

Z warsztatów badawczych i doświadczeń klinicznych

Wanda Dyr, Anna Witanowska¹, Jolanta Dzierzkowska¹, Krystyna Iwińska², Paweł Krząścik², Wojciech Kostowski

Zakład Farmakologii i Fizjologii Ośrodkowego Układu Nerwowego
Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie.

¹⁾ Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej w Warszawie.

²⁾ Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej i Doświadczalnej
Akademii Medycznej w Warszawie

BIOCHEMICZNA I BEHAVIORALNA ANALIZA NOWEJ LINII SZCZURÓW WYSELEKCJONOWANYCH W KIERUNKU WYSOKIEGO SPOŻYCIA ALKOHOLU ETYLOWEGO

WSTĘP

Istotnymi przyczynami rozwoju alkoholizmu u ludzi są liczne czynniki psychosocjalne i biologiczne. Znaczenie tych czynników ciągle pozostaje słabo wyjaśnione ale wszystkie one prowadzą do powstania zaburzenia w sferze motywacyjnej, jakim jest poszukiwanie alkoholu i przymus picia (craving). Jak do tej pory nie zidentyfikowano pojedynczego, najważniejszego czynnika jako początkowej i zasadniczej przyczyny rozwoju zależności alkoholowej. Alkohol etylowy jest jednym i najstarszym ze znanych środków modyfikujących nastroj u ludzi.

Badania nad alkoholizmem są trudne, także z tego powodu, że występują etyczne ograniczenia w prowadzeniu doświadczeń na ludziach. Stąd też wprowadza się liczne zwierzęce modele uzależnienia od leków i alkoholu. Modele te odgrywają w nim ważną rolę w badaniach mechanizmu działania alkoholu i mechanizmu uzależnienia oraz działania leków hamujących ten proces. Wyselekcjonowane linie zwierząt w kierunku preferencji alkoholu zostały zaakceptowane i są szeroko używane jako model

eksperymentalnego uzależnienia od alkoholu (Li i wsp. 1994). Pionierskie prace Eriks-sona (1968) z genetycznie uwarunkowaną linią szczurów zwaną AA (Alcohol Ac-cepting) (1968) i prace Lumenga i wsp. (1977) z linią szczurów zwaną P (High Pre-ferring) pociągnęły za sobą rozwój badań nad innymi liniami zwierząt. I tak we Włoszech wyhodowano szczury linii SP (Sardinian-Preferring) o dużej gene-tycznie uwarunkowanej preferencji roztworów alkoholu (Fadda i wsp. 1989). Samoistne picie etanolu i preferencja roztworu alkoholu są podstawowymi ce-chami zwierzęcego modelu alkoholizmu. W warunkach wolnego wyboru między wodą a alkoholem (np. two bottle test) np. szczury SP oraz inne linie szczurów wykazują większą preferencję do roztworu etanolu niż do wody i piją wielokrot-nie więcej niż 4-5 g/kg czystego etanolu w ciągu doby. (Colombo i wsp. 1995). Szczury linii (P) wykazują cechy silnej preferencji alkoholu pijąc spontanicznie od 10-30% roztworu alkoholu i spełniając inne kryteria uzależnienia, takie jak, nabywanie metabolicznej i neuronalnej tolerancji, rozwój zależności fizycznej, wykonywanie reakcji instrumentalnej w celu pozyskania dawki alkoholu. Szczury tej linii konsumują ponad 9,0 g/kg alkoholu dziennie, co prowadzi do pojawie-nia się wysokiego poziomu alkoholu we krwi w zakresie od 92 do 415 mg% (Waller MB i wsp. 1984).

Anksjolityczny efekt działania etanolu jest ważnym czynnikiem indukującym pi-cie alkoholu. Jedną z technik badawczych pozwalających na ocenę działania prze-ciwłękowego jest test tzw. Elevated Plus-Maze (podniesiony labirynt krzyżowy) po-zwalający na badanie reakcji lękowej przed nowym otwartym otoczeniem. Badano ilość spontanicznie pitego alkoholu przez szczury z dużym i niskim poziomem lęku. Wykazano, że szczury bardziej „lękowe” mają znacząco wyższą preferencję i zwięk-szone picie alkoholu niż zwierzęta z małym nasileniem lęku. Wykazano również, że parenteralne podanie etanolu (0,5-1,5 g/kg) powoduje dawko-zależny efekt anksjoli-tyczny u szczurów w doświadczalnych modelach lęku (np. w teście tzw. „labiryntu krzyżowe”). Uważa się, że nasilone picie alkoholu przez szczury „lękowe” jest reak-cją kompensującą nadmierny lęk i że alkohol działa w tym wypadku jak środek prze-ciwłękowy. (Spanagel i wsp. 1995).

Wykazano, że selektywne linie szczurów preferujących alkohol mają poważne zmiany w wielu układach neuroprzekaźnikowych mózgu. Na przykład, badania szczu-rów wykazujących genetycznie uwarunkowany wzrost do spontanicznego picia al-kooholu oraz zwiększoną preferencję alkoholu (linia P) wykazały, obniżony poziom serotoniny (5-HT) i jej metabolitu kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) w wielu strukturach mózgu (korze mózgowej, prążkowie, jądrze półleżącym mózgu, hippokampie i w podwzgórzu) w porównaniu do zwierząt słabo preferujących alko-hol lub nie preferujących alkoholu (NP.) Szczury linii (P) wykazywały obniżony po-ziom dopaminy (DA) i jej metabolitów DOPAC, HVA w strukturach limbicznych, głównie w jądrze półleżącym przegrody (Gongwer i wsp.).

W Zakładzie Farmakologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii od wielu lat trwa-ją prace nad wyselekcjonowaniem linii szczurów, które w warunkach wolnego wy-boru alkoholu i wody, preferują roztwory alkoholu i spontanicznie wypijają znaczną

jego ilość (przekraczającą 5g/kg/24h w przeliczeniu na alkohol absolutny). Linie taką udało się nam uzyskać przez kojarzenie zwierząt pokolenia F_2 genetycznie heterogennego wybierając w ramach miotu zwierzęta wysoko-pijące i nisko-pijące i krzyżując pod kątem docelowego fenotypu, tak aby dana para nie miała wspólnych przodków do drugiego pokolenia wstecz (Bisaga i wsp. 1993).

Obecnie dysponujemy linią zwierząt wysoko preferujących alkohol (F_{13} i F_{14}) i nazwaną przez nas WHP (Warsaw High Preferring) oraz linią niepreferującą (F_{13} i F_{14}) nazwaną WLP (Warsaw Low Preferring) (Dyr i wsp. 1997).

W przedstawionej pracy określiliśmy niektóre cechy neurochemiczne pokolenia 11 (F_{11}) obu linii szczurów (WHP i WLP) a mianowicie – poziom neuroprzebieżników i ich metabolitów w mózgu. Badanie to miało na celu sprawdzenie, czy u linii wysoko preferującej alkohol występują podobne zmiany jak u znanej linii amerykańskiej (Murphy i wsp. 1987). Ponadto sprawdziliśmy czy występują różnice w stężeniu alkoholu we krwi u obu linii zwierząt (WHP i WLP) po podaniu jednorazowej dawki alkoholu 5g/kg i.p. oraz określiliśmy czas trwania snu po podaniu jednorazowej dawki 2g/kg i.p. Badania te miały na celu określenie ewentualnych różnic w biodostępności alkoholu oraz reaktywności na alkohol obu badanych linii.

METODYKA BADAŃ

Do badania użyto zwierzęta 11 generacji linii szczurów WHP pijących 5 g/kg/24h i więcej czystego alkoholu oraz linii WLP (pijących mniej niż 2g/kg/24h). Zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC dla określenia stężenia następujących monoamin i ich metabolitów; dopaminy (DA), DOPAC i HVA, noradrenaliny (NA) oraz serotoniny (5HT) i kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5HIAA).

Wymienione neuroprzebieżniki określano w następujących strukturach mózgowych; przegroda (septum), prążkowie (striatum – obejmujące jądro ogoniaste i skorupę), hippocamp i w korze mózgowej.

Stężenie alkoholu we krwi było badane, przy zastosowaniu testu DIALAB, po 10, 30, 120, 240 min. po dootrzewnowym podaniu 2 g/kg alkoholu.

W obu grupach zwierząt badano czas trwania snu po podaniu dootrzewnowo dawki alkoholu 5,0 g/kg. Czas snu określano badając utrzymywanie się szczurów w pozycji leżącej na grzbiecie. Mierzono czas od utraty odruchu wstawania do jego powrotu. Wszystkie badania wykonywane były po upływie 10-14 dni po ostatnim określeniu wielkości picia w teście wyboru pomiędzy 10% roztworem alkoholu a wodą.

WYNIKI

Stężenie DA i jej metabolitów (DOPAC, HVA), oraz NA i 5HT było zamiennie obniżone w obrębie prążkowie, natomiast zwiększone w obrębie przegrody u szczurów linii WHP w porównaniu ze szczurami linii WLP. Dokładne wyniki przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1

Średnie stężenie w ng/g \pm SEM monoamin i ich metabolitów w różnych strukturach mózgu szczurów linii WHP i WLP

Neuro trans.	Septum		Striatum		Hippocamp.		Cortex	
	WHP	WLP	WHP	WLP	WHP	WLP	WHP	WLP
DA	1738,9 \pm 130,0	954,15 \pm 226,4*	1707,8 \pm 133,0	4320,0 \pm 403,8*	509,3 \pm 25,5	472,5 \pm 39,5	156,8 \pm 15,9	195,0 \pm 23,0
DOPAC	198,02 \pm 22,0	93,8 \pm 21,5*	186,6 \pm 8,7	381,0 \pm 53,2*	0	0	29,1 \pm 4,0	16,9 \pm 3,3
HVA	165,6 \pm 13,2	93,5 \pm 23,2*	167,4 \pm 12,6	411,8 \pm 57,3*	0	0	53,46 \pm 2,7	35,63 \pm 5,5
NA	595,0 \pm 89,3	246,3 \pm 45,0*	70,05 \pm 4,15	197,95 \pm 16,0*	327,8 \pm 15,5	266,2 \pm 8,1*	216,3 \pm 11,6	218,7 \pm 27,7
5HT	76,91 \pm 11,2	45,7 \pm 16,07	4,7 \pm 1,2	43,22 \pm 2,5*	115,0 \pm 26,1	142,2 \pm 9,2	103,96 \pm 11,4	98,5 \pm 6,0
5HIAA	73,6 \pm 13,0	30,5 \pm 10,3	17,18 \pm 0,47	31,04 \pm 3,0	109,0 \pm 15,3	146,07 \pm 4,17	98,4 \pm 8,6	77,0 \pm 5,2

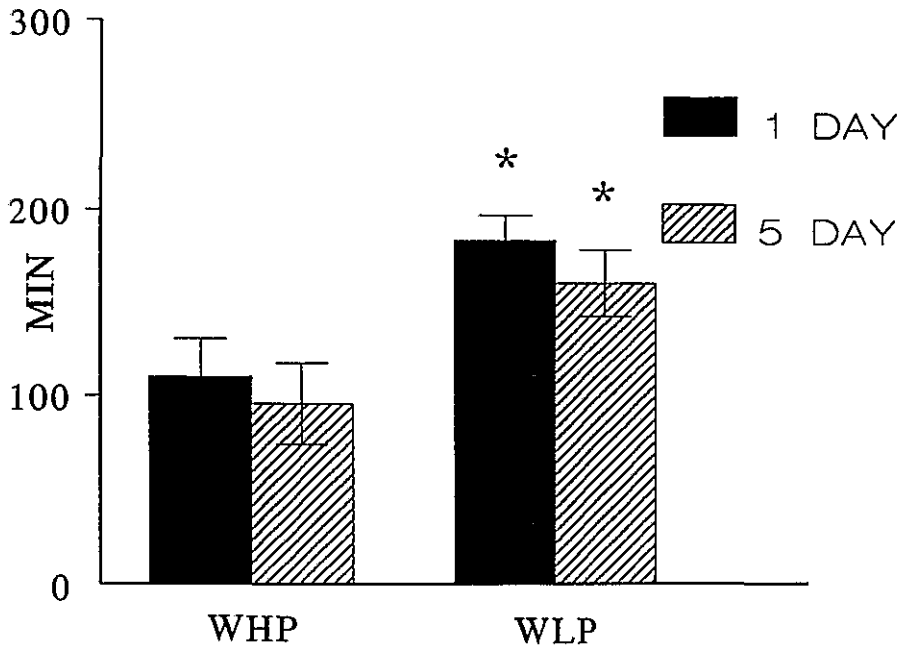
* $p < 0,001$ vs WHP odpowiednich danych

Stwierdzono także różnice w czasie trwania snu między szczurami obu linii. Czas snu szczurów WLP był niemal dwa razy dłuższy niż szczurów linii WHP po podaniu dootrzewnowym dawki alkoholu 5g/kg. Wyniki przedstawiono na ryc. 1.

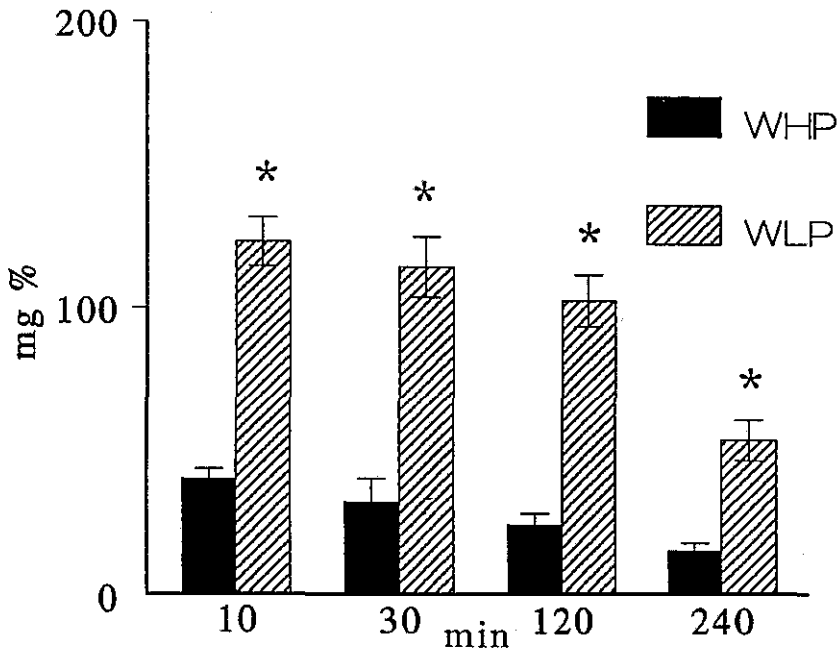
Odmienne kształtował się, u obu linii szczurów, poziom alkoholu we krwi po podaniu dawki 2,0 g/kg. U szczurów WHP był on znacznie obniżony i kształtował się w granicach 20-50 mg%, natomiast u szczurów WLP, w tych samych przedziałach czasowych (10-240 min), poziom alkoholu we krwi utrzymywał się w granicach 50-130 mg% (Ryc. 2). Dobowe spożycie alkoholu u zwierząt linii WHP mieściło się w granicach 5,0-10,0 g/kg/24h i 0,0-1,5 g/kg/24h u szczurów WLP.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Rezultaty badań wskazują na wyraźne różnice pomiędzy dwoma liniami szczurów WHP i WLP pod względem reakcji na alkohol jak i biodostępności alkoholu (czyli poziomów we krwi po podaniu określonej dawki). Wystąpiły także różnice w poziomach głównych substancji neuroprzebieżnikowych w mózgu. Na uwagę zasługują duże różnice w czasie trwania snu po dawce etanolu (5g/kg) w obu liniach, przy czym u linii WHP czas ten był znamienne krótszy niż u zwierząt WLP. Zwraca uwagę różnica w stężeniu alkoholu we krwi po podaniu dootrzewnowym. Stężenie jego we krwi, po podaniu dawki 2 g/kg było niższe u szczurów WHP niż WLP co wskazuje na różnice w biodostępności alkoholu. Mogą one wynikać z różnic w metabolizmie lub/i wchłanianiu z przewodu. Problem ten wymaga dalszych badań, w szczególności oznaczania poziomu aldehydu octowego. U zwierząt linii pijących duże ilości alkoholu (P oraz HAD) obserwowano mniejsze poziomy DA w prądkowiu w porównaniu ze zwierzętami nie preferującymi alkoholu (NP, LAD). Podobny wniosek wynika z obserwacji zmian w poziomach 5HT, 5HIAA (Murphy i wsp. 1983,



Ryc. 1. Średnie wartości czasu trwania snu szczurów linii WHP (Warsaw High Preferring) i WLP (Warsaw Low Preferring) po dootrzewnowym podaniu 5 g/kg etanolu. * $p < 0,05$ WLP vs. WHP.



Rycina 2. Średnie stężenie etanolu we krwi po 10, 30, 60, 120, 240 min po dootrzewnowym podaniu etanolu w dawce 2 g/kg szczurom linii WHP i WLP. * $p < 0,05$ WLP vs. WHP.

1988). Przyczyny obniżenia poziomu 5HT i DA u zwierząt preferujących etanol mogą być różne, np. obniżenie tempa syntezy neuroprzekaźników (za czym przemawia też spadek poziomu metabolitów) lub zaburzenie metabolizmu czy wchłaniania zwrotnego (uptake).

Obszar przedniego prążkowiec otrzymuje projekcję dopaminergiczną głównie z istoty czarnej, ale przednio-pośrodkowa część prążkowiec jest unerwiana także przez neurony DA docierające z brzusznej nakrywki mostu (ventral tegmental area, VTA) (Gongwer i wsp. 1989). Stąd też, zmniejszony poziom DA i jej metabolitów u szczurów preferujących alkohol może być wynikiem obniżonej aktywności układu dopaminergicznego tak istoty czarnej jak i VTA. Należy dodać, że neurony dopaminergiczne układu mezolimbicznego biorącego początek w VTA są związane z „nagradzającym” efektem alkoholu (Gongwer i wsp. 1989).

Zmiany w czasie trwania snu u obu linii zwierząt mogą wynikać nie tylko z różnic w poziomach we krwi. Przykładem mogą być badania potomstwa zwierząt uprzednio intensywnie alkoholizowanych. Ciężarnym szczurom podawano dootrzewnowo, w odstępach kilkugodzinnych, dwie dawki alkoholu każda 2,9 g/kg. Następnie u potomstwa (F₁) określano czas snu po podaniu 3,5 g/kg i.p. Potomstwo alkoholizowanych matek wykazywało krótszy czas snu niż zwierzęta grupy kontrolnej (potomstwo matek niealkoholizowanych) (Fulginiti i wsp. 1989). Rezultaty te wskazują, że ostra intoksykacja etanolem w czasie ciąży wywołuje długo trwające zmiany w OUN następnej generacji prowadzące do osłabienia nasennego działania etanolu.

WNIOSKI

1. U szczurów WHP stwierdzono niższe stężenie 5HT i DA oraz ich metabolitów w prążkowiec w porównaniu do szczurów WLP.

2. Czas trwania snu po podaniu 5,0 g/kg etanolu jest znacznie dłuższy u szczurów linii WLP niż u szczurów WHP.

3. Stężenie alkoholu we krwi, po dootrzewnowym podaniu 2,0 g/kg, jest znacznie wyższe u szczurów WLP niż WHP.

4. Rezultaty badań mogą wskazywać na poważne różnice w biodostępności u obu linii zwierząt. Stanowi to najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie różnic w czasie trwania snu po podaniu dużej dawki alkoholu.

Streszczenie

W Zakładzie Farmakologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii od wielu lat trwają prace badawcze nad pozyskaniem zwierzęcego modelu uzależnienia od alkoholu. Modele takie odgrywają ważną rolę w badaniach mechanizmu działania alkoholu i mechanizmu uzależnienia oraz działania leków hamujących ten proces. Wyselekcjonowane linie zwierząt w kierunku preferencji alkoholu zostały zaakceptowane i są szeroko używane jako model eksperymentalnego uzależnienia od alkoholu (Li i wsp. 1994). W Zakładzie otrzymano wyselekcjonowane linie szczurów pijących sponta-

nicznie alkohol. Uzyskano dwie linie zwierząt, jedna nosi nazwę Warsaw High Preferring (WHP) i druga Warsaw Low Preferring (WLP), w których szczury wykazują wysoką preferencję do alkoholu powyżej 5g/kg/24h (WHP) i niską poniżej 1-2g/kg/24h (WLP).

Zwierzęta obu linii były badane behawioralnie i biochemicznie na poziom alkoholu we krwi i stężenie neuroprzekaźników w poszczególnych strukturach mózgu. W 11 pokoleniu szczurów WHP i WLP średni czas trwania snu wynosił 100 min dla (WHP) i 184 min dla (WLP) po podaniu dootrzewnowym (I.P.) 5,0 g/kg etanolu.

Stężenie alkoholu we krwi po podaniu I.P. 2g/kg etanolu było wyższe u szczurów linii WLP niż WHP. Badania biochemiczne wykazały znaczne różnice między obu grupami w stężeniu serotoniny i jej metabolitu kwasu 5-hydroksyindolooctowego, dopaminy i jej metabolitu DOPAC w prążkowiu.

Generalnie, rezultaty badań wskazują na znaczne różnice w biodostępności alkoholu i znaczne różnice w stężeniach neuroprzekaźników w mózgu szczurów linii wysokopreferującej (WHP) i niskopreferującej (WLP) alkohol.

Wanda Dyr, Anna Witanowska, Jolanta Dzierzkowska, Krystyna Iwińska, Paweł Krząścik, Wojciech Kostowski

Biochemical and behavioral analysis of a new line of rats selectively bred for high ethanol consumption

Summary

Studies on the development of an animal model of alcohol dependence have been conducted at the Pharmacology Department of the Institute of Psychiatry and Neurology for many years now. Such models are important in the research on the mechanism underlying alcohol action, the mechanism of dependence formation, as well as on drugs inhibiting this process. Selective breeding of animals for alcohol preference has been accepted and is widely used as a model of experimental alcohol dependence formation (Li et al. 1994). Selective breeding of Wistar rats for voluntary ethanol (EtOH) consumption yielded two lines: the Warsaw High Preferring (WHP) and Warsaw Low Preferring (WLP) rats. The former (WHP) are characterized by a high ethanol consumption (over 5g/kg/24h), while the latter (WLP) - by a low one (below 1-2g/kg/24h).

Both these rat lines were submitted to a behavioral examination as well as to biochemical analysis of blood ethanol and neurotransmitters concentration in particular cerebral structures. In the 11th generation of rats the mean duration of sleep induced by 5,0 g/kg of intraperitoneally administered ethanol (i.p. EtOH) was 100 minutes in WHP and 184 minutes in WLP rats.

Blood ethanol concentration after i.p. administration of 2g/kg EtOH was significantly higher in the WLP line than that in WHP rats. Biochemical analyses have shown significant differences between the two lines in the brain concentration of striatal serotonin (5-HT) and its metabolite, 5-HIAA, as well as striatal dopamine

(DA) and its metabolite, DOPAC. Generally, obtained results indicate marked differences between the WHP (high ethanol preferring) and WLP (low ethanol preferring) rats as regards EtOH bioavailability and brain concentration of neurotransmitters.

Key words: ethanol / alcohol-preferring rats / blood ethanol / monoamines

PIŚMIENNICTWO

1. Bisaga A., Kostowski W. *Selective breeding of rats differing in voluntary ethanol consumption*. Pol. J. Pharmacol. 1993, 45 431-436.
2. Colombo G., Agabio R., Lobino C., Reali R., Zocchi A., Fadda F., Gessa G.: *Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety*. Physiology and Behavior 1995, 57, 1181-1185.
3. Dyr W., Dzierzkowska J., Iwińska K., Krząścik P., Witanowska A., Kostowski W. *Preliminary biochemical and behavioral analysis of the new line of rats selectively bred for high ethanol consumption*. Alcohol and Alcoholism, 1997, Vol. 32, No 3, pp. 379
4. Eriksson K.: *Genetic selection for voluntary alcohol consumption in the albino rat*. Science 1968, 159, 739-741.
5. Fadda F., Mosca E., Colombo G., Gessa G.: *Effect of spontaneous ingestion of ethanol on brain dopamine metabolism*. Life Science 1989, 44, 281-287.
6. Fulginiti S., Artinian J., Cabrera R., Contreras P.: *Response to an ethanol challenge dose on sleep time and blood alcohol level in Wistar rats prenatally exposed to ethanol during gestational day 8*. Alcohol 1989, 6, 3, 253-256,
7. Gongwer M., Murphy J., McBride W., Lumeng L., T.-K. Li.: *Regional brain contents of serotonin, dopamin and their metabolites in the selectively bred high-and low-alcohol drinking lines of rats*. Alcohol. Vol. 6, pp. 317-320.
8. Li T.-K., Lumeng L., McBride W., Murphy J.: *Genetic and neurobiological basis of alcohol seeking behavior*. Alcohol and Alcoholism. 1994, 29, 697-700.
9. Lumeng L., Hawkins T., Li T.-K.: *New strains of rats with alcohol preference and non-preference*. In Alcohol and Aldehyde Metabolizing System. Vol. 3, Thurman R., Williamson J., Drott H., Chance B. Eds. 1977, 537-544, Academic Press, New York.
10. Murphy J., McBride W., Lumeng L., Li T.-K.: *Monoamine and metabolite levels in CNS regions of the P line of alcohol-preferring rats after acute and chronic ethanol treatment*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1983, 19, 849-856,
11. Murphy J., McBride W., Lumeng L., Li T.-K.: *Contents of monoamines in forebrain regions of alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) lines of rats*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1987, 26, 389-392,
12. Murphy J., McBride W., Gatto G., Lumeng L., Li T.-K.: *Effects of acute ethanol administration on monoamine and metabolite content in forebrain regions of ethanol-tolerant and -nontolerant alcohol-preferring (P) rats*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1988, 29, 169-174.
13. Spanagel R., Montkowski A., Allinham K., Stohr T., Shoaib M., Holsboer F., Landgraf R.: *Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration*

- in rats*. Psychopharmacology 1995,
14. Steinbusch H., Nieuwenhuys R.: *The raphe nuclei of the rat brainstem: A cytoarchitectonic and immunohistochemical study*. In: Emson, P.C. ed. Chemical neuroanatomy. New York: Raven Press: 1983, 131-207,
 15. Waller M., McBride W., Gatto G., Lumeng L., Li-T.: *Intragastric self-infusion of ethanol by ethanol-preferring and -nonpreferring lines of rats*. Science 1984, 6, 78-80.