

Instrumentalne samopodawanie alkoholu przez szczury linii WHP i WLP

Operant self-administration of ethanol in WHP and WLP lines of rats

Wanda Dyr, Paulina Rok-Bujko, Wojciech Kostowski

Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

Abstract – Introduction. One of the requirements of an animal model of alcoholism is the ability to press a lever to obtain ethanol by a laboratory animal. The present investigation estimated oral self-administration of ethanol using the operant paradigm in selectively bred WHP (Warsaw High Preferring) and WLP (Warsaw Low Preferring) rats.

Method. Rats of the WHP and WLP lines were studied in operant chambers to press a lever for access to a dipper containing ethanol.

Results. During 30 min. of the experimental session both lines of rats acquired and maintained lever pressing reinforced by ethanol (EtOH) under the FR-1 schedule of reinforcement. However, WHP rats but not WLP rats showed a much stronger level of lever pressing for EtOH under the FR-3 requirement.

These results suggest that EtOH may have stronger reinforcing activity properties in WHP than in WLP rats. Thus, the WHP rats seem to satisfy one of the most important criteria for an animal model of alcoholism.

Key words: ethanol drinking, operant self-administration of ethanol, Warsaw High Preferring (WHP) rats, Warsaw Low Preferring (WLP) rats

Streszczenie – Wstęp. Jednym z ważnych kryteriów uzależnienia od alkoholu jest zdolność wykonania określonej pracy w celu pozyskania alkoholu. Mierzona jest najczęściej reakcja instrumentalna, taka jak naciskanie dźwigni uruchamiającej podajnik z alkoholem.

Metoda. Badano samopodawanie alkoholu przez szczury linii WHP (Warsaw High Preferring) i WLP (Warsaw Low Preferring) z zastosowaniem procedury instrumentalnej. Szczury WHP i WLP są liniami zwierząt fenotypowo wyselekcjonowanymi w naszym laboratorium w kierunku odpowiednio dużej i małej preferencji alkoholu i jego spożycia. Szczury WHP i WLP badano w standardowych klatkach przystosowanych do wykonania reakcji instrumentalnej. Klatki były wyposażone w 2 dźwignie, z których jedna uruchamiała na 5 sekund poidełko z alkoholem.

Artykuł jest skróconą wersją tekstu, który w 2006 r. ukazał się jęz. angielskim (w obecnym wydaniu dyskusja jest wzbogacona dzięki uwagom recenzenta *Alkoholizmu i Narkomanii*).

Rok-Bujko P, Dyr W, Kostowski W (2006) Operant self-administration of ethanol in Warsaw High-Preferring (WHP) and Warsaw Low-Preferring (WLP) lines of rats. *Pharmacological Reports*, 58, 931–935.

Praca była poparta grantem statutowym t. 46/2004-5 Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie.

Wyniki. W ciągu 30-minutowej sesji eksperymentalnej szczury obu linii naciskały dźwignię podobną liczbę razy, przy wartościach współczynnika wzmocnienia FR-1 (wymagane jedno naciśnięcie dźwigni dla pojawienia się podajnika z alkoholem). Z kolei, szczury linii WHP statystycznie większą liczbę razy naciskały dźwignię przy wartościach FR-3 (trzy naciśnięcia dźwigni dla uzyskania porcji alkoholu), w porównaniu do szczurów linii WLP, których reakcja utrzymuje się na niskim poziomie. Rezultaty badań mogą wskazywać, że etanol ma większe właściwości wzmacniające dla szczurów linii WHP niż dla szczurów linii WLP. Szczury WHP wykazują znacznie większą motywację do wykonania określonej pracy w celu pozyskania alkoholu. Spełniają więc jedno z ważniejszych kryteriów zwierzęcego modelu alkoholizmu.

Słowa kluczowe: picie alkoholu, reakcja instrumentalna samopodawania alkoholu, szczury WHP (Warsaw High Preferring), szczury WLP (Warsaw Low Preferring)

WSTĘP

Uzależnienie od alkoholu charakteryzuje się utratą kontroli nad zachowaniami apetytywnymi, co przejawia się intensywnym poszukiwaniem i spożywaniem alkoholu. W porównaniu do osób umiarkowanie pijących, osoby dotknięte alkoholizmem spożywają etanol w znacznie częstszych epizodach i w większej ilości podczas każdego z nich. Nadmierne picie przez dłuższy czas prowadzi do rozwoju tolerancji i uzależnienia psychicznego. Oprócz wpływu otoczenia i uwarunkowań socjalnych ważną rolę w rozwoju uzależnienia odgrywają predyspozycje genetyczne (1).

Linie szczurów WHP (Warsaw High Preferring) i WLP (Warsaw Low Preferring) są liniami fenotypowo wyselekcjonowanymi w naszym laboratorium w kierunku dużej i małej preferencji alkoholu (2, 3).

Szczury linii WHP spełniają wiele ważnych kryteriów określających zwierzęcy model alkoholizmu. Przy dostępie do pokarmu i wody *ad libitum*, szczury WHP spontanicznie piją duże ilości 10-procentowego roztworu alkoholu, co w przeliczeniu na czysty etanol przekracza 5 g/kg/24 h. W wyniku spontanicznego picia uzyskują znaczne stężenie alkoholu we krwi (do 40–45 mg%) oraz cechy uzależnienia fizycznego, przejawiającego się objawami zespołu abstynencyjnego (3, 4).

Linia pod względem fenotypu przeciwstawną do linii WHP jest linia szczurów WLP, które w takich samych warunkach wolnego wyboru piją bardzo małe ilości 10-procentowego roztworu alkoholu (w przeliczeniu na czysty etanol – poniżej 1 g/kg/24 g). Obie linie odmiennie reagują na alkohol, np. niewielkie jego dawki (0,5 g/kg i.p.) działają pobudzająco na aktywność ruchową u szczurów linii WHP, czego nie obserwuje się u linii WLP (3).

Za szczególnie ważne kryterium uzależnienia uważa się gotowość do określonego wysiłku (np. reakcji instrumentalnej) w celu zdobycia alkoholu bądź innej substancji uzależniającej. Wykonanie określonej pracy jest miarą właściwości wzmacniających i nagradzających alkoholu, jak również jednym z zasadniczych kryteriów zwierzęcego modelu alkoholizmu (5, 6, 7, 8, 9).

W badaniach na szczurach testuje się najczęściej reakcję instrumentalną, polegającą na naciskaniu dźwigni, która uruchamia mechanizm prezentujący na określony czas poidelko z niewielką porcją alkoholu (6, 8).

Celem badań przedstawionych w tej pracy była dalsza charakterystyka cech fenotypowych linii WHP i WLP pod względem reaktywności na wzmacniające działanie alkoholu w modelu instrumentalnego samopodawania (*operant self-administration*).

METODA

Zwierzęta

Do badania użyto 4-miesięcznych szczurów samców linii WHP i WLP (pokolenia F 32–33) o wadze 250–280 g na początku doświadczenia. Zwierzęta były przetrzymywane po 4–5 w standardowych klatkach, w temperaturze otoczenia 22°C i w cyklu dobowym 12 h:12 h (światło włączano o godz. 07:00). Standardowa pasza granulowana i woda były dostępne *ad libitum*.

Badania wykonano zgodnie z obowiązującymi zasadami badań na zwierzętach, za zgodą komisji etycznej (Nr 11 – 30.03.2004).

Doświadczenie I. Instrumentalne samopodawanie etanolu

Reakcje instrumentalne wzmacniane alkoholem badano w standardowych klatkach (Coulbourn Instrument, Allentown, PA, USA), wyposażonych w 2 dźwignie i automatyczny podajnik płynów (*liquid dipper*).

Naciśnięcie na dźwignię „aktywną” uruchamiało podajnik płynu, podczas gdy naciśnięcie na dźwignię „nieaktywną” było rejestrowane, lecz nie uruchamiało podajnika, a więc nie prowadziło do wzmocnienia reakcji. Początek sesji był sygnalizowany przez włączenie światła, którego źródło było zlokalizowane na górze w pobliżu wejścia do klatki. Podczas sesji doświadczalnej system podający płyn w ciągu 5 sek. zawierał etanol w ilości 0,1 ml 10-procentowego roztworu.

W celu wyuczenia reakcji instrumentalnej stosowano procedurę wycofywania cukru (*sucrose fading*) (7), zgodnie z którą przez pierwsze 4 dni treningu szczurom WHP i WLP podawano wodę tylko przez 2 godziny w ciągu doby. Codziennie przeprowadzano sesję eksperymentalną trwającą 30 minut, podczas której jedno naciśnięcie dźwigni, określane jako FR-1 (*fixed ratio*), uruchamiało podajnik płynu zawierający 10-procentowy roztwór cukru. Piątego dnia do 10-procentowego roztworu cukru dodawano 2-procentowy etanol i przez następne 14 dni stężenie etanolu stopniowo wzrastało do 10-procentowego, z równoczesnym zmniejszaniem stężenia roztworu cukru od 10 do 0%. Po zakończeniu fazy treningu, rozpoczynał się właściwy cykl doświadczalny, w czasie którego przez kolejne 10 sesji szczury obu linii musiały wykonać jedno naciśnięcie dźwigni. Po zakończeniu fazy FR-1, stopień trudności pozyskania alkoholu zwiększał się do wartości FR-2 i FR-3, w których wzmacniane podaniem alkoholu było odpowiednio: co drugie lub co trzecie naciśnięcie dźwigni. Podobnie jak w fazie wzmocnienia FR-1, dla wartości wzmocnienia FR-2 i FR-3 przeprowadzono 1 sesję trwającą 30 minut w ciągu kolejnych 10 dni.

Doświadczenie II. Spontaniczne picie etanolu

Po zakończeniu instrumentalnego samopodawania, szczury były przetrzymywane pojedynczo w drucianych klatkach. Przez pierwszy tydzień zwierzęta miały dostęp tylko do 10-procentowego roztworu etanolu w dwóch skalowanych poidelkach przymocowanych do klatki. Podczas drugiego, trzeciego i czwartego tygodnia jedno poidelko zawierało wodę, a drugie 10-procentowy roztwór etanolu (test „dwubutelkowy”). W czwartym tygodniu mierzono ilość wypitego 10-procentowego roztworu etanolu i wody w ciągu doby. Zarejestrowane w ml spożycie etanolu było przeliczane na wartość wyrażoną w g/kg/24 h czystego etanolu.

Statystyka

Reakcja instrumentalna była analizowana przy użyciu trójczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla wartości powtórzonych oraz testem *post-hoc* Newmana-Keulsa. Analizowano trzy czynniki doświadczalne: pierwszy czynnik to zaprogramowane wzmocnienie, drugi to rodzaj linii i trzeci to poszczególne sesje doświadczalne.

Picie spontaniczne alkoholu analizowano dwuczynnikową analizą wariancji (jeden czynnik to rodzaj linii, a drugi to czas badania) oraz testem Newmana-Keulsa.

WYNIKI

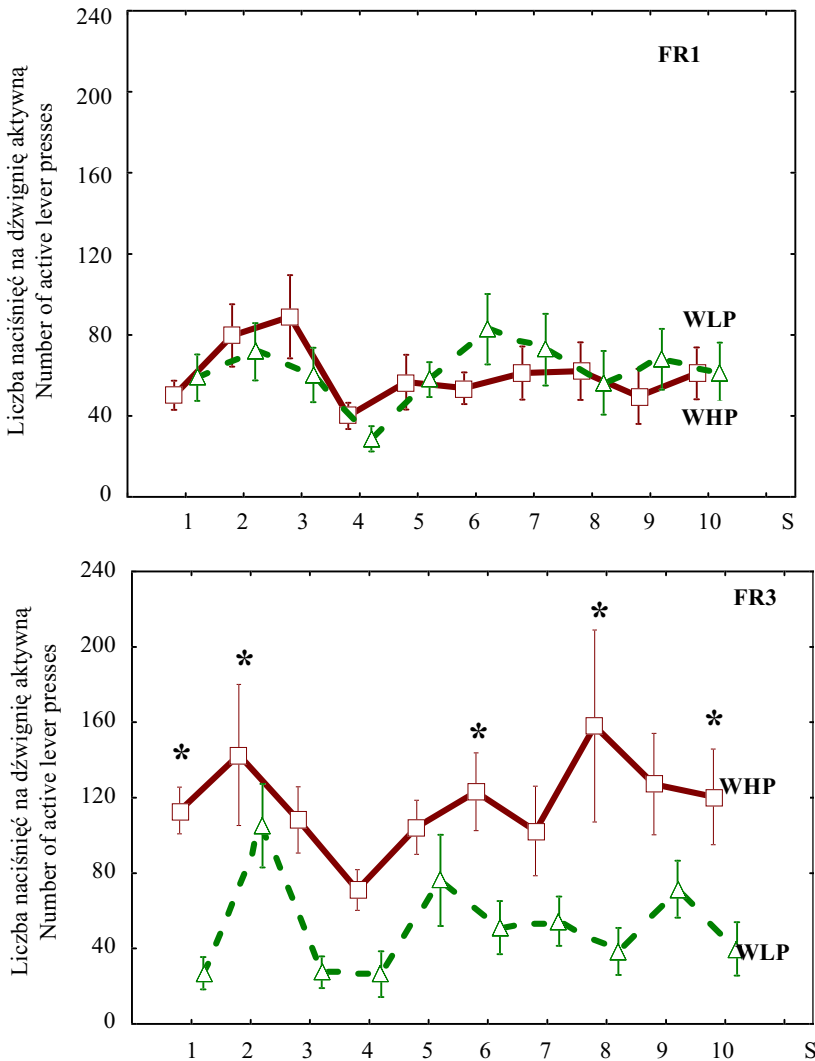
Wyniki naszych doświadczeń wskazują, że szczury WHP i WLP wykonują podobną liczbę naciśnień dźwigni przy wzmocnieniu każdej reakcji (FR-1). Gdy współczynnik wzmocnienia wzrastał do FR-2 i FR-3, reakcja instrumentalna szczurów linii WLP zmniejszała się w każdej kolejnej sesji. W przeciwieństwie do szczurów WLP, liczba naciśnień dźwigni przez szczury WHP utrzymywała się na podobnym poziomie dla wartości FR-1 i FR-2, natomiast statystycznie znacznie zwiększała się przy wartościach FR-3 (rys. 1).

Analiza wariancji trójczynnikowa dla powtarzanych pomiarów nie wykazała znacznej różnicy statystycznej dla zaprogramowanego wzmocnienia ($F_{2,50} = ,48$; $p < 0,09$), ale wykazała znaczne różnice w odniesieniu do badanych linii szczurów ($F_{1,50} = 16,00$; $p < 0,0002$) i poszczególnych sesji (czasu trwania doświadczenia) ($F_{9,450} = 4,65$; $p < 0,001$).

Analiza wykazała znaczącą statycznie interakcję między zaprogramowanym wzmocnieniem a badanymi liniami ($F_{2,50} = 9,54$; $p < 0,001$), a także interakcję między czasem trwania doświadczenia a zaprogramowanym wzmocnieniem ($F_{18,450} = 1,63$; $p < 0,05$).

Naciśnięcie na dźwignię nieaktywną było bez znaczenia.

Jak oczekiwano, w warunkach wolnego wyboru między 10-procentowym roztworem alkoholu i wodą, szczury linii WHP piły powyżej 6,0 g/kg/24 h czystego etanolu, podczas gdy średnie spożycie alkoholu przez szczury WLP wynosiło mniej niż 1,0 g/kg/24 h (rys. 2). Dwuczynnikowa analiza wariancji dla powtórzo-



Rys. 1.

Liczba naciśnień przez szczury WHP i WLP na dźwignię aktywną podczas 30-minutowej sesji instrumentalnego samopodawania etanolu dla wartości FR-1 i FR-3

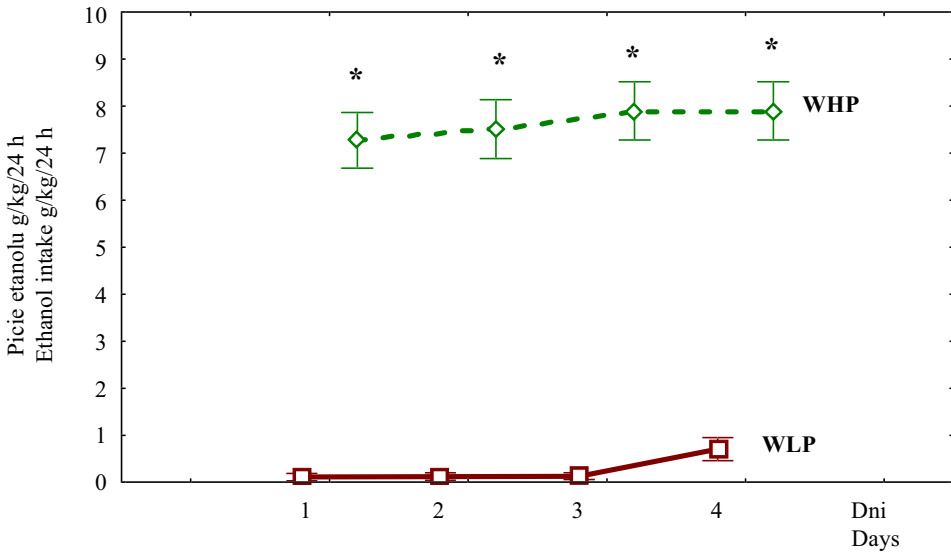
S – liczba sesji. Wartości wyrażone jako średnie ± błąd standardowy (n = 7),

* p<0,01, test Newmana-Keulsa

Mean value ± SEM of number of active lever presses by WHP and WLP rats during 30 min. operant self-administration of ethanol at the FR-1 and the FR-3 ratio

S-number of sessions (n = 7), * p<0.01, Newman-Keuls test

nych pomiarów wykazała znamiennej różnicę między grupami ($F_{3,54}=5,4$; $p=0,02$), podczas gdy test (*post-hoc*) Newmana-Keulsa wykazał znamiennej różnicę w picciu alkoholu na poziomie $p<0,001$ między szczurami WHP i WLP.



Rys. 2.

Dobowe spożycie etanolu (wyrażone w g/kg/24 h czystego etanolu) przez szczury WHP i WLP w warunkach wolnego wyboru między 10-procentowym roztworem etanolu a wodą. Wartości wyrażone jako średnie \pm błąd standardowy ($n = 7$), * $p < 0,01$, test Newmana-Keulsa. Mean value \pm SEM of ethanol intake (g/kg/24 h) by WHP and WLP rats in the free-choice condition between 10% ethanol solution and water ($n = 7$), * $p < 0.01$, Newman-Keuls test.

DYSKUSJA

Badanie instrumentalne samopodawania alkoholu przeprowadzono na zwierzętach obu linii, które uprzednio nie miały kontaktu z alkoholem (zwierzęta „naiwne”). Stosowanie zwierząt „naiwnych” wyklucza wpływ uprzedniego podawania alkoholu na rezultaty przeprowadzonych doświadczeń. Wyniki naszych badań wykazały podobną zdolność szczurów linii WHP i WLP do nabywania i utrzymywania na podobnym poziomie reakcji instrumentalnej, czyli liczby naciśnień dźwigni przy wartościach wzmocnienia FR-1 i FR-2, a więc przy relatywnie niskim kryterium wymaganej pracy dla uzyskania wzmocnienia. Przy wyższej wartości współczynnika wzmocnienia (FR-3, wzmocniana co trzecia reakcja) pojawiały się zasadnicze różnice między linią WHP i WLP. Szczury WHP, w przeciwieństwie do szczurów WLP, wykonywały statystycznie znamienne większą liczbę naciśnień na dźwignię w celu pozyskania alkoholu. Szczury linii WLP nie były natomiast zdolne do zwiększania nakładu pracy w tej sytuacji doświadczalnej. Wzmacniające właściwości alkoholu są zatem większe u zwierząt linii WHP, niż u zwierząt linii WLP. Szczury WHP są więc silniej motywowane do pozyskania alkoholu w warunkach utrudnionego dostępu do poidełka (wzmocniana co trzecia reakcja instrumentalna). Według kryteriów ustalonych przez Cicero (9) wykonanie określonej pracy przez

zwierzęta w celu pozyskania alkoholu do picia jest jednym z zasadniczych warunków uznania określonego modelu zwierzęcego za model uzależnienia zbliżony (oczywiście, przy wszystkich zastrzeżeniach) do alkoholizmu u człowieka. Na podstawie uzyskanych wyników badań można wnioskować, że szczury WHP spełniają w znacznym stopniu to zasadnicze kryterium zwierzęcego modelu alkoholizmu.

Wyniki badań II eksperymentu, przeprowadzonego po zakończeniu instrumentalnego samopodawania alkoholu, wykazały, że ilość spontanicznie wypitego 10-procentowego roztworu alkoholu w statystycznie znamiennej sposób różniła obie linie szczurów. Szczury WHP piły powyżej 5,0 g/kg/24 h czystego alkoholu, natomiast szczury WLP – poniżej 2,0 g/kg/24 h. Spożywanie w warunkach wolnego wyboru przez szczury WHP alkoholu powyżej 5 g/kg/24 h spełnia kolejne kryterium zwierzęcego modelu alkoholizmu.

Preferencje dotyczące etanolu i jego spożycie przez szczury wyselekcjonowanych linii, preferujących i niepreferujących etanolu, bada się na ogół poprzez zapewnienie ciągłego dostępu do 10-procentowego roztworu alkoholu. Jednakże konsumpcja mniejszych lub znacznie większych stężeń etanolu przy ograniczonym dostępie do alkoholu jest słabo poznana. Ostatnie badania Martinetti (10) wykazały, że dostęp przez 1 godzinę w ciągu doby do 4-procentowego roztworu etanolu ujawnia różnicę w konsumpcji i preferencji etanolu między szczurami linii P (preferującymi), NP (niepreferującymi) i SD (Sprague-Dawley). Co więcej, różnica między szczurami P i NP jest już widoczna przy stężeniu etanolu 1,8%. Rezultaty tych badań wskazują, że różnice między szczurami P i NP istnieją przy stężeniach znacznie niższych niż te, które stosowano w sytuacji ciągłego dostępu do alkoholu. Przyniesione wyniki mogą być wskazówką dla przyszłych badań szczurów linii WHP i WLP.

Wyniki naszych badań są w dużej mierze zgodne z rezultatami instrumentalnego samopodawania etanolu przez szczury innych linii preferujących alkohol, jak linie sP (sardinian Preferring), P (Preferring), HAD (High Alcohol Drinking) oraz niepreferujących alkoholu, takich jak linie sNP (sardinian Nonpreferring), LAD (Low Alcohol Drinking) i NP (Nonpreferring) (8, 11, 12). Wystąpiła jednak pewna różnica. Wykazaliśmy bowiem, że szczury WLP nabywają i utrzymują instrumentalne samopodawanie, podobnie jak szczury WHP, przy współczynniku wzmocnienia FR-1 (a więc przy niewielkich wymaganiach co do nakładu pracy). Ta zdolność wydaje się być zróżnicowana, przynajmniej do pewnego stopnia, w innych znanych liniach niepreferujących alkoholu. Odnosi się to w szczególności do linii (sNP), która nie jest w stanie nauczyć się instrumentalnego samopodawania etanolu i utrzymać tę umiejętność, nawet przy niskim współczynniku wzmocnienia FR-1 (8).

Przy dalszym przeglądzie rezultatów badań w danym zakresie okazało się, że u szczurów linii preferującej alkohol AA (alcohol accepting) instrumentalne samopodawanie etanolu jest znacznie mniejsze, niż u szczurów linii niepreferującej NP (NonPreferring). Autorzy uważają, że reakcja instrumentalnego samopodawania etanolu jest determinowana przez inne geny niż te, które byłyby odpowiedzialne za wyselekcjonowane linie zwierząt preferujących alkohol lub niepreferujących (13).

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przeciwieństwie do badań innych autorów (8), w naszych badaniach instrumentalną reakcję samopodawania alkoholu przeprowadzono na szczurach „naiwnych” (które nie miały uprzednio kontaktu z alkoholem).

PIŚMIENNICTWO

1. Cloninger CR (1987) Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science*, 236, 410–416.
2. Bisaga A, Kostowski W (1993) Selective breeding of rats differing in voluntary ethanol consumption. *Polish Journal of Pharmacology*, 45, 431–436.
3. Dyr W, Kostowski W (2004) Preliminary phenotypic characterization of the Warsaw High-Preferring (WHP) and Warsaw Low-Preferring (WLP) lines of rats selectively bred for high and low ethanol consumption. *Polish Journal of Pharmacology*, 56, 359–365.
4. Dyr W, Kostowski W (2000) Animal model of ethanol abuse: rats selectively bred for high and low voluntary alcohol intake. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 57 Suppl, 90–92.
5. Bieńkowski P, Kostowski W, Koroś E (1999) Ethanol-reinforced behavior in the rat: effects of naltrexone. *European Journal of Pharmacology*, 374, 321–327.
6. Middaugh LD, Kelley BM (1999) Operant ethanol reward in C57BL/6 mice: influence of gender and procedural variables. *Alcohol*, 17, 185–194.
7. Samson HH, Pfeiffer AO, Tolliver GA (1988) Oral ethanol self-administration in rats: models of alcohol-seeking behavior. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 12, 591–598.
8. Vacca G, Serra S, Brunetti G, Carai AM, Samson HH, Gessa GL, Colombo G (2002) Operant self-administration of ethanol in Sardinian Alcohol-Preferring rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 26, 11, 1678–1685.
9. Cicero TJ (1980) Animal models of alcoholism. W: Eriksson K, Sinclair JD, Kiiammaa K (red.) *Animal models in alcohol research*. London: Academic Press, 99–107.
10. Martinetti MP, Lowery EG, Vona SR, Wichnick AM, Adler RA, Finch DG (2006) Limited-access consumption of ascending ethanol concentration in alcohol-preferring, nonpreferring, and Sprague-Dawley rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 30 (5), 836–846.
11. Murphy JM, Gatto GJ, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1989) Operant responding for oral ethanol in the alcohol-preferring P and alcohol-nonpreferring NP lines of rats. *Alcohol*, 6, 127–131.
12. Ritz MC, Garcia JM, Protz D, George FR (1994) Operant ethanol-reinforced behavior in P, NP, HAD and LAD rats bred for high versus low ethanol preference. *Alcoholism, and Clinical Experimental Research*, 18, 1406–1415
13. Samson HH, Files FJ, Denning C, Marvin S (1998) Comparison of alcohol-preferring and non-preferring selectively bred rat lines. I. Ethanol initiation and limited access operant self-administration. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22, 9, 2133–2146.

Adres do korespondencji

Wanda Dyr

Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego

Instytut Psychiatrii i Neurologii

ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa

tel. (22) 4582 728

e-mail: wdyr@ipin.edu.pl

otrzymano 21.11.06

przyjęto do druku 15.05.07