

**MORFIININ VAIKUTUKSET  
EHDOLLISTETUSSA PAIKKAHAKUISUUSKOKEESSA  
AMPA-TYYPIN GLUTAMAATTIRESEPTORIN GLUA1-ALAYKSIKÖN  
POISTOGEENISILLÄ HIIRILLÄ**

Katja Ojala  
Helsingin yliopisto  
Farmasian tiedekunta  
Farmakologian ja  
toksikologian osasto

Maaliskuu 2010

|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
| Tiedekunta – Fakultet – Faculty<br>Farmasian tiedekunta  |  | Osasto – Sektion – Department<br>Farmakologian ja toksikologian osasto |   |
| Tekijä – Författare – Author<br>Katja Ojala  |  |  |   |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title<br>Morfiinin vaikutukset ehdollistetussa paikkahakuisuuskokeessa AMPA-tyypin glutamaattireseptorin GluA1-alayksikön poistogeenisillä hiirillä   |  |  |   |
| Oppiaine – Läroämne – Subject<br>Farmakologia  |  |  |   |
| Työn laji – Arbetets art – Level<br>Pro gradu  |  | Aika – Datum – Month and year<br>Maaliskuu 2010                        | Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages<br>72 |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract   |  |  |   |
| <p>Glutamaatti on keskushermoston pääasiallinen eksitatorinen eli toimintaa kiihdyttävä välittäjäaine. Glutamaattin hermovälityksen merkitys päihderiippuvuuden kehittämisessä ja ylläpidossa on keskeinen. Glutamaatti on vuorovaikutuksessa muiden välittäjäaineiden kuten dopamiinin kanssa riippuvuuteen liittyvissä tapahtumissa. Päihderiippuvuuden kehittyessä tapahtuu muistiin ja oppimiseen liittyviä hermosoluyhteyksien plastisia muutoksia esimerkiksi synapsien määrässä ja niiden toiminnan tehokkuudessa. Glutamaattin AMPA-reseptorin ja erityisesti sen GluA1-alayksikön uskotaan sisältyvän riippuvuuden taustalla oleviin neurobiologisiin mekanismeihin.</p> <p>Päihderiippuvuudesta kärsivillä ihmisillä on keskeisinä ongelmina pakonomainen halu käyttää päihdettä ja raittiiden kausien jälkeen tapahtuvat retkahtamiset päihteisiin. Päihteiden aiheuttamaa palkitsevuutta voidaan mallintaa ehdollistetun paikkahakuisuusmenetelmän avulla. Erikoistyön tavoitteena oli selvittää glutamaattin AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön merkitystä hiirillä morfiinin paikkahakuisuudessa ja sen sammumisessa sekä retkahduskäyttäytymisessä. Hiirien lokomotorista aktiivisuutta tutkittiin kaikkien koevaiheiden aikana. Koe-eläiminä käytettiin C57BL/6J hiirikannan pohjalta kehitettyjä glutamaattin AMPA-reseptorin suhteen GluA1 villityypin ja GluA1 poistogeenisiä (GluA1<sup>-/-</sup>) hiiriä. Ehdollistamisvaiheessa hiiret opetettiin yhdistämään morfiinin (20 mg/kg) vaikutukset tiettyyn ympäristöön. Ehdollistamisen jälkeen arvioitiin ehdollistumisen sammumista eli ekstinktiota morfiiniin liitettyyn ehdollistamisympäristöön antamalla hiirille saliniä (0,9 % NaCl-liuos). Ekstinktiiovaihetta seurasi retkahdustesti, jonka yhteydessä hiirille annettiin morfiinia (20 mg/kg). Eläinten hakeutuminen morfiiniin liitettyyn ehdollistamisympäristöön kuvasi päihdehakuisuutta eri koevaiheiden aikana.</p> <p>GluA1<sup>-/-</sup> hiiret olivat hyperaktiivisempia koeympäristössä villityypin hiiriin verrattuna. Morfiinin indusoima liikkuminen ei kuitenkaan eronnut genotyyppien välillä, vaan molempien genotyyppien lokomotorinen aktiivisuus herkistyi yhtä lailla toistuvien morfiinialtistuksien seurauksena. Morfiini aiheutti myös paikkahakuisuutta molemmilla genotyypeillä. Morfiinin paikkahakuisuus sammui edelleen kummallakin genotyypillä. Retkahdustestin tulokset erosivat kuitenkin osittain genotyyppien välillä. Villityypin hiiret retkahtivat morfiiniin, kun käytettiin toistettujen testien ekstinktiomenetelmää, mutta GluA1<sup>-/-</sup> hiiret eivät. Villityypin hiirillä esiintyi paikkahakuisuuden sijaan paikka-aversiota retkahdustestissä, kun ekstinktiomenetelmänä oli saliinilla ehdollistaminen. Näiden kokeiden perusteella ekstinktiomenetelmällä saattaa olla vaikutusta retkahdustestin tuloksiin, eikä koetulosten perusteella voi tehdä johtopäätöksiä GluA1-alayksikön merkityksestä morfiiniin retkahtamisessa.</p> <p>Yhteenvetona voidaan todeta, että paikkaehdollistamiskokeiden tulokset tukevat käsitystä, minkä perusteella GluA1-alayksikkö ei ole merkittävä morfiiniin ehdollistamisessa. Koetulosten perusteella GluA1-alayksiköllä ei ole kuitenkaan merkitystä morfiinin ekstinktiossa, kuten kirjallisuuden perusteella voi olettaa. GluA1-alayksiköllä saattaa olla merkitystä morfiiniin retkahtamisessa, vaikka retkahdustestin tulokset olivat osittain ristiriitaisia.</p> |  |  |   |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords<br>riippuvuus, glutamaatti, AMPA, poistogeeninen hiiri, ehdollistettu paikkahakuisuus, lokomotorinen aktiivisuus, morfiini   |  |  |   |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited<br>Helsingin yliopisto, Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian osasto   |  |  |   |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information<br>Ohjaajat: Teemu Aitta-aho, Anne Panhelainen (o.s. Heikkinen)<br>Kokeellinen osa: Biolääketieteen laitos, farmakologian oppiaine, Lääketieteen tutkimus- ja opetuskeskus Biomedicum, Helsingin yliopisto   |  |  |   |

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
| Tiedekunta – Fakultet – Faculty<br>Faculty of Pharmacy  |  | Osasto – Sektion – Department<br>Division of Pharmacology and Toxicology |   |
| Tekijä – Författare – Author<br>Katja Ojala   |  |  |   |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title<br>Morfiinin vaikutukset ehdollistetussa paikkahakuisuuskokeessa AMPA-tyypin glutamaattireseptorin GluA1-alayksikön poistogeenisillä hiirillä  |  |  |   |
| Oppiaine – Läroämne – Subject<br>Pharmacology   |  |  |   |
| Työn laji – Arbetets art – Level<br>Master's thesis   |  | Aika – Datum – Month and year<br>March 2010                              | Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages<br>72 |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract  |  |  |   |
| <p>Glutamate is the principal excitatory neurotransmitter in the central nervous system. Glutamatergic neurotransmission plays a central role in the development and maintenance of drug addiction. Glutamate interacts with other neurotransmitters such as dopamine in the actions concerning addiction. During the development of drug addiction, plastic changes in the neuronal connections related to memory and learning occur for example in the amount of synapses and in the efficacy of their action. Glutamatergic AMPA receptor and especially its GluA1 subunit are thought to be included in the neurobiological mechanisms related to drug addiction.</p> <p>Compulsive drug craving and relapses to drug use after a period of abstinence are central problems among people suffering drug addiction. Conditioned place preference is a technique that is used to study motivational properties of drugs in experimental animals. The aim of this master's thesis was to examine the importance of glutamatergic AMPA receptor GluA1 subunit in the morphine-induced place preference and in its extinction and reinstatement behaviour. Locomotor activity of mice was studied during all the phases of experiment. Glutamatergic AMPA receptor GluA1 subunit-deficient (GluA1<sup>-/-</sup>) and their control (wildtype) mice, based on C57BL/6J mouse strain, were used in the experiments. During the conditioning phase, the mice were trained to associate the effects of morphine (20 mg/kg) with a specific environment. After conditioning, the extinction with morphine paired conditioning environment was assessed by giving saline (0,9 % NaCl solution) to mice. The extinction phase was followed by reinstatement test, in which mice were given morphine (20 mg/kg). The seeking of animals with morphine paired conditioning environment described drug-seeking during different phases of experiment.</p> <p>GluA1<sup>-/-</sup> mice were more hyperactive when placed in the testing environment compared to the wildtype mice. However, the morphine-induced locomotor activity did not differ between genotypes. Locomotor activity of both genotypes was sensitized equally in consequence of repeated morphine exposures. Morphine induced place preference in both genotypes. Furthermore, the extinction of morphine place preference happened in both genotypes. However, the results of reinstatement test differed partly between genotypes. The place preference was reinstated by morphine in wildtype mice, but not in GluA1<sup>-/-</sup> mice, when using repeated testing extinction method. Instead of place preference, wildtype mice exhibited place aversion, when extinction method was saline conditioning. As a result of these experiments, extinction method can have an impact on the results of reinstatement test and conclusions cannot be done on the importance of GluA1 subunit in morphine reinstatement.</p> <p>In conclusion, the results of place preference experiments support the conception that GluA1 subunit is not significant in morphine conditioning. However, based on these experiments, GluA1 subunit is not important in morphine extinction, as one might assume on the basis of literature. GluA1 subunit may have an importance in morphine reinstatement, although the results of reinstatement test were partly contradictory.</p> |  |  |   |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords<br>addiction, glutamate, AMPA, knockout mouse, conditioned place preference, locomotor activity, morphine   |  |  |   |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited<br>University of Helsinki, Faculty of Pharmacy, Division of Pharmacology and Toxicology  |  |  |   |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information<br>Mentors: Teemu Aitta-aho, Anne Panhelainen (o.s. Heikkinen)<br>Experimental part: Institute of Biomedicine, Pharmacology, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki  |  |  |   |

## SISÄLLYSLUETTELO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I KIRJALLISUUSKATSAUS .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1 JOHDANTO.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2 PÄIHDERIIPPUUUS .....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1 Ehdollistuminen .....  | 4         |
| 2.2 Positiivinen ja negatiivinen vahvistaminen .....                                     | 5         |
| 2.3 Herkistyminen ja toleranssi .....  | 6         |
| <b>3 PÄIHDERIIPPUUUDEN MALLINTAMINEN .....</b>   | <b>8</b>  |
| 3.1 Itseannostelu .....  | 9         |
| 3.2 Kallonsisäinen itsestimulaatio .....   | 10        |
| 3.3 Ehdollistettu paikkahakuisuus .....  | 11        |
| 3.3.1 Ehdollistaminen ja ehdollistumisen testaaminen .....                               | 11        |
| 3.3.2 Ekstinktio ja retkahtaminen .....  | 14        |
| 3.3.3 Menetelmän koejärjestelyt sekä heikkoudet ja vahvuudet .....                       | 16        |
| 3.4 Lokomotorisen aktiivisuuden herkistyminen.....                                       | 17        |
| <b>4 GLUTAMAATTI.....</b>  | <b>19</b> |
| 4.1 Glutamaattireseptorit .....  | 19        |
| 4.1.1 NMDA-reseptorit.....   | 20        |
| 4.1.2 AMPA-reseptorit .....  | 21        |
| 4.1.3 Kainaattireseptorit.....   | 24        |
| 4.1.4 Metabotrooppiset glutamaattireseptorit .....                                       | 24        |
| 4.2 Glutamaterginen hermojärjestelmä ja päihderiippuvuus .....                           | 25        |
| 4.3 Glutamaterginen AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön suhteen poistogeeniset hiiret ..... | 27        |
| 4.3.1 Kognitiiviset ja motoriset ominaisuudet GluA1-poistogeenisillä hiirillä .....      | 28        |
| 4.3.2 Psykiatristen sairauksien piirteet GluA1-poistogeenisillä hiirillä .....           | 29        |
| 4.3.3 Päihteiden vaikutukset GluA1-poistogeenisillä hiirillä .....                       | 30        |
| <b>5 MORFIINI.....</b>   | <b>32</b> |
| 5.1 Morfiini ja opioidireseptorit.....   | 33        |
| 5.2 Morfiinin indusoimia neurokemiallisia muutoksia.....                                 | 34        |
| <b>6 YHTEENVETO .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>II KOKEELLINEN OSUUS .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>8 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>  | <b>40</b> |
| 8.1 Eläimet .....  | 40        |
| 8.2 Tutkittavat aineet .....   | 40        |

|   |           |
|---|-----------|
| 8.3 Ehdollistettu paikkahakuisuus ja lokomotorinen aktiivisuus.....   | 41        |
| 8.3.1 Koehuone ja koejärjestelyt.....   | 41        |
| 8.3.2 Koe 1.....  | 42        |
| 8.3.3 Koe 2.....  | 44        |
| 8.4 Tilastolliset menetelmät.....   | 46        |
| <b>9 TULOKSET .....</b>   | <b>46</b> |
| 9.1 Lokomotorinen aktiivisuus .....   | 46        |
| 9.1.1 Lokomotorinen aktiivisuus ehdollistamisvaiheessa.....   | 46        |
| 9.1.2 Lokomotorinen aktiivisuus ehdollistumis-, ekstinktio- ja retkahdustestissä sekä ekstinktiövaiheessa ..... | 49        |
| 9.2 Ehdollistettu paikkahakuisuus .....   | 50        |
| 9.2.1 Ehdollistumistesti.....   | 50        |
| 9.2.2 Ekstinktiövaihe ja ekstinktiotesti .....  | 51        |
| 9.2.3 Retkahdustesti.....   | 53        |
| <b>10 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>   | <b>54</b> |
| 10.1 Lokomotorinen aktiivisuus .....  | 54        |
| 10.1.1 GluA1-poistogeeniset hiiret liikkivat enemmän villityypin hiiriin verrattuna .....                       | 54        |
| 10.1.2 Morfiinin indusoima lokomotorinen aktiivisuus ei eronnut genotyyppien välillä .....                      | 55        |
| 10.2 Ehdollistettu paikkahakuisuus .....  | 55        |
| 10.2.1 Morfiini aiheutti paikkahakuisuutta kaikilla hiirillä ehdollistumistestissä ..                           | 55        |
| 10.2.2 Genotyyppien välillä ei ollut eroa ehdollistumisen sammumisessa .....                                    | 57        |
| 10.2.3 Retkahdustestin tulokset erosivat kokeiden 1 ja 2 välillä .....  | 58        |
| 10.3 Erilaisten ekstinktiotapojen vertailua CPP-kokeissa .....  | 59        |
| <b>11 YHTEENVETO .....</b>  | <b>60</b> |
| <b>KIITOKSET.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>KIRJALLISUUSLUETTELO .....</b>   | <b>63</b> |

## LYHENTEET

|             |  |
|-------------|--|
| AC          | adenylaattisyklaasi  |
| AMPA        | $\alpha$ -amino-3-hydroksi-5-metyyli-isoksatsoli-4-propionihappo               |
| ANOVA       | varianssianalyysi  |
| CaMKII      | kalsium/kalmoduliini kinaasi II  |
| cAMP        | syklinen adenosiinimonofosfaatti   |
| CPA         | ehdollistettu paikka-aversio (conditioned place aversion)                      |
| CPP         | ehdollistettu paikkahakuisuus (conditioned place preference)                   |
| CR          | ehdollinen vaste (conditioned response)  |
| CREB        | cAMP:n vastetekijöitä sitova proteiini (cAMP response element binding protein) |
| CS          | ehdollinen ärsyke (conditioned stimulus)                                       |
| CTD         | reseptorin karboksyyliipää tähde (carboxyl-terminal domain)                    |
| GABA        | gamma-aminovoihappo  |
| GluA1-/-    | GluA1-alayksikön poistogeeninen hiirikanta                                     |
| GnRH        | gonadotropiineja vapauttava hormoni  |
| G-proteiini | guaniininukleotideja sitova säätelijäproteiini                                 |
| 5-HT        | 5-hydroksitryptamiini, serotoniini   |
| ICSS        | kallonsisäinen itsestimulaatio (intracranial self-stimulation)                 |
| IEG         | välitön varhaisgeeni (immediate early gene)                                    |
| iGluR       | ionotrooppinen glutamaattireseptori  |
| i.p.        | intraperitoneaalinen, vatsakalvonsisäinen                                      |
| i.v.        | intravenoosi, laskimonsisäinen   |
| KAR         | ionotrooppinen kainaattireseptori  |
| KO          | GluA1-alayksikön poistogeeninen hiirikanta                                     |
| LTD         | synaptisen toiminnan pitkäkestoinen heikkeneminen                              |
| LTP         | synaptisen toiminnan pitkäkestoinen vahvistuminen                              |
| mGluR       | metabotrooppinen glutamaattireseptori  |
| mRNA        | lähettilä-RNA  |
| NAc         | accumbens-tumake   |
| Narp        | neuronaalinen välitön varhaisgeeni (IEG)                                       |
| NMDA        | N-metyyli-D-aspartaatti  |
| nNOS        | hermostollinen typpioksidisyntetaasi   |
| NTD         | reseptorin aminopää (amino-terminal domain)                                    |
| PCP         | fensyklidiini  |
| PCR         | polymeraasiketjureaktio  |
| PFC         | prefrontaalinen aivokuori  |
| PKC         | proteiinikinaasi-C   |
| PLC         | fosfolipaasi-C   |
| s.c.        | subkutaaninen, ihonalainen   |
| SEM         | keskiarvon keskivirhe  |
| UCS         | ehdoton ärsyke (unconditioned stimulus)  |
| VTA         | ventraalinen tegmentaalin alue   |
| WT          | villityypin hiirikanta   |

## **I KIRJALLISUUSKATSAUS**

### **1 JOHDANTO**

Päihderiippuvuus on maailmanlaajuinen ongelma, joka häiritsee yhä useamman ihmisen jokapäiväistä elämää. Se on laajojen tutkimuksien aiheena, sillä riippuvuuden hoitoon ei ole olemassa tehokasta hoitokeinoa (Kreek ym. 2002). Tieteellisten tutkimuksien avulla on pyritty selvittämään riippuvuuden taustalla olevia neurobiologisia mekanismeja ja mahdollisia vaikutuskohteita farmakologisille hoitokeinoille. Päihderiippuvuuden kehittyessä tapahtuu muistiin ja oppimiseen liittyviä hermosoluyhteyksien plastisia muutoksia esimerkiksi synapsien määrässä ja niiden toiminnan tehokkuudessa (Koob ja Le Moal 2001; Nestler 2001). Riippuvuuteen liitetään keskeisesti mesokortikolimbinen dopamiinirata, jonka olennaisia rakenneosia ovat muun muassa ventraalinen tegmentaali alue (VTA) ja accumbens-tumake (NAc) (Koob ja Le Moal 2001). Mesokortikolimbinen dopamiinirata on vuorovaikutuksessa monien hermovälittäjäaineiden kuten serotoniinin (5-HT), gamma-aminovoihapon (GABA), opioidipeptidien ja glutamaatin kanssa riippuvuuden taustalla olevissa mekanismeissa. Glutamatergisen hermovälityksen merkitys päihderiippuvuuden kehittymisessä ja sen ylläpidossa on korostunut viime vuosien aikana (Tzschentke ja Schmidt 2003).

Päihderiippuvuudesta kärsivillä ihmisillä on keskeisinä ongelmina pakonomainen halu käyttää päihdettä ja raittiiden kausien jälkeen tapahtuvat retkahtamiset päihteisiin. Koe-eläimien avulla on tutkittu päihderiippuvuuden kehittymistä, sen sammumista sekä päihteisiin retkahtamista esimerkiksi ehdollistetun paikkahakuisuusmenetelmän (conditioned place preference, CPP) ja itseannostelukokeiden avulla (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006; Tzschentke 2007). CPP-menetelmän käyttö on lisääntynyt voimakkaasti viime vuosien aikana. Menetelmä soveltuu hyvin päihderiippuvuuden tutkimiseen, sillä se mallintaa erityisesti päihteiden ja niihin assosioituneiden vihjeiden aiheuttamaa pakonomaista halua päihteisiin. Menetelmän etuina voidaan pitää samanaikaista lokomotorisen aktiivisuuden mittaamista ja mahdollisuutta tutkia palkkiota ilman päihteen vaikutuksen alaisena olemista (Bardo ja Bevins 2000), sillä toistuvat päihdealtistukset herkistävät sekä lokomotorisia että päihteiden käyttöä motivoivia

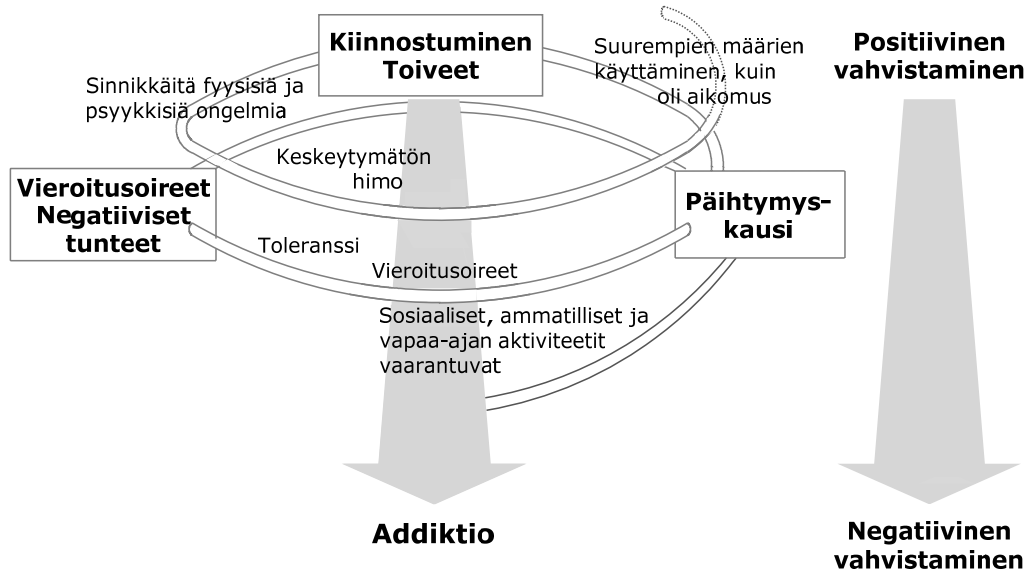
vaikutuksia (Vezina ja Leyton 2009). Päihteille herkistymisen ja ehdollistumisen uskotaan olevan keskeisiä ilmiöitä päihderiippuvuuden kehittämisessä sekä päihteisiin retkahtamisessa (Robinson ja Berridge 2003).

Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään lyhyesti päihderiippuvuutta ja siihen liittyviä ilmiöitä sekä käyttäytymiskokeita, joilla mallinnetaan päihderiippuvuutta koe-eläimillä. Lisäksi kerrotaan glutamatergisestä hermojärjestelmästä ja sen merkityksestä päihderiippuvuudessa keskittyen glutamatergisiin AMPA-reseptoreihin, sillä tämän tutkielman kokeellisessa osassa tutkittiin AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön merkitystä morfiinin paikkahakuisuudessa GluA1-alayksikön suhteen poistogeenisten hiirten avulla. Lisäksi käsitellään GluA1-poistogeenisien hiirien tyypillisiä ominaisuuksia. Lopuksi kerrotaan morfiinin aiheuttamista neurokemiallisista muutoksista aivojen palkkiojärjestelmässä, sillä morfiinia käytettiin päihteenä kokeellisessa osassa.



## 2 PÄIHDERIIPPUUUS

Päihderiippuvuus (addiktio) voidaan määritellä pitkäaikaiseksi ja uusiutuvaksi häiriöksi, jolle on tyypillistä pakonomainen tarve hankkia ja käyttää päihteitä, kontrollin menettäminen päihteiden käyttämisessä sekä negatiivisten tunteiden kuten ahdistuneisuuden esiintyminen estettäessä päihteiden saanti (Koob ja Le Moal 2006a). Päihderiippuvuus kehittyy vähitellen toistuvassa käytössä. Samanaikaisesti lääkinnälliset, sosiaaliset ja ammatilliset ongelmat kehittyvät. Käsitys addiktiosta ja siihen liittyvistä käyttäytymismuutoksista on kehittynyt ajan kuluessa. Nykykäsityksen mukaan addiktiolle on tyypillistä sekä fyysinen että psyykinen riippuvuus (Robinson ja Berridge 2003; Koob ja Le Moal 2006a). Samalla korostetaan enemmän vieroitukseen liittyviä psyyke- ja motivaatiomuutoksia kuin fyysisiä vieroitusoireita. Päihderiippuvuutta voidaan kuvata kolmivaiheisena addiktiosyklinä, jonka aikana riippuvuus kehittyy impulsiivisista päihdekokeiluista pakonomaiseksi päihdehakuiseksi käyttäytymiseksi (Koob ja Le Moal 2001) (Kuva 1). Nämä kolme vaihetta ovat ensin esiintyvä kiinnostuksen ja toiveiden vaihe, jota seuraa päihtymyskausi ja lopulta vallitsevaksi jää vieroitusoireiden sekä negatiivisten tunteiden vaihe. Seuraavaksi esitetään riippuvuuden syntymisen ja säilymisen kannalta keskeisiä ilmiöitä.



Kuva 1. Päihderiippuvuuden (addiktio) kehittyminen impulsiivisista päihdekokeiluista pakonomaiseen päihdehakuiseen käyttäytymiseen. Ensin esiintyy kiinnostuksen ja toiveiden vaihe, jota seuraa päihtymyskausi ja lopulta vallitsee vieroitusoireiden sekä negatiivisten tunteiden vaihe. Addiktion kehittyessä voi esiintyä erilaisia ilmiöitä kuten herkistymistä ja toleranssia päihteelle. Erityisesti alkuvaiheessa esiintyy mielihyvän tunteita (positiivinen vahvistaminen), jotka motivoivat jatkamaan päihteen käyttöä. Addiktion kroonistuessa vieroitusoireiden välttäminen (negatiivinen vahvistaminen) motivoi edelleen päihteen käyttöä. Addiktiosyklin kierteinen muoto kuvaa päihderiippuvuuden kehittymistä ja sen voimistumista, joka johtaa lopulta patologiseen addiktioon. Mukailten (Koob ja Le Moal 2001).

## 2.1 Ehdollistuminen

Klassisella ehdollistumisella (conditioning) tarkoitetaan Ivan Pavlovin esittämää assosioivaa oppimisteoriaa (Cunningham ym. 1983). Ehdollistuminen voidaan jakaa oppimis- (acquisition) ja ilmenemisvaiheisiin (expression) (Bardo ja Bevins 2000; Tzschentke 2007). Oppimisvaiheessa ehdottomat ärsykkeet (unconditioned stimulus, UCS) kuten ruoka tai päihteet assosioituvat johonkin neutraaliin ärsykkeeseen (esim. ääni tai ympäristö), kun ne yhdistetään toisiinsa toistuvasti (Cunningham ym. 1983; Tzschentke 2007). Ilmenemisvaiheessa oppimisen myötä ehdolliseksi ärsykkeeksi (conditioned stimulus, CS) muuttunut neutraali ärsyke alkaa ohjata käyttäytymistä aiheuttaen ehdollisen vasteen (conditioned response, CR) ilman ehdotonta ärsykettä (Cunningham ym. 1983; Tzschentke 2007). Esimerkiksi hiiret oppivat yhdistämään palkkiota aiheuttavan morfiinin (UCS) tiettyyn ympäristöön (CS, esim. muovinen

lattiamateriaali) ja hakeutuvat oppimisen myötä tähän ympäristöön, vaikka eivät enää saisikaan morfiinia. Opittua reaktiota kutsutaan ehdollistumiseksi ja edellinen esimerkki kuvaa sen alamuotoa paikkaehdollistumista (place conditioning).

Ehdollistumisella uskotaan olevan keskeinen tehtävä addiktiivisen käyttäytymismallin tukemisessa (Cunningham ym. 1983; Di Chiara 1999). Sen arvellaan liittyvän päihderiippuvuuden kehittymiseen sekä säilymiseen. Nykytiedon mukaan päihderiippuvuudessa on keskeistä päihteiden käyttöön liittyvä motivoiva ehdollistuminen (Robinson ja Berridge 2003). Assosiatiivisen oppimisen myötä neutraali ärsyke saa motivoivan merkityksen, minkä seurauksena se voi aiheuttaa pakonomaista halua päihteisiin (craving) ja altistaa retkahtamisille. Päihteiden aiheuttaman palkkion (reward) ei uskota aiheuttavan päihderiippuvuutta. Päihderiippuvuuden kehittymisen edellytyksenä on kuitenkin, että päihde aiheuttaa mielihyvän tunteuksia, jotka puolestaan edistävät käytön jatkamista aiheuttaen ehdollistumisen. Edellä esitetyn klassisen ehdollistumisen lisäksi käyttäytymistä ohjaavaan motivaatioon vaikuttaa myös ns. operantti ehdollistuminen (Di Chiara 1999; Panlilio ja Goldberg 2007). Siinä opitaan muodostamaan assosiaatio toiminnan ja ehdottoman ärsykkeen välille, jolloin ehdollistuminen tapahtuu toiminnan seuraamuksiin.

## 2.2 Positiivinen ja negatiivinen vahvistaminen

Vahvistamisella (reinforcement) tarkoitetaan ilmiötä, jossa jokin tapahtuma lisää sen todennäköisyyttä tulevaisuudessa (Koob ja Le Moal 2001). Positiivisella vahvistamisella tarkoitetaan tilannetta, jossa päihteiden mielihyväväikutukset lisäävät käytön jatkamista. Negatiivisessa vahvistamisessa on puolestaan keskeistä päihteiden aiheuttamien vieroitusoireiden välttäminen, mikä motivoi käytön jatkamista. Positiivinen vahvistaminen esiintyy edellä esitetyssä addiktiosykliissä erityisesti päihtymyskauden vaiheessa (Kuva 1). Negatiivinen vahvistaminen on sen sijaan tyypillistä vieroitusoireiden sekä negatiivisten tunteiden vaiheessa.

Positiivisen vahvistamisen perusteella on ymmärrettävää, miksi palkkiota aiheuttavia päihteitä käytetään (Di Chiara 1999). Päihteiden aiheuttamat mielihyvävaikutukset (reward) eivät kuitenkaan voi selittää pakonomaista päihdehakuista käyttäytymistä silloin, kun ei olla päihteen vaikutuksen alaisena. Fyysisen riippuvuuden ajateltiin aiemmin olevan päihderiippuvuuden taustalla, jolloin vieroitusoireiden välttämisen uskottiin motivoivan päihteiden käyttöä (Robinson ja Berridge 2003). Tämä käsitys perustuu negatiiviseen vahvistumiseen. Uudemman käsityksen mukaan sekä positiivinen että negatiivinen vahvistuminen ovat merkittäviä päihderiippuvuuden kehittämisessä (Koob ja Le Moal 2001). Päihderiippuvuuden taustalla on Koobin ja Le Moalin mukaan allostaasi-ilmiö, jolla tarkoitetaan erilaisia hermoston adaptaatioita, jotka aiheuttavat pysyviä muutoksia motivaatioon. Motivaatiomuutokset altistavat retkahtamisille ja aiheuttavat pakonomaisen halun käyttää päihdettä. Allostaasi-ilmiöön perustuvan näkemyksen mukaan mielihyvätuntemukset heikkenevät riippuvuuden kehittyessä ja samalla vastenmieliset sekä negatiiviset tuntemukset voimistuvat. Tämän ilmiön perusteella positiivinen vahvistaminen on merkittävää riippuvuuden syntymiselle, mutta negatiivinen vahvistaminen on osallisena patologisen addiktion säilymiselle (Kuva 1).

### 2.3 Herkistyminen ja toleranssi

Herkistymisellä eli sensitiisaatiolla (sensitization) tarkoitetaan ilmiötä, jossa toistuvan päihteen annostelun seurauksena päihteen vaikutukset voimistuvat (Koob ja Le Moal 2001; Robinson ja Berridge 2003). Toleranssi (tolerance) on herkistymisen vastakkainen ilmiö. Tällöin toistuvan päihteen annostelun seurauksena päihteen vaikutukset heikkenevät ja tarvitaan entistä suurempi annos aikaansaamaan aiempi päihdevaste. Toistuva päihdealtistus voi heikentää joitakin päihteen vaikutuksia toleranssin kautta, vaikka samalla jotkut päihteen vaikutuksista saattavat voimistua herkistymisen myötä (Robinson ja Berridge 2003). Esimerkiksi morfiinin analgeettista ja päihdyttävää vaikutusta kohtaan voi kehittyä toleranssi jatkuvan käytön seurauksena. Samanaikaisesti morfiini voi aiheuttaa psykomotorisien vaikutuksien kuten liikeaktiivisuuden (lokomotorinen aktiivisuus) herkistymistä toistuvan käytön seurauksena (Vezina ja Leyton 2009). Päihteiden aiheuttama herkistyminen syntyy

tyypillisesti väliajoin toistuvan (intermittent) päihdealtistuksen johdosta. Sen sijaan toleranssi esiintyy yleensä tauotta jatkuvan (continuous) päihteen käytön myötä.

Toleranssin ja herkistymisen kehittyminen päihteille voi aiheuttaa farmakologisia muutoksia, jotka muodostuvat kaikissa ympäristöissä samalla tavalla (Cunningham ym. 1983). Samalla voi kehittyä toleranssi tai herkistyminen joillekin päihteen aiheuttamille vaikutuksille vain tietyssä ympäristössä. Esimerkiksi alkoholin aiheuttamalle ataksialle (hapuilu) voi kehittyä toleranssi ehdollistumisen seurauksena vain tiettyyn ympäristöön (context-dependent tolerance) (White ym. 2002). Amfetamiini voi aiheuttaa puolestaan koe-eläimille lokomotorisen aktiivisuuden herkistymistä vain ehdollistamisympäristössä (context-dependent sensitization), mikäli eläimet on ensin ehdollistettu amfetamiinin avulla kyseiseen ympäristöön (Anagnostaras ja Robinson 1996). Ehdollistamisjakson jälkeen amfetamiini ei kuitenkaan usein aiheuta lokomotorisen aktiivisuuden herkistymistä koe-eläimille täysin uudessa ympäristössä. Edellä esitetyt esimerkit korostavat assosiatiivisen oppimisen ja ympäristön ärsykkeiden merkitystä addiktiossa.

Riippuvuuden kehittymistä satunnaisesta päihteiden käytöstä pakonomaiseen käyttöön on selitetty erilaisien teorioiden avulla. Robinsonin ja Berridgen (1993) esittämän teorian mukaan patologisen addiktion aiheuttaa voimakkaaseen himoon liittyvien hermojärjestelmien herkistyminen päihteiden käytön seurauksena. Heidän mukaansa subjektiivinen päihteistä pitäminen (liking) ja niihin liittyvä himo (wanting) ovat erillisiä tapahtumia kuten näitä tapahtumia ohjaavat hermojärjestelmät (Robinson ja Berridge 2003). Himoon liittyvillä hermojärjestelmillä tarkoitetaan nucleus accumbensin kanssa yhteydessä olevia hermojärjestelmiä, esimerkiksi dopaminergisiä ratoja, joihin päihteen vaikuttavat. Himoon liittyvät hermojärjestelmät herkistyvät toistuvan päihdealtistuksen myötä, minkä johdosta hermojärjestelmät ovat yliherkkiä päihteeseen assosioituneille ärsykeille sekä päihteele. Tämän seurauksena ärsykkeet toimivat päihdehakuisen käyttäytymisen kiihottajina ja altistavat retkahtamisille. Himoon liittyvien hermojärjestelmien yliaktivoinnin uskotaan johtavan pakonomaiseen haluun käyttää päihdettä (craving).

### 3 PÄIHDERIIPPUVUUDEN MALLINTAMINEN

Päihderiippuvuutta ja sen taustalla olevia neurofarmakologisia mekanismeja voidaan mallintaa erilaisien eläinkokeiden avulla. Päihderiippuvuuden mallintamisessa käytettävien menetelmien validiteetti eli pätevyys on tärkeää osoittaa, jotta menetelmien avulla saatuja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Mikään menetelmä ei kuitenkaan täytä kattavasti kaikkien validiteettimittareiden kriteerejä, vaan kukin eläinmalli kuvaa joitakin tyypillisiä päihderiippuvuuteen liittyviä tekijöitä (Goudie 1991). Näennäisvaliditeetilla (face validity) tarkoitetaan menetelmän kykyä kuvata päihderiippuvuutta vakuuttavasti ja suorasti. Se vastaa kysymykseen, arvioidaanko menetelmän avulla päihderiippuvuuteen liittyviä tekijöitä (Sayette ym. 2000). Rakennevaliditeetissa (construct validity) on puolestaan keskeistä menetelmän kyky kuvata päihderiippuvuutta tarkoituksenmukaisesti ja tulkittavasti. Termi kertoo, ovatko päihderiippuvuuden ja menetelmän taustalla olevat mekanismit samanlaisia (Epstein ym. 2006). Rakennevaliditeetti sisältää useita muita validiteettimittareita ja sitä pidetään merkittävänä mittarina mallinnettaessa päihderiippuvuutta eläinkokeiden avulla (Sayette ym. 2000). Ennustevaliditeetti (predictive validity) kuvaa menetelmän kykyä antaa päihderiippuvuuteen liittyen oikeita ennusteita (Epstein ym. 2006). Se arvioi, osaako menetelmä erottaa päihteitä ei-päihdyttävistä aineista ja mahdollisesti luokitella päihteitä niiden aiheuttaman riippuvuuspotentiaalin mukaan.

Päihderiippuvuutta ja päihteiden palkkio-ominaisuuksia voi määrittää esimerkiksi kallonsisäisten itsestimulaatio- sekä itseannostelu- ja paikkaehdollistamiskokeiden avulla (Goudie 1991; Bardo ja Bevins 2000; Tzschentke 2007). Päihdetutkimuksessa arvioidaan usein myös päihteiden aiheuttamaa lokomotoriikan lisääntymistä ja käyttäytymisen herkistymistä, joiden uskotaan mallintavan päihdehakuisuutta (Vezina ja Leyton 2009). Tässä yhteydessä käsitellään tarkemmin lokomotorisen aktiivisuuden herkistymistä sekä ehdollistettua paikkahakuisuutta (conditioned place preference, CPP) päihderiippuvuuden mallintamisessa, koska niitä on käytetty tämän tutkielman kokeellisessa osassa.

### 3.1 Itseannostelu

Itseannostelu (self-administration) on operanttiin ehdollistumiseen perustuva menetelmä, jonka avulla voi arvioida päihderiippuvuutta ja päihteiden ominaisuuksia sekä ihmisillä että koe-eläimillä (Panlilio ja Goldberg 2007; Haney ja Spealman 2008). Menetelmä perustuu olettamukseen, että päihteet toimivat vahvistajina (reinforcer) ja ylläpitävät sekä päihdehakuisuutta että päihteiden käyttämistä motivoivaa käyttäytymistä (Panlilio ja Goldberg 2007). Koe-eläimet opetetaan suorittamaan itseannostelukokeissa tietty tehtävä kuten vivun painaminen saadakseen päihdettä. Päihteet annostellaan tyypillisesti suonensisäisesti, mikä on teknisesti vaativaa ja kallista. Mikäli päihteen annostelu lisää toimintaa, joka johtaa seuraavan päihdeannoksen saamiseen, päihde voidaan tulkita positiiviseksi vahvistajaksi (Di Chiara 1999; Sanchis-Segura ja Spanagel 2006).

Itseannostelukokeet vastaavat muihin päihderiippuvuuden mallintamisessa käytettäviin menetelmiin verrattuna erittäin hyvin luonnollisessa ympäristössä tapahtuvaa päihdekäyttäytymistä (Malanga ja Kosofsky 2003; Panlilio ja Goldberg 2007). Tämän johdosta itseannostelukokeilla on korkean asteen näennäisvaliditeetti ja hyvä rakennevaliditeetti (Malanga ja Kosofsky 2003; Sanchis-Segura ja Spanagel 2006) (Taulukko 1). Menetelmän avulla onkin tutkittu laajasti ihmisten käyttämiä päihteitä sekä hoitokeinoja päihderiippuvuuteen (Haney ja Spealman 2008). Useimmat päihteet, jotka ovat palkitsevia itseannostelukokeissa, aiheuttavat paikkahakuisuutta paikkaehdollistamiskokeissa (Bardo ja Bevins 2000). Tämän perusteella itseannostelu- ja paikkaehdollistamiskokeiden välillä on korrelaatio, vaikka menetelmissä esiintyvien käyttäytymisilmiöiden neuraaliset mekanismit saattavat erota toisistaan.

Taulukko 1. Päihderiippuvuuden mallintamisessa käytettäviä menetelmiä sekä niiden validiteetti eli pätevyys mallintaa päihderiippuvuuteen liittyviä tekijöitä.

| <b>Menetelmä</b>                                 | <b>Validiteetti</b>  | <b>Lähdeviitteet</b>  |
|--|--|---|
| <b>Itseannostelu</b>                             | Korkean asteen näennäisvaliditeetti, hyvä rakennevaliditeetti, hyvä ennustevaliditeetti                  | Spanagel ja Zieglighsberger 1997<br>Malanga ja Kosofsky 2003<br>Sanchis-Segura ja Spanagel 2006<br>Haney ja Spealman 2008 |
| <b>Kallonsisäinen itsestimulaatio</b>            | Näennäisvaliditeetti puuttuu, rakennevaliditeetti osoitettu, ennustevaliditeettia ei osoitettu           | Markou ja Koob 1992<br>Sanchis-Segura ja Spanagel 2006  |
| <b>Ehdollistettu paikkahakuisuus</b>             | Näennäisvaliditeetti puuttuu, hyvä rakennevaliditeetti, kohtalainen ennustevaliditeetti                  | Goudie 1991<br>Bardo ja Bevins 2000<br>Sanchis-Segura ja Spanagel 2006  |
| <b>Lokomotorisen aktiivisuuden herkistyminen</b> | Keskinkertainen näennäisvaliditeetti, kohtalainen rakennevaliditeetti, ennustevaliditeettia ei osoitettu | Wise ja Bozarth 1987<br>Malanga ja Kosofsky 2003<br>Robinson ja Berridge 2003<br>Sanchis-Segura ja Spanagel 2006          |

### 3.2 Kallonsisäinen itsestimulaatio

Kallonsisäinen itsestimulaatio (intracranial self-stimulation, ICSS) on operanttiin ehdollistumiseen perustuva menetelmä, jota voi käyttää jyrksijöillä tutkittaessa farmakologisten käsittelyjen vaikutusta aivojen palkkiojärjestelmään (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006; Carlezon ja Chartoff 2007). Koe-eläimille asennetaan tutkittavalle aivoalueella elektrodit leikkauksen avulla, jonka jälkeen eläimet opetetaan stimuloimaan aivoja esimerkiksi vipua painamalla. Mikäli eläimet stimuloivat aivoaluetta yhä enemmän, alueen voidaan olettaa osallistuvan palkkioon. Lisäksi eläimille voidaan antaa pähteitä ja tutkia, lisääkö päihde itsestimulaatiota (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006). Itsestimulaation lisääntymisen oletetaan heijastavan päihteen palkkio-ominaisuuksia. Päihdetutkimuksessa menetelmän heikkoutena voidaan pitää näennäisvaliditeetin puutetta (Taulukko 1). Joillakin menetelmän sovelluksilla on kuitenkin osoitettu olevan jonkinlainen rakennevaliditeetti päihdetutkimuksessa (Markou ja Koob 1992).



### 3.3 Ehdollistettu paikkahakuisuus

Ehdollistettu paikkahakuisuus on klassiseen ehdollistumiseen perustuva menetelmä, jossa koe-eläin opetetaan yhdistämään päihteen vaikutukset tiettyyn ympäristöön (Bardo ja Bevins 2000; Sanchis-Segura ja Spanagel 2006; Tzschentke 2007). Kokeissa määritetään eläimien päihdehakuista käyttäytymistä ja seurataan alkavatko eläimet suosia enemmän ympäristöä, jossa ovat saaneet päihdettä kuin ympäristöä, jossa ovat saaneet päihteen vaikuttamatonta kantoainetta (vehikkeli) kuten saliniliuosta (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006). Mikäli eläimet pitävät enemmän ympäristöstä, jossa ovat saaneet päihdettä, päihteen voidaan sanoa aiheuttavan ehdollistettua paikkahakuisuutta ja olettaa olevan palkitseva. Viime vuosien aikana CPP-menetelmän käyttö on lisääntynyt ja sitä on sovellettu uusiin käyttötarpeisiin. Ensinnäkin sen avulla on arvioitu päihteen palkkio-ominaisuuksia geneettisesti muunnelluilla eläimillä kuten poistogeenisillä hiirillä (Tzschentke 2007). Toiseksi paikkaehdollistamiskokeita on käytetty laajasti arvioitaessa toleranssin ja herkistymisen kehittymistä päihteen palkkiovaikutuksille. Kolmanneksi kivun aiheuttamia vaikutuksia käyttäytymiseen ja motivaatioon on alettu tutkia CPP-menetelmän avulla. Neljänneksi päihderiippuvuudelle tyypillistä päihdehakuista käyttäytymistä sekä retkahtamisalttiutta on alettu mallintaa paikkaehdollistamiskokeiden avulla soveltamalla mallia paikkahakuisuuden sammumis- (ekstinktio, extinction) sekä retkahduskokeisiin (Itzhak ja Martin 2002). Päihdehakuisten käyttäytymisen jatkuvuutta voidaan tutkia CPP-kokeilla, joissa eläimille annetaan ehdollistamisjakson jälkeen vehikkeliä ja arvioidaan ehdollistumisen sammumista. Paikkahakuisuuden sammumisen jälkeen eläimille voidaan antaa uudestaan päihdettä ja tutkia palaako eläimille uudestaan ehdollistettu paikkahakuisuus. Mikäli eläimillä esiintyy paikkahakuisuutta, niiden voidaan tulkita retkahtavan (reinstatement) päihteseen.

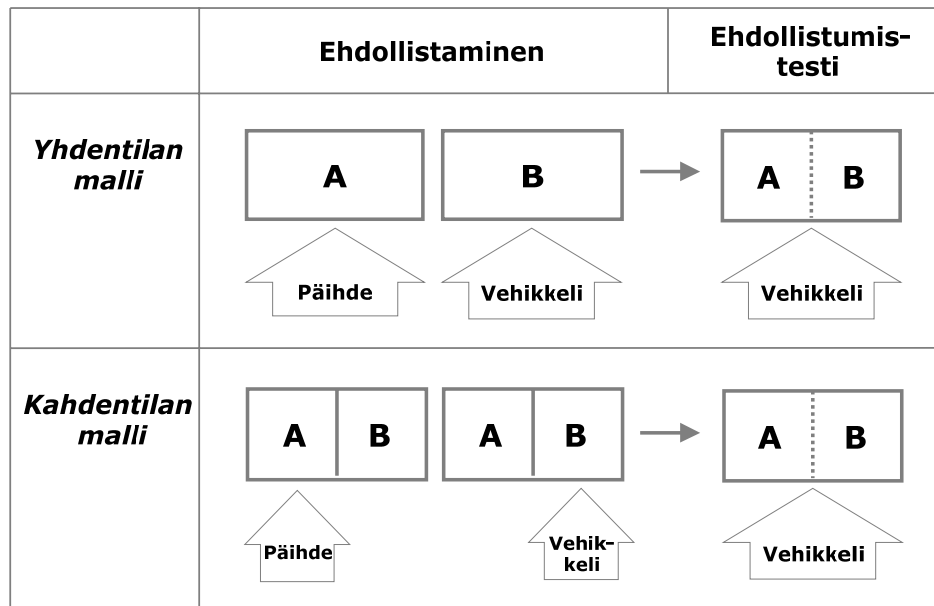
#### 3.3.1 Ehdollistaminen ja ehdollistumisen testaaminen

Tyypillinen paikkaehdollistamiskoe suoritetaan usein kaksipuolisen laatikon avulla. Koe koostuu kolmesta vaiheesta: tutustumisesta ja/tai esitestistä, ehdollistamisjaksosta sekä ehdollistumistestistä (Bardo ja Bevins 2000; Cunningham ym. 2006a; Tzschentke

2007). Ennen varsinaisia kokeita eläimien voidaan antaa tutustua uuteen koeympäristöön, mikä vähentää käsittelyyn ja koeympäristöön liittyvää uutuutta ja stressiä (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006). Mahdollisen esitestin aikana arvioidaan, suosivatko eläimet jompaakumpaa puolta laatikosta, jotka voivat eroavat toisistaan esimerkiksi lattiamateriaalin, seinien värityksen/kuvioinnin tai hajuärsykkeiden mukaan (Cunningham ym. 2006a). Ehdollistamisjakso muodostuu tilallisesti ja ajallisesti erillisistä päihde- ja vehikkeli-altistuksista. Sen aikana koe-eläin saa palkkiota aiheuttavaa päihdettä toistuvasti samalla puolella laatikkoa, jonka seurauksena eläin oppii assosioimaan päihteen vaikutukset kyseiseen ympäristöön. Jakson aikana koe-eläin saa yhtä useasti laatikon toisella puolella vehikkeliä. Ehdollistamisjaksoa seuraa ehdollistumistesti, jonka yhteydessä eläimille annetaan vehikkeliä. Ehdollistumistestissä eläimien annetaan kulkea vapaasti laatikon molempien puolien välillä. Mikäli eläin viettää testissä enemmän aikaa päihteeseen liitettyssä ympäristössä, päihteen voidaan sanoa aiheuttavan ehdollistettua paikkahakuisuutta (Cunningham ym. 2006a; Tzschentke 2007). Jos eläin hakeutuu sen sijaan enemmän vehikkeliin liitettyyn ympäristöön, päihteen voidaan sanoa aiheuttavan ehdollistettua paikka-aversiota eli paikan välttämistä (conditioned place aversion, CPA). Useat päihteen kuten kokaiini, amfetamiini, morfiini ja alkoholi aiheuttavat ehdollistettua paikkahakuisuutta CPP-kokeissa, joten ne voidaan tulkita vaikutuksiltaan palkitseviksi (Bardo ja Bevins 2000).

CPP-kokeista on olemassa monenlaisia variaatioita. Edellä esitettyä koeasetelmaa voidaan kutsua kahdentilan malliksi kaksipuolisen laatikon perusteella (Cunningham ym. 2006b; Tzschentke 2007). Tällöin koe-eläin ehdollistuu sekä päihteeseen liitettyyn tilaan että siellä esiintyviin mahdollisiin muihin vihjeisiin. Cunningham työtovereineen (2006b) on suorittanut kokeita yhdentilan mallin avulla ja arvioinut visuaalisten, kosketeltavien sekä spatiaaliseen sijaintiin perustuvien vihjeiden merkitystä ehdollistumisen syntymiselle. Yhdentilan mallissa kaikki koevaiheet suoritetaan yhtenäisessä laatikossa, jota ei jaeta seinän avulla (Kuva 2). Ehdollistamisjakson aikana koko laatikkoon laitetaan esim. kosketusaistiin perustuva vihje kuten lattiamateriaali, joka on erilainen päihde- ja vehikkeli-altistuksien aikana. Ehdollistumistestissä laatikko jaetaan puoliksi vehikkeliin ja puoliksi päihteeseen liitettyllä vihjeellä. Yhdentilan mallissa koe-eläin ei ehdollistu spatiaaliseen sijaintiin perustuen, vaan koko tilaan

liitettyihin muihin vihjeisiin. Yhdentilan malli voi saada aikaan voimakkaamman ehdollistumisen kuin kahdentilan malli, sillä ehdollistuminen voi heikentyä kahdentilan mallissa eläinten kokiessa spatiaalista uutuutta, kun kulkueste poistetaan laatikon eri tilojen väliltä (Cunningham ym. 2003). Cunninghamin ja työtovereiden (2006b) mukaan visuaaliset vihjeet ovat tehokkaita ehdollisia ärsykeitä CPP-kokeissa, jos ne esitellään jatkuvasti tietyssä paikassa, kuten kahdentilan mallissa tehdään. Sen sijaan kosketusaistiin perustuvat vihjeet assosioituvat hyvin riippumatta niiden sijainnista ja aiheuttavat itsessään voimakkaan paikkaehdollistumisen (Vezina ja Stewart 1987), joka ei voimistu lisäämällä visuaalisia tai spatiaaliseen sijaintiin perustuvia vihjeitä (Cunningham ym. 2006b). Cunninghamin ja työtovereiden kokeet eivät tue käsitystä, jonka mukaan useamman vihjeen samanaikainen käyttö voisi voimistaa ehdollistumisen muodostumista. Sen sijaan koetulokset puoltavat kosketusaistiin perustuvien vihjeiden ja yhdentilan mallin käyttöä CPP-kokeissa.



Kuva 2. Yhden- ja kahdentilan paikkaehdollistamiskokeet sekä niiden välillä esiintyviä samanlaisia ja erilaisia ominaisuuksia. Molemmat mallit sisältävät päihde- ja vehikkeli-altistuksista muodostuvan ehdollistamisjakson. Yllä olevassa yhdentilan mallissa päihde yhdistetään tiettyyn ärsykkeeseen (A), joka on läsnä koko tilassa. Samoin vehikkeli yhdistetään erilaiseen, koko tilassa esiintyvään ärsykkeeseen (B). Alla olevassa kahdentilan mallissa päihde ja vehikkeli liitetään myös erilaisiin ärsykkeisiin (A vs. B). Tässä mallissa koe-eläimet laitetaan sen sijaan ehdollistamisjakson päihde- ja vehikkeli-altistuksien aikana spatiaalisesti erillisiin alueisiin, jotka erotetaan seinällä. Molemmissa malleissa annetaan vehikkeliä ehdollistumistestissä. Yhdentilan mallissa koko tilaan laitetaan testin ajaksi puoliksi päihdeeseen ja puoliksi vehikkeliin liitettyä ärsykettä. Kahdentilan mallissa eläinten annetaan liikkua vapaasti laatikon molempien tilojen välillä testaamisen aikana. Mukailten (Cunningham ym. 2006b).

### 3.3.2 Ekstinktio ja retkahtaminen

CPP-menetelmän käyttäminen paikkahakuisuuden ekstinktio- ja retkahdusmallina on vahvistettu palkkiota aiheuttaville päihdeille kuten kokaiinille (Itzhak ja Martin 2002) ja morfiinille (Popik ym. 2006). Ennen ekstinktio- ja retkahduskokeita koe-eläimet tulee ehdollistaa antamalla palkkiota aiheuttavaa päihdettä ja vehikkeliä erilaisissa ympäristöissä sekä testata ehdollistuminen kuten edellä on esitetty. Ekstinktiokokeen aikana eläimille annetaan yleensä toistuvasti vehikkeliä aiemmin sekä päihdeeseen että vehikkeliin liitettyissä ympäristöissä. Ekstinktiojakson jälkeen testataan, onko ehdollistuminen sammunut antamalla eläimille vehikkeliä ympäristössä, jossa on sekä vehikkeliin että päihdeeseen liitettyjä vihjeitä. Jos eläimet eivät hakeudu enempää

päihteeseen liitettyyn ympäristöön, ehdollistuminen on sammunut. Tämän jälkeen on edelleen mahdollista testata paikkahakuisuuden palaamista ja retkahtamista antamalla eläimille päihdettä ympäristössä, jossa on sekä päihteeseen että vehikkeliin liitettyjä vihjeitä. Mikäli eläimet hakeutuvat enemmän päihteeseen liitettyyn ympäristöön, niiden voidaan tulkita retkahtavan päihteeseen.

CPP-menetelmä on osoittautunut hyväksi ekstinktiomalliksi, sillä paikkahakuisuus päihteille kuten morfiinille (Mueller ym. 2002) ja kokaiinille (Busse ja Riley 2004) häviää toistuvien vehikkelialtistusten myötä. Ribeiro Do Couton ja työtovereiden (2003) tekemissä morfiinin ekstinktiokokeissa paikkahakuisuus sammui 60 ja 15 min mittaisten päivittäisten ekstinktiokokeiden seurauksena 7 ja 9 päivän kuluessa. Näissä ekstinktiokokeissa ei annettu vehikkeliä, vaan eläimet laitettiin suoraan koeympäristöön, jossa oli sekä päihteeseen että vehikkeliin liitettyjä vihjeitä. Mueller työtovereineen (2002) tutki myös morfiinin ekstinktiota testaamalla paikkahakuisuutta kahden tai kuuden viikon välein ensimmäisen paikkahakuisuuskokeen jälkeen. Koe-eläimille ei annettu vehikkeli-injektiota ekstinktiojakson aikana, eikä eläimiä altistettu päihteeseen liitettyyn ympäristöön. Paikkahakuisuus säilyi 12 viikkoa kahden viikon välein testattavilla eläimillä ja oli vallitseva 12 viikon kohdalla myös 6 viikon välein testattavilla eläimillä. Edellä esitettyjen tutkimustulosten perusteella vehikkeli-injektion antaminen sekä koe-eläimien altistaminen päihteeseen liitettyihin vihjeisiin ekstinktiojakson aikana saattavat nopeuttaa ehdollistumisen sammumista päihteeseen.

CPP-menetelmä on myös osoittautunut toimivaksi retkahdusmalliksi. Sekä morfiinin (Mueller ym. 2002; Ribeiro Do Couto ym. 2003) että kokaiinin (Itzhak ja Martin 2002) on todettu aiheuttavan retkahtamista päihteeseen liitettyyn ehdollistamisympäristöön ekstinktiokokeiden jälkeen. CPP-menetelmä on käyttökelpoinen myös retkahdusmallina vertailtaessa päihteitä toisiinsa, sillä esim. metamfetamiini palauttaa paikkahakuisuuden kokaiinilla ehdollistetuille eläimille ekstinktion jälkeen, mitä fensyklidiini (PCP) ei saa aikaan (Itzhak ja Martin 2002). Bussen ja Rileyn (2004) tekemissä kokaiinin CPP-kokeissa ainoastaan kokaiini aiheutti retkahtamisen ekstinktiokokeiden jälkeen, mitä alkoholi ei saanut aikaan. Päihteiden lisäksi sekä sosiaalisen että fyysisen stressin kuten eläinten liikkumisen rajoittamisen ja hännän puristamisen on osoitettu aiheuttavan

retkahtamista morfiiniin CPP-kokeissa morfiinin paikkahakuisuuden sammuttua (Ribeiro Do Couto ym. 2006). Yhteenvedona todettakoon, että CPP-menetelmä on hyödyllinen tutkittaessa retkahtamisalttiutta ja sen kestoa käyttämällä ärsykkeenä stressiä, ehdollisia vihjeitä ja/tai ehdotonta ärsykettä, joka on yleensä päihde.

### 3.3.3 Menetelmän koejärjestelyt sekä heikkoudet ja vahvuudet

CPP-kokeiden ehdollistamisympäristön molemmat alueet tulisi suunnitella niin, etteivät koe-eläimet suosi kumpaakaan ympäristöä, sillä toisen ympäristön suosiminen voi vaikuttaa paikkaehdollistamiskokeiden tuloksiin (Bardo ja Bevins 2000; Cunningham ym. 2003; Sanchis-Segura ja Spanagel 2006; Tzschentke 2007). Mikäli eläimet eivät suosi kumpaakaan ympäristöä, koeasetelmaa voidaan kutsua painottumattomaksi (unbiased) (Cunningham ym. 2006a). Jos eläimet sen sijaan suosivat toista ympäristöä, koeasetelma on painottunut (biased). Painottunut koeasetelma aiheuttaa pulman: antaako päihde suositussa ympäristössä, jonka seurauksena CPP voi heikentyä kattovaikutuksen (ceiling effect) takia; vai ei-suosituksessa ympäristössä, jolloin CPP voi syntyä eläinten aversion vähennyttyä kyseiseen ympäristöön (Bardo ja Bevins 2000). Painottuneen koeasetelman käyttäminen voidaan nähdä myös manipulaatiokeinona, kun yritetään saada mahdollisimman suuri ehdollistuminen esiin (Cunningham ym. 2003). Paikkaehdollistamiskokeiden tulosten luotettavuutta voidaan parantaa koeympäristön suunnittelun lisäksi tasapainottamalla (counterbalance) koejärjestelyjä kokeeseen osallistuvan eläinryhmän osalta. Tämä on erityisen tärkeää, mikäli on kyseessä painottunut koeasetelma. Tasapainotuksella tarkoitetaan esimerkiksi eläimien jakamista ryhmiin niin, että samaa sukupuolta tai genotyyppiä esiintyy tasapuolisesti kaikissa ryhmissä, jotka voivat erota mm. käsittelyn tai ehdollistamisympäristön mukaan. Kaiken kaikkiaan paikkaehdollistamiskokeita voidaan helpottaa käyttämällä painottumatonta koeasetelmaa ja tasapainottamalla koejärjestelyjä (Cunningham ym. 2003). Tällöin on mahdollista poistaa kontrolliryhmä, sillä tulokset voidaan analysoida vertaamalla keskenään tasapainotettuja eläinryhmiä, jotka ehdollistetaan eri ympäristöihin saman päihteen avulla.

CPP-menetelmällä on monia vahvuuksia päihdetutkimuksessa. Ensinnäkin menetelmällä on hyvä rakennevaliditeetti päihdetutkimuksessa (Goudie 1991; Malanga ja Kosofsky 2003; Tzschentke 2007) (Taulukko 1). Toiseksi menetelmä on suhteellisen yksinkertainen, eikä se vaadi kirurgisia toimenpiteitä kuten itseannostelukokeet (Bardo ja Bevins 2000). Kolmanneksi sen avulla voidaan arvioida päihteiden aiheuttamaa palkkiota ja aversiota useilla eläinlajeilla. Neljänneksi menetelmän etuna voidaan pitää myös sen soveltuvuutta samanaikaiselle liikeaktiivisuuden ja paikkahakuisuuden määrittämiselle. Lisäksi eläimet testataan ehdollistamisjakson jälkeen päihteettömässä tilassa, jolloin päihteiden vaikutukset esim. liikeaktiivisuuteen eivät häiritse tulosten arviointia (Vezina ja Stewart 1987). CPP-menetelmällä on myös omat heikkoutensa. Ensinnäkin menetelmästä on olemassa useita variaatioita, joten eri tutkimustulosten vertaileminen on haastavaa (Tzschentke 2007). Toiseksi farmakologisen annosvaste-käyrän muodostaminen on hankalaa verrattuna itseannostelukokeisiin (Bardo ja Bevins 2000). Kolmanneksi paikkaehdollistamiskokeissa kokeen suorittaja antaa koe-eläimille päihteen, jolloin menetelmä ei vastaa ihmisten päihdekäyttöä ja siltä puuttuu näennäisvaliditeetti (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006) (Taulukko 1). Menetelmä on myös altis ns. uutuushakuisuudelle (novelty seeking) ehdollistumistestissä, sillä päihteen vaikutusten assosioituminen tiettyyn ympäristöön ehdollistamisjakson aikana voi hidastaa tai estää tutustumista tähän ympäristöön (Bardo ja Bevins 2000).

### 3.4 Lokomotorisen aktiivisuuden herkistyminen

Lokomotorisella aktiivisuudella tarkoitetaan koe-eläimien liikeaktiivisuutta ja eläinten kulkemaa matkaa tiettyinä aikoina. Päihdetutkimuksessa arvioidaan lokomotorista aktiivisuutta, koska liikeaktiivisuus välittyy ainakin osittain samojen hermojärjestelmien kautta kuin palkkiovaikutukset (Wise ja Bozarth 1987; Robinson ja Berridge 2003). Palkkiovaikutusten kannalta ovat keskeisessä asemassa ventraaliselta tegmentaaliselta alueelta nucleus accumbensin menevät dopaminergiset projektiot. Lisäksi toistuvat päihdealtistukset voivat herkistää sekä lokomotorisia että päihteiden käyttöä motivoivia vaikutuksia (Vezina ja Leyton 2009). Lokomotorista aktiivisuutta mittaamalla voidaan arvioida päihteiden aiheuttamaa käyttäytymisen herkistymistä ja herkistymisen pysyvyyttä koe-eläimillä. Lokomotorista aktiivisuutta arvioidaan usein

paikkaehdollistamiskokeiden yhteydessä, jolloin voidaan tutkia mahdollisia korrelaatioita lokomotorisen herkistymisen ja CPP:n kehittymisen välillä (Tzschentke 2007). Lokomotorisen herkistymisen uskotaan mallintavan suhteellisen hyvin joitakin addiktioon liittyviä tekijöitä kuten päihdehakuista käyttäytymistä ja päihteisiin retkahtamista (Malanga ja Kosofsky 2003; Vezina ja Leyton 2009), sillä ihmisilläkin on havaittu psykomotorisien vaikutuksien herkistymistä päihteiden käytön seurauksena (Robinson ja Berridge 2003). Tämän perusteella päihteiden annon yhteydessä arvioitavalla lokomotorisen aktiivisuuden herkistymisellä on keskinkertainen näennäisvaliditeetti ja mahdollisesti kohtalainen rakennevaliditeetti perustuen samoihin hermojärjestelmiin liikeaktiivisuuden ja palkkion taustalla (Taulukko 1).

Toistuva päihteiden annostelu lisää yleensä asteittain lokomotorista aktiivisuutta (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006). Monet asiat voivat kuitenkin vaikuttaa lokomotorisen aktiivisuuden voimakkuuteen. Annostuksella voi olla merkitystä päihteestä riippuen, sillä esimerkiksi morfiini lisää lokomotorista aktiivisuutta pienemmillä annoksilla, mutta suuremmat annokset voivat ensin lamata aktiivisuutta ja myöhemmin lisätä sitä (Babbini ja Davis 1972). Päihteet aiheuttavat lokomotorista herkistymistä erityisesti silloin, kun päihde annostellaan väliajoin toistuvasti ja nopean päihteiden annostelun kuten intraperitoneaalisen (i.p.) tai intravenoosin (i.v.) injisoinnin avulla (Vezina ja Leyton 2009). Herkistyminen on voimakkaampaa, mikäli päihdettä annostellaan nousevin annoksin (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006). Herkistymisen kannalta on edelleen oleellista, missä ympäristössä koe-eläin on, sillä eläin voi assosioida päihteiden ja koeympäristön, missä päihde on annosteltu. Tämän seurauksena lokomotorinen herkistyminen saattaa olla voimakkaampaa koeympäristössä kuin esimerkiksi kotihäkissä. Lisäksi lokomotorisen herkistymisen kuten addiktionkin kehittämisessä voi esiintyä eroja yksilöiden välillä niin ihmisillä kuin koe-eläimillä (Robinson ja Berridge 2003).



## 4 GLUTAMAATTI

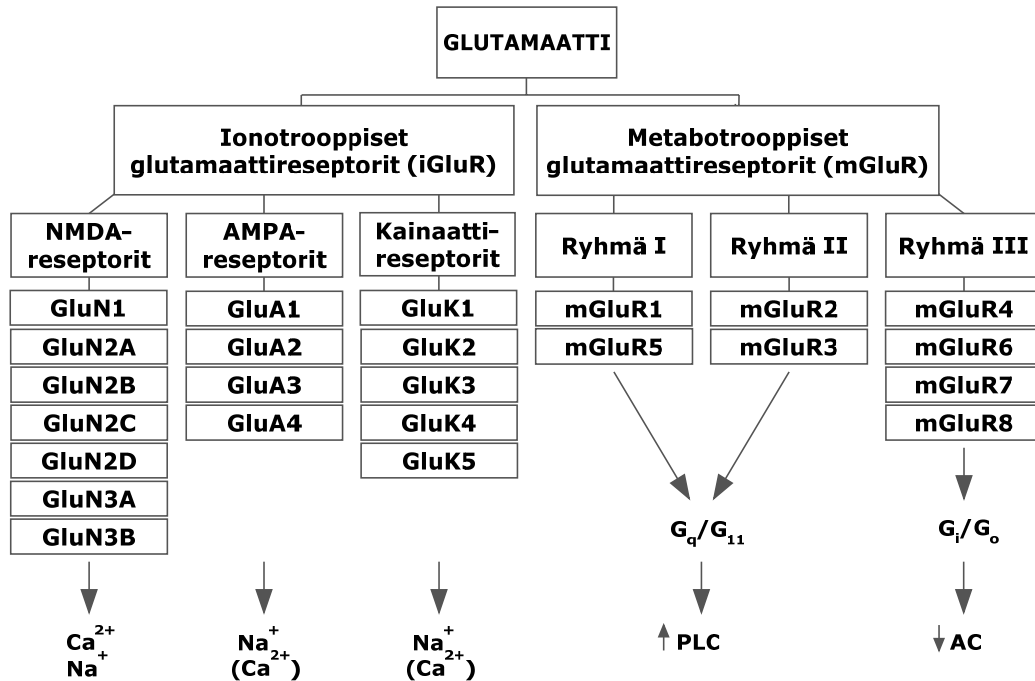
Glutamaatti on yleisin eksitoiva eli kiihottava aminohappovälittäjäaine keskushermostossa (Meldrum 2000; Kew ja Kemp 2005). Glutaminaasi-entsyymi syntetisoi sitä glutamiinista hermopäätteissä (Cooper ym. 2003). Glutamaatti varastoituu presynaptisessa hermopäätteessä vesikkeleihin, mistä se vapautuu kalsiumin säätelemän eksosytoosin avulla synapsirakoon. Glutamaatti sitoutuu synapsiraossa glutamaattireseptoreihin ja sen vaikutukset päättyvät glutamaatin takaisinkuljetuksella presynaptiseen hermopäätteeseen ja gliasoluihin, mikä tapahtuu erityisten glutamaatin kuljettajaproteiinien avulla. Gliasoluista glutamaatti kulkeutuu myöhemmin presynaptiseen hermopäätteeseen.

Glutamaatti osallistuu moniin normaaleihin fysiologisiin ja patofysiologisiin tapahtumiin kuten hermoston kehitykseen, neurokognitiivisiin toimintoihin (esim. oppiminen ja muisti), muiden hermovälittäjäainejärjestelmien säätelyyn sekä neuronien degeneraatioon eli tuhoutumiseen (Meldrum 2000; Howland 2007). Monet sairaudet liittyvät jollain tavalla glutamaattijärjestelmään. Tällaisia ovat mm. mieliala- ja ahdistussairaudet, päihderiippuvuus sekä monet neurodegeneratiiviset sairaudet kuten Alzheimerin tauti (Meldrum 2000). Glutamaatin keskeinen rooli kliinisessä neurologiassa johtuu osaltaan välittäjäaineen neurotoksisuudesta. Glutamaatin liiallinen vapautuminen voi johtaa tilaan, jota kutsutaan eksitotoksisuudeksi (Arundine ja Tymianski 2003). Tällöin glutamaattireseptorit aktivoituvat voimakkaasti aiheuttaen solujen turpoamista ja kuolemaa. Erityisesti ionotrooppiset glutamaattireseptorit välittävät neurotoksisuutta.

### 4.1 Glutamaattireseptorit

Glutamaattireseptorit jaetaan ionotrooppisiin (iGluR) ja metabotrooppisiin reseptoreihin (mGluR) (Kew ja Kemp 2005; Guo ym. 2009) (Kuva 3). Ionotrooppiset reseptorit ovat neljästä alayksiköstä koostuvia tetrameerisiä kationikanavia, joiden aktivaatio depolarisoi postsynaptisen kalvon (Kew ja Kemp 2005). NMDA- (N-metyyli-D-aspartaatti), AMPA- ( $\alpha$ -amino-3-hydroksi-5-metyyli-isoksatsoli-4-propionihappo) ja

kainaattireseptorit kuuluvat ionotrooppisiin reseptoreihin, joissa glutamaatti toimii endogeenisena välittäjäaineena. Metabotrooppiset glutamaattireseptorit ovat puolestaan G-proteiinikytkentäisiä reseptoreita. Tähän mennessä on tunnistettu kahdeksan erilaista metabotrooppista glutamaattireseptoria (mGluR1-mGluR8).



Kuva 3. Ionotrooppiset (iGluR) ja metabotrooppiset (mGluR) glutamaattireseptorit, niiden alatyypit sekä pääasialliset signaalinvälitysmekanismit. Ionotrooppiset glutamaattireseptorit läpäisevät kationeja ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ ). Metabotrooppiset glutamaattireseptorit kytkeytyvät sen sijaan G-proteiinien ( $\text{G}_q/\text{G}_{11}/\text{G}_i/\text{G}_o$ ) avulla toisiolähtetimekanismeihin (fosfolipaasi-C, PLC; adenyylaattisyklaasi, AC). Mukaillen (Bleakman ja Lodge 1998; Kew ja Kemp 2005; Collingridge ym. 2009).

#### 4.1.1 NMDA-reseptorit

Ionotrooppinen NMDA-reseptori on rakenteeltaan heterotetrameeri koostuen kahdesta GluN1- ja kahdesta GluN2- tai GluN3- alayksiköstä (Blaise ym. 2004; Stoll ym. 2007). Reseptorilla on 7 erilaista alayksikköä, jotka nimetään seuraavasti: GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A ja GluN3B (Collingridge ym. 2009) (Kuva 3). NMDA-reseptorit esiintyvät laajasti keskushermoston alueella (Cooper ym. 2003). Erityisen paljon niitä on hippokampuksen ja isoivokuoren alueilla. NMDA-reseptorit läpäisevät kalsium- ja natriumioneja. Kalsiumioneja läpäisevinä reseptoreina ne ovat

merkittäviä eksitatorisen synaptisen transmission moduloijia, koska niillä on kyky aktivoida kalsiumriippuvaisia solunsisäisiä signaalireittejä (Lee ym. 2003).

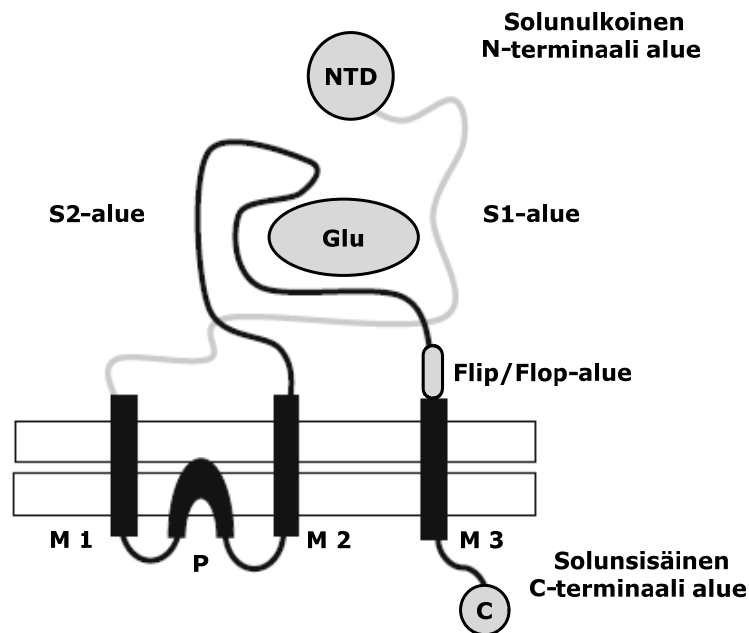
NMDA-reseptori on merkittävä keskushermoston neuronalisessa kehityksessä, toiminnassa ja degeneraatiossa (Blaise ym. 2004). Sen toiminta liittyy glutamaatin eksitotoksiisiin vaikutuksiin ja sillä on keskeinen rooli epilepsian patogeneesissa, iskemiaan liittyvässä neurodegeneraatiossa ja kivussa (Cooper ym. 2003; Lodge 2009). Lisäksi NMDA-reseptorilla on tärkeä tehtävä muistin ja oppimisen biokemiassa. Reseptorin jänniteriippuvainen magnesiumblokki ja suuri kalsiumpermeabiliteetti ovat merkittäviä muistin ja oppimisen taustalla olevissa tapahtumissa: synaptisen toiminnan pitkäkestoisessa vahvistumisessa (long-term potentiation, LTP) ja -heikkenemisessä (long-term depression, LTD) (Blaise ym. 2004). NMDA-reseptorit sisältävät paljon erilaisia sitoutumiskohtia, joiden kautta on mahdollista muuttaa reseptorin aktiivisuutta. Reseptori vaatii aktivoituaakseen glutamaatin lisäksi glysiinin sitoutumisen (Cooper ym. 2003). Reseptorin glysiiniä sitova kohta on osoittautunut kiinnostavaksi epilepsian ja iskemian lääkekehityksen kannalta.

#### 4.1.2 AMPA-reseptorit

Tetrameeriset AMPA-reseptorit muodostuvat neljän eri alayksikön, GluA1-GluA4, yhdistelmästä (Keinanen ym. 1990; Brecht ja Nicoll 2003) (Kuva 3). Ne esiintyvät laajasti eri aivoalueilla ja välittävät suurimman osan nopeasta eksitatorisesta synaptisesta transmissiosta keskushermostossa (Keinanen ym. 1990). Reseptorin aktivoituessa solun sisälle virtaa erityisesti natrium-, mutta myös kalsiumioneja. GluA2-alayksikkö on merkittävä AMPA-reseptorien kalsiumläpäisevyyden kannalta. Ne AMPA-reseptorit, jotka eivät sisällä GluA2-alayksikköä, läpäisevät hyvin kalsiumia (Arundine ja Tymianski 2003).

AMPA-reseptorin alayksikköjen koostumus vaihtelee paikallisesti riippuen reseptorin toiminnasta keskushermostossa (Keinanen ym. 1990; Collingridge ym. 2009). Useimmat AMPA-reseptorit aikuisen hippokampuksessa ja aivokuorella muodostuvat GluA1/GluA2- ja GluA2/GluA3-alayksiköistä (Bassani ym. 2009). Alayksiköt

koostuvat noin 900 aminohaposta ja ovat rakenteeltaan 60 – 70 % samankaltaisia (Keinanen ym. 1990). Tyypillinen AMPA-reseptorin alayksikkö muodostuu aminopäästä (NTD), ligandia sitovasta alueesta (S1 ja S2), kolmesta kalvoa läpäisevästä alueesta (M1, M2 ja M3), yhdestä sytoplasmaan uudelleen menevästä silmukasta (P) sekä solunsisäisen alueen karboksyyliipäästä (CTD, C) (Dingledine ym. 1999; Bassani ym. 2009) (Kuva 4). Alayksiköt eroavat toisistaan karboksyyliipään rakenteellaan. Karboksyyliipää on oleellinen reseptorin toiminnan säätelyn kannalta ja se määrittelee, minkä proteiinien kanssa reseptori on vuorovaikutuksessa (Bredt ja Nicoll 2003). Kaikki alayksiköt voivat esiintyä lisäksi kahdessa eri molekyyli muodossa joko Flip- tai Flop-variantteina (splice variant) (Bassani ym. 2009). Flip/Flop-alue sijaitsee ennen M3:sta karboksyyliipään suuntaan mentäessä. Flip/Flop-alueen silmukointi (splicing) vaikuttaa reseptorikanavan farmakologisiin ja kineettisiin ominaisuuksiin kuten nopeuteen, millä reseptori epäherkistyy (desensitize). Flop-variantti, jonka ilmentyminen lisääntyy kehittyvissä aivoissa, epäherkistyy yleensä nopeammin glutamaatille (Mosbacher ym. 1994).



Kuva 4. AMPA-reseptorin alayksikön tyypillinen rakenne. Alayksiköt koostuvat aminopäästä (NTD), ligandia sitovasta alueesta (S1 ja S2), kolmesta kalvoa läpäisevästä alueesta (M1, M2 ja M3), yhdestä sytoplasmaan uudelleen menevästä silmukasta (P) sekä solunsisäisen alueen karboksyyliipäästä (C). Alayksiköt esiintyvät Flip- tai Flop-variantteina (Flip/Flop-alue). Mukaillen (Bredt ja Nicoll 2003; Kew ja Kemp 2005).

AMPA-reseptorien esiintyminen synapsin solukalvolla vaihtelee (Bredt ja Nicoll 2003). Monet proteiinit säätelevät niiden siirtymistä synapsin solukalvolle ja pois sieltä. Lisäksi neuronaalinen aktiivisuus kontrolloi synaptisten AMPA-reseptorien liikkumista. Tällaiset dynaamiset prosessit ovat edellytyksenä synaptisen plastisuuden (hermosoluyhteyksien muovautuvuus) muodostumiselle ja niiden uskotaan olevan muistin ja oppimisen taustalla. Karboksyyliipään rakenteeltaan ns. pitkän hännän omaavat GluA1- ja GluA4-alayksiköt vaativat synapsin aktivoitumisen ja proteiinien fosforyloitumisen kulkeutuakseen hermopäätteen solukalvolle. Sen sijaan AMPA-reseptorit, jotka koostuvat lyhythäntäisistä GluA2- ja GluA3-alayksiköistä, kulkeutuvat konstitutiivisesti hermopäätteen solukalvolle ja pois sieltä.

AMPA-reseptorin GluA1-alayksikkö on merkittävä muistin ja oppimisen taustalla olevissa synaptisen plastisuuden muutoksissa LTP:ssä ja LTD:ssä (Andrásfalvy ym. 2003; Jensen ym. 2003; Lee ym. 2003; Kauer ja Malenka 2007; Frey 2009). LTP:n induktio vaatii NMDA-reseptorin aktivoitumisen ja kalsiumpitoisuuden nousun hermosolun viejähaarakkeessa (Kauer ja Malenka 2007). LTP saa alkunsa, kun glutamaatti sitoutuu postsynaptisiin AMPA- ja NMDA-reseptoreihin. AMPA-reseptorin depolarisoitumisen seurauksena NMDA-reseptorista poistuu Mg-blokki, jolloin NMDA-reseptori aktivoituu ja läpäisee natriumia sekä kalsiumia. Kalsium aktivoi kalsium/kalmoduliini kinaasi II:n (CaMKII), mikä on välttämätöntä LTP:n muodostumiselle (Bredt ja Nicoll 2003). CaMKII lisää AMPA-reseptorien toimintaa kahdella tavalla: fosforyloimalla suoraan reseptorin alayksikköjä sekä lisäämällä AMPA-reseptorien kulkeutumista solukalvolle. Leen ja työtovereiden (2003) mukaan GluA1-alayksikön fosforyloituminen on välttämätöntä muistin ja oppimisen taustalla olevien muutosten aikaansaamiseksi.

Hippokampuksen uskotaan olevan tärkeä spatiaaliselle (tilaa koskeva) muistamiselle (Zamanillo ym. 1999; Romberg ym. 2009). Hippokampuksen CA1-alueen pyramidaalisolujen AMPA-reseptorit koostuvat pääasiassa GluA1- ja GluA2-alayksiköistä. Viimeaikaisten tutkimusten perusteella GluA2-alayksikkö osallistuu LTP:n muodostumiseen hippokampuksen CA3-CA1-alueen synapseissa (Romberg ym. 2009). Hippokampuksen CA3-CA1-alueen synapsien LTP käsittää nopeasti

heikkenevän GluA1-riippuvaisen vahvistumisen ja kauemmin kestävän vahvistumisen, jota säätelevät mm. GluA2:n ilmentymistä kontrolloivat entsyymit proteiinikinaasi-C (PKC) ja hermostollinen typpioksidisyntetaasi (nNOS). Hippokampus-riippuvaista spatiaalista muistia on olemassa kahdenlaista (Romberg ym. 2009; Sanderson ym. 2009). GluA1-alayksikkö on välttämätön spatiaalisen työmuistin (lyhytkestoinen muisti) muodostumiselle. Sen sijaan tehtävät, jotka vaativat vähitellen omaksuttavaa spatiaalista säilömuistia (pitkäkestoinen muisti), ovat riippumattomia GluA1-alayksiköstä (Zamanillo ym. 1999; Reisel ym. 2002).

#### 4.1.3 Kainaattireseptorit

Ionotrooppisella kainaattireseptorilla (KAR) on viisi alayksikköä: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 ja GluK5 (Kew ja Kemp 2005; Collingridge ym. 2009; Jane ym. 2009) (Kuva 3). Kainaattireseptoreja esiintyy runsaasti keskushermostossa (Jane ym. 2009). Niiden toiminnan tutkimista on hidastanut puute selektiivisistä reseptorin alayksikköjen antagonisteista ja agonisteista. Erityiseksi ongelmaksi on muodostunut kainaattireseptoriagonistit, mukaan lukien kainaatti, jotka sitoutuvat sekä AMPA- että KAR-reseptoreihin. Farmakologisten tutkimusten perusteella kainaattireseptorien on osoitettu säätelevän sekä eksitatorista että inhibitorista synaptista transmissiota. Ne voivat käynnistää LTP:n tai LTD:n syntymisen sekä vaikuttaa synaptiseen plastisuuteen ja neuronien kehitykseen. Niiden tiedetään osallistuvan myös muistin ja oppimisen muodostumiseen. GluK1-antagonisteilla tehdyissä eläinkokeissa on havaittu positiivista aktiivisuutta kivun, migreenin, ahdistuneisuuden sekä epilepsian ja halvauksien eläinmalleissa.

#### 4.1.4 Metabotrooppiset glutamaattireseptorit

Metabotrooppiset glutamaattireseptorit (mGluR) jaetaan rakenteen, farmakologian ja toisiolähettikytkentöjen perusteella kolmeen alaryhmään: ryhmä I (mGluR1 ja 5), ryhmä II (mGluR2 ja 3) ja ryhmä III (mGluR4, 6, 7 ja 8) (Kew ja Kemp 2005) (Kuva 3). Ne säätelevät neuronien eksitaatiota sekä synaptista transmissiota ja plastisuutta. mGluR-välitteinen signaalointi tapahtuu aktivoimalla solunsisäisiä toisiolähettireittejä

G-proteiinien välityksellä. Ryhmä I kytkeytyy lähinnä  $G_q/G_{11}$  kautta fosfolipaasi C:hen (PLC). Ryhmät II ja III inhiboivat puolestaan adenyylaattisykloaasia (AC)  $G_i/G_o$  välitteisesti.

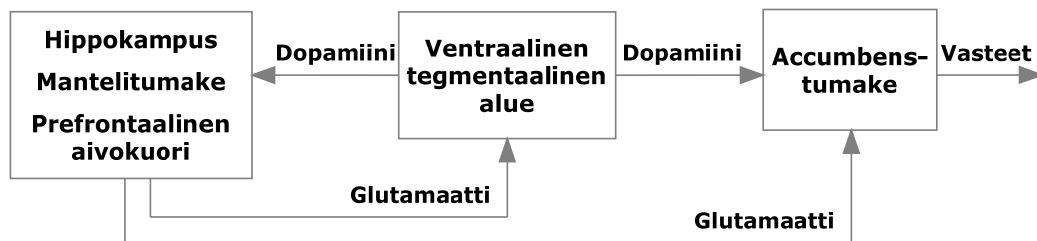
Metabotrooppisia glutamaattireseptoreja esiintyy keskushermostossa sekä neuroneissa että gliasoluissa (Kew ja Kemp 2005). Ryhmän I reseptorit esiintyvät tyypillisesti postsynaptisesti. Ryhmän II reseptoreja esiintyy sen sijaan sekä pre- että postsynaptisesti. Ryhmän III reseptorit sijaitsevat yleensä presynaptisesti. Selektiivisten ligandien löytäminen reseptorin alatyypeille on mahdollistanut mGluR:n arvioimisen lääkekehityksen kannalta. mGluR2-agonistit ovat kiinnostavia ahdistuksen hoidossa. mGluR1-antagonisteja tutkitaan kivun hoidossa ja mGluR5-antagonisteja kehitettäessä lääkkeitä ahdistukseen, kipuun ja lääkkeiden väärinkäyttöön.

#### 4.2 Glutamaterginen hermojärjestelmä ja päihderiippuvuus

Toistuva päihteiden käyttäminen aiheuttaa pitkäaikaisia muutoksia aivoissa. Aivomuutokset sekä muut päihteiden käyttöön liittyvät asiat eivät häviä katkaisuhoidon myötä, vaan altistavat uudelleen päihteen käyttämiseen. Dopaminergisen hermotuksen muutokset erityisesti aivojen etuosan accumbens-tumakkeen (NAc) alueella ovat merkittäviä päihderiippuvuuden kehittymisessä (Koob ja Le Moal 2001). Dopamiinin lisäksi esimerkiksi serotoniinilla (5-HT), gamma-aminovoihapolla (GABA), opioidipeptideillä ja glutamaatilla on oma merkityksensä riippuvuuden kannalta. Päihderiippuvuus on myös oppimisprosessi. Monet muistiin ja oppimiseen liittyvät mekanismit kuten LTP ovat tärkeitä riippuvuuden kehittymisessä (Nestler 2001).

Glutamaterginen hermovälityksen merkitys päihderiippuvuuden kehittymisessä ja ylläpidossa on keskeinen (Tzschentke ja Schmidt 2003; Guo ym. 2009). Glutamaatti on vuorovaikutuksessa muiden neurotransmitterien, erityisesti dopamiinin, kanssa riippuvuuden taustalla olevissa tapahtumissa (Tzschentke ja Schmidt 2003). Sen pääasiallinen merkitys riippuvuudessa on säädellä joko suoraan tai välillisesti dopaminergisen järjestelmän aktiivisuutta. Päihteiden aiheuttamassa palkkiossa merkittävä mesokortikolimbainen dopamiinirata, joka muodostuu VTA:sta (ventraalinen

tegmentaalinen alue) limbiselle aivokuorelle nousevista mesokortikaalisista ja limbisille alueille menevistä mesolimbisistä radoista, on monimutkaisesti yhteydessä glutamatergisiin rakenteisiin (Koob ja Le Moal 2001). Sekä VTA että NAc vastaanottavat runsaasti glutamatergisiä projektioita useista kortikolimbisistä rakenteista kuten prefrontaalisesta aivokuoresta (PFC), mantelitumakkeesta (amygdala) ja hippokampuksesta (Tzschentke ja Schmidt 2003) (Kuva 5). Glutamaatin ja dopamiinin väliset vuorovaikutukset VTA:n ja NAc:n alueilla voidaan yksinkertaistaa seuraavasti. Glutamatergiset projektiot VTA:han lisäävät dopaminergisten solujen aktiivisuutta ja voimistavat dopamiinin vapautumista NAc:sta. Lisäksi glutamaatti muuttaa dopaminergistä transmissiota NAc:ssa, missä sen uskotaan lisäävän dopamiinin vapautumista AMPA-reseptorivälitteisesti. Lopulta NAc yhdistää kortikaalisista rakenteista ja VTA:sta tulleen tiedon motorisiksi ja käyttäytymismuutoksiksi (Malanga ja Kosofsky 2003).



Kuva 5. Yksinkertaistettu esitys glutamaatin ja dopamiinin välisistä vuorovaikutuksista ventraalisen tegmentaalin alueen (VTA) ja accumbens-tumakkeen (NAc) ympäristössä. VTA ja NAc vastaanottavat runsaasti glutamatergisiä projektioita useista kortikolimbisistä rakenteista kuten prefrontaalisesta aivokuoresta, mantelitumakkeesta ja hippokampuksesta. Glutamatergiset projektiot VTA:han lisäävät dopaminergisten solujen aktiivisuutta ja voimistavat dopamiinin vapautumista NAc:sta. Lisäksi glutamaatti muuttaa dopaminergistä transmissiota NAc:ssa, missä sen uskotaan lisäävän dopamiinin vapautumista AMPA-reseptorivälitteisesti. Vasteet = dopaminergiset vasteet NAc:ssa. Mukailten (Tzschentke ja Schmidt 2003).

Päihteiden käyttöön liittyy sekä akuutteja että pidempikestoisia vaikutuksia. Toistuva päihteiden käyttö altistaa päihdehakukselle käyttäytymiselle (Tzschentke ja Schmidt 2003; Kalivas 2009). Samalla ympäristön ärsykkeiden merkitys käyttäytymisen säätelijänä vähenee. Päihdehauksien käyttäytymisen ja retkahtamisen voivat laukaista pitkänkin raittiin kauden jälkeen esimerkiksi stressi, päihteiden käyttöön liittyvät ehdollistuneet ärsykkeet sekä päihdeelle altistuminen (Koob ja Le Moal 2006b; Aguilar



ym. 2009). Glutamaterginen projektiio PFC:sta accumbens-tumakkeeseen on merkittävä päihdehakuksen käyttäytymisen ja retkahtamisen säätelyssä (Kalivas 2009). Toistuvan päihteen käytön seurauksena PFC:n säätely heikkenee. Päihdehakuksen käyttäytymisen epäonnistuneeseen kontrollointiin liittyy pitkäaikainen epätasapaino synaptisen ja ei-synaptisen glutamaatin välillä NAc:ssa (NAc:n glutamaatin homeostaasi). Epätasapaino accumbens-tumakkeen glutamaatin homeostaasissa aiheuttaa muutoksia neuroplastisuuteen, jolloin tiedonvälitys PFC:n ja accumbens-tumakkeen välillä heikkenee. Tällaisia muutoksia ovat mm. vähentyneestä NAc:n kystiini-glutamaattivaihtajan (säätlee glutamaatin solunulkoisia pitoisuuksia) toiminnasta johtuvat pitkittyneesti alhaiset glutamaatin basaalitasot (Koob ja Le Moal 2006b; Kalivas 2009). Alhaiset glutamaatin solunulkoiset pitoisuudet vähentävät edelleen tonusta presynaptisissa mGluR2/3-reseptoreissa helpottaen glutamaatin vapautumista synapsissa. Lisäksi AMPA-reseptoreiden määrä lisääntyy (up-regulation). Edellä esitetyt tutkimustulokset pohjautuvat pääasiassa kokaiinilla tehtyihin eläinkokeisiin, eikä niitä voida yleistää kaikille päihteille. Glutamaatilla uskotaan kuitenkin olevan merkittävä tehtävä päihdehakuksessa käyttäytymisessä ja retkahtamisessa (Tzschentke ja Schmidt 2003; Aguilar ym. 2009).

#### 4.3 Glutamaterginen AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön suhteen poistogeeniset hiiret

C57BL/6J hiirikannan glutamaterginen AMPA-reseptorin GluA1-poistogeeniset (GluA1<sup>-/-</sup>) hiiret on luotu poistamalla *Gria1*-geeni (Zamanillo ym. 1999), minkä johdosta hiirien AMPA-reseptoreissa ei esiinny GluA1-alayksikköä. GluA1-alayksikön inaktivoitumista on tutkittu immunohistokemian avulla GluA1<sup>-/-</sup> hiirien koronaalitasoon tehdyistä aivoleikkeistä. GluA1-alayksikön poistaminen vaikutti voimakkaimmin hippokampuksen ja amygdalan AMPA-reseptoreihin (Zamanillo ym. 1999), missä GluA1-alayksikön esiintyminen on runsasta (Molnar ym. 1993). Zamanillo työtovereineen (1999) on määrittänyt edelleen hippokampuksesta glutamaattireseptorin alayksikköjen pitoisuuksia GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä. Muiden AMPA- (GluA2, GluA3 ja GluA4) ja NMDA-alayksikköjen (GluN1 sekä GluN2A, -B ja -C) määrät eivät olleet muuttuneet GluA1-alayksikön poistamisen seurauksena GluA1<sup>-/-</sup>

hiirillä villityypin hiiriin verrattuna. GluA2-alayksikön jakautuminen oli kuitenkin muuttunut hippokampuksessa villityypin hiiriin verrattuna.

GluA1-/- hiirien peruskäyttäytyminen ei juuri eroa villityypistä (Vekovischeva ym. 2004). Konfliktihakuinen (agonistinen) käyttäytyminen on ollut vähäisempää GluA1-/- hiirillä villityypin hiiriin verrattuna, kun on arvioitu eristettyjen hiirien käyttäytymistä yhdistettäessä ne toisien hiirien kanssa. Agonistista käyttäytymistä on analysoitu myös GluA1-/- ja villityypin urosten kohtaamisilla, joissa villityypin uros dominoi. GluA1-/- hiiret osoittavat joko puolustuskäyttäytymistä tai ei muutosta käyttäytymisessä villityypin hiirien hyökkäyksille.

#### 4.3.1 Kognitiiviset ja motoriset ominaisuudet GluA1-poistogeenisillä hiirillä

GluA1-/- hiirillä on heikentynyt spatiaalinen työmuisti, mikä on osoitettu useiden testien kuten T-sokkelon avulla (Bannerman ym. 2004; Frey 2009; ks. lisää spatiaalisesta muistista kappaleesta 4.1.2). Sen sijaan spatiaalinen säilömuisti on samanlainen kuin villityypin hiirillä. GluA1-/- hiirien heikentyneen työmuistin voidaan olettaa johtuvan hippokampuksen CA3-CA1 synapsien LTP:ssä esiintyvistä puutteista (Zamanillo ym. 1999). AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön fosforyloitumisessa tapahtuu muutoksia LTP:n ja LTD:n aikana (Lee ym. 2003). Hiirillä, joilta oli poistettu GluA1-alayksiköstä kaksi fosforylaatiokohtaa, esiintyi vähemmän synaptista plastisuutta. Niillä ei esiintynyt LTD:tä ja LTP oli vähentynyt hippokampuksen CA1-alueella. Sen lisäksi näillä hiirillä säilyi huonommin mielessä spatiaalista muistia vaativat tehtävät Morrisin vesisokkelokokeessa. Leen ja työtovereiden mukaan AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön fosforyloituminen on ratkaiseva tekijä NMDA-reseptori riippuvaisen LTP:n ja LTD:n ilmentymiselle sekä spatiaalista muistia vaativien tehtävien mielessä pitämiseksi.

GluA1-/- hiiret liikkuvat enemmän kuin villityypin hiiret, kun ne laitetaan uuteen ympäristöön (Vekovischeva ym. 2001; Cowen ym. 2003; Bannerman ym. 2004; Wiedholz ym. 2008). Motorista koordinaatiota vaativissa tehtävissä kuten kiihtyvässä rotarod-kokeessa (puolakävely) GluA1-/- hiiret ovat sen sijaan huonompia villityypin

hiiriin verrattuna (Cowen ym. 2003). GluA1<sup>-/-</sup> hiirien hyperaktiivinen käyttäytyminen saattaa paradoksaalisesti heikentää tuloksia rotarod-kokeessa vaikeuttaen tehtävän suorittamista.

#### 4.3.2 Psykiatristen sairauksien piirteet GluA1-poistogeenisillä hiirillä

Jyrsijöiden lokomotorisen hyperaktiivisuuden oletetaan vastaavan skitsofreniaan liittyviä ominaisuuksia (Chen ym. 2006). GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä on todettu hyperaktiivisuuden lisäksi muitakin skitsofreniaan liittyviä piirteitä kuten dopaminergisen neurotransmission toimintahäiriö striatumissa *in vivo* kronoamperometrisissa mittauksissa (Wiedholz ym. 2008). Wiedholzin ja työtovereiden mukaan GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä esiintyy lisäksi puutteita sosiaalisessa käyttäytymisessä ja PPI (prepulse inhibition) kokeessa, mitkä ovat skitsofrenialle tyypillisiä piirteitä. Dopaminergistä toimintaa aktivoivat tilanteet kuten stressi, kognitiivista toimintaa vaativat tehtävät sekä uutuudelle altistaminen lisäävät GluA1<sup>-/-</sup> hiirien hyperaktiivisuutta. Dopaminergisen D<sub>2</sub>-reseptorin antagonisti haloperidoli puolestaan vähensi GluA1<sup>-/-</sup> hiirien hyperaktiivisuutta. Nämä tulokset tukevat GluA1-alayksikön, AMPA-reseptorien sekä glutamaatin ja dopamiinin välisien vuorovaikutuksien merkitystä sekä skitsofreniassa että muissa neuropsykiatrisissa sairauksissa kuten ADHD:ssa (tarkkaavaisuus- ja ylivilkkaushäiriö) ja kaksisuuntaisessa mielialahäiriössä.

Viimeaikaisten tutkimusten mukaan glutamaterginen neurotransmissio muuttuu merkittävässä masennushäiriöissä ja myös GluA1<sup>-/-</sup> hiiriä on käytetty masennusmallina hyvällä menestyksellä (Chourbaji ym. 2008). GluA1<sup>-/-</sup> hiiret osoittivat kokeissa lisääntyntä opittua avuttomuutta. Lisäksi GluA1<sup>-/-</sup> hiirien serotoniini- ja noradrenaliinitasot olivat alentuneet sekä glutamaatin homeostaasi oli häiriintynyt. Häiriintyneen homeostaasin takia GluA1<sup>-/-</sup> hiirien glutamaattitasot ja NMDA-reseptorin GluN1-alayksiköt olivat lisääntyneet hippokampuksessa. GluN1-tasojen muuttuminen GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä on ristiriidassa Zamanillon ja työtovereiden (1999) tekemien tutkimuksien kanssa, joiden mukaan NMDA-reseptorin alayksikköjen määrät eivät olleet muuttuneet GluA1-alayksikön poistamisen seurauksena. Glutamaattitasojen kohoaminen GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä saattaa johtua kompensatorisesta mekanismista vasteena

GluA1-alayksikköä sisältävien AMPA-reseptorien puutteelle (Chourbaji ym. 2008). GluA1-/- hiirillä saadut tulokset tukevat yleistä käsitystä glutamatergisestä neurotransmissioista ja masennuksesta, sillä yhdisteet, jotka lisäävät AMPA-reseptorin kautta tapahtuvaa signaalointia tai vähentävät NMDA-reseptorin toimintaa, ovat vaikutukseltaan antidepressiivisiä.

Masennus esiintyy usein samanaikaisesti ahdistuneisuuden kanssa, minkä perusteella GluA1-/- hiirien voisi olettaa olevan ahdistuneempia kuin villityypin hiirien. Kirjallisuudessa on kuitenkin ristiriitaista tietoa GluA1-/- hiirien ahdistuneisuuteen liittyen. Bannermanin ja työtovereiden (2004) mukaan GluA1-/- naarashiiret ovat ahdistuneempia musta-valko-laatikkokokeessa villityypin naarashiiriin verrattuna. Vekovischeva työtovereineen (2004) löysi sen sijaan päinvastaisia tuloksia GluA1-/- hiirien ahdistuneisuudesta. Heidän mukaan GluA1-/- hiiret ovat vähemmän ahdistuneita villityypin hiiriin verrattuna kohotetun plus-sokkelo- ja musta-valko-laatikkokokeiden perusteella.

#### 4.3.3 Päihteiden vaikutukset GluA1-poistogeenisillä hiirillä

Glutamatergisen AMPA-reseptorin ja erityisesti sen GluA1-alayksikön uskotaan sisältyvän päihderiippuvuden taustalla oleviin neurobiologisiin mekanismeihin (Tzschentke ja Schmidt 2003; Kalivas 2009), minkä perusteella päihteiden vaikutuksien voi olettaa eroavan GluA1-/- ja villityypin hiirien välillä. Krooninen morfiinin anto aiheuttaa GluA1-/- hiirille vähemmän toleranssia ja vieroitusoireita kuin villityypin hiirille (Vekovischeva ym. 2001). GluA1-/- hiiret herkistyvät villityypin tavoin morfiinille, mikäli päihteen antoon liittyy ympäristön vihjeitä. GluA1-/- hiirillä ei kuitenkaan esiinny herkistymistä, jos morfiinin antoon ei liity ympäristön vihjeitä. Tämän perusteella GluA1-alayksikkö on merkittävä morfiinin aiheuttamassa herkistymisessä, kun se on riippumaton asiayhteydestä (context-independent sensitization). Fluratsepaamille (bentsodiatsepiini), jolle on tyypillistä nopeasti esiin tuleva toleranssi rauhoittavalle vaikutukselle sekä erilaiset vieroitusoireet, kehittyä morfiinin tavoin vähemmän toleranssia GluA1-/- hiirillä, mutta sen sijaan enemmän vieroitusoireita villityypin hiiriin verrattuna (Aitta-aho ym. 2009). Toleranssi opioideille

ja bentsodiatsepiineille välitty Vekovischevan (2001) ja Aitta-ahon (2009) mukaan GluA1-riippuvaisen mekanismin kautta. Sen sijaan vieroitusoireet näille sedatiiveille välittyvät eri mekanismien kautta.

Alkoholin aiheuttamat akuutit ja krooniset vaikutukset eivät eroa Cowenin ja työtovereiden (2003) mukaan GluA1-/- ja villityypin hiirien välillä. Toleranssi alkoholille kehittyy yhtäläillä GluA1-/- ja villityypin hiirille. Edellä esitettyjen tulosten perusteella toleranssi alkoholille kehittyy ainakin osittain eri mekanismien kautta kuin opioideille ja bentsodiatsepiineille, koska GluA1-/- hiirillä esiintyy vähemmän toleranssia opioideille ja bentsodiatsepiineille villityyppiin verrattuna (Vekovischeva ym. 2001; Cowen ym. 2003; Aitta-aho ym. 2009). Cowenin ja työtovereiden (2003) mukaan ainoa ero alkoholin vaikutuksissa genotyyppien välillä on ruumiinlämmön lasku villityypin, mutta ei GluA1-/- hiirillä. GluA1-alayksikön on kuitenkin osoitettu sisältyvän alkoholin käyttöön liittyviin neuroadaptaatioihin (Pickering ym. 2007; Knackstedt ja Kalivas 2009), vaikka GluA1-/- ja villityypin hiirien välillä ei esiintynyt merkittäviä eroja esimerkiksi alkoholin itseannostelukokeissa (Cowen ym. 2003).

GluA1-alayksikön merkitystä päihdehakuksessa käyttäytymisessä on pyritty selvittämään paikkaehdollistamis- ja itseannostelukokeiden avulla. Meadin ja työtovereiden (2005) tekemissä paikkaehdollistamiskokeissa GluA1-/- hiiret ehdollistuivat kokaiinille villityypin tavoin. Dong työtovereineen (2004) löysi päinvastaisia tuloksia. Heidän kokeissaan GluA1-/- hiirillä ei esiintynyt paikkahakuisuutta kokaiiniin. Engblom työtovereineen (2008) on puolestaan tutkinut CPP-kokeiden avulla kokaiinihakuista käyttäytymistä hiirillä, joilta oli poistettu GluA1-alayksikkö selektiivisesti vain dopamiinineuroneista, sillä kokaiiniin oletetaan vahvistavan eksitatorisia synapseja keskiaivojen dopamiinineuroneissa (Liu ym. 2005). Synaptisen transmission vahvistumista ei tapahtunut niiden hiirien aivoleikkeissä, joilta oli poistettu GluA1 dopamiinineuroneista (Engblom ym. 2008). Ehdollistuminen kokaiinille tapahtui yhtäläillä poistogeenisillä ja villityypin hiirillä. Poistogeenisillä hiirillä ei kuitenkaan esiintynyt ehdollistumisen sammumista. Engblomin ja työtovereiden mukaan kokaiinin aiheuttama synaptinen plastisuus ei välitä kokaiinin lyhytaikaisia vaikutuksia käyttäytymiseen, mutta saattaa panna alulle adaptiivisia

muutoksia, jotka voivat johtaa päihdehakuiseen käyttäytymisen jatkumiseen. Heidän mukaansa dopamiinineuroneiden GluA1-alayksikkö on oleellinen kokaiinin aiheuttaman ehdollistumisen sammumiselle. Mead ja työtoverit (2007) selvittivät GluA1-alayksikön merkitystä edelleen kokaiinin itseannostelukokeissa GluA1-/- ja villityypin hiirillä. Itseannostelukokeissa ei ollut eroa genotyyppien välillä. Kokaiiniin liitetyt vihjeet aiheuttivat retkahtamisen itseannostelukokeiden ekstinktiiovaiheen jälkeen yhtä lailla molemmilla genotyypeillä. GluA1-/- hiirien itseannostelun ekstinktio tapahtui kuitenkin hitaammin kuin villityypin hiirillä. Kaiken kaikkiaan edellä esitetyt tutkimustulokset vahvistavat käsitystä, että GluA1-alayksiköllä on merkitystä päihteiden käyttöön liittyvissä neurobiologisissa mekanismeissa, vaikkakin jotkin tutkimustulokset ovat ristiriitaisia.

## **5 MORFIINI**

Morfiini on oopiumunikosta eristetty tehokas kivunlievittäjä ja päihde (Corbett ym. 2006). Pitkäaikainen opioidien kuten morfiinin käyttäminen johtaa usein riippuvuuden ja toleranssin kehittymiseen sekä vieroitusoireiden syntymiseen, mikäli päihteiden käyttö lopetetaan. Morfiinin aiheuttaman toleranssin ja riippuvuuden on osoitettu kehittyvän myös nopeasti, jopa yhden annostelukerran seurauksena (Zhang ym. 2008). Joka tapauksessa toistuva morfiinialtistus voi heikentää joitakin tämän päihteiden vaikutuksia toleranssin kautta, vaikka samalla jotkut morfiinin vaikutukset saattavat voimistua herkistymisen myötä (Carlezon ym. 1997; Robinson ja Berridge 2003). Toistuvat morfiinialtistukset lisäävät esimerkiksi lokomotorista aktiivisuutta. Morfiinin annostuksella voi olla kuitenkin merkitystä, sillä pienemmät annokset lisäävät lokomotoriikkaa, mutta suuremmat annokset voivat ensin lamata aktiivisuutta ja myöhemmin lisätä sitä (Babbini ja Davis 1972). Kaiken kaikkiaan edellä esitetyt tapahtumat kuten toleranssi, herkistyminen ja riippuvuus ovat monimutkaisia ilmiöitä, joiden taustalla oletetaan tapahtuvan adaptiivisia muutoksia sekä opioidireseptorien tasolla että laajemmin hermojärjestelmien välisissä toiminnoissa (Corbett ym. 2006). Esimerkiksi neurokemialliset muutokset hermovälittäjäaineiden kuten dopamiinin, glutamaatin ja GABA:n aktiivisuudessa ovat keskeisiä morfiinin aiheuttaman

riippuvuuden kehittymisessä (Xiang ym. 2006). Opioidien aiheuttama riippuvuus on edelleen vilkkaan tutkimuksen kohteena (Kreek ym. 2002), sillä opioidiriippuvuuden mekanismeja ei tunneta vielä riittävästi, eikä riippuvuuteen ole tehokasta lääkehoitoa.

### 5.1 Morfiini ja opioidireseptorit

Morfiinin vaikutukset välittyvät pääasiallisesti keskushermoston opioidireseptorien kautta (Corbett ym. 2006; Trescot ym. 2008). Opioidireseptoreja tunnetaan neljää alatyyppeä:  $\mu$  (mu, MOP),  $\delta$  (delta, DOP),  $\kappa$  (kappa, KOP) ja NOP (IUPHAR database 2009). Niiden esiintyvyys keskushermostossa vaihtelee reseptorialatyypin mukaan, mutta pääasiassa reseptorit sijaitsevat limbisen alueen ympärillä (Trescot ym. 2008). Morfiini sitoutuu voimakkaasti  $\mu$ -opioidireseptoriin (Toll ym. 1998; Corbett ym. 2006; Trescot ym. 2008). Sen vaikutukset tulevat esiin enimmäkseen  $\mu$ -opioidireseptorin kautta, mutta se on lisäksi hyvin heikko  $\kappa$ - ja  $\delta$ -opioidireseptoriagonisti (Toll ym. 1998; IUPHAR database 2009).  $\mu$ -opioidireseptori liittyy muun muassa analgesiaan, euforiaan, hengityslamaan, sedaatioon sekä heikentyneeseen suoliston toimintaan ja fyysiseen riippuvuuteen (Trescot ym. 2008).  $\kappa$ - ja  $\delta$ -opioidireseptorin kautta välittyy myös analgeettisia vaikutuksia. Lisäksi  $\kappa$ -opioidireseptori liitetään dysforiaan, sedaatioon ja hengityslamaan.  $\mu$ -opioidireseptorilla on keskeinen merkitys morfiinin aiheuttamassa riippuvuudessa ja fyysisissä vieroitusoireissa (Narita ym. 2001). Matthesin ja työtovereiden (1996) mukaan  $\mu$ -reseptorin suhteen poistogeenisillä hiirillä ei esiinny morfiinin fyysisiä vieroitusoireita riippuvuuden koe-eläinmallissa. Piepposen ja työtovereiden (1997) mukaan  $\mu$ -opioidireseptori ja erityisesti sen  $\mu_1$ -alatyypit ovat puolestaan merkittäviä morfiinin aiheuttamassa palkkiossa.

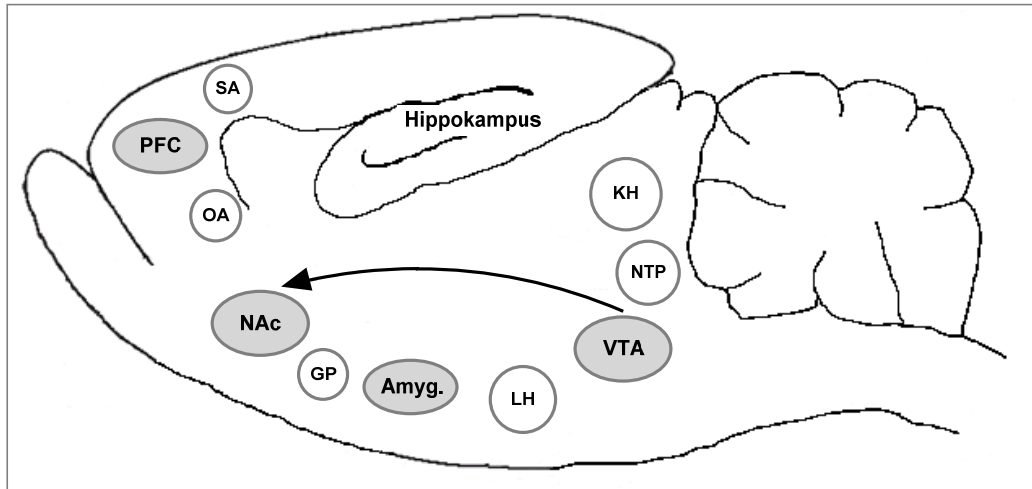
Opioidireseptorit kuuluvat G-proteiinikytkentäisiin reseptoreihin vaikuttaen inhibitorisien G-proteiinin alatyypin kautta (Zaki ym. 1996; Harrison ym. 1998; IUPHAR database 2009). Opioidireseptorien soluvasteet liittyvät neuronaalisen aktiivisuuden estämiseen kytkeytymällä adenylaattisyklaasin estoon, lisäämällä kaliumin virtausta tai estämällä kalsiumkanavien aktiivisuutta (Harrison ym. 1998). Opioidien kuten morfiinin nopeat vaikutukset muuttavat proteiinien fosforylaatiota syklisen adenosiinimonofosfaatin (cAMP) kautta (Trescot ym. 2008). Pitkäaikaisemmat

ja hitaammat vaikutukset muuttavat sen sijaan proteiinisynteesiä ja geenien transkriptiota. Opioidireseptorien vaikutuksien heikkenemisen ja epäherkistymisen uskotaan olevan osasyynä toleranssin ja riippuvuuden kehittymiselle (Harrison ym. 1998). Zhangin ja työtovereiden (2008) mukaan morfiinialtistuksen seurauksena esiintyvät häiriöt G-proteiiniin kytketytyksessä saattavat johtaa osaltaan toleranssin syntymiseen. Esimerkiksi morfiinin indusoiman analgesian ja toleranssin taustalla esiintyy cAMP:n tasojen laskua (Yoshimura ym. 2000). Morfiinin aiheuttaman palkkion ja ehdollistetun paikkahakuisuuden on puolestaan osoitettu korreloivan transkriptiotekijä CREB:n (cAMP:n vastetekijöitä sitova proteiini) fosforyloitumisen kanssa hippokampuksen, aivokuoren ja VTA:n alueilla (Moron ym. 2009). Yhteenvetona todettakoon, että morfiinin aiheuttamat soluvasteet esimerkiksi proteiinisynteesiin ja geenien transkriptiotekijöihin aiheuttavat edelleen muutoksia hermoston välittäjäaineiden aktiivisuuteen sekä synapsien rakenteisiin vaikuttaen riippuvuuden kehittymiseen.

## 5.2 Morfiinin indusioimia neurokemiallisia muutoksia

Morfiini aiheuttaa muiden päihteiden tavoin neurokemiallisia muutoksia ns. aivojen palkkiojärjestelmässä, jolla tarkoitetaan useimmiten VTA:n alueelta accumbens-tumakkeeseen menevää mesolimbistä dopamiinirataa, joka on edelleen vuorovaikutuksessa palkkion kannalta merkittävien kortikolimbisten rakenteiden kuten amygdalan, hippokampuksen ja PFC:n kanssa (Tzschentke ja Schmidt 2003) (Kuva 6). Morfiini vaikuttaa opioididiagonistien tavoin aktivoimalla suoraan kortikaalisia ja accumbens-tumakkeen neuroneita, minkä seurauksena dopamiinin pitoisuus NAc:ssa lisääntyy (Malanga ja Kosofsky 2003). Lisäksi morfiini hyperpolarisoi VTA:han tulevia GABAergisiä interneuroneita (Johnson ja North 1992), mikä johtaa VTA:n dopamiinineuroneiden aktivoitumiseen ja edelleen dopamiinin lisääntyneeseen vapautumiseen accumbens-tumakkeessa. Yhteenvetona todettakoon, että dopaminergiset vasteet accumbens-tumakkeessa välittävät ainakin osittain morfiinin indusioimia palkkiovaikutuksia.





Kuva 6. Opioidiriippuvuuteen liittyviä aivoalueita sekä mesolimbinen dopamiinirata ventraaliselta tegmentaaliselta alueelta accumbens-tumakkeeseen (musta nuoli). PFC = prefrontaalinen aivokuori, OA = orbitofrontaalinen aivokuori, SA = singulaarinen aivokuori, NAc = accumbens-tumake, GP = globus palliduksen alaosa, Amyg. = amygdala, LH = lateraalinen hypotalamus, VTA = ventraalinen tegmentaalin alue, NTP = nucleus tegmentalis pedunculopontinus, KH = keskeinen harmaa alue. Mukaillen (Nestler 2001; Meririnne ja Seppälä 2004).

GABA:n lisäksi muutkin välittäjäaineet kuten glutamaatti vaikuttavat palkkiojärjestelmän dopamiinineuroneihin ja ovat merkittäviä myös morfiinin aiheuttamissa palkkiovaikutuksissa. Glutamatergisen järjestelmän vaikutus VTA:n dopamiinineuroneihin on tärkeää ehdollistuttaessa päihteeseen liitettyihin ympäristön vihjeisiin (Harris ym. 2004). Harris työtovereineen osoitti VTA:n AMPA- ja NMDA-reseptorien olevan merkittäviä sekä morfiiniin ehdollistumisen oppimis- että ilmenemisvaiheissa, sillä VTA:han annetut AMPA- ja NMDA-antagonistit estivät morfiinin paikkahakuisuuden CPP-kokeissa. Morfiinin aiheuttamia neurokemiallisia muutoksia on tutkittu VTA:n ja NAc:n lisäksi mm. kortikolimbisiltä aivoalueilta kuten hippokampuksesta. Hippokampuksessa esiintyvien muistiin ja oppimiseen liittyvien glutamatergisten muutosten uskotaan olevan keskeisiä myös ehdollistuttaessa ja retkahdettaessa päihteisiin (Eisch ja Harburg 2006). Billan ja työtovereiden (2009) mukaan glutamaterginen hermojärjestelmä ja erityisesti glutamaterginen AMPA-reseptori ovat merkittäviä morfiinin ja ympäristön vihjeiden välille muodostuneen ehdollistumisen sammumisessa, muttei morfiiniin ehdollistumisessa. Heidän kokeissaan AMPA-reseptoreiden GluA1-alayksikön fosforyloituminen oli lisääntynyt hippokampuksen synapseissa ekstinktiivaiheen, muttei ehdollistamisvaiheen

seurauksena. Yhteenvedon voi todeta, että morfiinin ja ympäristön vihjeiden välille muodostuneet assosiaatiot aiheuttavat neuroplastisia muutoksia glutamatergisen järjestelmän kautta ja esimerkiksi AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön fosforyloitumisen lisääntyminen saattaa olla keskeinen mekanismi estettäessä retkahtamista morfiiniin ja päihdehakuiseen käyttäytymiseen.

Dopaminergisen ja glutamatergisen järjestelmän lisäksi myös serotonergisellä ja noradrenergisellä hermovälityksellä (Salomon ym. 2006; Lanteri ym. 2008) sekä endogeenisillä opioidipeptideillä kuten dynorfiinilla (Shippenberg ym. 2007) saattaa olla merkitystä morfiinin aiheuttamassa riippuvuudessa. Lanterin ja työtovereiden (2008) mukaan toistettu morfiinin anto aiheuttaa serotonergisten ja noradrenergisten neuroneiden herkistymistä kortikaalisella alueella. Heidän mukaan herkistymisen taustalla on serotonergisten ja noradrenergisten neuroneiden irtikytkeytyminen, joka on yhteydessä toistuvan morfiinialtistuksen aiheuttamaan käyttäytymisen herkistymiseen. Tämän perusteella voidaan olettaa, että morfiinin indusoima serotonergisten ja noradrenergisten neuronien herkistyminen saattaa olla merkittävä pitkäaikaisen päihdealtistuksen aiheuttama muutos, joka ei ole yhteydessä riippuvuuteen yleisesti liitettyyn dopamiinin vapautumiseen. Lisäksi opioidipeptidi dynorfiinilla saattaa olla merkitystä morfiinin aiheuttamassa riippuvuudessa, sillä opioidien aiheuttamien vieroitusoireiden on osoitettu korreloivan amygdalan ja accumbens-tumakkeen kohonneiden dynorfiinipitoisuuksien kanssa (Koob 2008). Tämän perusteella dynorfiini voi olla merkittäviä opioidiriippuvuuden ylläpidossa osallistumalla riippuvuuteen liittyviin negatiivisiin tunteisiin. Yhteenvedon todettakoon, että morfiinin aiheuttaman riippuvuuden taustalla esiintyy monia muutoksia keskushermoston neurokemiallisessa toiminnassa. Vielä ei kuitenkaan täysin tiedetä, miten nämä muutokset muodostavat riippuvuuteen liittyvän tapahtumasarjan ja mitkä muutokset ovat merkittävimpiä päihdehakuisuuden ja retkahtamisten taustalla.

## 6 YHTEENVETO

Päihderiippuvuus kehittyy usein impulsiivisista päihdekokeiluista pakonomaiseksi päihdehakuiseksi käyttäytymiseksi. Riippuvuuden kehittyessä esiintyy erilaisia ilmiöitä, jotka motivoivat edelleen päihdehakuisuuteen ja päihteisiin retkahtamiseen. Ehdollistumisella, jolla tarkoitetaan opitun assosiaation muodostumista päihteen ja ympäristön välille, on keskeinen merkitys päihderiippuvuudessa ja sen uskotaan selittävän osaltaan voimakasta päihdehimoa sekä päihteisiin retkahtamista. Päihderiippuvuuden kehittyessä esiintyy myös toleranssia ja herkistymistä päihteen aiheuttamille vaikutuksille. Herkistyminen on tärkeä tekijä riippuvuuden synnyssä ja sen oletetaan altistavan myös päihdehakuiseen käyttäytymiseen ja retkahtamisiin. Lisäksi positiivisen ja negatiivisen vahvistamisen uskotaan voimistavan päihdehakuisuutta päihteiden aiheuttamien mielihyvävaikutusten ja vieroitusoireiden kautta.

Päihteiden aiheuttamia palkkio-ominaisuuksia ja käyttäytymismuutoksia voidaan mallintaa koe-eläimillä kallonsisäisten itsestimulaatio-, itseannostelu- sekä paikkaehdollistamiskokeiden avulla. Lisäksi koe-eläinten lokomotorista aktiivisuutta mittaamalla voidaan arvioida päihteiden aiheuttamaa käyttäytymisen herkistymistä. Itseannostelu- ja kallonsisäiset itsestimulaatiokokeet perustuvat olettamukseen, että päihteet toimivat vahvistajina ja ylläpitävät sekä päihdehakuisuutta että päihteiden ottamista motivoivaa käyttäytymistä. Ehdollistettu paikkahakuisuus (CPP) menetelmä mallintaa puolestaan päihteiden ja niihin assosioituneiden vihjeiden aiheuttamaa pakonomaista halua päihteisiin. Menetelmän avulla voidaan arvioida päihteille ehdollistumisen lisäksi päihdehakuisen käyttäytymisen sammumista sekä päihteisiin retkahtamista. Esimerkiksi toistuvat morfiinialtistukset aiheuttavat selvää paikkahakuisuutta CPP-kokeissa ja toistuvat vehikkelialtistukset sammuttavat edelleen morfiinin paikkahakuisuuden. CPP-menetelmän avulla voidaan myös arvioida toleranssin ja herkistymisen kehittymistä päihteiden palkkiovaikutuksille. Esimerkiksi päihdehakuisuutta mallintavan lokomotorisen herkistymisen tutkiminen on helppoa paikkaehdollistamiskokeiden yhteydessä.

Toistuvat päihdealtistukset aiheuttavat neurofarmakologisia muutoksia erityisesti aivojen palkkiojärjestelmässä, jolla tarkoitetaan usein mesokortikolimbistä dopaminergistä rataa. Dopamiinin lisäksi myös glutamaatti on keskeinen riippuvuuden kehittämisessä. Glutamaatin pääasiallinen merkitys riippuvuudessa on säädellä joko suoraan tai välillisesti dopaminergisen järjestelmän aktiivisuutta. Mesokortikolimbinen dopaminerginen rata on monimutkaisesti yhteydessä glutamatergisiin rakenteisiin ja glutamatergiset projektiot lisäävät edelleen glutamatergisten AMPA-reseptorien välityksellä dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa, mitä pidetään merkittävänä riippuvuuden kehittämisessä. Toistuvien päihdealtistuksien on myös osoitettu lisäävän glutamatergisiä AMPA-reseptoreja aivojen palkkiojärjestelmään liittyvillä alueilla. Esimerkiksi toistuvat morfiinialtistukset herkistävät sekä päihteen lokomotorisia että palkkiovaikutuksia ja lisäävät AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön esiintymistä palkkiojärjestelmässä sijaitsevien VTA:n ja hippokampuksen alueilla. GluA1-alayksikön merkitystä päihderiippuvuudessa on tutkittu myös GluA1 poistogeenisten hiirten avulla. Tutkimukset vahvistavat käsitystä, että GluA1-alayksikkö on merkittävä päihteen käyttöön liittyvissä neurobiologisissa muutoksissa, vaikka tutkimustulokset ovat vielä osittain ristiriitaisia.

## II KOKEELLINEN OSUUS

### 7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Päihteille ehdollistuminen ja herkistyminen ovat keskeisiä ilmiöitä riippuvuuden kehittämisessä. Näitä tapahtumia voidaan mallintaa esimerkiksi ehdollistetun paikkahakuisuusmenetelmän avulla. Dopaminergisen hermojärjestelmän merkitys tunnetaan melko hyvin ehdollistuttaessa päihteiden aiheuttamille palkkiovaikutuksille. Glutamatergisen hermojärjestelmän osalta ei kuitenkaan ole yhtä paljon tietoa. Nykytiedon mukaan glutamatergisen järjestelmän uskotaan osallistuvan erityisesti päihdehakuiseen käyttäytymiseen ja retkahtamisien taustalla oleviin neurobiologisiin mekanismeihin.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää glutamatergisen AMPA-reseptorin GluA1-alayksikön merkitystä morfiinin paikkahakuisuudessa ja sen sammumisessa sekä retkahduskäyttäytymisessä GluA1-alayksikön suhteen poistogeenisten hiirten avulla. Lisäksi vertailtiin erilaisia tapoja toteuttaa paikkahakuisuuden sammuminen eli ekstinktio, koska GluA1-poistogeenisten hiirten ekstinktiota ei ole tutkittu aikaisemmin. Ensin tutkittiin hiirien ehdollistumista morfiiniin liitettyyn ympäristöön paikkahakuisuuskokeiden avulla. Sen jälkeen arvioitiin kahdella eri tavalla ekstinktiota morfiiniin liitettyyn ehdollistamisympäristöön. Ekstinktiiovaiheen jälkeen tutkittiin vielä retkahtamista morfiiniin liitettyyn ympäristöön. Lisäksi kaikissa koevaiheissa mitattiin hiirien lokomotorista aktiivisuutta sekä morfiinin indusoimaa käyttäytymisen herkistymistä lokomotorisen herkistymisen avulla.

## 8 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 8.1 Eläimet

Koe-eläiminä käytettiin C57BL/6J hiirikannan pohjalta kehiteltyjä glutamatergisen AMPA-reseptorin suhteen GluA1 villityypin (WT) ja GluA1-poistogeenisiä (GluA1<sup>-/-</sup>, knockout, KO) uros sekä naaras hiiriä. GluA1<sup>-/-</sup> hiiriltä oli poistettu Gria1-geeni, minkä johdosta niillä ei esiintynyt GluA1-alayksikköproteiinia (Zamanillo ym. 1999). Hiirien genotyyppi varmistettiin ottamalla koepala korvasta 30 päivän ikäisinä. Koepalat hajotettiin entsyymaattisesti yön yli proteiinikinaasi-K:n (0,5 mg/ml; Finnzymes Oy, Espoo, Suomi) avulla 55 °C ja sentrifugoitiin (15300 g; 10 min). Supernatantti monistettiin PCR:n (polymeraasiketjureaktio) avulla, jonka jälkeen määritettiin genotyyppi. Hiiret jaettiin neljään koeryhmään genotyypin ja sukupuolen mukaan: villityypin uros, villityypin naaras, knockout uros ja knockout naaras. Hiiret olivat kokeen aikana 3 - 6 kk ja painoivat keskimäärin 20 - 30 g. Ne säilytettiin 2 - 5 hengen ryhmissä Makrolon laatikoissa (25 × 20 × 15 cm tai 40 × 25 × 15 cm; Techniplast, Buguggiate, Italia). Hiirien annettiin sopeutua eläinkoetiloihin viikon ajan ennen kokeita. Koetilojen valorytmi oli 12 h (06:00 – 18:00) ja kokeet suoritettiin päiväaikaan. Lämpötila oli 21 ± 1 °C ja suhteellinen ilmankosteus 50 - 60 %. Hiiret saivat kokeen aikana ruokaa (Harlan Teklad, Oxon, Iso-Britannia) ja juomaa (vesijohtovesi) *ad libitum*. Eläimet lopetettiin kokeen jälkeen hiilidioksidilla. Kokeet olivat Etelä-Suomen lääninhallituksen ja Helsingin yliopiston koe-eläintoimikunnan hyväksymiä.

### 8.2 Tutkittavat aineet

Morfiinihydrokloridi hankittiin Yliopiston Apteekista (Helsinki, Suomi). Morfiiniliuos valmistettiin sekoittamalla morfiinihydrokloridi 0,9 % keittosuolaliuokseen (NaCl) suhteessa 2 mg/ml. Hiirille annettiin morfiinia 20 mg/kg injektioilavuuden ollessa 10 ml/kg. Lääkeaineannokset laskettiin hydrokloridisuolana. Morfiiniannos 20 mg/kg valittiin, sillä se saa aikaan selkeän paikkahakuisuuden sekä villityypin että GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä. Vehikkelinä annettiin 0,9 % keittosuolaliuosta (saliini) injektioilavuuden ollessa 10 ml/kg. Kaikki injektiot annettiin s.c. niskanahkaan.

### 8.3 Ehdollistettu paikkahakuisuus ja lokomotorinen aktiivisuus

#### 8.3.1 Koehuone ja koejärjestelyt

Ehdollistetun paikkahakuisuusmenetelmän avulla suoritetuissa kokeissa käytettiin Makrolon laatikoita (40 × 25 × 15 cm). Kansimateriaali oli läpinäkyvää, rei'itettyä muovia, mikä mahdollisti hiirien kuvaamisen kokeen aikana. Hiiret jaettiin kahdeksan eläimen ryhmiin, koska yhtä aikaa oli mahdollista kuvata kahdeksaa laatikkoa. Hiirien lokomotorista aktiivisuutta mitattiin Ethovision Color-Pro 3.0 videokuvausohjelmiston (Noldus Information Technology, Wageningen, Alankomaat) avulla. Kaikissa kokeissa laatikoihin laitettiin lattiamateriaali. Koevaiheesta riippuen laatikon pohja peitettiin joko kokonaan metalliverkolla (verkon silmän koko 1 × 1 mm) tai muovimatolla (kylpyhuoneen muovimatto, jossa noin 1 cm raot) tai puoliksi metalliverkolla ja puoliksi muovimatolla. Laatikot vaihdettiin puhtaisiin ennen seuraavan hiiriryhmän kuvaamista. Lattiamateriaalit pestiin laatikoiden vaihdon yhteydessä lämpöisellä vedellä ja harjalla, jonka jälkeen ne kuivattiin käsipyyhkeillä. Koehuoneen valaistus oli keskimäärin 50 - 100 lx koelaatikoiden kannen yläpinnalta mitattuna. Kokeiden aikana äänieristetty koehuoneen ovi pidettiin suljettuna ja kokeensuorittaja oli koehuoneen ulkopuolella mikäli mahdollista.

Kokeet suoritettiin soveltaen yhdentilan ehdollistetun paikkahakuisuuden menetelmää (ks. lisää kappale 3.3.1) (Cunningham ym. 2006b). Kaikissa koevaiheissa hiiret tuotiin koehuoneeseen 30 min ennen koepäivän ensimmäisen kokeen aloittamista ja säilytettiin kokeiden ajan omissa kotihäkeissään koehuoneessa. Hiiret ehdollistettiin kahdelle eri lattiamateriaalille muovimatolle (muovi) tai metalliverkolle (metalli) morfiinin annostelun jälkeen. Aiemmin tehdyissä kokeissa oli tutkittu, etteivät hiiret suosi kumpaakaan lattiamateriaalia. Tämän perusteella koeasetelmaa voidaan kutsua painottumattomaksi (unbiased). Koejärjestelyjä tasapainotettiin ehdollistamalla puolet kustakin hiirien koeryhmästä metalli- ja puolet muovialustalle. Tasapainotusta lisättiin jakamalla kaikista koeryhmistä hiiriä tasaisesti erillisiin kahdeksan eläimen ryhmiin. Kuvausten aikana laatikoiden lattiamateriaalit (kun kyseessä puoliksi muovi- ja puoliksi metallialusta) tasapainotettiin eri suuntiin huonetilaan nähden. Kokeissa ei tarvittu

täydellistä saliniikkontrolliryhmää, koska käytettiin painottomatonta koeasetelmaa ja tasapainotettiin koejärjestelyjä (ks. lisää kappale 3.3.3).

### 8.3.2 Koe 1

#### Morfiinin ehdollistamisvaihe (Koe 1 ja Koe 2)

Neljän päivän mittaisen ehdollistamisvaiheen tarkoituksena oli ehdollistaa hiiret morfiiniin liitettyyn lattiamateriaaliin (Taulukko 2). Kokeet muodostuivat kahdesta ehdollistamisjaksosta päivittäin. Hiirille annettiin aamupäivällä saliniinia ja ne laitettiin joko muovi- tai metallialusteiseen laatikkoon. Tämän jälkeen hiirien lokomotorista aktiivisuutta mitattiin 30 min. Iltapäivällä hiirille annettiin morfiinia 20 mg/kg ja ne laitettiin laatikkoon, jossa oli toinen lattiamateriaali kuin aamupäivällä. Sitten hiirien liikeaktiivisuutta mitattiin 30 min.

Taulukko 2. Koe 1. Morfiinin ehdollistamis-, ekstinktio- ja retkahduskokeet ehdollistetun paikkahakuisuusmenetelmän avulla. Kaikissa koevaiheissa mitattiin hiirien lokomotorista aktiivisuutta.

| Koevaihe                     | Päivät | Lattiamateriaali                                   | Koevaiheen tapahtumat   | Kesto    |
|------------------------------|--------|--|---|----------|
| Morfiinin ehdollistamisvaihe | 1 – 4  | Metalli tai muovi koko laatikossa                  | Hiirille annettiin aamupäivällä saliniinia joko metalli- tai muovialusteisessa laatikossa. Iltapäivällä eläimille annettiin morfiinia toisella lattiamateriaalilla. | à 30 min |
| Tauko                        | 5 - 6  |  |   |          |
| Ehdollistumistesti           | 7      | Puoliksi metalli ja puoliksi muovi koko laatikossa | Hiirille annettiin saliniinia.  | à 15 min |
| Ekstinktiiovaihe             | 8 - 11 | Puoliksi metalli ja puoliksi muovi koko laatikossa | Hiirille annettiin saliniinia sekä aamu- että iltapäivällä.   | à 15 min |
| Retkahdustesti               | 12     | Puoliksi metalli ja puoliksi muovi koko laatikossa | Hiirille annettiin morfiinia.   | à 15 min |



### Ehdollistumistesti

Ehdollistamisvaiheen jälkeen oli kahden päivän tauko kokeissa. Sen jälkeen tehtiin ehdollistumistesti, joka mittasi hiirien paikkahakuisuutta morfiiniin liitettyyn lattiamateriaaliin (Taulukko 2). Hiirille annettiin salinia, jonka jälkeen ne laitettiin laatikkoon, jossa oli puoliksi muovi- ja puoliksi metallialusta. Tämän jälkeen hiirien lokomotorista aktiivisuutta mitattiin 15 min. Kuvantamisohjelma määritti lokomotorisen aktiivisuuden erikseen muovi- ja metallialustalla. Hiirien viettämä aika metallialustalla metalli- ja muovialustalle ehdollistettujen eläinten välillä kuvasi paikkahakuisuutta eri koeryhmissä analysoitaessa koetuloksia. Morfiini aiheutti hiirille ehdollistettua paikkahakuisuutta, jos hiiret suosivat testissä morfiiniin yhdistettyä lattiamateriaalia.

### Ekstinktiiovaihe

Ehdollistumistestiä seurasi neljän päivän mittainen ekstinktiiovaihe, jonka tarkoituksena oli sammuttaa ehdollistuminen morfiiniin liitettyyn lattiamateriaaliin (Taulukko 2). Ekstinktiiovaihe koostui kahdesta mittauksesta päivittäin. Hiirille annettiin aamupäivällä salinia ja ne laitettiin puoliksi muovi- ja puoliksi metallialusteiseen laatikkoon, minkä jälkeen hiirien lokomotoriikkaa mitattiin 15 min. Koe toistettiin iltpäivällä samanlaisena. Hiirille annettiin ekstinktiiovaiheessa salini-injektio, koska ekstinktiiovaiheen koejärjestelyt pyrittiin toteuttamaan ehdollistamisvaiheen tavoin, jotta koejärjestelyt eivät vaikuttaisi paikkahakuisuuden sammumiseen. Ekstinktiiovaiheen viimeistä salini-altistusta (e8) pidettiin ekstinktiotestinä analysoitaessa koetuloksia. Edellä esitettyä ekstinktiomenetelmää kutsutaan toistetuksi testaamiseksi (repeated testing) (Ribeiro Do Couto ym. 2003; Popik ym. 2006). Kyseisen ekstinktiomenetelmän etuna voidaan pitää mahdollisuutta seurata paikkahakuisuuden sammumista ekstinktiotestien edetessä vertaamalla eläinten viettämää aikaa eri lattiamateriaaleilla.

### Retkahdustesti (Koe 1 ja Koe 2)

Ekstinktiiovaiheen jälkeen suoritettiin retkahdustesti. Hiirille annettiin morfiinia 20 mg/kg ja ne laitettiin laatikkoon, jossa oli puoliksi muovi- ja puoliksi metallialusta

(Taulukko 2). Hiirien lokomotorista aktiivisuutta mitattiin 15 min. Retkahdustestin tarkoituksena oli arvioida hiirien retkahtamistaipumusta palkkiota aiheuttavaan morfiiniin. Retkahtamisen oletettiin tapahtuvan, mikäli hiiret viihtyivät testissä enemmän lattiamateriaalilla, jolla ne olivat saaneet morfiinia kokeiden ehdollistamisvaiheessa.

### 8.3.3 Koe 2

#### Morfiinin ehdollistamisvaihe

Ehdollistaminen suoritettiin kuten kokeessa 1 (ks. edellä kappale 8.3.2) (Taulukko 3).

Taulukko 3. Koe 2. Morfiinin ehdollistamis-, ekstinktio- ja retkahduskokeet ehdollistetun paikkahakuisuusmenetelmän avulla. Kaikissa koevaiheissa mitattiin hiirien lokomotorista aktiivisuutta.

| Koevaihe                     | Päivät | Lattiamateriaali                                   | Koevaiheen tapahtumat  | Kesto    |
|------------------------------|--------|--|--|----------|
| Morfiinin ehdollistamisvaihe | 1 - 4  | Metalli tai muovi koko laatikossa                  | Hiirille annettiin aamupäivällä saliniä joko metalli- tai muovialusteisessa laatikossa. Iltapäivällä eläimille annettiin morfiinia toisella lattiamateriaalilla. | à 30 min |
| Tauko                        | 5 - 6  |  |  |          |
| Ehdollistumistesti           | 7      | Puoliksi metalli ja puoliksi muovi koko laatikossa | Hiirille ei annettu saliniä, vaan ne laitettiin suoraan koelaatikkoon.   | à 15 min |
| Ekstinktiovaihe              | 8 - 11 | Metalli tai muovi koko laatikossa                  | Hiirille annettiin aamupäivällä saliniä joko metalli- tai muovialusteisessa laatikossa. Iltapäivällä eläimille annettiin saliniä toisella lattiamateriaalilla.   | à 30 min |
| Ekstinktiotesti              | 12     | Puoliksi metalli ja puoliksi muovi koko laatikossa | Hiirille ei annettu saliniä, vaan ne laitettiin suoraan koelaatikkoon.   | à 15 min |
| Retkahdustesti               | 13     | Puoliksi metalli ja puoliksi muovi koko laatikossa | Hiirille annettiin morfiinia.  | à 15 min |

### Ehdollistumistesti

Ehdollistamisvaiheen jälkeen oli kahden päivän tauko, jota seurasi ehdollistumistesti. Hiirille ei annettu mitään injeksiota testissä, vaan ne laitettiin suoraan puoliksi muovi- ja puoliksi metallialusteiseen koelaatikkoon (Taulukko 3). Hiirien lokomotorista aktiivisuutta mitattiin 15 min. Ehdollistumistestissä ei annettu saliini-injektiota kuten kokeessa 1, koska haluttiin tutkia, vaikuttaako saliini-injektion antaminen ehdollistumistestissä arvioitavaan paikkahakuisuuteen ja mahdollisesti paikkahakuisuuden voimakkuuteen.

### Ekstinktiiovaihe ja ekstinktiotesti

Ehdollistumistestiä seurasi neljän päivän mittainen ekstinktiiovaihe, joka koostui kahdesta mittauksesta päivittäin (Taulukko 3). Hiirille annettiin aamupäivällä saliinia ja ne laitettiin joko muovi- tai metallialusteiseen laatikkoon, jonka jälkeen hiirien lokomotorista aktiivisuutta mitattiin 30 min. Iltapäivällä hiirille annettiin saliinia toisella lattiamateriaalilla, minkä jälkeen hiirien lokomotorista aktiivisuutta mitattiin 30 min. Ekstinktiiovaiheen jälkeen testattiin, oliko ehdollistuminen sammunut morfiiniin liitettyyn lattiamateriaaliin mittaamalla lokomotoriikkaa 15 min laatikossa, jossa oli puoliksi metalli- ja puoliksi muovialusta. Kokeessa 2 käytettyä ekstinktiomenetelmää kutsutaan saliinilla ehdollistamiseksi (saline conditioning), sillä ekstinktio suoritetaan ehdollistamisvaiheen tavoin (Cunningham ym. 2006a; Popik ym. 2006). Ainoana erona ehdollistamiseen on saliinin käyttäminen molemmilla lattiamateriaaleilla. Kyseinen ekstinktiomenetelmä vaatii paikkahakuisuuden testaamisen ekstinktiopakson jälkeen kuten ehdollistaminenkin. Kokeissa 1 ja 2 käytettiin erilaisia ekstinktiomenetelmiä, koska GluA1-/- hiirien ekstinktiota ei ole tutkittu aikaisemmin.

### Retkähdustesti

Retkähdustesti suoritettiin kuten kokeessa 1 (ks. edellä kappale 8.3.2) (Taulukko 3).

## 8.4 Tilastolliset menetelmät

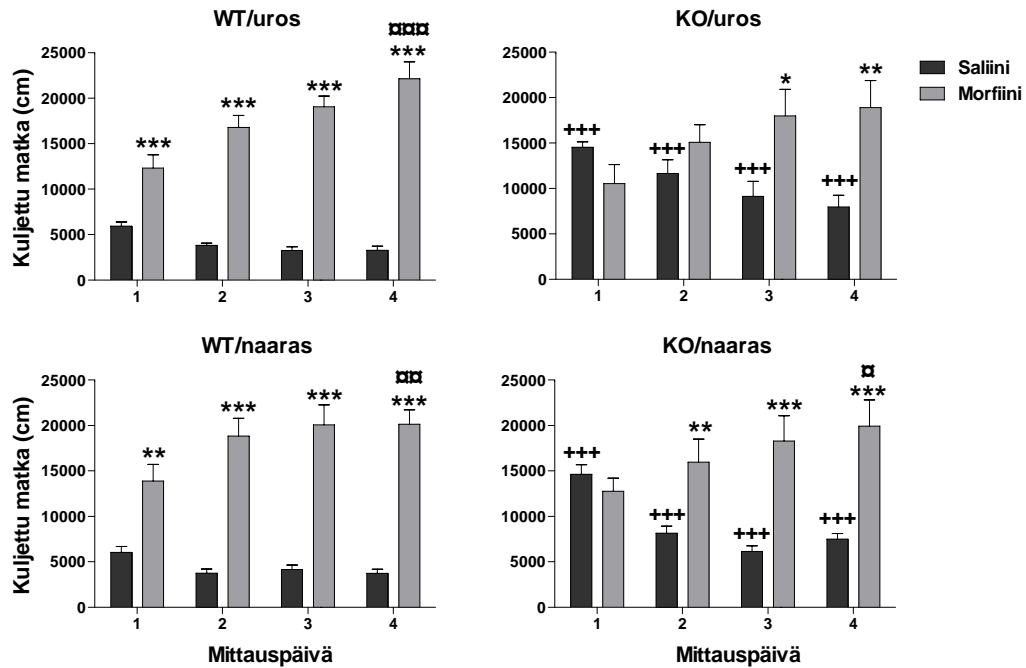
Riippuvana muuttujana käytettiin joko lokomotorista aktiivisuutta (kuljettu matka, cm) tai aikaa metallialustalla (s). Lokomotorisen aktiivisuuden aineisto analysoitiin toistettujen mittausten kaksisuuntaisella ANOVA:lla (genotyyppi × sukupuoli; mittauskerran ollessa toistomittausfaktori). Ehdollistumis-, ekstinktio- ja retkahdustestin tulokset analysoitiin kolmesuuntaisella ANOVA:lla (genotyyppi × sukupuoli × materiaalityyppi (metalli/muovi)). Ekstinktiiovaiheen aineisto analysoitiin toistettujen mittausten kolmesuuntaisella ANOVA:lla (genotyyppi × sukupuoli × materiaalityyppi (metalli/muovi); mittauskerran ollessa toistomittausfaktori). Kokeiden jatkotestinä tehtiin tarvittaessa joko kaksisuuntainen ANOVA tai parillinen tai pariton t-testi. Aineistojen analysoinnissa käytettiin tilastollista tietojenkäsittelyohjelmisto SPSS:ää (versio 13.0.1, SPSS Inc., IL, USA). Tuloksia pidettiin tilastollisesti merkitsevinä, kun  $p < 0,05$ . Kaikki tulokset on ilmaistu muodossa keskiarvo + S.E.M.

## 9 TULOKSET

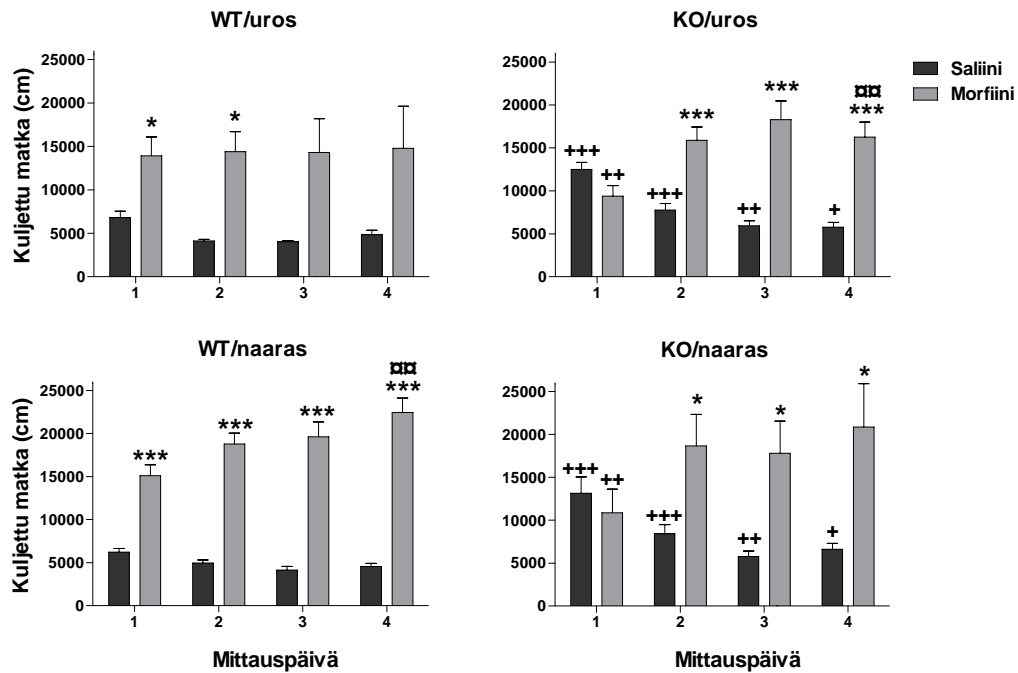
### 9.1 Lokomotorinen aktiivisuus

#### 9.1.1 Lokomotorinen aktiivisuus ehdollistamisvaiheessa

Ehdollistamisvaiheen lokomotoriikassa löytyi interaktio genotyypin ja mittauskerran välillä (Koe 1:  $F_{7,196}=10,76$ ;  $p < 0,0001$ ; Kuva 7) (Koe 2:  $F_{7,140}=3,62$ ;  $p=0,001$ ; Kuva 8). Ensimmäisen saliinialistuksen aikana GluA1<sup>-/-</sup> hiiret liikkuivat enemmän villityypin hiiriin verrattuna (Genotyyppiero: Koe 1,  $F_{1,28}=140,44$ ;  $p < 0,0001$  ja Koe 2,  $F_{1,20}=36,49$ ;  $p < 0,0001$ ). Molemmat genotyypit tottuivat uuteen ympäristöön ja lokomotorinen aktiivisuus väheni toistettujen saliinialistuksien myötä kaikilla koeryhmillä. Kaiken kaikkiaan GluA1<sup>-/-</sup> hiiret olivat hyperaktiivisempia kuin villityypin hiiret kaikkien saliinialistuksien aikana (Genotyyppiero: Koe 1,  $F_{1,28}=81,85$ ;  $p < 0,0001$  ja Koe 2,  $F_{1,20}=23,85$ ;  $p < 0,0001$ ). Sukupuolella ei ollut merkitystä ehdollistamisvaiheen saliinialistuksien lokomotoriikassa.



Kuva 7. Koe 1. Lokomotorinen aktiivisuus GluA1 villityypin (WT) ja GluA1 poistogeenisillä (KO) hiirillä ehdollistamisvaiheessa. Hiirien kulkemaa matkaa (cm; keskiarvo + S.E.M.) mitattiin 30 min saliini- (s.c.) ja morfiini-injektioiden (20 mg/kg; s.c.) jälkeen. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  saliini vs. morfiini. +++ $p < 0,001$  WT vs. KO. □ $p < 0,05$ ; □□ $p < 0,01$ ; □□□ $p < 0,001$  ensimmäinen morfiini vs. viimeinen morfiini. KO uroksilla löytyi trendi ensimmäisen ja viimeisen morfiinialtistuksen välillä ( $p < 0,1$ ). Kokeessa oli 32 hiirtä:  $n=10$  (WT/uroses),  $n=8$  (WT/naaras),  $n=6$  (KO/uroses) ja  $n=8$  (KO/naaras).

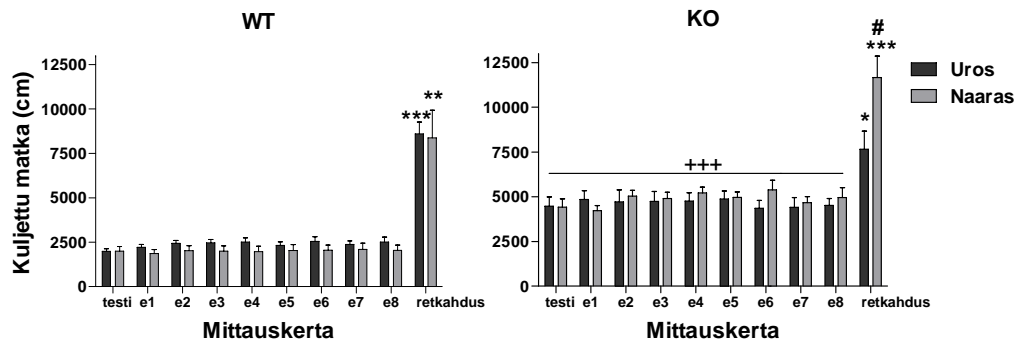


Kuva 8. Koe 2. Lokomotorinen aktiivisuus GluA1 villityypin (WT) ja GluA1 poistogeenisillä (KO) hiirillä ehdollistamisvaiheessa. Hiirien kulkemaa matkaa (cm; keskiarvo + S.E.M.) mitattiin 30 min saliini- (s.c.) ja morfiini-injektioiden (20 mg/kg; s.c.) jälkeen. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  saliini vs. morfiini. + $p < 0,05$ ; ++ $p < 0,01$ ; +++ $p < 0,001$  WT vs. KO. □□ $p < 0,01$  ensimmäinen morfiini vs. viimeinen morfiini. Kokeessa oli 24 hiirtä:  $n=3$  (WT/uros),  $n=8$  (WT/naaras),  $n=9$  (KO/uros) ja  $n=4$  (KO/naaras).

Ehdollistamisvaiheen lokomotorinen aktiivisuus erosi mittauskertojen (kaikki saliini- ja morfiinialtistukset) välillä (Mittauskertaero: Koe 1,  $F_{7,196}=85,28$ ;  $p < 0,0001$ ; Kuva 7 ja Koe 2,  $F_{7,140}=50,28$ ;  $p < 0,0001$ ; Kuva 8), mikä johtui vuorokerron annetun morfiinin aiheuttamasta lokomotorisen aktiivisuuden lisääntymisestä. Lokomotorinen aktiivisuus erosi ensimmäisen saliini- ja morfiinialtistuksen välillä villityypin hiirillä, muttei GluA1-/- hiirillä (Koe 1: Kuva 7 ja Koe 2: Kuva 8). Kaikki hiiret herkistyivät morfiinille lokomotoriikan erotessa ensimmäisen ja viimeisen morfiinialtistuksien välillä tilastollisesti erittäin merkitsevästi ANOVA:lla tehdyissä testeissä (Mittauskertaero: Koe 1,  $F_{1,28}=57,44$ ;  $p < 0,0001$  ja Koe 2,  $F_{1,20}=22,07$ ;  $p < 0,0001$ ). Kaikkien koeryhmien lokomotoriikka ei kuitenkaan eronnut tilastollisesti merkitsevästi ensimmäisen ja viimeisen morfiinialtistuksen välillä parillisessa t-testissä, minkä selittävät luultavasti joidenkin koeryhmien pienet ryhmäkoot (Koe 1:  $p < 0,0001$  WT/uros;  $p=0,007$  WT/naaras;  $p=0,055$  KO/uros;  $p=0,015$  KO/naaras) (Koe 2:  $p=0,807$  WT/uros;  $p=0,009$  WT/naaras;  $p=0,001$  KO/uros;  $p=0,123$  KO/naaras).

### 9.1.2 Lokomotorinen aktiivisuus ehdollistumis-, ekstinktio- ja retkahdustestissä sekä ekstinktiövaiheessa

GluA1<sup>-/-</sup> hiiret olivat hyperaktiivisempia myös ehdollistumis- ja ekstinktiotestissä sekä ekstinktiövaiheessa villityypin hiiriin verrattuna. Lokomotorinen aktiivisuus erosi genotyyppien välillä tilastollisesti erittäin merkitsevästi kokeen 1 ehdollistumistestissä ja ekstinktiövaiheessa (Genotyyppiero:  $F_{1,28}=75,01$ ;  $p<0,0001$ ; Kuva 9) sekä merkitsevästi kokeen 2 ehdollistumis- ja ekstinktiotestissä (Genotyyppiero:  $F_{1,20}=9,42$ ;  $p=0,006$ ; ei kuvaa) sekä ekstinktiövaiheessa (Genotyyppiero:  $F_{1,20}=10,53$ ;  $p=0,004$ ; ei kuvaa). Sukupuolella ei ollut merkitystä ehdollistumis- ja ekstinktiotestin sekä ekstinktiövaiheen lokomotoriikassa. Morfiinin 20 mg/kg retkahdustestin lokomotoriikassa ei ollut eroa genotyyppien välillä (Koe 1, Kuva 9; Koe 2, ei kuvaa). Sukupuolien välillä löytyi sen sijaan tilastollisesti melkein merkitsevä ero kokeen 2 retkahdustestissä naarashiirien liikkua enemmän (Sukupuoliero:  $F_{1,20}=5,73$ ;  $p=0,027$ ; ei kuvaa). Kokeen 1 retkahdustestin lokomotoriikassa sukupuolien välillä löytyi ero ainoastaan GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä naarashiirien liikkua enemmän (Sukupuoliero:  $F_{12}=2,43$ ;  $p=0,0317$ ).



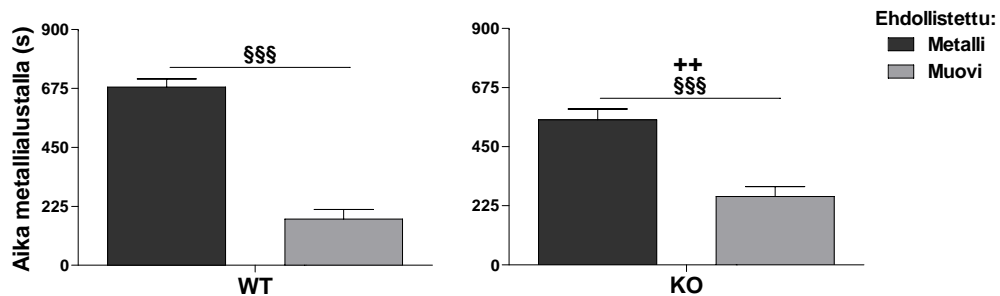
Kuva 9. Koe 1. Lokomotorinen aktiivisuus GluA1 villityypin (WT) ja GluA1 poistogeenisillä (KO) hiirillä ehdollistumis- ja retkahdustestissä sekä ekstinktiövaiheessa. Hiirien kulkemaa matkaa (cm; keskiarvo + S.E.M.) mitattiin 15 min ehdollistumistestin (testi) ja ekstinktiövaiheen (e1-e8) saliini-injektioiden (s.c.) sekä retkahdustestin (retkahdus) morfiini-injektion (20 mg/kg; s.c.) jälkeen. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  ehdollistumistestin ja ekstinktiövaiheen saliini vs. morfiini. +++ $p<0,001$  WT vs. KO. # $p<0,05$  uros vs. naaras. Kokeessa oli 32 hiirtä: n=10 (WT/uros), n=8 (WT/naaras), n=6 (KO/uros) ja n=8 (KO/naaras).

## 9.2 Ehdollistettu paikkahakuisuus

Ehdollistumis-, ekstinktio- ja retkahdustestissä sekä kokeen 1 ekstinktiövaiheessa tutkittiin GluA1<sup>-/-</sup> ja villityypin hiirien paikkahakuisuutta morfiiniin liitettyyn lattiamateriaaliin. Koetulokset analysoitiin vertaamalla hiirien viettämää aikaa metallialustalla metalli- ja muovialustalle ehdollistettujen eläinten välillä. Paikkahakuisuutta mitattiin 15 min (900 s), jolloin keskimääräinen aika eri lattiamateriaaleilla on 450 s.

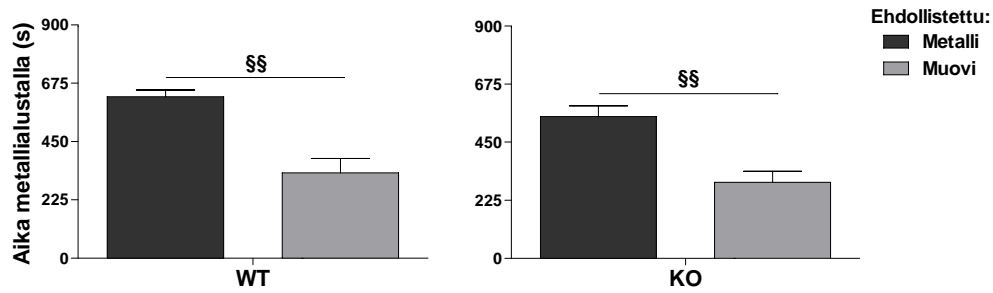
### 9.2.1 Ehdollistumistesti

Morfiini 20 mg/kg aiheutti ehdollistettua paikkahakuisuutta ehdollistumistestissä kaikilla hiirillä materiaaliryhmien (metalli/muovi) erotessa toisistaan (Materiaaliryhmäero: Koe 1,  $F_{1,24}=119,24$ ;  $p<0,0001$ ; Kuva 10 ja Koe 2,  $F_{1,16}=22,62$ ;  $p<0,0001$ ; Kuva 11). Genotyypin ja materiaaliryhmän (muovi/metalli) välillä oli tilastollisesti merkitsevä yhteisvaikutus kokeessa 1 ( $F_{1,24}=9,39$ ;  $p=0,005$ ), muttei kokeessa 2 ( $F_{1,16}=0,023$ ;  $p=0,882$ ), mikä tarkoittaa sitä, että GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä esiintyi vähemmän paikkahakuisuutta villityypin hiiriin verrattuna kokeessa 1, muttei kokeessa 2. Sukupuolella ei ollut merkitystä ehdollistumistestissä.



Kuva 10. Koe 1. Morfiinin (20 mg/kg) aiheuttama paikkahakuisuus ehdollistumistestissä GluA1 villityypin (WT) ja GluA1 poistogeenisillä (KO) hiirillä. Paikkahakuisuutta mitattiin 900 s antamalla hiirille saliinia (s.c.). Hiirien viettämä aika metallialustalla (s; keskiarvo + S.E.M.) metalli- ja muovialustalle ehdollistettujen eläinten välillä kuvaa paikkahakuisuutta.  $^{++}p<0,01$  WT vs. KO.  $^{$$$}p<0,001$  metalli vs. muovi. Kokeessa oli 32 hiirtä: n=10 (WT/uros), n=8 (WT/naaras), n=6 (KO/uros) ja n=8 (KO/naaras).

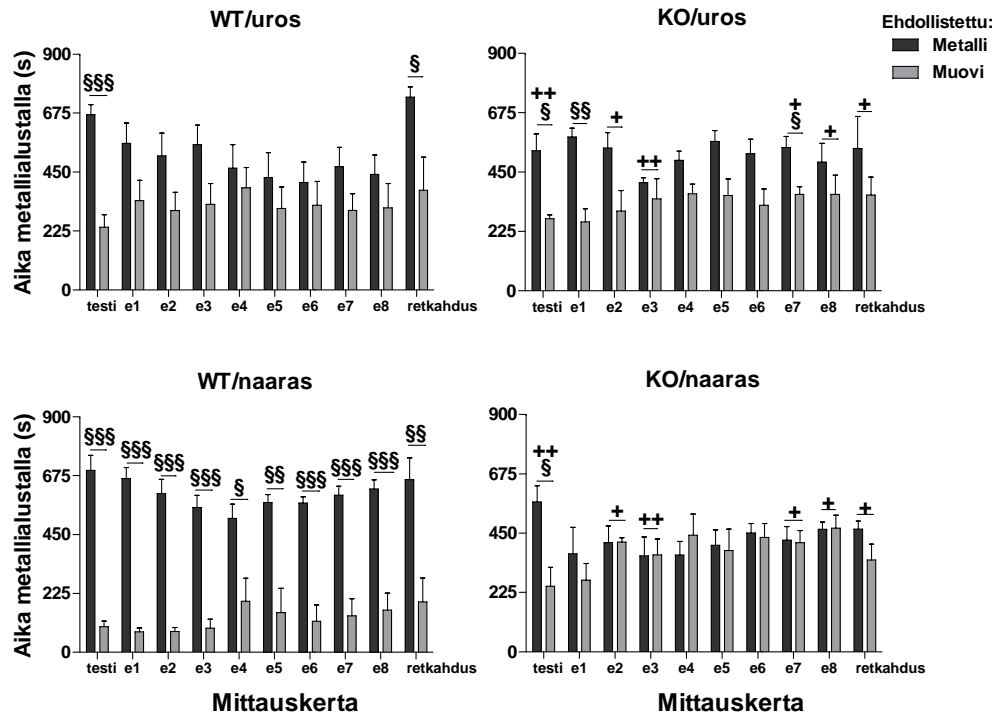




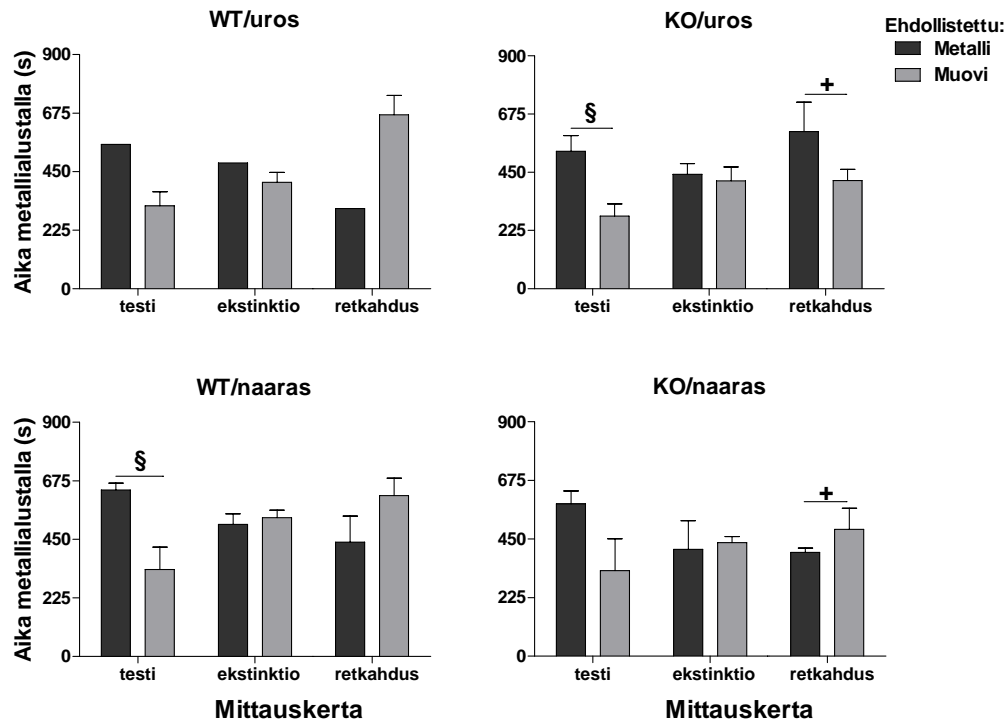
Kuva 11. Koe 2. Morfiinin (20 mg/kg) aiheuttama paikkahakuisuus ehdollistumistestissä GluA1 villityypin (WT) ja GluA1 poistogeenisillä (KO) hiirillä. Paikkahakuisuutta mitattiin 900 s (ei annettu salinia). Hiirien viettämä aika metallialustalla (s; keskiarvo + S.E.M.) metalli- ja muovialustalle ehdollistettujen eläinten välillä kuvaa paikkahakuisuutta. §§ $p < 0,01$  metalli vs. muovi. Kokeessa oli 24 hiirtä:  $n=3$  (WT/urossa),  $n=8$  (WT/naaras),  $n=9$  (KO/urossa) ja  $n=4$  (KO/naaras).

### 9.2.2 Ekstinktiiovaihe ja ekstinktiotesti

Kokeen 1 ekstinktiiovaiheessa löytyi yhteisvaikutus genotyypin, materiaaliryhmän (metalli/muovi) ja sukupuolen välillä ( $F_{1,24}=9,22$ ;  $p=0,006$ ; Kuva 12). Paikkahakuisuus oli sammunut muilla koeryhmillä paitsi villityypin naarailla ekstinktiotestissä (e8). Villityypin naarailla esiintyi erittäin merkitsevä paikkahakuisuus sekä koko ekstinktiiovaiheessa (Materiaaliryhmäero:  $F_{1,6}=81,95$ ;  $p < 0,0001$ ) että ekstinktiotestissä (Materiaaliryhmäero:  $F_6=6,30$ ;  $p=0,0007$ ). Kokeen 2 ekstinktiotestissä paikkahakuisuus oli sammunut kaikilla koeryhmillä (Kuva 13).



Kuva 12. Koe 1. Morfiinin aiheuttaman paikkahakuisuuden sammuminen ja morfiiniin retkahdus GluA1 villityypin (WT) ja GluA1 poistogeenisillä (KO) hiirillä. Hiirille annettiin ekstinktiiovaiheessa (e1-e8) saliinia (s.c.) ja retkahdustestissä (retkahdus) morfiinia (20 mg/kg; s.c.). Paikkahakuisuutta mitattiin 900 s. Hiirien viettämä aika metallialustalla (s; keskiarvo + S.E.M.) metalli- ja muovialustalle ehdollistettujen eläinten välillä kuvaa paikkahakuisuutta.  $^+p<0,05$ ;  $^{++}p<0,01$  WT vs. KO.  $^{\$}p<0,05$ ;  $^{\$\$}p<0,01$ ;  $^{\$\$\$}p<0,001$  metalli vs. muovi. Kokeessa oli 32 hiirtä: n=10 (WT/uross), n=8 (WT/naaras), n=6 (KO/uross) ja n=8 (KO/naaras). Testi = ehdollistumistesti.



Kuva 13. Koe 2. Morfiinin aiheuttaman paikkahakuisuuden sammuminen ja morfiiniin retkahtaminen GluA1 villityypin (WT) ja GluA1 poistogeenisillä (KO) hiirillä. Ekstinktiotestissä (ekstinktio) ei annettu saliinia. Retkahdustestissä (retkahdus) annettiin morfiinia (20 mg/kg; s.c.). Paikkahakuisuutta mitattiin 900 s. Hiiren viettämä aika metallialustalla (s; keskiarvo + S.E.M.) metalli- ja muovialustalle ehdollistettujen eläinten välillä kuvaa paikkahakuisuutta.  $^+p < 0,05$  WT vs. KO.  $^{\$}p < 0,05$  metalli vs. muovi. Kokeessa oli 24 hiirtä:  $n=3$  (wt/uros),  $n=8$  (wt/naaras),  $n=9$  (ko/uros) ja  $n=4$  (ko/naaras). Testi = ehdollistumistesti. Huom! Metallille ehdollistettujen WT urosten  $n=1$ .

### 9.2.3 Retkahdustesti

Kokeen 1 retkahdustestissä löytyi tilastollisesti erittäin merkitsevä ero materiaaliryhmien (metalli/muovi) välillä (Materiaaliryhmäero:  $F_{1,24}=20,50$ ;  $p < 0,0001$ ) ja melkein merkitsevä yhteisvaikutus genotyypin ja materiaaliryhmän (metalli/muovi) välillä ( $F_{1,24}=4,59$ ;  $p=0,043$ ) (Kuva 12). Morfiini aiheutti paikkahakuisuutta villityypin uroksilla (Materiaaliryhmäero:  $F_8=2,68$ ;  $p=0,0282$ ) ja naarailla (Materiaaliryhmäero:  $F_6=3,79$ ;  $p=0,0091$ ). GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä ei esiintynyt paikkahakuisuutta kokeen 1 retkahdustestissä. Kokeen 2 retkahdustestissä löytyi yhteisvaikutus genotyypin ja materiaaliryhmän (metalli/muovi) välillä ( $F_{1,16}=4,83$ ;  $p=0,043$ ; Kuva 13). Villityypin

hiirillä esiintyi paikkahakuisuuden sijaan paikka-aversiota (Materiaaliryhmäero:  $F_{1,9}=5,96$ ;  $p=0,037$ ), sillä hiiret hakeutuivat enemmän saliiniin kuin morfiiniin liitettyyn lattiamateriaaliin. GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä ei esiintynyt tilastollisesti merkitsevää paikkahakuisuutta tai -aversiota kokeen 2 retkahdustestissä.

## 10 TULOSTEN TARKASTELU

### 10.1 Lokomotorinen aktiivisuus

#### 10.1.1 GluA1-poistogeeniset hiiret liikkuivat enemmän villityypin hiiriin verrattuna

GluA1<sup>-/-</sup> uros- sekä naarashiiret olivat lokomotorisesti aktiivisempia kuin villityypin hiiret sekä ehdollistamis- että ekstinktiiovaiheen saliinialtistuksien aikana. Koetulos on yhdenmukainen aiempien tutkimustulosten kanssa, joiden mukaan GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä on lisääntynyt lokomotorinen aktiivisuus uudessa ympäristössä, mutta ei kotihäkissä (Vekovischeva ym. 2001; Cowen ym. 2003; Bannerman ym. 2004; Wiedholz ym. 2008). Lisääntynyt lokomotorinen aktiivisuus GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä on vaikea selittää. Genotyyppien välillä ei esiintynyt eroa AMPA-alayksiköiden mRNA-tasoissa millään aivoalueella *in situ* hybridisaation avulla tehdyissä kokeissa (Aitta-aho T, ei julkaistu tiedonanto 2007), mikä olisi voinut aiheuttaa GluA1<sup>-/-</sup> hiirien hyperaktiivisuutta. Hyperaktiivisuuden taustalla saattaa olla geneettisen mutaation seurauksena esiintyviä adaptaatiomuutoksia hermostollisissa mekanismeissa. GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä on todettu dopaminergisen neurotransmission toimintahäiriö striatumin dopamiinitransporttereissa, jonka seurauksena dopamiinin poistuminen on hidastunut (Wiedholz ym. 2008). Kyseinen häiriö saattaa osaltaan vaikuttaa GluA1<sup>-/-</sup> hiirien lisääntyneeseen lokomotoriseen aktiivisuuteen, sillä dopamiinireseptoreiden stimulaation on todettu aiheuttavan lokomotorista hyperaktiivisuutta (Holmes ym. 2001).

### 10.1.2 Morfiinin indusoima lokomotorinen aktiivisuus ei eronnut genotyyppien välillä

Ehdollistamisvaiheen toistuvien morfiinialtistuksien (20 mg/kg) seurauksena molemmat genotyypit herkistyivät morfiinille, sillä hiirien lokomotoriikka erosi tilastollisesti erittäin merkitsevästi ensimmäisen ja viimeisen morfiinialtistuksen välillä ANOVA:lla tehdyissä analyyseissä. GluA1<sup>-/-</sup> hiirien herkistyminen ei kuitenkaan eronnut villityypin hiiriin verrattuna, vaikka GluA1<sup>-/-</sup> hiiret liikkuivat voimakkaammin uudessa ympäristössä saliinialtistuksien aikana. Herkistyminen havaittiin hyperaktiivisuuden lisäksi stereotyyppisen motorisen käyttäytymisen (esim. kaavamainen saman liikeradan juokseminen) lisääntymisenä. Morfiinin aiheuttaman asiayhteydestä riippuvaisen lokomotorisen herkistymisen olisi olettanut heikentyneen GluA1<sup>-/-</sup> hiirillä, sillä toistuvien morfiinialtistuksien on todettu herkistävän sekä päihteen lokomotorisia että palkkiovaikutuksia ja lisäävän GluA1-alayksikön esiintymistä VTA:n (Churchill ym. 1999) ja hippokampuksen alueilla (Zhong ym. 2006). Koetulokset vastaavat kuitenkin Vekovischevan ja työtovereiden (2001) tutkimuksia, joiden mukaan GluA1-alayksikkö on merkittävä vain morfiinin asiayhteydestä riippumattomassa herkistymisessä (ks. lisää kappale 4.3.3). Koetulosten perusteella ympäristön vihjeet voimistavat morfiinin aiheuttamaa palkkiota ja lokomotoriikkaa yhtä lailla molemmilla genotyypeillä, minkä seurauksena hiiret ovat herkempiä seuraaville päihdeannoksille (Lu ym. 2002).

## 10.2 Ehdollistettu paikkahakuisuus

### 10.2.1 Morfiini aiheutti paikkahakuisuutta kaikilla hiirillä ehdollistumistestissä

Morfiini (20 mg/kg) aiheutti ehdollistettua paikkahakuisuutta sekä GluA1<sup>-/-</sup> että villityypin hiirillä ehdollistumistestissä. Neljän päivän mittaisten morfiinin ehdollistamiskokeiden on aiemminkin todettu aiheuttavan selkeää paikkahakuisuutta sekä hiirillä (Ribeiro Do Couto ym. 2005) että rotilla (Milekic ym. 2006). Genotyyppien välillä oli eroa paikkahakuisuuden voimakkuudessa kokeen 1 mukaan, mutta ei kokeen 2 perusteella. Kokeessa 2 hiirille ei annettu saliini-injektiota ehdollistumistestissä kuten kokeessa 1, mikä on saattanut vaikuttaa koetuloksiin. Koe-eläimille annetaan yleensä saliini-injektio paikkahakuisuutta testattaessa, sillä ehdollistumistestin koejärjestelyt

pyritään toteuttamaan ehdollistamisjakson tavoin, jotta koejärjestelyt eivät vaikuta paikkahakuisuuden syntymiseen (Bardo ja Bevins 2000). Genotyyppien välillä ei ole kuitenkaan aiemmin löytynyt eroa kokeen 1 tavalla suoritetuissa morfiinin ehdollistumistesteissä (Aitta-aho T, julkaisemattomat tulokset 2008), joten saliini-injektion antaminen on tuskin syynä genotyyppien väliseen eroon kokeessa 1. Sen sijaan eläinten käsittely on saattanut vaikuttaa genotyyppien väliseen eroon (Cunningham ym. 2006a), sillä kokeiden suorittaja toteutti kokeen 1 aikana ensimmäistä kertaa yksin käyttäytymiskokeita hiirillä. Kokematon käsittely ja siitä aiheutunut stressi on saattanut lisätä paikkahakuisuutta erityisesti villityypin hiirillä (Will ym. 2002), sillä villityypin hiirien on todettu olevan aggressiivisempia kuin GluA1-/- hiirien (Vekovischeva ym. 2004). Villityypin hiirien lisääntyneen paikkahakuisuuden taustalla olisi voinut olettaa löytyvän lisääntynyttä morfiiniin herkistymistä ehdollistamisvaiheessa GluA1-/- hiiriin verrattuna. Genotyyppien välillä ei kuitenkaan löytynyt eroa ehdollistamisvaiheen morfiinialistuksien lokomotoriikassa.

Päihderiippuvuuden kehittyessä tapahtuu synaptisen plastisuuden muutoksia kuten LTP:tä (Kauer ja Malenka 2007), missä AMPA-reseptorin GluA1-alayksikkö on osallisena (Lee ym. 2003). Zamanillon ja työtovereiden (1999) mukaan GluA1-/- hiirillä ei esiinny lainkaan LTP:tä, minkä perusteella GluA1-/- hiirien ei olisi olettanut ehdollistuvan morfiinille. GluA1-/- hiirillä on kuitenkin todettu esiintyvän GluA1-alayksiköstä riippumaton LTP (Romberg ym. 2009), joka saattaa olla osallisena GluA1-/- hiirien ehdollistumiseen. Joka tapauksessa kummallakin genotyypillä esiintyi molempien kokeiden ehdollistumistesteissä tilastollisesti merkitsevä paikkahakuisuus, minkä takia kokeen 1 tuloksien perusteella ei voi tehdä johtopäätöksiä GluA1-alayksikön merkityksestä morfiiniin ehdollistumisessa. Lisäksi toistuvan morfiinin annon seurauksena molempien genotyyppien liikeaktiivisuus herkistyi yhtä lailla, minkä voidaan olettaa korreloivan paikkahakuisuuden syntymisen kanssa, mikäli lokomotorinen herkistyminen ja ehdollistettu paikkahakuisuus mallintavat päihdehakuisuutta (Sanchis-Segura ja Spanagel 2006; Tzschentke 2007). Kokaiiniin (Mead ym. 2005; Engblom ym. 2008) ja morfiiniin (Billa ym. 2009) avulla tehdyt CPP-kokeet tukevat edelleen käsitystä, ettei GluA1-alayksikkö ole merkittävä päihteille ehdollistumisessa.

## 10.2.2 Genotyypin välillä ei ollut eroa ehdollistumisen sammumisessa

Ehdollistuminen morfiiniin liitettyyn lattiamateriaaliin sammui kokeessa 2 kaikilla koeryhmillä, mutta kokeessa 1 ekstinktiota ei tapahtunut villityypin naarashiirillä. Ekstinktiokokeet suoritettiin kahdella eri tavalla, mikä on saattanut osaltaan vaikuttaa koetuloksiin (ks. lisää kappale 10.3). Paikkahakuisuuden säilyminen villityypin naarashiirillä kokeessa 1 saattaa johtua osaltaan sukupuolihormonien ja glutamatergisen hermojärjestelmän välillä esiintyvistä vuorovaikutuksista (Diano ym. 1997). Glutamatergisten projektoiden on osoitettu kulkevan hypotalamuksen neuroneihin, jotka muodostavat gonadotropiineja vapauttavaa hormonia (GnRH) (Spergel ym. 1999), joka säätelee edelleen gonadotropiiniin kautta sukupuolihormonien eritystä. GnRH:ta vapauttavissa neuroneissa on osoitettu esiintyvän kaikkia AMPA-reseptorin alayksikköjä, mukaan lukien GluA1-alayksikköä (Bailey ym. 2006). Lisäksi naissukupuolihormoni estradiolin on osoitettu lisäävän GluA1-alayksikön esiintymistä hypotalamuksessa (Diano ym. 1997). Todd työtovereineen (2007) esitti edelleen AMPA-reseptorien välittävän estradiolin indusoimia muutoksia hypotalamukseen. Heidän mukaansa estradioli lisää mm. hypotalamukseen tulevien dendriittien ulokkeita (spine). Näiden tutkimustulosten perusteella glutamaterginen hermojärjestelmä ja esimerkiksi AMPA-reseptorin GluA1-alayksikkö säätelevät osaltaan neuroendokriinistä toimintaa ja saattavat vaikuttaa päihdehakuiseen käyttäytymiseen olemalla vuorovaikutuksessa sukupuolihormonien kuten estradiolin kanssa. Esimerkiksi estradiolin vapautumissyklillä ja naarashiirien elimistössä vallitsevalla määrällä saattaa olla vaikutusta motivaatioon jatkaa päihdehakuista käyttäytymistä, sillä estradiolin antamisen on todettu lisäävän koe-eläimien motivaatiota päihteen ottamiseen (Becker ja Hu 2008). Mikäli estradiolin ja GluA1-alayksikön välillä on merkittävä vuorovaikutus, joka vaikuttaa päihdehakuiseen käyttäytymiseen, ekstinktiota ei olisi oletettavasti tapahtunut villityypin naarashiirillä kokeessa 2. Toisaalta kokeiden 1 ja 2 välillä esiintyvän eron selityksenä saattaa olla erilaiset ekstinktiomenetelmät. Yhteenvedona todettakoon, että sukupuolien väliset erot päihdehakuisessa käyttäytymisessä saattavat selittyä osaltaan sukupuolihormoneilla ja niiden vuorovaikutuksilla GluA1-alayksikön kanssa.

Viimeaikaisten tutkimusten perusteella AMPA-reseptorit ja erityisesti niiden GluA1-alayksikkö ovat merkittäviä päihteiden ekstinktiassa (Engblom ym. 2008; Billa ym. 2009; Crombag ym. 2009). Kokaiinilla tehdyissä CPP-kokeissa, joissa oli käytetty dopamiinineuroneiden GluA1-alayksikön suhteen poistogeenisiä hiiriä, ei tapahtunut ekstinktiota (Engblom ym. 2008). Morfiinin CPP-kokeissa, joissa oli käytetty Narpgeenin suhteen poistogeenisiä hiiriä, ei tapahtunut myöskään ekstinktiota (Crombag ym. 2009). Narp on neuronaalinen välitön varhaisgeeni (immediate early gene, IEG), jonka oletetaan säätelevän AMPA-reseptoreiden liikkumista. Lisäksi Billan ja työtovereiden (2009) tekemissä morfiinin CPP-kokeissa GluA1-alayksikön fosforyloituminen oli lisääntynyt rottien hippokampuksessa ehdollistumisen sammuttua. Edellä esitettyjen tutkimustulosten mukaan voisi olettaa, ettei GluA1-/- hiirillä tapahdu ekstinktiota. GluA1-/- hiirillä esiintyneen morfiinin ekstinktion taustalla saattaa olla esimerkiksi GluA1-alayksiköstä riippumaton LTP ja mahdolliset muut GluA1-/- hiirien geneettisen mutaation seurauksena esiintyvät adaptaatiomekanismit (Romberg ym. 2009).

### 10.2.3 Retkahdustestin tulokset erosivat kokeiden 1 ja 2 välillä

Morfiinin (20 mg/kg) retkahdustestin tulokset erosivat kokeiden 1 ja 2 välillä. Kokeen 1 perusteella villityypin hiiret retkahtivat morfiiniin, mutta GluA1-/- hiiret eivät. Villityypin naarashiirillä ei kuitenkaan tapahtunut ekstinktiota kokeessa 1, joten niiden tuloksia ei voi tulkita retkahdustestin osalta. Kokeen 2 mukaan villityypin hiirillä esiintyi paikkahakuisuuden sijaan paikka-aversiota retkahdustestissä. GluA1-/- hiirillä ei esiintynyt tilastollisesti merkitsevää paikkahakuisuutta tai -aversiota kokeessa 2. Yhteenvedona todettakoon, että ainoastaan GluA1-/- urokset käyttäytyivät samalla tavalla molemmissa kokeissa. Koetulosten vastakohtaisuuden selittää luultavasti erilaiset ekstinktiomenetelmät. Toisaalta kirjallisuuden mukaan morfiini aiheuttaa retkahtamisen riippumatta siitä, käytetäänkö ekstinktiomenetelmänä toistettuja testejä tai saliinilla ehdollistamista (Mueller ym. 2002; Ribeiro Do Couto ym. 2003; Popik ym. 2006; Aguilar ym. 2009). Tutkimustulosten vertailua vaikeuttaa joka tapauksessa koejärjestelyiden eroavuudet kuten morfiinin annos ehdollistamis- ja retkahduskokeissa sekä variaatiot ekstinktiomenetelmän suhteen. Mikäli kokeen 1 retkahdustestin tuloksia pidetään luotettavampina perustuen kirjallisuudessa saatuihin samansuuntaisiin



tuloksiin, joiden perusteella GluA1-alayksikkö on merkittävä päihteisiin retkahtamisessa (Ping ym. 2008), genotyyppien välillä on mahdollisesti eroa morfiiniin retkahtamisessa. GluA1-/- hiirien ekstinktio- ja retkahduskokeita tulisi joka tapauksessa kehittää ja toteuttaa lisää, sillä glutamatergisen hermojärjestelmän ja GluA1-alayksikön on todettu osallistuvan päihdehakuiseen käyttäytymisen ja retkahtamisen taustalla oleviin neurobiologisiin mekanismeihin (Engblom ym. 2008; Ping ym. 2008; Aguilar ym. 2009; Knackstedt ja Kalivas 2009). GluA1-/- hiirien osalta ei ole myöskään kirjallisuudessa tutkimuksia päihdehakuiseen käyttäytymisen sammumisesta ja päihteisiin retkahtamisesta.

### 10.3 Erilaisten ekstinktiotapojen vertailua CPP-kokeissa

Ekstinktiokokeet suoritettiin kahdella eri tavalla, kokeessa 1 toistettujen testien ja kokeessa 2 saliinilla ehdollistamisen avulla, mikä on saattanut osaltaan vaikuttaa koetuloksiin. Popikin ja työtovereiden (2006) tekemissä morfiinin CPP-kokeissa tapahtui ekstinktio hiirillä, kun ekstinktiomenetelmänä oli saliinilla ehdollistaminen, mutta ei käytettäessä toistettuja testejä ekstinktiossa. Ehdollistuminen morfiinille sammui kuitenkin Ribeiro Do Couton ja työtovereiden (2003) tekemissä hiirien ekstinktiokokeissa, jotka vastaavat pääpiirteiltään kokeessa 1 käytettyä toistettujen testien ekstinktiomenetelmää. Saliinilla ehdollistaminen saattaa olla tehokkaampi ekstinktiomenetelmä. Kokeiden 1 ja 2 koetulokset eivät kuitenkaan eronneet kaikkien hiirien osalta eikä genotyyppien välillä, joten erilaiset ekstinktiomenetelmät selittävät tuskin paikkahakuisuuden säilymistä villityypin naarailta kokeessa 1. Ekstinktio tapahtui kahdeksan saliinialtistuksen seurauksena kaikilla koeryhmillä molemmissa kokeissa lukuun ottamatta villityypin naaraita kokeessa 1, minkä perusteella ekstinktiokokeet olivat riittävän pitkiä vastaten kirjallisuudessa esiintyviä kokeita (Ribeiro Do Couto ym. 2003; Ribeiro Do Couto ym. 2005; Popik ym. 2006). Ekstinktiokokeiden aikana annettu saliiini-injektio on mahdollisesti nopeuttanut paikkahakuisuuden sammumista (Mueller ym. 2002). Voidaan kuitenkin miettiä, että tulisiko ekstinktiokokeet suorittaa ilman saliiini-injektiota. Tällöin ehdollistumisen sammuminen tapahtuisi luonnollisemmalla tavalla ja mallintaisi paremmin todellista tilannetta päihderiippuvaisella. Joka tapauksessa ehdollistumisen sammumisessa on

keskeistä koe-eläimien altistaminen ehdollistamisjakson aikana päihteeseen liitettyihin vihjeisiin (Ribeiro Do Couto ym. 2003; Cunningham ym. 2006a). Kaiken kaikkiaan ehdollistumisen sammumiseen saattaa vaikuttaa ekstinktiomenetelmän lisäksi monet asiat kuten morfiinin annos ehdollistamiskokeiden aikana, ekstinktiokokeiden määrä sekä ajanjakso niiden välillä ja ehdollistamiskokeiden jälkeen kulunut aika ennen ekstinktion testaamista (Ribeiro Do Couto ym. 2005).

Edellä esitettyjen kokeiden ja kirjallisuuden (Mueller ym. 2002; Ribeiro Do Couto ym. 2003) perusteella voidaan sanoa, että CPP-menetelmä soveltuu sekä ekstinktio- että retkahdusmalliksi. Näiden koetulosten perusteella on kuitenkin epäselvää, mikä on luotettavin tapa toteuttaa ekstinktio ja voivatko erilaiset ekstinktiotavat vaikuttaa merkittävästi retkahduskokeisiin. Onko esimerkiksi mahdollista, että käytettäessä saliinilla ehdollistamista ekstinktiomenetelmänä, koe-eläimet kokisivat ekstinktiojakson jälkeen herkemmin paikka-aversiota retkahdustestissä päihteeseen liitettyä ehdollistamisympäristöä kohtaan. Kokeen 2 retkahdustestissä villityypin hiirillä esiintyi paikka-aversiota, kun ekstinktiomenetelmänä oli saliinilla ehdollistaminen. Sen sijaan kokeen 1 retkahdustestissä villityypin hiirillä esiintyi paikkahakuisuutta, kun ekstinktiomenetelmänä käytettiin toistettuja testejä. Toistettujen testien ekstinktiomenetelmä saattaa olla luotettavampi retkahdustesteistä saatujen koetulosten valossa. Toistettujen testien ekstinktiomenetelmän etu on joka tapauksessa siinä, että sen avulla voidaan seurata ehdollistumisen sammumista koko ekstinktiojakson ajan. Samalla nähdään, että olivatko ekstinktiokokeet riittävän pitkiä. CPP-menetelmän käyttämistä ekstinktio- ja retkahdusmallina tulisi kuitenkin tutkia lisää ja vertailla erilaisten ekstinktiotapojen validiteettia CPP-kokeissa.

## **11 YHTEENVETO**

Glutamatergisen AMPA-reseptorin ja sen GluA1-alayksikön on osoitettu sisältyvän päihderiippuvuuden taustalla oleviin neurobiologisiin mekanismeihin. GluA1-alayksikön uskotaan osallistuvan erityisesti päihderiippuvuudelle tyypillisten päihdehakuksen käyttäytymisen ja retkahtamisen taustalla oleviin muutoksiin. Tällä

hetkellä ei ole kuitenkaan selvää, kuinka merkittävä tekijä GluA1-alayksikkö on päihderiippuvuudessa ja voisiko se olla mahdollinen vaikutuskohde kehitettäessä uusia hoitokeinoja päihderiippuvuuteen.

Erikoistyössä havaittiin, että GluA1-poistogeeniset hiiret ovat hyperaktiivisempia uudessa ympäristössä villityypin hiiriin verrattuna, mikä vastaa kirjallisuudessa esiintyviä havaintoja. Morfiinin indusoima liikkuminen ei kuitenkaan eronnut genotyyppien välillä, vaan molemmat genotyypit herkistyivät yhtä lailla morfiinille toistuvien morfiinialtistuksien seurauksena. Morfiini aiheutti myös paikkahakuisuutta molemmilla genotyypeillä, kuten on todettu aiemmissakin tutkimuksissa. Morfiinin paikkahakuisuus sammui edelleen kummallakin genotyypillä. Retkahdustestin tulokset erosivat kuitenkin osittain genotyyppien välillä. Villityypin hiiret retkahtivat morfiiniin, kun käytettiin toistettujen testien ekstinktiomenetelmää, mutta GluA1-poistogeeniset hiiret eivät. Villityypin hiirillä esiintyi paikkahakuisuuden sijaan paikka-aversiota retkahdustestissä, kun ekstinktiomenetelmänä oli saliinilla ehdollistaminen. Näiden kokeiden perusteella ekstinktiomenetelmällä saattaa olla vaikutusta retkahdustestin tuloksiin. Koetulosten perusteella ei voi kuitenkaan tehdä johtopäätöksiä GluA1-alayksikön merkityksestä morfiiniin retkahtamisessa. Jatkokokeiden avulla tulisi selvittää, kumpi ekstinktiomenetelmä on luotettavampi. Tämän jälkeen voisi tutkia, eroavatko GluA1-poistogeeniset ja villityypin hiiret morfiinin ekstinktiossa ja retkahtamisessa kuten kirjallisuuden perusteella voi olettaa.

Yhteenvedona voidaan todeta, että paikkaehdollistamiskokeiden tulokset tukevat käsitystä, minkä perusteella GluA1-alayksikkö ei ole merkittävä morfiiniin ehdollistumisessa. Koetulosten perusteella GluA1-alayksiköllä ei ole kuitenkaan merkitystä morfiinin ekstinktiossa, kuten kirjallisuuden perusteella voi olettaa. GluA1-alayksiköllä saattaa olla merkitystä morfiiniin retkahtamisessa, vaikka retkahdustestin tulokset olivat osittain ristiriitaisia.

## **KIITOKSET**

Haluan kiittää biolääketieteen laitoksen professori Esa Korpea mahdollisuudesta suorittaa erikoistyö neurofarmakologian tutkimusryhmässä sekä avusta ja neuvoista koetulosten parissa. Erityiskiitokset kuuluvat erikoistyöni ohjaajalle proviisori Teemu Aitta-aholle neuvoista ja avusta sekä erikoistyön suorittamisen että kirjoittamisen aikana. Lisäksi haluan kiittää FM Anne Panhelaista (o.s. Heikkinen) ja FaT, dosentti Anni-Maija Lindéniä neuvoista ja tuesta erikoistyön suorittamisen aikana. Kiitän myös koko osaston henkilökuntaa käytännön avusta. Lämpimimmät kiitokset menevät perheelleni Heikille, Vivianille ja Patrikille. Kiitos rakkaudesta, tuesta ja rohkaisusta tämän työn aikana.

**KIRJALLISUUSLUETTELO**

Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Minarro J: Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res Rev* 59: 253-277, 2009

Aitta-aho T, Vekovischeva OY, Neuvonen PJ, Korpi ER: Reduced benzodiazepine tolerance, but increased flumazenil-precipitated withdrawal in AMPA-receptor GluR-A subunit-deficient mice. *Pharmacol Biochem Behav* 92: 283-290, 2009

Anagnostaras SG, Robinson TE: Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behav Neurosci* 110: 1397-1414, 1996

Andrasfalvy BK, Smith MA, Borchardt T, Sprengel R, Magee JC: Impaired regulation of synaptic strength in hippocampal neurons from GluR1-deficient mice. *J Physiol* 552: 35-45, 2003

Arundine M, Tymianski M: Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34: 325-337, 2003

Babbini M, Davis WM: Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. *Br J Pharmacol* 46: 213-224, 1972

Bailey JD, Centers A, Jennes L: Expression of AMPA receptor subunits (GluR1-GluR4) in gonadotrophin-releasing hormone neurones of young and middle-aged persistently oestrous rats during the steroid-induced luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol* 18: 1-12, 2006

Bannerman DM, Deacon RM, Brady S, Bruce A, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN: A comparison of GluR-A-deficient and wild-type mice on a test battery assessing sensorimotor, affective, and cognitive behaviors. *Behav Neurosci* 118: 643-647, 2004

Bardo MT, Bevins RA: Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)* 153: 31-43, 2000

Bassani S, Valnegri P, Beretta F, Passafaro M: The GLUR2 subunit of AMPA receptors: synaptic role. *Neuroscience* 158: 55-61, 2009

Becker JB, Hu M: Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* 29: 36-47, 2008

Billa SK, Sinha N, Rudrabhatla SR, Moron JA: Extinction of morphine-dependent conditioned behavior is associated with increased phosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Eur J Neurosci* 29: 55-64, 2009

Blaise MC, Sowdhamini R, Rao MR, Pradhan N: Evolutionary trace analysis of ionotropic glutamate receptor sequences and modeling the interactions of agonists with different NMDA receptor subunits. *J Mol Model* 10: 305-316, 2004

Bleakman D, Lodge D: Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 37: 1187-1204, 1998

Bredt DS, Nicoll RA: AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40: 361-379, 2003

Busse GD, Riley AL: Cocaine, but not alcohol, reinstates cocaine-induced place preferences. *Pharmacol Biochem Behav* 78: 827-833, 2004

Carlezon WA, Jr, Boundy VA, Haile CN, Lane SB, Kalb RG, Neve RL, Nestler EJ: Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer. *Science* 277: 812-814, 1997

Carlezon WA, Jr, Chartoff EH: Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nat Protoc* 2: 2987-2995, 2007

Chen J, Lipska BK, Weinberger DR: Genetic mouse models of schizophrenia: from hypothesis-based to susceptibility gene-based models. *Biol Psychiatry* 59: 1180-1188, 2006

Chourbaji S, Vogt MA, Fumagalli F, Sohr R, Frasca A, Brandwein C, Hortnagl H, Riva MA, Sprengel R, Gass P: AMPA receptor subunit 1 (GluR-A) knockout mice model the glutamate hypothesis of depression. *FASEB J* 22: 3129-3134, 2008

Churchill L, Swanson CJ, Urbina M, Kalivas PW: Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* 72: 2397-2403, 1999

Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M: A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56: 2-5, 2009

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 8. painos. Oxford University Press, New York 2003

Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ: 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S153-62, 2006

Cowen MS, Schroff KC, Gass P, Sprengel R, Spanagel R: Neurobehavioral effects of alcohol in AMPA receptor subunit (GluR1) deficient mice. *Neuropharmacology* 45: 325-333, 2003

Crombag HS, Bossert JM, Koya E, Shaham Y: Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 3233-3243, 2008

Crombag HS, Dickson M, Dinenna M, Johnson AW, Perin MS, Holland PC, Baraban JM, Reti IM: Narp deletion blocks extinction of morphine place preference conditioning. *Neuropsychopharmacology* 34: 857-866, 2009

Cunningham CL, Crabbe JC, Rigter H: Pavlovian conditioning of drug-induced changes in body temperature. *Pharmacol Ther* 23: 365-391, 1983

Cunningham CL, Ferree NK, Howard MA: Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 170: 409-422, 2003

Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA: Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc* 1: 1662-1670, 2006a

Cunningham CL, Patel P, Milner L: Spatial location is critical for conditioning place preference with visual but not tactile stimuli. *Behav Neurosci* 120: 1115-1132, 2006b

Di Chiara G: Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 375: 13-30, 1999

Diano S, Naftolin F, Horvath TL: Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study. *Endocrinology* 138: 778-789, 1997

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61, 1999

Dong Y, Saal D, Thomas M, Faust R, Bonci A, Robinson T, Malenka RC: Cocaine-induced potentiation of synaptic strength in dopamine neurons: behavioral correlates in GluRA(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14282-14287, 2004

Eisch AJ, Harburg GC: Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus* 16: 271-286, 2006

Engblom D, Bilbao A, Sanchis-Segura C, Dahan L, Perreau-Lenz S, Balland B, Parkitna JR, Lujan R, Halbout B, Mameli M, Parlato R, Sprengel R, Luscher C, Schutz G, Spanagel R: Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron* 59: 497-508, 2008

Epstein DH, Preston KL, Stewart J, Shaham Y: Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology (Berl)* 189: 1-16, 2006

Frey MC, Sprengel R, Nevian T: Activity pattern-dependent long-term potentiation in neocortex and hippocampus of GluA1 (GluR-A) subunit-deficient mice. *J Neurosci* 29: 5587-5596, 2009

- Goudie AJ: Animal models of drug abuse and dependence. Kirjassa: Behavioural models in psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives, ss. 453-484, 1. painos. Toim. Willner P, University Press, Cambridge 1991
- Guo Y, Wang HL, Xiang XH, Zhao Y: The role of glutamate and its receptors in mesocorticolimbic dopaminergic regions in opioid addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 864-873, 2009
- Haney M, Spealman R: Controversies in translational research: drug self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 199: 403-419, 2008
- Harris GC, Wimmer M, Byrne R, Aston-Jones G: Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine. *Neuroscience* 129: 841-847, 2004
- Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE: Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides* 19: 1603-1630, 1998
- Holmes A, Hollon TR, Gleason TC, Liu Z, Dreiling J, Sibley DR, Crawley JN: Behavioral characterization of dopamine D5 receptor null mutant mice. *Behav Neurosci* 115: 1129-1144, 2001
- Howland RH: Glutamate-modulating drugs & the treatment of mental disorders. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* 45: 11-14, 2007
- Itzhak Y, Martin JL: Cocaine-induced conditioned place preference in mice: induction, extinction and reinstatement by related psychostimulants. *Neuropsychopharmacology* 26: 130-134, 2002
- IUPHAR database: Opioid receptors. Haettu 23.11.2009 internetistä:  
<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=50>
- Jane DE, Lodge D, Collingridge GL: Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56: 90-113, 2009
- Jensen V, Kaiser KM, Borhardt T, Adelman G, Rozov A, Burnashev N, Brix C, Frotscher M, Andersen P, Hvalby O, Sakmann B, Seeburg PH, Sprengel R: A juvenile form of postsynaptic hippocampal long-term potentiation in mice deficient for the AMPA receptor subunit GluR-A. *J Physiol* 553: 843-856, 2003
- Johnson SW, North RA: Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12: 483-488, 1992
- Kalivas PW: The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci* 10: 561-572, 2009
- Kauer JA, Malenka RC: Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8: 844-858, 2007



- Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH: A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249: 556-560, 1990
- Kew JN, Kemp JA: Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 4-29, 2005
- Knackstedt LA, Kalivas PW: Glutamate and reinstatement. *Curr Opin Pharmacol* 9: 59-64, 2009
- Koob GF: A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59: 11-34, 2008
- Koob GF, Le Moal M: What is addiction? Kirjassa: *Neurobiology of Addiction*, ss. 1-19, 1. painos. Academic Press, Lontoo 2006a
- Koob GF, Le Moal M: Neurobiological Theories of Addiction. Kirjassa: *Neurobiology of Addiction*, ss. 412-414, 1. painos. Academic Press, Lontoo 2006b
- Koob GF, Le Moal M: Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24: 97-129, 2001
- Kreek MJ, LaForge KS, Butelman E: Pharmacotherapy of addictions. *Nat Rev Drug Discov* 1: 710-726, 2002
- Lanteri C, Salomon L, Torrens Y, Glowinski J, Tassin JP: Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* 33: 1724-1734, 2008
- Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL: Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112: 631-643, 2003
- Liu QS, Pu L, Poo MM: Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* 437: 1027-1031, 2005
- Lodge D: The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. *Neuropharmacology* 56: 6-21, 2009
- Lu L, Xu NJ, Ge X, Yue W, Su WJ, Pei G, Ma L: Reactivation of morphine conditioned place preference by drug priming: role of environmental cues and sensitization. *Psychopharmacology (Berl)* 159: 125-132, 2002
- Malanga CJ, Kosofsky BE: Does drug abuse beget drug abuse? Behavioral analysis of addiction liability in animal models of prenatal drug exposure. *Brain Res Dev Brain Res* 147: 47-57, 2003

- Markou A, Koob GF: Construct validity of a self-stimulation threshold paradigm: effects of reward and performance manipulations. *Physiol Behav* 51: 111-119, 1992
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL: Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383: 819-823, 1996
- Mead AN, Brown G, Le Merrer J, Stephens DN: Effects of deletion of *gria1* or *gria2* genes encoding glutamatergic AMPA-receptor subunits on place preference conditioning in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 164-171, 2005
- Mead AN, Zamanillo D, Becker N, Stephens DN: AMPA-receptor GluR1 subunits are involved in the control over behavior by cocaine-paired cues. *Neuropsychopharmacology* 32: 343-353, 2007
- Meldrum BS: Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130: 1007S-15S, 2000
- Meririnne E, Seppälä T: Opiattiriippuvuuden neurobiologiaa. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 120: 951-959, 2004
- Milekic MH, Brown SD, Castellini C, Alberini CM: Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. *J Neurosci* 26: 3010-3020, 2006
- Molnar E, Baude A, Richmond SA, Patel PB, Somogyi P, McIlhinney RA: Biochemical and immunocytochemical characterization of antipeptide antibodies to a cloned GluR1 glutamate receptor subunit: cellular and subcellular distribution in the rat forebrain. *Neuroscience* 53: 307-326, 1993
- Moron JA, Gullapalli S, Taylor C, Gupta A, Gomes I, Devi LA: Modulation of Opiate-Related Signaling Molecules in Morphine-Dependent Conditioned Behavior: Conditioned Place Preference to Morphine Induces CREB Phosphorylation. *Neuropsychopharmacology* 2009 (painossa)
- Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, Ruppertsberg JP: A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* 266: 1059-1062, 1994
- Mueller D, Perdikaris D, Stewart J: Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. *Behav Brain Res* 136: 389-397, 2002
- Narita M, Funada M, Suzuki T: Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol Ther* 89: 1-15, 2001
- Nestler EJ: Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2: 119-128, 2001

Panlilio LV, Goldberg SR: Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction* 102: 1863-1870, 2007

Pickering C, Avesson L, Lindblom J, Liljequist S, Schioth HB: Identification of neurotransmitter receptor genes involved in alcohol self-administration in the rat prefrontal cortex, hippocampus and amygdala. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 53-64, 2007

Piepponen TP, Kivastik T, Katajamaki J, Zharkovsky A, Ahtee L: Involvement of opioid mu 1 receptors in morphine-induced conditioned place preference in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 275-279, 1997

Ping A, Xi J, Prasad BM, Wang MH, Kruzich PJ: Contributions of nucleus accumbens core and shell GluR1 containing AMPA receptors in AMPA- and cocaine-primed reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Brain Res* 1215: 173-182, 2008

Popik P, Wrobel M, Bisaga A: Reinstatement of morphine-conditioned reward is blocked by memantine. *Neuropsychopharmacology* 31: 160-170, 2006

Reisel D, Bannerman DM, Schmitt WB, Deacon RM, Flint J, Borchardt T, Seeburg PH, Rawlins JN: Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat Neurosci* 5: 868-873, 2002

Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Armario A, Minarro J: Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 185: 459-470, 2006

Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J: Reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice by priming injections. *Neural Plast* 10: 279-290, 2003

Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Minarro J: Long-lasting rewarding effects of morphine induced by drug primings. *Brain Res* 1050: 53-63, 2005

Robinson TE, Berridge KC: Addiction. *Annu Rev Psychol* 54: 25-53, 2003

Robinson TE, Berridge KC: The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18: 247-291, 1993

Romberg C, Raffel J, Martin L, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM, Paulsen O: Induction and expression of GluA1 (GluR-A)-independent LTP in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 29: 1141-1152, 2009

Salomon L, Lanteri C, Glowinski J, Tassin JP: Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7476-7481, 2006

- Sanchis-Segura C, Spanagel R: Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11: 2-38, 2006
- Sanderson DJ, Good MA, Skelton K, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM: Enhanced long-term and impaired short-term spatial memory in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice: evidence for a dual-process memory model. *Learn Mem* 16: 379-386, 2009
- Sayette MA, Shiffman S, Tiffany ST, Niaura RS, Martin CS, Shadel WG: The measurement of drug craving. *Addiction* 95 Suppl 2: S189-210, 2000
- Shippenberg TS, Zapata A, Chefer VI: Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. *Pharmacol Ther* 116: 306-321, 2007
- Spanagel R, Zieglgansberger W: Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci* 18: 54-59, 1997
- Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH: GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19: 2037-2050, 1999
- Stoll L, Hall J, Van Buren N, Hall A, Knight L, Morgan A, Zuger S, Van Deusen H, Gentile L: Differential regulation of ionotropic glutamate receptors. *Biophys J* 92: 1343-1349, 2007
- Todd BJ, Schwarz JM, Mong JA, McCarthy MM: Glutamate AMPA/kainate receptors, not GABA(A) receptors, mediate estradiol-induced sex differences in the hypothalamus. *Dev Neurobiol* 67: 304-315, 2007
- Toll L, Berzetei-Gurske IP, Polgar WE, Brandt SR, Adapa ID, Rodriguez L, Schwartz RW, Haggart D, O'Brien A, White A, Kennedy JM, Craymer K, Farrington L, Auh JS: Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Res Monogr* 178: 440-466, 1998
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H: Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11: S133-53, 2008
- Tzschentke TM: Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12: 227-462, 2007
- Tzschentke TM, Schmidt WJ: Glutamatergic mechanisms in addiction. *Mol Psychiatry* 8: 373-382, 2003
- Vekovischeva OY, Aitta-aho T, Echenko O, Kankaanpaa A, Seppala T, Honkanen A, Sprengel R, Korpi ER: Reduced aggression in AMPA-type glutamate receptor GluR-A subunit-deficient mice. *Genes Brain Behav* 3: 253-265, 2004

Vekovischeva OY, Zamanillo D, Echenko O, Seppala T, Uusi-Oukari M, Honkanen A, Seeburg PH, Sprengel R, Korpi ER: Morphine-induced dependence and sensitization are altered in mice deficient in AMPA-type glutamate receptor-A subunits. *J Neurosci* 21: 4451-4459, 2001

Veizina P, Leyton M: Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1: 160-168, 2009

Veizina P, Stewart J: Conditioned locomotion and place preference elicited by tactile cues paired exclusively with morphine in an open field. *Psychopharmacology (Berl)* 91: 375-380, 1987

White AM, Roberts DC, Best PJ: Context-specific tolerance to the ataxic effects of alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 107-110, 2002

Wiedholz LM, Owens WA, Horton RE, Feyder M, Karlsson RM, Hefner K, Sprengel R, Celikel T, Daws LC, Holmes A: Mice lacking the AMPA GluR1 receptor exhibit striatal hyperdopaminergia and 'schizophrenia-related' behaviors. *Mol Psychiatry* 13: 631-640, 2008

Will MJ, Der-Avakian A, Pepin JL, Durkan BT, Watkins LR, Maier SF: Modulation of the locomotor properties of morphine and amphetamine by uncontrollable stress. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 345-351, 2002

Wise RA, Bozarth MA: A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94: 469-492, 1987

Xiang Y, Gao H, Zhu H, Sun N, Ma Y, Lei H: Neurochemical changes in brain induced by chronic morphine treatment: NMR studies in thalamus and somatosensory cortex of rats. *Neurochem Res* 31: 1255-1261, 2006

Yoshimura M, Wu PH, Hoffman PL, Tabakoff B: Overexpression of type 7 adenylyl cyclase in the mouse brain enhances acute and chronic actions of morphine. *Mol Pharmacol* 58: 1011-1016, 2000

Zaki PA, Bilsky EJ, Vanderah TW, Lai J, Evans CJ, Porreca F: Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 379-401, 1996

Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Koster HJ, Borchardt T, Worley P, Lubke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B: Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284: 1805-1811, 1999

Zhang D, Zhang H, Jin GZ, Zhang K, Zhen X: Single dose of morphine produced a prolonged effect on dopamine neuron activities. *Mol Pain* 4: 57, 2008

Zhong W, Dong Z, Tian M, Cao J, Xu T, Xu L, Luo J: Opiate withdrawal induces dynamic expressions of AMPA receptors and its regulatory molecule CaMKIIalpha in hippocampal synapses. *Life Sci* 79: 861-869, 2006