

Wanda Dyr, Wojciech Kostowski
Zakład Farmakologii i Fizjologii Ośrodkowego Układu Nerwowego
Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

PROBLEMY METODYCZNE BADAŃ DOŚWIADCZALNYCH NAD UZALEŻNIENIEM ALKOHOLOWYM: SELEKCJONOWANE LINIE ZWIERZĄT PREFERUJĄCYCH ALKOHOL

Alkohol jest drugą, po kofeinie, psychoaktywną substancją najszerzej zażywaną przez człowieka w celach towarzyskich i wywołania zmiany nastroju. Socjalne i kliniczne konsekwencje nadmiernego spożywania alkoholu są znane od bardzo dawna. Udział czynników biologicznych, psychosocjalnych i kulturowych w rozwoju alkoholizmu jest niezaprzeczalny. Znajomość natury biologicznej tych czynników pozostaje jednak wciąż mało wyjaśniona, a główny mechanizm uzależnienia od alkoholu polega na utracie kontroli nad piciem, poszukiwaniem dostępu do alkoholu i przymusem picia (craving). Chroniczne nadużywanie alkoholu etylowego często prowadzi do deficytu neuronalnego w mózdzku, części wzgórza, korze mózgowej i w hipokampie (2).

Jednym z najbardziej istotnych celów w badaniach naukowych nad problemem alkoholowym jest poszukiwanie skutecznych leków zmniejszających picie alkoholu. Przy ocenie stopnia skuteczności takich leków niezbędne jest stosowanie w testach przedklinicznych zwierzęcych modeli wykazujących genetycznie uwarunkowaną skłonność do nadmiernego spożywania alkoholu. Stworzenie takich modeli jest niezwykle trudne, ponieważ zwierzęta z zasady unikają alkoholu z racji jego działań awersyjnych w tym smaku i zapachu. Poprzez długotrwałą hodowlaną selekcję szczurów w Europie i w Stanach Zjednoczonych, otrzymano wyselekcjonowane linie zwierząt z utrwalonym, zwiększonym piciem alkoholu, które w warunkach swobodnego wyboru między roztworami alkoholu etylowego na ogół 8-10 % i wody wypijają duże ilości alkoholu – 5,0 g/kg/

24h i więcej. Do najbardziej znanych linii szczurów „wysokopreferujących” należą – AA (Alko, Alkohol) z Finlandii, SP (Sardinian-Preferring) z Włoch, P (alcohol-preferring) i HAD (High Alcohol Drinking) ze Stanów Zjednoczonych. Szczury tych wyselekcjonowanych linii spełniają zasadnicze kryteria zwierzęcego modelu wypijając np. więcej niż 5 g/kg absolutnego alkoholu w ciągu doby. Przeciwwagą dla linii wysokopreferujących alkohol są linie wyselekcjonowane genetycznie, które również w warunkach wolnego wyboru piją duże ilości wody, a spożycie alkoholu wynosi mniej niż 1 g/kg/24. Do takich linii należą odpowiedniki wymienionych linii ANA (Alko Non-Alkohol), SnP (Sardinian-non Preferring), LAD (Low-Alcohol Drinking).

Mutacja dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) bardzo osłabia utlenienie aldehydu octowego (głównego metabolitu etanolu) do kwasu octowego co jest przyczyną pojawiania się licznych objawów awersyjnych jak: zaczerwienienia twarzy, nudności, zaburzeń rytmu serca u większości osób po spożyciu alkoholu. Mutacja tego enzymu odgrywa istotną rolę w ograniczaniu picia alkoholu przez niektóre populacje ludzkie, nie wydaje się jednak mieć znaczenia u zwierząt. Badania na zwierzętach demonstrują, że alkohol w dawce pojedynczej zwiększa poziom cyklicznej adenylowej w mózgu, ale wielokrotne dawki zmniejszają jej stężenie. Podobny spadek aktywności cyklicznej adenylowej stwierdzono w limfocytach i płytkach krwi u ludzi uzależnionych od alkoholu. Istnieją dowody na to, że monoaminooksydaza B (MAO B) wykazuje małą aktywność u osób uzależnionych, a ich krewni z wysoką skłonnością do alkoholizmu, również mogą mieć obniżony poziom MAO B (5).

Wśród 5-ciu linii myszy tj. C57BL/6J; BALB/cJ, DBA/2J, A/HeJ, 129/J stwierdzono genetycznie zdeterminowane różnice w ostrej wrażliwości na temperaturę ciała po podaniu jednorazowej dawki etanolu (1). Podobnie badania genetycznych linii szczurów wykazały, że szczury tzw. P (preferujące alkohol) i NP (niepreferujące alkohol) mają wrodzone różnice w regulowaniu aktywności lokomotorycznej poprzez układ receptorów nikotynowych ośrodkowego układu nerwowego (11). Wrodzona odmienna wrażliwość szczurów na etanol wprowadziła podział tych genetycznych linii na typ HAS – high alcohol sensitive (bardzo duża wrażliwość na alkohol) i LAS – low alcohol sensitive (niska wrażliwość na alkohol) (6).

Badania nad wyselekcjonowanymi grupami szczurów preferującymi alkohol, które nigdy nie były poddane działaniu etanolu, wykazały obniżony poziom serotoniny (5-HT) i jej głównego metabolitu kwasu 5-hydroksyindoloctowego (5-HIAA) w korze mózgu, prążkowie, jądrze półleżącym przegrody, hipokampie i podwzgórz. Powyższe wyniki były porównywane z wynikami badań przeprowadzonych na szczurach niepreferującymi alkohol (NP) (14). Podobny poziom 5-HT znaleziono u szczurów HAD w porównaniu do LAD. Nasunęło to przypuszczenie, że regulacja przekąźnictwa 5-HT może być potencjalną terapeutyczną możliwością leczenia choroby alkoholowej. Zidentyfikowanie określonych podtypów receptora serotonergicznego związanego z tym mechanizmem służyłoby lepszemu zrozumieniu mechanizmu zależności alkoholowej i jej leczenia.

W warunkach reakcji instrumentalnej (zwierzęta wykonują wyuczoną czynność np. naciśnięcie dźwigni w celu uzyskania możliwości spożycia porcji alkoholu) u

szczurów linii P stwierdzono zwiększony poziom dopaminy (DA) w jądrze półleżącym przegrody w porównaniu z nie selekcionowanymi szczurami Wistar. Badania te mogą świadczyć, że system dopaminergiczny obszaru VTA szczurów linii P może być szczególnie wrażliwy na działanie alkoholu, co może przejawiać się wzmożoną reakcją nagradzającą (15, 17).

Techniki wiązania receptorowego wykazały, że gęstość receptorów dopaminergicznych D2 była obniżona w jądrze półleżącym przegrody u szczurów linii SP w porównaniu ze szczurami SnP lub nie selekcionowanymi Wistar. Technika ilościowej autoradiografii wykazano zmniejszoną gęstość receptorów D2 w wielu strukturach mózgu szczurów P w porównaniu ze szczurami NP (13). U szczurów Wistar stwierdza się również obniżoną gęstość receptorów D2 w 24 godziny po odstawieniu alkoholu spożywanego długotrwale przez zwierzęta. Ponieważ receptory D2 mogą być autoreceptorami, stąd zmniejszenie ich ilości może mieć znaczenie mechanizmu kompensacyjnego na długotrwale zwiększanie poziomu dopaminy na skutek działania alkoholu (7).

W badaniach porównawczych ze szczurami wyselekcjonowanymi linii NP i LAD, szczury linii P mają obniżony poziom DA i jej metabolitów w jądrze półleżącym przegrody (14, 17). Można przyjąć, że obniżony poziom DA w jądrze półleżącym nasila w wyniku niedoczynności systemu nagrody picie alkoholu. Z tego względu wzrost poziomu DA może zmniejszać picie alkoholu, jak to ma miejsce po zastosowaniu agonistów receptora D2 – bromokryptyny oraz amfetaminy (14, 26).

Wzmacniające działanie alkoholu wydaje się być wynikiem aktywacji mezolimbicznego układu dopaminergicznego. Jak wspomiano, w brzusznej nakrywce mostu (ventral tegmental area – VTA) etanol zwiększa stężenie dopaminy. Działanie agonistów i antagonistów dopaminy na picie alkoholu nie jest jednak jednoznaczne. Z danych literaturowych wynika, że rezultaty badań są różne. I tak, antagoniści receptora DA zmniejszają picie alkoholu lub też nie mają wpływu, a także nasilenie aktywności układu również może zmniejszać spożywanie alkoholu lub też pozostaje bez efektów (20). Wiadomo jest, że układ DA jest heterogenny i zawiera wiele typów receptorów dopaminergicznych. Na przykład D1 i D2 różnią się w zakresie funkcji i farmakologii np. stymulacja receptorów D1 aktywuje cyklazę adenylową, podczas gdy receptory D2 nie są związane „pozytywnie” z tym przekaźnikiem (12, 19, 23).

Bezpośrednie podanie do jądra półleżącego przegrody antagonisty receptora D2 sulpirydu powoduje dawkozależne zwiększenie picia alkoholu. Również dożylnie „samopodanie” (self-administration) kokainy przez szczury jest nasilane przez antagonistów receptora D2 jak i antagonistów receptora D1 (3, 4)

W serii wykonanych niedawno badań oceniano wpływ agonisty D2 – quinpirolu (0,02-2,0 mg/kg) i antagonisty D2 – spiperonu (3-30ug/kg) na picie alkoholu u szczurów linii HAD. Agonista powodował dawko-zależne zmniejszenie picia w ciągu 4-godzinnego okresu obserwacji, natomiast spiperon nie miał wpływu w początkowej fazie, lecz w czwartej godzinie badania (10 ug/kg) wykazało tendencję redukującą picie. W innych eksperymentach, agonista D1 SKF 38393 i antagonist D1 SCH-23390, dawko-zależnie zmniejszały picie alkoholu podczas 30 do 60 min badania

(8). Wiadomo jest, że oba typy receptorów współdziałają w czynnościach behawioralnych i aktywacja receptorów D1 jest niezbędna do funkcjonalnego efektu receptorów D2 (19, 25). W podsumowaniu można stwierdzić, że wpływ czynników dopaminergicznych typu D1 i D2 na picie alkoholu u szczurów HAD potwierdza hipotezę, że system DA współuczestniczy w regulacji wzmacniającego działania etanolu w OUN.

Szczury linii P wykonują reakcje instrumentalne (ang. operant response) aby pozyskać etanol, co wskazuje na pozytywnie wzmacniające (nagradzające) właściwości alkoholu (18, 21). Takiego zachowania nie wykazują szczury linii niepreferującej alkohol (NP). Prawdopodobnie w wyniku tego działania alkoholu szczury wykonują reakcje samo-podania (ang. self-administration) dożołądkowo lub też bezpośrednio do struktur mózgu – (ventral tegmental area – VTA) (10, 24), co może wykluczyć hipotezę, że szczury piją alkohol głównie ze względu na jego właściwości smakowe. Szczury linii P i NP różnią się w wielu behawioralnych reakcjach na etanol. Na przykład szczury linii P rozwijają szybciej i dłużej trwającą tolerancję, niż szczury NP, na osłabienie aktywności ruchowej wywołanej etanolem (9,16).

Jedną z możliwych motywacji promującej picie alkoholu jest osiągnięcie euforyzującego i nagradzającego efektu. Jednak inne czynniki mogą również przyczynić się do nadmiernego spożywania alkoholu, np. jego właściwości anksjolityczne. W badaniach wyselekcjonowanych linii stwierdza się wyższy stopień zachowań lękowych u szczurów linii P w porównaniu do szczurów linii NP i te reakcje lękowe są blokowane przez etanol (22).

Domózgowe „samopodanie” alkoholu potwierdza przypuszczenie, że strukturą przez którą alkohol może wywoływać swoje działanie nagradzające jest VTA (15). Obwodowe podanie związków farmakologicznych, zwiększających aktywność układu 5-HT jak np. fluoksetyny (inhibitora wchłaniania zwrotnego serotoniny) lub fenfluraminy (nasilającej wydzielanie 5-HT), w sposób statystycznie znamienne zmniejsza preferencję alkoholu. Podobne efekty wywierać mogą inne substancje np. agoniści receptora DA (14). Dane te oraz liczne tu nie cytowane sugerują, że zaburzenie w układach neurotransmisyjnych może być zasadniczym czynnikiem biologicznym przyczyniającym się do wysokiego spożycia i preferencji alkoholu.

Podsumowanie

Spontaniczną zdolność picia alkoholu w warunkach wolnego wyboru między 10% roztworem etanolu a wodą, wykazują wyselekcjonowane linie szczurów. Zwierzęta wypijają w ciągu doby 5,0 g/kg i więcej czystego alkoholu. Najbardziej znane linie zwierząt to AA (Alko, Alkohol) z Finlandii, SP (Sardinian – Preferring) z Włoch i P (Preferring) ze Stanów Zjednoczonych, które służą do oceny stopnia skuteczności leków zmniejszających picie alkoholu jak i do badania neurobiologicznych czynników promujących picie alkoholu.

Badania wykazały, że szczury z genetycznym uwarunkowaniem do preferencji alkoholowej mają obniżony poziom serotoniny (5-HT) w wielu strukturach mózgu (prążkowiu, hipokampie, podwzgórzu, jądrze półleżącym przegrody) jak i dopami-

ny (DA) w jądrze półleżącym przegrody. Zwiększając poziom tych neurotransmiterów można zmniejszyć ilość spożywanego alkoholu, co ma zastosowanie w praktyce klinicznej, stosując inhibitory wchłaniania zwrotnego (np. fluoksetynę). Pod działaniem alkoholu wzrasta ilość dopaminy w jądrze półleżącym przegrody, czego wyrazem może być zmniejszona gęstość receptorów dopaminergicznych D2, jako mechanizm neuroadaptacyjny na długofalowe zwiększanie poziomu dopaminy.

Szczury linii P wykonują reakcję samopodania alkoholu dożołądkowo lub też bezpośrednio do struktur mózgowych, co wyklucza hipotezę, że szczury piją alkohol głównie ze względu na jego właściwości smakowe.

Wanda Dyr, Wojciech Kostowski

Methodological problems in the experimental investigation of alcohol dependence: selected lines of ethanol-preferring animals

Summary

The ability of spontaneous alcohol drinking under conditions of free choice between 10% ethanol solution and water is shown by selected lines of rats. Such animals drink 5,0 g/kg or more of pure ethanol during 24 hours. Among the most widely known lines of rats there are: AA (Alko, Alkohol) from Finland, SP (Sardinian - Preferring) from Italy, and P (Preferring) from the United States. The animals are used for the assessment of efficacy of drugs decreasing alcohol intake, as well as in research on neurobiological factors promoting alcohol drinking.

Various studies have shown that in rats with genetically determined alcohol preference, serotonin (5-HT) levels are decreased in many cerebral structures (striatum, hippocampus, subthalamus and nucleus accumbens septi). Moreover, in the latter structure dopamine (DA) level is also decreased. By increasing levels of these neurotransmitters the amount of consumed alcohol may be reduced, by means of reuptake inhibitors (e.g. fluoxetine) administration - which is applied in clinical practice. Due to the effect of alcohol the amount of dopamine in the nucleus accumbens septi increases, which may be reflected in a reduced density of D2 dopaminergic receptors. The phenomenon constitutes a mechanism of neuroadaptation to long-term increment in dopamine level. Rats of line P perform the intragastric and directly intracerebral self-administration response. This finding allows to reject the hypothesis that alcohol is consumed by rats mainly because of its attractive taste.

Key words: ethanol / genetic determinants / alcohol-preferring lines of rats

PIŚMIENNICTWO

1. Alkana R.L., Finn D.A., Bejanian M., Crabbe J.C.: *Genetically determined differences in ethanol sensitivity influenced by body temperature during intoxication*. Life Science, Vol. 43, pp. 1973-1982.

2. Bonthius D.J & West J.R.: *Permanent neuronal deficit in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt*. Teratology 1991, 44, 147-163.
3. Britton D.R, Curzon P, Mac Kenzi R.G, Keababian J.W, Williams J.E, Kerkman D.: *Evidence for involvement of both D1 and D2 receptors in maintaining cocaine self-administration*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1991, 39, 911-915.
4. Corrigan W.A., Coen K.M.: *Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1991, 39, 799-802.
5. Devor E.J.: *Why there is no gene for alcoholism*. Behavior Genetics, 1993, Vol. 23, No 2.
6. De Fiebre C.M., Medhurst L.J., Collins A.C.: *Nicotine response and nicotine receptors in long-sleep and short-sleep mice*. Alcohol 1987, 4, 493.
7. Di Chiara G., Imperato A.: *Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats*. Eur. J. Pharmacol. 1993, 115, 131-132.
8. Dyr W., McBride W.J., Lumeng L., Li T-K., Murphy J.M.: *Effects of D1 and D2 dopamine receptor agents on ethanol consumption in the high-alcohol-drinking (HAD) line of rats*. Alcohol, 1993, 10, 207-212.
9. Gatto G.J, Murphy J.M., Waller M.B., McBride W.J, Lumeng L., Li T-K.: *Chronic ethanol tolerance through free-choice drinking in the P line of alcohol-preferring rats*. Pharmacol Biochem. Behav. 1987, 28, 110-115.
10. Gatto G.J., Murphy J.M., Waller M.B., McBride W.J., Lumeng L., Li T-K.: *Ethanol-associated conditioned reinforcement in alcohol-preferring (P) rats*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1991, 15, 313.
11. Katner S.N., McBride W.J., Lumeng L., Li T-K., Murphy J.M.: *Effects of cholinergic agents on locomotor activity of P and NP rats*. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. Vol. 20. No 6.
12. Keababian J.W., Calne D.B.: *Multiple receptors for dopamine*. Nature 1979, 277, 93-96.
13. McBride W.J., Chernet E., Dyr W., Lumeng L., Li T-K.: *Densities of dopamine D2 receptors are reduced in CNS regions of alcohol-preferring P rats*. Alcohol, 1993, 10, 387-390.
14. McBride W.J., Murphy J.M., Lumeng L., Li T-K.: *Serotonin, dopamine and GABA involvement in alcohol drinking of selectively bred rats*. Alcohol 1990, 7, 199-205.
15. McBride W.J., Murphy J.M., Gatto G.J., Levy A.D., Lumeng L., Li T-K.: *Serotonin and dopamine system regulating alcohol intake*. Alcohol & Alcoholism, Supple. 1, 411-416.
16. Murphy J.M., Gatto G.J., Waller M.B., McBride W.J., Lumeng L., Li T-K.: *Effects of scheduled access on ethanol intake by the alcohol-preferring (P) line of rats*. Alcohol 1986, 3, 331-336.
17. Murphy J.M., McBride W.J., Lumeng L., Li T-K.: *Contents of monoamines in forebrain regions of alcohol-preferring (P) and non-preferring (NP) lines of rats*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1987, 26, 389-392.
18. Murphy J.M., Gatto G.J., McBride W.J., Lumeng L., Li T-K.: *Operant responding for oral ethanol in the alcohol-preferring P and alcohol nonpreferring NP lines of rats*. Alcohol 1989, 6, 127-131.
19. Nakajima S.: *Subtypes of dopamine receptors involved in the mechanism of reinforcement*. Neurosci. Biobehav. Rev. 1989, 13, 123-128.
20. Pfeiffer A.O., Samson H.H.: *Haloperidol and apomorphine effects on ethanol reinforcement in free feeding rats*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1988, 29, 343-350.

21. Penn P.E., McBride W.J., Lumeng L., Gaff T., Li T-K.: *Neurochemical and operant behavioral studies of a strain of alcohol-preferring rats*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1978, 8; 475-481.
22. Stewart G., Gatto G.L., Lumeng L., Li T-K., Murphy J.M.: *Comparison of alcohol-preferring (P) and non-preferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol*. Alcohol 1993, 10, 1-10.
23. Stof J.C., Keabian J.W.: *Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum*. Nature 1981, 294, 366-368,
24. Waller M.B., McBride W.J., Gatto G.J., Lumeng L., Li T-K.: *Intragastric self-administration of ethanol by ethanol-preferring and non-preferring lines of rats*. Science 1984, 225, 78-80.
25. Walters J.R., Bergstrom D.A., Carlson J., Chase T.N., Braun A.R.: *D1 dopamine receptor activation required for postsynaptic expression D-2 agonist effects*. Science 1987, 236, 719-722.
26. Weiss F., Mitchiner M., Bloom F.E., Koob G.F.: *Free-choice responding for ethanol versus water in alcohol preferring (P) and unselected Wistar rats is differentially modified by naloxone, bromocriptine and methysergide*. Psychopharmacology 1990, 10, 178-186.