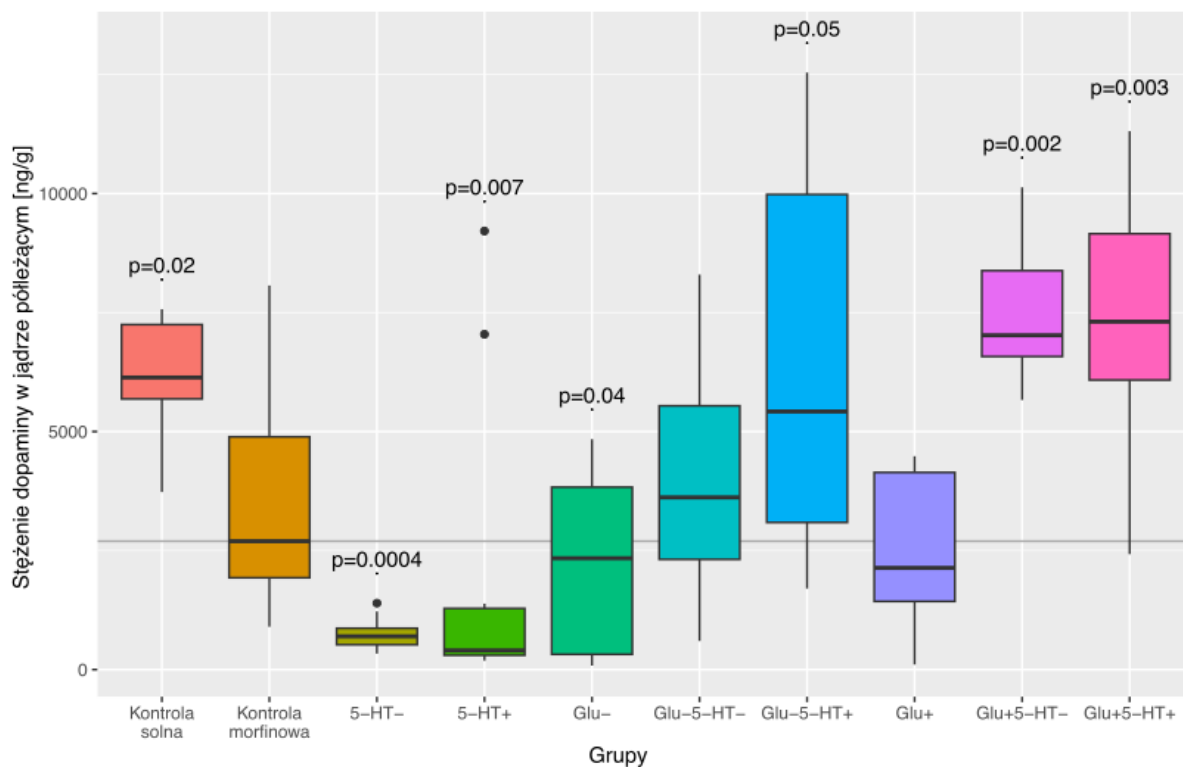
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie glicyny w jądrze półleżącym pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu glicyny w jądrze półleżącym w dwóch grupach: "5-HT-" ( $p=0,01$ ) i "Glu+" ( $p<0,05$ ).



**Rys. 28. Rozkłady stężenia sarkozyny w jądrze półleżącym w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

### **Sarkozyna (rys. 28):**

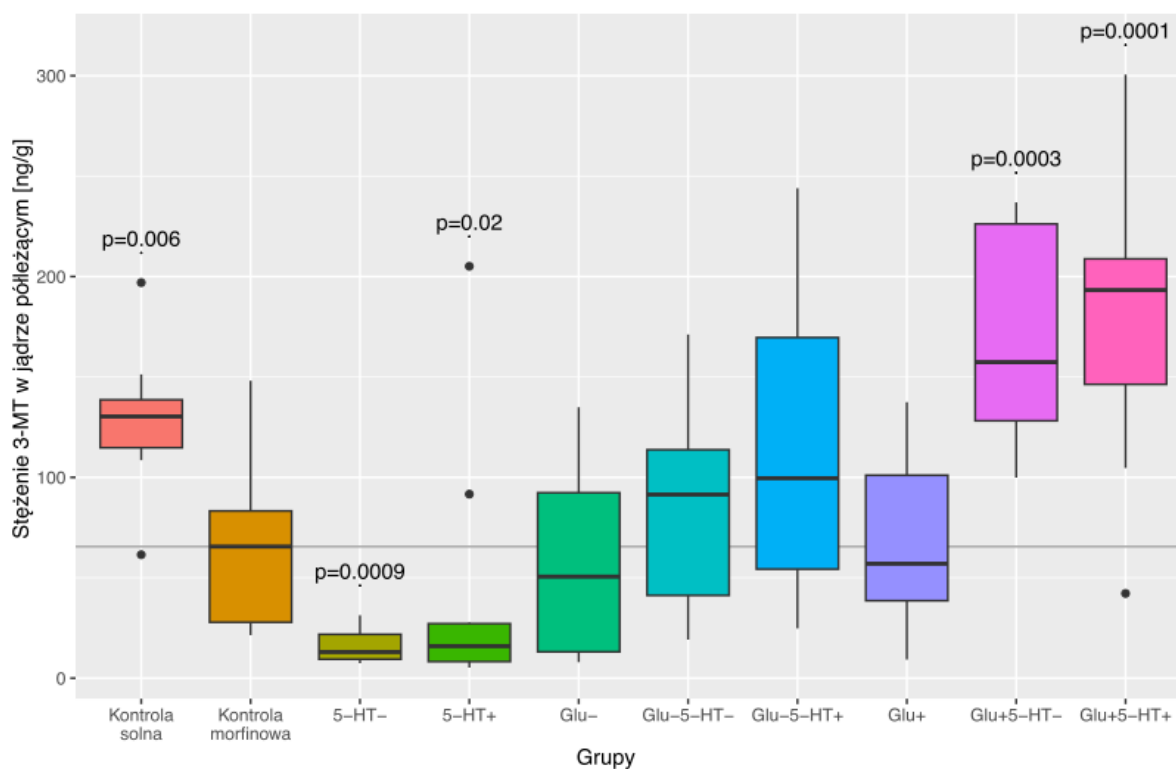
Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,001$ ) wzrost poziomu sarkozyny w jądrze półleżącym w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W stosunku do kontroli morfinowej zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu sarkozyny w jądrze półleżącym pięciu grupach: "5-HT-" ( $p < 0,05$ ), "Glu-" ( $p < 0,05$ ), "Glu-5-HT-" ( $p = 0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p = 0,01$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p = 0,05$ ).



**Rys. 29. Rozkłady stężenia dopaminy w jądrze półleżącym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Dopamina** (rys. 29):

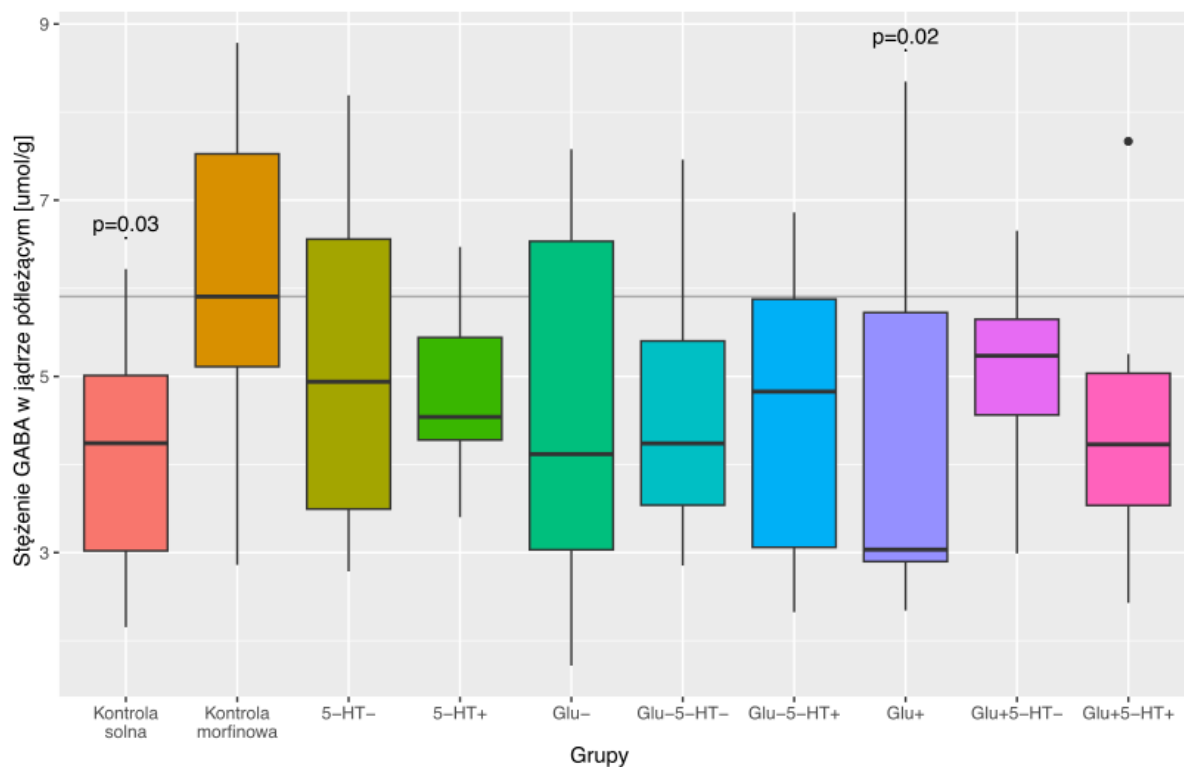
W porównaniu do grupy kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) spadek poziomu dopaminy w jądrze półleżącym w grupie kontroli morfinowej. W stosunku do kontroli morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu dopaminy w jądrze półleżącym w trzech grupach: "**5-HT-**" ( $p < 0,001$ ), "**5-HT+**" ( $p < 0,01$ ) i "**Glu-**" ( $p < 0,05$ ), natomiast wzrost w trzech grupach: "**Glu-5-HT+**" ( $p = 0,05$ ), "**Glu+5-HT-**" ( $p < 0,01$ ) i "**Glu+5-HT+**" ( $p < 0,01$ ).



**Rys. 30. Rozkłady stężenia 3-MT w jądrze półęzającym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **3-metoksytyramina (3-MT) (rys. 30):**

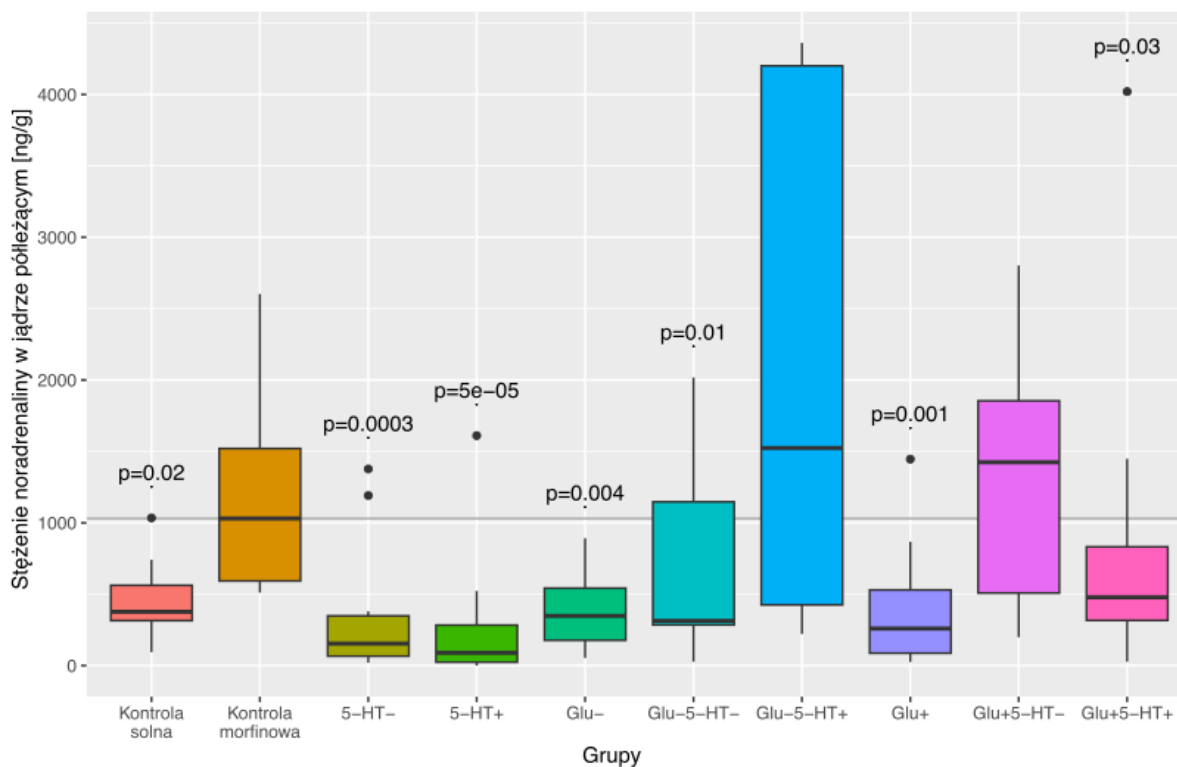
Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,01$ ) spadek poziomu 3-MT w jądrze półęzającym w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W stosunku do kontroli morfinowej zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu 3-MT w jądrze półęzającym w dwóch grupach: "**5-HT-**" ( $p < 0,001$ ) i "**5-HT+**" ( $p < 0,05$ ). Natomiast, w grupach "**Glu+5-HT-**" ( $p < 0,001$ ) i "**Glu+5-HT+**" ( $p < 0,001$ ), zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu 3-MT w jądrze półęzającym w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej.



**Rys. 31. Rozkłady stężenia GABA w jądrze półleżącym w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Kwas $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) (rys. 31):**

W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) wzrost poziomu GABA w jądrze półleżącym w grupie kontroli morfinowej. W grupie "Glu+" zaobserwowano statystycznie istotny ( $p < 0,05$ ) spadek poziomu GABA w jądrze półleżącym w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej.



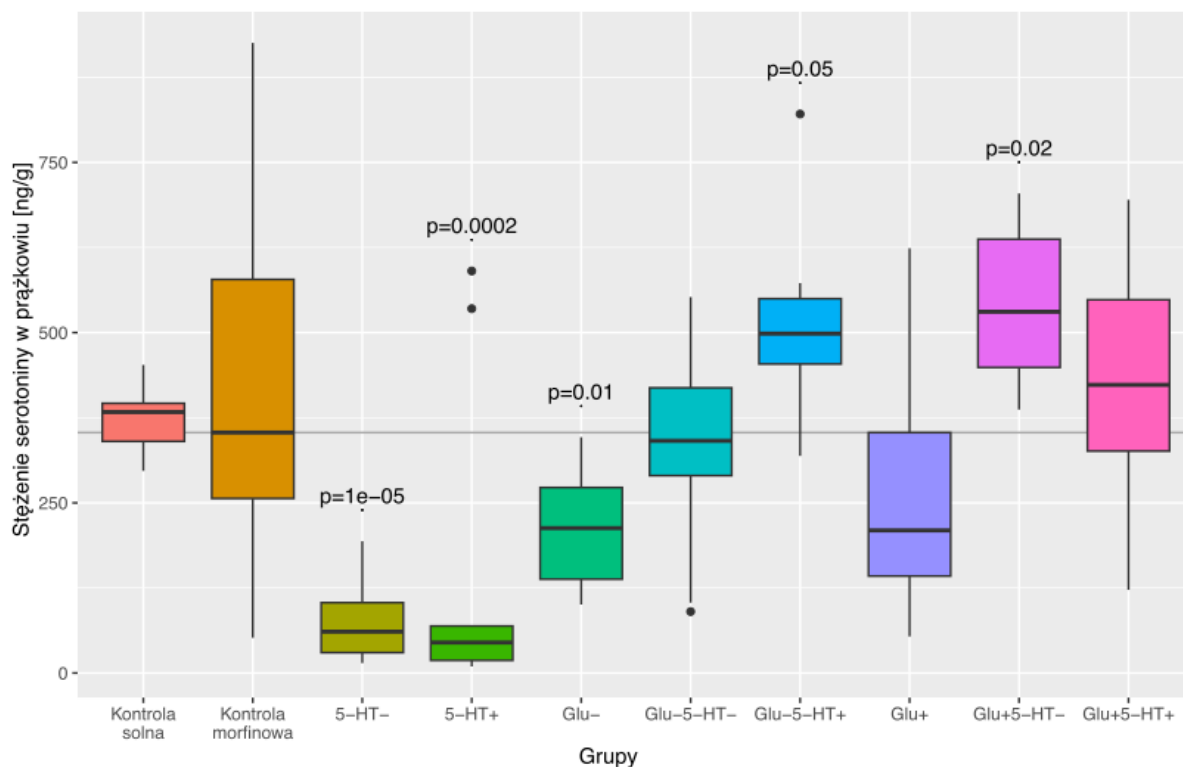
**Rys. 32. Rozkłady stężenia noradrenaliny w jądrze półleżącym w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Noradrenalina (rys. 32):**

Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) wzrost poziomu noradrenaliny w jądrze półleżącym w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu noradrenaliny w jądrze półleżącym w sześciu grupach: "**5-HT-**" ( $p < 0,001$ ), "**5-HT+**" ( $p < 0,001$ ), "**Glu-**" ( $p < 0,01$ ), "**Glu-5-HT-**" ( $p = 0,01$ ), "**Glu+**" ( $p = 0,001$ ) i "**Glu+5-HT+**" ( $p < 0,05$ ).



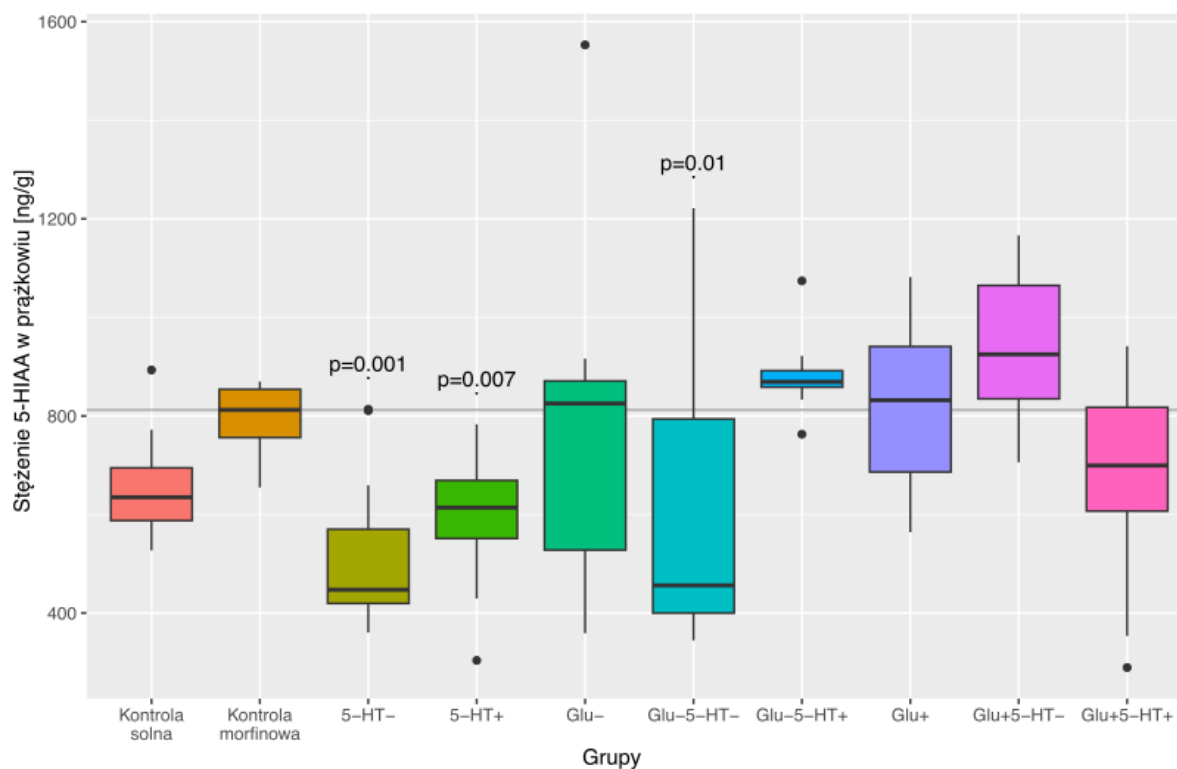
### 4.3.3. Neurochemia prążkowiec



**Rys. 33. Rozkłady stężenia serotoniny w prążkowiec w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Serotonina (rys. 33):**

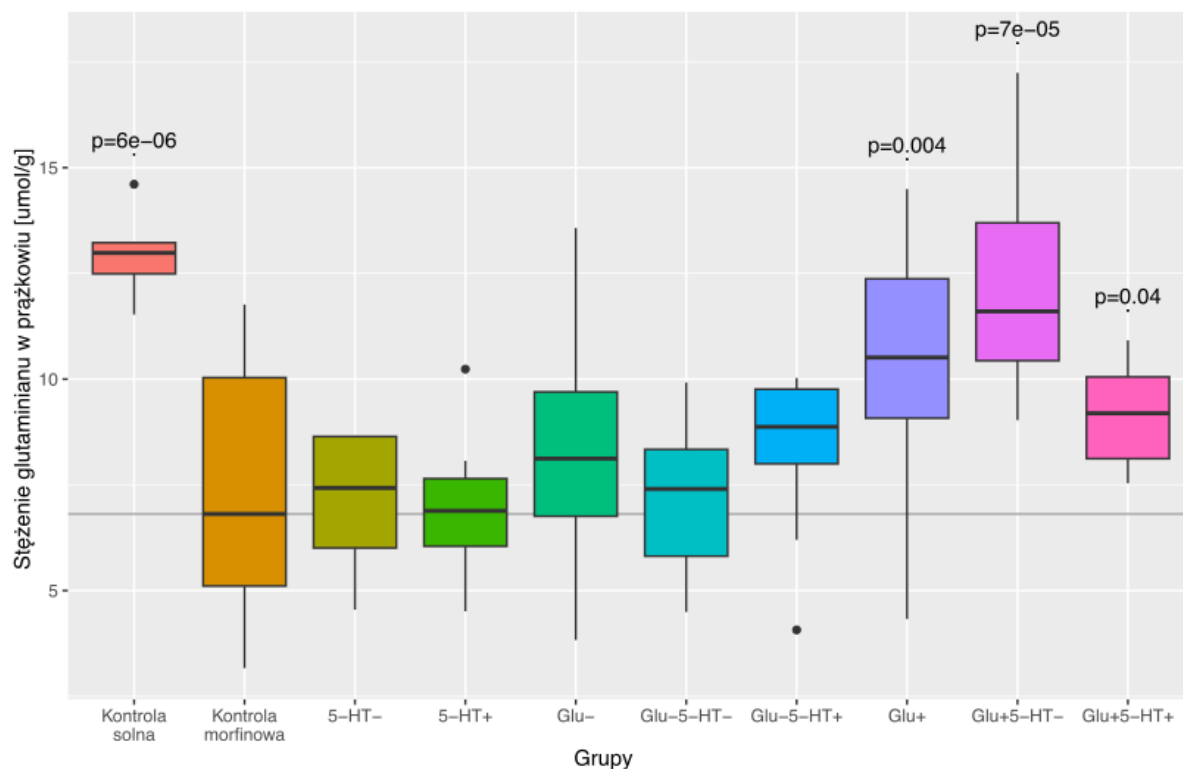
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie serotoniny w prążkowiec pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu serotoniny w prążkowiec w trzech grupach: "5-HT-" ( $p < 0,001$ ), "5-HT+" ( $p < 0,001$ ) i "Glu-" ( $p = 0,01$ ), natomiast, wzrost w dwóch grupach: "Glu-5-HT+" ( $p = 0,05$ ) i "Glu+5-HT-" ( $p < 0,05$ ).



**Rys. 34. Rozkłady stężenia kwasu 5-hydroksyindoloocetowego (5-HIAA) w prążkowie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Kwas 5-hydroksyindoloocetowy (5-HIAA) (rys. 34):**

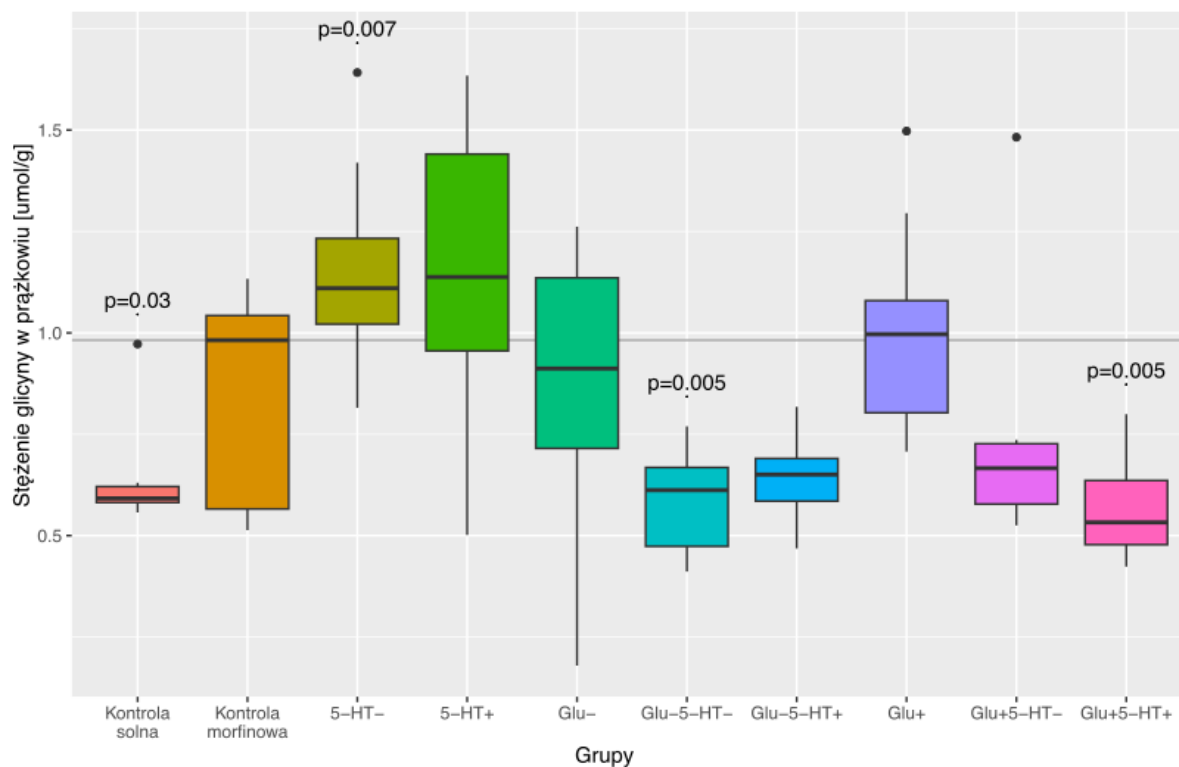
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 5-HIAA w prążkowie pomiędzy grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu 5-HIAA w prążkowie w trzech grupach: "5-HT-" ( $p=0,001$ ), "5-HT+" ( $p<0,01$ ) i "Glu-5-HT-" ( $p=0,01$ ).



**Rys. 35. Rozkłady stężenia glutaminianu w prążkowie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Glutaminian** (rys. 35):

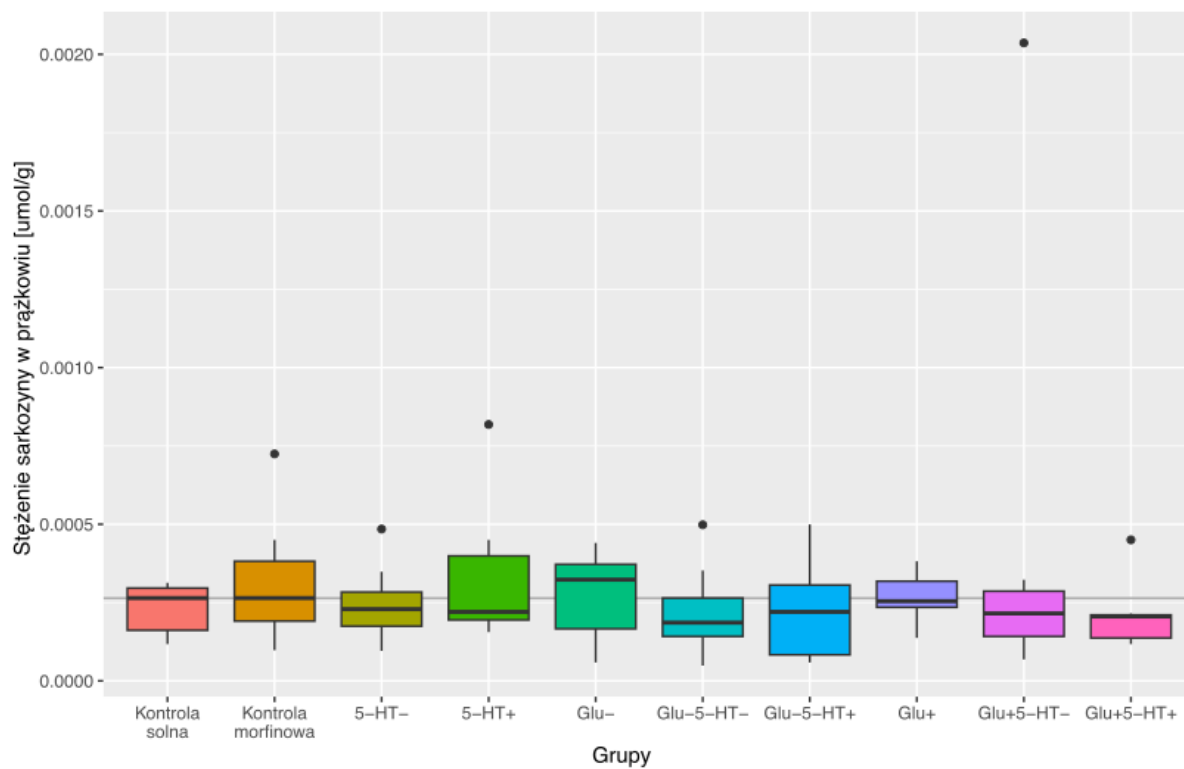
W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano statystycznie istotny ( $p < 0,001$ ) spadek poziomu glutaminianu w prążkowie w grupie kontroli morfinowej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej istotny statystycznie wzrost poziomu glutaminianu w prążkowie zaobserwowano w trzech grupach: "Glu+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p < 0,05$ ).



**Rys. 36. Rozkłady stężenia glicyny w prążkowie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Glicyna (rys. 36):**

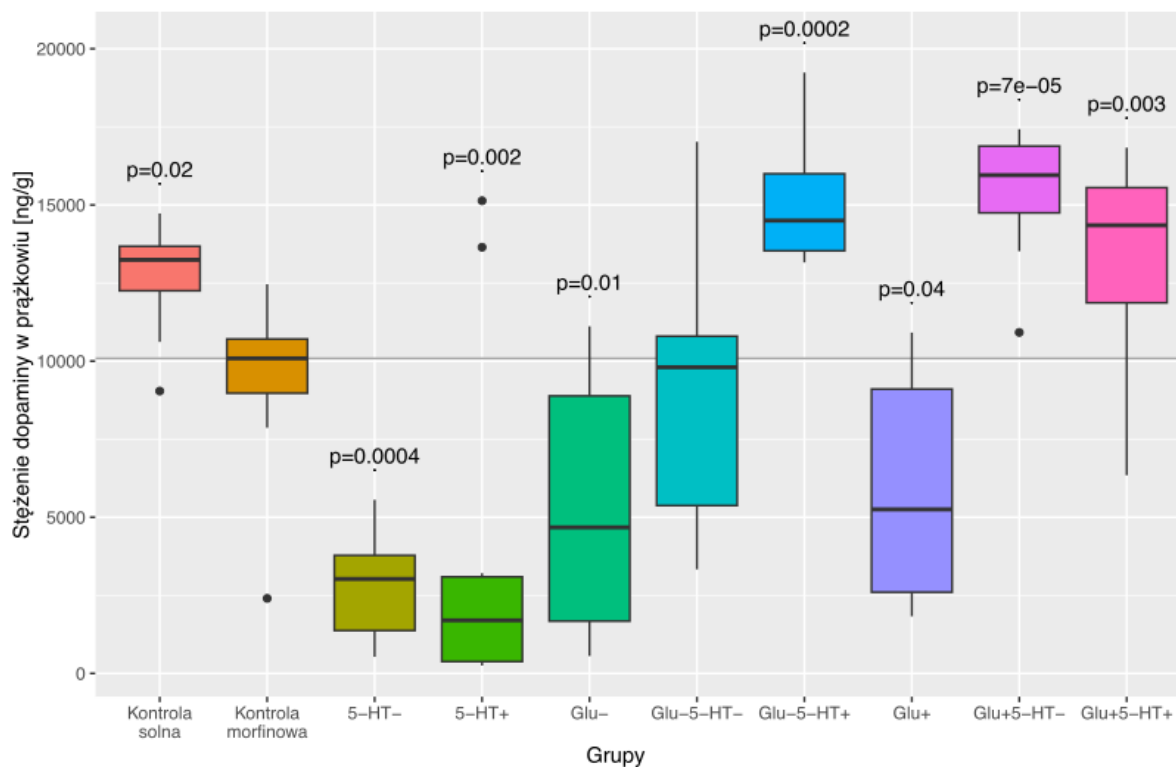
Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) wzrost poziomu glicyny w prążkowie w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do grupy kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontroli morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu glicyny w prążkowie w dwóch grupach: "Glu-5-HT-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p < 0,01$ ), natomiast wzrost w grupie "5-HT-" ( $p < 0,05$ ).



**Rys. 37. Rozkłady stężenia sarkozyny w prążkowie w badanych grupach.**

**Sarkozyna (rys. 37):**

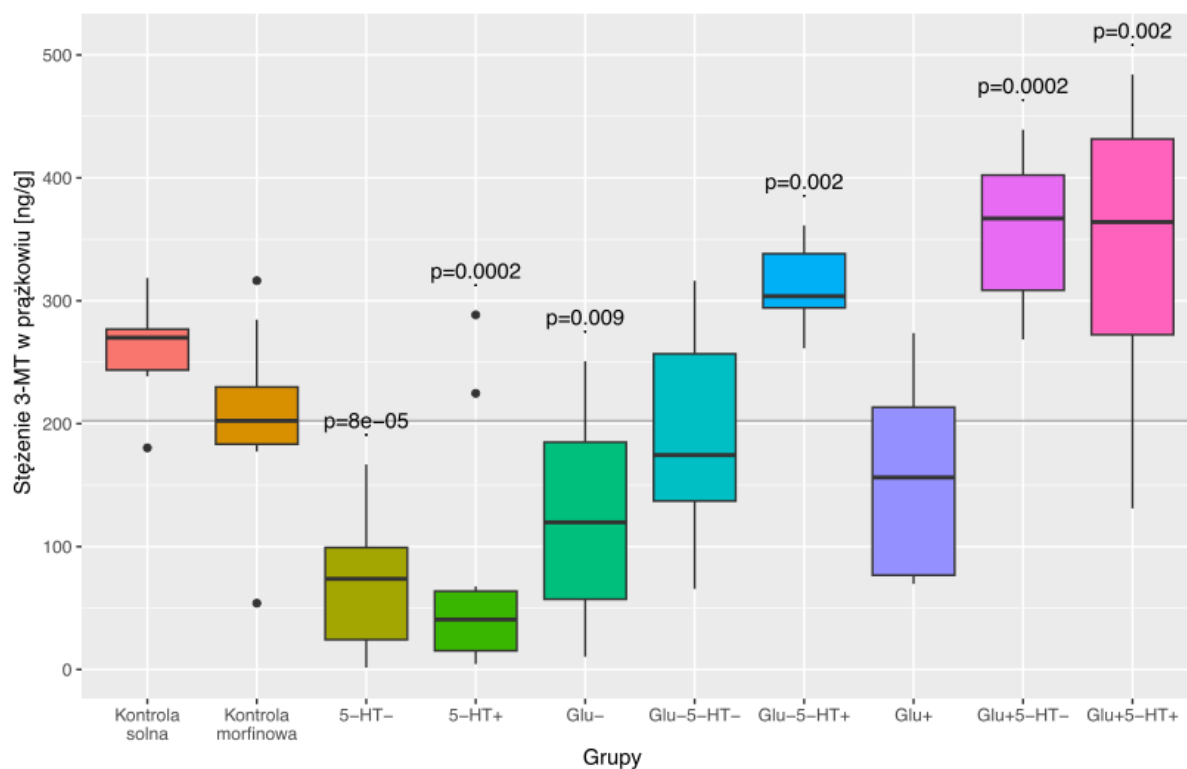
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie sarkozyny w prążkowie pomiędzy grupami.



**Rys. 38. Rozkłady stężenia dopaminy w prążkowie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### Dopamina (rys. 38):

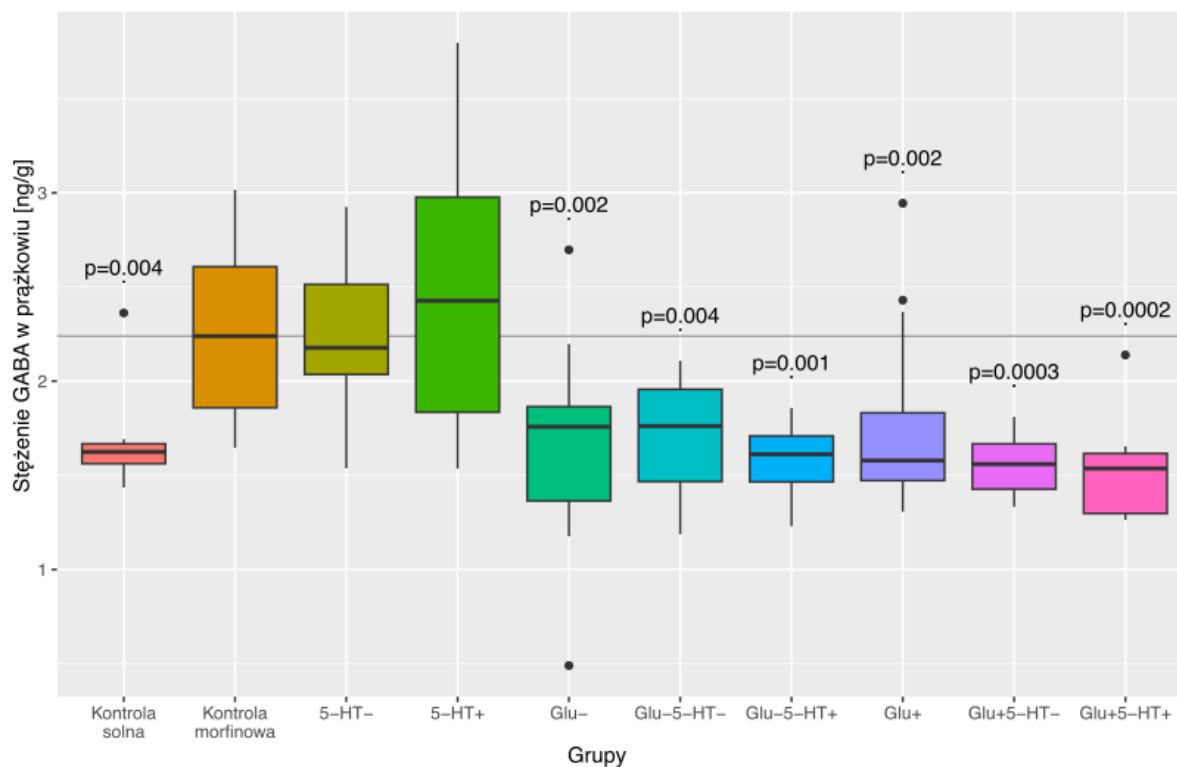
W porównaniu do grupy kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) spadek poziomu dopaminy w prążkowie w grupie kontroli morfinowej. W stosunku do grupy kontroli morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu dopaminy w prążkowie w czterech grupach: "5-HT-" ( $p = 0,01$ ), "5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu-" ( $p = 0,01$ ) i "Glu+" ( $p < 0,05$ ), natomiast wzrost w trzech grupach: "Glu-5-HT+" ( $p < 0,001$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p < 0,01$ ).



**Rys. 39. Rozkłady stężenia 3-MT w prążkowie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### 3-metoksytyramina (3-MT) (rys. 39):

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 3-MT w prążkowie między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W porównaniu do kontroli morfinowej zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu 3-MT w prążkowie w trzech grupach: "5-HT-" ( $p<0,001$ ), "5-HT+" ( $p<0,001$ ) i "Glu-" ( $p<0,01$ ), oraz wzrost w trzech grupach: "Glu-5-HT+" ( $p<0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p<0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p<0,01$ ).

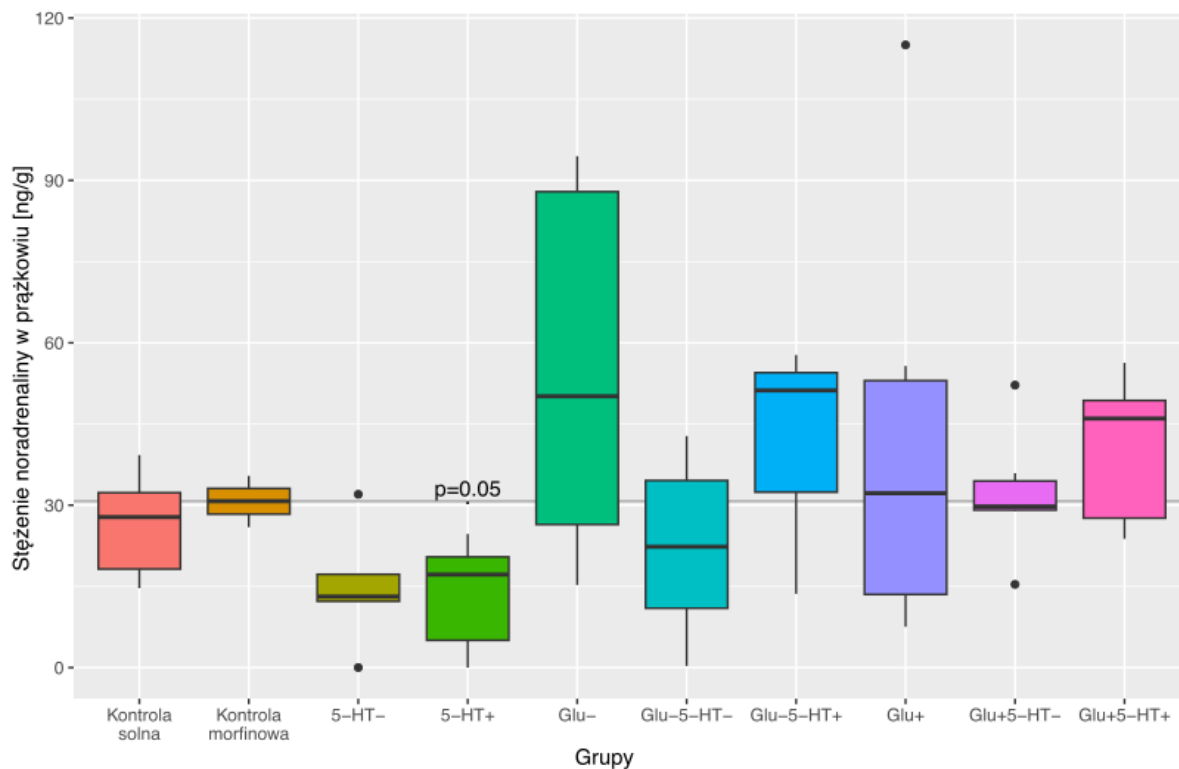


**Rys. 40. Rozkłady stężenia GABA w prążkowiu w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Kwas $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) (rys. 40):**

Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,01$ ) wzrost poziomu GABA w prążkowiu w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W stosunku do grupy kontrolnej morfinowej istotnie statystyczny spadek poziomu GABA w prążkowiu zaobserwowano w sześciu grupach: "Glu-" ( $p < 0,01$ ), "Glu-5-HT-" ( $p < 0,01$ ), "Glu-5-HT+" ( $p = 0,001$ ), "Glu+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p < 0,001$ ).



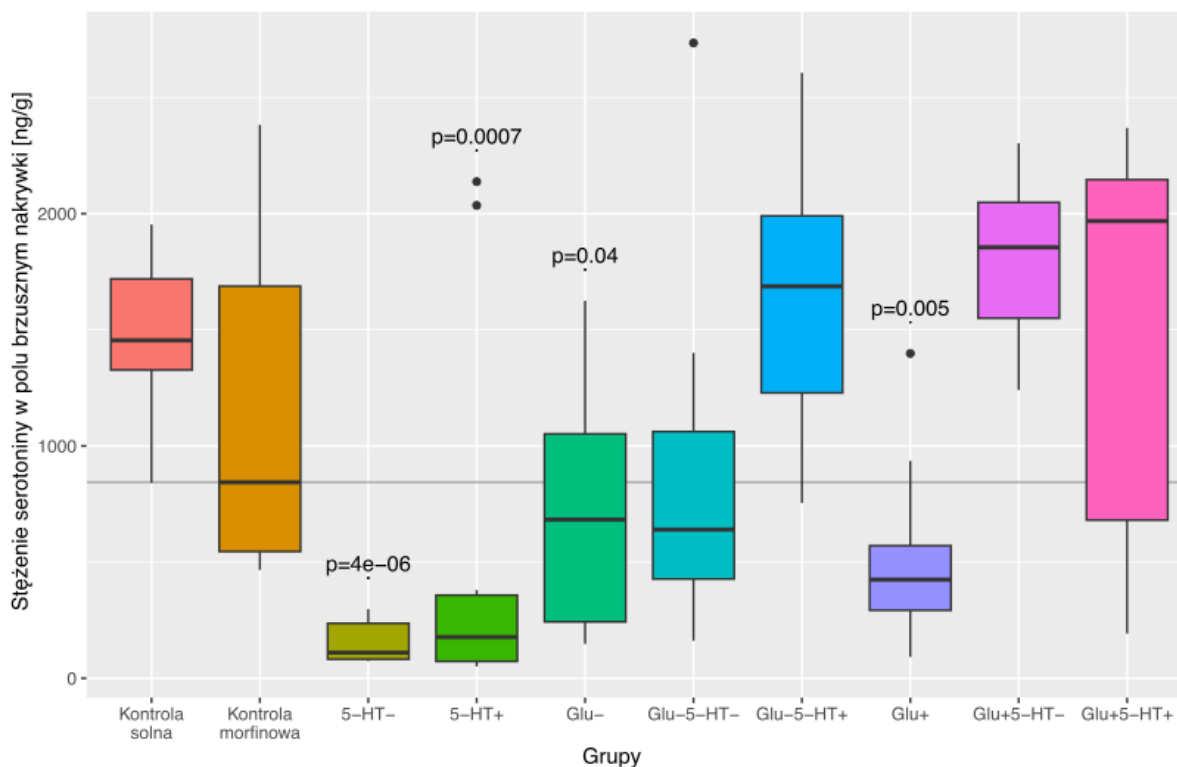


**Rys. 41. Rozkłady stężenia noradrenaliny w prążkowie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Noradrenalina (rys. 41):**

Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w poziomie noradrenaliny w prążkowie pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu noradrenaliny w prążkowie w grupie "5-HT+" ( $p=0,05$ ).

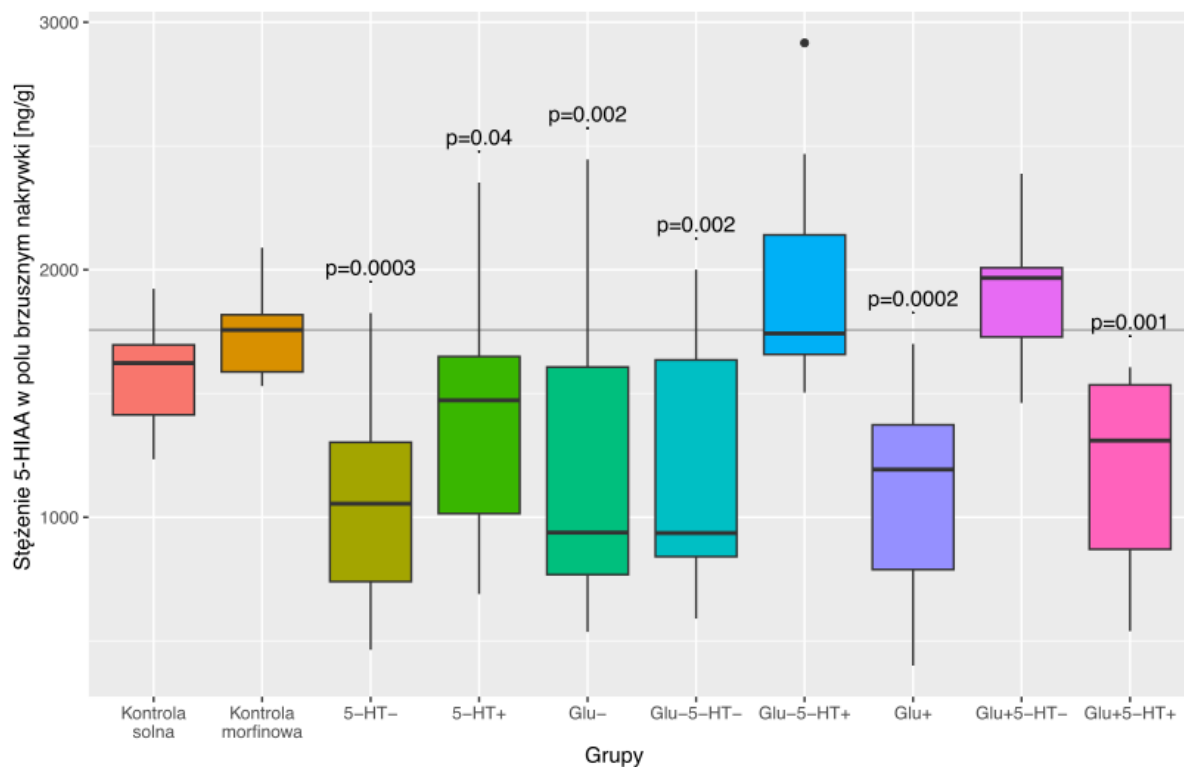
#### 4.3.4. Neurochemia pola brzuszego nakrywki



**Rys. 42. Rozkłady stężenia serotoniny w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

#### **Serotonina (rys. 42):**

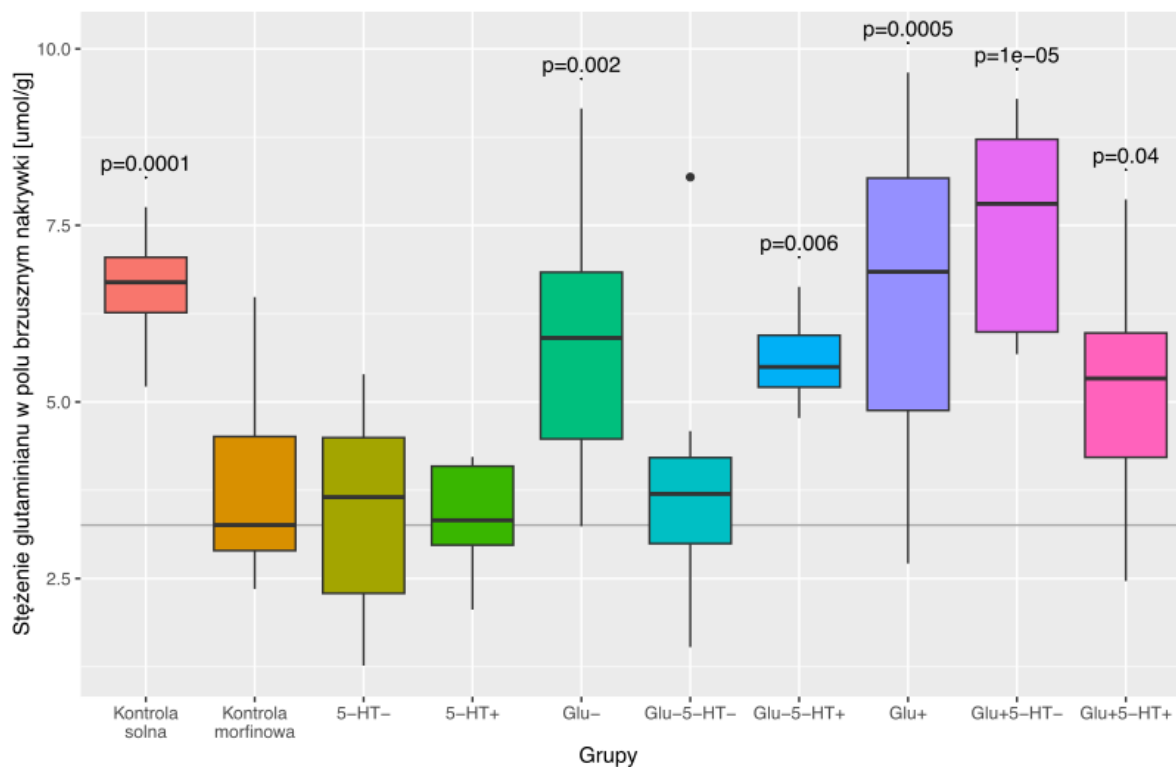
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie serotoniny w polu brzusznej nakrywki między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu serotoniny w polu brzusznej nakrywki w czterech grupach: "5-HT-" ( $p < 0,001$ ), "5-HT+" ( $p < 0,001$ ), "Glu-" ( $p = 0,01$ ) i "Glu+".



**Rys. 43. Rozkłady stężenia kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA) (rys. 43):**

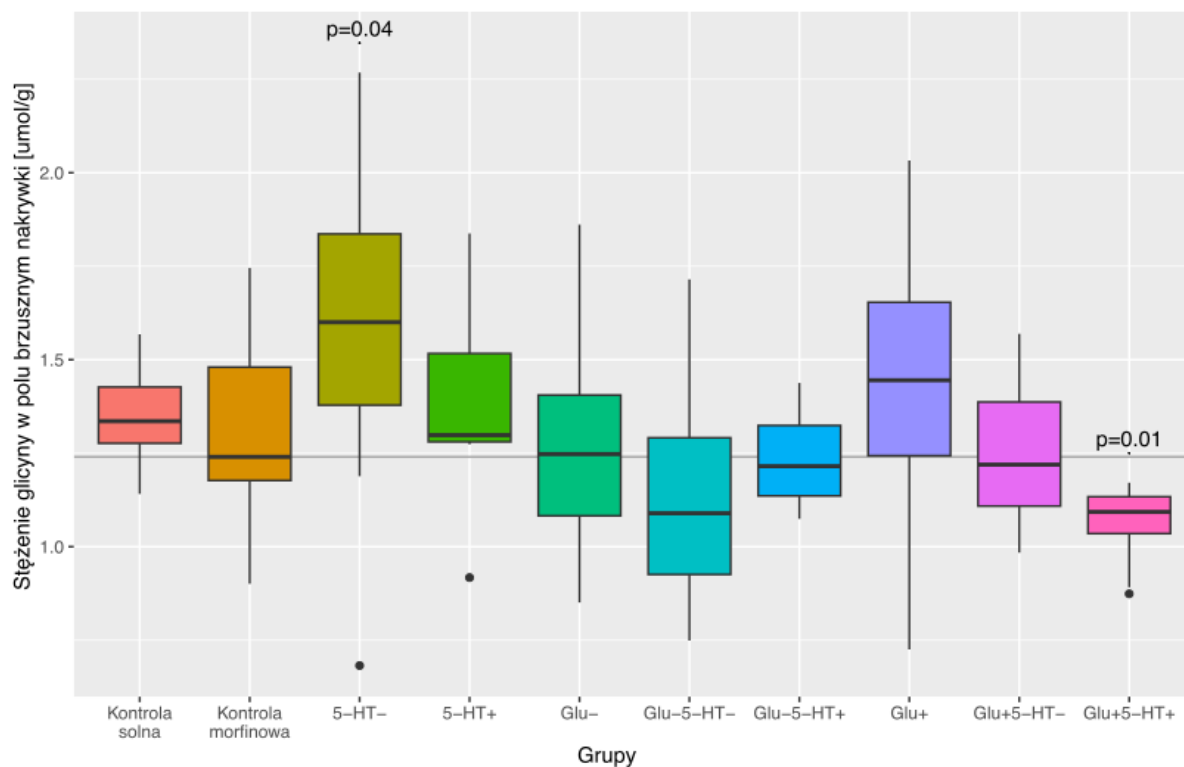
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 5-HIAA w polu brzusznej nakrywki pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. Istotny statystycznie spadek poziomu 5-HIAA w polu brzusznej nakrywki w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w sześciu grupach: "5-HT-" ( $p=0,001$ ), "5-HT+" ( $p<0,05$ ), "Glu-" ( $p<0,01$ ), "Glu-5-HT-" ( $p<0,01$ ), "Glu+" ( $p<0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p=0,001$ ).



**Rys. 44. Rozkłady stężenia glutaminy w polu brzusznej nakrywy w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Glutaminian** (rys. 44):

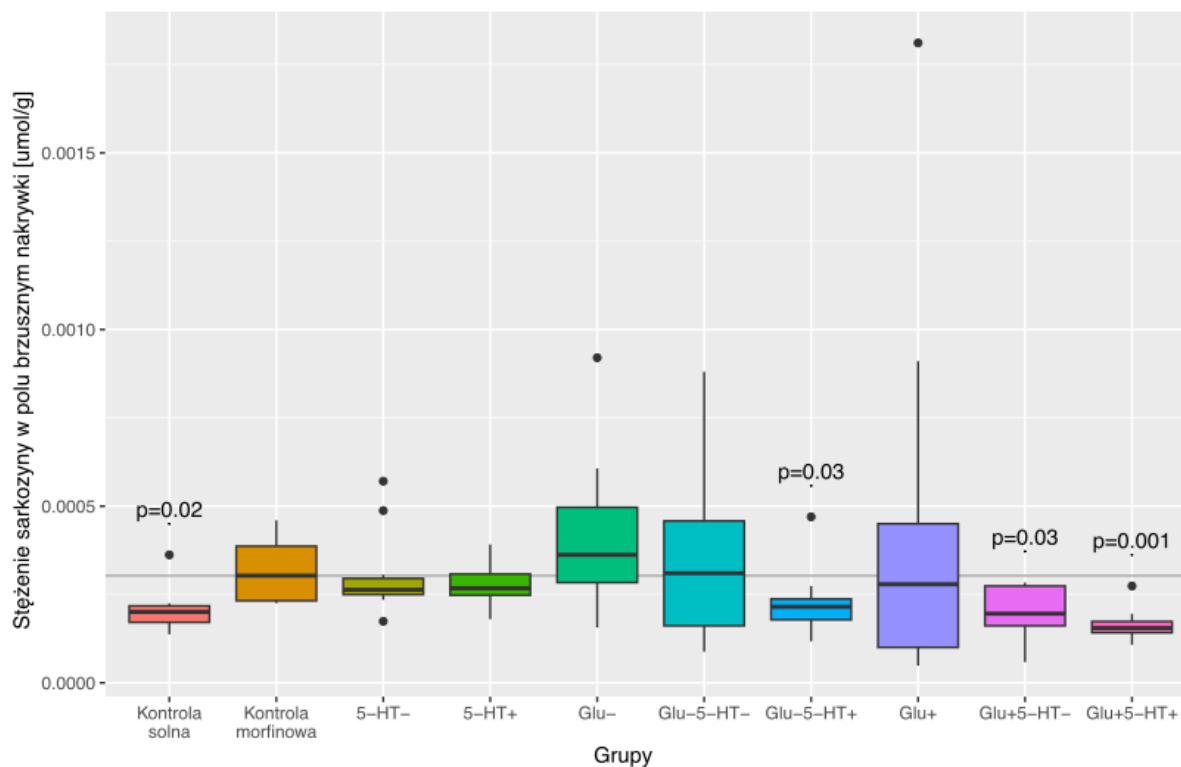
W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,001$ ) spadek poziomu glutaminy w polu brzusznej nakrywy w grupie kontroli morfinowej. Istotny statystycznie wzrost poziomu glutaminy w polu brzusznej nakrywy zaobserwowano w pięciu grupach: "Glu-" ( $p < 0,01$ ), "Glu-5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+" ( $p < 0,001$ ), "**Glu+5-HT-**" ( $p < 0,001$ ) i "**Glu+5-HT+**" ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej.



**Rys. 45. Rozkłady stężenia glicyny w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Glicyna (rys. 45):**

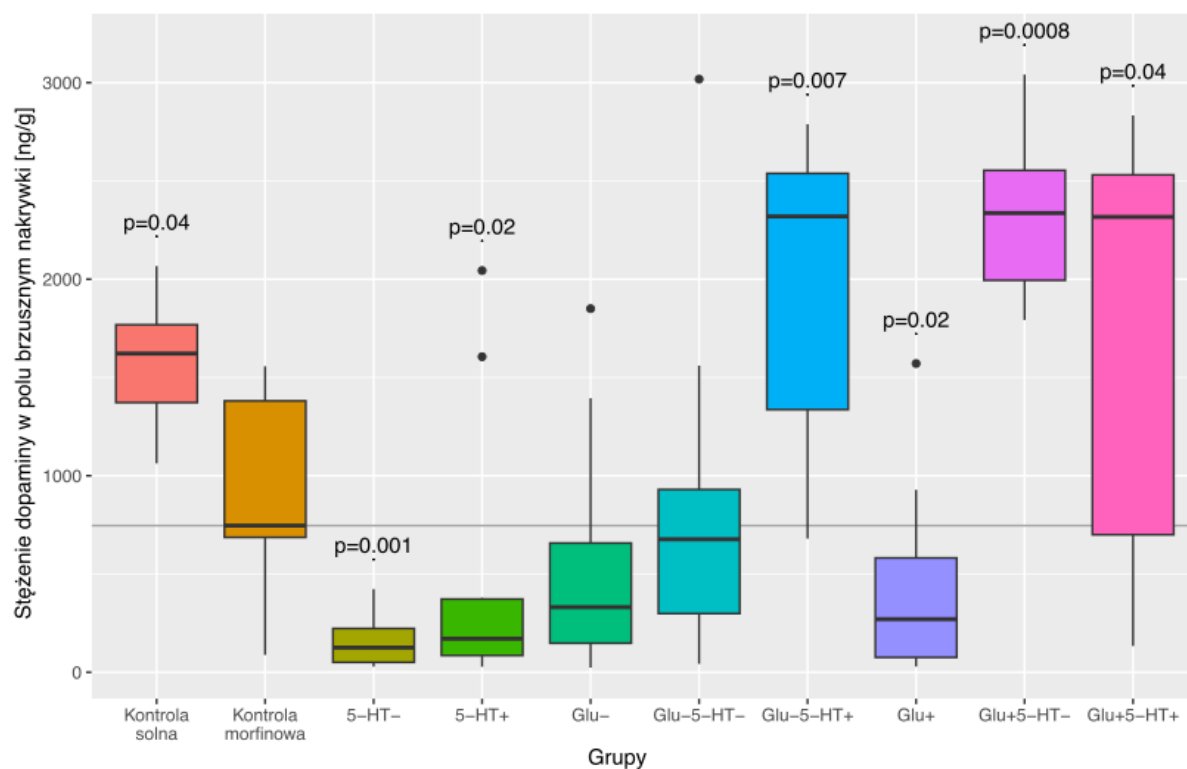
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie glicyny w polu brzusznej nakrywki między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W stosunku do grupy kontrolnej morfinowej w grupie "Glu+5-HT+" ( $p=0,01$ ) zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu glicyny w polu brzusznej nakrywki, natomiast wzrost w grupie "5-HT-" ( $p<0,05$ ).



**Rys. 46. Rozkłady stężenia sarkozyny w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Sarkozyna (rys. 46):**

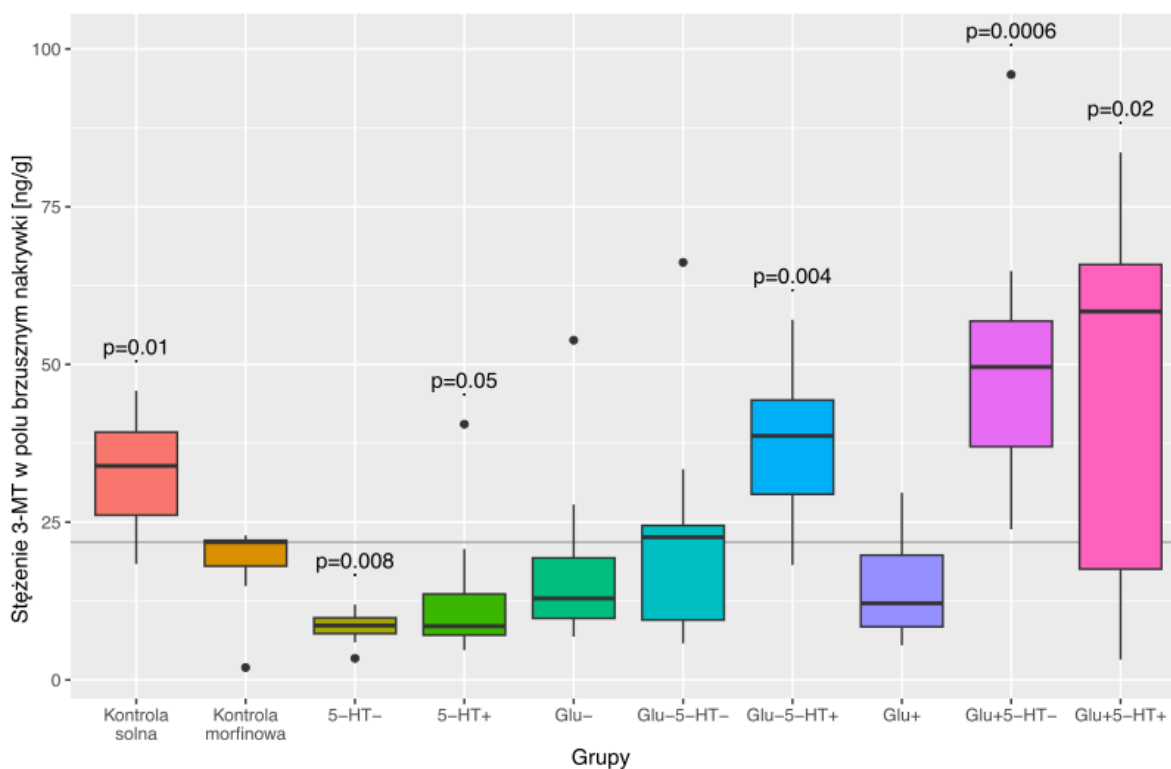
W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) wzrost poziomu sarkozyny w polu brzusznej nakrywki w grupie kontroli morfinowej. Istotny statystycznie spadek poziomu sarkozyny w polu brzusznej nakrywki w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w trzech grupach: "Glu-5-HT+" ( $p < 0,05$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,05$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p = 0,001$ ).



**Rys. 47. Rozkłady stężenia dopaminy w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Dopamina** (rys. 47):

Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) spadek poziomu dopaminy w polu brzusznej nakrywki w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W trzech grupach: "**5-HT-**" ( $p = 0,001$ ), "**5-HT+**" ( $p < 0,05$ ) i "**Glu+**" ( $p < 0,05$ ), zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu dopaminy w polu brzusznej nakrywki w stosunku do kontroli morfinowej. Natomiast, istotny statystycznie wzrost poziomu dopaminy w polu brzusznej nakrywki zaobserwowano w trzech grupach: "**Glu-5-HT+**" ( $p < 0,01$ ), "**Glu+5-HT-**" ( $p < 0,001$ ) i "**Glu+5-HT+**" ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej.

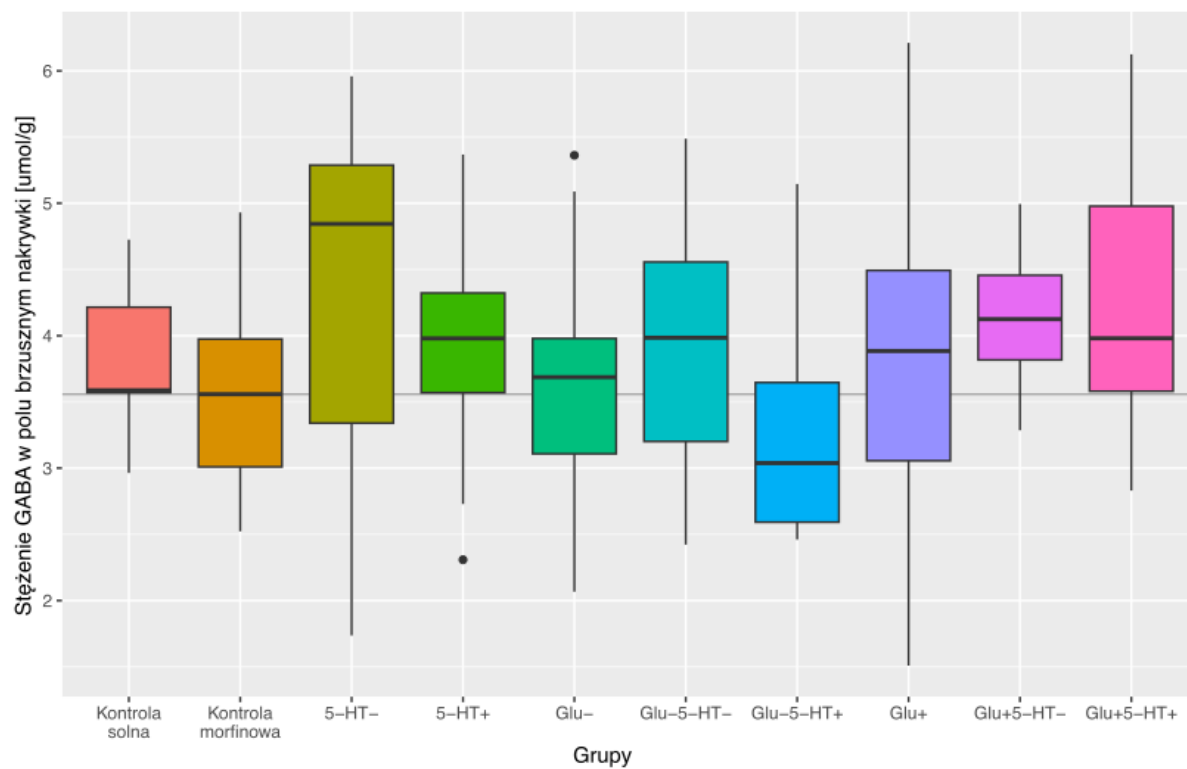


**Rys. 48. Rozkłady stężenia 3-MT w polu brzuszonym nakrywki w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **3-metoksytyramina (3-MT) (rys. 48):**

W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p=0,01$ ) spadek poziomu 3-MT w polu brzuszonym nakrywki w grupie kontroli morfinowej. W stosunku do kontroli morfinowej zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu 3-MT w polu brzuszonym nakrywki w dwóch grupach: "5-HT-" ( $p<0,01$ ) i "5-HT+" ( $p=0,05$ ), oraz wzrost w trzech grupach: "Glu-5-HT+" ( $p<0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p<0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p<0,05$ ).

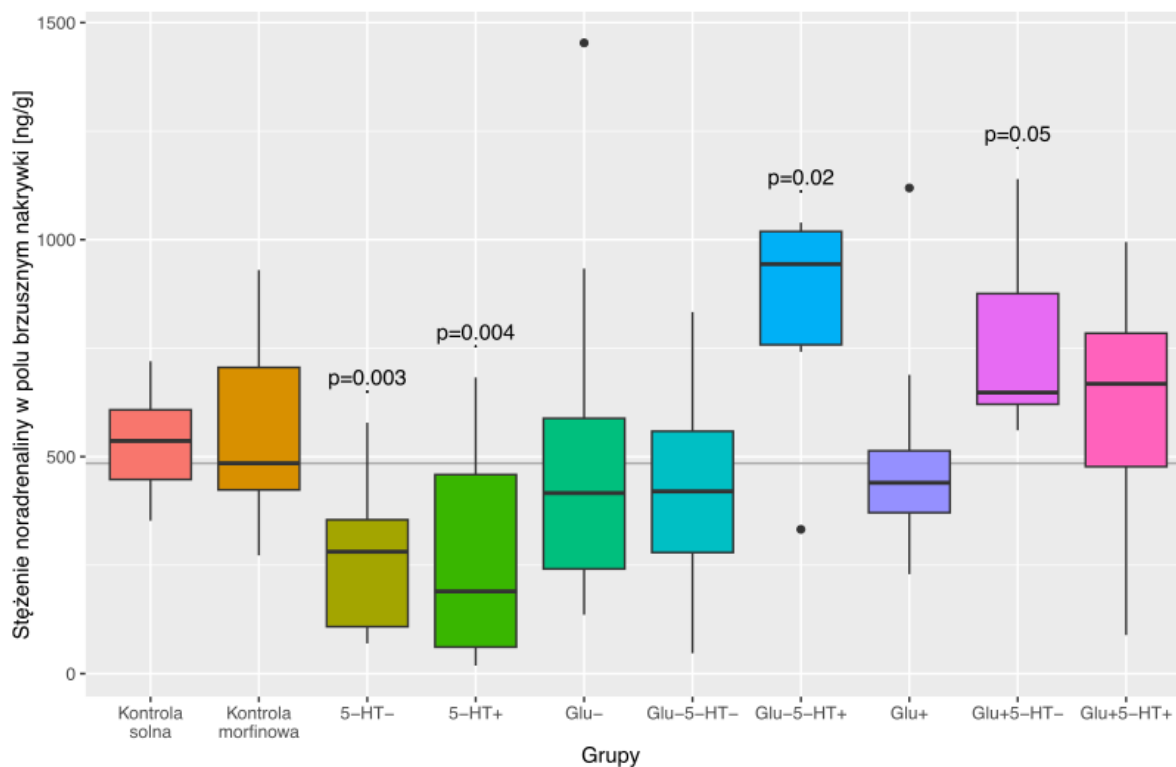




Rys. 49. Rozkłady stężenia GABA w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach.

**Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) (rys. 49):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie GABA w polu brzusznej nakrywki pomiędzy grupami.

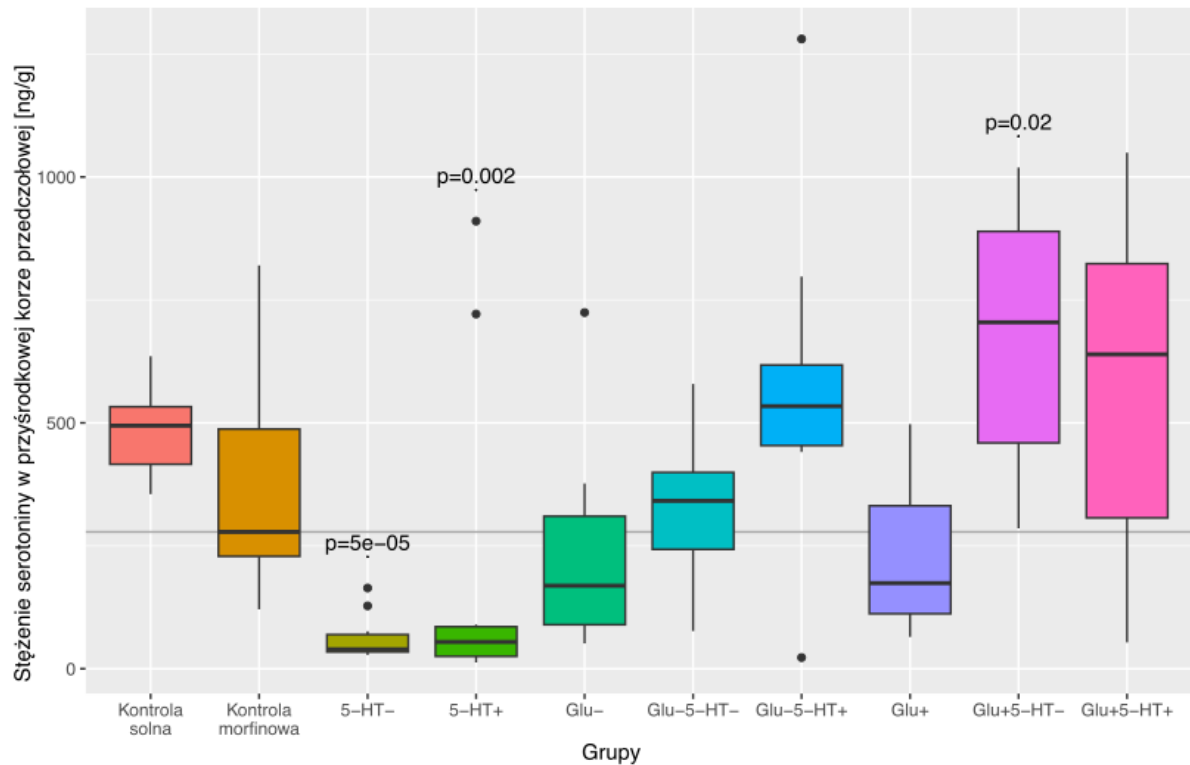


**Rys. 50. Rozkłady stężenia noradrenaliny w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

#### **Noradrenalina (rys. 50):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie noradrenaliny w polu brzusznej nakrywki pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W dwóch grupach: "**5-HT-**" ( $p < 0,01$ ) i "**5-HT+**" ( $p < 0,01$ ), zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu noradrenaliny w polu brzusznej nakrywki w stosunku do kontroli morfinowej. Natomiast istotny statystycznie wzrost poziomu noradrenaliny w polu brzusznej nakrywki w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w grupach "**Glu-5-HT+**" ( $p < 0,05$ ) i "**Glu+5-HT-**" ( $p = 0,05$ ).

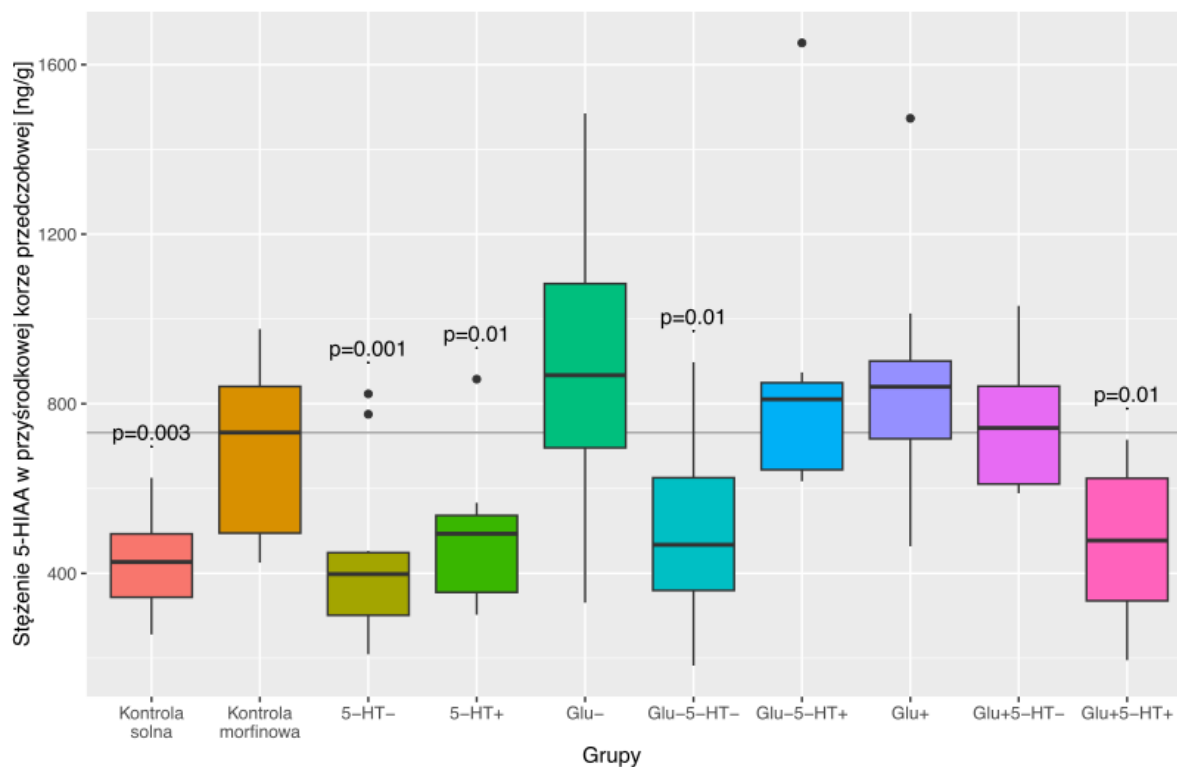
#### 4.3.5. Neurochemia przyśrodkowej kory przedczołowej



**Rys. 51. Rozkłady stężenia serotoniny w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Serotonina (rys. 51):**

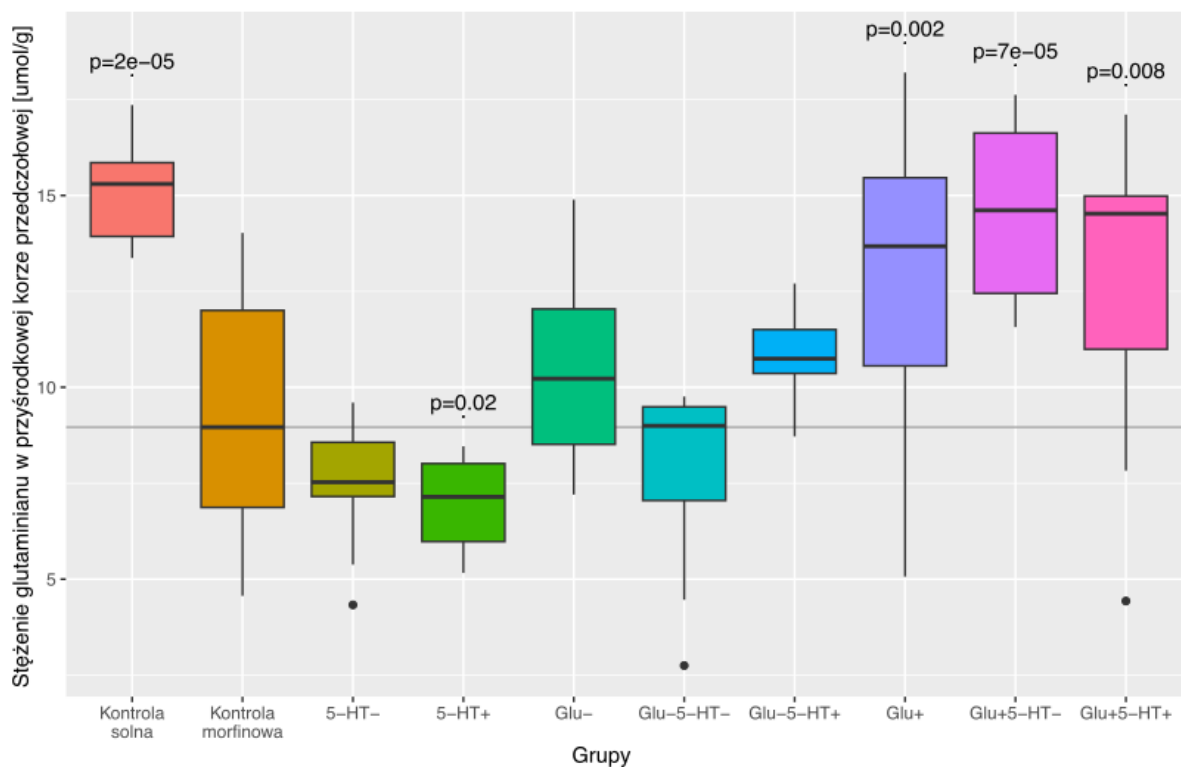
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie serotoniny w przyśrodkowej korze przedczołowej między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu serotoniny w przyśrodkowej korze przedczołowej w dwóch grupach: "**5-HT-**" ( $p < 0,001$ ) i "**5-HT+**" ( $p < 0,01$ ), natomiast wzrost w grupie "**Glu+5-HT-**" ( $p < 0,05$ ).



Rys. 52. Rozkłady stężenia kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### Kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA) (rys. 52):

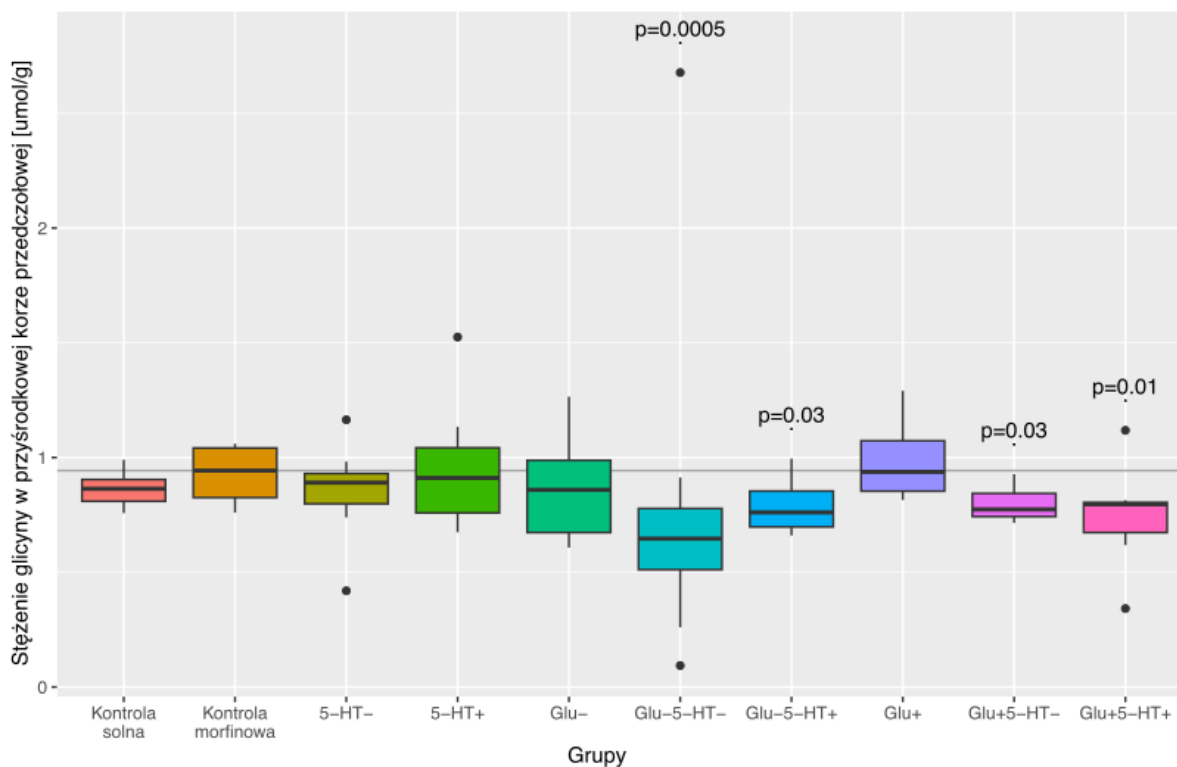
W grupie kontroli morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,01$ ) wzrost poziomu 5-HIAA w przyśrodkowej korze przedczołowej w porównaniu do kontroli solnej. Istotny statystycznie spadek poziomu 5-HIAA w przyśrodkowej korze przedczołowej w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w czterech grupach: "5-HT-" ( $p=0,001$ ), "5-HT+" ( $p=0,01$ ), "Glu-5-HT-" ( $p=0,01$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p=0,01$ ).



**Rys. 53. Rozkłady stężenia glutaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Glutaminian** (rys. 53):

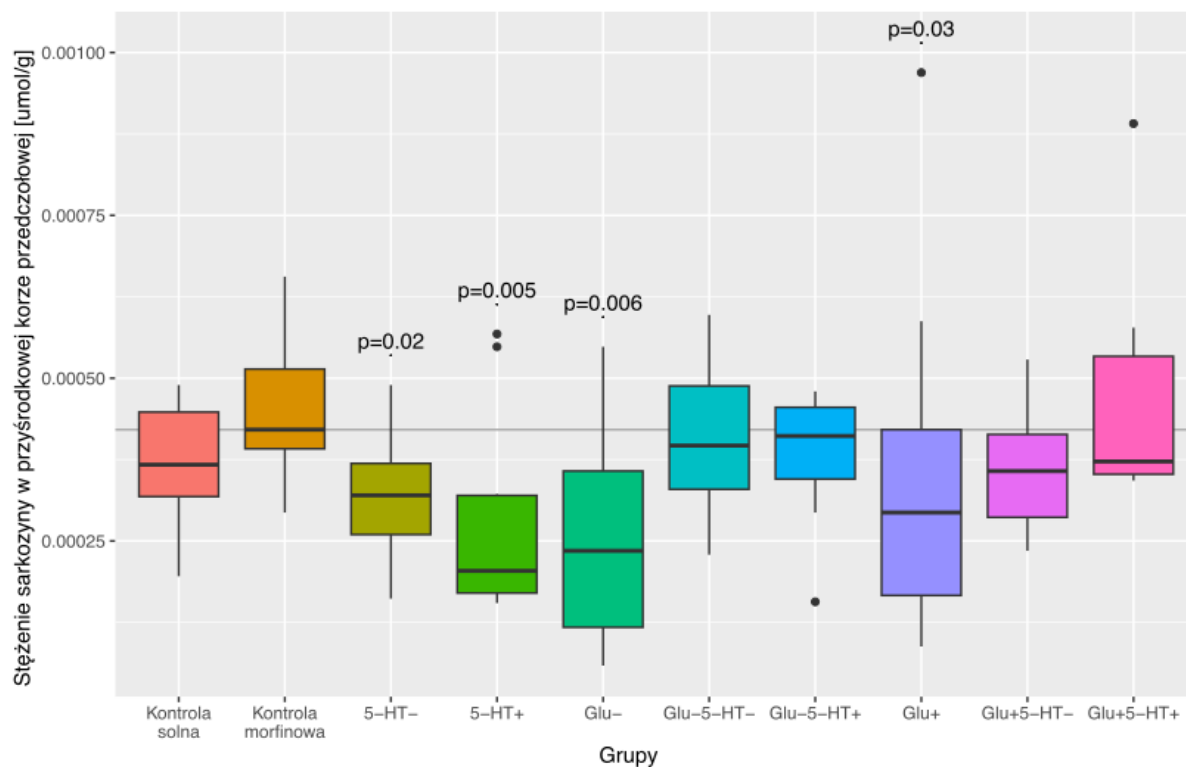
W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p<0,001$ ) spadek poziomu glutaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej w grupie kontroli morfinowej. W grupie "5-HT+" ( $p<0,05$ ) zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu glutaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej. Natomiast istotny statystycznie wzrost poziomu glutaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w trzech grupach: "Glu+" ( $p<0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p<0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p<0,01$ ).



**Rys. 54. Rozkłady stężenia glicyny w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Glicyna (rys. 54):**

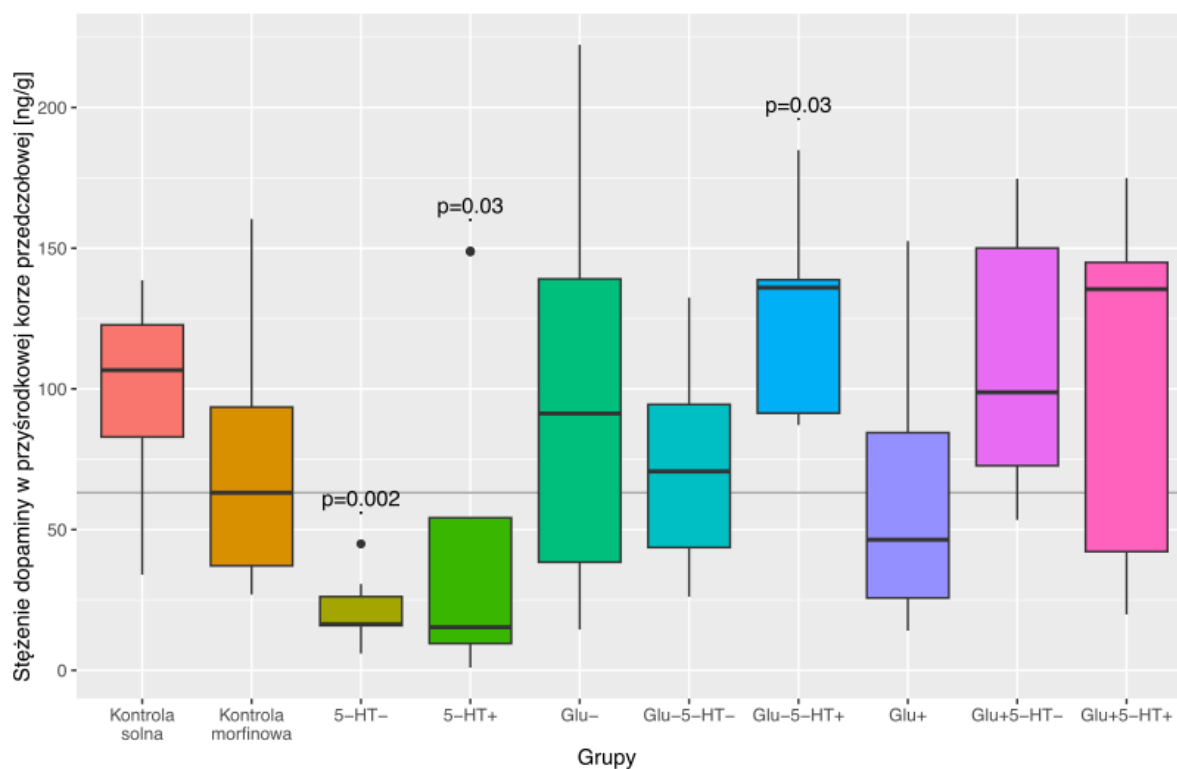
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie glicyny w przyśrodkowej korze przedczołowej pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu glicyny w przyśrodkowej korze przedczołowej w czterech grupach: "Glu-5-HT-" ( $p < 0,001$ ), "Glu-5-HT+" ( $p < 0,05$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,05$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p = 0,01$ ).



**Rys. 55. Rozkłady stężenia sarkozyny w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Sarkozyna (rys. 55):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie sarkozyny w przyśrodkowej korze przedczołowej między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. Istotnie statystyczny spadek poziomu sarkozyny w przyśrodkowej korze przedczołowej w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w czterech grupach: "5-HT-" ( $p < 0,05$ ), "5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu+" ( $p < 0,05$ ).

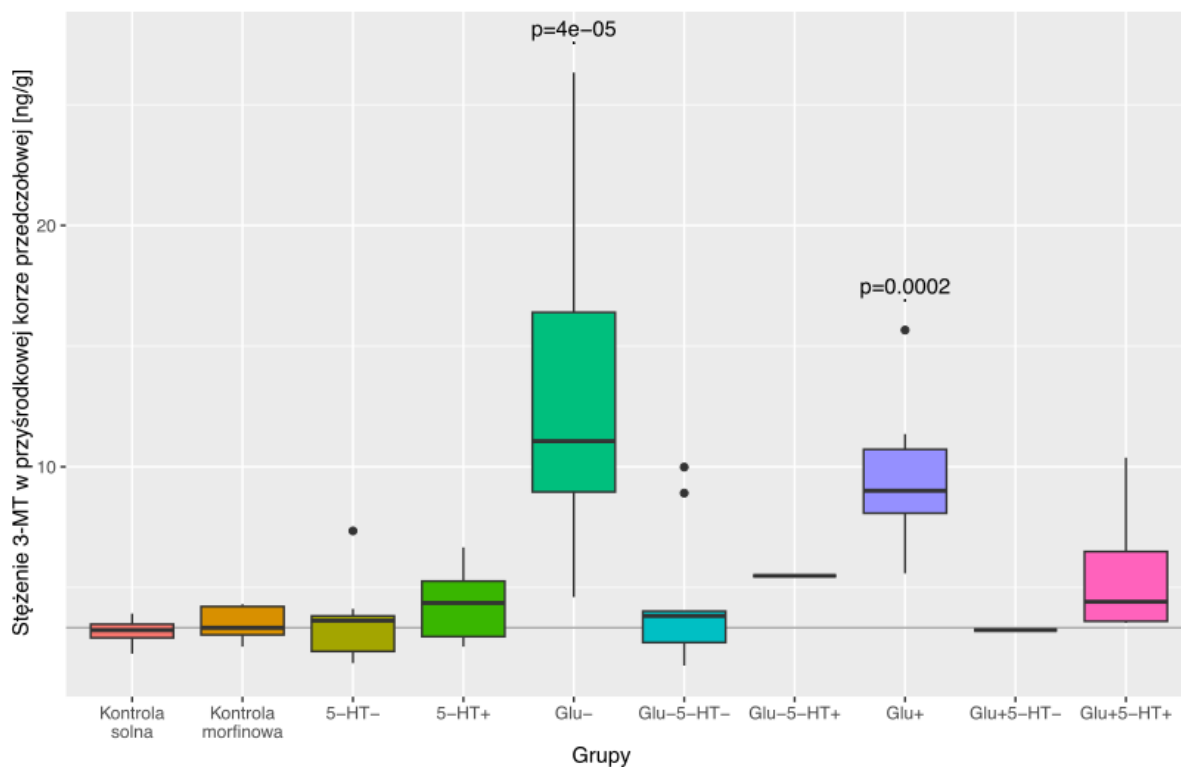


**Rys. 56. Rozkłady stężenia dopaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### Dopamina (rys. 56):

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie dopaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu dopaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej w dwóch grupach: "5-HT-" ( $p < 0,01$ ) i "5-HT+" ( $p < 0,05$ ), natomiast wzrost w grupie "Glu-5-HT+" ( $p < 0,05$ ).

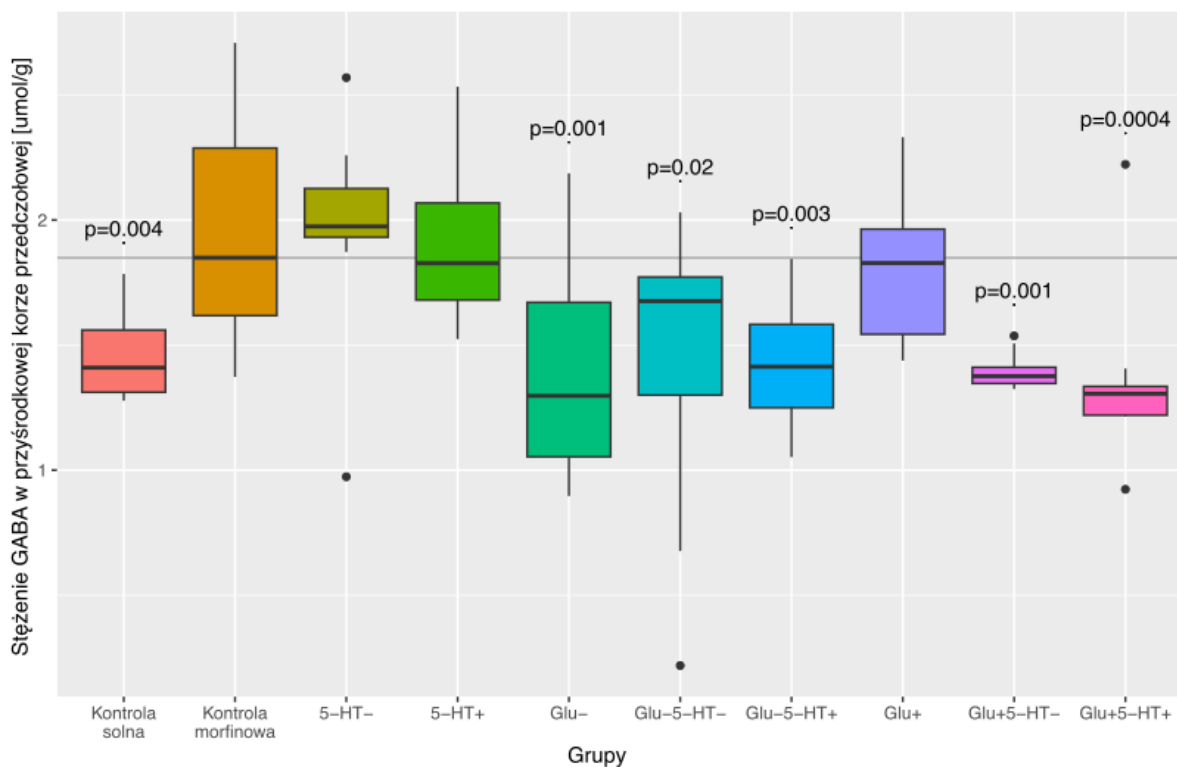




**Rys. 57. Rozkłady stężenia 3-MT w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

### **3-metoksytyramina (3-MT) (rys. 57):**

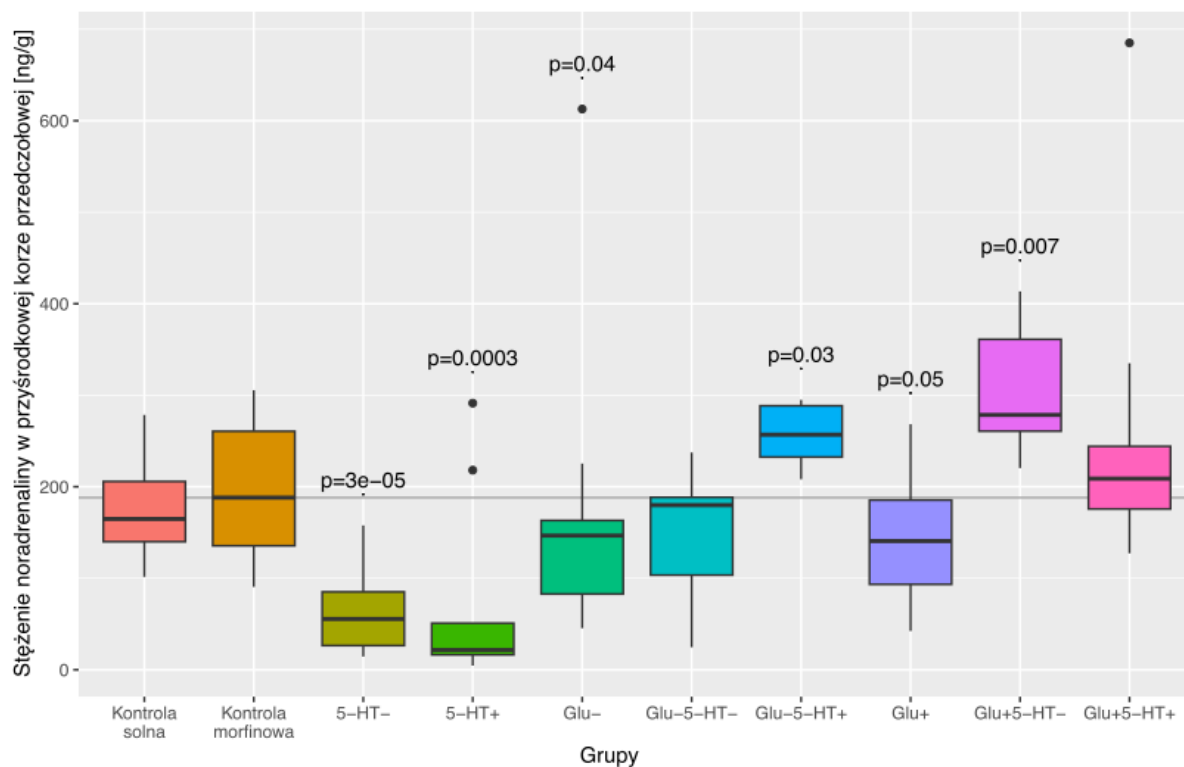
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 3-MT w przyśrodkowej korze przedczołowej między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W stosunku do kontroli morfinowej statystycznie istotny wzrost poziomu 3-MT w przyśrodkowej korze przedczołowej zaobserwowano w grupach "Glu-" ( $p < 0,001$ ) i "5-HT+" ( $p < 0,001$ ).



**Rys. 58. Rozkłady stężenia GABA w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

#### **Kwas $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) (rys. 58):**

Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,01$ ) wzrost poziomu GABA w przyśrodkowej korze przedczołowej w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu GABA w przyśrodkowej korze przedczołowej w czterech grupach: "Glu-" ( $p = 0,001$ ), "Glu-5-HT-" ( $p < 0,05$ ), "Glu-5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+5-HT-" ( $p = 0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p < 0,001$ ).

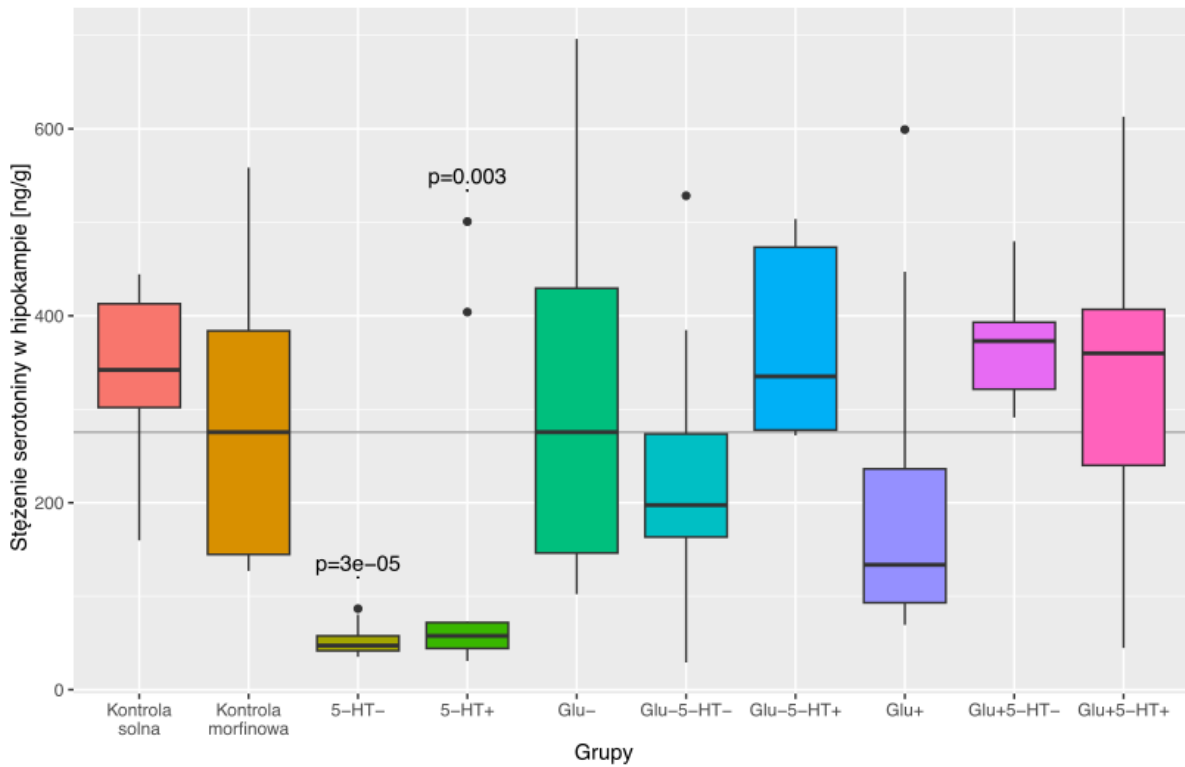


**Rys. 59. Rozkłady stężenia noradrenaliny w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### Noradrenalina (rys. 59):

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie noradrenaliny w przyśrodkowej korze przedczołowej pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do kontroli morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu noradrenaliny w przyśrodkowej korze przedczołowej w grupach: "5-HT-" ( $p<0,001$ ), "5-HT+" ( $p<0,001$ ) i "Glu+" ( $p=0,05$ ). Natomiast, istotny statystycznie wzrost poziomu noradrenaliny w przyśrodkowej korze przedczołowej w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w grupach: "Glu-5-HT+" ( $p<0,05$ ) i "Glu+5-HT-" ( $p<0,01$ ).

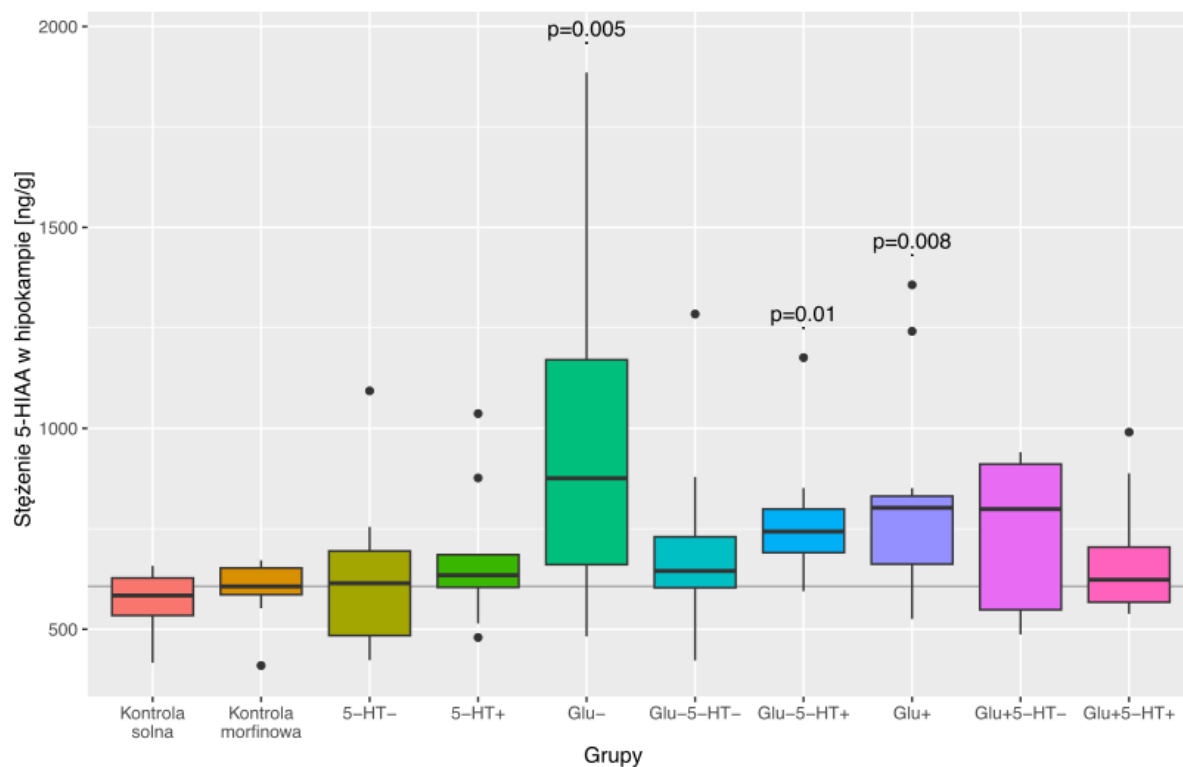
### 4.3.6. Neurochemia hipokampa



**Rys. 60. Rozkłady stężenia serotoniny w hipokampie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Serotonina (rys. 60):**

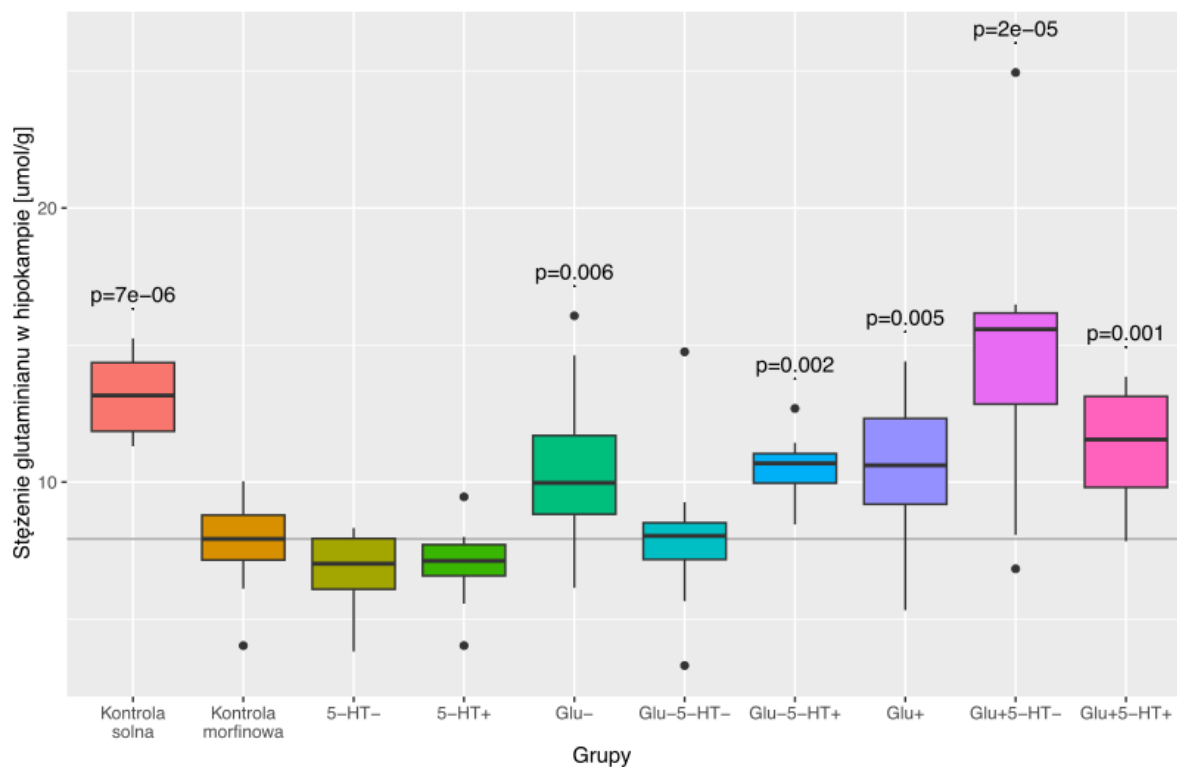
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie serotoniny w hipokampie między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu serotoniny w hipokampie w dwóch grupach: "5-HT-" ( $p < 0,001$ ), "5-HT+" ( $p < 0,01$ ).



**Rys. 61. Rozkłady stężenia kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w hipokampie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA) (rys. 61):**

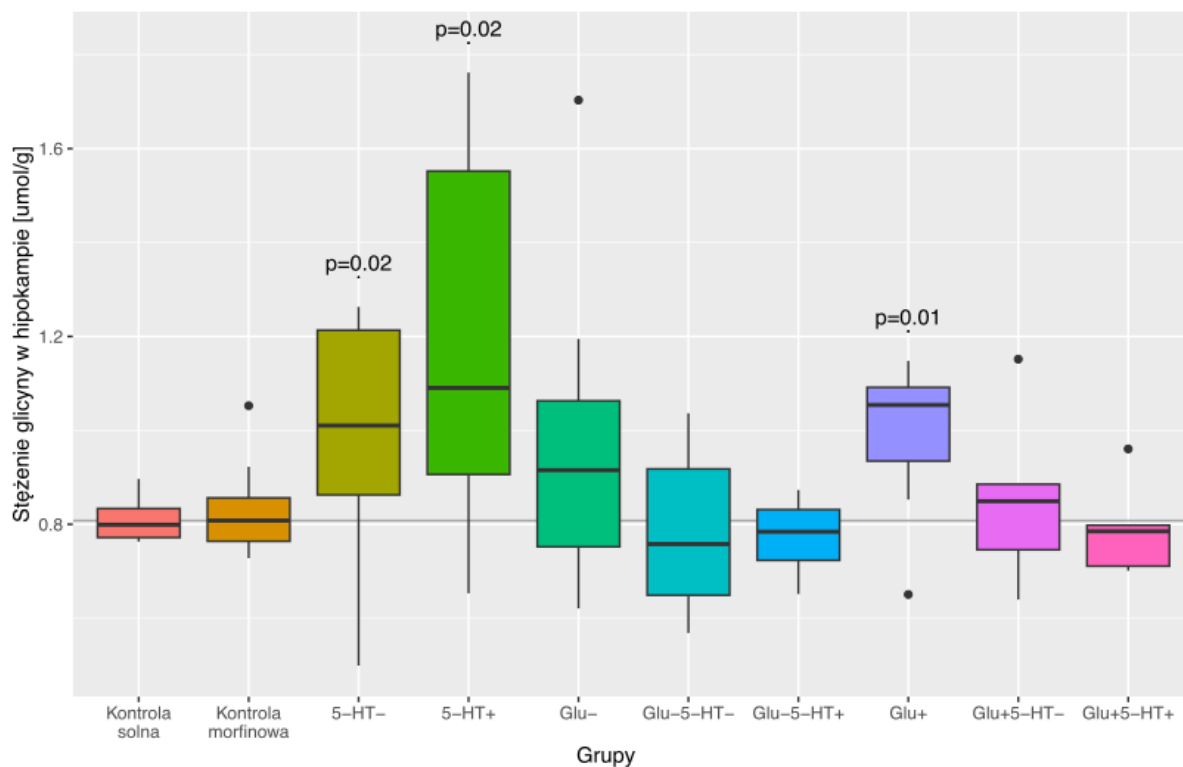
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 5-HIAA w hipokampie pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W trzech grupach: "Glu-" ( $p < 0,01$ ), "Glu-5-HT+" ( $p = 0,01$ ) i "Glu+" ( $p < 0,01$ ), zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost poziomu 5-HIAA w hipokampie w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej.



**Rys. 62. Rozkłady stężenia glutaminianu w hipokampie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Glutaminian** (rys. 62):

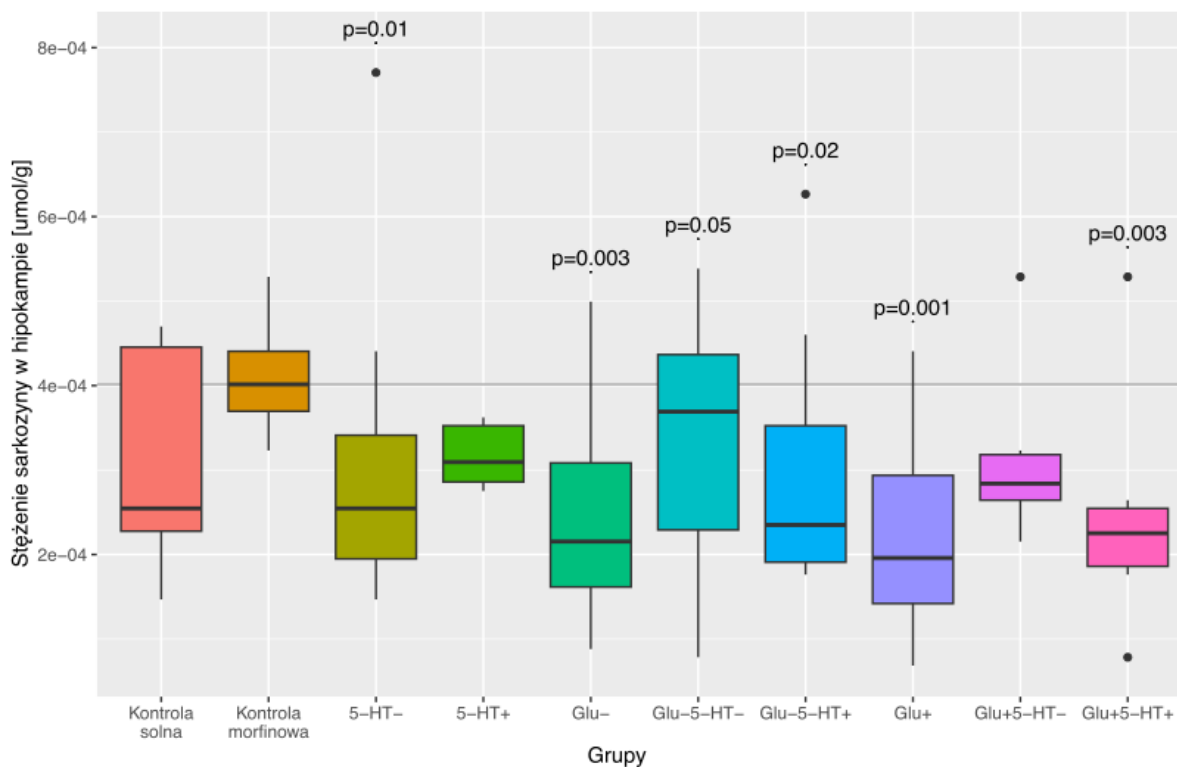
Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,001$ ) spadek poziomu glutaminianu w hipokampie w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W stosunku do grupy kontrolnej morfinowej istotny statystycznie wzrost poziomu glutaminianu w hipokampie zaobserwowano w pięciu grupach: "Glu-" ( $p < 0,01$ ), "Glu-5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+" ( $p < 0,01$ ), "**Glu+5-HT-**" ( $p < 0,001$ ) i "**Glu+5-HT+**" ( $p = 0,001$ ).



**Rys. 63. Rozkłady stężenia glicyny w hipokampie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Glicyna (rys. 63):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie glicyny w hipokampie między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej istotny statystycznie spadek poziomu glicyny w hipokampie zaobserwowano w trzech grupach: "5-HT-" ( $p < 0,05$ ), "5-HT+" ( $p < 0,05$ ) i "Glu+" ( $p = 0,01$ ).

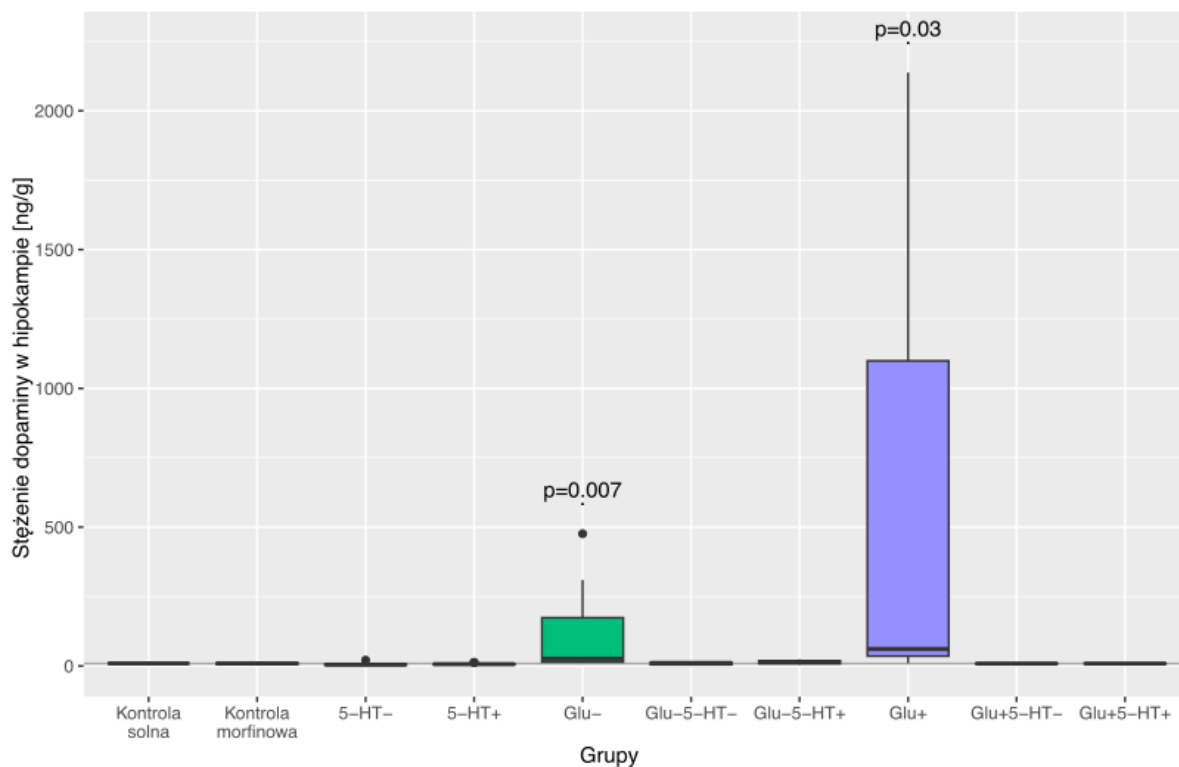


**Rys. 64. Rozkłady stężenia sarkozyny w hipokampie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Sarkozyna (rys. 64):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie sarkozyny w hipokampie pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W stosunku do kontroli morfinowej istotny statystycznie spadek poziomu sarkozyny w hipokampie zaobserwowano w sześciu grupach: "**5-HT-**" ( $p=0,01$ ), "**Glu-**" ( $p<0,01$ ), "**Glu-5-HT-**" ( $p=0,05$ ), "**Glu-5-HT+**" ( $p<0,05$ ), "**Glu+**" ( $p=0,001$ ) i "**Glu+5-HT+**" ( $p<0,01$ ).

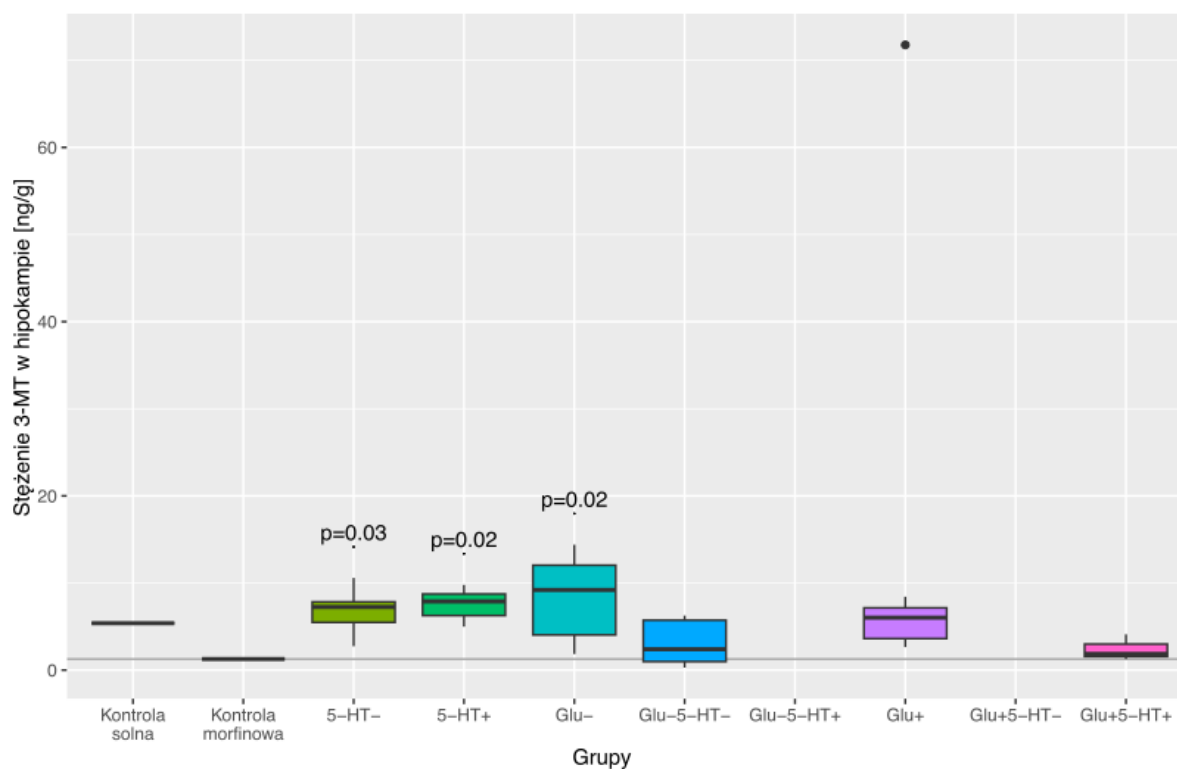




**Rys. 65. Rozkłady stężenia dopaminy w hipokampie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Dopamina (rys. 65):**

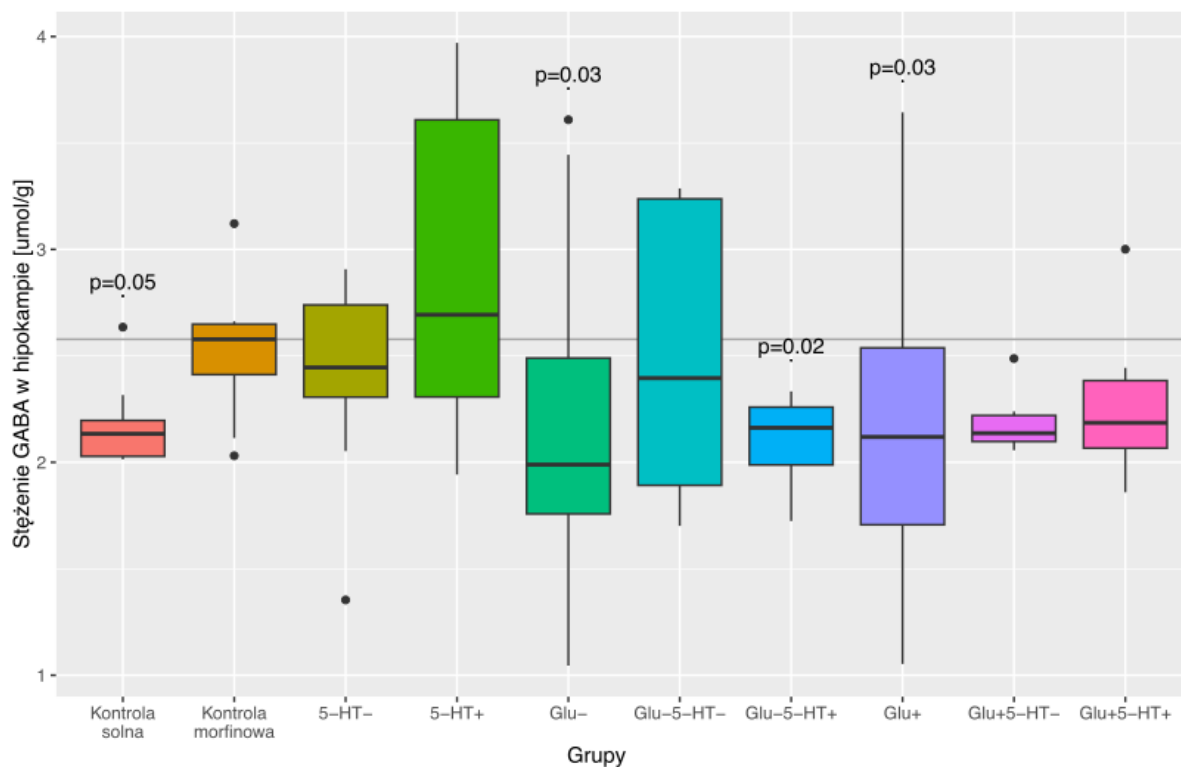
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie dopaminy w hipokampie między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej istotny statystycznie wzrost poziomu dopaminy w hipokampie zaobserwowano w dwóch grupach: "Glu-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu+" ( $p < 0,05$ ).



**Rys. 66. Rozkłady stężenia 3-MT w hipokampie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **3-metoksytyramina (3-MT) (rys. 66):**

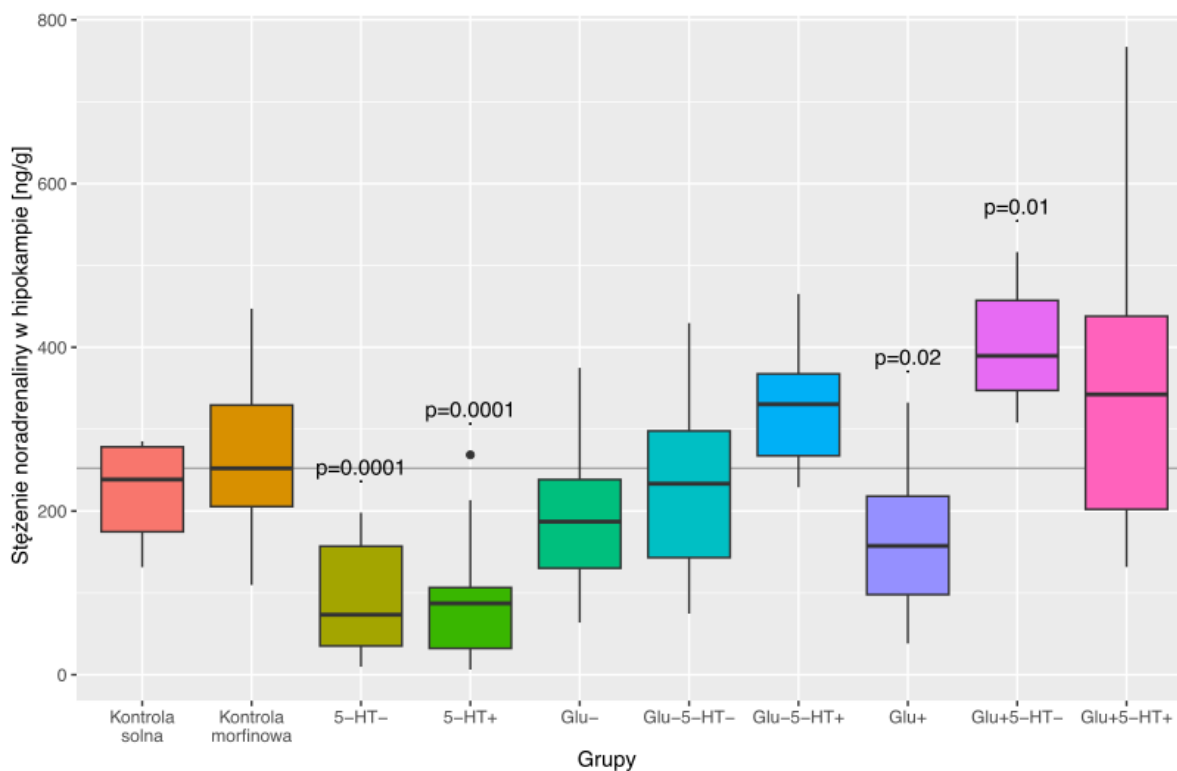
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 3-MT w hipokampie pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W stosunku do kontroli morfinowej istotny statystycznie wzrost poziomu 3-MT w hipokampie zaobserwowano w trzech grupach: "5-HT-" ( $p < 0,05$ ), "5-HT+" ( $p < 0,05$ ) i "Glu-" ( $p < 0,05$ ).



**Rys. 67. Rozkłady stężenia GABA w hipokampie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) (rys. 67):**

W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p=0,05$ ) wzrost poziomu GABA w hipokampie w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej istotny statystycznie spadek poziomu GABA w hipokampie zaobserwowano w trzech grupach: "Glu-" ( $p<0,05$ ), "Glu-5-HT+" ( $p<0,05$ ) i "Glu+" ( $p<0,05$ ).

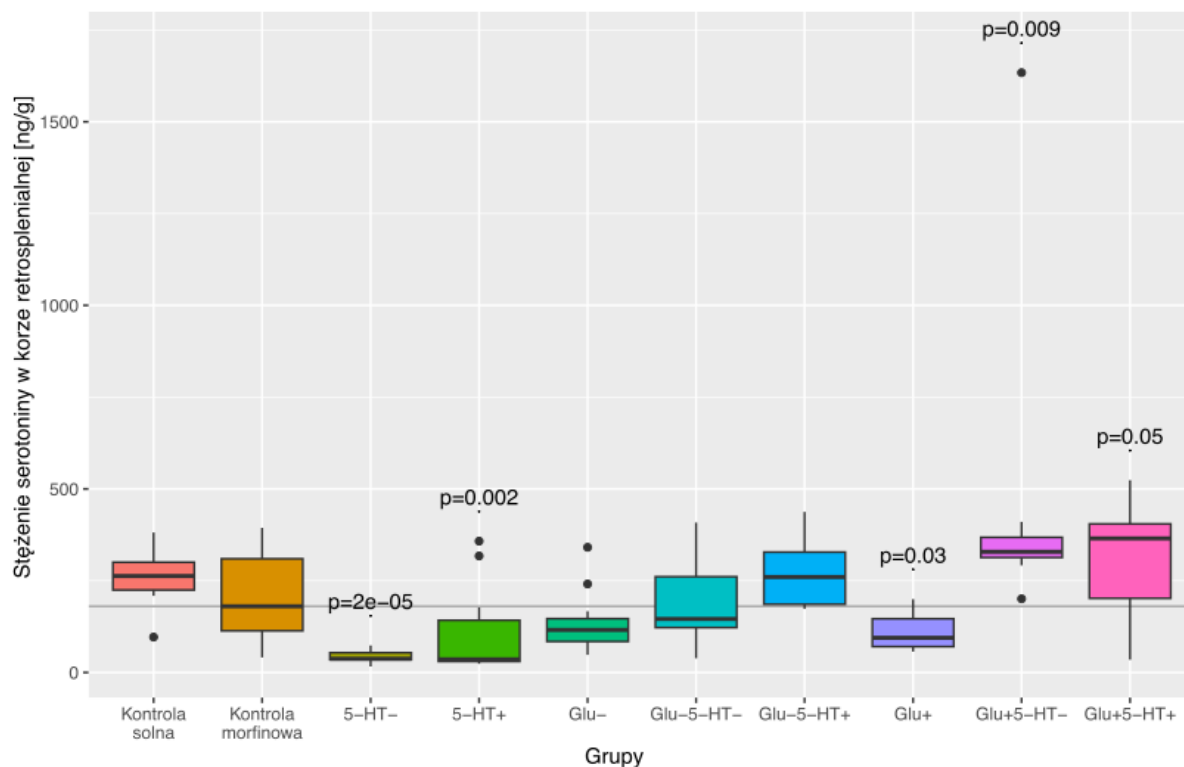


**Rys. 68. Rozkłady stężenia noradrenaliny w hipokampie w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Noradrenalina (rys. 68):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie noradrenaliny w hipokampie między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej istotny statystycznie spadek poziomu noradrenaliny w hipokampie zaobserwowano w trzech grupach: "**5-HT-**" ( $p < 0,001$ ), "**5-HT+**" ( $p < 0,001$ ) i "**Glu+**" ( $p < 0,05$ ). Natomiast w grupie "**Glu+5-HT-**" ( $p = 0,01$ ) zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu noradrenaliny w hipokampie w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej.

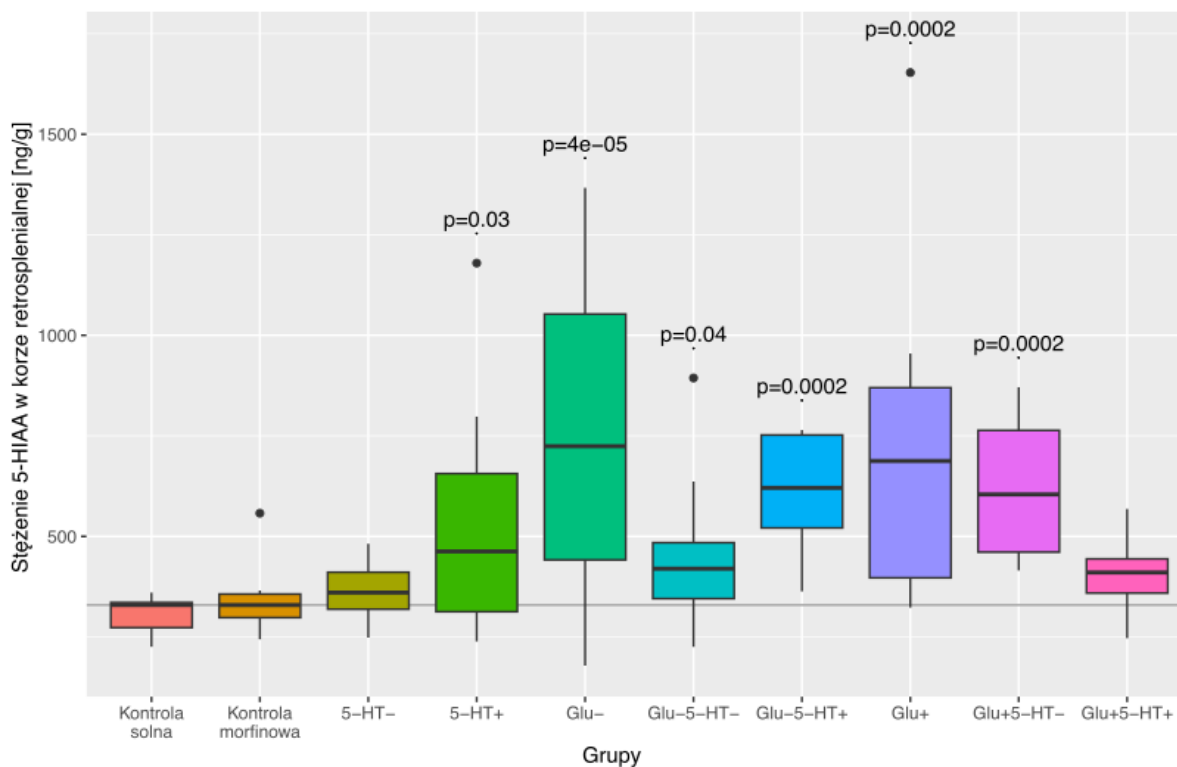
#### 4.3.7. Neurochemia kory retrosplenialnej



**Rys. 69.** Rozkłady stężenia serotoniny w korze retrosplenialnej w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### Serotonina (rys. 69):

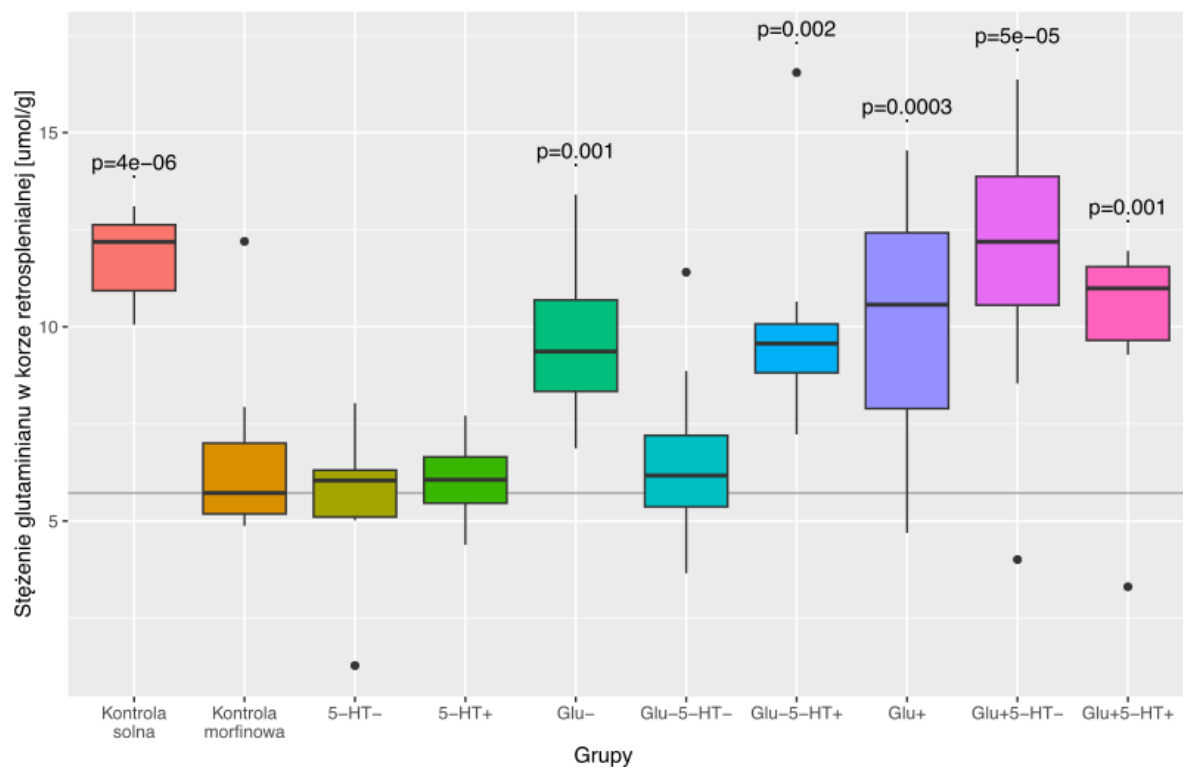
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie serotoniny w korze retrosplenialnej pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu serotoniny w korze retrosplenialnej w trzech grupach: "5-HT-" ( $p<0,001$ ), "5-HT+" ( $p<0,01$ ) i "Glu+" ( $p<0,05$ ), natomiast wzrost w grupach: "Glu+5-HT-" ( $p<0,01$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p=0,05$ ).



**Rys. 70. Rozkłady stężenia kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w korze retrosplenia w badanych grupach. Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

### **Kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA) (rys. 70):**

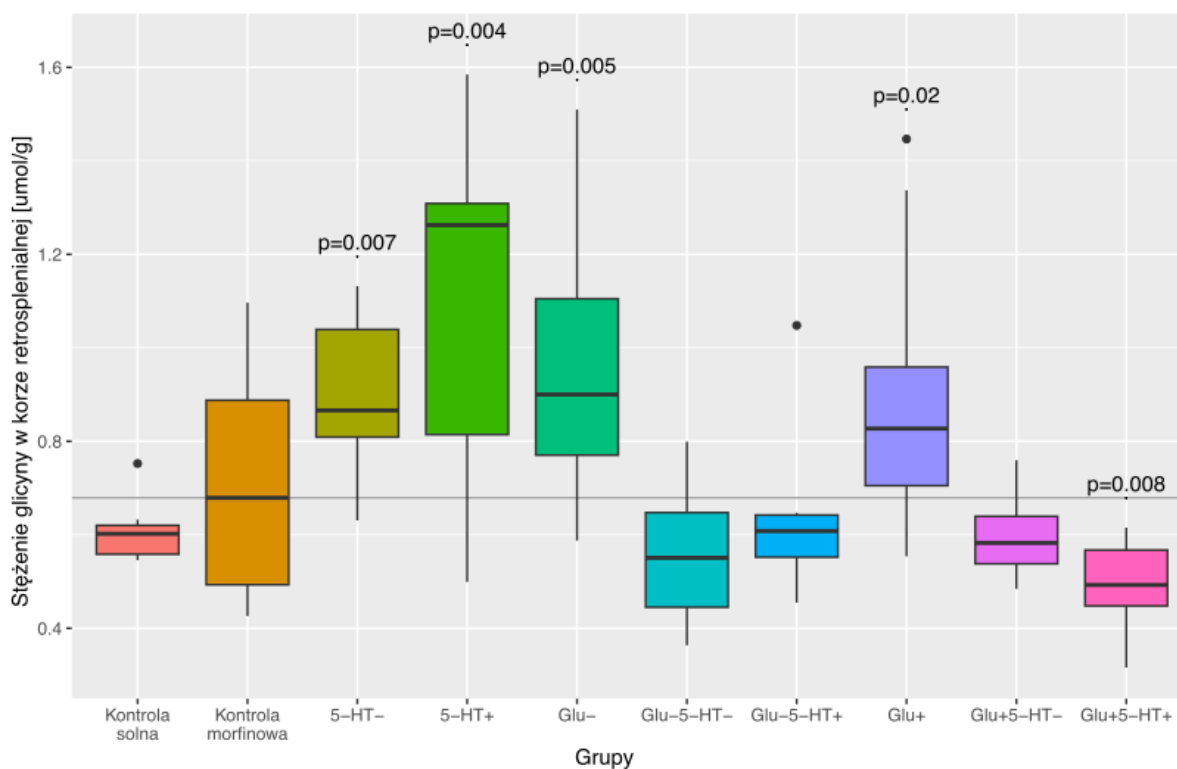
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 5-HIAA w korze retrosplenia między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. Istotnie statystyczny wzrost poziomu 5-HIAA w korze retrosplenia w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w sześciu grupach: "5-HT+" ( $p < 0,05$ ), "Glu-" ( $p < 0,001$ ), "Glu-5-HT-" ( $p < 0,05$ ), "Glu-5-HT+" ( $p < 0,001$ ) i "Glu+5-HT-" ( $p < 0,001$ ).



**Rys. 71. Rozkłady stężenia glutaminy w korze retrosplenialnej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Glutaminian** (rys. 71):

Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,001$ ) spadek poziomu glutaminy w korze retrosplenialnej w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu glutaminy w korze retrosplenialnej w grupach: "Glu-" ( $p=0,001$ ), "Glu-5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+" ( $p < 0,001$ ), "Glu+5-HT-" ( $p < 0,001$ ) i "Glu+5-HT+" ( $p=0,001$ ).

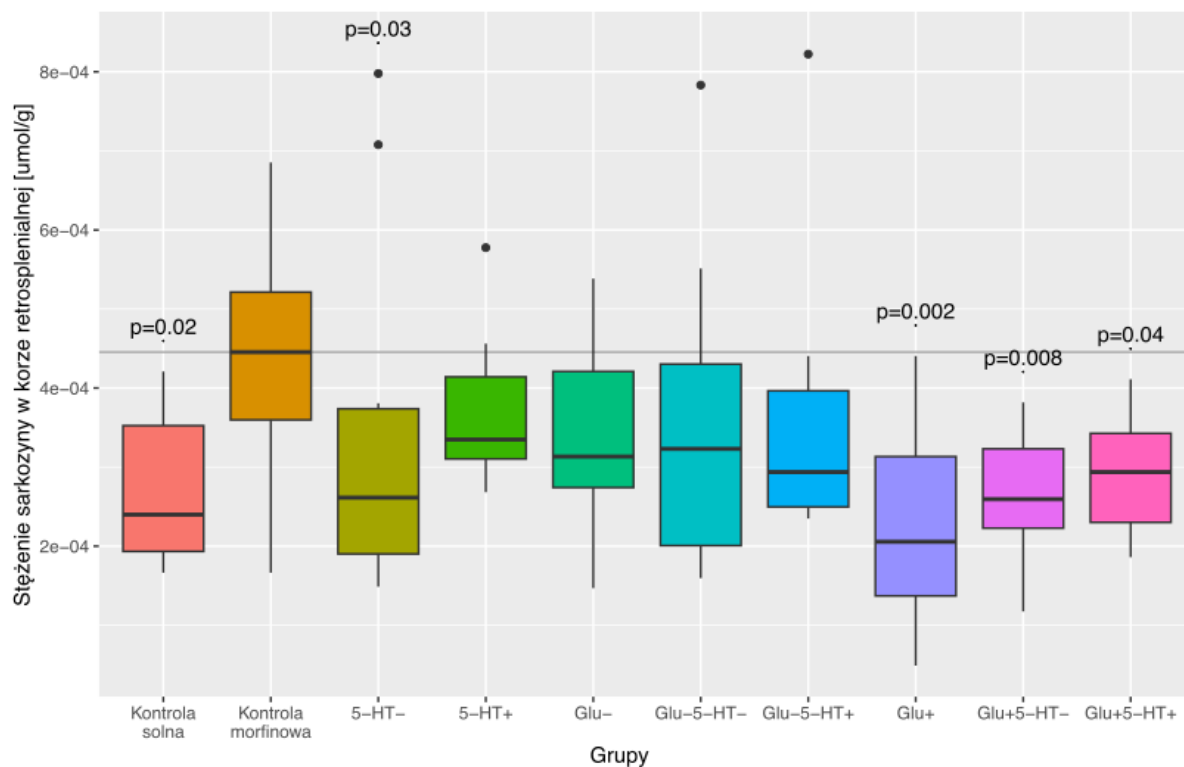


**Rys. 72. Rozkłady stężenia glicyny w korze retrosplenialnej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Glicyna (rys. 72):**

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie glicyny w korze retrosplenialnej pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W stosunku do kontroli morfinowej grupie "**Glu+5-HT+**" ( $p < 0,01$ ) zaobserwowano statystycznie istotny spadek poziomu glicyny w korze retrosplenialnej. Natomiast, w czterech grupach: "**5-HT-**" ( $p < 0,01$ ), "**5-HT+**" ( $p < 0,01$ ), "**Glu-**" ( $p < 0,01$ ) i "**Glu+**" ( $p < 0,05$ ), zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu glicyny w korze retrosplenialnej w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej.

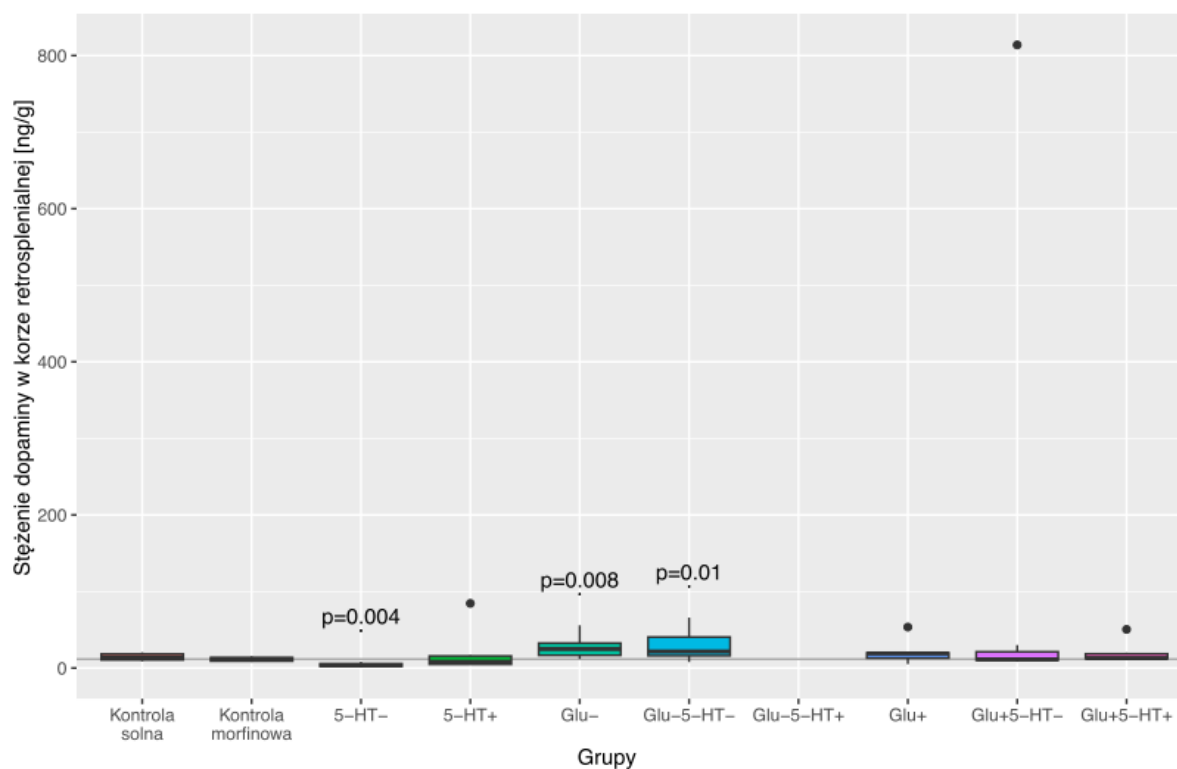




**Rys. 73. Rozkłady stężenia sarkozyny w korze retrosplenia w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

**Sarkozyna (rys. 73):**

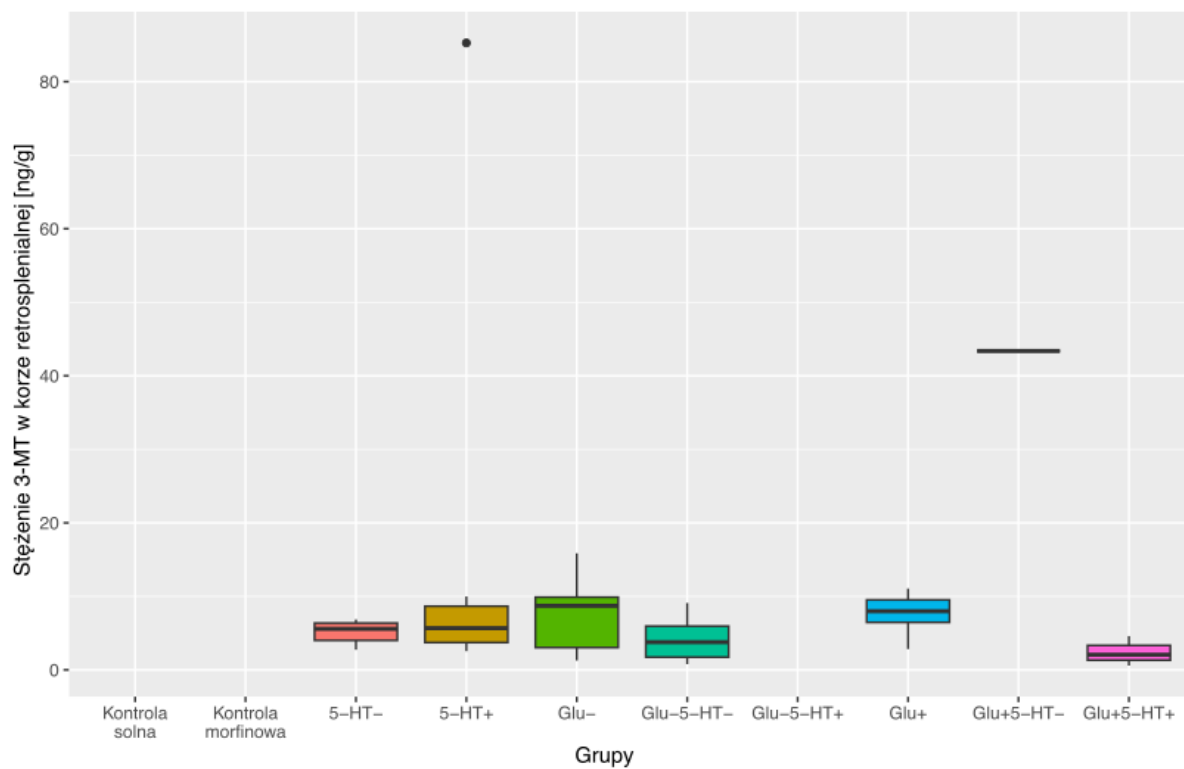
W porównaniu do kontroli solnej zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) wzrost poziomu sarkozyny w korze retrosplenia w grupie kontroli morfinowej. W stosunku do kontroli morfinowej istotny statystycznie spadek poziomu sarkozyny w korze retrosplenia zaobserwowano w czterech grupach: **"5-HT-"** ( $p < 0,05$ ), **"Glu+"** ( $p < 0,01$ ), **"Glu+5-HT-"** ( $p = 0,008$ ) i **"Glu+5-HT+"** ( $p < 0,05$ ).



**Rys. 74. Rozkłady stężenia dopaminy w korze retrosplenia w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

### **Dopamina (rys. 74):**

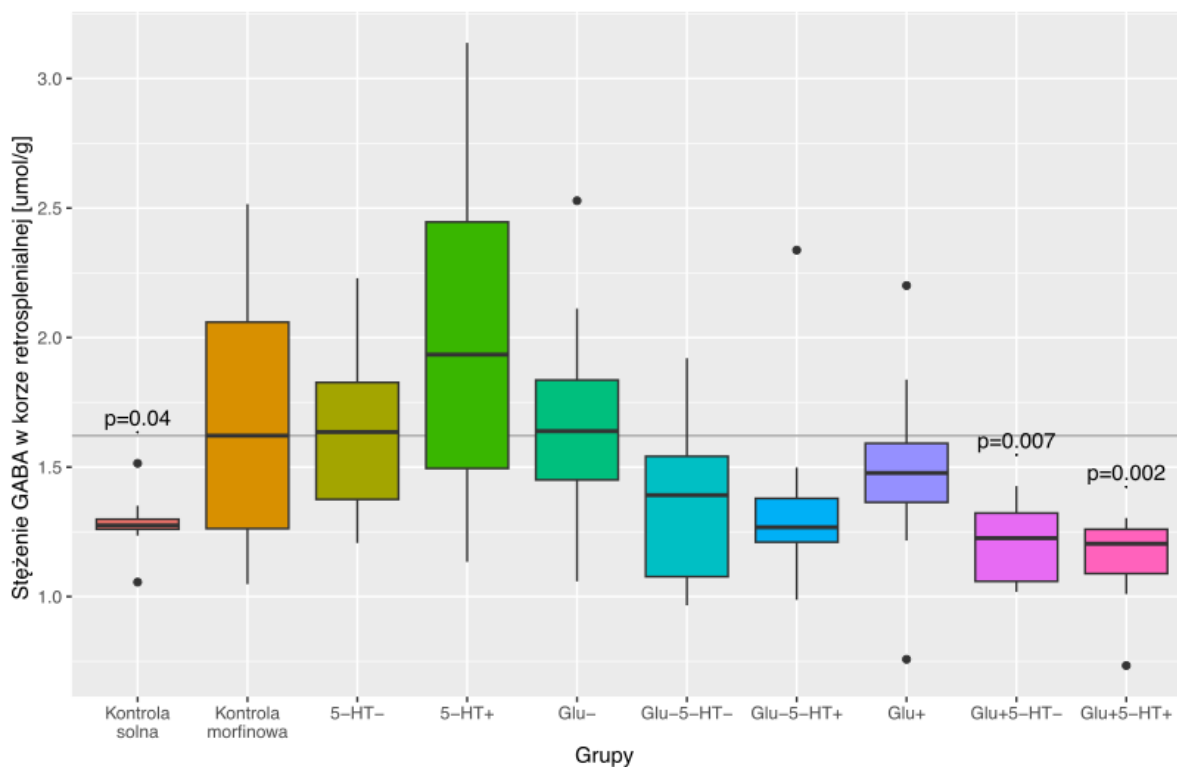
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie dopaminy w korze retrosplenia między grupą kontroli morfinowej i grupą kontroli solnej. W porównaniu do kontroli morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu dopaminy w korze retrosplenia w grupie "5-HT-" ( $p < 0,01$ ), natomiast wzrost w grupach "Glu-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu-5-HT-" ( $p = 0,01$ ).



Rys. 75. Rozkłady stężenia 3-MT w korze retrosplenialnej w badanych grupach.

**3-metoksytyramina (3-MT) (rys. 75):**

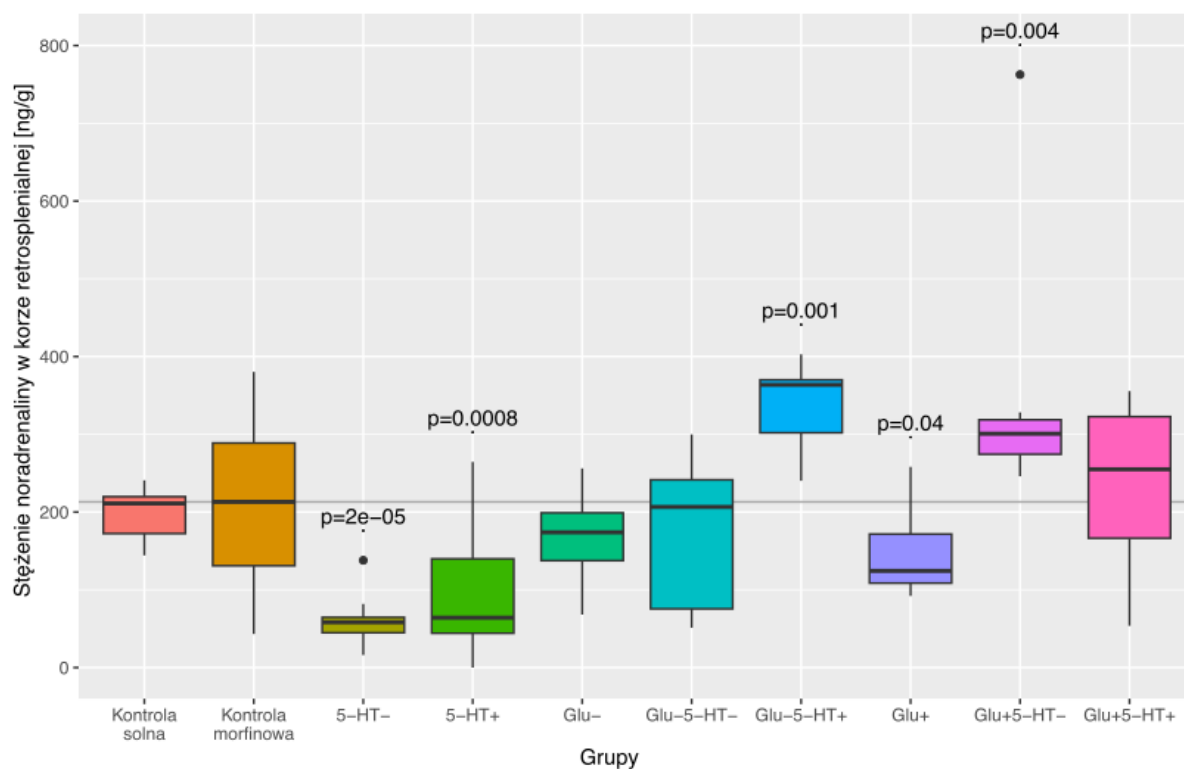
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie 3-MT w korze retrosplenialnej pomiędzy grupami.



**Rys. 76. Rozkłady stężenia GABA w korze retrosplenialnej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### **Kwas $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) (rys. 76):**

Zaobserwowano istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) wzrost poziomu GABA w korze retrosplenialnej w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej. W stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu GABA w korze retrosplenialnej w dwóch grupach "**Glu+5-HT-**" ( $p < 0,01$ ) i "**Glu+5-HT+**" ( $p < 0,01$ ).

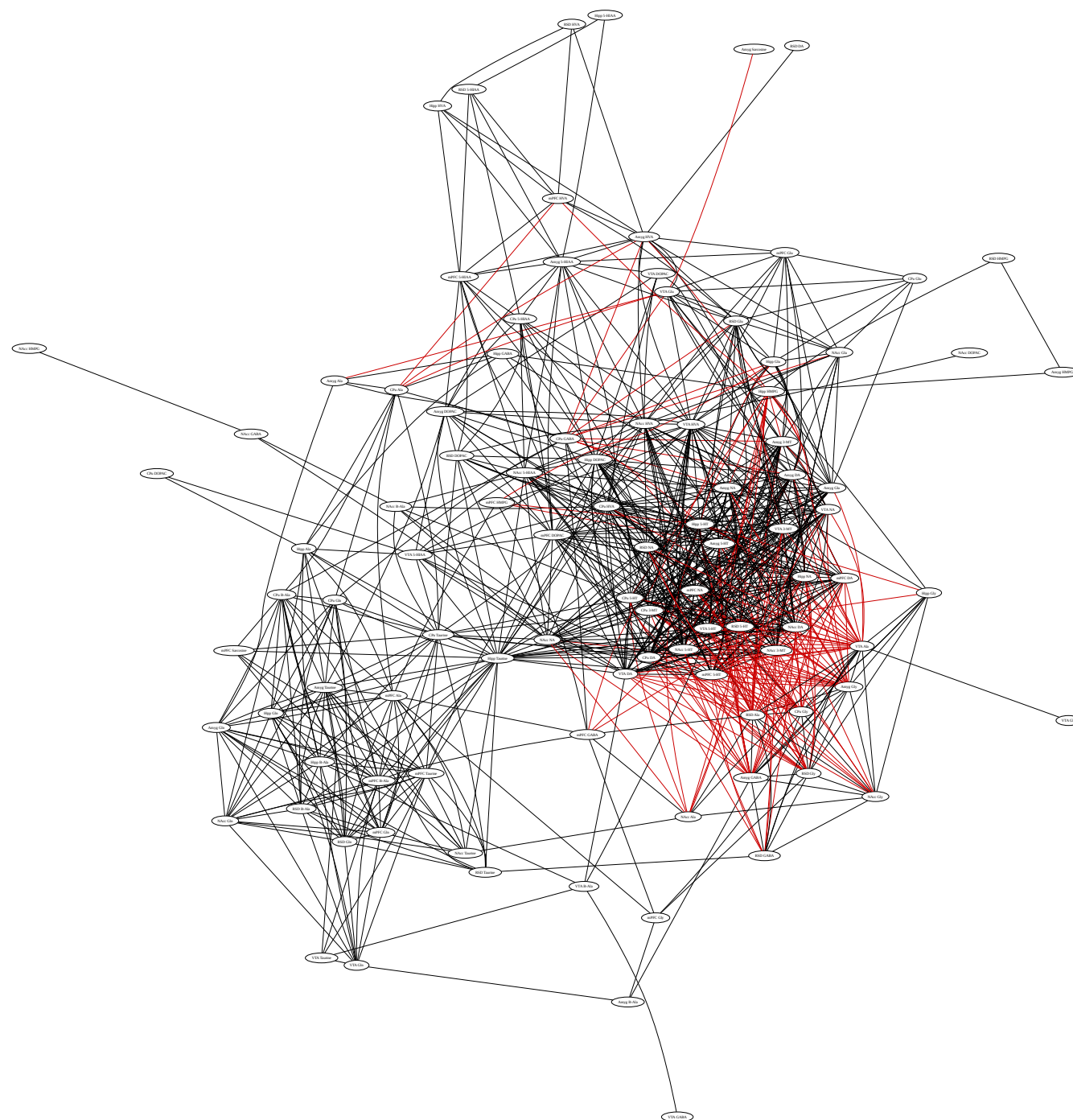


**Rys. 77. Rozkłady stężenia noradrenaliny w korze retrosplenialnej w badanych grupach.** Podano "wartości p" dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

#### Noradrenalina (rys. 77):

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomie noradrenaliny w korze retrosplenialnej pomiędzy grupami kontroli morfinowej i kontroli solnej. W porównaniu do kontroli morfinowej zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu noradrenaliny w korze retrosplenialnej w trzech grupach: "5-HT-" ( $p<0,001$ ), "5-HT+" ( $p<0,001$ ) i "Glu+" ( $p<0,05$ ), natomiast wzrost w grupach: "Glu-5-HT+" ( $p=0,001$ ) i "Glu+5-HT-" ( $p<0,01$ ).

#### 4.3.8. Analiza korelacji neuroprzekaźników w badanych strukturach



Rys. 78. Graf korelacji neurochemicznych istotnych na poziomie  $p=0,01$ . Czerwone linie ilustrują negatywne korelacje, natomiast czarne - korelacje pozytywne.

Na rysunku 78 przedstawiono graf korelacji neurochemicznych wszystkich analizowanych monoamin i ich metabolitów, neuromodulatorów i aminokwasów w badanych strukturach. Graf przedstawia wyłącznie korelacje istotne na poziomie  $p=0,01$ , czerwone linie ilustrują korelacje negatywne, natomiast czarne to korelacje pozytywne.





## 5. Dyskusja

Głównym celem niniejszej rozprawy było zbadanie roli ko-transmisji serotonergicznej i glutaminergicznej w ciele migdałowatym, poprzez jej chemogenetyczną dekompozycję, w kontekście zachowań związanych z inkubacją głodu narkotykowego. Zastosowano klasyczny model zwierzęcy warunkowania miejsca oraz techniki chemogenetyczne, aby przeanalizować wpływ modulacji aktywności neuronów ciała migdałowatego na liczbę emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych (USV) oraz przebyty dystans podczas testu odpowiedzi kontekstowej. Dodatkowo zbadano wpływ tych modyfikacji na poziomy monoamin i ich metabolitów, aminokwasów i neuromodulatorów w wybranych strukturach mózgu oraz zależności między układami neurochemicznymi, a także ich związek ze zmianami behawioralnymi.

Hipoteza dotycząca roli ko-transmisji serotonergicznej i glutaminergicznej w ciele migdałowatym postawiono w oparciu o wcześniejsze badania, które wykazały pozytywne korelacje między poziomem serotoniny w ciele migdałowatym i liczbą apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych w trakcie ponownej ekspozycji na kontekst związany z morfiną, po okresie odstawienia. Jednocześnie, w tym badaniu, zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy poziomem serotoniny i glutamianu w ciele migdałowatym [136]. Przewidywano, że co najmniej jedna z zastosowanych modyfikacji chemogenetycznych, których celem była dekompozycja ko-transmisji tych neuroprzekaźników, może istotnie zredukować liczbę apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych w odpowiedzi na kontekst związany z podaniem morfiny. Przypuszczano, że efekt behawioralny będzie miał odzwierciedlenie w zmianach neurochemicznych mózgu.

### **5.1. Wpływ manipulacji chemogenetycznych na odpowiedź kontekstową mierzoną liczbą emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych**

Analiza behawioralna wokalizacji ultradźwiękowych (USV) wykazała wzrost odpowiedzi kontekstowej u zwierząt z grupy kontroli morfinowej w stosunku do grupy kontroli solnej (rys. 8). Odpowiedź kontekstową mierzono liczbą emitowanych USV podczas ponownej ekspozycji na kontekst związany z podaniem substancji, po okresie odstawienia. Istotność statystyczna uzyskanego wyniku ( $p < 0,001$ ) wskazuje na silny wpływ morfiny i jej

odstawienia na rozwój odpowiedzi kontekstowej, ilustrującej emocjonalny komponent pożądania, czyli głód narkotykowy. Wynik ten jest zgodny z dotychczasową wiedzą na temat wpływu opioidów na procesy uczenia się i pamięci [177, 534–536] oraz z doniesieniami literaturowymi wskazującymi istotną rolę inkubacji głodu narkotykowego w ekspresji apetytywnych USV po powrocie do kontekstu związanego z podaniem morfiny [136, 537].

USV u szczurów często interpretowane jako wskaźnik stanów emocjonalnych. Przykładowo, dźwięki z klasy “50-kHz” są markerem pozytywnych emocji i oczekiwania nagrody. Wzrost liczby apetytywnych USV w odpowiedzi na kontekst związany z morfiną, po okresie odstawienia, może świadczyć o aktywacji mechanizmów neuronalnych leżących u podstaw głodu narkotykowego, odzwierciedlając antycypację efektów morfiny [136, 177, 537, 538].

Analiza wokalizacji wykonana w grupach poddanych modyfikacjom chemogenetycznym wykazała istotny statystycznie spadek liczby epizodów USV w paśmie apetytywnym, zarejestrowanych w teście reekspozycji na kontekst związany z podawaniem morfiny po okresie odstawienia, w grupach "5-HT-" oraz "Glu+5-HT-" (rys. 8), w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej. Obserwowany spadek liczby USV z klasy “50-kHz” sugeruje, że modulacja aktywności neuronów w ciele migdałowatym, obejmująca zarówno hamowanie aktywności neuronów serotoninergeicznych (grupa "5-HT-"), jak i ich hamowanie w połączeniu ze wzrostem aktywności neuronów glutaminianergicznymi (grupa "Glu+5-HT-"), wpływa na zmniejszenie ekspresji apetytywnej reakcji behawioralnej wywołanej przez kontekst związany z morfiną. Natomiast, w grupie "Glu+5-HT+" odnotowano istotny statystycznie wzrost liczby wokalizacji ultradźwiękowych w paśmie “50-kHz”. Wyniki te potwierdzają istotną rolę ko-transmisji serotoninergeiczno-glutaminianergicznej w modulowaniu reakcji na bodźce związane z substancjami psychoaktywnymi [136, 498, 521, 525, 528, 539]. Są również zgodne z rosnącą liczbą dowodów wskazujących na istotną rolę ciała migdałowatego w procesach asocjacyjnego uczenia się związanego z nagrodą, w tym z nagrodą farmakologiczną [540–545, 349].

Analiza z wykorzystaniem algorytmu Boruta wykazała, że wśród neuroprzekaźników istotnie statystycznie wpływających na liczbę emitowanych epizodów USV były: serotonina w jądrze półleżącym, glutaminian i kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC) w przyśrodkowej korze przedczołowej oraz 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikol (MHPG) w korze retrosplenialnej (rys. 12 A). Ponadto w grupach bez ingerencji w system

serotoninergetyczny istotny statystycznie okazał się wyłącznie glutaminian w ciele migdałowatym, prążkowi i przyśrodkowej korze przedczołowej (rys. 12 B). Natomiast w grupach bez ingerencji w system glutamininergetyczny istotne statystycznie były: glutaminian w prążkowi i korze retrosplenia oraz sarkozyna w jądrze półleżącym (rys. 12 C).

Zróznicowanie wpływu neuroprzekazników na emisję USV w poszczególnych grupach, wraz z zaobserwowaną nieliniowością w poziomach wokalizacji ultradźwiękowych, wskazuje na złożoność systemów zaangażowanych w funkcje wyższego rzędu, szczególnie w przypadku grup poddanych modyfikacjom chemogenetycznym. Sugeruje to, że proces emisji wokalizacji ultradźwiękowych jest wynikiem zaangażowania wielu struktur i szlaków neurotransmisji. Potencjalne podłoże neurochemiczne istotnych statystycznie zmian wokalizacji zostanie omówione w punkcie 5.4.

### **5.1.1. Relacja między odpowiedzią kontekstową a *ticklingiem***

W niniejszym badaniu nie stwierdzono istotnej korelacji ( $r=0,04$  oznacza brak monotonicznej zależności) pomiędzy liczbą wokalizacji ultradźwiękowych (USV) emitowanych przez szczury podczas procedury *ticklingu* a liczbą wokalizacji emitowanych w teście odpowiedzi kontekstowej (rys. 9). Wynik ten sugeruje brak bezpośredniego związku reaktywności na nagradzające bodźce społeczne oraz podatności na uzależnienie od opioidów.

Badania Ryguły *i in.* [479] wykazały, że szczury emitujące więcej wokalizacji o częstotliwości w paśmie “50-kHz” podczas *ticklingu*, charakteryzują się bardziej “optymistycznym” profilem usposobienia. Niemniej, wyniki niniejszego badania wskazują, że indywidualne różnice w charakterze, tj. tendencja do “optyzmu” lub “pesymizmu”, mierzone reaktywnością na *tickling*, nie przekładają się bezpośrednio na podatność na uzależnienie od opioidów. Sugeruje to, że mechanizmy leżące u podstaw reakcji na przyjemne bodźce naturalne (społeczne – w przypadku *ticklingu*) mogą być odrębne od tych zaangażowanych w rozwój uzależnienia, co jest zgodne z obserwacjami klinicznymi, wskazującymi, że uzależnienie może dotknąć osoby o różnych typach osobowości [546–548].

Emisja wokalizacji w paśmie “50-kHz” podczas obu zachowań, służy prawdopodobnie do ekspresji pozytywnych, lecz odmiennych stanów emocjonalnych lub

pełni odmienne funkcje. Wokalizacje wywołane przez *tickling* wiążą się z odczuwaniem przyjemności, zabawą i wzmacnianiem więzi społecznych [451, 463], podczas gdy odpowiedź kontekstowa w niniejszym badaniu odzwierciedla pobudzenie związane potencjalnym podaniem morfiny [475, 549, 136]. Uzyskane wyniki sugerują, że oba typy odpowiedzi USV są najprawdopodobniej regulowane przez różne mechanizmy neuronalne, a brak korelacji między nimi może wynikać z aktywacji odmiennych obwodów neuronalnych związanych z nagrodą [550]. Imitujący zabawę *tickling* ma silniejszą komponentę społeczną, podczas gdy odpowiedź kontekstowa jest reakcją wywołaną przez wskazówki przestrzenne i odzwierciedla indywidualne pobudzenie związane z przywołaniem pamięci o nagrodzie i jej “przewidywaniem”. Emisja USV w obu przypadkach jest wyrazem apetytywnego pobudzenia emocjonalnego, lecz prawdopodobnie różni się czynnikami, które je wywołują.

Zgodnie literaturą podczas *ticklingu* istotną rolę odgrywa pobudzenie aktywności istoty szarej okołowodociągowej (ang. Periaqueductal gray, PAG) [551] oraz części kory somatosensorycznej reprezentującej tułowia (ang. Trunk somatosensory cortex). Ponadto, mikrostymulacja tego ostatniego obszaru jest wystarczająca aby wywołać apetytywne USV podobne do tych obserwowanych podczas *ticklingu* u szczurów [552]. Natomiast, w przypadku wokalizacji ultradźwiękowych emitowanych w odpowiedzi na kontekst związany z podaniem substancji psychoaktywnych można spodziewać się większego udziału struktur związanych z układem nagrody [468, 56, 467, 474]. Brak korelacji można również tłumaczyć aktywacją odrębnych szlaków neuronalnych w obrębie układu nagrody. Jest to zbieżne z wynikami badań, które wykazały, że optogenetyczna stymulacja komórek dynorfinergicznym w różnych podregionach jądra półleżącego (części grzbietowej lub brzusznej) wywołuje przeciwstawne zachowania (związane z nagrodą lub awersyjne) [553].

Indywidualne różnice w aktywacji mechanizmów neuronalnych podczas ekspresji stanów emocjonalnych mogą być również uwarunkowane przez czynniki genetyczne i środowiskowe [554, 555], oraz zaburzone przez potencjalne wystąpienie stresu podczas obu procedur [556–558]. Stres, zarówno ostry jak i chroniczny, może znacząco zredukować liczbę apetytywnych wokalizacji “50-kHz” [559–562].

Najistotniejszym czynnikiem różnicującym oba zachowania jest prawdopodobnie morfina, która indukuje modyfikacje obwodów neuronalnych. Morfina może prowadzić do zmian w neurotransmisji poprzez bezpośredni wpływ na obwody neuronalne [563, 564], a także modyfikując plastyczność synaptyczną [565, 566] i neuroprzeżywalność [567].

Konsekwencje tych zmian są złożone i mogą obejmować upośledzenie funkcji poznawczych [568], a także, potencjalnie, zmiany wzorców emisji wokalizacji ultradźwiękowych u szczurów.

Morfina, działając na receptory  $\kappa$  oraz  $\mu$  opioidowe w mózgu, może modyfikować aktywność neuronów w strukturach kluczowych dla układu nagrody, w tym w jądrze półleżącym i polu brzusznej nakrywki [567, 569], czyli struktur których farmakologiczna stymulacja u naiwnych zwierząt wywoływała emisję apetytywnych USV (jądra półleżące [467] pola brzusznej nakrywki [468]). Chroniczne podawanie opioidów prowadzi do szeregu neuroadaptacji na różnych poziomach organizacji układu nerwowego, obejmujących tolerancję receptorową (np. desensytyzację receptorów  $\mu$ -opiodowych), adaptacje komórkowe (np. poprzez hipertrofię sygnalizacji cAMP) oraz plastyczność synaptyczną, co przyczynia się do rozwoju tolerancji i wystąpienia objawów odstawiennych [80]. Długotrwałe stosowanie morfiny może prowadzić do reorganizacji sieci neuronowej, co wpływa na działanie obwodów neuronalnych i przetwarzanie sygnałów, w tym potencjalnie związanych z indukowaniem wokalizacji ultradźwiękowych [113, 405]. Morfina może też powodować adaptacje w systemie neuroprzebieżności, modyfikując wzorce uwalniania neuroprzebieżników, takich jak dopamina, serotonina i glutaminian, które odgrywają ważną rolę w emisji wokalizacji ultradźwiękowych [570–573].

Jednak należy mieć na uwadze, że odpowiedź kontekstowa w większości grup mierzona była po aktywacji receptorów DREADD modyfikujących aktywność neuronalną, a rzeczona korelacja analizowana była dla wszystkich zwierząt biorących udział w eksperymencie. Analiza wokalizacji ultradźwiękowych wykazała istotne statystycznie zmiany w emisji USV podczas odpowiedzi kontekstowej (rys. 8) w trzech grupach, ale nie można również wykluczyć potencjalnych efektów ingerencji chemogenetycznych modulujących aktywność poszczególnych systemów transmisyjnych w pozostałych pięciu grupach. Zatem brak istotnej statystycznie korelacji pomiędzy fizjologiczną odpowiedzią indywidualną w procedurze *ticklingu* a odpowiedzią kontekstową mógł wynikać z dodatkowego czynnika aktywacji receptorów DREADD. Aby jednoznacznie ocenić relację między emisją wokalizacji ultradźwiękowych podczas odpowiedzi kontekstowej związanej z podaniem morfiny a podczas procedury *ticklingu*, należałoby ponownie przeprowadzić badanie wyłącznie na zwierzętach nie poddanych modyfikacjom chemogenetycznym, najlepiej obejmujących dużo większą liczbę osobników w każdej z badanych grup.

Brak korelacji pomiędzy procedurą *ticklingu* a testem odpowiedzi kontekstowej otwiera nowe perspektywy badawcze. Dalsze badania powinny skoncentrować się na

identyfikacji specyficznych mechanizmów neuronalnych leżących u podstaw obu zachowań, uwzględniając rolę czynników genetycznych i środowiskowych w kształtowaniu indywidualnych różnic w reaktywności na *tickling* i podatności na uzależnienie. Takie badania mogą dostarczyć ważnych informacji na temat neurobiologicznych podstaw zachowań społecznych i emocjonalnych u gryzoni w szczególności poprzez identyfikację zmienności osobniczej i jej wpływu na procesy związane z uzależnieniem.

## **5.2. Wpływ manipulacji chemogenetycznych na odpowiedź kontekstową mierzoną przebytym dystansem**

Analiza behawioralna przebytego dystansu [cm] w teście odpowiedzi kontekstowej (podczas ponownej ekspozycji na kontekst związany z morfiną po okresie odstawienia) wykazała istotny wzrost aktywności lokomotorycznej w grupie kontroli morfinowej w porównaniu do kontroli solnej (rys. 10). Wynik ten jest zbieżny z doniesieniami literaturowymi, zgodnie z którymi ponowna ekspozycja na kontekst uprzednio skojarzony z podaniem substancji psychoaktywnej wywołuje wzrost aktywności lokomotorycznej u szczurów [574–577]. Wzrost aktywności lokomotorycznej był też obserwowany po prezentacji bodźców związanych z warunkowaniem substancją psychoaktywną [578, 579]. Zjawisko to może być interpretowane jako element odzwierciedlający procesy motywacyjne i uczenia asocjacyjnego [580]. W testach związanych z uzależnieniem od substancji psychoaktywnych aktywność lokomotoryczna może być wykorzystywana do oceny poziomów lęku, sensytyzacji psychomotorycznej lub odpowiedzi kontekstowej [370, 581–583]. Właściwa interpretacja przebytego dystansu zależy od konkretnego protokołu badawczego [584].

W niniejszym badaniu stwierdzono istotny wzrost przebytego dystansu w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej w pięciu grupach: "5-HT-", "5-HT+", "Glu+", "Glu-" i "Glu-5-HT-" (rys.10). Wyniki te wskazują, że manipulacje farmakologiczne wpływające na neurotransmisję serotonergiczną i glutaminianergiczną w ciele migdałowatym mogą wpływać na aktywność lokomotoryczną podczas ponownej ekspozycji na kontekst po okresie odstawienia.

Co ciekawe, aktywacja receptorów DREADD, zarówno typu HM3Dq, jak i HM4Di, na neuronach serotonergicznym ("5-HT+" i "5-HT-") oraz na neuronach glutaminianergicznym ("Glu+" i "Glu-") w ciele migdałowatym wywoływała jednakowy

efektem behawioralny, tj. wzrost przebytego dystansu w teście odpowiedzi kontekstowej. Sugeruje to, że oba systemy neurotransmisyjne mogą modulować aktywność motoryczną, jednocześnie wykazując nieliniowe efekty względem kierunku wprowadzonych zmian. Oznacza to, że zarówno wysoka, jak i niska aktywność neuronów systemów transmisji serotoninerгіcznej lub glutaminianergicznej w ciele migdałowatym może prowadzić do jednakowych zmian behawioralnych związanych z motywacją i procesami pamięci skojarzeniowej, leżących u podstaw uzależnienia.

Efekt ten może wynikać z mechanizmów kompensacyjnych układu nerwowego, który dąży do utrzymania homeostazy [181]. Nawet w warunkach patologicznych, np. po powtarzającej się ekspozycji na substancję psychoaktywną, w których doszło do allostacyjnych lub trwałych adaptacji obwodów neuronalnych, zarówno nadmierna, jak i zbyt mała aktywność określonych neuronów może uruchamiać mechanizmy kompensacyjne [585], co z kolei może wpływać na funkcje wyższego rzędu.

Serotonina moduluje aktywność układu dopaminowego i wpływa na procesy emocjonalne i behawioralne [586]. Zarówno pobudzenie jak i hamowanie neuronów serotoninerгіcznych ("5-HT+" i "5-HT-") w ciele migdałowatym powodowały wzrost aktywności lokomotorycznej w teście odpowiedzi kontekstowej, mierzonej przebyłym dystansem, w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej. Sugeruje to, że układ serotoninerгіczny może pełnić funkcję modulatora w tym procesie, ale jego wpływ jest prawdopodobnie złożony i zależny od innych czynników, takich jak interakcje z układem dopaminergicznym, glutaminianergicznym i GABAergicznym [586–588]. Przykładowo, udowodniono, że w przyśrodkowej korze przedczołowej aktywacja receptorów serotoninerгіcznych 5-HT<sub>2A</sub> może zwiększać uwalnianie glutamianu, a aktywacja receptorów 5-HT<sub>1A</sub> może zwiększać uwalnianie GABA [588]. Możliwe, że również w ciele migdałowatym kierunek zmian aktywności neuronów serotoninerгіcznych wpływa na rekrutację obwodów neuronalnych o przeciwstawnych funkcjach w układzie nerwowym, co ostatecznie prowadzi do tego samego efektu behawioralnego [589].

Podobny efekt wywołały manipulacje w obrębie układu glutaminianergicznego. Zarówno wzrost ("Glu+"), jak i spadek ("Glu-") aktywności neuronów glutaminianergicznych zwiększał dystans pokonywany podczas testu odpowiedzi kontekstowej. Wskazuje to na istotną rolę dysregulacji tego układu w procesach neuroadaptacyjnych związanych z uzależnieniem od morfiny [590]. Jednoczesne hamowanie aktywności systemów transmisji serotoninerгіcznej i glutaminianergicznej ("Glu-5-HT-") również prowadziło do istotnego statystycznie wzrostu przebytego

dystansu, w przeciwieństwie do np. grupy "Glu+5-HT+" w której nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy, co sugeruje istnienie złożonych, nieliniowych interakcji między tymi dwoma układami neurochemicznymi.

Analiza z wykorzystaniem algorytmu Boruta wykazała szereg neuroprzekaźników, które istotnie statystycznie wpłynęły na przebyty dystans był szereg struktur zarówno we wszystkich porównywanych grupach (rys. 13), jak i w grupach nie poddawanych ingerencjom chemogenetycznym w systemie serotonergicznym (rys. 14 A) lub glutaminianergicznym (rys. 14 B). Sugeruje to, że na aktywność lokomotoryczną wpływ ma

Dalsze badania są niezbędne do pełnego zrozumienia mechanizmów neuronalnych leżących u podstaw zaobserwowanych zmian w przebytym dystansie. Mimo, że przebyty dystans jest powszechnie stosowaną miarą aktywności lokomotorycznej u szczurów, zarówno w badaniach behawioralnych, jak i farmakologicznych, do oceny wpływu substancji psychoaktywnych, manipulacji genetycznych lub uszkodzeń mózgu na aktywność lokomotoryczną zwierząt [580, 591], w literaturze można znaleźć niewiele doniesień na temat wykorzystywania dystansu jako miary głodu narkotykowego lub jego inkubacji. Przedstawienie zmian w pokonanym dystansie, szczególnie w szerszym kontekście, na przykład w odniesieniu do układu mezo limbicznego dopaminy, który odgrywa kluczową rolę w procesach motywacyjnych i uczeniu się reakcji na bodźce związane z nagrodą [592], lub funkcji hipokampa, kory przedczołowej oraz innych struktur zaangażowanych w procesy pamięci, uczenia się i podejmowania decyzji, mogłoby dostarczyć cennych informacji i wspomóc analizę danych złożonych procesów związanych z uzależnieniem od substancji psychoaktywnych. Jednak, aby móc jednoznacznie wykorzystywać przebyty dystans jako behawioralny marker głodu narkotykowego, należałoby zastosować inne testy behawioralne, takie jak zadania ukierunkowane na cel i porównać je z preferencją miejsca [349].

### **5.3. Relacja między wokalizacjami ultradźwiękowymi a przebytym dystansem jako miarami odpowiedzi kontekstowej**

W niniejszym badaniu stwierdzono brak silnej korelacji ( $r=0,31$  oznacza słabą zależność monotoniczną) między liczbą emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych (USV) a dystansem pokonanym przez szczury w teście odpowiedzi kontekstowej podczas ponownej ekspozycji na kontekst związany z podawaniem morfiny, po okresie odstawienia (rys. 11).



Sugeruje to, że oba zachowania, choć zaangażowane w reakcję odpowiedzi na kontekst związany z podawaniem morfiny, mogą odzwierciedlać odrębne aspekty tego procesu. Wokalizacje ultradźwiękowe mogą stanowić wyraz bardziej emocjonalnego, afektywnego komponentu odpowiedzi kontekstowej, związanej z głodem narkotykowym, podczas gdy aktywność lokomotoryczna może odzwierciedlać bardziej jej aspekt motywacyjny lub wskazywać na redukcję lęku, która manifestuje się wzmożoną eksploracją otoczenia [593].

Również różnice w podłożu neurochemicznym tych dwóch zachowań, zaobserwowane w niniejszym badaniu, dodatkowo potwierdzają ich odrębność. Analiza z wykorzystaniem algorytmu Boruta wykazała, że na liczbę emitowanych epizodów USV wpłynęły głównie zmiany w neurotransmisji w obrębie kory retrosplenialnej, przyśrodkowej kory przedczołowej i jądra półleżącego, obejmujące zmiany w stężeniach neuroprzekaźników i ich metabolitów, takich jak MHPG, glutaminian, DOPAC i serotonina (rys. 12 A). Natomiast, na dystans pokonywany przez zwierzęta wpływ miały zmiany neurochemiczne we wszystkich badanych strukturach mózgu, obejmujące szeroki zakres neuroprzekaźników i ich metabolitów oraz neuromodulatorów (rys. 13). W wynikach analiz przeprowadzonych dla obu zachowań powtarzały się jedynie dwa parametry: serotonina w jądrze półleżącym oraz kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC) w przyśrodkowej korze przedczołowej (rys. 12A i 13). Związki te są najprawdopodobniej zaangażowane są w odpowiedź kontekstową, niezależnie od formy jej ekspresji.

Uzyskane wyniki potwierdzają złożoność neurobiologicznych mechanizmów leżących u podstaw reakcji na kontekst związany z morfiną. Reakcja ta angażuje wiele struktur mózgu i układów neuroprzekaźnikowych, a jej poszczególne komponenty, takie jak emisja USV i aktywność lokomotoryczna, mogą być regulowane poprzez niezależne szlaki transmisyjne. Dalsze badania w tym obszarze powinny skoncentrować się na szczegółowej charakterystyce tych mechanizmów, w tym przede wszystkim na roli poszczególnych szlaków neurotransmisyjnych oraz struktur mózgu w kształtowaniu poszczególnych aspektów zachowania w teście odpowiedzi kontekstowej.

#### **5.4. Relacja między wokalizacjami ultradźwiękowymi a neurochemią**

Głównym celem niniejszej pracy była weryfikacja wpływu poszczególnych modyfikacji chemogenetycznych na emocjonalny komponent głodu narkotykowego. Dodatkowo podjęto próbę interpretacji zmian neurochemicznych leżących u podstaw zarówno redukcji,

jak i wzrostu emisji ultradźwięków w odpowiedzi na kontekst związany z podawaniem morfiny, po okresie odstawienia.

W teście reekspozycji na kontekst związany z podaniem morfiny, zaobserwowano istotny statystycznie spadek liczby wokalizacji ultradźwiękowych (USV) z klasy "50-kHz" w dwóch grupach: "5-HT-" oraz "Glu+5-HT-", a także wzrost w grupie "Glu+5-HT+", w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej (rys. 8). Zmiany w poziomach USV nie wykazały charakteru liniowego wobec zastosowanych modyfikacji chemogenetycznych. Dalsza analiza danych uzyskanych za pomocą spektrometrii mas, wykazała zróżnicowane podłoże neurochemiczne ekspresji stanu emocjonalnego, którego markerem była emisja wokalizacji ultradźwiękowych.

#### **5.4.1. Grupa "5-HT-": możliwe mechanizmy neurochemiczne leżące u podstaw redukcji liczby wokalizacji ultradźwiękowych**

Analiza wyników biochemicznych, uzyskanych za pomocą spektrometrii mas w grupie "5-HT-" ujawniła złożony obraz zmian neurochemicznych, które mogą leżeć u podstaw obserwowanej redukcji wokalizacji ultradźwiękowych.

Efekty hamowania aktywności neuronów serotonergiczných w ciele migdałowatym w grupie "5-HT-" są zgodne z doniesieniami literaturowymi, wskazującymi na udział transmisji serotonergicznęj w zachowaniach związanych z poszukiwaniem substancji psychoaktywnych [594–596] oraz głodem narkotykowym [539, 597, 598].

Badania neurochemiczne wykazały, że większość substancji psychoaktywnych o potencjale uzależniającym powoduje ostry (ang. Acute) wzrost aktywności serotoniny w całym mózgu [498]. Rola 5-HT w rozwoju i utrzymaniu zachowań związanych z używaniem morfiny wydaje się jednak zróżnicowana i specyficzna dla danego obszaru mózgu [599–602]. Istnieje niewiele jednoznacznych informacji odnośnie roli i aktywności 5-HT w odpowiedzi kontekstowej. Wcześniejsze badania sugerowały, że zarówno zmniejszona [603, 604], jak i zwiększona [605, 606] neurotransmisja serotonergiczna może obniżać motywację do zażywania kokainy. Udowodniono, że u myszy poziom serotoniny w prążkowie wzrasta podczas antycypacji naturalnej nagrody i osiąga maksimum w czasie jej konsumpcji. Amplituda i czas trwania sygnału serotonergicznego są tym większe, większa jest wartość nagrody [607]. W niniejszym badaniu zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomów serotoniny we wszystkich badanych strukturach w grupie "5-HT-" (rys. 15, 24, 33, 42, 51, 60 i 69), wraz z osłabieniem

pozytywnego stanu afektywnego, mierzonego liczbą epizodów USV (rys. 8). Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi, sugerującymi związek między redukcją ogólnego poziomu serotoniny a obniżonym oczekiwaniem nagrody.

W grupie "5-HT-" zaobserwowano również spadek poziomów dopaminy (DA) w ciele migdałowatym (Amy) (rys. 20), jądrze półłożącym (Nacc) (rys. 29), prążkowi (Cpu) (rys. 38) i polu brzusznej nakrywki (VTA) (rys. 47), czyli strukturach związanych m.in. z mezolimbicznym szlakiem dopaminergicznym, w którym ten neuroprzekaźnik odgrywa kluczową rolę w przetwarzaniu informacji o nagrodzie (więcej informacji przedstawiono w punkcie 1.4). Wykazano, że zmniejszona transmisja dopaminergiczna w VTA może świadczyć o tym, że nagroda jest mniejsza niż przewidywano lub nie pojawiła się w oczekiwanym czasie [310, 608]. Obniżone stężenie dopaminy w Nacc może odzwierciedlać wysokie pragnienie nagrody farmakologicznej [609] i/lub nieoczekiwane doświadczenie jej braku [610], natomiast w Cpu – zmniejszoną motywację apetytywną, która oznacza stan pobudzenia wywołanego przez bodźce zewnętrzne o właściwościach nagradzających [611]. Obserwacje te mogą wyjaśniać redukcję emisji apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych w odpowiedzi na kontekst związany z podaniem morfiny w grupie "5-HT-".

O zmniejszonym pobudzeniu może również świadczyć obniżony poziom noradrenaliny zaobserwowany w niniejszym badaniu. Istotny statystycznie spadek jej poziomu zaobserwowano w ciele migdałowatym (rys. 23), jądrze półłożącym (rys. 32), polu brzusznej nakrywki (rys. 50), przyśrodkowej korze przedczołowej (rys. 59), hipokampie (rys. 68) i korze retrosplenialnej (rys. 77). Noradrenalina pełni rolę neuromodulatora procesów związanych z nastrojem, uwagą, pobudzeniem i podejmowaniem decyzji [612]. Ponadto, udowodniono, że przekaznictwo noradrenergiczne jest zaangażowane zarówno w objawy odstawienia od opioidów [613, 614] jak i w nawrót [615, 616]. Zmniejszenie transmisji noradrenergicznej może wskazywać na niski poziom zaangażowania w procesy motywacyjne w związku z doświadczanymi bodźcami, np. otoczeniem [617]. Istnieją liczne interakcje pomiędzy układem noradrenergicznym a dopaminergicznym. Przykładowo, noradrenalina może modulować uwalnianie dopaminy w powłoce jądra półłożącego poprzez wpływ na receptory  $\alpha$ 1- lub  $\alpha$ 2-adrenergiczne zlokalizowane na neuronach dopaminergicznych [618, 619]. Stężenia tych dwóch neuroprzekaźników (DA i NA) zaobserwowane w grupie "5-HT-" mogą zatem świadczyć o niskim pobudzeniu emocjonalnym u zwierząt.

W niniejszym badaniu zaobserwowano spadek poziomu dopaminy również w przyśrodkowej korze przedczołowej (mPFC) (rys. 56) i korze retrosplenialnej (RC) (rys. 74). Landeta *i in.* [620] wykazali, że dopaminergiczne projekcje z pola brzusznej nakrywki do kory retrosplenialnej pełnią funkcję modulacyjną w konsolidacji pamięci związanej z rozpoznawaniem obiektów. Obserwacja niskiego poziomu dopaminy w ciele migdałowatym (rys. 20), może wskazywać na znikomą aktywację receptorów dopaminergicznych D1 i D2 w jądrze podstawno-bocznym (BLA). Badania z wykorzystaniem antagonistów receptorów D1 lub D2 w ciele migdałowatym wykazały, że aktywacja tych receptorów jest niezbędna do destabilizacji pamięci apetytywnej podczas jej rekonsolidacji [621]. Obniżony poziom dopaminy w tych trzech strukturach może zatem sugerować odseparowanie wspomnień związanych ze znanym otoczeniem (kontekstem) z ich emocjonalnym, apetytywnym powiązaniem.

Przyśrodkowa kora przedczołowa odgrywa istotną rolę w ocenie niejednoznacznych sytuacji poprzez integrację informacji sensorycznych z ich subiektywnie postrzeganą wartością oraz wewnętrznymi stanami przekonań, co w konsekwencji wpływa na zachowania zorientowane na cel [622]. Wzrost poziomu dopaminy obserwowano zarówno w odpowiedzi na bodźce awersyjne, jak i apetytywne, co sugeruje, że reaktywność DA odzwierciedla ogólną motywację [623]. Inaktywacja mPFC upośledza zdolność do dynamicznego wnioskowania o potencjalnej nagrodzie na podstawie wskazówek nieprecyzyjnie sygnalizujących nagrodę (dostarczenie nagrody po wskazówce podczas treningu następowało w 90% przypadków) [624]. Zmniejszenie aktywności transmisji dopaminergicznej w mPFC może wpływać na funkcje poznawcze i emocjonalne, co pośrednio może przyczyniać się do obserwowanej redukcji wokalizacji.

Ponadto, w przyśrodkowej korze przedczołowej w grupie "5-HT-" zaobserwowano wyłącznie istotne statystycznie spadki poziomów neuroprzekaźników i ich metabolitów oraz neuromodulatorów: dopaminy (rys. 56), serotoniny (rys. 51), kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) (rys. 52), sarkozyny (rys. 55) i noradrenaliny (rys. 59). Nie odnotowano też istotnej zmiany poziomów glutaminianu oraz kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) (rys. 58), których neurony w mPFC mają projekcje, odpowiednio do Nacc [338–340] i VTA [337, 341] oraz Nacc [342], pełniąc funkcje regulacyjne mezolimbicznego szlaku dopaminergicznego. Taki profil biochemiczny struktury może odzwierciedlać jej niższą aktywność, a tym samym świadczyć o niskim zaangażowaniu zwierząt w zachowania zorientowane na cel i/lub mniejszej motywacji związanej z potencjalną nagrodą [625]. Zgodna z tą teorią jest obserwowana redukcja

odpowiedzi kontekstowej wyrażana emisją wokalizacji ultradźwiękowych, ale nie pokonanym dystansem, którego odnotowano istotny statystycznie wzrost. Wyjaśnienie przyczyny takiego zróżnicowania funkcji wyższego rzędu może tkwić w ciele migdałowatym, które reguluje odpowiedź emocjonalną na bodźce [626].

Obserwowany profil neurochemiczny ciała migdałowatego wykazuje dalsze zbieżności z danymi literaturowymi. Doświadczanie bodźców apetytywnych u myszy aktywuje ipsilateralne projekcje neuronów glutaminianergicznych jądra podstawno-bocznego (BLA) ciała migdałowatego, stymulując aktywację receptorów D1 na średnich neuronach kolczastych (MSN) jądra półleżącego. Prowadzi to do zwiększenia uwalniania dopaminy, a w konsekwencji do odczuwania nagrody i ekspresji reakcji behawioralnych z nią związanych [627]. Jądro centralne ciała migdałowatego (CeA) również otrzymuje projekcje glutaminianergiczne z jądra podstawno-bocznego [628]. Aktywacja CeA pośredniczy w łączeniu bodźca z jego ogólnymi właściwościami afektywnymi, tj. w zależności od sytuacji (kontekstu) z pozytywnymi lub negatywnymi emocjami i/lub pobudzeniem motywacji do reakcji na bodziec apetytywny lub awersyjny (np. chęć nagrody lub strach) [626, 629, 630]. W grupie "5-HT-" stwierdzono istotnie statystyczny spadek poziomu glutamianu w ciele migdałowatym (rys. 17) i dopaminy w jądrze półleżącym (rys. 29). Biorąc pod uwagę wszystkie wymienione wcześniej informacje, istnieje szansa, że u zwierząt z grupy "5-HT-" aktywacja receptorów DREADD podczas testu odpowiedzi kontekstowej osłabiła skojarzenie kontekstu z nagrodą farmakologiczną.

W ciele migdałowatym zaobserwowano również bardzo wysoki poziom GABA oraz istotny statystycznie wzrost stężenia tego neuroprzekaźnika w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej (rys. 22). GABA jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym w mózgu, a jego wzrost może prowadzić do hamowania aktywności neuronów w ciele migdałowatym [631]. Udowodniono, że neurotransmisja GABAergiczna w ciele migdałowatym wzrasta w odpowiedzi na stres [632–636]. Obserwowane stężenie GABA w ciele migdałowatym może być również efektem uruchomienia mechanizmu kompensacyjnego. Badania na mysich oseskach w modelu separacji od matki wykazały redukcję wokalizacji ultradźwiękowych w odpowiedzi na stres po podaniu benzodiazepin [637], które allosterycznie oddziałują na receptory GABAergiczne typu A, wpływając na wiązanie GABA i zwiększając ich aktywność [638]. Serotonina [639, 640] oraz jej receptory [641] w ciele migdałowatym mogą modulować neurotransmisję GABAergiczną. Modyfikacja chemogenetyczna systemu neurotransmisji serotoninerdycznej w ciele migdałowatym w grupie "5-HT-" najprawdopodobniej zupełnie zaburzyła współdziałanie

systemu 5-HT–GABA, powodując nadmierną stymulację transmisji GABAergicznej, która mogła spowodować redukcję wokalizacji w teście odpowiedzi kontekstowej analogiczną do tej zaobserwowanej przez Takahashiego *i in.* [637]. Odwrotną korelację pomiędzy stężeniami 5-HT i GABA udało się zaobserwować również na grafach korelacji przedstawionych na rys. 79 i rys. 80.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na złożoną rolę sieci interakcji pomiędzy układem serotonergicznym, dopaminergicznym, GABAergicznym i noradrenergicznym w modulacji wokalizacji ultradźwiękowych. Chemogenetyczne hamowanie neurotransmisji serotonergicznej w ciele migdałowatym spowodowało zmiany neurochemii kluczowych struktur mózgu zaangażowanych w przetwarzanie nagrody i emocji, co może tłumaczyć obserwowaną redukcję wokalizacji ultradźwiękowych w grupie "5-HT-". Jednak, mechanizmy leżące u podstaw funkcji wyższego rzędu są wypadkową wielu czynników, a dalsze badania są niezbędne, aby w pełni zrozumieć obserwowane zjawiska.

#### **5.4.2. Grupa "Glu+5-HT+": możliwe mechanizmy neurochemiczne leżące u podstaw zwiększenia liczby wokalizacji ultradźwiękowych**

W niniejszym badaniu zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby wokalizacji ultradźwiękowych (USV) w paśmie "50-kHz" w trakcie testu odpowiedzi kontekstowej w grupie szczurów "Glu+5-HT+", tj. u których aktywowano receptory DREADD HM3Dq na neuronach glutaminianergicznym i serotonergicznym w ciele migdałowatym (rys. 8). Wydaje się, że podwyższona liczba epizodów USV znajduje odzwierciedlenie w zaobserwowanym profilu neurochemicznym grupy.

W porównaniu do grupy kontroli morfinowej w grupie "Glu+5-HT+" stwierdzono istotny statystycznie wzrost poziomów dopaminy w ciele migdałowatym (rys. 20), jądrze półleżącym (rys. 29), prążkowie (rys. 38) i polu brzusznej nakrywki (rys. 47). Zwiększona transmisja dopaminergiczna w najważniejszych strukturach mózgu tworzących mezolimbiczną część układu nagrody sugeruje, że zwierzęta kojarzyły kontekst z podaniem morfiny i odczuwały pobudzony/wzmocniony wskazówkami głód narkotykowy [642–644], a także mogły oczekiwać nagrody, np. w postaci podania substancji [310, 610, 645–647]. Wzrost stężenia dopaminy mógł być biochemicznie spowodowany wysoką aktywnością glutaminianergiczną. Zgodnie z danymi literaturowymi glutaminian pełni rolę

modulatora modulatora układu dopaminergicznego [648]. W porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej w grupie "Glu+5-HT+" zaobserwowano istotne statystycznie wzrosty poziomów glutaminianu, głównego pobudzającego neuroprzekaźnika w ośrodkowym układzie nerwowym, we wszystkich badanych strukturach (rys. 17, 26, 35, 44, 53, 62 i 71). Wzrosty te mogły być efektem ingerencji chemogenetycznej, która spowodowała zwiększoną stymulację systemu neurotransmisji glutaminianergicznej. Jednocześnie w badanych strukturach nie zaobserwowano istotnego statystycznie zwiększenia poziomów noradrenaliny (rys. 23, 41, 50, 59, 68 i 77), które mogłyby sugerować wystąpienie stresu [649].

Udowodniono, że inhibicja aktywności interneuronów GABAergicznych w przyśrodkowej korze przedczołowej leży u podstaw obniżenia zachowań lękowych [650] i szybkich odpowiedzi antydepresyjnych [651]. Istotny statystycznie spadek stężenia GABA zaobserwowany w mPFC (rys. 58) może wskazywać na brak reakcji lękowej lub stanów depresyjnych, a nawet odzwierciedlać pozytywny lub euforyczny stan emocjonalny zwierząt [136, 650, 651].

Wszystkie powyższe obserwacje mogą tłumaczyć zwiększoną emisję więcej apetytywnych wokalizacji ultradźwiękowych w grupie "Glu+5-HT+". Prawdopodobnie zwiększona liczba USV jest wyrazem wzmocnienia chemogenetycznego pozytywnego afektu, wywołanego ponowną ekspozycją na kontekst związany z podaniem morfiny po okresie odstawienia.

#### **5.4.3. Grupa "Glu+5-HT-": możliwe mechanizmy neurochemiczne leżące u podstaw redukcji wokalizacji ultradźwiękowych**

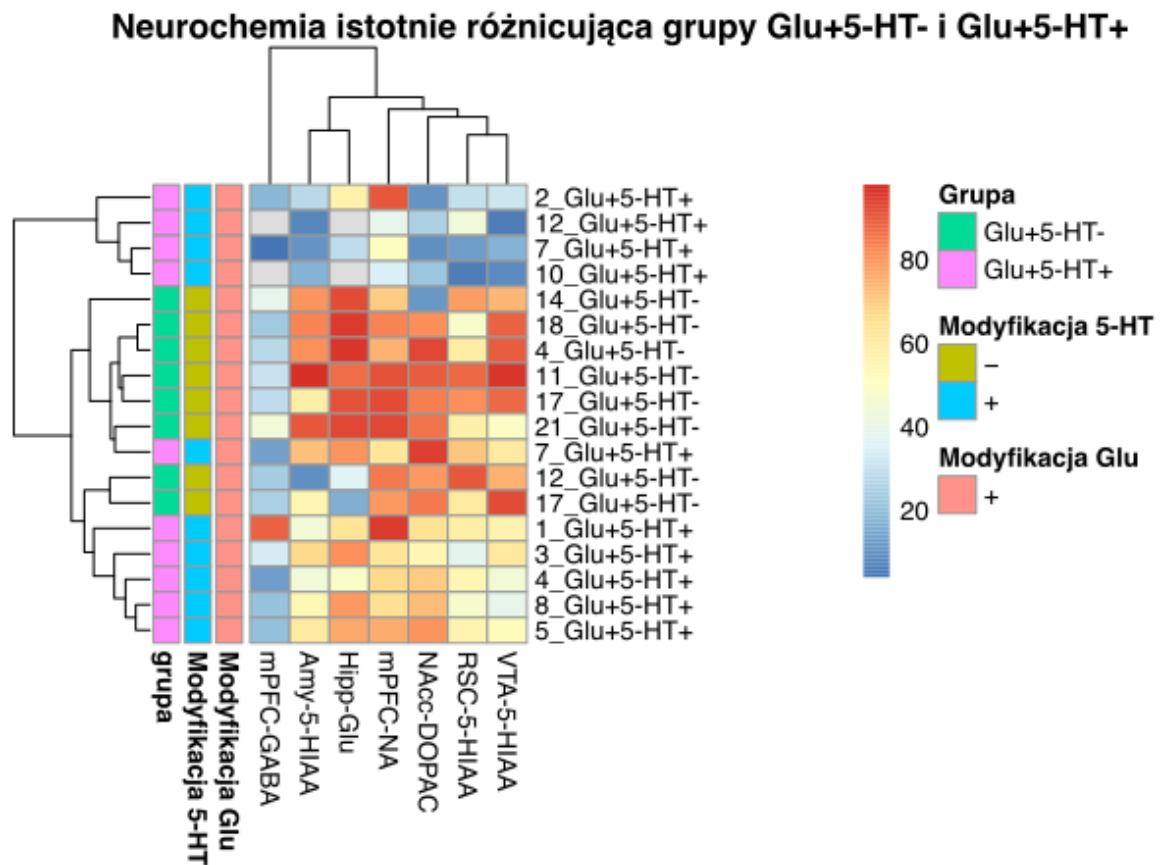
Analiza wyników biochemicznych, uzyskanych za pomocą spektrometrii mas w grupach szczurów "5-HT-" i "Glu+5-HT-" (aktywacja receptorów DREADD HM3Dq na neuronach glutaminianergicznych i HM4Di na neuronach serotoninerznych w ciele migdałowatym) wskazuje, że redukcja wokalizacji ultradźwiękowych może być wywołana przez więcej niż jeden szlak neurochemiczny. Zastosowane ingerencje chemogenetyczne w grupie "Glu+5-HT-" najprawdopodobniej zaburzają obwody neuronalne zaangażowane w przetwarzanie kontekstu związanego z nagrodą i ekspresję związanego z nim stanu afektywnego.

Istnieją dowody sugerujące, że zmniejszona neurotransmisja serotoninerzyczna w ciele migdałowatym może sprzyjać nadpobudliwości poprzez zwiększoną aktywność

glutaminergiczną, prowadząc następnie do nasilenia zachowań związanych ze strachem [652]. Mimo, że w badanej grupie szczurów "Glu+5-HT-" zaobserwowano istotne statystycznie zwiększenie poziomu glutaminianu w ciele migdałowatym w porównaniu do grupy kontroli morfinowej (rys. 17), zwierzęta nie przejawiały zachowań typowo kojarzonych ze strachem, takich jak wystąpienie reakcji zneruchomienia (ang. Freezing), emisja wokalizacji w paśmie częstotliwości "22-kHz" lub zmniejszona aktywność lokomotoryczna.

Należy podkreślić, że profil neurochemiczny zwierząt w grupie "Glu+5-HT-" zdecydowanie różnił się od zaobserwowanego w grupie "5-HT-" jednocześnie wykazując wysokie podobieństwo z grupą "Glu+5-HT+", stąd przypuszczenie, że za redukcję wokalizacji w tej grupie musi odpowiadać inny mechanizm neurochemiczny. W celu identyfikacji statystycznie istotnych różnic neurochemicznych pomiędzy grupami "Glu+5-HT-" i "Glu+5-HT+" przeprowadzono dodatkową analizę z wykorzystaniem algorytmu Boruta, której wyniki przedstawiono na rysunku 81. Wyniki analizy wskazały, że istotne znaczenie dla zróżnicowania grup miały: noradrenalina i kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) w przyśrodkowej korze przedczołowej (mPFC), glutaminian w hipokampie (Hipp), kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC) w jądrze półleżącym (Nacc) oraz 5-hydroksyindol kwasu octowego (5-HIAA) w ciele migdałowatym, polu brzusznej nakrywki oraz korze retrosplenialnej.





Rys. 81. Wykres przedstawiający stężenie neuroprzekaźników w strukturach, które istotnie statystycznie wpływają różnicują grupy "Glu+5-HT-" i "Glu+5-HT+".

Istotnie statystycznie obniżony poziom GABA w mPFC (rys. 58) sugeruje, że zwierzęta nie odczuwały lęku lub obniżenia stanu emocjonalnego [650, 651]. Istotnie statystycznie wzrosty poziomów dopaminy (rys. 29), kwasy dihydroksyfenylooctowego DOPAC (rys. s27 w *suplemencie*) i kwasu 5-hydroksyindoloctowego (5-HIAA) (rys. 25) w jądrze półleżącym mogą odzwierciedlać ogólny wzrost pobudzenia behawioralnego [653]. Ponadto istotnie statystycznie wzrosty poziomów 5-HIAA w ciele migdałowatym (rys. 16) i korze retrosplenialnej (rys. 70) sugerują wysoki obrót serotoniny.

W porównaniu do grupy kontroli morfinowej zaobserwowano istotnie statystycznie zwiększenie poziomu noradrenaliny (NA) w przyśrodkowej korze przedczołowej (rys. 59), ciele migdałowatym (rys. 23), polu brzusznej nakrywki (rys. 50), hipokampie (rys. 68) i korze retrosplenialnej (rys. 77). Badania wykazały, że zwiększone uwalnianie NA w przyśrodkowej korze przedczołowej jest niezbędne dla wpływu morfiny na mezolimbiczny układ dopaminergiczny, natomiast jej deplecja prowadzi do upośledzenia preferencji miejsca uwarunkowanego morfiną, związanej z właściwościami nagradzającymi substancji [654]. Na podstawie zaobserwowanych wzrostów poziomów NA w mPFC i DA w Nacc,

można zatem przypuszczać, że zwierzęta rozpoznały kontekst związany z morfiną, a wzrosty noradrenaliny w pozostałych strukturach związane były z ich emocjonalnym pobudzeniem [619, 655–657].

Najprawdopodobniej jednak, kluczowe znaczenie w kontekście modulacji wokalizacji ultradźwiękowych w grupie "Glu+5-HT-" miał glutaminian (Glu), którego bardzo wysokie poziomy odnotowano we wszystkich badanych strukturach (rys. 17, 26, 35, 44, 53, 62 i 71). Obserwowane poziomy Glu mogą świadczyć o nadmiernym pobudzeniu neuronów glutaminianergicznym. Potencjalnie taka hiperaktywność systemu glutaminianergicznego może prowadzić do zaburzeń prawidłowego funkcjonowania obwodów neuronalnych [658]. System glutaminianergiczny jest zaangażowany w funkcje poznawcze [659, 660], regulację nastroju [661, 662] i pamięć [663], a także w procesy związane z uzależnieniem [521, 522]. Udowodniono również, że zaburzenia homeostazy glutaminianu upośledzają komunikację między korą przedczołową a jądrem półleżącym, co może powodować niezdolność do kontroli zachowań związanych z poszukiwaniem substancji psychoaktywnych w uzależnieniu [524]. Być może to właśnie nadmiar glutaminianu, w szczególności w przyśrodkowej korze przedczołowej (rys. 79), wpłynął na zdolność zwierząt do kontroli i ekspresji zachowań, które znalazło odzwierciedlenie w zmniejszonej liczbie wokalizacji ultradźwiękowych podczas ponownej ekspozycji na kontekst związany z podaniem morfiny po okresie odstawienia.

Powyższe obserwacje potwierdzają złożoność systemów zaangażowanych w funkcje wyższego rzędu. Dalsze badania odnośnie potencjalnych mechanizmów leżących u podstaw komunikacji ultradźwiękowej szczurów związanej z odpowiedzią kontekstową są niezbędne by lepiej zrozumieć zjawisko uzależnienia.

#### **5.4.4. Między strukturalne relacje systemów neurotransmisyjnych**

Graf przedstawiony w punkcie [4.3.8](#) ilustruje złożoność systemu neurotransmisji. Dekompozycja ko-transmisji serotoninerdycznej i glutaminanerdycznej w ciele migdałowatym z użyciem metod chemogenetycznych ujawniła zawiłą sieć zależności neurochemicznych leżących u podstaw odpowiedzi kontekstowej, indukowanej przez kontekst skojarzony z podaniem morfiny, po okresie odstawienia.

Sieć układów neurotransmisyjnych zaangażowanych w funkcje wyższego rzędu charakteryzują się wysokim stopniem złożoności, co ilustruje graf z rysunku 78. Należy założyć, że każda z wykonanych ingerencji chemogenetycznych miała wielowymiarowe

konsekwencje, które w niektórych przypadkach przejawiały się w zmianie zachowania zwierząt. Istotne statystycznie zmiany liczby wokalizacji ultradźwiękowych, zaobserwowane w trzech grupach ("5-HT-", "Glu+5-HT-" i "Glu+5-HT+"), sugerują, że układy serotoninergetyczny i glutaminiergetyczny w ciele migdałowatym mogą stanowić potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu uzależnień, szczególnie w aspektach związanych z inkubacją głodu narkotykowego. Wyniki badania przedłożonego w niniejszej rozprawie wskazują jednak na zaangażowanie wielu szlaków neurotransmisyjnych leżących u podłoża reakcji na kontekst związany z podaniem substancji opioidowej, co sugeruje konieczność dalszych badań z uwzględnieniem wielowymiarowego podejścia.

Zastosowanie techniki chemoetycznej DREADD w połączeniu z wielostrukturalną analizą danych otwiera nowe, ciekawe perspektywy badawcze w zakresie badania interakcji między różnymi obszarami mózgu. Niniejszy eksperyment uwydatnił złożoność neurobiologicznych podstaw uzależnienia, wskazując na potrzebę holistycznego podejścia w badaniu tego zjawiska.

## 6. Podsumowanie i wnioski

Niniejsza rozprawa prezentuje wyniki eksperymentu, którego celem była analiza roli ko-transmisji serotonergicznej i glutaminergicznej w ciele migdałowatym w kontekście warunkowania miejsca z podaniem morfiny. W badaniu zastosowano zwierzęcy model warunkowania miejsca oraz technikę chemogenetyczną z zastosowaniem receptorów DREADD hM3Dq i hM4Di, ukierunkowanych na neurony serotonergiczne i/lub glutaminergiczne w ciele migdałowatym. Zastosowanie manipulacji chemogenetycznych miało na celu zbadanie wpływu modulacji aktywności tych systemów neurotransmisyjnych na zachowanie szczurów w teście odpowiedzi kontekstowej.

Eksperyment objął dziesięć grup szczurów (tabela 13), z czego osiem poddano manipulacjom chemogenetycznym, a dwie stanowiły grupy kontrolne (morfinowa i solna).

**Tabela 13. Grupy przebadane w eksperymencie, podzielone zgodnie z wprowadzonymi manipulacjami chemogenetycznymi.**

Grupa	Manipulacja chemogenetyczna
Kontrolna morfinowa	brak ingerencji
Kontrolna solna	brak ingerencji
"5-HT-"	aktywacja receptorów DREADD HM4Di na neuronach serotonergicznym
"5-HT+"	aktywacja receptorów DREADD hM3Dq na neuronach serotonergicznym
"Glu-"	aktywacja receptorów DREADD HM4Di na neuronach glutaminergicznym
"Glu+"	aktywacja receptorów DREADD hM3Dq na neuronach glutaminergicznym
"Glu-5-HT-"	jednoczesna aktywacja receptorów DREADD HM4Di na neuronach glutaminergicznym i DREADD HM4Di na neuronach serotonergicznym
"Glu-5-HT+"	jednoczesna aktywacja receptorów DREADD HM4Di na neuronach glutaminergicznym i receptorów DREADD hM3Dq na neuronach serotonergicznym
"Glu+5-HT-"	jednoczesna aktywacja receptorów DREADD hM3Dq na neuronach glutaminergicznym i receptorów DREADD HM4Di na neuronach serotonergicznym
"Glu+5-HT+"	jednoczesna aktywacja receptorów DREADD hM3Dq na neuronach glutaminergicznym i DREADD hM3Dq na neuronach serotonergicznym

Odpowiedź kontekstową oceniano na podstawie dwóch parametrów behawioralnych: liczby emitowanych epizodów wokalizacji ultradźwiękowych (USV) o charakterze apetytywnym oraz przebytego dystansu w reakcji na kontekst skojarzony z podaniem substancji. Ponadto, przeprowadzono ilościową analizę poziomu wybranych monoamin i aminokwasów w siedmiu strukturach mózgu z wykorzystaniem spektrometrii mas.

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Conovera oraz algorytmu Boruta. Celem analizy było zbadanie wpływu modyfikacji chemogenetycznych transmisji serotoninerгіczno–glutaminianergicзnej w ciele migdałowatym na liczbę emitowanych apetytywnych USV i dystans przebyty podczas testu reekspozycji na kontekst związany z podaniem morfiny po okresie odstawienia, a także określenie neurochemicznego podłoża badanych zachowań.

Analiza behawioralna wykazała statystycznie istotny spadek liczby apetytywnych epizodów USV, zarejestrowanych podczas testu reekspozycji na kontekst związany z podaniem morfiny po okresie odstawienia, w porównaniu do grupy kontrolnej morfinowej, w dwóch grupach: "5-HT-" ( $p < 0,05$ ) oraz "Glu+5-HT-" ( $p < 0,05$ ), natomiast istotny statystycznie wzrost zaobserwowano w grupie "Glu+5-HT+" ( $p < 0,05$ ) (rys. 8). Analiza poziomu aktywności lokomotorycznej wykazała statystycznie istotny wzrost przebytego dystansu [cm] podczas testu odpowiedzi kontekstowej w stosunku do grupy kontrolnej morfinowej zaobserwowano w pięciu grupach: "5-HT-" ( $p = 0,001$ ), "5-HT+" ( $p < 0,01$ ), "Glu+" ( $p < 0,001$ ), "Glu-" ( $p < 0,01$ ) i "Glu-5-HT-" ( $p < 0,01$ ) (rys. 10). Analiza neurochemiczna ujawniła złożone, odrębne podłoża neurochemiczne obu zachowań.

Badanie przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy można podsumować następującymi wnioskami:

1. Ko-transmisja serotoninerгіczno-glutaminianergicзna w ciele migdałowatym odgrywa istotną rolę w kształtowaniu odpowiedzi kontekstowej związanej z podawaniem morfiny.
2. Brak silnej korelacji między liczbą emitowanych wokalizacji ultradźwiękowych a dystansem pokonanym przez szczury w teście odpowiedzi kontekstowej sugeruje, że odzwierciedlają różne aspekty reakcji na kontekst związany z morfiną: wokalizacje ultradźwiękowe – emocjonalny, podczas gdy aktywność lokomotoryczna – motywacyjny lub związany z redukcją lęku. Ten stan rzeczy

odzwierciedlony jest w relacjach neurochemicznych leżących u podłoża tych zachowań.

3. Dwie z zastosowanych modyfikacji chemogenetycznych w ciele migdałowatym: hamowanie aktywności neurotransmisji serotoninerdycznej ("5-HT-") oraz jednoczesne hamowanie aktywności neurotransmisji serotoninerdycznej i pobudzanie aktywności neurotransmisji glutaminianerdycznej ("Glu+5-HT-"), powodują istotną statystycznie redukcję liczby wokalizacji ultradźwiękowych w paśmie "50-kHz" w teście ponownej ekspozycji na kontekst związany z podawaniem morfiny, po okresie odstawienia.
4. Jedna z zastosowanych modyfikacji chemogenetycznych w ciele migdałowatym, tj. pobudzenie neurotransmisji serotoninerdycznej i neurotransmisji glutaminianerdycznej ("Glu+5-HT+") w ciele migdałowatym powoduje istotne statystycznie zwiększenie liczby wokalizacji ultradźwiękowych w paśmie "50-kHz" w teście ponownej ekspozycji na kontekst związany z podawaniem morfiny, po okresie odstawienia.
5. Podłoże neurochemiczne ekspresji stanu afektywnego poprzez emisję wokalizacji ultradźwiękowych jest złożone i zróżnicowane. Aktywacja odrębnych sieci neurotransmisyjnych może indukować jednakowy efekt behawioralny.

Niniejszy eksperyment uwydatnił złożoność neurobiologicznych podstaw uzależnienia, podkreślając potrzebę holistycznego podejścia w badaniu tego zjawiska.

## 7. Bibliografia

1. **Hasin DS, O'Brien CP, Auriacombe M, Borges G, Bucholz K, et al.** DSM-5 Criteria for Substance Use Disorders: Recommendations and Rationale. *Am J Psychiatry* 2013;170:834–851.
2. **American Psychiatric Association.** *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, Text Revision (DSM-5-TR)*. 5th ed. American Psychiatric Publishing. <https://doi/book/10.1176/appi.books.9780890425787> (2013, accessed 9 October 2024).
3. **World Health Organization (ed).** *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: diagnostic criteria for research*. Geneva: World Health Organization; 1993.
4. **The Centers for Disease Control and Prevention.** Understanding the Opioid Overdose Epidemic. [https://www.cdc.gov/overdose-prevention/about/understanding-the-opioid-overdose-epidemic.html?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/opioids/basics/epidemic.html](https://www.cdc.gov/overdose-prevention/about/understanding-the-opioid-overdose-epidemic.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/opioids/basics/epidemic.html) (2024).
5. **Ciccarone D.** The triple wave epidemic: Supply and demand drivers of the US opioid overdose crisis. *Int J Drug Policy* 2019;71:183–188.
6. **Van Zee A.** The promotion and marketing of oxycontin: commercial triumph, public health tragedy. *Am J Public Health* 2009;99:221–227.
7. **Congressional Research Service (CRS).** *The Opioid Crisis in the United States: A Brief History*. IF12260. <https://crsreports.congress.gov/product/pdf/IF/IF12260> (30 November 2022, accessed 10 October 2024).
8. **Bernard SA, Chelminski PR, Ives TJ, Ranapurwala SI.** Management of Pain in the United States-A Brief History and Implications for the Opioid Epidemic. *Health Serv Insights* 2018;11:1178632918819440.
9. **Lynch M.** Pain as the fifth vital sign. *J Intraven Nurs Off Publ Intraven Nurses Soc* 2001;24:85–94.
10. **Smith J, Roberts R.** *Vital Signs for Nurses: An Introduction to Clinical Observations*. 1st ed. Wiley. Epub ahead of print 21 April 2015. DOI: 10.1002/9781119139119.
11. **National Institute on Drug Abuse.** *Drug Overdose Deaths: Facts and Figures*. <https://nida.nih.gov/research-topics/trends-statistics/overdose-death-rates>.
12. **Stanley TH.** Fentanyl. *J Pain Symptom Manage* 2005;29:67–71.
13. **Spencer MR, Garnett MF, Miniño AM.** *NCHS Data Brief: Drug Overdose Deaths in the United States, 2002–2022*. 491; March 2024.
14. **Substance Abuse Center for Behavioral Health Statistics and Quality.** *Results from 2020 National Survey on Drug Use and Health: Section 5: Substance Use Disorder and Treatment Tables - 5.1 to 5.43*. Substance Abuse and Mental Health Services Administration. <https://www.samhsa.gov/data/release/2020-national-survey-drug-use-and-health-nsduh-releases> (2021, accessed 10 October 2024).
15. **Scavette A.** Exploring the Economic Effects of the Opioid Epidemic. *Econ Insights* 2019;4:1–7.
16. **Singh GK, Kim, Jr. IE, Girmay M, Perry C, Daus GP, et al.** Opioid Epidemic in the United States: Empirical Trends, and A Literature Review of Social Determinants and Epidemiological, Pain Management, and Treatment Patterns. *Int J*

- Matern Child Health AIDS IJMA* 2019;8:89–100.
17. **Joyce VR, Oliva EM, Garcia CC, Trafton J, Asch SM, et al.** Healthcare costs and use before and after opioid overdose in Veterans Health Administration patients with opioid use disorder. *Addiction* 2023;118:2203–2214.
  18. **Florence C, Luo F, Rice K.** The economic burden of opioid use disorder and fatal opioid overdose in the United States, 2017. *Drug Alcohol Depend* 2021;218:108350.
  19. **Chen Q, Sterner G, Segel J, Feng Z.** Trends in opioid-related crime incidents and comparison with opioid overdose outcomes in the United States. *Int J Drug Policy* 2022;101:103555.
  20. **Pierce M, Hayhurst K, Bird SM, Hickman M, Seddon T, et al.** Insights into the link between drug use and criminality: Lifetime offending of criminally-active opiate users. *Drug Alcohol Depend* 2017;179:309–316.
  21. **Radel L, Baldwin M, Crouse G, Ghertner R, Waters A.** *ASPE Research Brief: Substance Use, the Opioid Epidemic, and the Child Welfare System: Key Findings from a Mixed Methods Study*. U.S. Department of Health and Human Services. [https://www.aspe.hhs.gov/sites/default/files/migrated\\_legacy\\_files/179966/SubstanceUseChildWelfareOverview.pdf](https://www.aspe.hhs.gov/sites/default/files/migrated_legacy_files/179966/SubstanceUseChildWelfareOverview.pdf) (7 March 2018, accessed 10 October 2024).
  22. **Dasgupta N, Beletsky L, Ciccarone D.** Opioid Crisis: No Easy Fix to Its Social and Economic Determinants. *Am J Public Health* 2018;108:182–186.
  23. **Phillips J, Ford M, Bonnie R.** *Pain Management and the Opioid Epidemic: Balancing Societal and Individual Benefits and Risks of Prescription Opioid Use*. Washington (DC): National Academies Press (US); National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Health Sciences Policy; Committee on Pain Management and Regulatory Strategies to Address Prescription Opioid Abuse. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK458653/> (2017, accessed 10 October 2024).
  24. **Government of British Columbia.** *Provincial health officer declares public health emergency*. <https://news.gov.bc.ca/releases/2016hlth0026-000568> (14 April 2016, accessed 10 October 2024).
  25. **Government of Canada.** *Opioid- and Stimulant-related Harms in Canada*. <https://health-infobase.canada.ca/substance-related-harms/opioids-stimulants/> (13 September 2024, accessed 10 October 2024).
  26. **United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC).** *World Drug Report 2024: Contemporary issues on drugs*. United Nations publication. [https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR\\_2024/WDR24\\_Contemporary\\_issues.pdf](https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR_2024/WDR24_Contemporary_issues.pdf) (2024, accessed 10 October 2024).
  27. **United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC).** *Illicit Drug Trends in Central Asia*. Regional Office for Central Asia: United Nations publication. [https://www.unodc.org/documents/regional/central-asia/Illicit%20Drug%20Trends\\_Central%20Asia-final.pdf](https://www.unodc.org/documents/regional/central-asia/Illicit%20Drug%20Trends_Central%20Asia-final.pdf) (2008, accessed 10 October 2024).
  28. **European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA).** *Heroin and other opioids – the current situation in Europe (European Drug Report 2024)*. European Union Drugs Agency. [https://www.euda.europa.eu/sites/default/files/pdf/31876\\_en.pdf?243731](https://www.euda.europa.eu/sites/default/files/pdf/31876_en.pdf?243731) (2024, accessed 10 October 2024).
  29. **European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.** *European drug report 2024*. LU: Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2810/91693>



- (2024, accessed 10 October 2024).
30. **Australian Institute of Health and Welfare.** *Opioid harm in Australia and comparisons between Australia and Canada.* Cat. no. HSE 210; Canberra: AIHW. <https://www.aihw.gov.au/reports/illicit-use-of-drugs/opioid-harm-in-australia/summary> (2018, accessed 10 October 2024).
  31. **Australian Bureau of Statistics.** *Opioid-induced deaths in Australia.* <https://www.abs.gov.au/articles/opioid-induced-deaths-australia> (25 September 2019, accessed 10 October 2024).
  32. **Boun SS, Omonaiye O, Yaya S.** Prevalence and health consequences of nonmedical use of tramadol in Africa: A systematic scoping review. *PLOS Glob Public Health* 2024;4:e0002784.
  33. **United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC).** *Regional Overview: Africa.* United Nations publication. [https://www.unodc.org/documents/scientific/Regional\\_Overview\\_Africa.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Regional_Overview_Africa.pdf) (2020, accessed 10 October 2024).
  34. **Pacurucu-Castillo SF, Ordóñez-Mancheno JM, Hernández-Cruz A, Alarcón RD.** World Opioid and Substance Use Epidemic: A Latin American Perspective. *Psychiatr Res Clin Pract* 2019;1:32–38.
  35. **Furlan AD, Harvey AM, Chadha R.** Warning from Canada: Latin America, South Africa and India may face an opioid epidemic in the coming years. *J Glob Health* 2020;10:010324.
  36. **Wise RA, Koob GF.** The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2014;39:254–262.
  37. **Kranzler HR, Li T-K.** What is addiction? *Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol* 2008;31:93–95.
  38. **McLellan AT.** Substance Misuse and Substance use Disorders: Why do they Matter in Healthcare? *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2017;128:112–130.
  39. **Volkow ND, Blanco C.** Substance use disorders: a comprehensive update of classification, epidemiology, neurobiology, clinical aspects, treatment and prevention. *World Psychiatry* 2023;22:203–229.
  40. **Ifland JR, Preuss HG, Marcus MT, Rourke KM, Taylor WC, et al.** Refined food addiction: A classic substance use disorder. *Med Hypotheses* 2009;72:518–526.
  41. **Semaan A, Khan MK.** Neurobiology of Addiction. In: *In: StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK597351/> (2024, accessed 1 August 2024).
  42. **Ferrer-Pérez C, Montagud-Romero S, Blanco-Gandía MC.** Neurobiological Theories of Addiction: A Comprehensive Review. *Psychoactives* 2024;3:35–47.
  43. **Institute of Medicine (US) Committee on Opportunities in Drug Abuse Research.** *Pathways of Addiction: Opportunities in Drug Abuse Research.* Washington (DC): National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232972/> (1996, accessed 10 October 2024).
  44. **Lüscher C, Robbins TW, Everitt BJ.** The transition to compulsion in addiction. *Nat Rev Neurosci* 2020;21:247–263.
  45. **Tatum AL, Seevers MH.** THEORIES OF DRUG ADDICTION. *Physiol Rev* 1931;11:107–121.
  46. **Maldonado R.** *Molecular biology of drug addiction.* Totowa, N.J: Humana Press; 2003.
  47. **Robinson TE.** Addicted Rats. *Science* 2004;305:951–953.

48. **Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV.** Evidence for Addiction-like Behavior in the Rat. *Science* 2004;305:1014–1017.
49. **Vanderschuren LJMJ, Everitt BJ.** Drug Seeking Becomes Compulsive After Prolonged Cocaine Self-Administration. *Science* 2004;305:1017–1019.
50. **Steketee JD, Kalivas PW.** Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev* 2011;63:348–365.
51. **Fuchs RA, Lasseter HC, Ramirez DR, Xie X.** Relapse to drug seeking following prolonged abstinence: the role of environmental stimuli. *Drug Discov Today Dis Models* 2008;5:251–258.
52. **Wand G.** The influence of stress on the transition from drug use to addiction. *Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol* 2008;31:119–136.
53. **Samson HH, Chappell A, Slawecki C, Hodge C.** The Effects of Microinjection of d-Amphetamine Into The N. Accumbens During the Late Maintenance Phase of an Ethanol Consumption Bout. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;63:159–165.
54. **Lerner A, Klein M.** Dependence, withdrawal and rebound of CNS drugs: an update and regulatory considerations for new drugs development. *Brain Commun* 2019;1:fcz025.
55. **Kuhn BN, Kalivas PW, Bobadilla A-C.** Understanding Addiction Using Animal Models. *Front Behav Neurosci* 2019;13:262.
56. **Koob GF, Volkow ND.** Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 2016;3:760–773.
57. **Skinner BF.** Two Types of Conditioned Reflex: A Reply to Konorski and Miller. *J Gen Psychol* 1937;16:272–279.
58. **Staddon JER, Cerutti DT.** Operant Conditioning. *Annu Rev Psychol* 2003;54:115–144.
59. **Skinner BF.** *Science and human behavior.* 2014th ed. <https://www.bfskinner.org/newtestsite/wp-content/uploads/2014/02/ScienceHumanBehavior.pdf> (1965, accessed 11 October 2024).
60. **Schultz W.** Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data. *Physiol Rev* 2015;95:853–951.
61. **Schultz W.** Multiple reward signals in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2000;1:199–207.
62. **Koob GF, Volkow ND.** Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:217–238.
63. **Volkow ND, Morales M.** The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell* 2015;162:712–725.
64. **Le Merrer J, Becker JAJ, Befort K, Kieffer BL.** Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiol Rev* 2009;89:1379–1412.
65. **Crowley TJ.** The reinforcers for drug abuse: Why people take drugs. *Compr Psychiatry* 1972;13:51–62.
66. **Robinson TE, Berridge KC.** The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 1993;18:247–291.
67. **Nestler EJ.** Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:119–128.
68. **Hearing MC, Zink AN, Wickman K.** Cocaine-induced adaptations in metabotropic inhibitory signaling in the mesocorticolimbic system. *Rev Neurosci*;23. Epub ahead of print 1 January 2012. DOI: 10.1515/revneuro-2012-0045.
69. **Everitt BJ, Robbins TW.** Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 2005;8:1481–1489.
70. **Koob GF.** Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. *Curr Opin*

- Neurobiol* 2013;23:559–563.
71. **Pietrzykowski AZ, Treistman SN.** The molecular basis of tolerance. *Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol* 2008;31:298–309.
  72. **Rohrig TP.** Tolerance. In: *Postmortem Toxicology*. Elsevier. pp. 221–240.
  73. **Collett BJ.** Opioid tolerance: the clinical perspective. *Br J Anaesth* 1998;81:58–68.
  74. **Gamble MC, Williams BR, Singh N, Posa L, Freyberg Z, et al.** Mu-opioid receptor and receptor tyrosine kinase crosstalk: Implications in mechanisms of opioid tolerance, reduced analgesia to neuropathic pain, dependence, and reward. *Front Syst Neurosci* 2022;16:1059089.
  75. **Dumas EO, Pollack GM.** Opioid Tolerance Development: A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Perspective. *AAPS J* 2008;10:537.
  76. **Morgan MM, Christie MJ.** Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br J Pharmacol* 2011;164:1322–1334.
  77. **Jage J.** Opioid tolerance and dependence — do they matter? *Eur J Pain* 2005;9:157–162.
  78. **Eidson LN, Murphy AZ.** Inflammatory mediators of opioid tolerance: Implications for dependency and addiction. *Peptides* 2019;115:51–58.
  79. **Mathews JL, Smrcka AV, Bidlack JM.** A Novel Gβγ-Subunit Inhibitor Selectively Modulates μ-Opioid-Dependent Antinociception and Attenuates Acute Morphine-Induced Antinociceptive Tolerance and Dependence. *J Neurosci* 2008;28:12183–12189.
  80. **Christie MJ.** Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 2008;154:384–396.
  81. **Dang VC, Christie MJ.** Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *Br J Pharmacol* 2012;165:1704–1716.
  82. **Williams JT, Christie MJ, Manzoni O.** Cellular and Synaptic Adaptations Mediating Opioid Dependence. *Physiol Rev* 2001;81:299–343.
  83. **Keith DE, Anton B, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, et al.** mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Mol Pharmacol* 1998;53:377–384.
  84. **Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, et al.** Morphine Activates Opioid Receptors without Causing Their Rapid Internalization. *J Biol Chem* 1996;271:19021–19024.
  85. **Onogi T, Minami M, Katao Y, Nakagawa T, Aoki Y, et al.** DAMGO, a μ-opioid receptor selective agonist, distinguishes between μ- and δ-opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett* 1995;357:93–97.
  86. **Haberstock-Debic H, Wein M, Barrot M, Colago EEO, Rahman Z, et al.** Morphine Acutely Regulates Opioid Receptor Trafficking Selectively in Dendrites of Nucleus Accumbens Neurons. *J Neurosci* 2003;23:4324–4332.
  87. **Connor M, Osborne PB, Christie MJ.** μ -Opioid receptor desensitization: Is morphine different? *Br J Pharmacol* 2004;143:685–696.
  88. **Whistler JL, Chuang H, Chu P, Jan LY, Von Zastrow M.** Functional Dissociation of μ Opioid Receptor Signaling and Endocytosis. *Neuron* 1999;23:737–746.
  89. **Alvarez VA, Arttamangkul S, Dang V, Salem A, Whistler JL, et al.** μ-Opioid Receptors: Ligand-Dependent Activation of Potassium Conductance, Desensitization, and Internalization. *J Neurosci* 2002;22:5769–5776.
  90. **Koch T, Höllt V.** Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Ther* 2008;117:199–206.

91. **Williams JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, et al.** Regulation of  $\mu$ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev* 2013;65:223–254.
92. **Shen J, Benedict Gomes A, Gallagher A, Stafford K, Yoburn BC.** Role of cAMP-dependent protein kinase (PKA) in opioid agonist-induced  $\mu$ -opioid receptor downregulation and tolerance in mice. *Synapse* 2000;38:322–327.
93. **Watts VJ, Neve KA.** Sensitization of adenylate cyclase by Gai/o-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 2005;106:405–421.
94. **Bagley EE, Chieng BCH, Christie MJ, Connor M.** Opioid tolerance in periaqueductal gray neurons isolated from mice chronically treated with morphine. *Br J Pharmacol* 2005;146:68–76.
95. **Kramer HK, Simon EJ.**  $\mu$  and  $\delta$ -opioid receptor agonists induce mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the absence of receptor internalization. *Neuropharmacology* 2000;39:1707–1719.
96. **Li LY, Chang KJ.** The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1996;50:599–602.
97. **Deng M, Chen S, Chen H, Luo Y, Dong Y, et al.** Mitogen-activated protein kinase signaling mediates opioid-induced presynaptic NMDA receptor activation and analgesic tolerance. *J Neurochem* 2019;148:275–290.
98. **Trapaizze N, Gomes I, Cvejic S, Bansinath M, Devi LA.** Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Mol Brain Res* 2000;76:220–228.
99. **Mouledous L, Diaz M, Gutstein H.** Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibition does not prevent the development or expression of tolerance to and dependence on morphine in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;88:39–46.
100. **Bilecki W, Zapart G, Ligęza A, Wawrzczak-Bargiela A, Urbański MJ, et al.** Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2369–2375.
101. **Ueda H, Inoue M, Matsumoto T.** Protein Kinase C-Mediated Inhibition of  $\mu$ -Opioid Receptor Internalization and Its Involvement in the Development of Acute Tolerance to Peripheral  $\mu$ -Agonist Analgesia. *J Neurosci* 2001;21:2967–2973.
102. **Narita M, Makimura M, Feng Y, Hoskins B, Ho IK.** Influence of chronic morphine treatment on protein kinase C activity: comparison with butorphanol and implication for opioid tolerance. *Brain Res* 1994;650:175–179.
103. **Pena DA, Duarte ML, Pramio DT, Devi LA, Schechtman D.** Exploring Morphine-Triggered PKC-Targets and Their Interaction with Signaling Pathways Leading to Pain via TrkA. *Proteomes* 2018;6:39.
104. **Liang L, Zhao J-Y, Gu X, Wu S, Mo K, et al.** G9a inhibits CREB-triggered expression of mu opioid receptor in primary sensory neurons following peripheral nerve injury. *Mol Pain* 2016;12:1744806916682242.
105. **Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Wallace T, Gilden L, Zachariou V, et al.** Regional and Cellular Mapping of cAMP Response Element-Mediated Transcription during Naltrexone-Precipitated Morphine Withdrawal. *J Neurosci* 2002;22:3663–3672.
106. **Reddy D, Wickman JR, Ajit SK.** Epigenetic regulation in opioid induced hyperalgesia. *Neurobiol Pain* 2023;14:100146.
107. **Han M-H, Bolaños CA, Green TA, Olson VG, Neve RL, et al.** Role of cAMP Response Element-Binding Protein in the Rat Locus Ceruleus: Regulation of Neuronal Activity and Opiate Withdrawal Behaviors. *J Neurosci* 2006;26:4624–

- 4629.
108. **Carlezonjr W, Duman R, Nestler E.** The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 2005;28:436–445.
  109. **Dong Y, Green T, Saal D, Marie H, Neve R, et al.** CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nat Neurosci* 2006;9:475–477.
  110. **Pu L, Bao G-B, Xu N-J, Ma L, Pei G.** Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2002;22:1914–1921.
  111. **Drdla R, Gassner M, Gingl E, Sandkühler J.** Induction of Synaptic Long-Term Potentiation After Opioid Withdrawal. *Science* 2009;325:207–210.
  112. **Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ.** NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:565–598.
  113. **Kauer JA, Malenka RC.** Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:844–858.
  114. **Cahill CM, Walwyn W, Taylor AMW, Pradhan AAA, Evans CJ.** Allostatic Mechanisms of Opioid Tolerance Beyond Desensitization and Downregulation. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:963–976.
  115. **Shen H, Kalivas PW.** Reduced LTP and LTD in prefrontal cortex synapses in the nucleus accumbens after heroin self-administration. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16:1165–1167.
  116. **Mussetto V, Teuchmann HL, Heinke B, Trofimova L, Sandkühler J, et al.** Opioids Induce Bidirectional Synaptic Plasticity in a Brainstem Pain Center in the Rat. *J Pain* 2023;24:1664–1680.
  117. **Collett BJ.** Opioid tolerance: the clinical perspective. *Br J Anaesth* 1998;81:58–68.
  118. **Tiffany ST, Wray JM.** The clinical significance of drug craving. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1248:1–17.
  119. **López-Guerrero J, Navas JF, Perales JC, Rivero FJ, Muela I.** The Interrelation Between Emotional Impulsivity, Craving, and Symptoms Severity in Behavioral Addictions and Related Conditions: a Theory-Driven Systematic Review. *Curr Addict Rep* 2023;10:718–736.
  120. **Skinner MD, Aubin H-J.** Craving's place in addiction theory: Contributions of the major models. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;34:606–623.
  121. **Cless MM, Courchesne-Krak NS, Bhatt KV, Mittal ML, Marienfeld CB.** Craving among patients seeking treatment for substance use disorder. *Discov Ment Health* 2023;3:23.
  122. **Gawin FH.** Abstinence Symptomatology and Psychiatric Diagnosis in Cocaine Abusers: Clinical Observations. *Arch Gen Psychiatry* 1986;43:107.
  123. **Abrams DB, Monti PM, Carey KB, Pinto RP, Jacobus SI.** Reactivity to smoking cues and relapse: Two studies of discriminant validity. *Behav Res Ther* 1988;26:225–233.
  124. **Drummond DC, Cooper T, Glautier SP.** Conditioned learning in alcohol dependence: implications for cue exposure treatment. *Br J Addict* 1990;85:725–743.
  125. **Drummond DC.** What does cue-reactivity have to offer clinical research? *Addiction* 2000;95:129–144.
  126. **George MS, Anton RF, Bloomer C, Teneback C, Drobles DJ, et al.** Activation of Prefrontal Cortex and Anterior Thalamus in Alcoholic Subjects on Exposure to Alcohol-Specific Cues. *Arch Gen Psychiatry* 2001;58:345.
  127. **Li Q, Wang Y, Zhang Y, Li W, Yang W, et al.** Craving correlates with mesolimbic responses to heroin-related cues in short-term abstinence from heroin: An event-

- related fMRI study. *Brain Res* 2012;1469:63–72.
128. **Li P, Wu P, Xin X, Fan Y-L, Wang G-B, et al.** Incubation of alcohol craving during abstinence in patients with alcohol dependence: Incubation in alcoholics. *Addict Biol* 2015;20:513–522.
  129. **Parvaz MA, Moeller SJ, Goldstein RZ.** Incubation of Cue-Induced Craving in Adults Addicted to Cocaine Measured by Electroencephalography. *JAMA Psychiatry* 2016;73:1127.
  130. **Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y.** Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* 2001;412:141–142.
  131. **Shalev U, Morales M, Hope B, Yap J, Shaham Y.** Time-dependent changes in extinction behavior and stress-induced reinstatement of drug seeking following withdrawal from heroin in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156:98–107.
  132. **Shepard JD, Bossert JM, Liu SY, Shaham Y.** The anxiogenic drug yohimbine reinstates methamphetamine seeking in a rat model of drug relapse. *Biol Psychiatry* 2004;55:1082–1089.
  133. **Abdolahi A, Acosta G, Breslin FJ, Hemby SE, Lynch WJ.** Incubation of nicotine seeking is associated with enhanced protein kinase A-regulated signaling of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in the insular cortex. *Eur J Neurosci* 2010;31:733–741.
  134. **Bienkowski P.** Time-dependent changes in alcohol-seeking behaviour during abstinence. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14:355–360.
  135. **Grimm JW, Shaham Y, Hope BT.** Effect of cocaine and sucrose withdrawal period on extinction behavior, cue-induced reinstatement, and protein levels of the dopamine transporter and tyrosine hydroxylase in limbic and cortical areas in rats: *Behav Pharmacol* 2002;13:379–388.
  136. **Hamed A, Kursu MB.** Inter-individual differences in serotonin and glutamate co-transmission reflect differentiation in context-induced conditioned 50-kHz USVs response after morphine withdrawal. *Brain Struct Funct* 2018;223:3149–3167.
  137. **Li X, Caprioli D, Marchant NJ.** Recent updates on incubation of drug craving: a mini-review. *Addict Biol* 2015;20:872–876.
  138. **Fredriksson I, Applebey SV, Minier-Toribio A, Shekara A, Bossert JM, et al.** Effect of the dopamine stabilizer (-)-OSU6162 on potentiated incubation of opioid craving after electric barrier-induced voluntary abstinence. *Neuropsychopharmacology* 2020;45:770–779.
  139. **Venniro M, Reverte I, Ramsey LA, Papastrat KM, D’Ottavio G, et al.** Factors modulating the incubation of drug and non-drug craving and their clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 2021;131:847–864.
  140. **Conrad KL, Tseng KY, Uejima JL, Reimers JM, Heng L-J, et al.** Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature* 2008;454:118–121.
  141. **Sesack SR, Grace AA.** Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:27–47.
  142. **Wolf ME.** Synaptic mechanisms underlying persistent cocaine craving. *Nat Rev Neurosci* 2016;17:351–365.
  143. **Wolf ME, Tseng KY.** Calcium-permeable AMPA receptors in the VTA and nucleus accumbens after cocaine exposure: when, how, and why? *Front Mol Neurosci*;5. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.3389/fnmol.2012.00072.
  144. **Ma Y-Y, Lee BR, Wang X, Guo C, Liu L, et al.** Bidirectional Modulation of Incubation of Cocaine Craving by Silent Synapse-Based Remodeling of Prefrontal Cortex to Accumbens Projections. *Neuron* 2014;83:1453–1467.

145. **Tran-Nguyen, Ph.D. L.** Time-Dependent Changes in Cocaine-Seeking Behavior and Extracellular Dopamine Levels in the Amygdala during Cocaine Withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 1998;19:48–59.
146. **Li X, Zeric T, Kambhampati S, Bossert JM, Shaham Y.** The Central Amygdala Nucleus is Critical for Incubation of Methamphetamine Craving. *Neuropsychopharmacology* 2015;40:1297–1306.
147. **Purgianto A, Scheyer AF, Loweth JA, Ford KA, Tseng KY, et al.** Different Adaptations in AMPA Receptor Transmission in the Nucleus Accumbens after Short vs Long Access Cocaine Self-Administration Regimens. *Neuropsychopharmacology* 2013;38:1789–1797.
148. **Purgianto A, Weinfeld ME, Wolf ME.** Prolonged withdrawal from cocaine self-administration affects prefrontal cortex- and basolateral amygdala–nucleus accumbens core circuits but not accumbens GABAergic local interneurons. *Addict Biol* 2017;22:1682–1694.
149. **Pascoli V, Terrier J, Espallergues J, Valjent E, O’Connor EC, et al.** Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* 2014;509:459–464.
150. **Guillem K, Ahmed SH, Peoples LL.** Escalation of Cocaine Intake and Incubation of Cocaine Seeking Are Correlated with Dissociable Neuronal Processes in Different Accumbens Subregions. *Biol Psychiatry* 2014;76:31–39.
151. **Aoyama K, Barnes J, Grimm JW.** Incubation of saccharin craving and within-session changes in responding for a cue previously associated with saccharin. *Appetite* 2014;72:114–122.
152. **Liu X, Yuan K, Lu T, Lin X, Zheng W, et al.** Preventing incubation of drug craving to treat drug relapse: from bench to bedside. *Mol Psychiatry* 2023;28:1415–1429.
153. **Berridge KC.** The debate over dopamine’s role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;191:391–431.
154. **Ikemoto S, Panksepp J.** The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Rev* 1999;31:6–41.
155. **Salamone JD, Correa M.** Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res* 2002;137:3–25.
156. **Di Chiara G.** Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 2002;137:75–114.
157. **Thompson B, Leonard KC, Brudzynski SM.** Amphetamine-induced 50kHz calls from rat nucleus accumbens: A quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behav Brain Res* 2006;168:64–73.
158. **Brudzynski SM.** Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol* 2013;23:310–317.
159. **Lee BR, Ma Y-Y, Huang YH, Wang X, Otaka M, et al.** Maturation of silent synapses in amygdala–accumbens projection contributes to incubation of cocaine craving. *Nat Neurosci* 2013;16:1644–1651.
160. **Graziane NM, Sun S, Wright WJ, Jang D, Liu Z, et al.** Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses. *Nat Neurosci* 2016;19:915–925.
161. **Huang YH, Lin Y, Mu P, Lee BR, Brown TE, et al.** In Vivo Cocaine Experience Generates Silent Synapses. *Neuron* 2009;63:40–47.
162. **Kerchner GA, Nicoll RA.** Silent synapses and the emergence of a postsynaptic

- mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:813–825.
163. **Liao D, Zhang X, O'Brien R, Ehlers MD, Huganir RL.** Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 1999;2:37–43.
  164. **Hanse E, Seth H, Riebe I.** AMPA-silent synapses in brain development and pathology. *Nat Rev Neurosci* 2013;14:839–850.
  165. **Dong Y.** Silent Synapse-Based Circuitry Remodeling in Drug Addiction. *Int J Neuropsychopharmacol* 2016;19:pyv136.
  166. **Uejima JL, Bossert JM, Poles GC, Lu L.** Systemic and central amygdala injections of the mGluR2/3 agonist LY379268 attenuate the expression of incubation of sucrose craving in rats. *Behav Brain Res* 2007;181:292–296.
  167. **Li Y-Q, Li F-Q, Wang X-Y, Wu P, Zhao M, et al.** Central Amygdala Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway Is Critical to Incubation of Opiate Craving. *J Neurosci* 2008;28:13248–13257.
  168. **Funk D, Coen K, Tamadon S, Hope BT, Shaham Y, et al.** Role of Central Amygdala Neuronal Ensembles in Incubation of Nicotine Craving. *J Neurosci* 2016;36:8612–8623.
  169. **Lu L, Hope BT, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, et al.** Central amygdala ERK signaling pathway is critical to incubation of cocaine craving. *Nat Neurosci* 2005;8:212–219.
  170. **Lu L, Dempsey J, Shaham Y, Hope BT.** Differential long-term neuroadaptations of glutamate receptors in the basolateral and central amygdala after withdrawal from cocaine self-administration in rats. *J Neurochem* 2005;94:161–168.
  171. **Lu L, Uejima JL, Gray SM, Bossert JM, Shaham Y.** Systemic and Central Amygdala Injections of the mGluR2/3 Agonist LY379268 Attenuate the Expression of Incubation of Cocaine Craving. *Biol Psychiatry* 2007;61:591–598.
  172. **Langleben DD, Ruparel K, Elman I, Busch-Winokur S, Pratiwadi R, et al.** Acute Effect of Methadone Maintenance Dose on Brain fMRI Response to Heroin-Related Cues. *Am J Psychiatry* 2008;165:390–394.
  173. **Langleben DD, Ruparel K, Elman I, Loughhead JW, Busch EL, et al.** Extended-release naltrexone modulates brain response to drug cues in abstinent heroin-dependent patients. *Addict Biol* 2014;19:262–271.
  174. **Mei W, Zhang JX, Xiao Z.** Acute effects of sublingual buprenorphine on brain responses to heroin-related cues in early-abstinent heroin addicts: an uncontrolled trial. *Neuroscience* 2010;170:808–815.
  175. **Murphy A, Lubman DI, McKie S, Bijral PS, Peters LA, et al.** Time-dependent neuronal changes associated with craving in opioid dependence: an fMRI study. *Addict Biol* 2018;23:1168–1178.
  176. **Hinton DJ, Lee MR, Jacobson TL, Mishra PK, Frye MA, et al.** Ethanol withdrawal-induced brain metabolites and the pharmacological effects of acamprosate in mice lacking ENT1. *Neuropharmacology* 2012;62:2480–2488.
  177. **Hamed A, Taracha E, Szyndler J, Krząćik P, Lehner M, et al.** The effects of morphine and morphine conditioned context on 50kHz ultrasonic vocalisation in rats. *Behav Brain Res* 2012;229:447–450.
  178. **Roth BL.** DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 2016;89:683–694.
  179. **Johns P.** Overview of the nervous system. In: *Clinical Neuroscience*. Elsevier. pp. 1–17.
  180. **Lovinger DM.** Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol* 2008;31:196–214.



181. **Purves D (ed).** *Neuroscience*. 5th ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 2012.
182. **Kral A, Aplin F, Maier H.** Neuronal excitation. In: *Prostheses for the Brain*. Elsevier. pp. 55–75.
183. **Alberts B, Johnson A, Lewis J.** *General Principles of Cell Communication*. 4th ed. New York: Garland Science. Upon binding, activation of these receptors transmits signals to the appropriate effector elements within the cell, initiating a cascade of intracellular events that ultimately alter the excitability of the postsynaptic neuron. (2002, accessed 28 October 2024).
184. **Kandel ER (ed).** *Principles of neural science*. 5. ed. New York London: McGraw-Hill Medical; 2013.
185. **Deutch AY.** Neurotransmitters. In: *Fundamental Neuroscience*. Elsevier. pp. 117–138.
186. **Deutch AY, Roth RH.** Pharmacology and Biochemistry of Synaptic Transmission: Classic Transmitters. In: *From Molecules to Networks*. Elsevier. pp. 245–278.
187. **Siegel GJ (ed).** *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999.
188. **Tansey EM.** Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C R Biol* 2006;329:419–425.
189. **Teleanu RI, Niculescu A-G, Roza E, Vladâcenco O, Grumezescu AM, et al.** Neurotransmitters—Key Factors in Neurological and Neurodegenerative Disorders of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 2022;23:5954.
190. **Leonelli M, Torrão AS, Britto LRG.** Unconventional neurotransmitters, neurodegeneration and neuroprotection. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:68–75.
191. **Heinbockel T, Wang Z-J.** Cellular Mechanisms of Action of Drug Abuse on Olfactory Neurons. *Int J Environ Res Public Health* 2015;13:5.
192. **Herlenius E, Lagercrantz H.** Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol* 2004;190:8–21.
193. **Wu Z, Lin D, Li Y.** Pushing the frontiers: tools for monitoring neurotransmitters and neuromodulators. *Nat Rev Neurosci* 2022;23:257–274.
194. **Borodinsky LN, Belgacem YH, Swapna I, Sequerra EB.** Dynamic regulation of neurotransmitter specification: Relevance to nervous system homeostasis. *Neuropharmacology* 2014;78:75–80.
195. **Moini J, LoGalbo A, Ahangari R.** Neurotransmitters and synaptic transmission. In: *Foundations of the Mind, Brain, and Behavioral Relationships*. Elsevier. pp. 63–70.
196. **Barańska J, Nowak JZ, Zawilska JB (eds).** *Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału*. Wyd. 2 rozsz. Warszawa: Wydaw. Naukowe PWN; 2004.
197. **Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL.** Opioid Receptors. *Annu Rev Biochem* 2004;73:953–990.
198. **Lovinger DM, Mateo Y, Johnson KA, Engi SA, Antonazzo M, et al.** Local modulation by presynaptic receptors controls neuronal communication and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2022;23:191–203.
199. **Langer SZ.** Presynaptic autoreceptors regulating transmitter release. *Neurochem Int* 2008;52:26–30.
200. **Ferré S, Agnati LF, Ciruela F, Lluís C, Woods AS, et al.** Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in ‘local modules’: the striatal spine module. *Brain Res Rev* 2007;55:55–67.
201. **Pereda AE.** Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci* 2014;15:250–263.
202. **Waller DG, Sampson AP.** Neurotransmission and the peripheral autonomic nervous system. In: *Medical Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier. pp. 73–90.

203. **Su J, Song Y, Zhu Z, Huang X, Fan J, et al.** Cell–cell communication: new insights and clinical implications. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9:196.
204. **Bear MF, Connors BW, Paradiso MA.** *Neuroscience: exploring the brain*. Fourth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2016.
205. **Luo L.** *Principles of neurobiology*. New York London: Garland Science Taylor & Francis Group; 2016.
206. **Barrera NP, Edwardson JM.** The subunit arrangement and assembly of ionotropic receptors. *Trends Neurosci* 2008;31:569–576.
207. **Salon JA, Lodowski DT, Palczewski K.** The Significance of G Protein-Coupled Receptor Crystallography for Drug Discovery. *Pharmacol Rev* 2011;63:901–937.
208. **Michael-Titus A, Revest P, Shortland P.** ELEMENTS OF CELLULAR AND MOLECULAR NEUROSCIENCE. In: *The Nervous System*. Elsevier. pp. 31–46.
209. **Kamato D, Thach L, Bernard R, Chan V, Zheng W, et al.** Structure, Function, Pharmacology, and Therapeutic Potential of the G Protein, Ga/q,11. *Front Cardiovasc Med* 2015;2:14.
210. **Roth BL.** Molecular pharmacology of metabotropic receptors targeted by neuropsychiatric drugs. *Nat Struct Mol Biol* 2019;26:535–544.
211. **Mehta A, Patel BM.** Therapeutic opportunities in colon cancer: Focus on phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci* 2019;230:150–161.
212. **Falzone ME, MacKinnon R.** G $\beta\gamma$  activates PIP2 hydrolysis by recruiting and orienting PLC $\beta$  on the membrane surface. *Proc Natl Acad Sci* 2023;120:e2301121120.
213. **Weis WI, Kobilka BK.** The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem* 2018;87:897–919.
214. **Liu Y, An S, Ward R, Yang Y, Guo X-X, et al.** G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Lett* 2016;376:226–239.
215. **Gurevich V, Gurevich E.** Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *Int J Mol Sci* 2017;18:2519.
216. **Boczek T, Mackiewicz J, Sobolczyk M, Wawrzyniak J, Lisek M, et al.** The Role of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) and Calcium Signaling in Schizophrenia. Focus on GPCRs Activated by Neurotransmitters and Chemokines. *Cells* 2021;10:1228.
217. **Mahesh G, Jaiswal P, Dey S, Sengupta J, Mukherjee S.** Cloning, Expression, Purification and Characterization of Oligomeric States of the Native 5HT2A G-Protein-Coupled Receptor. *Protein Pept Lett* 2018;25:390–397.
218. **Yang D, Zhou Q, Labroska V, Qin S, Darbalaei S, et al.** G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:7.
219. **Sriram K, Insel PA.** G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol* 2018;93:251–258.
220. **Urs NM, Peterson SM, Caron MG.** New Concepts in Dopamine D2 Receptor Biased Signaling and Implications for Schizophrenia Therapy. *Biol Psychiatry* 2017;81:78–85.
221. **Daniel J, Clark R.** G-Protein Coupled Receptors Targeted by Analgesic Venom Peptides. *Toxins* 2017;9:372.
222. **Sternson SM, Roth BL.** Chemogenetic Tools to Interrogate Brain Functions. *Annu Rev Neurosci* 2014;37:387–407.
223. **Roth BL.** How structure informs and transforms chemogenetics. *Curr Opin Struct Biol* 2019;57:9–16.
224. **Whissell PD, Tohyama S, Martin LJ.** The Use of DREADDs to Deconstruct

- Behavior. *Front Genet*;7. Epub ahead of print 17 May 2016. DOI: 10.3389/fgene.2016.00070.
225. **Hui Y, Zheng X, Zhang H, Li F, Yu G, et al.** Strategies for Targeting Neural Circuits: How to Manipulate Neurons Using Virus Vehicles. *Front Neural Circuits* 2022;16:882366.
  226. **Zhang S, Gumpner RH, Huang X-P, Liu Y, Krumm BE, et al.** Molecular basis for selective activation of DREADD-based chemogenetics. *Nature* 2022;612:354–362.
  227. **Akhmedov D, Mendoza-Rodriguez MG, Rajendran K, Rossi M, Wess J, et al.** Gs-DREADD Knock-In Mice for Tissue-Specific, Temporal Stimulation of Cyclic AMP Signaling. *Mol Cell Biol* 2017;37:e00584-16.
  228. **El-Shamayleh Y, Ni AM, Horwitz GD.** Strategies for targeting primate neural circuits with viral vectors. *J Neurophysiol* 2016;116:122–134.
  229. **Liu Y, Hegarty S, Winter C, Wang F, He Z.** Viral vectors for neuronal cell type-specific visualization and manipulations. *Curr Opin Neurobiol* 2020;63:67–76.
  230. **Ghosh S, Brown AM, Jenkins C, Campbell K.** Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Appl Biosaf* 2020;25:7–18.
  231. **Shirley JL, De Jong YP, Terhorst C, Herzog RW.** Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. *Mol Ther* 2020;28:709–722.
  232. **Nieuwenhuis B, Haenzi B, Hilton S, Carnicer-Lombarte A, Hobo B, et al.** Optimization of adeno-associated viral vector-mediated transduction of the corticospinal tract: comparison of four promoters. *Gene Ther* 2021;28:56–74.
  233. **Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G.** Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:53.
  234. **Gray SJ, Foti SB, Schwartz JW, Bachaboina L, Taylor-Blake B, et al.** Optimizing Promoters for Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in the Peripheral and Central Nervous System Using Self-Complementary Vectors. *Hum Gene Ther* 2011;22:1143–1153.
  235. **López AJ, Kramár E, Matheos DP, White AO, Kwapis J, et al.** Promoter-Specific Effects of DREADD Modulation on Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory Formation. *J Neurosci* 2016;36:3588–3599.
  236. **Campbell EJ, Marchant NJ.** The use of chemogenetics in behavioural neuroscience: receptor variants, targeting approaches and caveats. *Br J Pharmacol* 2018;175:994–1003.
  237. **Liu J, Li D, Huang J, Cao J, Cai G, et al.** Glutamatergic Neurons in the Amygdala Are Involved in Paclitaxel-Induced Pain and Anxiety. *Front Psychiatry* 2022;13:869544.
  238. **Rongo C, Kaplan JM.** CaMKII regulates the density of central glutamatergic synapses in vivo. *Nature* 1999;402:195–199.
  239. **Yau JO-Y, McNally GP.** Pharmacogenetic Excitation of Dorsomedial Prefrontal Cortex Restores Fear Prediction Error. *J Neurosci* 2015;35:74–83.
  240. **Gentile MT, Nawa Y, Lunardi G, Florio T, Matsui H, et al.** Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) in a neuronal cell line: modulation by cell differentiation and NRSF/rest activity. *J Neurochem* 2012;123:963–970.
  241. **Wang J-H, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G.** Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9:78.
  242. **Minetti A.** Unlocking the potential of adeno-associated virus in neuroscience: a brief review. *Mol Biol Rep* 2024;51:563.

243. **Haggerty DL, Grecco GG, Reeves KC, Atwood B.** Adeno-Associated Viral Vectors in Neuroscience Research. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2020;17:69–82.
244. **Grieger JC, Samulski RJ.** Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005;99:119–145.
245. **Samulski RJ, Muzyczka N.** AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol* 2014;1:427–451.
246. **Bennett J, Wellman J, Marshall KA, McCague S, Ashtari M, et al.** Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *The Lancet* 2016;388:661–672.
247. **Wold W, Toth K.** Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther* 2014;13:421–433.
248. **Boulaiz H, Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Aránega A.** Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr* 2005;51:3–22.
249. **Zhang C, Zhou D.** Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum Vaccines Immunother* 2016;12:2064–2074.
250. **Sarno E, Robison AJ.** Emerging role of viral vectors for circuit-specific gene interrogation and manipulation in rodent brain. *Pharmacol Biochem Behav* 2018;174:2–8.
251. **Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, et al.** Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis* 2017;4:43–63.
252. **S. Ahi Y, S. Bangari D, K. Mittal S.** Adenoviral Vector Immunity: Its Implications and Circumvention Strategies. *Curr Gene Ther* 2011;11:307–320.
253. **Egan KP, Wu S, Wigdahl B, Jennings SR.** Immunological control of herpes simplex virus infections. *J Neurovirol* 2013;19:328–345.
254. **Lachmann R.** Herpes simplex virus-based vectors. *Int J Exp Pathol* 2004;85:177–190.
255. **Mátraí J, Chuah MK, VandenDriessche T.** Recent Advances in Lentiviral Vector Development and Applications. *Mol Ther* 2010;18:477–490.
256. **Lévy C, Verhoeyen E, Cosset F-L.** Surface engineering of lentiviral vectors for gene transfer into gene therapy target cells. *Curr Opin Pharmacol* 2015;24:79–85.
257. **Giacca G, Naldini L, Squadrito ML.** Harnessing lentiviral vectors for in vivo gene therapy of liver metastases. *Clin Transl Med* 2024;14:e1542.
258. **Palù G, Parolin C, Takeuchi Y, Pizzato M.** Progress with retroviral gene vectors. *Rev Med Virol* 2000;10:185–202.
259. **Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, Maetzig T, Knoess S, et al.** Insertional Transformation of Hematopoietic Cells by Self-inactivating Lentiviral and Gammaretroviral Vectors. *Mol Ther* 2009;17:1919–1928.
260. **Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, et al.** Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 2006;24:687–696.
261. **Ferry B, Gervasoni D.** Improving Stereotaxic Neurosurgery Techniques and Procedures Greatly Reduces the Number of Rats Used per Experimental Group—A Practice Report. *Animals* 2021;11:2662.
262. **Pérez-Martín E, Coto-Vilcapoma A, Castilla-Silgado J, Rodríguez-Cañón M, Prado C, et al.** Refining Stereotaxic Neurosurgery Techniques and Welfare Assessment for Long-Term Intracerebroventricular Device Implantation in Rodents. *Animals* 2023;13:2627.

263. **Humbel M, Ramosaj M, Zimmer V, Regio S, Aeby L, et al.** Maximizing lentiviral vector gene transfer in the CNS. *Gene Ther* 2021;28:75–88.
264. **Gore BB, Soden ME, Zweifel LS.** Manipulating Gene Expression in Projection-Specific Neuronal Populations Using Combinatorial Viral Approaches. *Curr Protoc Neurosci*;65. Epub ahead of print October 2013. DOI: 10.1002/0471142301.ns0435s65.
265. **Chan C, Kamiguchi H, Shimogori T.** Spatially restricted long-term transgene expression in the developing skin used for studying the interaction of epidermal development and sensory innervation. *Dev Growth Differ* 2019;61:276–282.
266. **Reimsnider S, Manfredsson FP, Muzyczka N, Mandel RJ.** Time Course of Transgene Expression After Intrastriatal Pseudotyped rAAV2/1, rAAV2/2, rAAV2/5, and rAAV2/8 Transduction in the Rat. *Mol Ther* 2007;15:1504–1511.
267. **Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V.** Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 2006;208:299–318.
268. **Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, et al.** An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:7866–7871.
269. **Wang W, Rein B, Zhang F, Tan T, Zhong P, et al.** Chemogenetic Activation of Prefrontal Cortex Rescues Synaptic and Behavioral Deficits in a Mouse Model of 16p11.2 Deletion Syndrome. *J Neurosci* 2018;38:5939–5948.
270. **Cheng Y, Wang J.** The use of chemogenetic approaches in alcohol use disorder research and treatment. *Alcohol* 2019;74:39–45.
271. **Smith KS, Bucci DJ, Luikart BW, Mahler SV.** DREADDS: Use and application in behavioral neuroscience. *Behav Neurosci* 2016;130:137–155.
272. **Castle MJ, Gershenson ZT, Giles AR, Holzbaur ELF, Wolfe JH.** Adeno-Associated Virus Serotypes 1, 8, and 9 Share Conserved Mechanisms for Anterograde and Retrograde Axonal Transport. *Hum Gene Ther* 2014;25:705–720.
273. **Xu X, Holmes TC, Luo M-H, Beier KT, Horwitz GD, et al.** Viral Vectors for Neural Circuit Mapping and Recent Advances in Trans-synaptic Anterograde Tracers. *Neuron* 2020;107:1029–1047.
274. **Surdyka M, Figiel M.** Retrograde capabilities of adeno-associated virus vectors in the central nervous system. *BioTechnologia* 2021;102:473–478.
275. **Castle MJ, Perlson E, Holzbaur EL, Wolfe JH.** Long-distance Axonal Transport of AAV9 Is Driven by Dynein and Kinesin-2 and Is Trafficked in a Highly Motile Rab7-positive Compartment. *Mol Ther* 2014;22:554–566.
276. **Berges BK, Wolfe JH, Fraser NW.** Transduction of Brain by Herpes Simplex Virus Vectors. *Mol Ther* 2007;15:20–29.
277. **Tervo DGR, Hwang B-Y, Viswanathan S, Gaj T, Lavzin M, et al.** A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* 2016;92:372–382.
278. **Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL.** Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:5163–5168.
279. **Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S.** DREADDS: The Power of the Lock, the Weakness of the Key. Favoring the Pursuit of Specific Conditions Rather than Specific Ligands. *eneuro* 2019;6:ENEURO.0171-19.2019.
280. **Jendryka M, Palchadhuri M, Ursu D, Van Der Veen B, Liss B, et al.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Sci Rep* 2019;9:4522.
281. **Claes M, De Groef L, Moons L.** The DREADDful Hurdles and Opportunities of

- the Chronic Chemogenetic Toolbox. *Cells* 2022;11:1110.
282. **Manvich DF, Webster KA, Foster SL, Farrell MS, Ritchie JC, et al.** The DREADD agonist clozapine N-oxide (CNO) is reverse-metabolized to clozapine and produces clozapine-like interoceptive stimulus effects in rats and mice. *Sci Rep* 2018;8:3840.
  283. **Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, et al.** Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 2017;357:503–507.
  284. **Nentwig TB, Obray JD, Vaughan DT, Chandler LJ.** Behavioral and slice electrophysiological assessment of DREADD ligand, deschloroclozapine (DCZ) in rats. *Sci Rep* 2022;12:6595.
  285. **Nagai Y, Miyakawa N, Takuwa H, Hori Y, Oyama K, et al.** Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat Neurosci* 2020;23:1157–1167.
  286. **Chen X, Choo H, Huang X-P, Yang X, Stone O, et al.** The First Structure–Activity Relationship Studies for Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs. *ACS Chem Neurosci* 2015;6:476–484.
  287. **Tran FH, Spears SL, Ahn KJ, Eisch AJ, Yun S.** Does chronic systemic injection of the DREADD agonists clozapine-N-oxide or Compound 21 change behavior relevant to locomotion, exploration, anxiety, and depression in male non-DREADD-expressing mice? *Neurosci Lett* 2020;739:135432.
  288. **Thompson KJ, Khajehali E, Bradley SJ, Navarrete JS, Huang XP, et al.** DREADD Agonist 21 Is an Effective Agonist for Muscarinic-Based DREADDs *in Vitro* and *in Vivo*. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2018;1:61–72.
  289. **Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S.** Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats. *PLOS ONE* 2020;15:e0238156.
  290. **Bonaventura J, Eldridge MA, Hu F, Gomez JL, Sanchez-Soto M, et al.** Chemogenetic ligands for translational neurotheranostics. Epub ahead of print 7 December 2018. DOI: 10.1101/487637.
  291. **Bonaventura J, Eldridge MAG, Hu F, Gomez JL, Sanchez-Soto M, et al.** High-potency ligands for DREADD imaging and activation in rodents and monkeys. *Nat Commun* 2019;10:4627.
  292. **Aomine Y, Oyama Y, Sakurai K, Macpherson T, Ozawa T, et al.** Clozapine N-oxide, compound 21, and JHU37160 do not influence effortful reward-seeking behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2024;241:89–96.
  293. **Bossuyt J, Van Den Herrewegen Y, Nestor L, Buckinx A, De Bundel D, et al.** Chemogenetic modulation of astrocytes and microglia: State-of-the-art and implications in neuroscience. *Glia* 2023;71:2071–2095.
  294. **Ozawa A, Arakawa H.** Chemogenetics drives paradigm change in the investigation of behavioral circuits and neural mechanisms underlying drug action. *Behav Brain Res* 2021;406:113234.
  295. **Wess J.** Designer GPCRs as Novel Tools to Identify Metabolically Important Signaling Pathways. *Front Endocrinol* 2021;12:706957.
  296. **Pati S, Salvi SS, Kallianpur M, Vaidya B, Banerjee A, et al.** Chemogenetic Activation of Excitatory Neurons Alters Hippocampal Neurotransmission in a Dose-Dependent Manner. *eneuro* 2019;6:ENEURO.0124-19.2019.
  297. **Zhu H, Roth BL.** Silencing Synapses with DREADDs. *Neuron* 2014;82:723–725.
  298. **Wang Y, Galeffi F, Wang W, Li X, Lu L, et al.** Chemogenetics-mediated acute inhibition of excitatory neuronal activity improves stroke outcome. *Exp Neurol*

- 2020;326:113206.
299. **Lerner TN, Ye L, Deisseroth K.** Communication in Neural Circuits: Tools, Opportunities, and Challenges. *Cell* 2016;164:1136–1150.
  300. **Hansen JY, Shafiei G, Markello RD, Smart K, Cox SML, et al.** Mapping neurotransmitter systems to the structural and functional organization of the human neocortex. *Nat Neurosci* 2022;25:1569–1581.
  301. **Ningampalle M, Chakravarthy H, Sharma S, Shree S, Bhat AR, et al.** Neurotransmitter systems in the etiology of major neurological disorders: Emerging insights and therapeutic implications. *Ageing Res Rev* 2023;89:101994.
  302. **Faingold CL, Blumenfeld H.** *Neuronal networks in brain function, CNS disorders, and therapeutics.* Amsterdam: Elsevier/AP; 2014.
  303. **Lewis RG, Florio E, Punzo D, Borrelli E.** The Brain’s Reward System in Health and Disease. In: Engmann O, Brancaccio M (editors). *Circadian Clock in Brain Health and Disease.* Cham: Springer International Publishing. pp. 57–69.
  304. **Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppel E.** Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med* 2010;3:24.
  305. **Fischer AG, Ullsperger M.** An Update on the Role of Serotonin and its Interplay with Dopamine for Reward. *Front Hum Neurosci* 2017;11:484.
  306. **Gorelova N, Mulholland PJ, Chandler LJ, Seamans JK.** The Glutamatergic Component of the Mesocortical Pathway Emanating from Different Subregions of the Ventral Midbrain. *Cereb Cortex* 2012;22:327–336.
  307. **Poschel BPH, Ninteman FW.** Norepinephrine: A possible excitatory neurohormone of the reward system. *Life Sci* 1963;2:782–788.
  308. **Trigo JM, Martín-García E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R.** The endogenous opioid system: A common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend* 2010;108:183–194.
  309. **Schultz W.** Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues Clin Neurosci* 2016;18:23–32.
  310. **Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O.** Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* 2010;68:815–834.
  311. **Robbins TW, Everitt BJ.** Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:228–236.
  312. **Castillo Díaz F, Caffino L, Fumagalli F.** Bidirectional role of dopamine in learning and memory-active forgetting. *Neurosci Biobehav Rev* 2021;131:953–963.
  313. **Klawonn AM, Malenka RC.** Nucleus Accumbens Modulation in Reward and Aversion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2018;83:119–129.
  314. **Benedetti F, Carlino E, Pollo A.** How Placebos Change the Patient’s Brain. *Neuropsychopharmacology* 2011;36:339–354.
  315. **Zhang W-H, Zhang J-Y, Holmes A, Pan B-X.** Amygdala Circuit Substrates for Stress Adaptation and Adversity. *Biol Psychiatry* 2021;89:847–856.
  316. **Paxinos G, Watson C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6. ed. Amsterdam Heidelberg: Academic Press; Elsevier; 2007.
  317. **Pessoa L.** Emotion and cognition and the amygdala: From “what is it?” to “what’s to be done?” *Neuropsychologia* 2010;48:3416–3429.
  318. **Janak PH, Tye KM.** From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 2015;517:284–292.
  319. **See RE, Fuchs RA, Ledford CC, McLAUGHLIN J.** Drug Addiction, Relapse, and the Amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 2003;985:294–307.
  320. **Luo Y-X, Xue Y-X, Shen H-W, Lu L.** Role of amygdala in drug memory.

- Neurobiol Learn Mem* 2013;105:159–173.
321. **Raud L, Sneve MH, Vidal-Piñeiro D, Sørensen Ø, Folvik L, et al.** Hippocampal-cortical functional connectivity during memory encoding and retrieval. *NeuroImage* 2023;279:120309.
  322. **Tanaka KZ, Pevzner A, Hamidi AB, Nakazawa Y, Graham J, et al.** Cortical Representations Are Reinstated by the Hippocampus during Memory Retrieval. *Neuron* 2014;84:347–354.
  323. **Shepherd GM (ed).** *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press. Epub ahead of print 8 January 2004. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780195159561.001.1.
  324. **Basu J, Siegelbaum SA.** The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a021733.
  325. **Van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP.** The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:272–282.
  326. **Eichenbaum H.** On the Integration of Space, Time, and Memory. *Neuron* 2017;95:1007–1018.
  327. **Zhu Y, Gao H, Tong L, Li Z, Wang L, et al.** Emotion Regulation of Hippocampus Using Real-Time fMRI Neurofeedback in Healthy Human. *Front Hum Neurosci* 2019;13:242.
  328. **Palombo DJ, Keane MM, Verfaellie M.** How does the hippocampus shape decisions? *Neurobiol Learn Mem* 2015;125:93–97.
  329. **Kutlu MG, Gould TJ.** Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learn Mem* 2016;23:515–533.
  330. **Speranza L, Di Porzio U, Viggiano D, De Donato A, Volpicelli F.** Dopamine: The Neuromodulator of Long-Term Synaptic Plasticity, Reward and Movement Control. *Cells* 2021;10:735.
  331. **Friedman NP, Robbins TW.** The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology* 2022;47:72–89.
  332. **Logue SF, Gould TJ.** The neural and genetic basis of executive function: Attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;123:45–54.
  333. **Cohen JD, Blum KI.** Reward and Decision. *Neuron* 2002;36:193–198.
  334. **Gold JI, Shadlen MN.** Banburismus and the Brain. *Neuron* 2002;36:299–308.
  335. **Herrera PM, Van Meerbeke AV, Speranza M, Cabra CL, Bonilla M, et al.** Expectation of reward differentially modulates executive inhibition. *BMC Psychol* 2019;7:55.
  336. **Xu P, Chen A, Li Y, Xing X, Lu H.** Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiol Genomics* 2019;51:432–442.
  337. **Tzschentke TM.** The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. *Amino Acids* 2000;19:211–219.
  338. **Britt JP, Benaliouad F, McDevitt RA, Stuber GD, Wise RA, et al.** Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens. *Neuron* 2012;76:790–803.
  339. **McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW.** Prefrontal Glutamate Release into the Core of the Nucleus Accumbens Mediates Cocaine-Induced Reinstatement of Drug-Seeking Behavior. *J Neurosci* 2003;23:3531–3537.
  340. **Taber M, Fibiger H.** Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic



- glutamate receptors. *J Neurosci* 1995;15:3896–3904.
341. **Sesack SR, Pickel VM.** Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 1992;320:145–160.
  342. **Lee AT, Vogt D, Rubenstein JL, Sohal VS.** A class of GABAergic neurons in the prefrontal cortex sends long-range projections to the nucleus accumbens and elicits acute avoidance behavior. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2014;34:11519–11525.
  343. **Perry JL, Joseph JE, Jiang Y, Zimmerman RS, Kelly TH, et al.** Prefrontal cortex and drug abuse vulnerability: Translation to prevention and treatment interventions. *Brain Res Rev* 2011;65:124–149.
  344. **Mesa JR, Wesson DW, Schwendt M, Knackstedt LA.** The roles of rat medial prefrontal and orbitofrontal cortices in relapse to cocaine-seeking: A comparison across methods for identifying neurocircuits. *Addict Neurosci* 2022;4:100031.
  345. **Yin HH, Ostlund SB, Balleine BW.** Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: the integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *Eur J Neurosci* 2008;28:1437–1448.
  346. **Todd TP, Fournier DI, Bucci DJ.** Retrosplenial cortex and its role in cue-specific learning and memory. *Neurosci Biobehav Rev* 2019;107:713–728.
  347. **Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA.** What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci* 2009;10:792–802.
  348. **Balcersek E, Włodkowska U, Czajkowski R.** Retrosplenial cortex in spatial memory: focus on immediate early genes mapping. *Mol Brain* 2021;14:172.
  349. **Hamed A, Kurska MB, Mrozek W, Piwoński KP, Falińska M, et al.** Spatio-temporal mechanisms of consolidation, recall and reconsolidation in reward-related memory trace. *Mol Psychiatry*. Epub ahead of print 13 September 2024. DOI: 10.1038/s41380-024-02738-8.
  350. **Lamontagne SJ, Olmstead MC.** Animal models in addiction research: A dimensional approach. *Neurosci Biobehav Rev* 2019;106:91–101.
  351. **Lynch WJ, Nicholson KL, Dance ME, Morgan RW, Foley PL.** Animal models of substance abuse and addiction: implications for science, animal welfare, and society. *Comp Med* 2010;60:177–188.
  352. **Olmstead MC (ed).** *Animal Models of Drug Addiction*. Totowa, NJ: Humana Press. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1007/978-1-60761-934-5.
  353. **Spanagel R.** Animal models of addiction. *Dialogues Clin Neurosci* 2017;19:247–258.
  354. **Panlilio LV, Goldberg SR.** Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction* 2007;102:1863–1870.
  355. **Markou A.** Effects of Contingent and Non-Contingent Cocaine on Drug-Seeking Behavior Measured Using a Second-Order Schedule of Cocaine Reinforcement in Rats. *Neuropsychopharmacology* 1999;20:542–555.
  356. **Nicolas C, Russell TI, Pierce AF, Maldera S, Holley A, et al.** Incubation of Cocaine Craving After Intermittent-Access Self-administration: Sex Differences and Estrous Cycle. *Biol Psychiatry* 2019;85:915–924.
  357. **Weeks JR.** Experimental Morphine Addiction: Method for Automatic Intravenous Injections in Unrestrained Rats. *Science* 1962;138:143–144.
  358. **Zanda MT, Floris G, Daws SE.** Drug-associated cues and drug dosage contribute to increased opioid seeking after abstinence. *Sci Rep* 2021;11:14825.
  359. **Clemens KJ, Holmes NM.** An extended history of drug self-administration results in multiple sources of control over drug seeking behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2018;87:48–55.

360. **Murphy ZD, Mulugeta R, Tran A, Ferguson SM.** DREADD activation of the lateral orbitofrontal increases cocaine-taking and cocaine-seeking in male and female rats during intermittent access self-administration under risky conditions. *Addict Neurosci* 2023;8:100122.
361. **Bock R, Shin JH, Kaplan AR, Dobi A, Markey E, et al.** Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat Neurosci* 2013;16:632–638.
362. **Prus A, James J, Rosecrans J.** *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience: Conditioned Place Preference (Chapter 4)*. 2nd edition. CRC Press/Taylor & Francis: Buccafusco JJ. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5229/> (2009).
363. **Yamamoto T.** Classical Conditioning (Pavlovian Conditioning). In: Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U (editors). *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. pp. 744–746.
364. **McKendrick G, Graziane NM.** Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Front Behav Neurosci* 2020;14:582147.
365. **Mucha RF, Van Der Kooy D, O’Shaughnessy M, Buceniaks P.** Drug reinforcement studied by the use of place conditioning in rat. *Brain Res* 1982;243:91–105.
366. **Tzschentke TM.** Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 1998;56:613–672.
367. **Bardo MT, Bevins RA.** Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)* 2000;153:31–43.
368. **Tzschentke TM.** REVIEW ON CPP: Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 2007;12:227–462.
369. **Davis CM.** Animal Models of Drug Abuse. In: *Animal Models for the Study of Human Disease*. Elsevier. pp. 681–707.
370. **Sanchis-Segura C, Spanagel R.** REVIEW: Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 2006;11:2–38.
371. **Blanco-Gandía MC, Aguilar MA, Miñarro J, Rodríguez-Arias M.** Reinstatement of Drug-seeking in Mice Using the Conditioned Place Preference Paradigm. *J Vis Exp* 2018;56983.
372. **Perry CJ, Zbukvic I, Kim JH, Lawrence AJ.** Role of cues and contexts on drug-seeking behaviour. *Br J Pharmacol* 2014;171:4636–4672.
373. **Yates JR.** Quantifying conditioned place preference: a review of current analyses and a proposal for a novel approach. *Front Behav Neurosci* 2023;17:1256764.
374. **Sun Y, Chen G, Zhou K, Zhu Y.** A Conditioned Place Preference Protocol for Measuring Incubation of Craving in Rats. *J Vis Exp* 2018;58384.
375. **White N, McDonald R.** Acquisition of a spatial conditioned place preference is impaired by amygdala lesions and improved by fornix lesions. *Behav Brain Res* 1993;55:269–281.
376. **Hitchcock LN, Lattal KM.** Involvement of the dorsal hippocampus in expression and extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Hippocampus* 2018;28:226–238.
377. **Palombo P, Maeda R, Riberti Zaniboni C, Antonagi Engi S, Yokoyama T, et al.** Unlocking the role of dorsal hippocampal  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors in Ethanol-Induced conditioned place preference in mice. *Neurosci Lett*

- 2024;824:137666.
378. **Acquas E, Carboni E, Leone P, Di Chiara G.** SCH 23390 blocks drug-conditioned place-preference and place-aversion: anhedonia (lack of reward) or apathy (lack of motivation) after dopamine-receptor blockade? *Psychopharmacology (Berl)* 1989;99:151–155.
  379. **Sakae DY, Martin SJ.** Formation of a morphine-conditioned place preference does not change the size of evoked potentials in the ventral hippocampus–nucleus accumbens projection. *Sci Rep* 2019;9:5206.
  380. **Papageorgi I.** The Skinner Box. In: Shackelford TK, Weekes-Shackelford VA (editors). *Encyclopedia of Evolutionary Psychological Science*. Cham: Springer International Publishing. pp. 1–3.
  381. **Gallo A, Duchatelle E, Elkhessaimi A, Pape GL, Desportes J-P.** Topographic analysis of the rat's bar behaviour in the Skinner box. *Behav Processes* 1995;33:319–327.
  382. **Tamaki Y, Inouye M.** Brightness discrimination learning in a Skinner box in prenatally X-irradiated rats. *Physiol Behav* 1976;16:343–348.
  383. **Custodio V, Rubio C, Paz C.** Prenatal Ozone Exposure Induces Memory Deficiencies in Newborns Rats. *Front Mol Neurosci* 2019;12:244.
  384. **Ahn S, Kang Y, Lee JW, Jeong SJ, Lee YJ, et al.** A role of anterior cingulate cortex in the emergence of worker–parasite relationship. *Proc Natl Acad Sci* 2021;118:e2111145118.
  385. **Nelson A, Sowinski P, Hodges H.** Differential Effects of Global Ischemia on Delayed Matching- and Non-Matching-to-Position Tasks in the Water Maze and Skinner Box. *Neurobiol Learn Mem* 1997;67:228–247.
  386. **Ohyama M, Kondo M, Yamauchi M, Imanishi T, Koyama T.** Asenapine reduces anxiety-related behaviours in rat conditioned fear stress model. *Acta Neuropsychiatr* 2016;28:327–336.
  387. **Vassilev P, Fonseca E, Hernandez G, Pantoja-Urban AH, Giroux M, et al.** Custom-Built Operant Conditioning Setup for Calcium Imaging and Cognitive Testing in Freely Moving Mice. *eneuro* 2022;9:ENEURO.0430-21.2022.
  388. **Delcasso S, Jeantet Y, Cho Y.** A new test for long-term spatial memory using an operant chamber in mice. *Behav Brain Res* 2007;178:200–207.
  389. **Matzeu A, Cauvi G, Kerr TM, Weiss F, Martin-Fardon R.** The paraventricular nucleus of the thalamus is differentially recruited by stimuli conditioned to the availability of cocaine versus palatable food. *Addict Biol* 2017;22:70–77.
  390. **Edwards S.** Reinforcement principles for addiction medicine; from recreational drug use to psychiatric disorder. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier. pp. 63–76.
  391. **Rogers JL, Ghee S, See RE.** The neural circuitry underlying reinstatement of heroin-seeking behavior in an animal model of relapse. *Neuroscience* 2008;151:579–588.
  392. **Jonkman S, Pelloux Y, Everitt BJ.** Drug Intake is Sufficient, but Conditioning is not Necessary for the Emergence of Compulsive Cocaine Seeking After Extended Self-Administration. *Neuropsychopharmacology* 2012;37:1612–1619.
  393. **Brudzynski SM (ed).** *Handbook of ultrasonic vocalization: a window into the emotional brain*. London, United Kingdom: Academic Press; 2018.
  394. **Brudzynski SM.** Communication of Adult Rats by Ultrasonic Vocalization: Biological, Sociobiological, and Neuroscience Approaches. *ILAR J* 2009;50:43–50.
  395. **Portfors CV.** Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS* 2007;46:28–34.

396. **Hartman S, Freeman SM, Bales KL, Belsky J.** Prenatal Stress as a Risk—and an Opportunity—Factor. *Psychol Sci* 2018;29:572–580.
397. **Lancaster WC, Keating AW, Henson OW.** Ultrasonic Vocalizations Of Flying Bats Monitored By Radiotelemetry. *J Exp Biol* 1992;173:43–58.
398. **Kanwal JS.** Ultrasonic Social Communication in Bats: Signal Complexity and Its Neural Management. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. pp. 493–508.
399. **Reidenberg JS, Laitman JT.** Anatomy of Underwater Sound Production With a Focus on Ultrasonic Vocalization in Toothed Whales Including Dolphins and Porpoises. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. pp. 509–519.
400. **Gursky S.** Ultrasonic Vocalizations by the Spectral Tarsier, *Tarsius spectrum*. *Folia Primatol (Basel)* 2015;86:153–163.
401. **Ruat J, Genewsky AJ, Heinz DE, Kaltwasser SF, Canteras NS, et al.** Why do mice squeak? Toward a better understanding of defensive vocalization. *iScience* 2022;25:104657.
402. **Packheiser J, Soyman E, Paradiso E, Michon F, Ramaaker E, et al.** Audible pain squeaks can mediate emotional contagion across pre-exposed rats with a potential effect of auto-conditioning. *Commun Biol* 2023;6:1085.
403. **Yao K, Bergamasco M, Scattoni ML, Vogel AP.** A review of ultrasonic vocalizations in mice and how they relate to human speech. *J Acoust Soc Am* 2023;154:650–660.
404. **Brudzynski SM.** Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sci* 2021;11:605.
405. **Simola N.** Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease. *Curr Neuropharmacol* 2015;13:164–179.
406. **Schwarting RKW.** Behavioral analysis in laboratory rats: Challenges and usefulness of 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neurosci Biobehav Rev* 2023;152:105260.
407. **Wendler E, De Souza CP, Dornellas APS, Santos LE, Ferreira ST, et al.** Mania-like elevated mood in rats: Enhanced 50-kHz ultrasonic vocalizations after sleep deprivation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2019;88:142–150.
408. **Simola N, Brudzynski SM.** Repertoire and Biological Function of Ultrasonic Vocalizations in Adolescent and Adult Rats. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. pp. 177–186.
409. **Silkstone M, Brudzynski SM.** The antagonistic relationship between aversive and appetitive emotional states in rats as studied by pharmacologically-induced ultrasonic vocalization from the nucleus accumbens and lateral septum. *Pharmacol Biochem Behav* 2019;181:77–85.
410. **Lenell C, Broadfoot CK, Schaen-Heacock NE, Ciucci MR.** Biological and Acoustic Sex Differences in Rat Ultrasonic Vocalization. *Brain Sci* 2021;11:459.
411. **Boulanger-Bertolus J, Rincón-Cortés M, Sullivan RM, Mouly A-M.** Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. *Sci Rep* 2017;7:13483.
412. **Brudzynski SM, Kehoe P, Callahan M.** Sonographic structure of isolation-induced ultrasonic calls of rat pups. *Dev Psychobiol* 1999;34:195–204.
413. **Premoli M, Pietropaolo S, Wöhr M, Simola N, Bonini SA.** Mouse and rat ultrasonic vocalizations in neuroscience and neuropharmacology: State of the art and future applications. *Eur J Neurosci* 2023;57:2062–2096.
414. **Shair HN.** Infantile Vocalizations in Rats. In: *Handbook of Behavioral*

- Neuroscience*. Elsevier. pp. 129–137.
415. **Shair HN, Brunelli SA, Masmela JR, Boone E, Hofer MA**. Social, thermal, and temporal influences on isolation-induced and maternally potentiated ultrasonic vocalizations of rat pups. *Dev Psychobiol* 2003;42:206–222.
  416. **Dastur FN, McGregor IS, Brown RE**. Dopaminergic modulation of rat pup ultrasonic vocalizations. *Eur J Pharmacol* 1999;382:53–67.
  417. **Hofer MA**. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 1996;21:203–217.
  418. **Gardner CR**. Distress vocalization in rat pups a simple screening method for anxiolytic drugs. *J Pharmacol Methods* 1985;14:181–187.
  419. **Wöhr M, Schwarting RKW**. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav Neurosci* 2008;122:310–330.
  420. **Insel TR, Hill JL, Mayor RB**. Rat pup ultrasonic isolation calls: Possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:1263–1267.
  421. **Branchi I, Santucci D, Alleva E**. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav Brain Res* 2001;125:49–56.
  422. **Brunelli SA**. Selective Breeding for an Infant Phenotype: Rat Pup Ultrasonic Vocalization (USV). *Behav Genet* 2005;35:53–65.
  423. **Naito H, Inoue M, Makino J**. Ultrasonic Isolation Calls in Genetically High- and Low-Emotional Rat Pups. *Exp Anim* 2000;49:289–294.
  424. **Blumberg MS, Sokoloff G**. Do infant rats cry? *Psychol Rev* 2001;108:83–95.
  425. **Hofer MA, Shair HN**. Ultrasonic vocalization by rat pups during recovery from deep hypothermia. *Dev Psychobiol* 1992;25:511–528.
  426. **Middlemis-Brown JE, Johnson ED, Blumberg MS**. Separable Brainstem and Forebrain Contributions to Ultrasonic Vocalizations in Infant Rats. *Behav Neurosci* 2005;119:1111–1117.
  427. **Barr GA, Wang S**. Tolerance and withdrawal to chronic morphine treatment in the week-old rat pup. *Eur J Pharmacol* 1992;215:35–42.
  428. **Schwarting RKW, Wöhr M**. On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 2012;45:337–348.
  429. **Cordeiro N, Pochapski JA, Luna WS, Baltazar G, Schwarting RK, et al**. Forty-kHz ultrasonic vocalizations of rat pups predict adult behavior in the elevated plus-maze behavior but not the effect of cocaine on 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Behav Brain Res* 2024;458:114759.
  430. **Inagaki H, Ushida T**. The effect of playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations on rat behaviors assessed with a modified open-field test. *Physiol Behav* 2021;229:113251.
  431. **Karwicka W, Wiatrowska M, Kondrakiewicz K, Knapska E, Kurska MB, et al**. Relaying Aversive Ultrasonic Alarm Calls Depends on Previous Experience. Empathy, Social Buffering, or Panic? *Brain Sci* 2021;11:759.
  432. **Lara-Valderrábano L, Cizek R, Bañuelos-Cabrera I, Andrade P, Pitkänen A**. Ultrasonic vocalizations – Novel seizure-related manifestation in rats. *Epilepsy Res* 2022;183:106927.
  433. **Brudzynski SM, Holland G**. Acoustic characteristics of air puff-induced 22-kHz alarm calls in direct recordings. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:1169–1180.
  434. **Burgdorf J, Panksepp J, Moskal JR**. Rat 22-kHz Ultrasonic Vocalizations as a

- Measure of Emotional Set Point During Social Interactions. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. pp. 261–265.
435. **Kim EJ, Kim ES, Covey E, Kim JJ.** Social Transmission of Fear in Rats: The Role of 22-kHz Ultrasonic Distress Vocalization. *PLoS ONE*;5. Epub ahead of print 1 December 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0015077.
  436. **Drugan RC, Stafford NP.** Effects of Physical Stress and Pain on Emission of Ultrasonic Vocalizations and Social Interactions. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. pp. 345–355.
  437. **Litvin Y, Blanchard DC, Blanchard RJ.** Rat 22kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behav Brain Res* 2007;182:166–172.
  438. **Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM.** Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 1991;50:967–972.
  439. **Lore R, Flannelly K, Farina P.** Ultrasounds produced by rats accompany decreases in intraspecific fighting. *Aggress Behav* 1976;2:175–181.
  440. **Brudzynski SM, Bihari F, Ociepa D, Fu X-W.** Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: Long and short calls. *Physiol Behav* 1993;54:215–221.
  441. **Brudzynski SM, Holland G.** Acoustic characteristics of air puff-induced 22-kHz alarm calls in direct recordings. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:1169–1180.
  442. **De Vry J, Benz U, Schreiber R, Traber J.** Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. *Eur J Pharmacol* 1993;249:331–339.
  443. **Wöhr M, Borta A, Schwarting RKW.** Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose–response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 2005;84:228–240.
  444. **Calvino B, Besson JM, Boehrer A, Depaulis A.** Ultrasonic vocalization (22–28 kHz) in a model of chronic pain, the arthritic rat: effects of analgesic drugs. *NeuroReport* 1996;7:581–584.
  445. **Vivian JA, Miczek KA.** Ultrasounds during morphine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;104:187–193.
  446. **Covington HE, Miczek KA.** Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress. *Eur J Pharmacol* 2003;467:1–13.
  447. **Jelen P, Soltysik S, Zagrodzka J.** 22-kHz Ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behav Brain Res* 2003;141:63–72.
  448. **Brudzynski SM.** *Emission of 22 kHz vocalizations in rats as an evolutionary equivalent of human crying: Relationship to depression*. 2019. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.01.033.
  449. **Wright JM, Gourdon JC, Clarke PBS.** Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;211:1–13.
  450. **Sales G, Pye D.** *Ultrasonic Communication by Animals*. 1974. Epub ahead of print 1974. DOI: 10.1007/978-94-011-6901-1.
  451. **Panksepp J, Burgdorf J.** 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav Brain Res* 2000;115:25–38.
  452. **Ashley CB, Snyder RD, Shepherd JE, Cervantes C, Mittal N, et al.** Acoustilytix™: A Web-Based Automated Ultrasonic Vocalization Scoring Platform. *Brain Sci* 2021;11:864.

453. **Burgdorf J, Moskal JR.** Frequency modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations reflect a positive emotional state in the rat: neural substrates and therapeutic implications. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. pp. 209–214.
454. **Brudzynski SM, Pniak A.** Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *J Comp Psychol Wash DC* 1983 2002;116:73–82.
455. **Wöhr M.** Ultrasonic communication in rats: Appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations as social contact calls. *Behav Ecol Sociobiol*;72. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1007/s00265-017-2427-9.
456. **Willey AR, Varlinskaya EI, Spear LP.** Social interactions and 50kHz ultrasonic vocalizations in adolescent and adult rats. *Behav Brain Res* 2009;202:122–129.
457. **Bogdan R, Kayumova R, Schwarting RKW, Wöhr M, Kisko TM.** Wildtype peers rescue social play and 50-kHz ultrasonic vocalization deficits in juvenile female Cacna1c heterozygous rats. *Front Behav Neurosci* 2023;17:1190272.
458. **Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J.** Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol Bull* 2002;128:961–977.
459. **Hammond T, Bombail V, Nielsen BL, Meddle SL, Lawrence AB, et al.** Relationships between play and responses to tickling in male juvenile rats. *Appl Anim Behav Sci* 2019;221:104879.
460. **Mällo T, Matrov D, Herm L, Kõiv K, Eller M, et al.** Tickling-induced 50-kHz ultrasonic vocalization is individually stable and predicts behaviour in tests of anxiety and depression in rats. *Behav Brain Res* 2007;184:57–71.
461. **LaFollette MR, O’Haire ME, Cloutier S, Gaskill BN.** Practical rat tickling: Determining an efficient and effective dosage of heterospecific play. *Appl Anim Behav Sci* 2018;208:82–91.
462. **Panksepp J.** Neuroevolutionary sources of laughter and social joy: Modeling primal human laughter in laboratory rats. *Behav Brain Res* 2007;182:231–244.
463. **Panksepp J, Burgdorf J.** “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol Behav* 2003;79:533–547.
464. **Burke CJ, Pellis SM, Achterberg EJM.** Who’s laughing? Play, tickling and ultrasonic vocalizations in rats. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2022;377:20210184.
465. **Simola N, Fenu S, Costa G, Pinna A, Plumitallo A, et al.** Pharmacological characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Comparison of the effects of different psychoactive drugs and relevance in drug-induced reward. *Neuropharmacology* 2012;63:224–234.
466. **Kuchniak K, Wyszogrodzka E, Chrapusta SJ, Czarna M, Michalak M, et al.** Using anticipatory and drug-evoked appetitive ultrasonic vocalization for monitoring the rewarding effect of amphetamine in a rat model of drug self-administration. *Behav Brain Res* 2019;376:112187.
467. **Scardocho T, Trujillo-Pisanty I, Conover K, Shizgal P, Clarke PBS.** The Effects of Electrical and Optical Stimulation of Midbrain Dopaminergic Neurons on Rat 50-kHz Ultrasonic Vocalizations. *Front Behav Neurosci*;9. Epub ahead of print 8 December 2015. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00331.
468. **Burgdorf J, Wood PL, Kroes RA, Moskal JR, Panksepp J.** Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav Brain Res* 2007;182:274–283.
469. **Lopuch S, Popik P.** Cooperative behavior of laboratory rats (*Rattus norvegicus*) in an instrumental task. *J Comp Psychol* 2011;125:250–253.
470. **Sangarapillai N, Wöhr M, Schwarting RKW.** Appetitive 50 kHz calls in a pavlovian conditioned approach task in Cacna1c haploinsufficient rats. *Physiol Behav* 2022;250:113795.

471. **Costa G, Serra M, Simola N.** Association between Novel Object Recognition/Spontaneous Alternation Behavior and Emission of Ultrasonic Vocalizations in Rats: Possible Relevance to the Study of Memory. *Brain Sci* 2021;11:1053.
472. **Simola N, Paci E, Serra M, Costa G, Morelli M.** Modulation of Rat 50-kHz Ultrasonic Vocalizations by Glucocorticoid Signaling: Possible Relevance to Reward and Motivation. *Int J Neuropsychopharmacol* 2018;21:73–83.
473. **Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J.** Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* 1998;112:65–73.
474. **Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J.** Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. *Behav Neurosci* 2000;114:320–327.
475. **Ma ST, Maier EY, Ahrens AM, Schallert T, Duvauchelle CL.** Repeated intravenous cocaine experience: Development and escalation of pre-drug anticipatory 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Brain Res* 2010;212:109–114.
476. **Burgdorf J, Panksepp J, Brudzynski SM, Kroes R, Moskal JR.** Breeding for 50-kHz Positive Affective Vocalization in Rats. *Behav Genet* 2005;35:67–72.
477. **Broadfoot CK, Lenell C, Kelm-Nelson CA, Ciucci MR.** Effects of social isolation on 50-kHz ultrasonic vocalizations, affective state, cognition, and neurotransmitter concentrations in the ventral tegmental and locus coeruleus of adult rats. *Behav Brain Res* 2023;437:114157.
478. **Rygula R, Golebiowska J, Kregiel J, Kubik J, Popik P.** Effects of optimism on motivation in rats. *Front Behav Neurosci*;9. Epub ahead of print 25 February 2015. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00032.
479. **Rygula R, Pluta H, Popik P.** Laughing Rats Are Optimistic. *PLoS ONE* 2012;7:e51959.
480. **Barker D, Simmons S, West M.** Ultrasonic Vocalizations as a Measure of Affect in Preclinical Models of Drug Abuse: A Review of Current Findings. *Curr Neuropharmacol* 2015;13:193–210.
481. **Burgdorf J, Panksepp J, Moskal JR.** Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35:1831–1836.
482. **Simola N, Granon S.** Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. *Neuropharmacology* 2019;159:107420.
483. **Popik P, Cyrano E, Golebiowska J, Malikowska-Racia N, Potasiewicz A, et al.** Deep learning algorithms reveal increased social activity in rats at the onset of the dark phase of the light/dark cycle. *PLOS ONE* 2024;19:e0307794.
484. **Simola N, Morelli M.** Repeated amphetamine administration and long-term effects on 50-kHz ultrasonic vocalizations: Possible relevance to the motivational and dopamine-stimulating properties of the drug. *Eur Neuropsychopharmacol* 2015;25:343–355.
485. **Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J, Shippenberg TS.** Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;155:35–42.
486. **Rapport MM, Green AA, Page IH.** Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 1948;176:1243–1251.
487. **Pourhamzeh M, Moravej FG, Arabi M, Shahriari E, Mehrabi S, et al.** The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. *Cell Mol Neurobiol* 2022;42:1671–



- 1692.
488. **Jenkins T, Nguyen J, Polglaze K, Bertrand P.** Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients* 2016;8:56.
  489. **Young SN, Leyton M.** The role of serotonin in human mood and social interaction. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71:857–865.
  490. **Portas CM, Bjorvatn B, Ursin R.** Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol* 2000;60:13–35.
  491. **Bîlc MI, Iacob A, Szekely-Copîndean RD, Kiss B, Ştefan M-G, et al.** Serotonin and emotion regulation: the impact of tryptophan depletion on emotional experience, neural and autonomic activity. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2023;23:1414–1427.
  492. **Juckel G.** Serotonin: From sensory processing to schizophrenia using an electrophysiological method. *Behav Brain Res* 2015;277:121–124.
  493. **Švob Štrac D, Pivac N, Mück-Šeler D.** The serotonergic system and cognitive function. *Transl Neurosci* 2016;7:35–49.
  494. **Schmitt J, Wingen M, Ramaekers J, Evers E, Riedel W.** Serotonin and Human Cognitive Performance. *Curr Pharm Des* 2006;12:2473–2486.
  495. **Höglund E, Øverli Ø, Winberg S.** Tryptophan Metabolic Pathways and Brain Serotonergic Activity: A Comparative Review. *Front Endocrinol* 2019;10:158.
  496. **Van Galen KA, Ter Horst KW, Serlie MJ.** Serotonin, food intake, and obesity. *Obes Rev* 2021;22:e13210.
  497. **Kirby LG, Zeeb FD, Winstanley CA.** Contributions of serotonin in addiction vulnerability. *Neuropharmacology* 2011;61:421–432.
  498. **Müller CP, Homberg JR.** The role of serotonin in drug use and addiction. *Behav Brain Res* 2015;277:146–192.
  499. **Terry AV.** Drugs that target serotonergic receptors. In: Buccafusco JJ (editor). *Cognitive Enhancing Drugs*. Basel: Birkhäuser Basel. pp. 79–88.
  500. **Komlósi G, Molnár G, Rózsa M, Oláh S, Barzó P, et al.** Fluoxetine (Prozac) and Serotonin Act on Excitatory Synaptic Transmission to Suppress Single Layer 2/3 Pyramidal Neuron-Triggered Cell Assemblies in the Human Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 2012;32:16369–16378.
  501. **Edinoff AN, Akuly HA, Hanna TA, Ochoa CO, Patti SJ, et al.** Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: A Narrative Review. *Neurol Int* 2021;13:387–401.
  502. **Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD.** Cocaine-Conditioned Place Preference by Dopamine-Deficient Mice Is Mediated by Serotonin. *J Neurosci* 2007;27:12484–12488.
  503. **Chakraborty P, Dey A, Gopalakrishnan AV, Swati K, Ojha S, et al.** Glutamatergic neurotransmission: A potential pharmacotherapeutic target for the treatment of cognitive disorders. *Ageing Res Rev* 2023;85:101838.
  504. **Riedel G.** Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 2003;140:1–47.
  505. **Gillespie CF, Ressler KJ.** Emotional Learning and Glutamate: Translational Perspectives. *CNS Spectr* 2005;10:831–839.
  506. **Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC.** Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. In: Parpura V, Schousboe A, Verkhratsky A (editors). *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain*. Cham: Springer International Publishing. pp. 13–30.
  507. **Frizzo ME.** The Effect of Glutamatergic Modulators on Extracellular Glutamate: How Does this Information Contribute to the Discovery of Novel Antidepressants?

- Curr Ther Res Clin Exp* 2019;91:25–32.
508. **Iovino L, Tremblay ME, Civiero L.** Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. *J Pharmacol Sci* 2020;144:151–164.
509. **Gardoni F, Bellone C.** Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front Cell Neurosci* 2015;9:25.
510. **De Bartolomeis A, Manchia M, Marmo F, Vellucci L, Iasevoli F, et al.** Glycine Signaling in the Framework of Dopamine-Glutamate Interaction and Postsynaptic Density. Implications for Treatment-Resistant Schizophrenia. *Front Psychiatry* 2020;11:369.
511. **Strzelecki D, Podgórski M, Kalużyńska O, Stefańczyk L, Kotlicka-Antczak M, et al.** Adding Sarcosine to Antipsychotic Treatment in Patients with Stable Schizophrenia Changes the Concentrations of Neuronal and Glial Metabolites in the Left Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Int J Mol Sci* 2015;16:24475–24489.
512. **Lee M-Y, Lin Y-R, Tu Y-S, Tseng YJ, Chan M-H, et al.** Effects of sarcosine and N, N-dimethylglycine on NMDA receptor-mediated excitatory field potentials. *J Biomed Sci* 2017;24:18.
513. **Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, et al.** Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22:1813–1824.
514. **Choi DW.** Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992;23:1261–1276.
515. **Pagonabarraga J, Tinazzi M, Caccia C, Jost WH.** The role of glutamatergic neurotransmission in the motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease: Clinical cases and a review of the literature. *J Clin Neurosci* 2021;90:178–183.
516. **Dauvermann MR, Lee G, Dawson N.** Glutamatergic regulation of cognition and functional brain connectivity: insights from pharmacological, genetic and translational schizophrenia research. *Br J Pharmacol* 2017;174:3136–3160.
517. **Wang R, Reddy PH.** Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017;57:1041–1048.
518. **Khodoruth MAS, Estudillo-Guerra MA, Pacheco-Barrios K, Nyundo A, Chapa-Koloffon G, et al.** Glutamatergic System in Depression and Its Role in Neuromodulatory Techniques Optimization. *Front Psychiatry* 2022;13:886918.
519. **Chen T-S, Huang T-H, Lai M-C, Huang C-W.** The Role of Glutamate Receptors in Epilepsy. *Biomedicines* 2023;11:783.
520. **Barker-Haliski M, White HS.** Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5:a022863.
521. **Kalivas PW, Lalumiere RT, Knackstedt L, Shen H.** Glutamate transmission in addiction. *Neuropharmacology* 2009;56 Suppl 1:169–173.
522. **Spencer S, Scofield M, Kalivas PW.** The good and bad news about glutamate in drug addiction. *J Psychopharmacol (Oxf)* 2016;30:1095–1098.
523. **Ersche KD, Lim TV, Murley AG, Rua C, Vaghi MM, et al.** Reduced Glutamate Turnover in the Putamen Is Linked With Automatic Habits in Human Cocaine Addiction. *Biol Psychiatry* 2021;89:970–979.
524. **Kalivas PW.** The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:561–572.
525. **D'Souza MS.** Glutamatergic transmission in drug reward: implications for drug addiction. *Front Neurosci*;9. Epub ahead of print 5 November 2015. DOI: 10.3389/fnins.2015.00404.
526. **Wise RA, Wang B, You Z-B.** Cocaine Serves as a Peripheral Interoceptive Conditioned Stimulus for Central Glutamate and Dopamine Release. *PLoS ONE*

- 2008;3:e2846.
527. **Substance Abuse and Mental Health Services Administration (US); Office of the Surgeon General (US).** THE NEUROBIOLOGY OF SUBSTANCE USE, MISUSE, AND ADDICTION. In: *Facing Addiction in America: The Surgeon General's Report on Alcohol, Drugs, and Health [Internet]*. Washington (DC): US Department of Health and Human Services. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK424849/> (2016, accessed 6 November 2024).
  528. **Gass JT, Olive MF.** Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 2008;75:218–265.
  529. **Memos N, Avila JA, Rodriguez E, Serrano PA.** Synaptic remodeling of GluA1 and GluA2 expression in the nucleus accumbens promotes susceptibility to cognitive deficits concomitant with downstream GSK3 $\beta$  mediated neurotoxicity in female mice during abstinence from voluntary oral methamphetamine. *Addict Neurosci* 2023;8:100112.
  530. **Van Den Oever MC, Spijker S, Smit AB, De Vries TJ.** Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;35:276–284.
  531. **Chen T, Tan H, Lei H, Li X, Wu Q, et al.** Nature of glutamate alterations in substance dependence: A systematic review and meta-analysis of proton magnetic resonance spectroscopy studies. *Psychiatry Res Neuroimaging* 2021;315:111329.
  532. **Kursa MB, Rudnicki WR.** Feature Selection with the **Boruta** Package. *J Stat Softw*;36. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.18637/jss.v036.i11.
  533. **Kursa M.** Impute Transdapter. <https://search.r-project.org/CRAN/refmans/Boruta/html/imputeTransdapter.html>.
  534. **Wright JM, Deng L, Clarke PBS.** Failure of rewarding and locomotor stimulant doses of morphine to promote adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology (Berl)* 2012;224:477–487.
  535. **Li Y, Ping X, Qi C, Shen F, Sun L, et al.** Re-exposure to morphine-associated context facilitated long-term potentiation in the vSUB-NAc glutamatergic pathway via GluN2B-containing receptor activation. *Addict Biol* 2017;22:435–445.
  536. **Gomes-Ribeiro J, Martins J, Sereno J, Deslauriers-Gauthier S, Summavielle T, et al.** Mapping functional traces of opioid memories in the rat brain. *Brain Commun* 2024;6:fcae281.
  537. **Mayberry HL, DeSalvo HA, Bavley CC, Downey SH, Lam C, et al.** Opioid and Sucrose Craving Are Accompanied by Unique Behavioral and Affective Profiles after Extended Abstinence in Male and Female Rats. *eneuro* 2022;9:ENEURO.0515-21.2022.
  538. **Hamed A, Boguszewski PM.** Effects of Morphine and Other Opioid Ligands on Emission of Ultrasonic Vocalizations in Rats. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier. pp. 327–334.
  539. **Nic Dhonnchadha BÁ, Cunningham KA.** Serotonergic mechanisms in addiction-related memories. *Behav Brain Res* 2008;195:39–53.
  540. **Koob GF.** The Role of the Striatopallidal and Extended Amygdala Systems in Drug Addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1999;877:445–460.
  541. **Everitt BJ, Dickinson A, Robbins TW.** The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res Rev* 2001;36:129–138.
  542. **Baxter MG, Murray EA.** The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:563–573.
  543. **Mahler SV, Berridge KC.** Which Cue to “Want?” Central Amygdala Opioid Activation Enhances and Focuses Incentive Saliency on a Prepotent Reward Cue. *J*

- Neurosci* 2009;29:6500–6513.
544. **Wassum KM, Izquierdo A.** The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 2015;57:271–283.
  545. **Wassum KM.** Amygdala-cortical collaboration in reward learning and decision making. *eLife* 2022;11:e80926.
  546. **Nathan PE.** The addictive personality is the behavior of the addict. *J Consult Clin Psychol* 1988;56:183–188.
  547. **Franques P, Auriacombe M, Tignol J.** [Addiction and personality]. *L'Encephale* 2000;26:68–78.
  548. **Taracha E, Kaniuga E, Wyszogrodzka E, Plaźnik A, Stefański R, et al.** Poor sensitization of 50-kHz vocalization response to amphetamine predicts rat susceptibility to self-administration of the drug. *Psychopharmacology (Berl)* 2016;233:2827–2840.
  549. **Jędras P, Jones A, Field M.** The role of anticipation in drug addiction and reward. *Neurosci Neuroeconomics* 2013;Volume 3:1–10.
  550. **Camara E.** Reward networks in the brain as captured by connectivity measures. *Front Neurosci* 2009;3:350–362.
  551. **Gloveli N, Simonnet J, Tang W, Concha-Miranda M, Maier E, et al.** Play and tickling responses map to the lateral columns of the rat periaqueductal gray. *Neuron* 2023;111:3041-3052.e7.
  552. **Ishiyama S, Brecht M.** Neural correlates of ticklishness in the rat somatosensory cortex. *Science* 2016;354:757–760.
  553. **Al-Hasani R, McCall JG, Shin G, Gomez AM, Schmitz GP, et al.** Distinct Subpopulations of Nucleus Accumbens Dynorphin Neurons Drive Aversion and Reward. *Neuron* 2015;87:1063–1077.
  554. **Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ.** Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat. *Science* 1999;286:1155–1158.
  555. **Wang M, Saudino KJ.** Genetic and environmental influences on individual differences in emotion regulation and its relation to working memory in toddlerhood. *Emotion* 2013;13:1055–1067.
  556. **Joëls M, Baram TZ.** The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:459–466.
  557. **Hermans EJ, Henckens MJAG, Joëls M, Fernández G.** Dynamic adaptation of large-scale brain networks in response to acute stressors. *Trends Neurosci* 2014;37:304–314.
  558. **McEwen BS, Nasca C, Gray JD.** Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* 2016;41:3–23.
  559. **Popik P, Potasiewicz A, Pluta H, Zieniewicz A.** High-frequency ultrasonic vocalizations in rats in response to tickling: The effects of restraint stress. *Behav Brain Res* 2012;234:223–227.
  560. **Popik P, Kos T, Pluta H, Nikiforuk A, Rojek K, et al.** Inhibition of the glucocorticoid synthesis reverses stress-induced decrease in rat's 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Behav Brain Res* 2014;260:53–57.
  561. **Kõiv K, Metelitsa M, Vares M, Tiitsaar K, Raudkivi K, et al.** Chronic variable stress prevents amphetamine-elicited 50-kHz calls in rats with low positive affectivity. *Eur Neuropsychopharmacol* 2016;26:631–643.
  562. **Rojas-Carvajal M, Brenes JC.** Acute stress differentially affects grooming subtypes and ultrasonic vocalisations in the open-field and home-cage test in rats.

- Behav Processes* 2020;176:104140.
563. **Robinson TE, Kolb B.** Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* 1999;33:160–162.
  564. **Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, Veinante P, Manzoni OJ, et al.** Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:16446–16450.
  565. **Robinson TE, Kolb B.** Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 2004;47:33–46.
  566. **Beltrán-Campos V, Silva-Vera M, García-Campos ML, Díaz-Cintra S.** Effects of morphine on brain plasticity. *Neurol Engl Ed* 2015;30:176–180.
  567. **Hamed A, Szyndler J, Taracha E, Turzyńska D, Sobolewska A, et al.**  $\kappa$ -opioid receptor as a key mediator in the regulation of appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology (Berl)* 2015;232:1941–1955.
  568. **González-Quevedo A (ed).** *Brain damage: bridging between basic research and clinics*. Rijeka: IntechOpen; 2019.
  569. **Doyle MA, Mazei-Robison MS.** Opioid-Induced Molecular and Cellular Plasticity of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2021;11:a039362.
  570. **Fu X, Brudzynski SM.** High-frequency ultrasonic vocalization induced by intracerebral glutamate in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:835–841.
  571. **Winslow JT, Insel TR.** Serotonergic and catecholaminergic reuptake inhibitors have opposite effects on the ultrasonic isolation calls of rat pups. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 1990;3:51–59.
  572. **Winslow JT, Insel TR.** Serotonergic modulation of the rat pup ultrasonic isolation call: studies with 5HT1 and 5HT2 subtype-selective agonists and antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;105:513–520.
  573. **Wintink AJ, Brudzynski SM.** The related roles of dopamine and glutamate in the initiation of 50-kHz ultrasonic calls in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70:317–323.
  574. **Bridger WH, Schiff SR, Cooper SS, Paredes W, Barr GA.** Classical conditioning of cocaine's stimulatory effects. *Psychopharmacol Bull* 1982;18:210–214.
  575. **Gold LH, Swerdlow NR, Koob GF.** The role of mesolimbic dopamine in conditioned locomotion produced by amphetamine. *Behav Neurosci* 1988;102:544–552.
  576. **Johnson SA, Sediqzadah S, Erb S.** Expression and resilience of a cocaine-conditioned locomotor response after brief and extended drug-free periods. *Behav Brain Res* 2012;230:69–77.
  577. **Brown EE, Fibiger HC.** Cocaine-induced conditioned locomotion: Absence of associated increases in dopamine release. *Neuroscience* 1992;48:621–629.
  578. **Panlilio LV, Schindler CW.** Conditioned locomotor-activating and reinforcing effects of discrete stimuli paired with intraperitoneal cocaine: *Behav Pharmacol* 1997;8:691–698.
  579. **Hotsenpiller G, Giorgetti M, Wolf ME.** Alterations in behaviour and glutamate transmission following presentation of stimuli previously associated with cocaine exposure. *Eur J Neurosci* 2001;14:1843–1855.
  580. **Whishaw IQ, Kolb B (eds).** *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. 1st ed. Oxford University Press New York. Epub ahead of print 30 September 2004. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780195162851.001.0001.
  581. **Kumar J, Naina Mohamed I, Mohamed R, Ugusman A, Muzaimi M, et al.** Locomotion changes in methamphetamine and amphetamine withdrawal: a

- systematic review. *Front Pharmacol* 2024;15:1428492.
582. **Salvi SS, Pati S, Chaudhari PR, Tiwari P, Banerjee T, et al.** Acute Chemogenetic Activation of CamKII $\alpha$ -Positive Forebrain Excitatory Neurons Regulates Anxiety-Like Behaviour in Mice. *Front Behav Neurosci* 2019;13:249.
  583. **Prut L, Belzung C.** The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3–33.
  584. **Schwartz R, Wöhr M, Engler H, Sungur AÖ, Schedlowski M.** Behaviorally conditioned effects of psychoactive drugs in experimental animals: What we have learned from nearly a century of research and what remains to be learned. *Neurosci Biobehav Rev* 2024;162:105721.
  585. **Chai Z, Ma C, Jin X.** Homeostatic activity regulation as a mechanism underlying the effect of brain stimulation. *Bioelectron Med* 2019;5:16.
  586. **Cools R, Nakamura K, Daw ND.** Serotonin and Dopamine: Unifying Affective, Activational, and Decision Functions. *Neuropsychopharmacology* 2011;36:98–113.
  587. **Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F.** Control of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons by the Medial Prefrontal Cortex: Involvement of Serotonin-1A, GABA<sub>A</sub>, and Glutamate Receptors. *J Neurosci* 2001;21:9917–9929.
  588. **Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, et al.** Control of Serotonergic Function in Medial Prefrontal Cortex by Serotonin-2A Receptors through a Glutamate-Dependent Mechanism. *J Neurosci* 2001;21:9856–9866.
  589. **Andraka K, Kondrakiewicz K, Rojek-Sito K, Ziegart-Sadowska K, Meyza K, et al.** Distinct circuits in rat central amygdala for defensive behaviors evoked by socially signaled imminent versus remote danger. *Curr Biol* 2021;31:2347-2358.e6.
  590. **Kalivas PW, Volkow ND.** The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. *Am J Psychiatry* 2005;162:1403–1413.
  591. **Crawley JN.** *What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. 1st ed. Wiley. Epub ahead of print 9 March 2007. DOI: 10.1002/0470119055.
  592. **Wise RA.** Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:483–494.
  593. **Prut L, Belzung C.** The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3–33.
  594. **Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F.** Control of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons by the Medial Prefrontal Cortex: Involvement of Serotonin-1A, GABA<sub>A</sub>, and Glutamate Receptors. *J Neurosci* 2001;21:9917–9929.
  595. **Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, et al.** Control of Serotonergic Function in Medial Prefrontal Cortex by Serotonin-2A Receptors through a Glutamate-Dependent Mechanism. *J Neurosci* 2001;21:9856–9866.
  596. **Acosta JI, Boynton FA, Kirschner KF, Neisewander JL.** Stimulation of 5-HT<sub>1B</sub> receptors decreases cocaine- and sucrose-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80:297–307.
  597. **Zhang G, Wu X, Zhang Y-M, Liu H, Jiang Q, et al.** Activation of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor suppresses behavioral sensitization and naloxone-precipitated withdrawal symptoms in morphine-dependent mice. *Neuropharmacology* 2016;101:246–254.
  598. **Pang G, Wu X, Tao X, Mao R, Liu X, et al.** Blockade of Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Receptors Suppresses Behavioral Sensitization and Naloxone-Precipitated Withdrawal Symptoms in Morphine-Treated Mice. *Front Pharmacol*;7. Epub ahead of print 26 December 2016. DOI: 10.3389/fphar.2016.00514.
  599. **Spyraki C, Nomikos GG, Galanopoulou P, Daifotis Z.** Drug-induced place preference in rats with 5,7-dihydroxytryptamine lesions of the nucleus accumbens.

- Behav Brain Res* 1988;29:127–134.
600. **Caillé S, Espejo EF, Koob GF, Stinus L.** Dorsal and median raphe serotonergic system lesion does not alter the opiate withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;72:979–986.
  601. **Staub DR, Lunden JW, Cathel AM, Dolben EL, Kirby LG.** Morphine history sensitizes postsynaptic GABA receptors on dorsal raphe serotonin neurons in a stress-induced relapse model in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:859–870.
  602. **Miyazaki KW, Miyazaki K, Tanaka KF, Yamanaka A, Takahashi A, et al.** Optogenetic Activation of Dorsal Raphe Serotonin Neurons Enhances Patience for Future Rewards. *Curr Biol* 2014;24:2033–2040.
  603. **Tran-Nguyen LTL, Baker DA, Grote KA, Solano J, Neisewander JL.** Serotonin depletion attenuates cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;146:60–66.
  604. **Nic Dhonnchadha BÁ, Fox RG, Stutz SJ, Rice KC, Cunningham KA.** Blockade of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor suppresses cue-evoked reinstatement of cocaine-seeking behavior in a rat self-administration model. *Behav Neurosci* 2009;123:382–396.
  605. **Tran-Nguyen L, Bellew J, Grote K, Neisewander J.** Serotonin depletion attenuates cocaine seeking but enhances sucrose seeking and the effects of cocaine priming on reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;157:340–348.
  606. **Baker DA, Tran-Nguyen LTL, Fuchs RA, Neisewander JL.** Influence of individual differences and chronic fluoxetine treatment on cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;155:18–26.
  607. **Spring MG, Nautiyal KM.** Striatal Serotonin Release Signals Reward Value. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2024;44:e0602242024.
  608. **Schultz W, Dayan P, Montague PR.** A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science* 1997;275:1593–1599.
  609. **Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, et al.** Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 2004;47:227–241.
  610. **Huang J, Crochet S, Sandi C, Petersen CCH.** Dopamine dynamics in nucleus accumbens across reward-based learning of goal-directed whisker-to-lick sensorimotor transformations in mice. *Heliyon* 2024;10:e37831.
  611. **Aarts E, Van Holstein M, Cools R.** Striatal Dopamine and the Interface between Motivation and Cognition. *Front Psychol*;2. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.3389/fpsyg.2011.00163.
  612. **Sara SJ.** The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:211–223.
  613. **Maldonado R.** Participation of Noradrenergic Pathways in the Expression of Opiate Withdrawal: Biochemical and Pharmacological Evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:91–104.
  614. **Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones G.** Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 2000;403:430–434.
  615. **Shaham Y, Erb S, Stewart J.** Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. *Brain Res Rev* 2000;33:13–33.
  616. **Wang X, Cen X, Lu L.** Noradrenaline in the bed nucleus of the stria terminalis is critical for stress-induced reactivation of morphine-conditioned place preference in rats. *Eur J Pharmacol* 2001;432:153–161.

617. **Aston-Jones G, Cohen JD.** AN INTEGRATIVE THEORY OF LOCUS COERULEUS-NOREPINEPHRINE FUNCTION: Adaptive Gain and Optimal Performance. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:403–450.
618. **Kerfoot EC, Williams CL.** Interactions between brainstem noradrenergic neurons and the nucleus accumbens shell in modulating memory for emotionally arousing events. *Learn Mem Cold Spring Harb N* 2011;18:405–413.
619. **Bernacka J, Kielbinski M, Wawrzczak-Bargiela A, Zajda K, Maćkowiak M, et al.** Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology* 2022;220:109258.
620. **De Landeta AB, Medina JH, Katche C.** Dopamine D1/D5 Receptors in the Retrosplenial Cortex Are Necessary to Consolidate Object Recognition Memory. *Front Behav Neurosci* 2022;16:922971.
621. **Merlo E, Ratano P, Ilioi EC, Robbins MALS, Everitt BJ, et al.** Amygdala Dopamine Receptors Are Required for the Destabilization of a Reconsolidating Appetitive Memory. *eNeuro* 2015;2:ENEURO.0024-14.2015.
622. **Weele CMV, Siciliano CA, Tye KM.** Dopamine tunes prefrontal outputs to orchestrate aversive processing. *Brain Res* 2019;1713:16–31.
623. **Bassareo V, De Luca MA, Di Chiara G.** Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 2002;22:4709–4719.
624. **Starkweather CK, Gershman SJ, Uchida N.** The Medial Prefrontal Cortex Shapes Dopamine Reward Prediction Errors under State Uncertainty. *Neuron* 2018;98:616-629.e6.
625. **Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ.** Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 2005;492:145–177.
626. **Murray EA.** The amygdala, reward and emotion. *Trends Cogn Sci* 2007;11:489–497.
627. **Tian Z, Song J, Zhao X, Zhou Y, Chen X, et al.** The interhemispheric amygdala-accumbens circuit encodes negative valence in mice. *Science* 2024;386:eadp7520.
628. **Abraham AD, Neve KA, Lattal KM.** Dopamine and extinction: a convergence of theory with fear and reward circuitry. *Neurobiol Learn Mem* 2014;108:65–77.
629. **Berridge KC, Robinson TE.** Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *Am Psychol* 2016;71:670–679.
630. **Warlow SM, Berridge KC.** Incentive motivation: ‘wanting’ roles of central amygdala circuitry. *Behav Brain Res* 2021;411:113376.
631. **Jie F, Yin G, Yang W, Yang M, Gao S, et al.** Stress in Regulation of GABA Amygdala System and Relevance to Neuropsychiatric Diseases. *Front Neurosci* 2018;12:562.
632. **Tian Z, Wang Y, Zhang N, Guo Y, Feng B, et al.** Estrogen receptor GPR30 exerts anxiolytic effects by maintaining the balance between GABAergic and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala of ovariectomized mice after stress. *Psychoneuroendocrinology* 2013;38:2218–2233.
633. **Ciccocioppo R, De Guglielmo G, Hansson AC, Ubaldi M, Kallupi M, et al.** Restraint Stress Alters Nociceptin/Orphanin FQ and CRF Systems in the Rat Central Amygdala: Significance for Anxiety-Like Behaviors. *J Neurosci* 2014;34:363–372.
634. **Hernández VS, Hernández OR, Perez De La Mora M, Gómora MJ, Fuxe K, et al.** Hypothalamic Vasopressinergic Projections Innervate Central Amygdala GABAergic Neurons: Implications for Anxiety and Stress Coping. *Front Neural*



- Circuits*;10. Epub ahead of print 18 November 2016. DOI: 10.3389/fncir.2016.00092.
635. **Varodayan FP, Bajo M, Soni N, Luu G, Madamba SG, et al.** Chronic alcohol exposure disrupts CB<sub>1</sub> regulation of GABAergic transmission in the rat basolateral amygdala. *Addict Biol* 2017;22:766–778.
  636. **Partridge JG, Forcelli PA, Luo R, Cashdan JM, Schulkin J, et al.** Stress increases GABAergic neurotransmission in CRF neurons of the central amygdala and bed nucleus stria terminalis. *Neuropharmacology* 2016;107:239–250.
  637. **Takahashi A, Yap JJ, Bohager DZ, Faccidomo S, Clayton T, et al.** Glutamatergic and GABAergic modulations of ultrasonic vocalizations during maternal separation distress in mouse pups. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;204:61–71.
  638. **Campo-Soria C, Chang Y, Weiss DS.** Mechanism of action of benzodiazepines on GABAA receptors. *Br J Pharmacol* 2006;148:984–990.
  639. **Ciranna L.** Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. *Curr Neuropharmacol* 2006;4:101–114.
  640. **Yamamoto R, Furuyama T, Sugai T, Ono M, Pare D, et al.** Serotonergic control of GABAergic inhibition in the lateral amygdala. *J Neurophysiol* 2020;123:670–681.
  641. **Koyama S, Matsumoto N, Murakami N, Kubo C, Nabekura J, et al.** Role of presynaptic 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in modulation of synaptic GABA transmission in dissociated rat basolateral amygdala neurons. *Life Sci* 2002;72:375–387.
  642. **Volkow ND, Wang G-J, Fowler JS, Tomasi D, Telang F.** Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:15037–15042.
  643. **Saunders BT, Yager LM, Robinson TE.** Cue-Evoked Cocaine ‘Craving’: Role of Dopamine in the Accumbens Core. *J Neurosci* 2013;33:13989–14000.
  644. **Schiffer WK, Liebling CNB, Reisz C, Hooker JM, Brodie JD, et al.** Cue-Induced Dopamine Release Predicts Cocaine Preference: Positron Emission Tomography Studies in Freely Moving Rodents. *J Neurosci* 2009;29:6176–6185.
  645. **Elum JE, Szelenyi ER, Juarez B, Murry AD, Loginov G, et al.** Distinct dynamics and intrinsic properties in ventral tegmental area populations mediate reward association and motivation. *Cell Rep* 2024;43:114668.
  646. **Goedhoop J, Arbab T, Willuhn I.** Anticipation of Appetitive Operant Action Induces Sustained Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 2023;43:3922–3932.
  647. **Kawagoe R, Takikawa Y, Hikosaka O.** Expectation of reward modulates cognitive signals in the basal ganglia. *Nat Neurosci* 1998;1:411–416.
  648. **Whitton PS.** Glutamatergic control over brain dopamine release in vivo and in vitro. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:481–488.
  649. **Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, et al.** Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:1214–1224.
  650. **Sabihi S, Goodpaster C, Maurer S, Leuner B.** GABA in the medial prefrontal cortex regulates anxiety-like behavior during the postpartum period. *Behav Brain Res* 2021;398:112967.
  651. **Fogaça MV, Wu M, Li C, Li X-Y, Picciotto MR, et al.** Inhibition of GABA interneurons in the mPFC is sufficient and necessary for rapid antidepressant responses. *Mol Psychiatry* 2021;26:3277–3291.
  652. **Tran L, Lasher BK, Young KA, Keele NB.** Depletion of serotonin in the

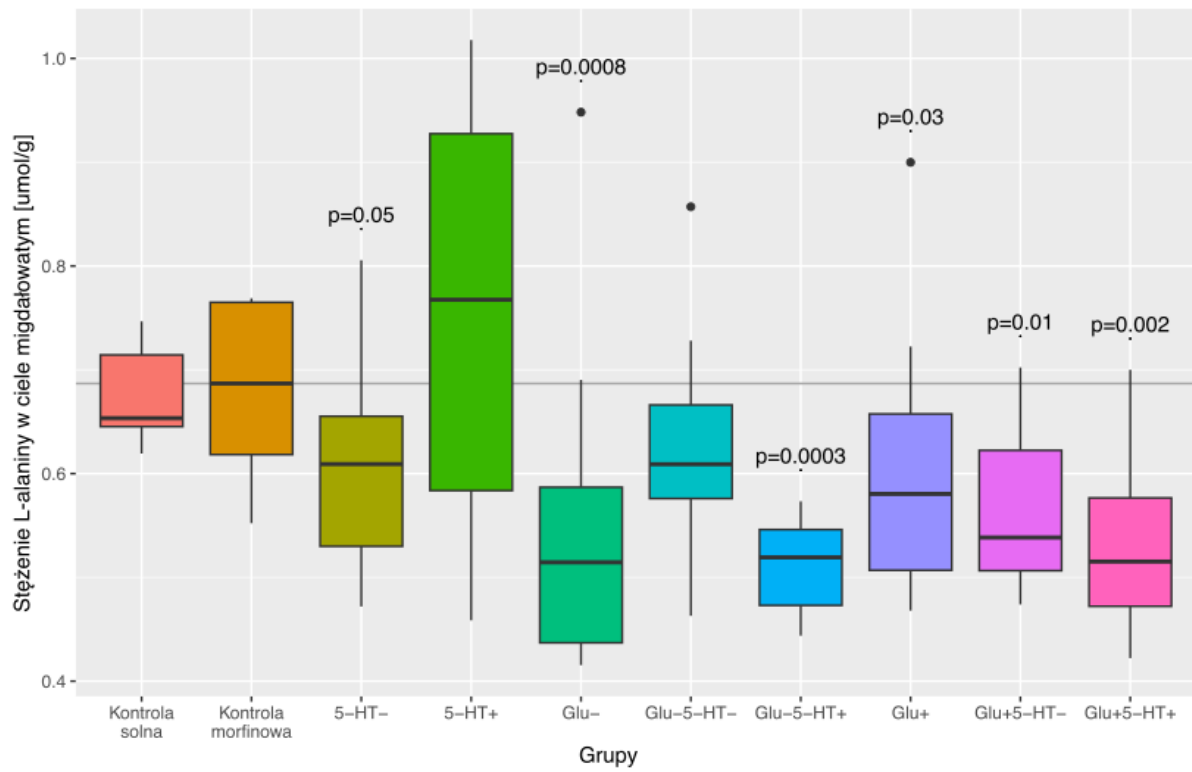
- basolateral amygdala elevates glutamate receptors and facilitates fear-potentiated startle. *Transl Psychiatry* 2013;3:e298–e298.
653. **Pleim ET, Matochik JA, Barfield RJ, Auerbach SB.** Correlation of dopamine release in the nucleus accumbens with masculine sexual behavior in rats. *Brain Res* 1990;524:160–163.
654. **Ventura R, Alcaro A, Puglisi-Allegra S.** Prefrontal Cortical Norepinephrine Release Is Critical for Morphine-induced Reward, Reinstatement and Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *Cereb Cortex* 2005;15:1877–1886.
655. **Berridge CW.** Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev* 2008;58:1–17.
656. **Bang D, Luo Y, Barbosa LS, Batten SR, Hadj-Amar B, et al.** Noradrenaline tracks emotional modulation of attention in human amygdala. *Curr Biol* 2023;33:5003-5010.e6.
657. **Pang K, Rose GM.** Differential effects of norepinephrine on hippocampal complex-spike and  $\theta$ -neurons. *Brain Res* 1987;425:146–158.
658. **Van Den Pol AN, Obrietan K, Belousov A.** Glutamate hyperexcitability and seizure-like activity throughout the brain and spinal cord upon relief from chronic glutamate receptor blockade in culture. *Neuroscience* 1996;74:653–674.
659. **Chakraborty P, Dey A, Gopalakrishnan AV, Swati K, Ojha S, et al.** Glutamatergic neurotransmission: A potential pharmacotherapeutic target for the treatment of cognitive disorders. *Ageing Res Rev* 2023;85:101838.
660. **A. Rahn K, S. Slusher B, I. Kaplin A.** Glutamate in CNS Neurodegeneration and Cognition and its Regulation by GCPII Inhibition. *Curr Med Chem* 2012;19:1335–1345.
661. **Pal MM.** Glutamate: The Master Neurotransmitter and Its Implications in Chronic Stress and Mood Disorders. *Front Hum Neurosci* 2021;15:722323.
662. **Reznikov LR, Fadel JR, Reagan LP.** Glutamate-Mediated Neuroplasticity Deficits in Mood Disorders. In: Costa E Silva JA, Macher JP, Olié JP (editors). *Neuroplasticity*. Tarporley: Springer Healthcare Ltd. pp. 13–26.
663. **Riedel G.** Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 2003;140:1–47.

## 8. Publikacje

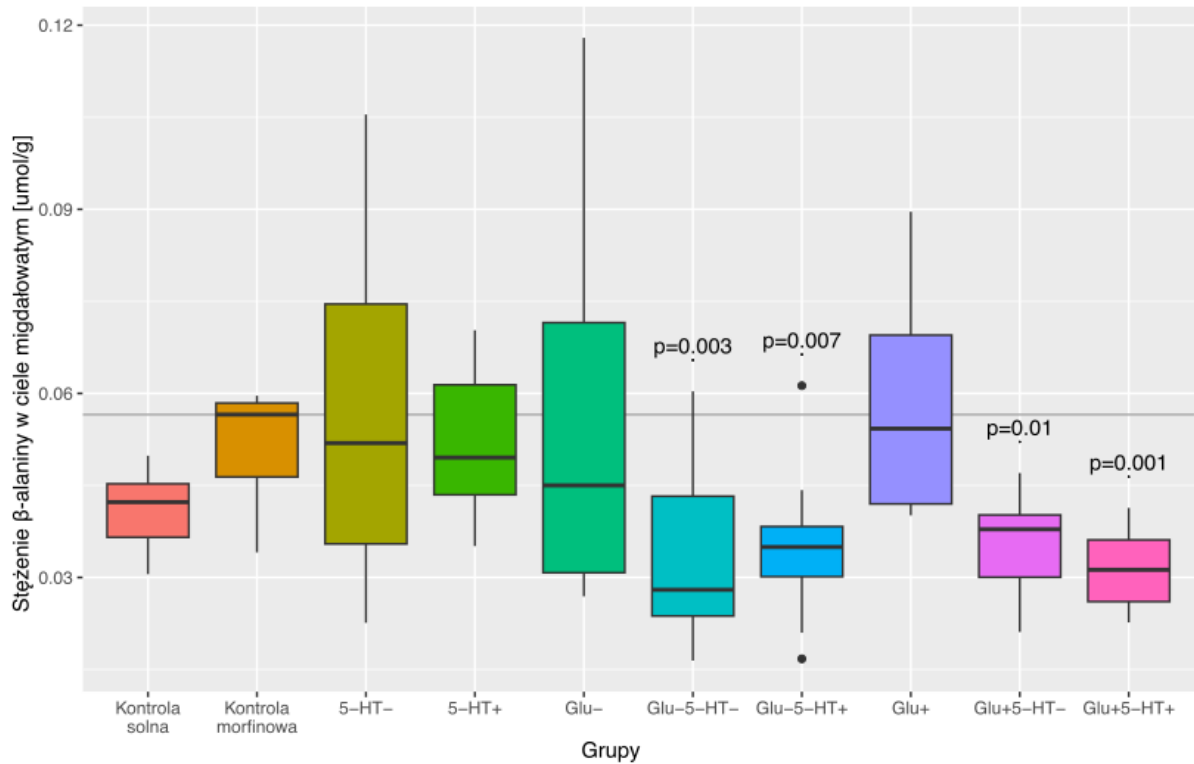
**Wiktoria Karwicka**, Marta Wiatrowska, Kacper Kondrakiewicz, Ewelina Knapska, iron Bartosz Kursa, Adam Hamed. Relaying Aversive Ultrasonic Alarm Calls Depends on Previous Experience. Empathy, Social Buffering, or Panic? *Brain Sci.* 2021;11;759.

Adam Hamed, Miron Bartosz Kursa, **Wiktoria Mrozek**, Krzysztof Piotr Piwoński, Monika Falińska, Konrad Danielewski, Emilia Rejmak, Urszula Włodkowska, Stepan Kubik, Rafał Czajkowski.

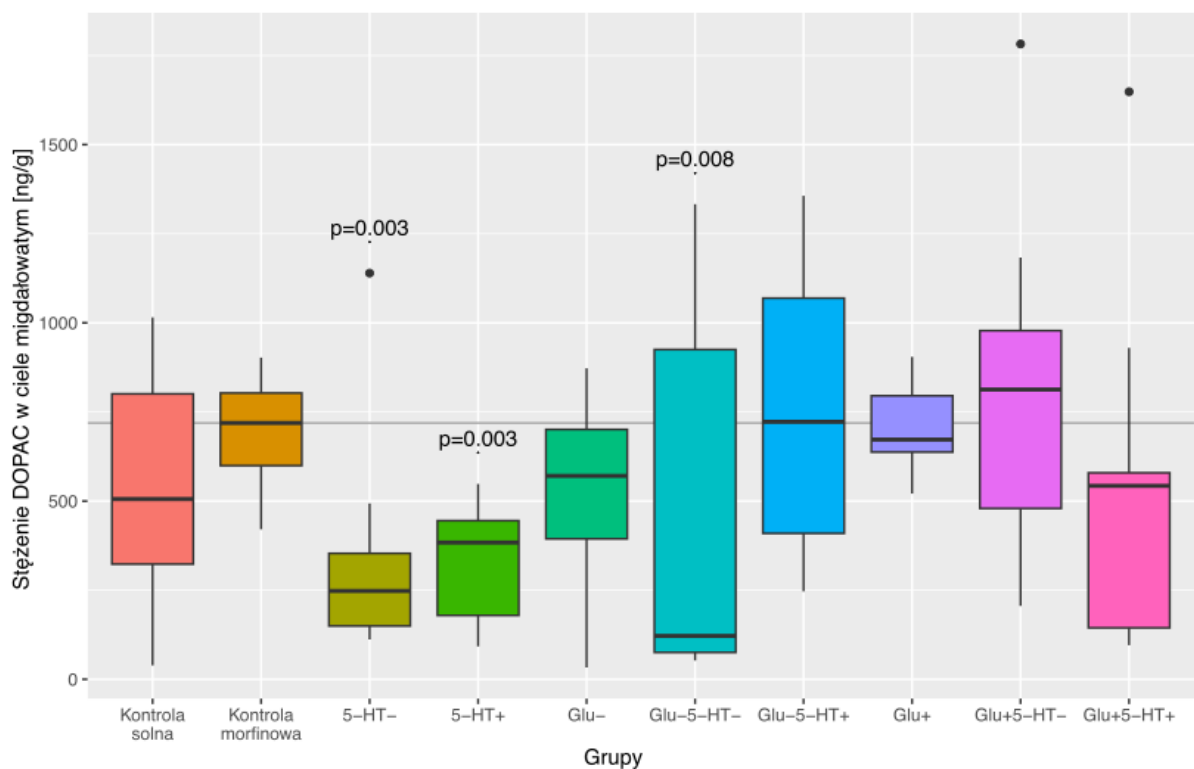
## 9. Suplement



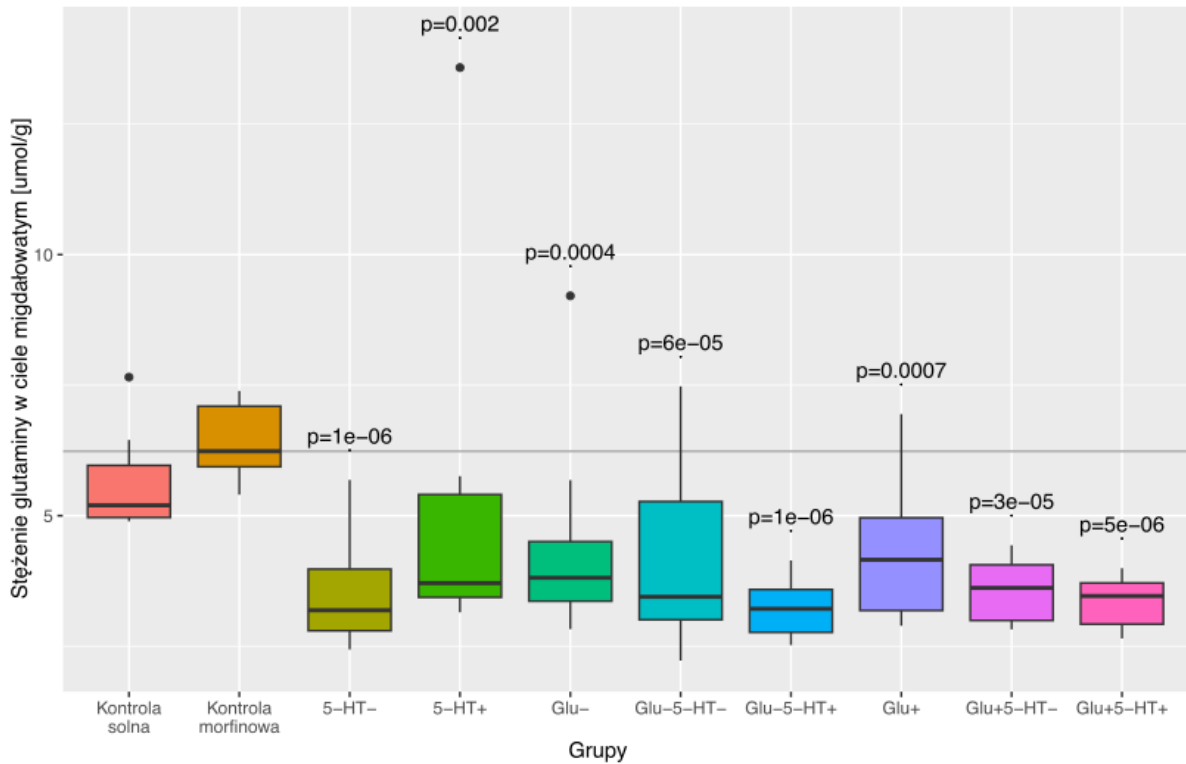
Rys. s1. Rozkłady stężenia L-alaniny w ciele migdałowatym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



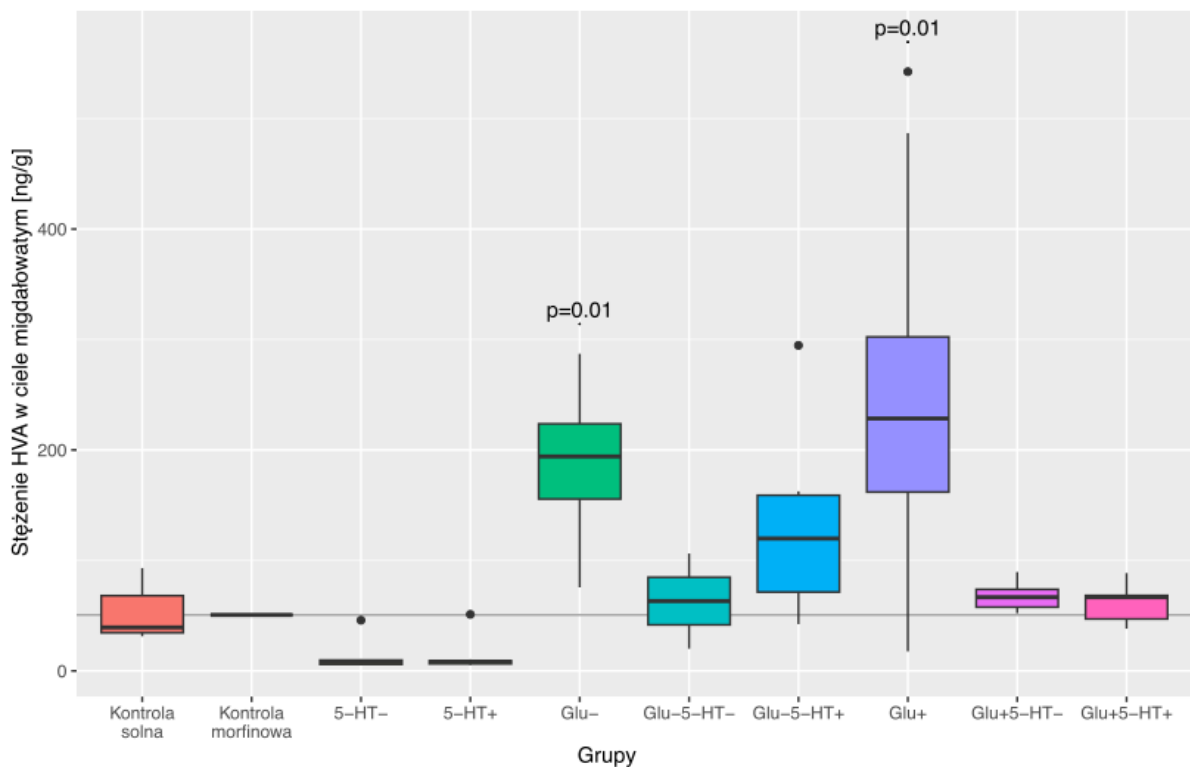
**Rys. s2. Rozkłady stężenia  $\beta$ -alanina w ciele migdałowatym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



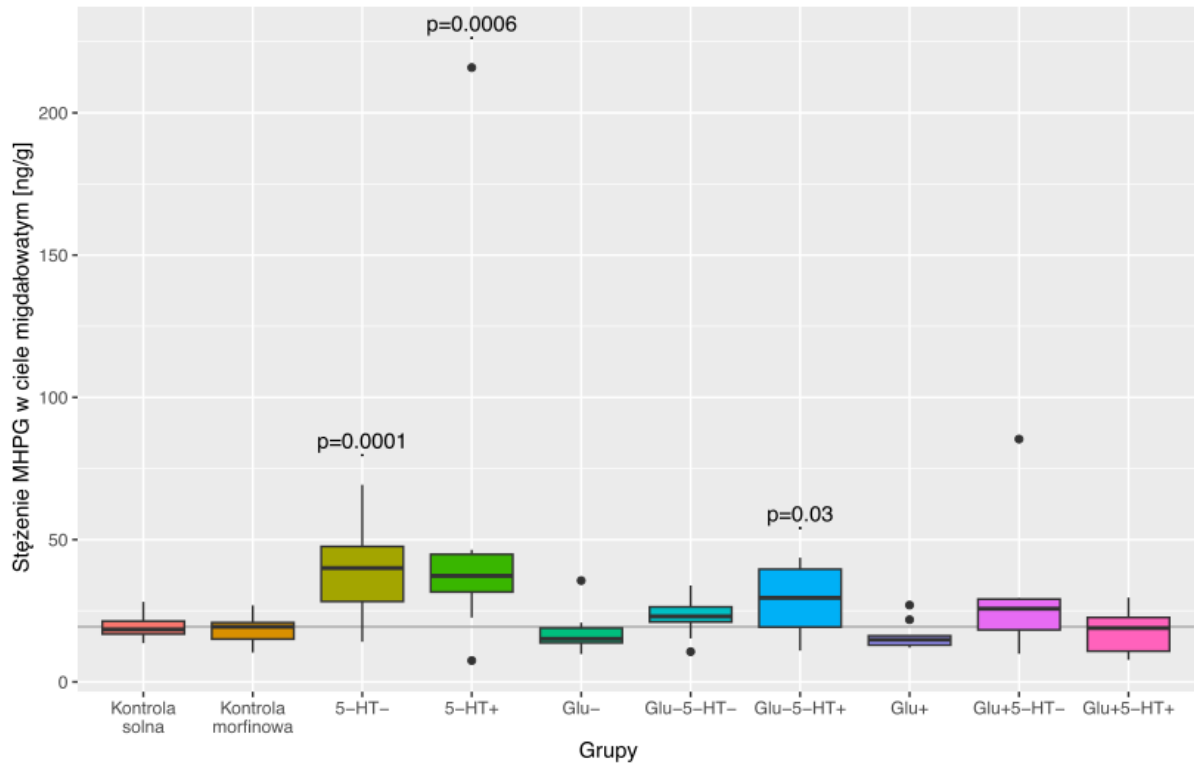
**Rys. s3. Rozkłady stężenia kwasu dihydroksyfenylooctowego DOPAC w ciele migdałowatym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



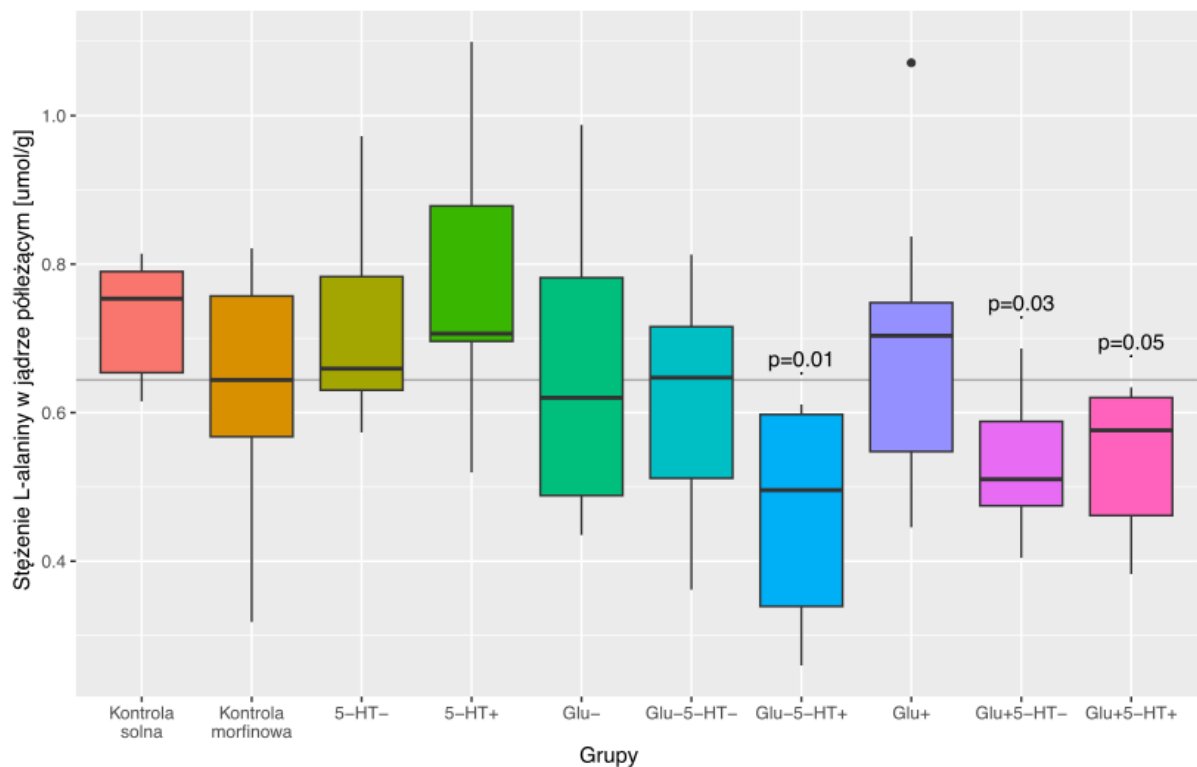
**Rys. s4. Rozkłady stężenia glutaminy w ciele migdałowatym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



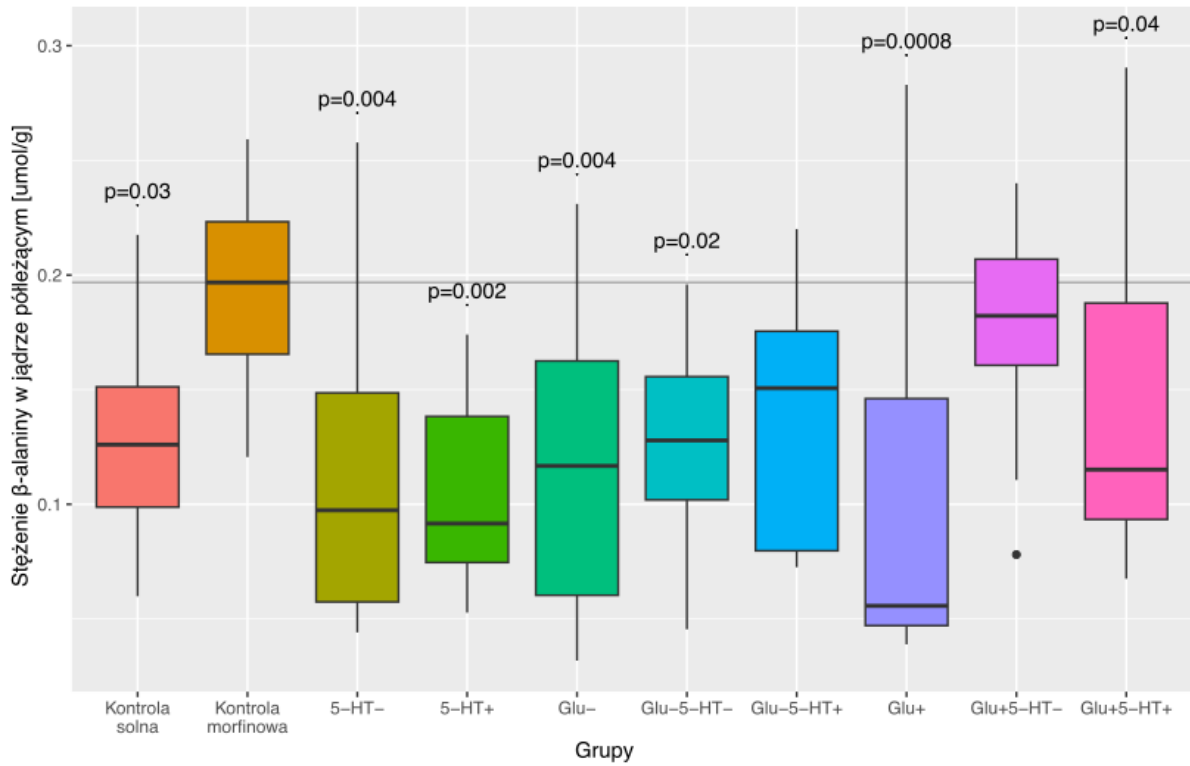
**Rys. s5. Rozkłady stężenia kwasu homowanilinowego (HVA) w ciele migdałowatym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



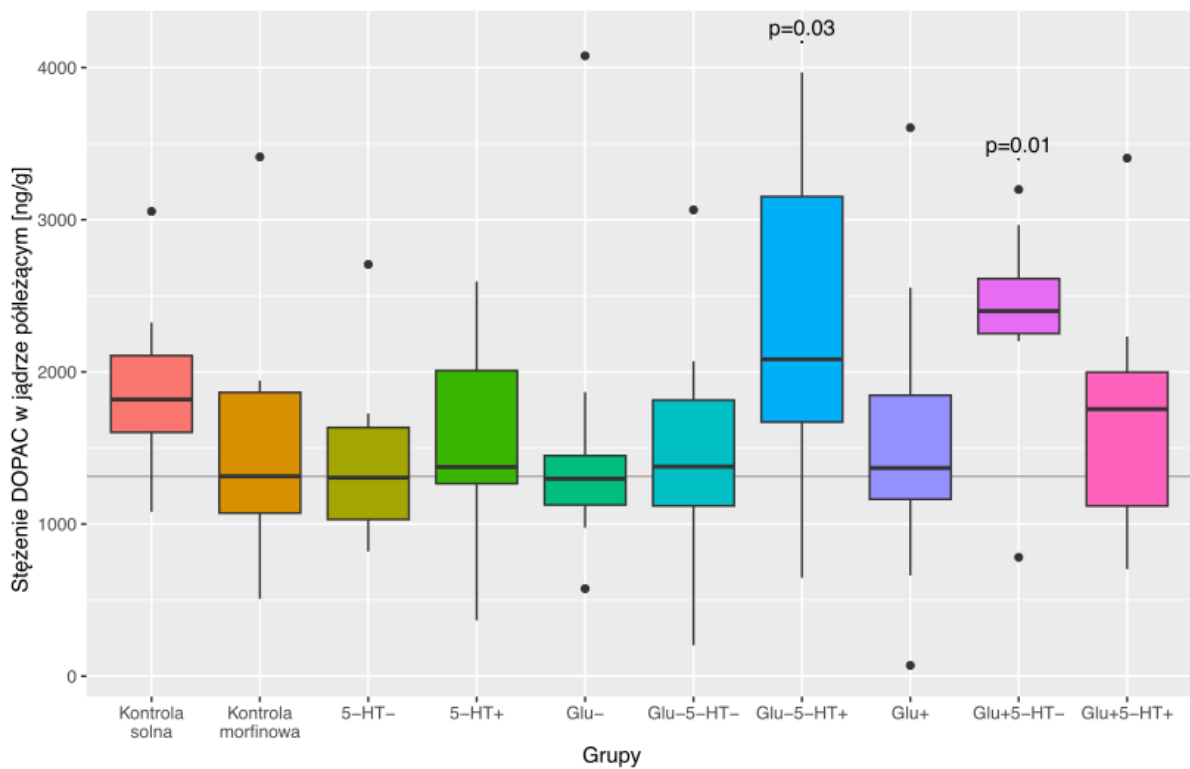
**Rys. s6. Rozkłady stężenia 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikolu (MHPG) w ciele migdałowatym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



**Rys. s7. Rozkłady stężenia L-alaniny w jądrze półleżącym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

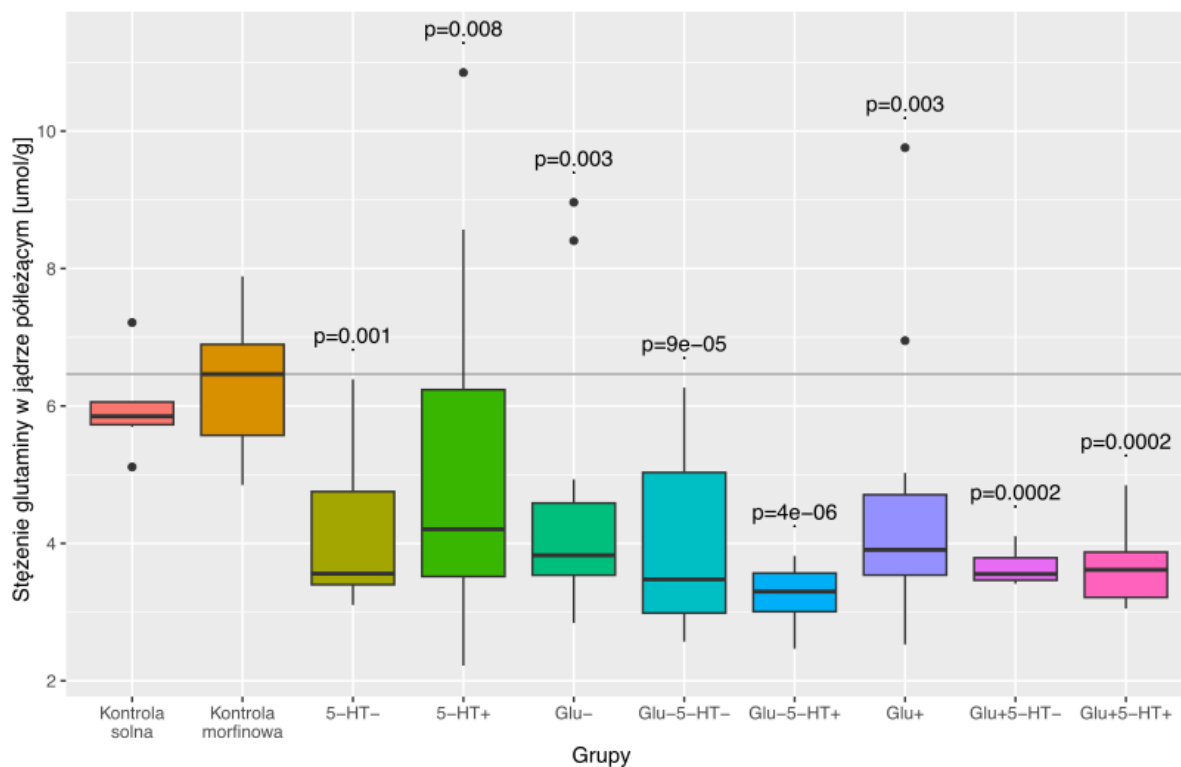


**Rys. s8. Rozkłady stężenia  $\beta$ -alaniny w jądrze półleżącym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

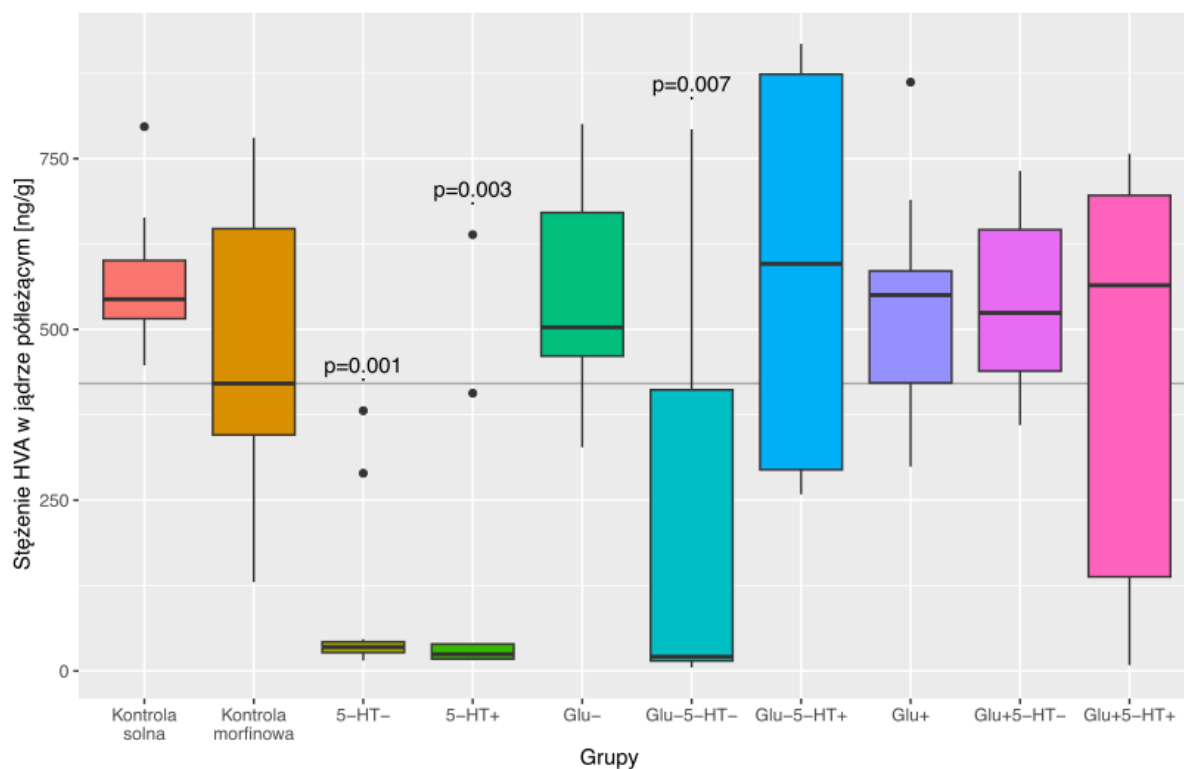


**Rys. s9. Rozkłady stężenia kwasu dihydroksyfenylooctowego DOPAC w jądrze półleżącym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**

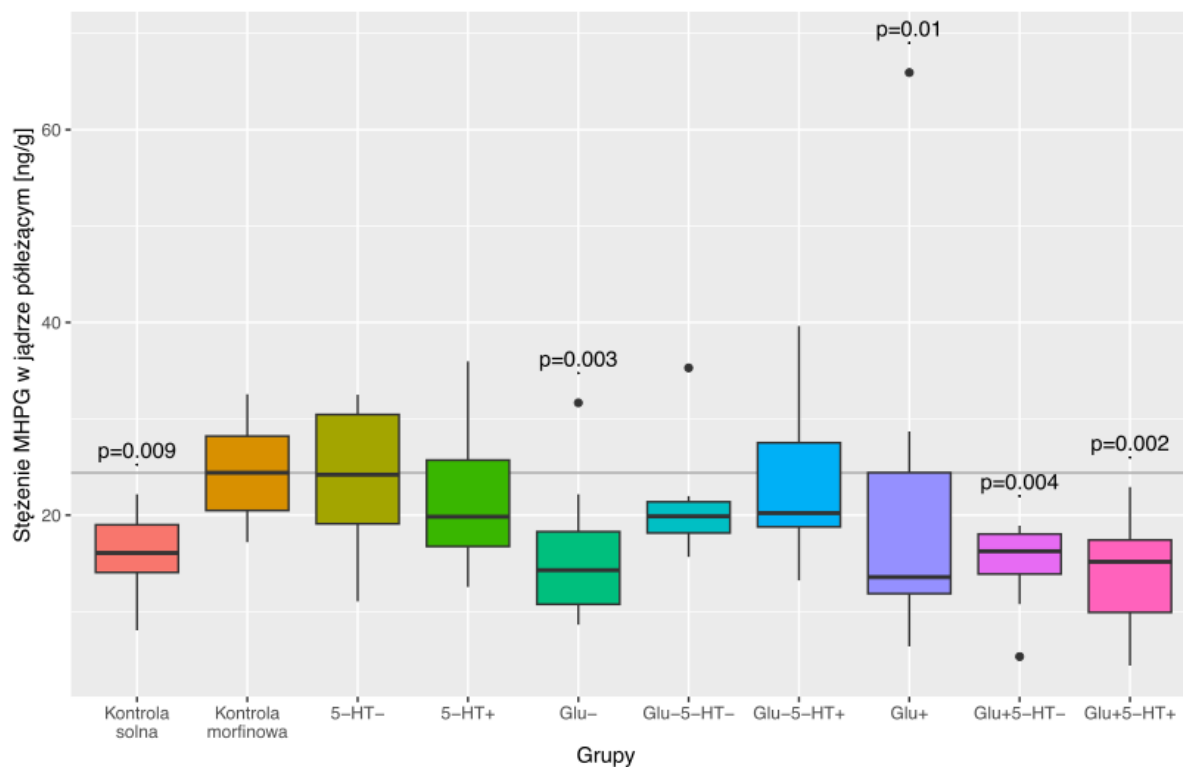




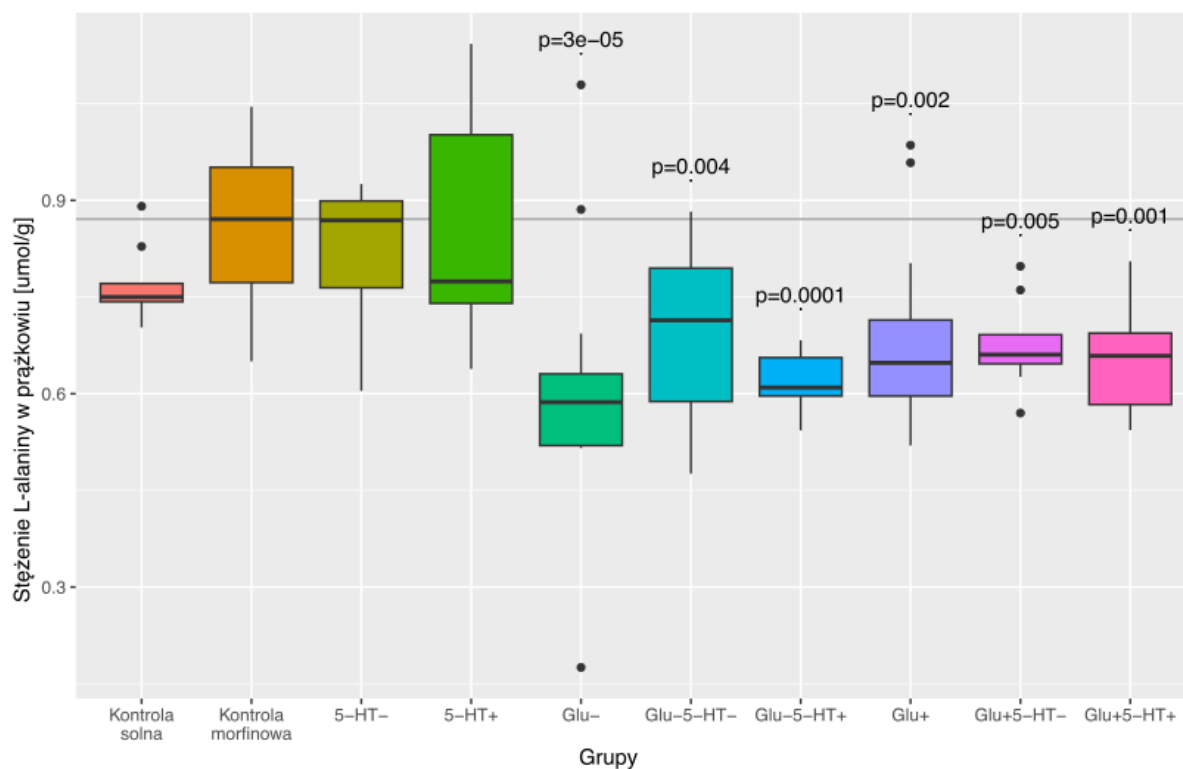
**Rys. s10. Rozkłady stężenia glutaminy w jądrze półleżącym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



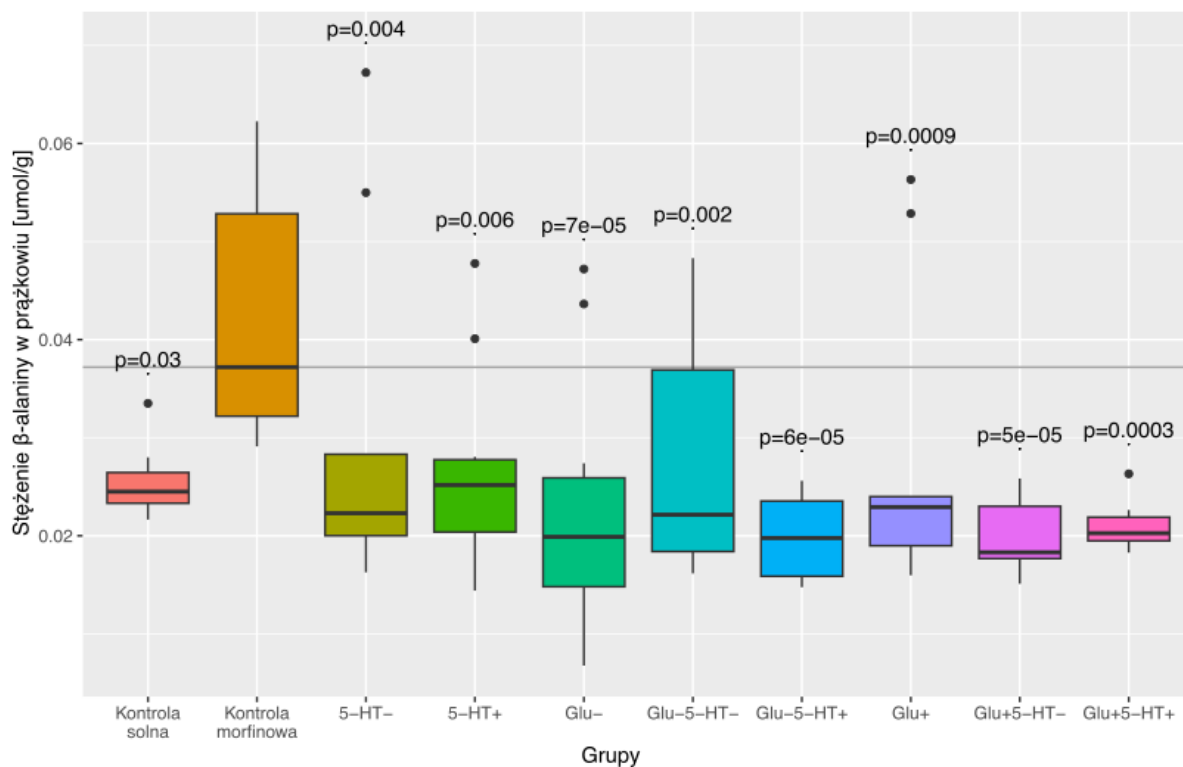
**Rys. s11. Rozkłady stężenia kwasu homowanilinowego (HVA) w jądrze półleżącym w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



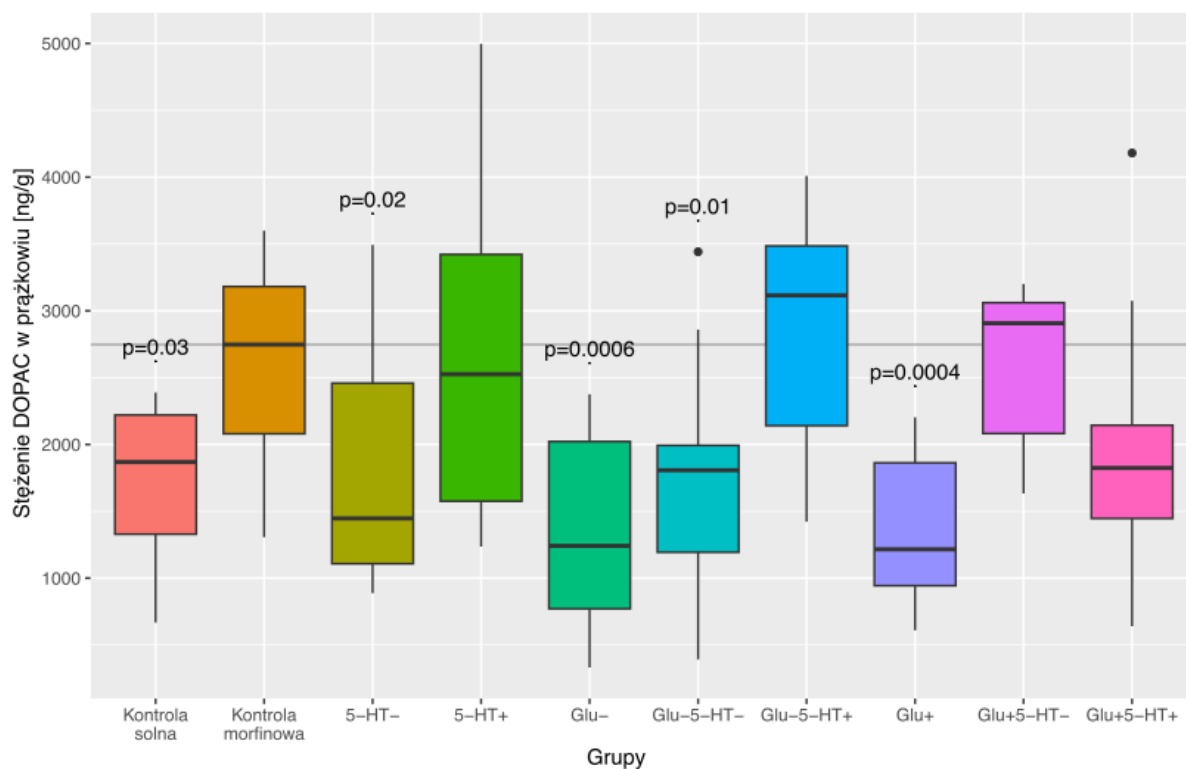
**Rys. s12. Rozkłady stężenia 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikolu (MHPG) w jądrze półleżącym w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



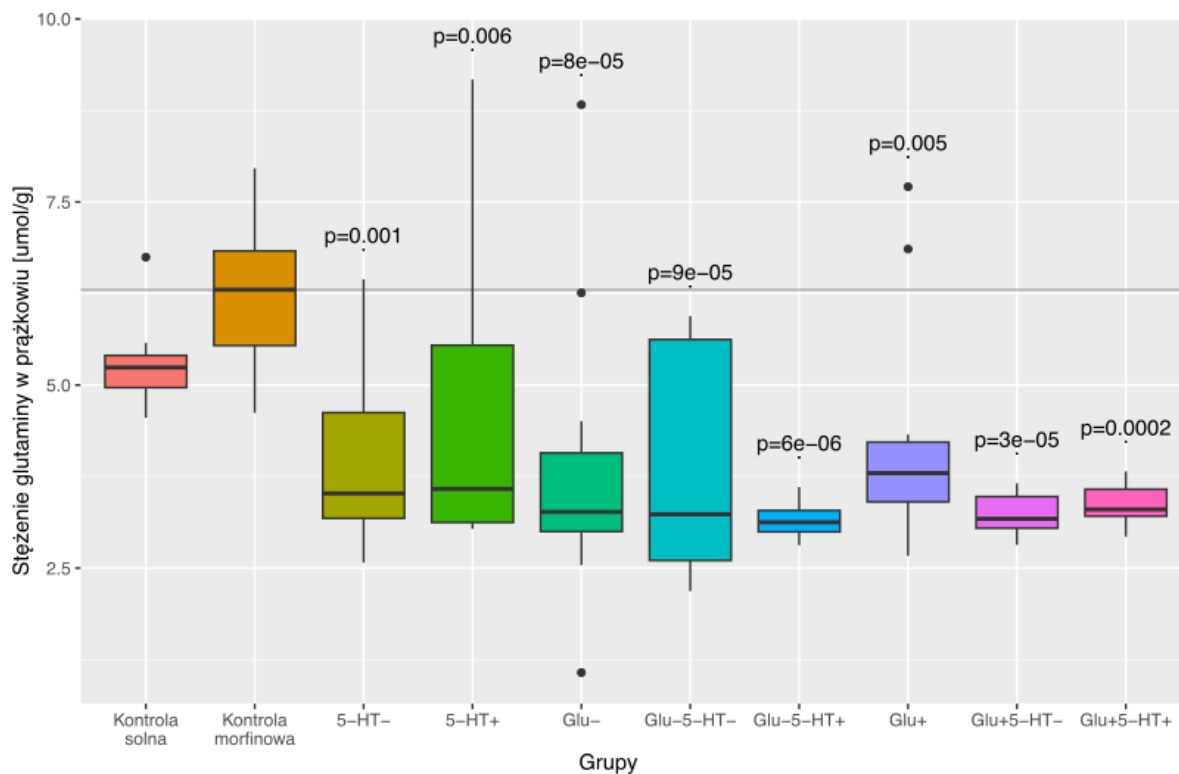
**Rys. s13. Rozkłady stężenia L-alaniny w prążkowie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



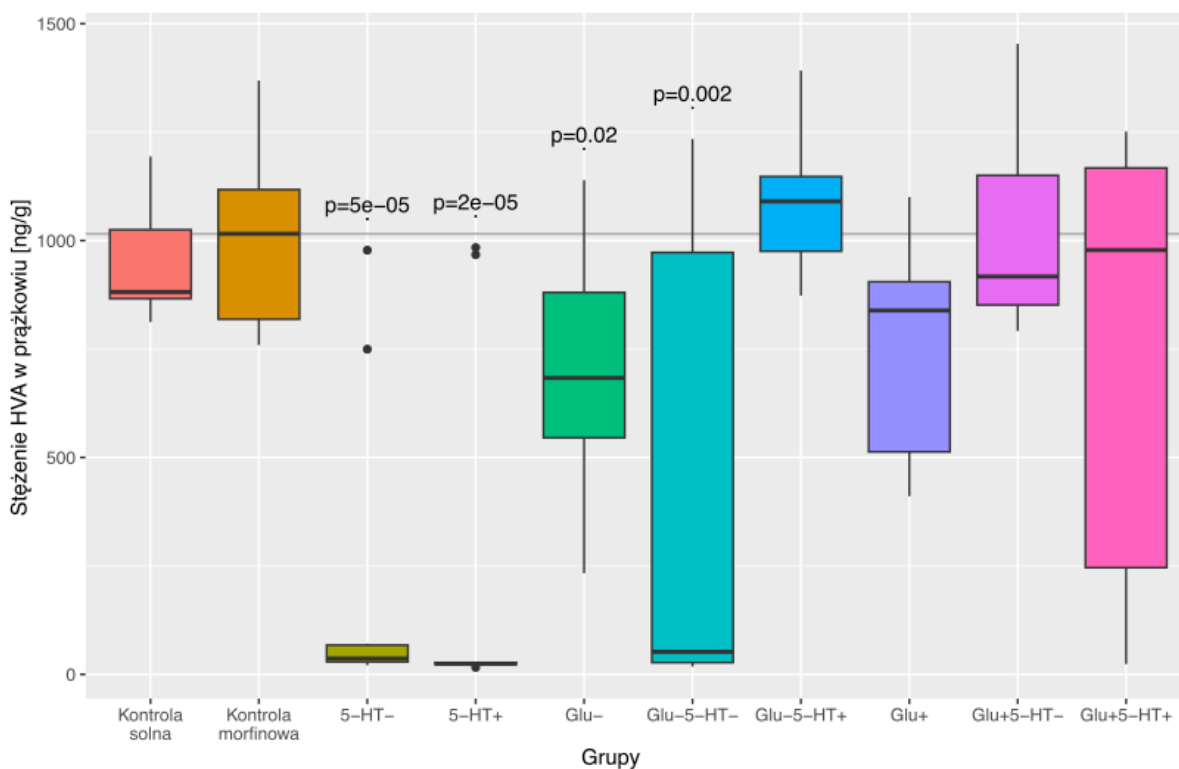
**Rys. s14. Rozkłady stężenia  $\beta$ -alaniny w prążkowie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



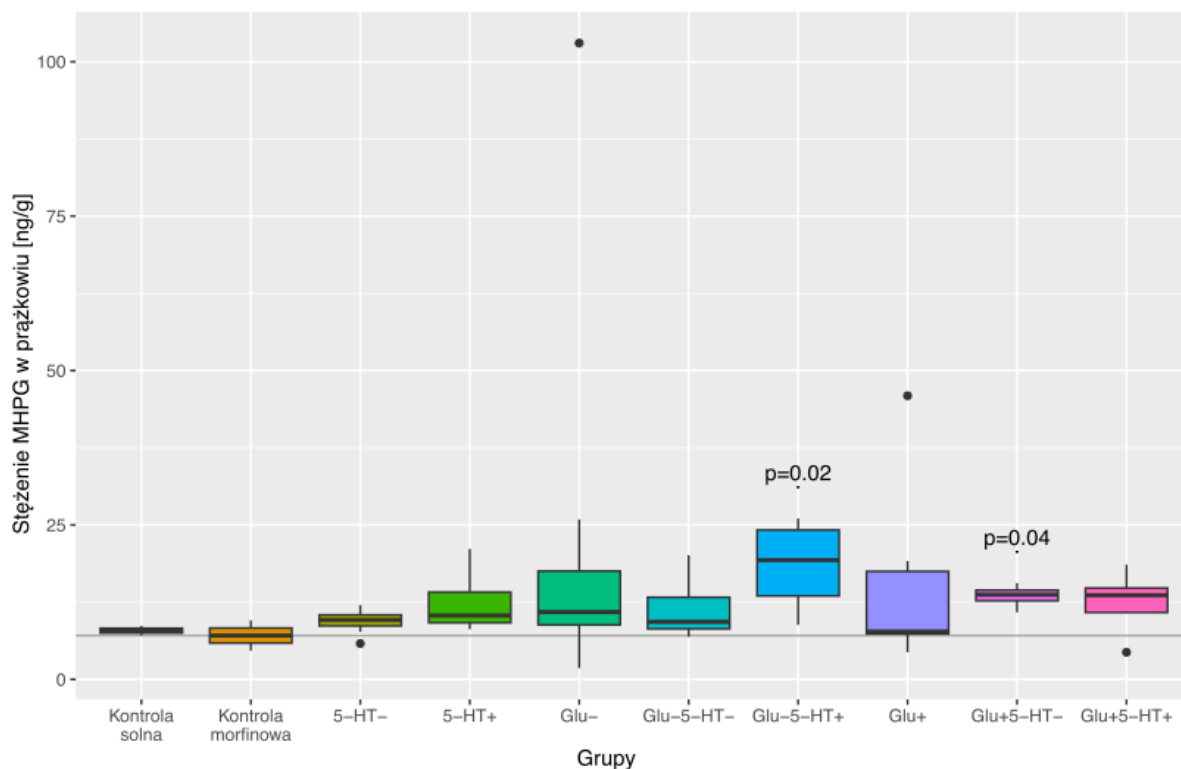
**Rys. s15. Rozkłady stężenia kwasu dihydroksyfenylooctowego DOPAC w prążkowie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



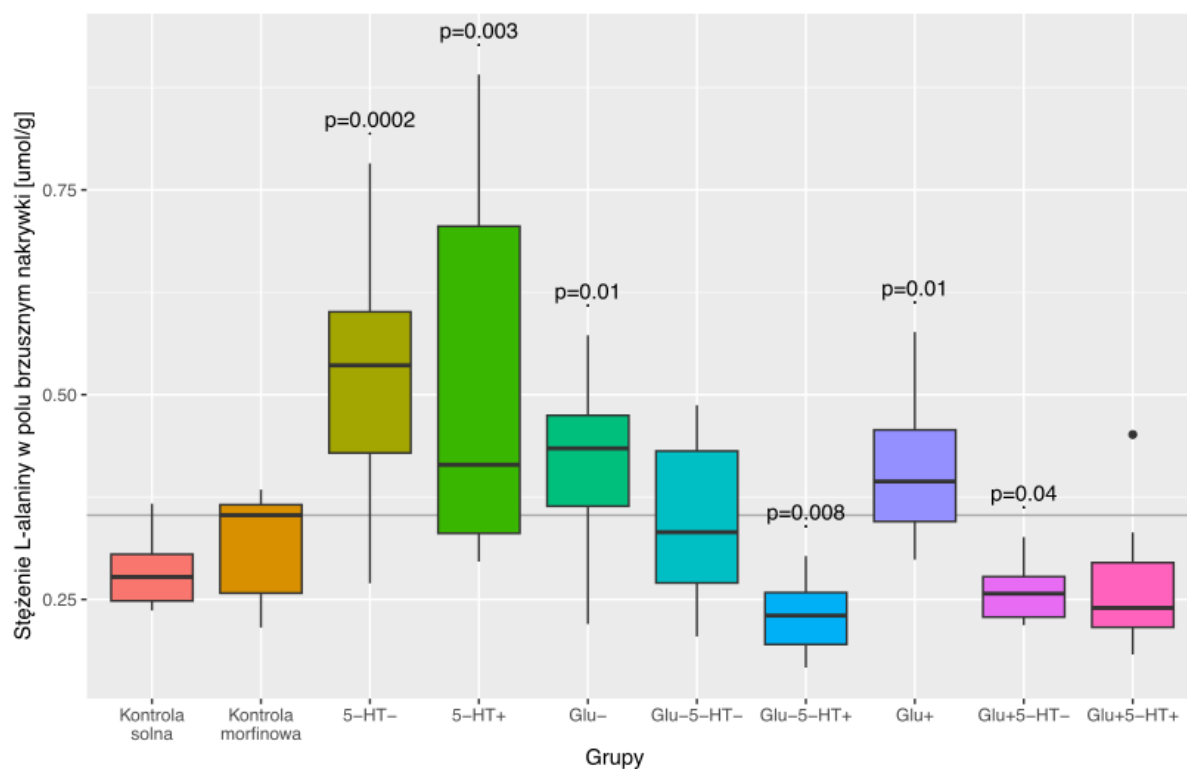
**Rys. s16. Rozkłady stężenia glutaminy w prążkowie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



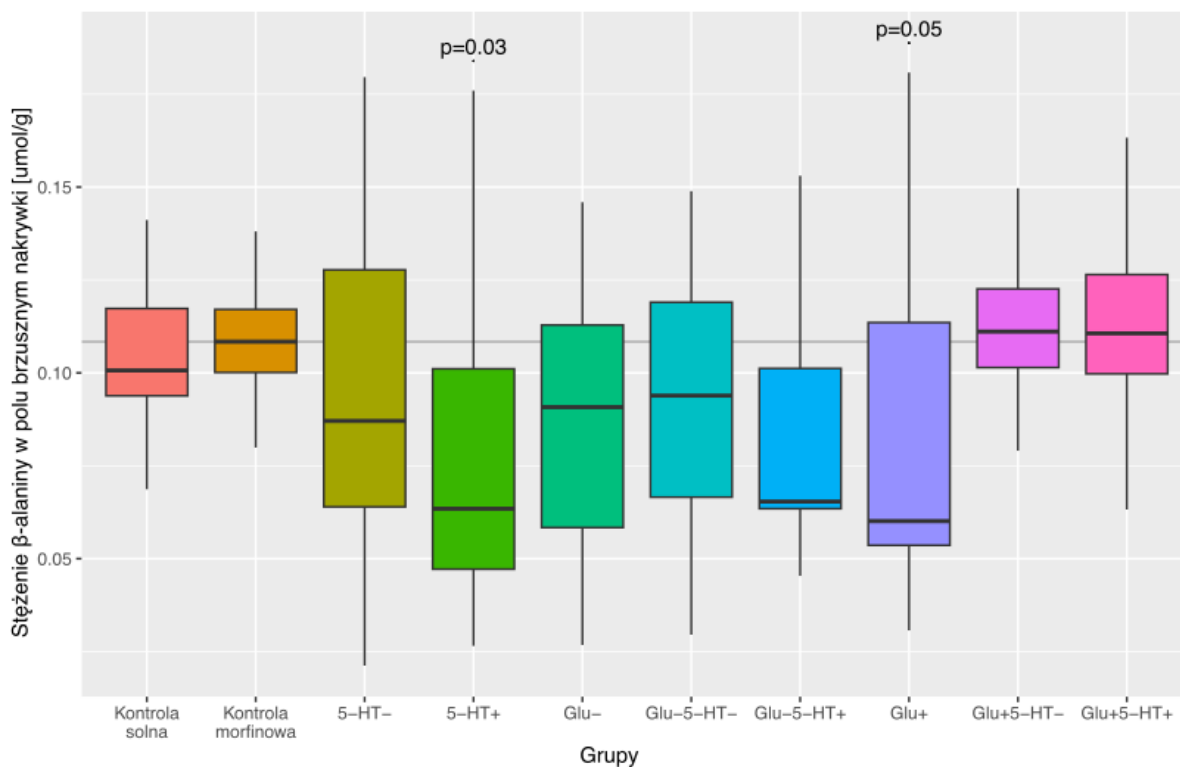
**Rys. s17. Rozkłady stężenia kwasu homowanilinowego (HVA) w prążkowie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



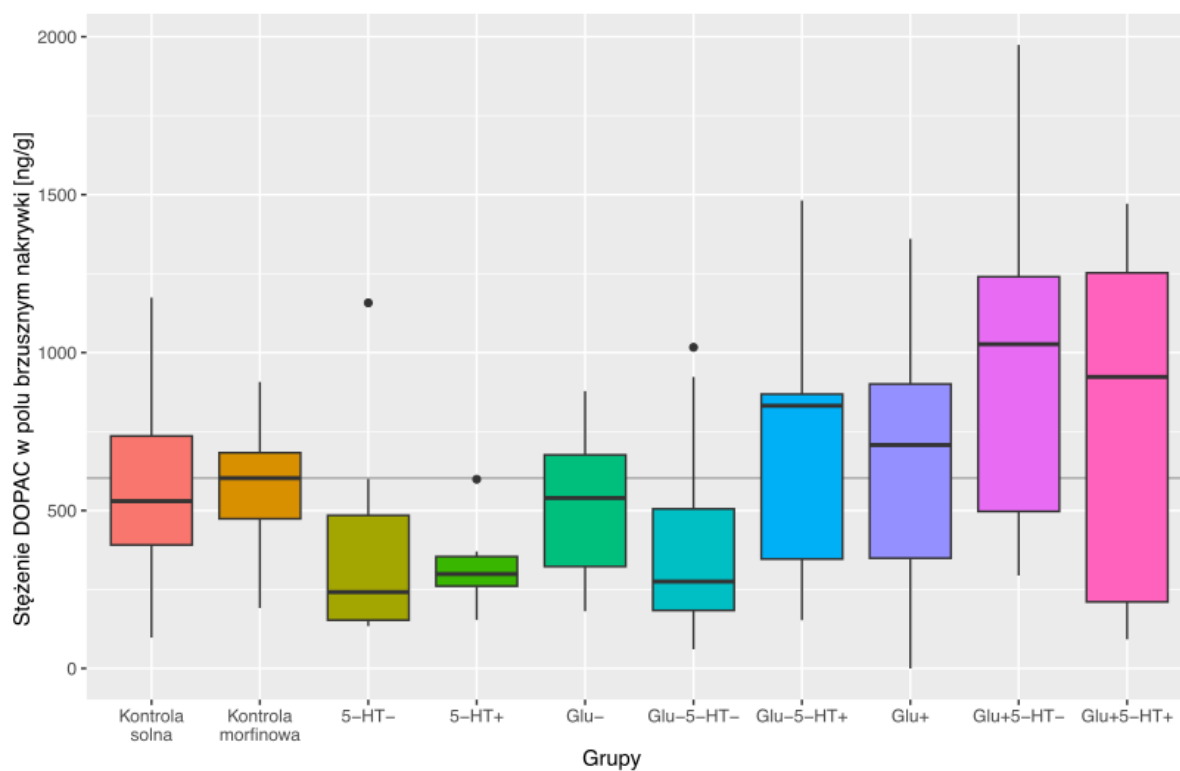
**Rys. s18. Rozkłady stężenia 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikolu (MHPG) w prążkowie w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



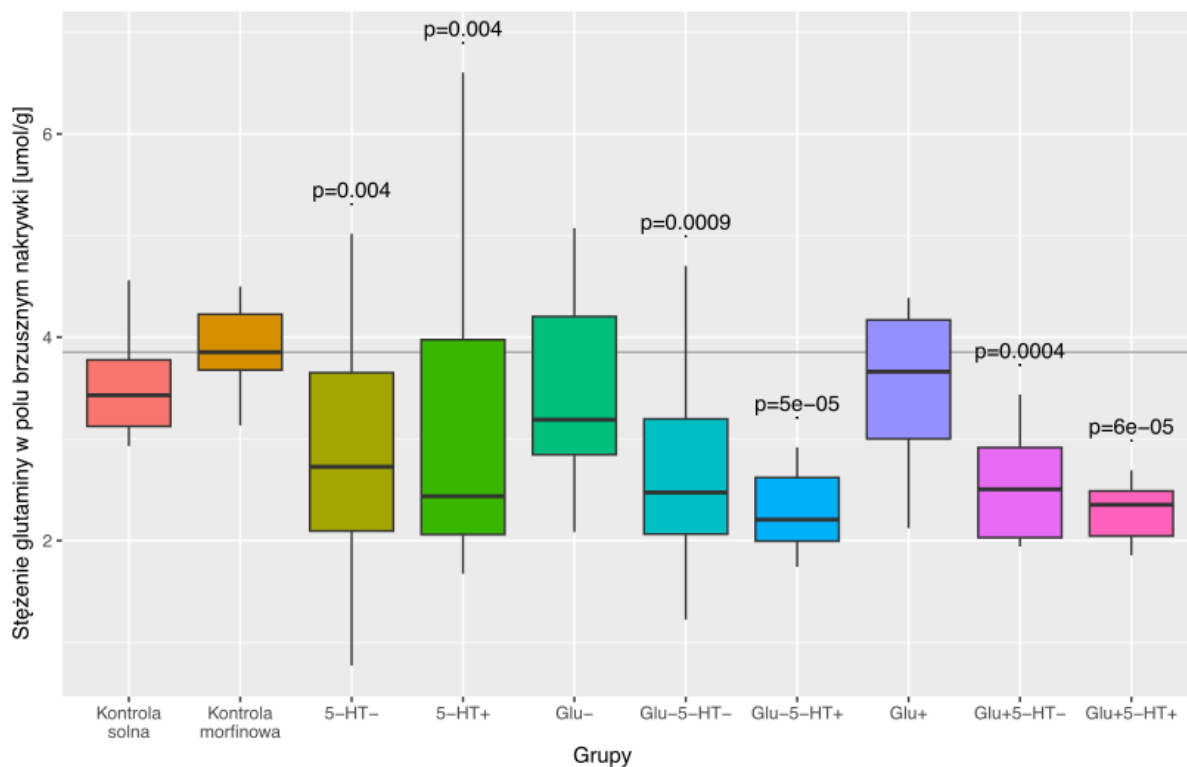
**Rys. s19. Rozkłady stężenia L-alaniny w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



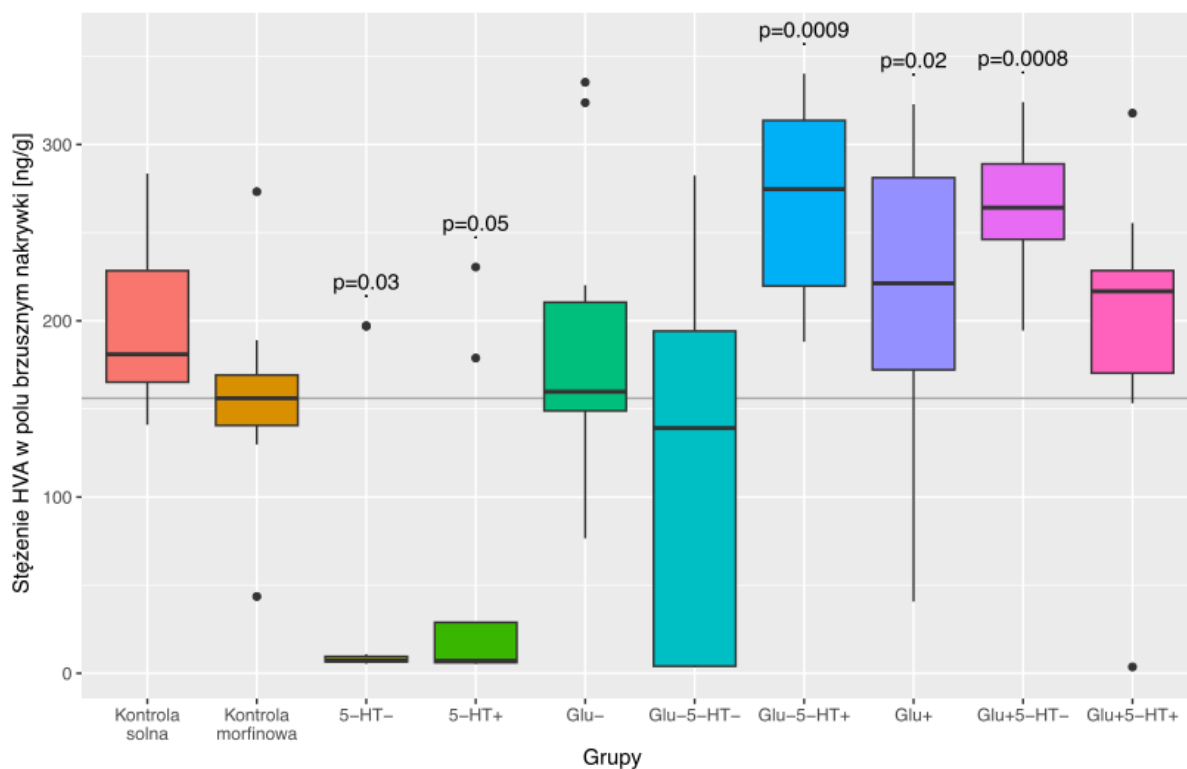
**Rys. s20. Rozkłady stężenia  $\beta$ -alaniny w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



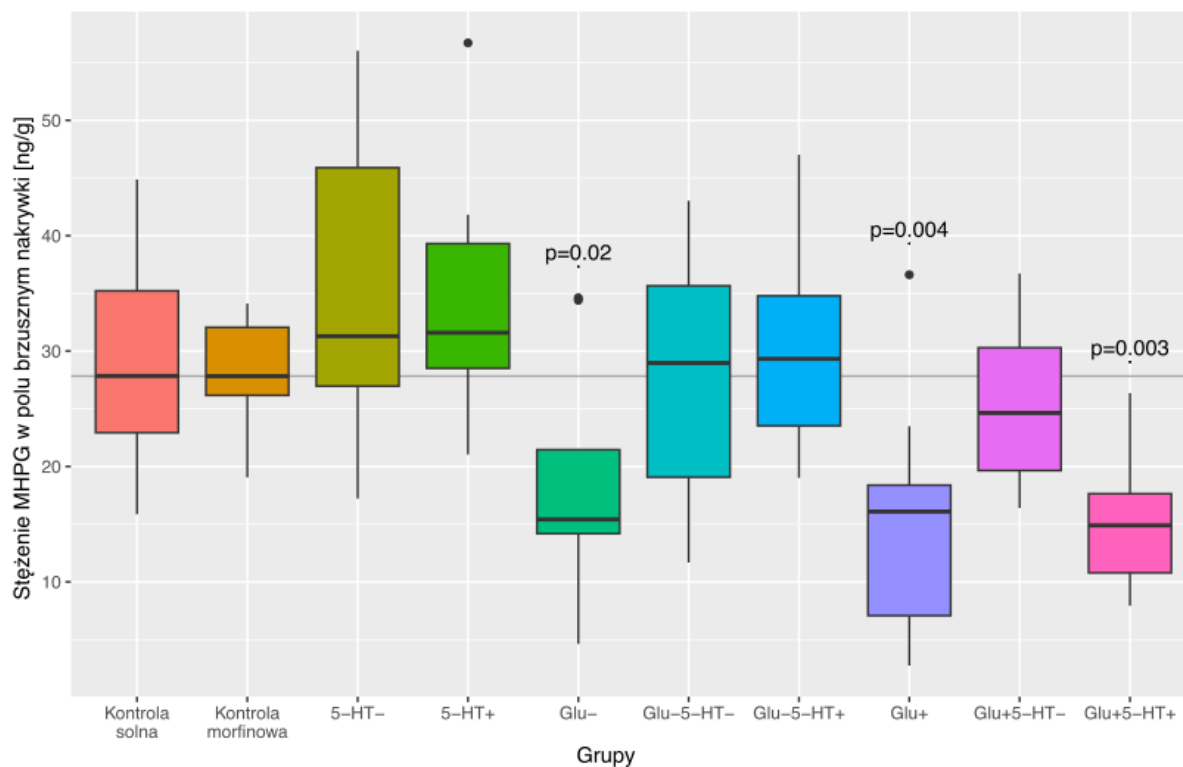
**Rys. s21. Rozkłady stężenia kwasu dihydroksyfenylooctowego DOPAC w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.**



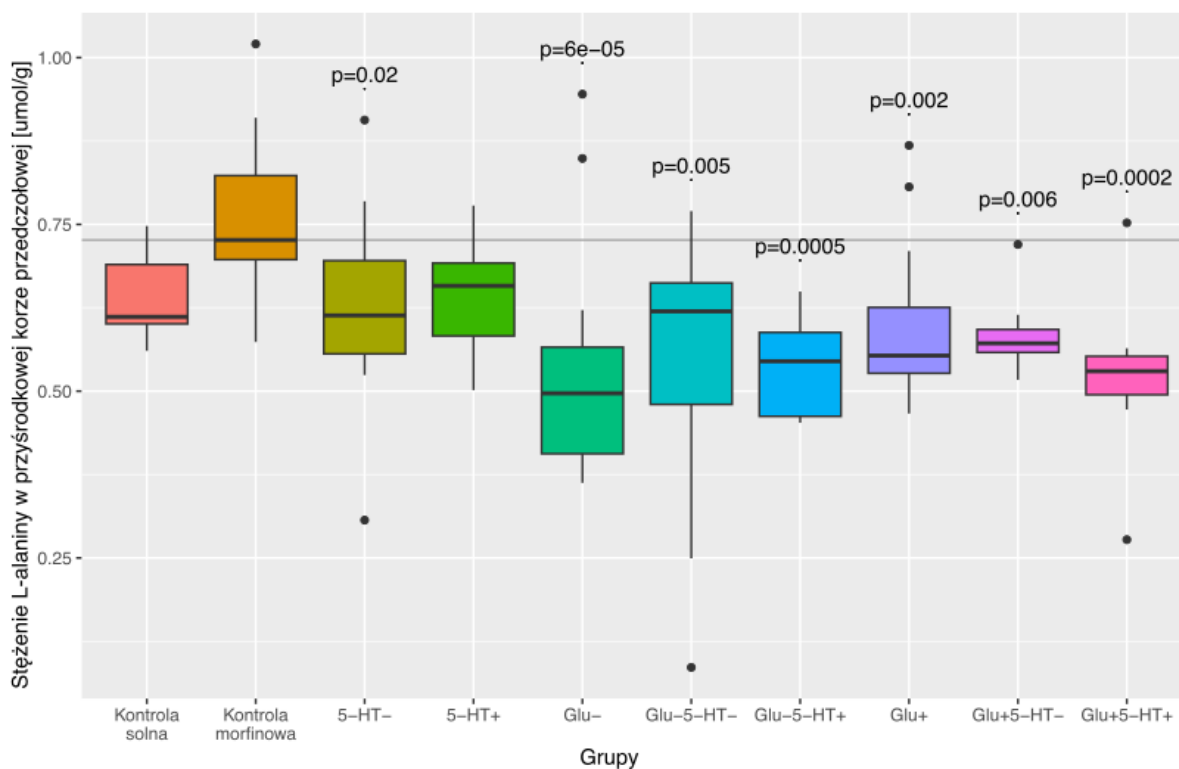
Rys. s22. Rozkłady stężenia glutaminy w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



Rys. s23. Rozkłady stężenia kwasu homowanilinowego (HVA) w polu brzusznej nakrywki w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

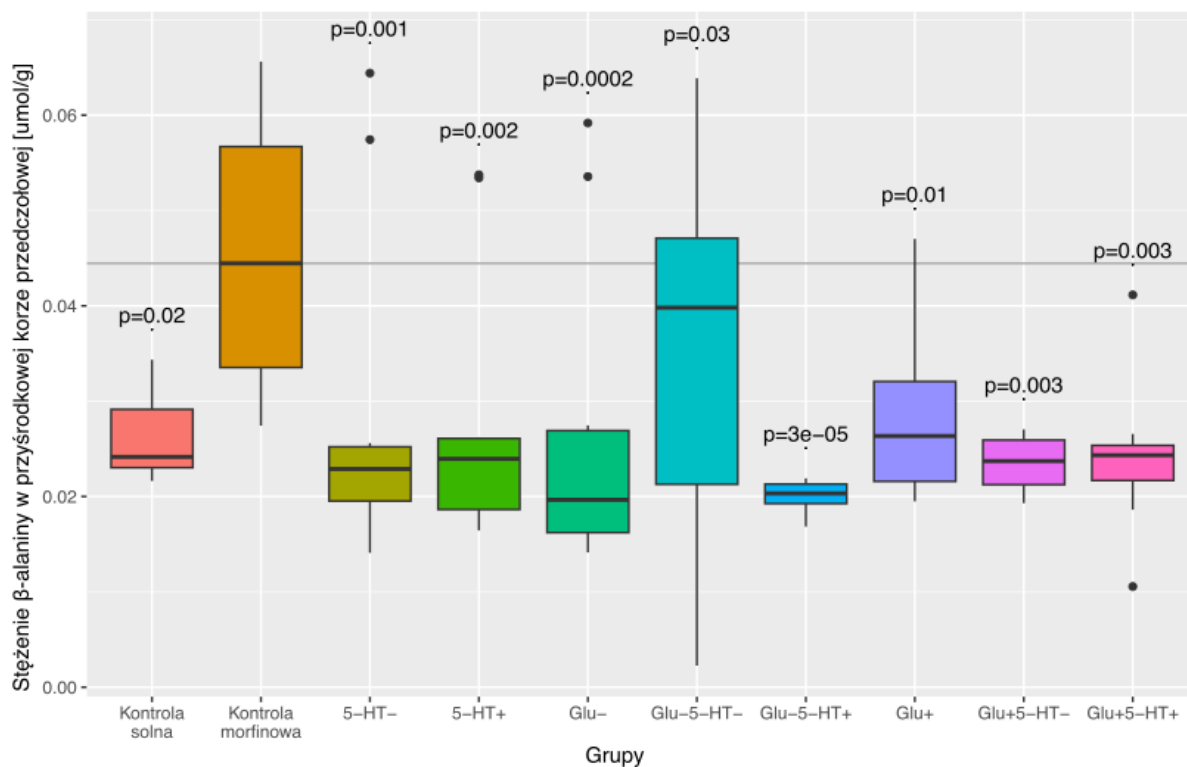


**Rys. s24. Rozkłady stężenia 3-metoksy-4-hydroksyfenilo-glikolu (MHPG) w polu brzusznej naczyni w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

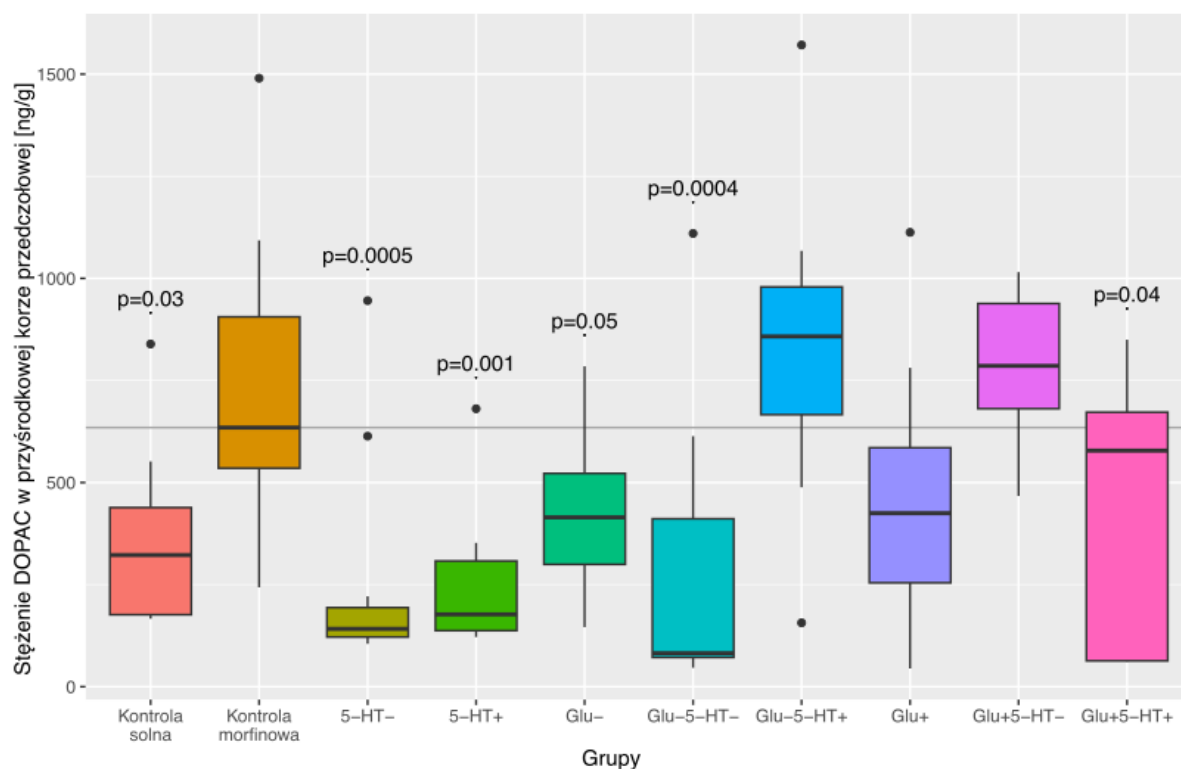


**Rys. s25. Rozkłady stężenia L-alaniny w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

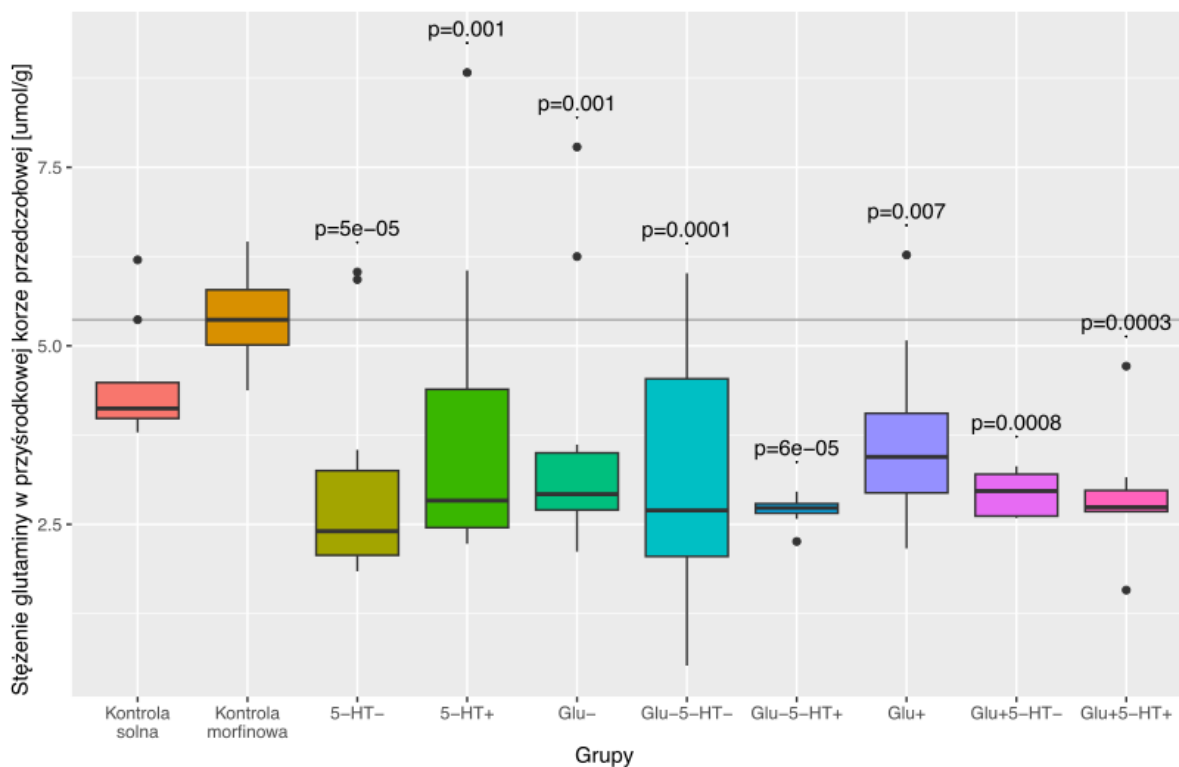




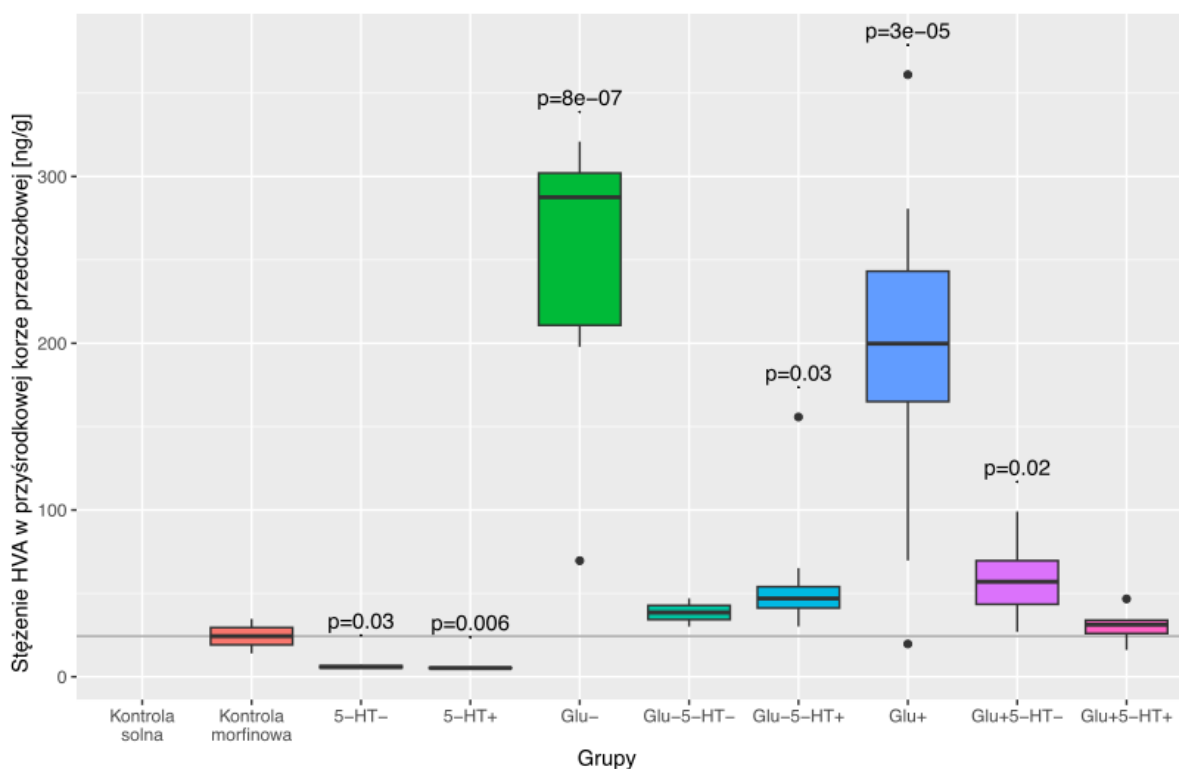
**Rys. s26. Rozkłady stężenia  $\beta$ -alaniny w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



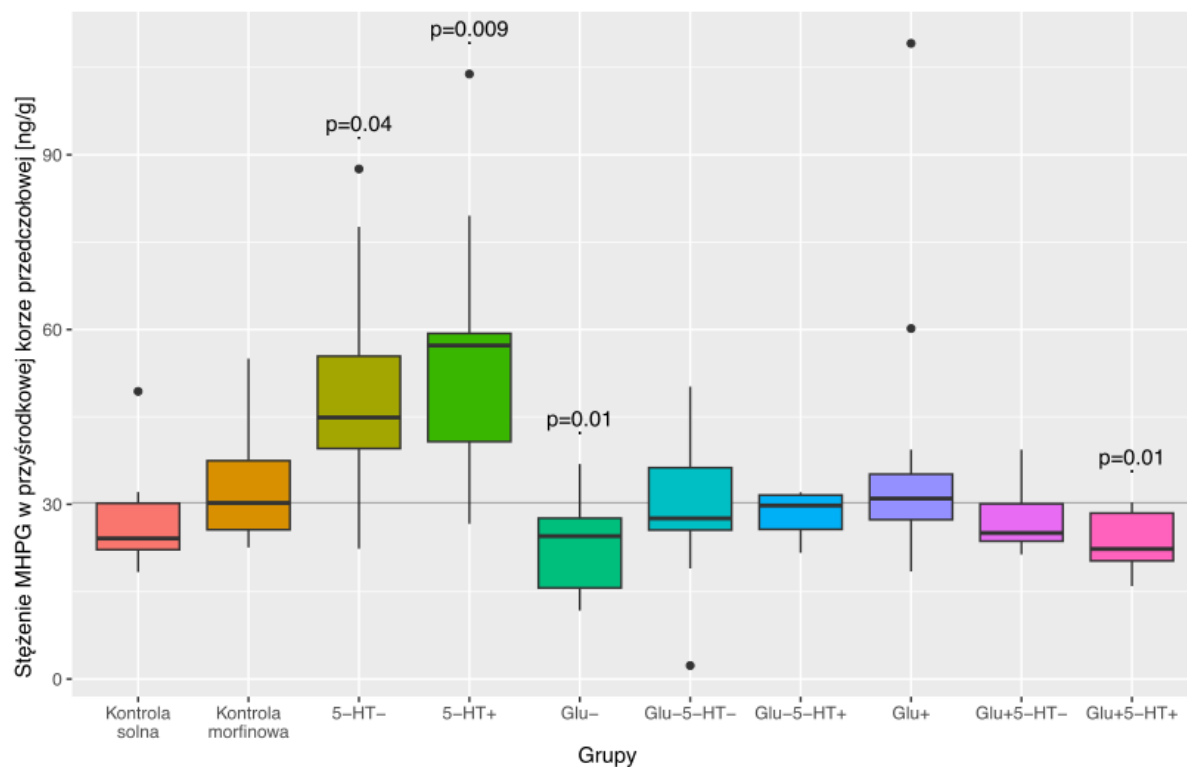
**Rys. s27. Rozkłady stężenia kwasu dihydroksyfenylooctowego DOPAC w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



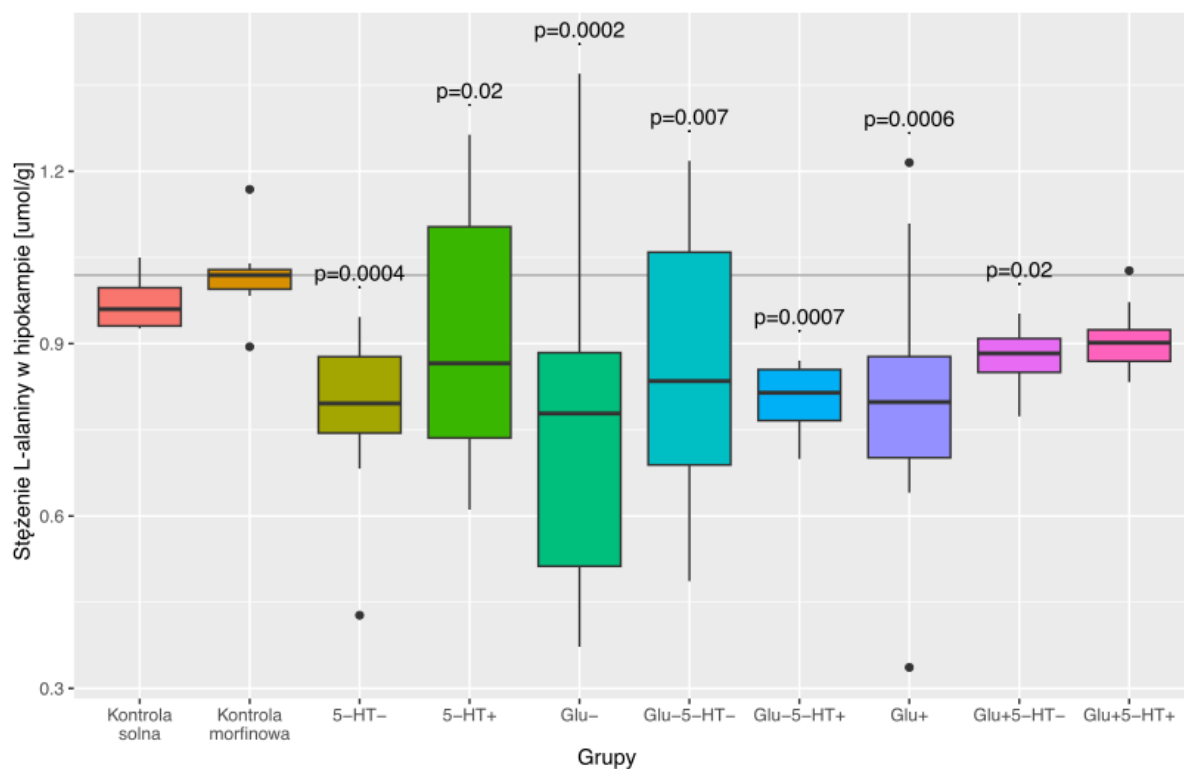
**Rys. s28. Rozkłady stężenia glutaminy w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



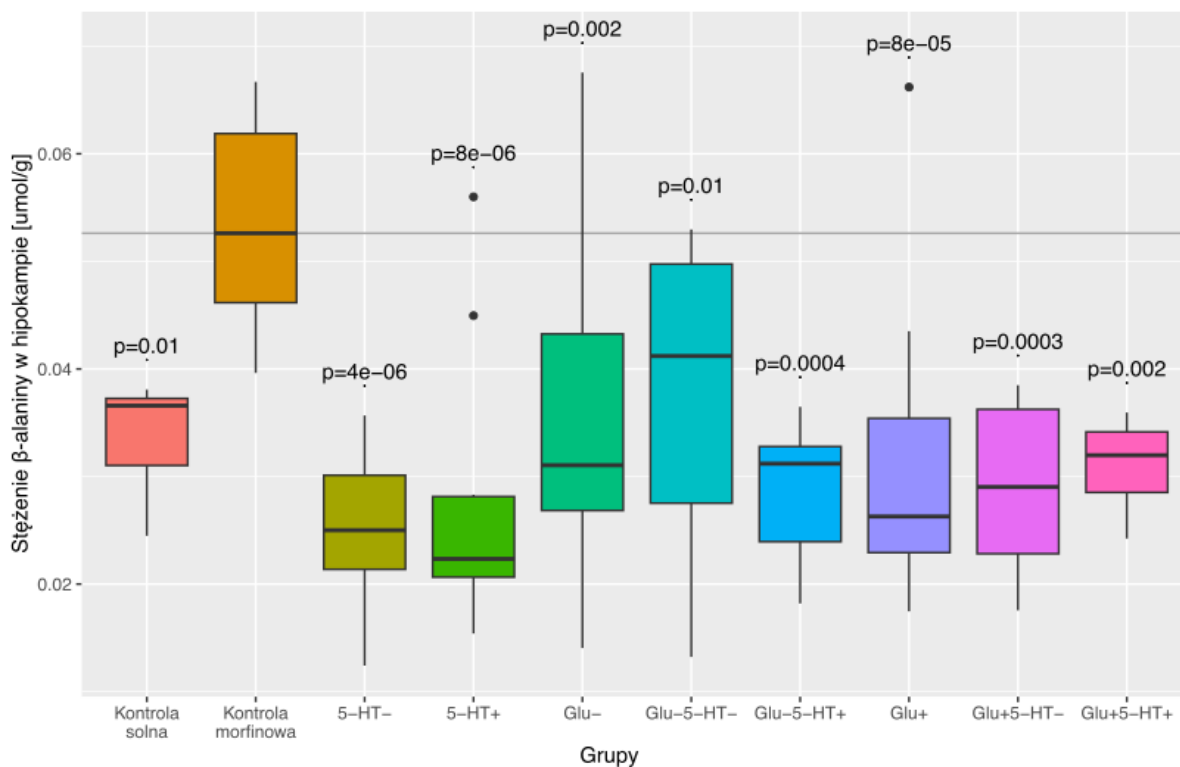
**Rys. s29. Rozkłady stężenia kwasu homowanilinowego (HVA) w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



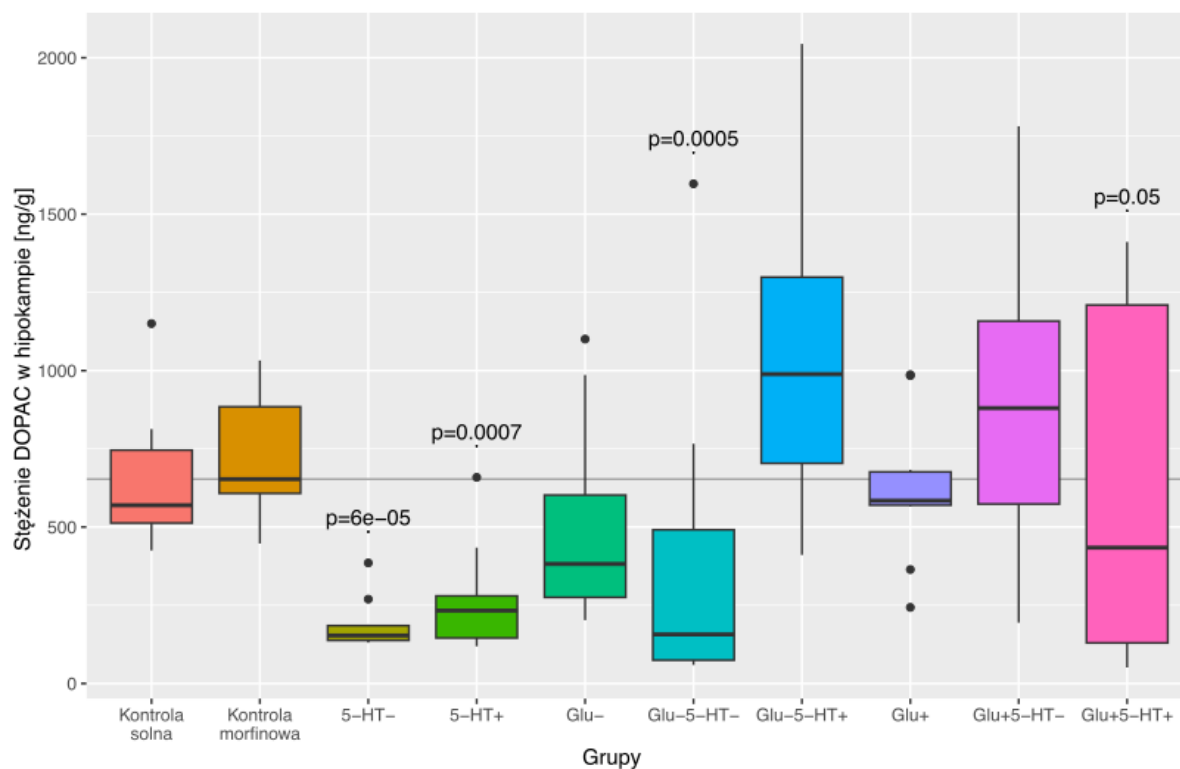
**Rys. s30. Rozkłady stężenia 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikolu (MHPG) w przyśrodkowej korze przedczołowej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



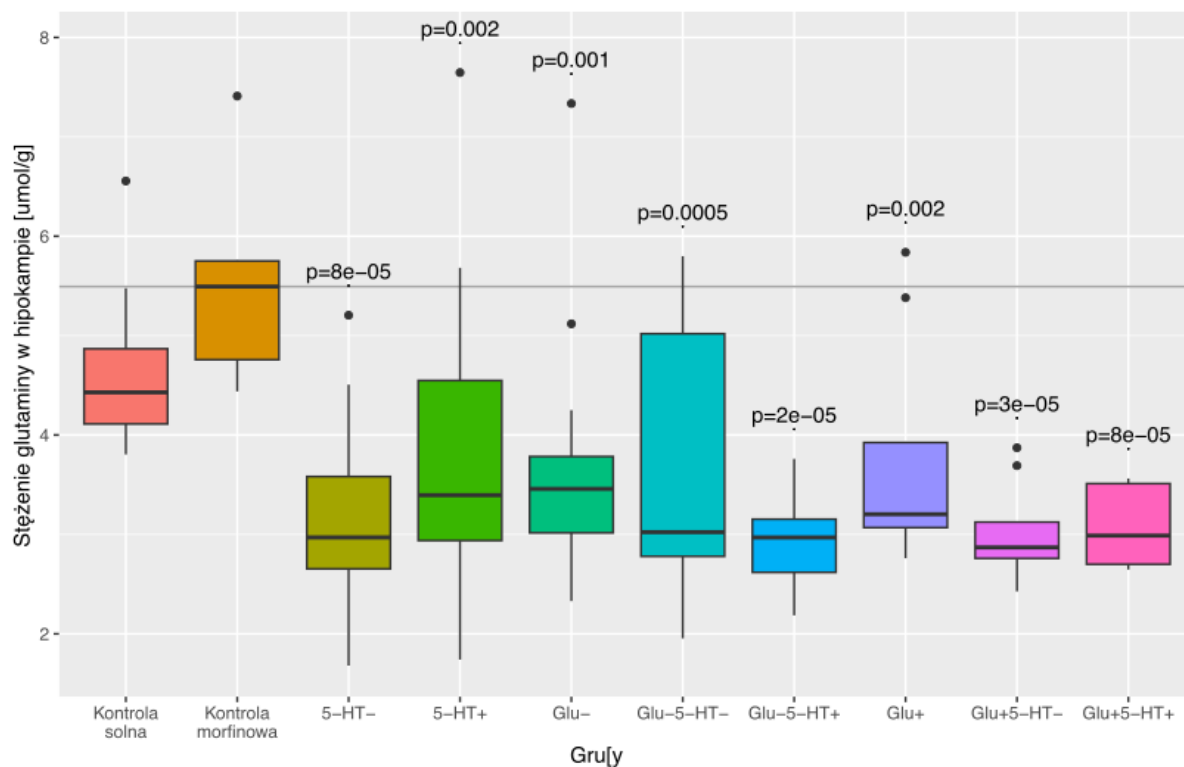
**Rys. s31. Rozkłady stężenia L-alaniny w hipokampie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



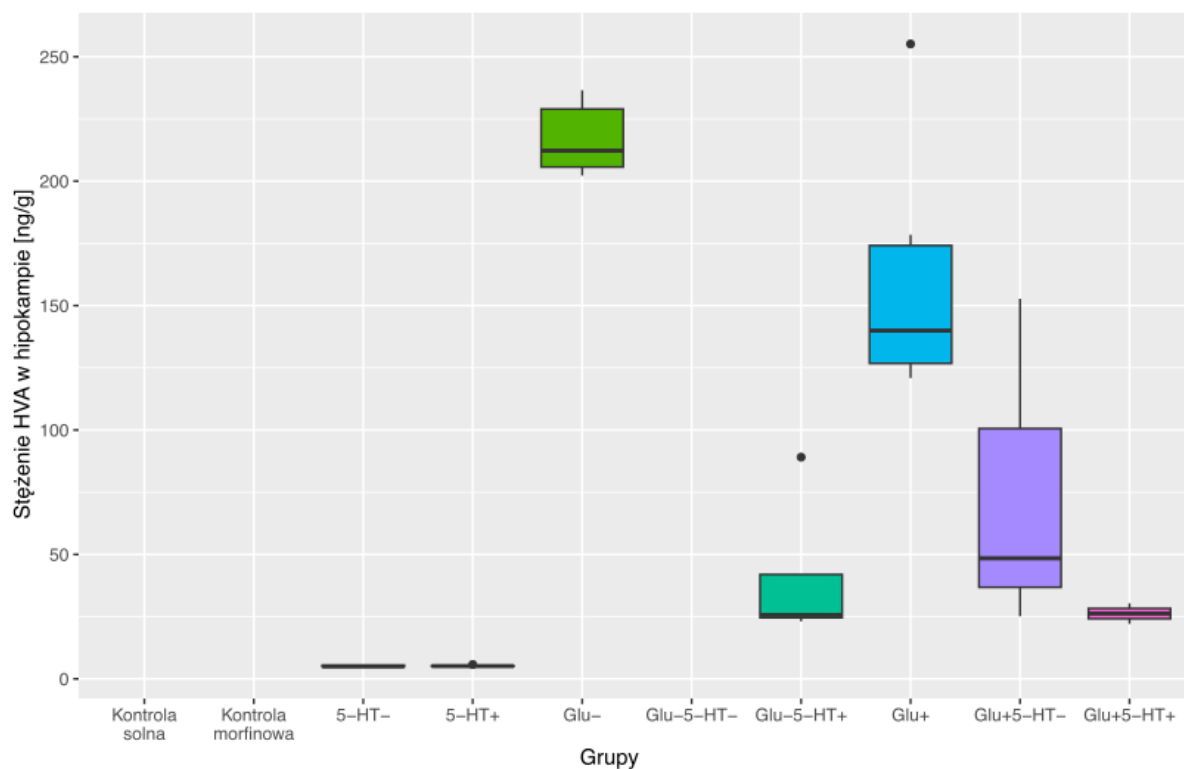
Rys. s32. Rozkłady stężenia  $\beta$ -alaniny w hipokampie w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



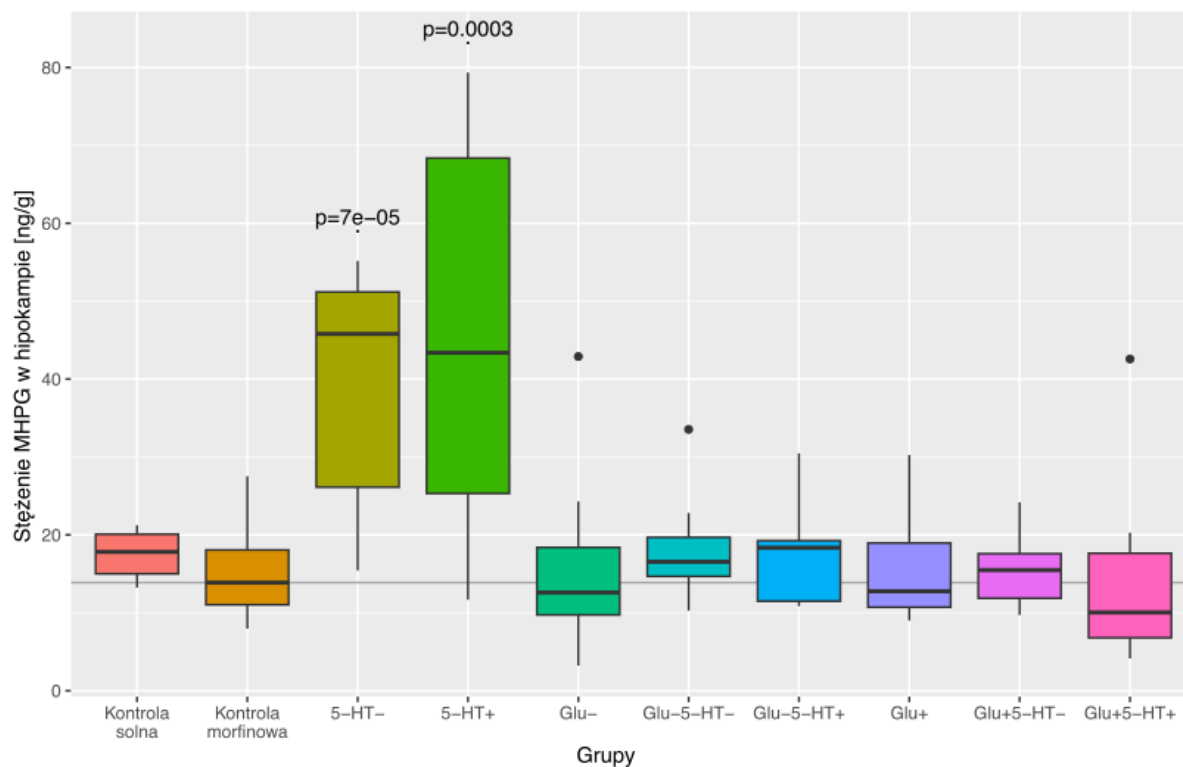
Rys. s33. Rozkłady stężenia kwasu dihydroksyfenylooctowego DOPAC w hipokampie w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



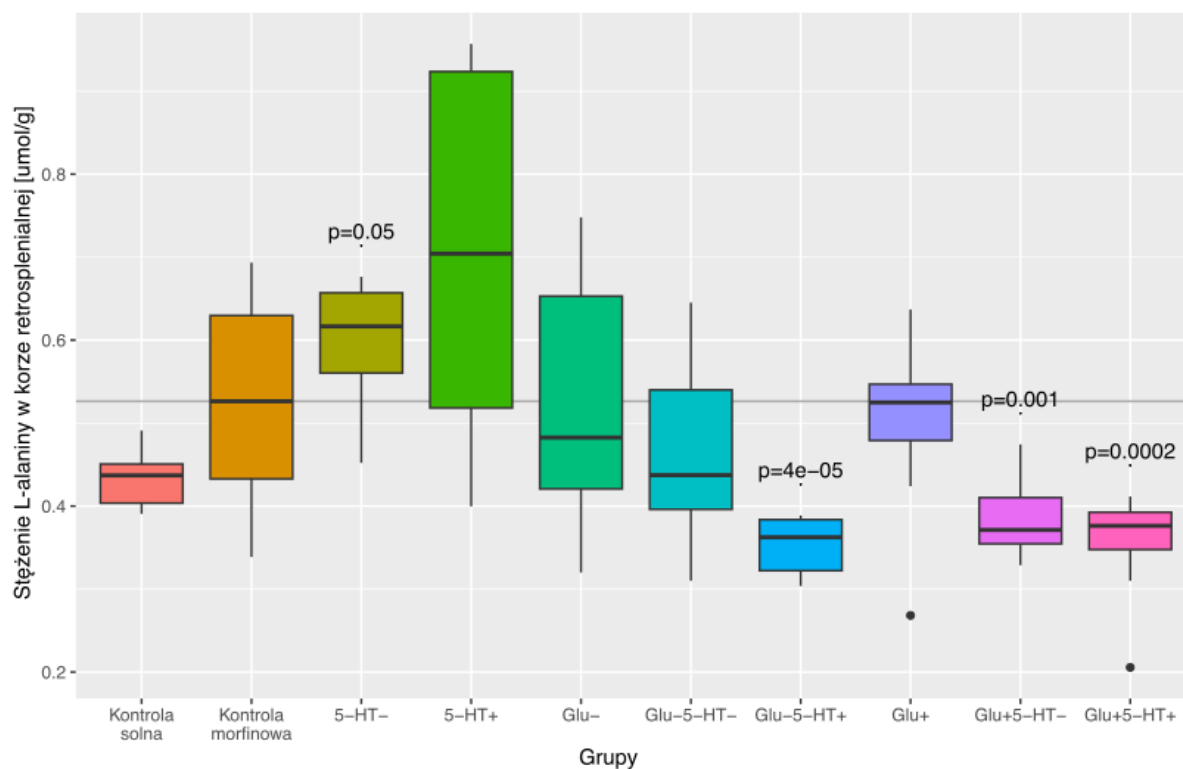
**Rys. s34. Rozkłady stężenia glutaminy w hipokampie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



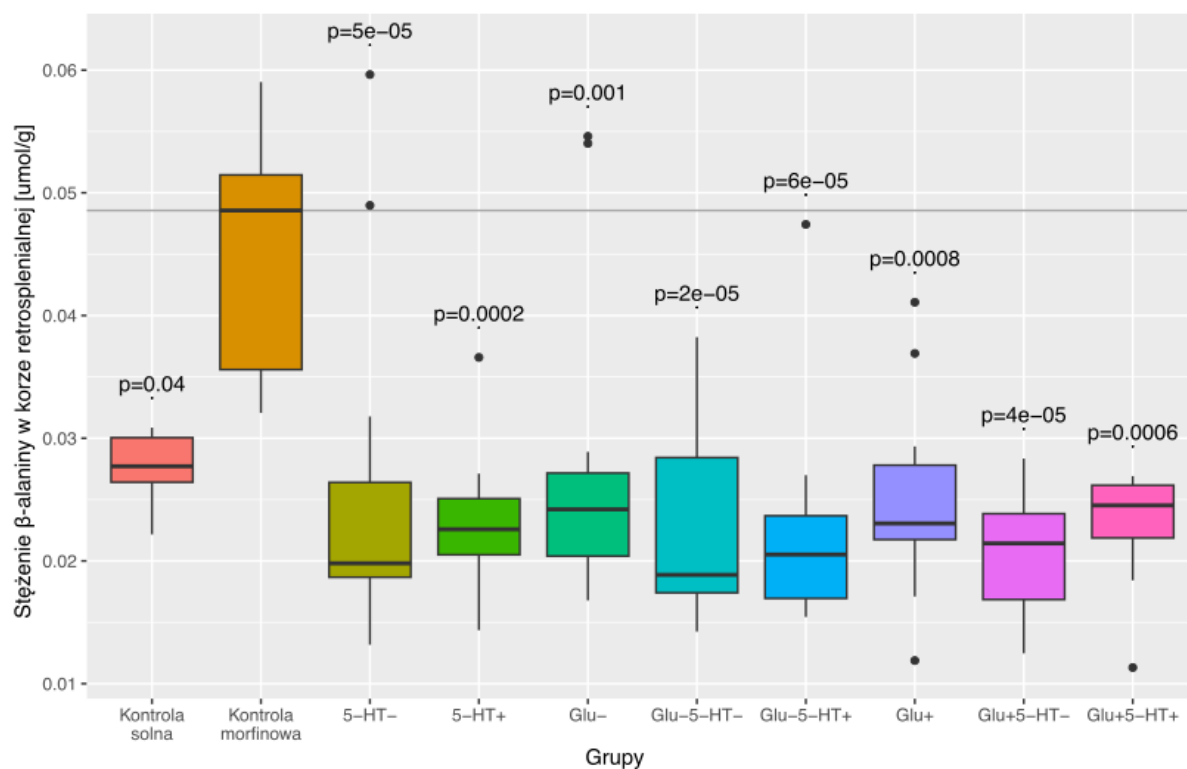
**Rys. s35. Rozkłady stężenia kwasu homowanilinowego (HVA) w hipokampie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



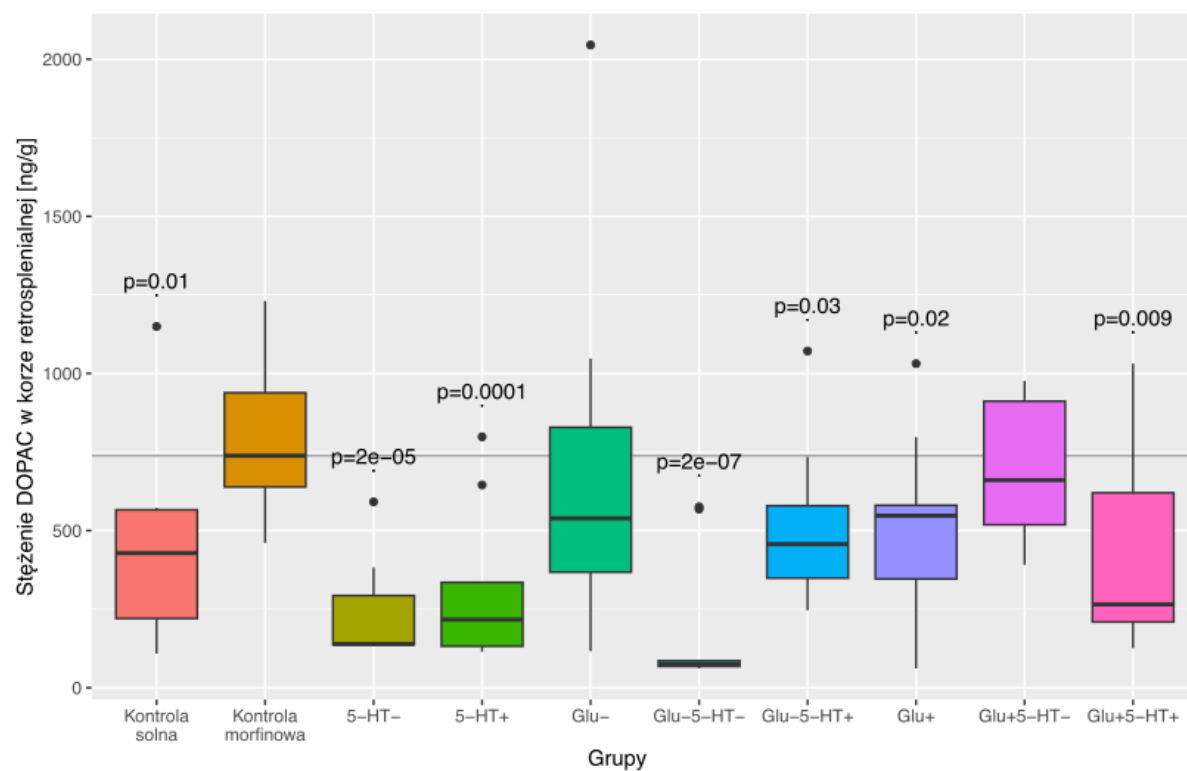
**Rys. s36. Rozkłady stężenia 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikolu (MHPG) w hipokampie w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



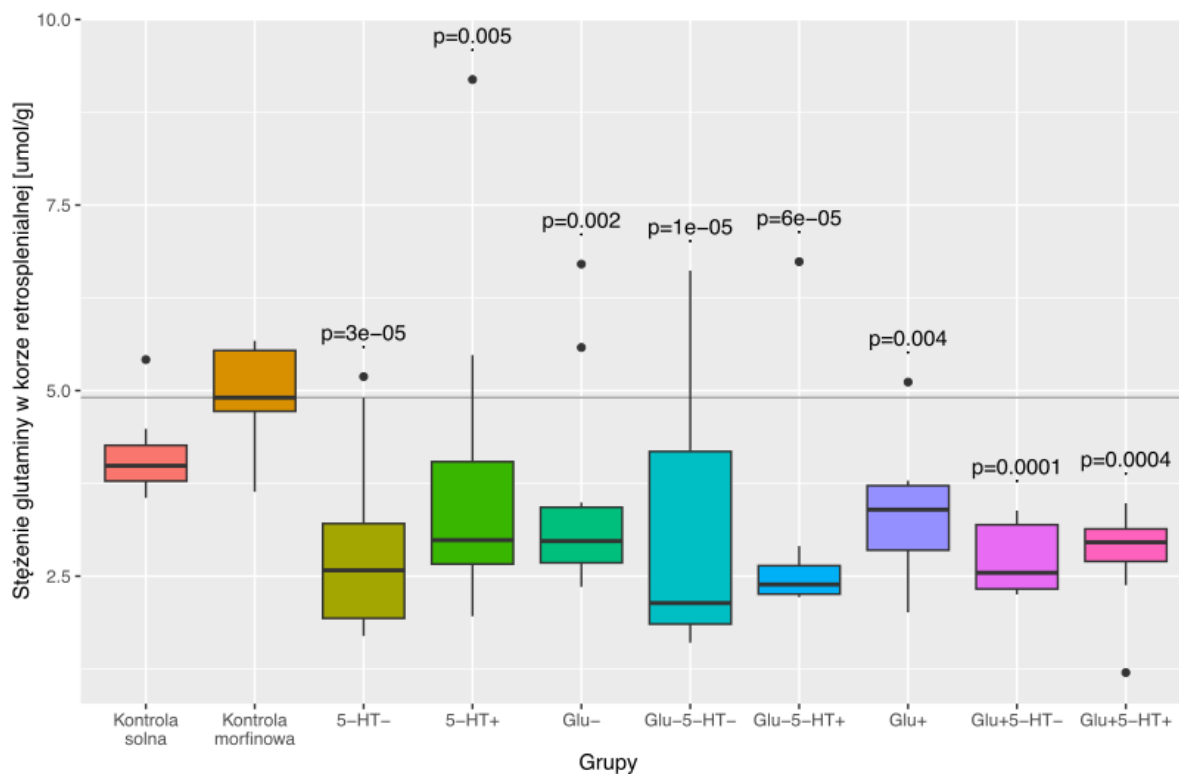
**Rys. s37. Rozkłady stężenia L-alaniny w korze retrosplenia w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



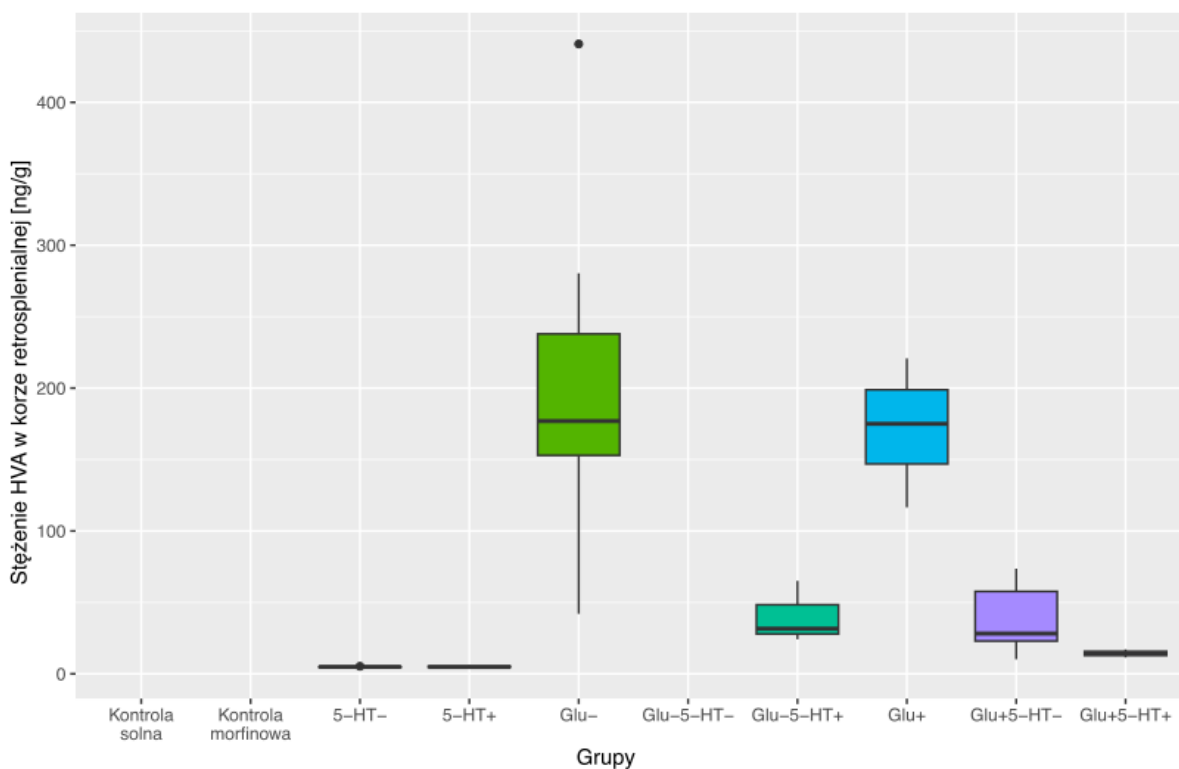
Rys. s38. Rozkłady stężenia  $\beta$ -alaniny w korze retrosplenia w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



Rys. s39. Rozkłady stężenia kwasu dihydroksyfenylooctowego DOPAC w korze retrosplenia w badanych grupach. Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

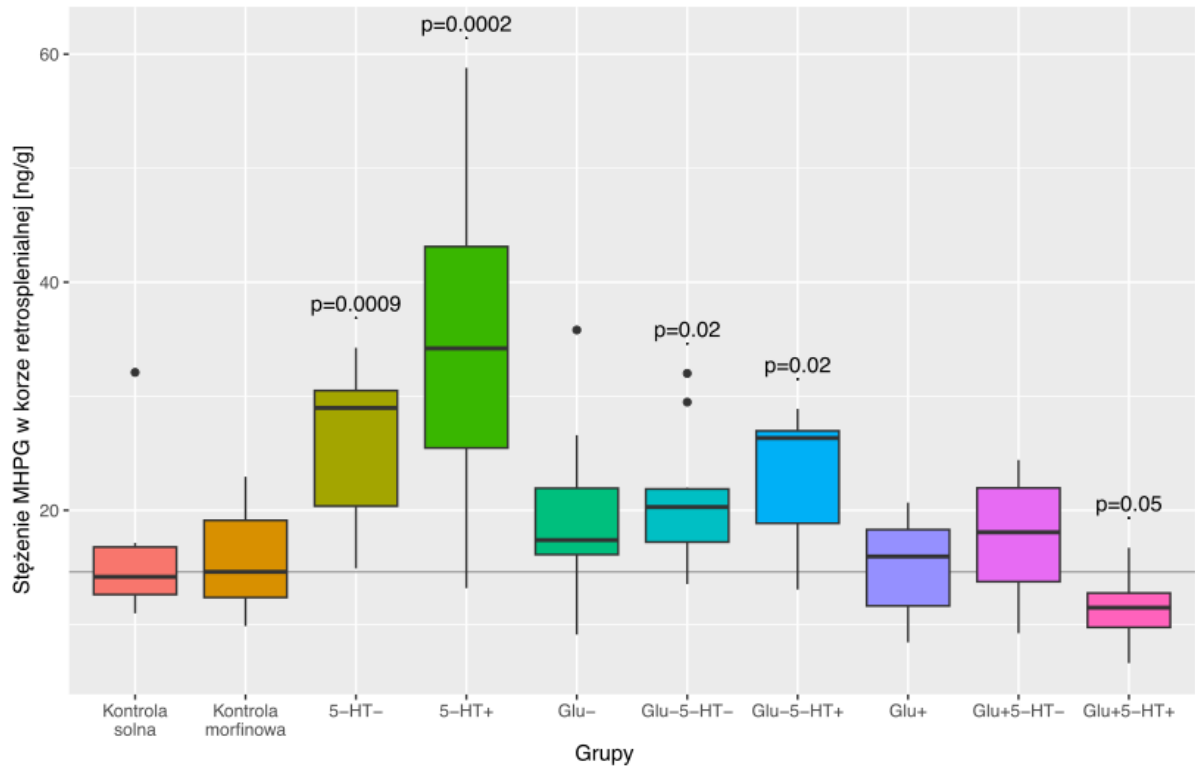


**Rys. s40. Rozkłady stężenia glutaminy w korze retrosplenialnej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

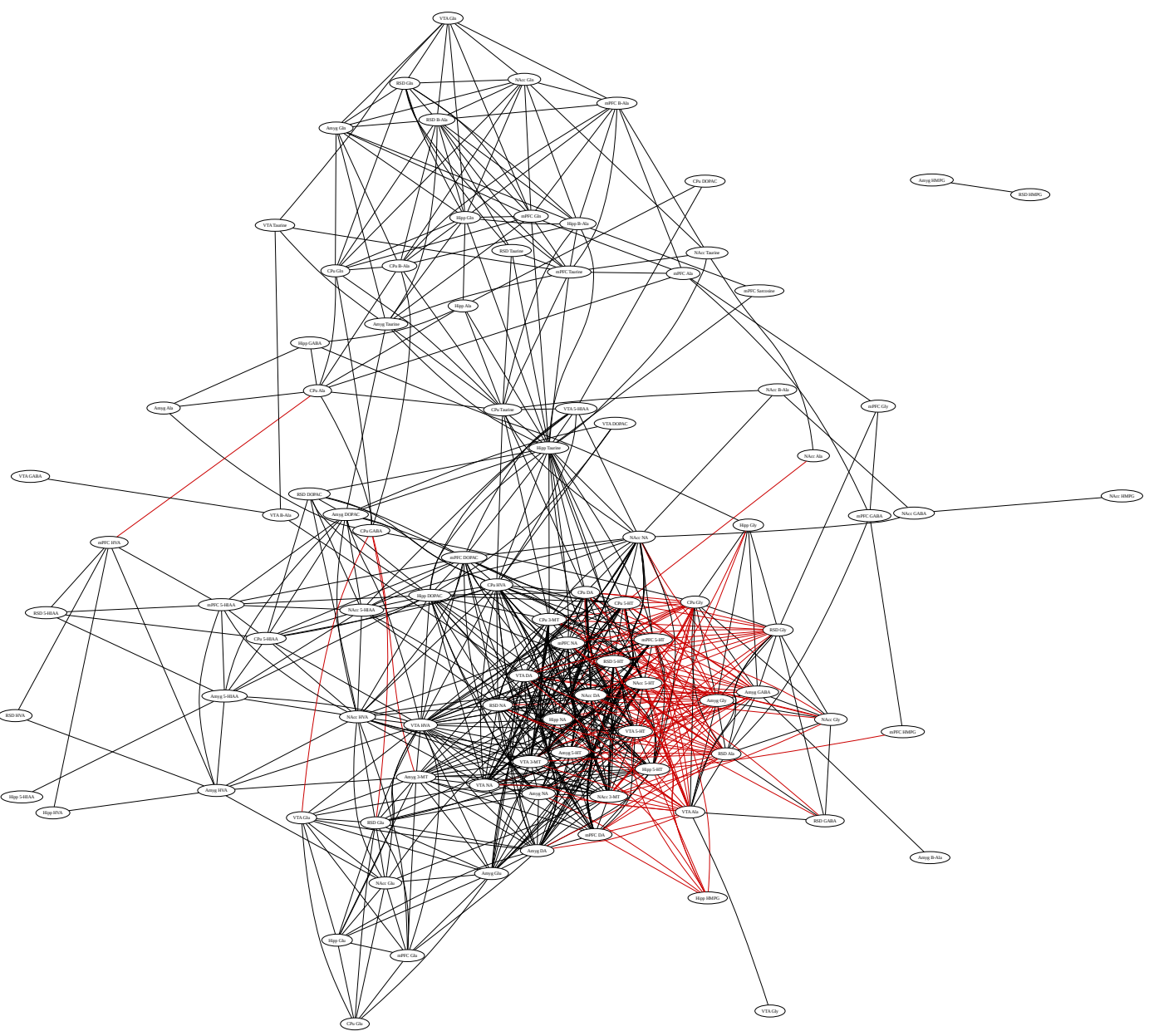


**Rys. s41. Rozkłady stężenia kwasu homowanilinowego (HVA) w korze retrosplenialnej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.

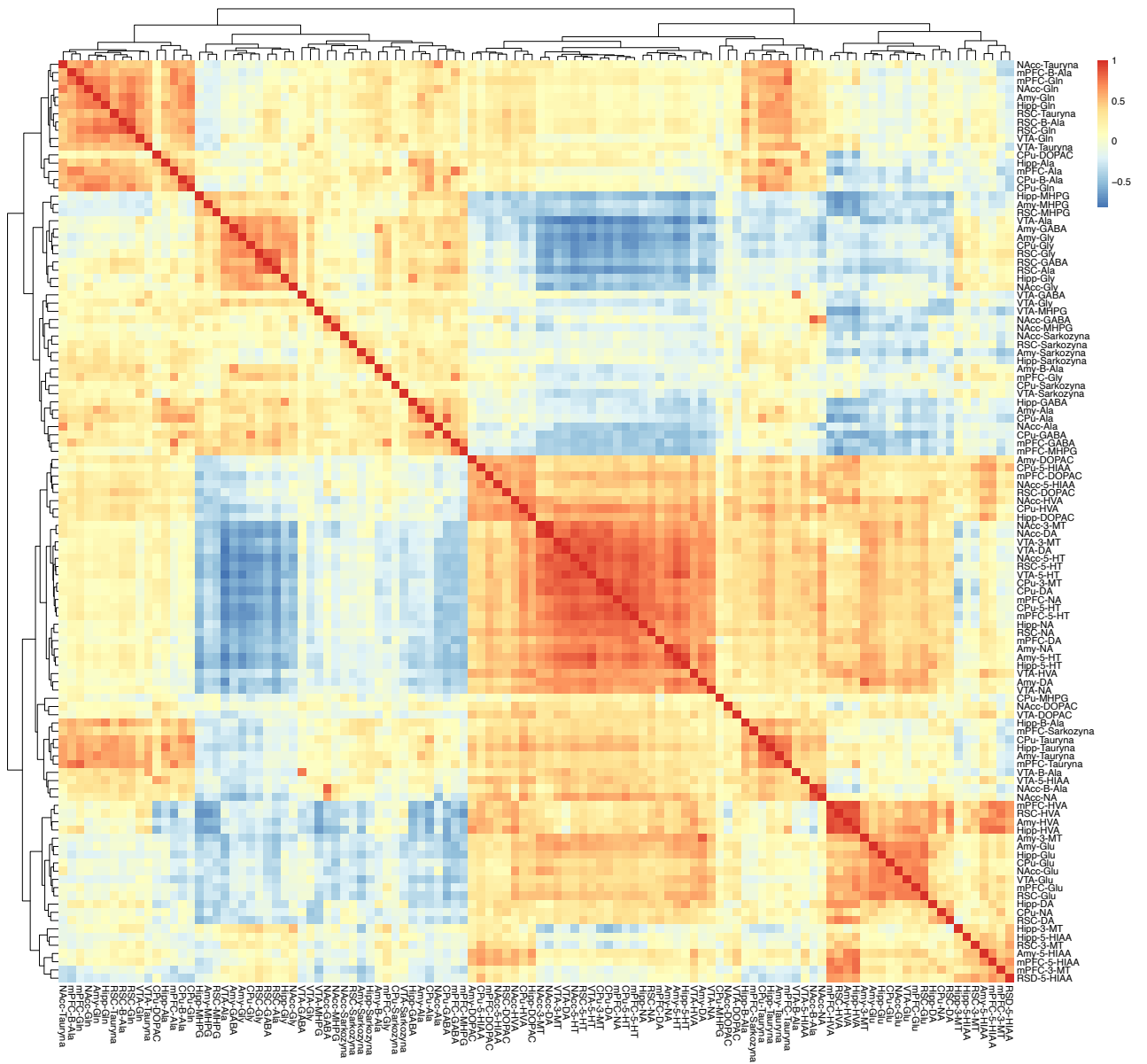




**Rys. s42. Rozkłady stężenia 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-glikolu (MHPG) w korze retrosplenialnej w badanych grupach.** Podano “wartości p” dla różnic istotnych statystycznie względem grupy kontrolnej morfinowej.



**Rys. s43. Graf korelacji neurochemicznych istotnych na poziomie  $p=0,001$ .**



Rys. s44. Mapa ciepła korelacji neuroprzekaźników w badanych grupach.