

**VENTRAALISEN PALLIDUMIN
OPIOIDIRESEPTORIEN MERKITYS
ALKOHOLIRIIPPUUUDESSA**

**Ville Suo-Yrjö
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologia ja toksikologia**

Syyskuu 2010

SISÄLLYSLUETTELO

KÄYTETYT LYHENTEET

I KIRJALLISUUSKATSAUS

1 JOHDANTO	1
2 PÄIHTEET JA RIIPPUVUUS	2
3 ETANOLI	4
3.1 Etanolin farmakokinetiikka	4
3.2 Etanolin reseptorivaikutukset keskushermostossa	5
3.2.1 GABAergiset reseptorit	5
3.2.2 Glutamatergiset reseptorit	7
4 RIIPPUVUUDEN NEUROBIOLOGIA	8
4.1 Mesolimbinen dopamiinirata	8
4.2 Striatopallidaalinen rata	10
4.3 Ventraalinen pallidum	10
4.4 Etanolin vahvistavien ominaisuuksien erityispiirteet	14
5 ENDOGEENINEN OPIOIDIJÄRJESTELMÄ	15
5.1 Etanolin vaikutus opioidijärjestelmään	17
5.2 Ventraalisen pallidum opioiderginen säätely	19
6 ALKOHOLIRIIPPUVUUDEN ELÄINMALLIT	22
6.1 AA- ja ANA-rottakannat	22
6.2 Opioidergisen järjestelmän erot AA ja ANA rotilla	23

II KOKEELLINEN OSA

1. JOHDANTO	26
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	27
2.1 Eläimet	27
2.2 Käytetyt yhdisteet	27
2.3 Etanolin kulutus	28
2.4 Leikkaus ja kanyylien asennus	30
2.4.1 Bregman määrittäminen	31
2.5 Koeryhmät ja lääkeaineet	32
2.6 Mikroinjektiokokeet	33
2.7 Histologia	36
2.8 Tilastollinen analyysi	36
3. TULOKSET	37
3.1 Injektiopaikan sijainnin tarkastaminen	37
3.2 DAMGO-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen	37
3.3 CTOP-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen	40
3.4 DPDPE-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen	41
3.5 Naltrindoli-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen	42
3.6 U50488H-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen	43
3.7 Nor-BNI-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen	44
4. TULOSTEN TARKASTELU	45
4.1 Ventraalisen pallidumin μ -opioidi reseptorit	45
4.2 Ventraalisen pallidumin δ -opioidi reseptorit	48
4.3 Ventraalisen pallidumin κ -opioidi reseptorit	49
4.4 Koeasetelma	50
4.5 Tilastollinen tarkastelu	51
4.6 Mikroinjektiot	52
4.6.1 Mikroinjektion aiheuttamat kudospaauriot	53
5. POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	54
6. YHTEENVETO	57
7. KIITOKSET	58
KIRJALLISUUSLUETTELO	59

KÄYTETYT LYHENTEET

AA	Alko Alcohol
AMP	Adnosiini monofosfaatti
AMPA	α -amino-3-hydroksi-5-metyyli-isoksatsoli-4-propionihappo
ANA	Alko Non Alcohol
ANOVA	Varianssianalyysi (Analysis Of Variance)
AP	Anteroposteriorinen
C _{max}	Lääkeaineen huippupitoisuus
CTOP	D-Phe-Cys-Trp-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂ (μ -opioidi reseptoriantagonisti)
CYP 450	Sytokromi P450-etsyymi järjestelmä
DAMGO	[D-Ala ₂ , NMe-Phe ₄ , Gly-ol ₅]-enkefaliini (μ -opioidi reseptoriagonisti)
DPDPE	[D-Pen ₂ , D-Pen ₅]-enkefaliini (δ -opioidi reseptoriagonisti)
DOPAC	3, 4-dihydroksifenyyliaasetahappo
DV	Dorsaaliventraalinen
GABA	γ -aminovoihappo
GABA _A	γ -aminovoihapporeseptorin A-alatyypin reseptori
GABA _B	γ -aminovoihapporeseptorin B-alatyypin reseptori
i.v.	Intravenoosi (laskimonsisäinen)
i.p.	Intraperitoneaalinen (vatsakalvonsisäinen)
s.c.	Subkutaaninen (ihonalainen)
KA	Keskiarvo
MHPG	3-metoksi-4-hydroksi-fenyyliglykoli
ML	Mediaalilateraalinen
MRI	Magneettikuvaus (Magnetic Resonance Imaging)
NAcc	Accumbens-tumake
NMDA	N-metyyli-D-aspartaatti
Nor-BNI	Nor-binaltorfimiini dihydrokloridi (κ -opioidi reseptoriantagonisti)
PDYN	Prodynorfiini
PENK	Proenkefaliini

POMC	Opiomelanokortiini
SEM	Keskiarvon keskivirhe
SN	Mustatumake
T _{max}	Lääkeaineen huippupitoisuuden ajankohta
U50488H	κ-opioidireseptoriagonisti
VP	Ventraalinen pallidum
VTA	Ventraalinen tegmentaalin alue
6-OHDA	6-hydroksidopamiini

KIRJALLISUUSKATSAUS

1 JOHDANTO

Alkoholismi on krooninen sairaus joka on yhteiskunnallisesti merkittävä terveydellinen ongelma (Gilpin ja Koob 2008). Alkoholin (etanolin) juomisen neurobiologisten vaikutusten ymmärtäminen ja se miten hallittu alkoholin käyttö lopulta kehittyy alkoholiriippuvuudeksi, ovat kysymyksiä joihin alkoholiriippuvuutta tarkasteleva perustutkimus pyrkii saamaan vastauksia. Alkoholiriippuvuuden taustalla olevien neuronaalisten mekanismien selvittäminen on merkittävässä roolissa myös kehitettäessä uusia lääkkeitä ja hoitomuotoja alkoholiriippuvuuteen. Etanolin humalluttavan ja addiktoivan vaikutuksen perusteita ei, lukuisista tutkimuksista huolimatta, tunneta vielä hyvin (Kiiänmaa 2003). Tiedetään kuitenkin että etanoli vaikuttaa aivoissa välittäjäainejärjestelmiin jotka säätelevät palkitsemiseen ja stressiin liittyviä mekanismeja (Gilpin ja Koob 2008).

Lähes kaikki päihteenä käytetyt aineet lisäävät dopamiinin vapautumista mesolimbisen dopamiiniradan päätepisteenä olevassa accumbens-tumakkeessa (Koob ja Volkow 2010). Tämän takia niiden vaikutukset on liitetty tiiviisti dopaminergisen järjestelmän toimintaan (Wise 2002). Mesolimbisen dopamiiniradan toiminta näyttää olevan välttämätön esimerkiksi kokaiinin ja amfetamiinin palkitsevien vaikutusten osalta. Etanolin kohdalla palkitsevat vaikutukset näyttäisivät kuitenkin välittyvän, ainakin osittain, mesolimbisesta dopamiiniradasta poikkeavia neuronaaalisia reittejä pitkin (Kiiänmaa ja Hyytiä 2003). Tätä puoltaa havainto jonka mukaan mesolimbisen dopamiiniradan hermoyhteyksien tuhoaminen accumbens-tumakkeessa ei vaikuta etanolin kulutukseen rotilla (Koistinen ym. 2001). Etanolin mahdollinen vaikutuskohta mielihyväjärjestelmässä saattaa siten olla accumbens-tumakkeen suoran stimulaation lisäksi, accumbens-tumakkeesta ventraalinen pallidumiin projisoituvat GABA- ja opioidergiset haarakesolut, sekä ventraalinen pallidumin GABA- ja opioidergiset reseptorit. Ventraalinen pallidum on aivojen rakenne jota pidetään mielihyväradan viimeisenä rakenteena ja sen on todettu välittävän luonnollisen mielihyvään ja päihteisiin liittyvää vahvistumista (Smith ym. 2009).

Pro gradu tutkielman kirjallisessa osassa tarkastellaan etanolin tärkeimpinä pidettyjä keskushermostovaikutuksia, sekä riippuvuuden neurobiologiaa ja sitä miten etanoli riippuvuutta aiheuttavana aineena poikkeaa muista päihteinä käytetyistä aineista.

Lisäksi käsitellään alkoholiriippuvuuden tutkimisessa käytettävää AA- ja ANA-rottakantaa. Riippuvuuden käsittely painottuu mesolimbisen dopamiiniradan, ventraalisen pallidumin ja opioidergisen järjestelmän merkitysten havainnollistamiseen etanolin vahvistavien mekanismien säätelijöinä. Huomioitavaa on painottaa näkemystä ventraalisen pallidumin roolista lähinnä etanolin liittyvän juomiskäyttäytymisen säätelyssä, mikä puolestaan voi vaikuttaa alkoholin normaalin juomisen kehittymiseen alkoholiriippuvuudeksi. Alkoholiriippuvuus kokonaisuudessaan on aihealueena niin laaja, että sen kokonaisvaltainen käsittely ei tämän tutkielman puitteissa ole mahdollista.

2 PÄIHTEET JA RIIPPUVUUS

Päihteet ovat farmakologisesti aktiivisia aineita joita käytetään nautinnon tai huumaavan vaikutuksen aikaansaamiseksi, ilman että aineen käyttöön liittyy terapeutista tarkoitusta (Kiianmaa ja Hyytiä 2003). Päihteiksi luokiteltavia aineita ovat alkoholi ja huumeet.

Päihderiippuvuus (addiktio) on krooninen relapsoiva sairaus joka johtaa yksilön fyysisen ja psyykkisen terveyden merkittävään heikkenemiseen (Koob ja Le Moal 1997, Kiianmaa ja Hyytiä 2003). Sille on ominaista pakonomainen tarve käyttää riippuvuutta aiheuttavaa ainetta ja vaikeuksia rajoittaa sen käyttöä terveydellisistä ja sosiaalisista ongelmista huolimatta. Päihderiippuvuudelle on lisäksi ominaista elimistön kasvava kyky sietää ainetta, sekä vieroitusoireiden ilmaantuminen aineen käytön loputtua (Kiianmaa ja Hyytiä 2003).

Riippuvuuteen keskeisesti liittyviä käsitteitä ovat huumehimo, toleranssi, herkistyminen, positiivinen ja negatiivinen vahvistumien sekä fyysinen ja psyykinen riippuvuus (Tacke ja Tuomisto 2007). Riippuvuudelle erittäin tyypillistä on huumehakuisuus, josta tulee elämää kontrolloiva tekijä kun yksilö käyttää siihen jatkuvasti enemmän aikaa ja vaivaa. Riippuvuuteen liittyvä pakonomainen tarve voi johtaa siihen, että riippuvuutta aiheuttavasta aineesta ja sen saamisesta tulee elämän keskeisimpiä asioita. Tästä johtuen yksilö voi laiminlyödä tärkeitä arkirutiineja, kuten

työssäkäyntiä, mikä puolestaan voi johtaa kyvyttömyyteen huolehtia omasta tai perheen toimeentulosta.

Huumehakuisuus johtuu riippuvuutta aiheuttavan aineen vahvistavista mekanismeista (Tacke ja Tuomisto 2007). Vahvistumisella tarkoitetaan prosesseja joissa vaste tai käyttäytyminen ainetta kohtaa muuttuu aiempien aineeseen liittyvien kokemusten perusteella (Gilpin ja Koob 2008) Vahvistavat ärsykkeet, eli vahvisteet voidaan jakaa positiivisiin ja negatiivisiin. Positiivisilla vahvisteilla tarkoitetaan tapahtumia, jotka saavat yksilössä aikaan miellyttäviä tunteita, kun ainetta käytetään tai hakeudutaan ympäristöön joka liittyy aineen käyttöön (Kiiänmaa ja Hyytiä 2003). Niillä ajatellaan olevan tärkeä merkitys, etenkin päihteiden käytön alkuvaiheessa, ennen kuin varsinaista riippuvuutta on syntynyt (Gilpin ja Koob 2008). Negatiiviset vahvisteet taas ovat epämiellyttäviä tunteita, kuten vieroitusoireita, joita ilmenee aineen poistuttua elimistöstä (Kiiänmaa ja Hyytiä 2003).

Toleranssilla tarkoitetaan päihteiden toistuvaan käyttöön liittyvää ilmiötä, jonka seurauksena elimistö sopeutuu aineen hermostollisiin vaikutuksiin (Kiiänmaa ja Hyytiä 2003). Tämän takia käytetyn aineen samanlaisen vaikutuksen aikaansaamiseksi tarvitaan kerta kerran jälkeen suurempia annoksia. Toleranssin kehittyminen päihteiden erilaisille vaikutuksille vaihtelee, eikä sitä näytä kehittyvän päihteiden psyykkisille vaikutuksille samoin kuin huumaaville vaikutuksille.

Herkistymisen johtuu siitä, että päihteet aktivoivat hermoston mekanismeja jotka tuottavat mielihyvää (Gilpin ja Koob 2008). Mitä enemmän ja pidempään päihdettä käytetään, sitä enemmän motivaatio alkaa kohdistua päihteiden saamiseen ja lopulta johtaa sairaalloiseen himoon (craving) päihdettä kohtaan. Alkoholille herkistymistä ei ole varmuudella pystytty osoittamaan, joten sen merkitystä alkoholin pitkäaikaisvaikutuksille ei tunneta hyvin (Kiiänmaa 2003).

Addiktiota aiheuttavaa ainetta kohtaan liittyy joko fyysistä tai psyykkistä riippuvuutta tai näitä molempia yhdessä (Tacke ja Tuomisto 2007). Fyysinen riippuvuus on seurausta päihteiden jatkuvasta käytöstä (Kiiänmaa ja Hyytiä 2003). Kun ainetta on koko ajan elimistössä, johtaa se elimistön homeostaasin muuttumiseen siihen suuntaan, että aineen läsnäolon mukaisesta olotilasta tulee elimistön normaali tila. Kun päihteiden

krooninen käyttö loppuu ja aine poistuu elimistöstä, seuraa tästä homeostaasin järkkäminen, mikä puolestaan johtaa vieroitusoireisiin. Jos ainetta saadaan pian uudestaan, vieroitusoireet katoavat.

Psyykinen riippuvuus johtuu päihteen mielihyvää tuottavista ominaisuuksista jotka vahvistavat toistuvaa päihteen käyttöä (Kiianmaa 2003). Psykkisestä riippuvuudesta puhutaan kun yksilö käyttää ainetta toistuvasti ja pakonomaisesti, tarkoituksenaan tuottaa sillä mielihyvää tai lievittää henkistä huonoa oloa.

3 ETANOLI

Etanoli on maailmalla sosiaalisesti hyväksytty nautinto- ja huumausaine (Korpi 2007a). Se on eniten käytetty päihde maailmassa, jos kofeiinia ja nikotiinia ei oteta huomioon (Kiianmaa 2003). Etanoli on farmakologisesti heikkotehoinen aine ja sitä tarvitaan suhteellisen suurina pitoisuuksina vaikutusten aikaansaamiseksi (Korpi 2007a). Jos sitä ei nautita liikaa saadaan aikaan mielihyvää tuottavia vaikutuksia, mutta suurina annoksina etanoli lamaa keskushermoston toimintaa. Etanoli on riippuvuutta aiheuttava aine jolla on useita vaikutuksia elimistön aineenvaihduntaan ja toimintaan.

3.1 Etanolin farmakokinetiikka

Etanolin imeytyminen on nopeaa (Korpi 2007a). Etanolimolekyyli on pieni, joten se kulkeutuu helposti solukalvojen läpi (Matsumoto ym. 2002). Se jakaantuu koko elimistön vesitilaan, eikä sitoudu kuljettajaproteiineihin (Korpi 2007a). Etanolin huippupitoisuus veressä (C_{max}) saavutetaan noin tunnin (T_{max}) kuluttua annostelusta. Jos etanolia nautitaan tyhjään vatsaan, huippupitoisuus saavutetaan 20 - 30 minuutin kuluttua annostelusta. Etanoli eliminoituu pääasiassa maksan kautta ja sen eliminoituminen noudattaa 0-asteen kinetiikka (Matsumoto ym. 2002). Suurin osa etanolista metaboloituu maksan sytoplasmisen alkoholidehydrogenaasin vaikutuksesta (Korpi 2007a). Maksa hapettaa etanolin asetaldehidiksi, joka puolestaan hajoaa asetaatiksi mitokondriaalisen aldehydihydrogenaasin vaikutuksesta. Asetaatti kulkeutuu edelleen lihaksiin ja sydämeen, jossa se pilkkoutuu lopulta hiilidioksidiksi ja vedeksi.

Pieni osa etanolista metaboloituu myös maksan sytokromi P450 2E1-entsyymin vaikutuksesta.

3.2 Etanolin reseptorivaikutukset keskushermostossa

Etanolilla on monimutkainen farmakologia ja sillä on suoria ja epäsuoria vaikutuksia useisiin reseptoreihin ja proteiineihin (Vengeliene ym. 2008). Se häiritsee niiden toimintaa ja vaikuttaa suurilla annoksilla jopa solukalvoproteiinien järjestäytymiseen (Korpi 2007b). Nykytietämyksen mukaan suorat reseptorivaikutukset kohdistuvat A-tyypin γ -aminovoihappo- (GABA_A), N-metyyli-D-aspartaattityypin (NMDA) glutamaatti-, strykniiniherkkiin glysiini-, serotoniini 5-HT_3 - ja nikotiinisiin asetyylikoliinireseptoreihin (nAChR) sekä purinergisiin P_{2X} -reseptoreihin (Korpi ja Setälä 1998, Vengeliene 2008). Näiden lisäksi etanoli vaikuttaa L-tyypin Ca^{2+} -kavaviin sekä G-proteiinikytkentäisiin K^+ -kanaviin (GIRKs). Etanolin suorista reseptorivaikutuksista tärkeimpinä voidaan pitää vaikutuksia GABA_A - ja NMDA-reseptoreihin (Krystal ym. 2003, Krystal ym. 2006). GABA ja glutamaatti ovat välittäjäaineita jotka säätelevät aivojen toiminnan kannalta tärkeitä tasapainottavia toimintoja ja etanolin vaikutukset käyttäytymiseen muistuttavat paljon GABA-agonistien ja glutamaattiantagonistien vaikutuksia (Korpi 1990, Korpi 2006). Koska etanoli vaikuttaa GABA_A -reseptorien toimintaa voimistavasti ja NMDA-reseptorien toimintaa heikkentävästi, nettovaikutuksena seuraa keskushermoston toimintojen hidastuminen. Jos veren etanolipitoisuus on riittävän suuri, voi seurauksena olla sammuminen eli anestesia.

Etanoli vaikuttaa edellä kuvattujen primaaristen reseptorivaikutusten lisäksi useisiin muihin välittäjäainejärjestelmiin, joista ainakin dopaminergista ja opioidergista järjestelmää pidetään merkittävänä alkoholiriippuvuuden kannalta (Gilpin ja Koob 2008). Etanolin vaikutukset näihin järjestelmiin välittyvät osittain edellä kuvattujen reseptorien säätelyn kautta. Tämän lisäksi etanolin uskotaan vaikuttavan riippuvuuteen liittyviin mekanismeihin suoraan opioidiergisen järjestelmän säätelyn kautta.

3.2.1 GABAergiset reseptorit

Gamma-aminovoihappo (GABA) on aivojen tärkein inhibitorinen välittäjäaine ja GABAergisten reseptoreiden endogeeninen ligandi (Koulu ja Tuomisto 2007). Sitä sijaitsee eri osissa aivoja, etenkin lyhyissä välineuroneissa jotka säätelevät muiden neuronien toimintaa. GABAergisiä reseptoreita on kahta päätyyppiä, jotka ovat GABA_A ja GABA_B (Krystal ym. 2006). Kumpaankin näistä reseptorityypeistä esiintyy ei-GABAergisen neuronin postsynaptisessa kalvomembraanissa ja ne säätelevät ei-GABAergisen neuronin toimintaa presynaptisesta GABAergisestä neuronista vapautuvan γ -aminovoihapon (GABA) välityksellä. GABA_B reseptorityyppiä löytyy myös presynaptisista neuroneista.

GABA_A-reseptorit koostuvat viidestä eri alayksiköstä ja ne muodostavat solukalvon läpi kulkevia ionikanavareseptoreita (Krystal ym. 2006). Eri alayksikkötyyppiä on paljon (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ_{1-3} ja π_{1-2}) joten GABA_A-reseptorien mahdollisten konformaatioiden määrä on suuri. GABA_A-reseptorit päästävät lävitseen kloridi-ioneja ja näin hyperpolarisoivat eli inhiboivat kohdesolujen toimintaa.

GABA_B-reseptori on G-proteiinikytkentäinen metabotrooppinen reseptori joka välittää hitaita pre- ja postsynaptisia potentiaaleja (Cooper ym. 2003). GABA_B-reseptorin aktivaatio saa aikaan muutoksia Ca²⁺ ja K⁺-ionikanavien toiminnassa toisiolähettien välityksellä. Sen hyperpolarisoiva eli inhibitorien vaikutus johtuu K⁺-ionien sisäänvirtauksen ja Ca²⁺-ionien ulosvirtauksen lisääntymisestä, sekä adenylaattisyklaasin toiminnan estosta.

Etanoli voi lisätä aivojen GABA aktiivisuutta kahden eri mekanismin kautta (Gilpin ja Koob 2008). Etanoli voi vaikuttaa GABAn vapautumiseen vaikuttamalla presynaptiseen GABAergiseen neuroniiin. Etanoli voi sitoutua myös postsynaptiseen neuroniiin, jossa se säätelee GABA_A-reseptorin aktiivisuutta. Alkoholin juonti vähenee kun GABA_A-reseptorien toimintaa estetään tai kun GABA_B-reseptorin toimintaa aktivoidaan accumbens-tumakkeen, ventraalisen pallidumin tai amygdalan alueella (Koob 2004). Näistä etenkin amygdalan keskiosan tumakkeeseen, alueeseen joka on tärkeä tunnetilojen säätelyssä, vaikuttaminen GABAergisillä aineilla saa aikaan

alkoholin juonnin vähentymisen (Hyytiä ja Koob 1995). GABA aktiivisuutta nostaa sekä akuutti, että krooninen alkoholin käyttö (Roberto ym. 2003 ja 2004).

Krooninen alkoholin käyttö saa aikaan muutoksia GABAergisessä järjestelmässä (Gilpin ja Koob 2008). Tietyillä aivoalueilla alkoholi vaikuttaa GABA_A-reseptoreiden osia koodaavien geenien ilmentymiseen siten, että GABA-reseptorien α_1 -alayksiköiden määrä vähenee ja α_4 -alayksiköiden määrä kasvaa (Biggio ym. 2007). Tutkimusten perusteella on ilmennyt myös, että alkoholi vaikuttaa lisäämällä GABA_A-reseptoreiden toimintaa säätelevien ns. neuroaktiivisten steroidien määrää aivoissa (Lambert ym. 2001).

3.2.2 Glutamatergiset reseptorit

Glutamaatti on aivojen eksitoiva välittäjäaine jonka vaikutukset välittyvät usean glutamaattireseptorityypin kautta (Gilpin ja Koob 2008). Glutamaattireseptoreja ovat NMDA-, AMPA-(α -amino-3-hydroksi-5-metyyli-isoksatsoli-4-propionihappo), ionotrooppiset kainaatti- sekä metabotrooppiset glutamattireseptorit (mGluR) (Krystal ym. 2003). Etanolin vaikutusten kannalta tärkein näistä on N-metyyli-D-aspartaatti-(NMDA) reseptori, johon etanolimolekyylillä on suuri affiniteetti. Normaalitytilanteessa NMDA-reseptorin endogeeninen ligandi glutamaatti aktivoi reseptorin ja saa aikaan Ca²⁺-ionien sisään virtauksen kohdesoluun. NMDA-reseptorin aktivaatio lisää myös natrium- ja kaliumionien soluun kulkeutumista. Etanolimolekyylin sitoutuu NMDA-reseptorin hydrofobiseen kohtaan ja estää näin reseptoria aktivoivien säätelijöiden toimintaa.

Glutamaatti on jo pitkään liitetty alkoholin akuuttiin annosteluun liittyviin vahvistaviin mekanismeihin ja etanolin vaikutuksia on pystytty mallintamaan NMDA-reseptorin antagonisteilla (Colombo ja Grant 1992). Akuutti etanolin annostelu laskee striatumin ekstrasellulaarisen glutamaatin pitoisuutta (Carboni ym. 1993). Etanolin akuutti annostelu myös vaimentaa glutamaattivälitteisen signaalinvälityksen amygdalan keskiosan tumakkeeseen ja tämä vaikutus vahvistuu etanolin käytön kroonistumisen myötä (Roberto ym. 2004). NMDA-reseptoreiden osallisuus alkoholiriippuvuudessa on mielenkiintoinen myös sen takia, että NMDA-reseptoreilla on tärkeä tehtävä neuroplastisuuden kannalta (Pulvirenti ja Diana 2001). Tällä voidaan olettaa olevan

merkitystä hallitun, mutta jatkuvan alkoholin käytön muuttumisessa alkoholiriippuvuudeksi.

4 RIIPPUVUUDEN NEUROBIOLOGIA

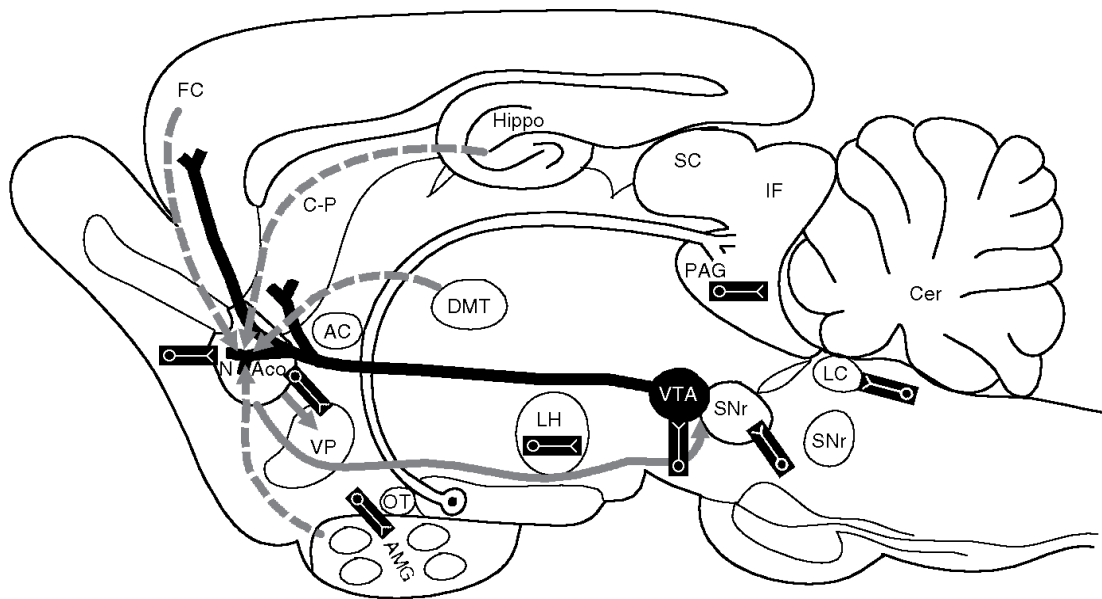
Päihteinä käytetyt aineet matkivat tai vahvistavat keskushermoston endogeenisten välittäjäaineiden toimintaa (Wise 1996). Koska käytännössä lähes kaikki riippuvuutta aiheuttavat aineet, lukuun ottamatta muutamia poikkeuksia, vapauttavat dopamiinia accumbens-tumakkeessa, on niiden vaikutukset liitetty mesolimbisen dopamiiniradan toimintaan (Di Chiara ja Imperato 1988, Leone ym. 1991, Kiiänmaa ja Hyytiä 2003, Trigo ym. 2009).

4.1 Mesolimbisen dopamiinirata

Mielihyvää tuottavat toiminnat vaikuttavat ja ohjaavat käyttäytymistä ns. mielihyväradan kautta (Wise 2002). Se on eri aivoalueilta alkunsa saavien neuronien muodostama kokonaisuus, joka on liitetty monien päihteiden vahvistaviin ominaisuuksiin (Trigo ym. 2009). Mielihyväradan keskeisimpiä rakenteita on mesolimbisen dopamiinirata (Gilpin ja Koob 2008). Normaali tilanteessa se säätelee sitä, kuinka elimistö reagoi mielihyvää tuottaviin asioihin, kuten syömiseen, juomiseen ja seksuaalisiin toimintoihin. Mesolimbisen dopamiiniradan tehtävänä on muovata ja suodattaa näihin ns. luonnollisiin palkitsijoihin liittyviä impulsseja, sekä integroida ne motivaatioon ja motorisiin toimintoihin (Kiiänmaa ja Hyytiä 2003). Päihteiden osalta tilanne on erilainen, koska ne voivat vaikuttaa suoraan mesolimbisen dopamiiniradan toimintaa ja näin aiheuttaa voimakkaita mielihyväkokenemuksia.

Mesolimbisen radan aktivoituminen johtaa lisääntyneeseen dopamiinin vapautumiseen accumbens-tumakkeessa ja tämä on mekanismi jota pidetään keskeisenä mielihyväväikutuksen synnyssä (Kiiänmaa ym. 2003). Mesolimbisen dopamiinirata saa alkunsa ventraalisesta tegmentaalisesta alueesta (Wise 2002). Ventraalisesta tegmentaalisesta alueesta kulkeutuu dopaminergisia neuroneita accumbens-tumakkeeseen sekä etuaivokuoreen. Näitä dopamiiniratoja hermottavat etuaivokuoresta lähtevät glutamatergiset neuronit, accumbens-tumakkeesta ja musta-tumakkeesta

lähtevät GABAergiset neuronit sekä pedunculopontisen tegmentumin tumakkeesta lähtevät kolinergiset neuronit (Wise 2002, Vengeliene ym. 2008). Tämän lisäksi kannabinoidi- ja opioidergiset reseptorit vaikuttavat dopamiinin vapautumiseen accumbens-tumakkeessa säätelemällä ventraalisen tegmentaalisen alueen dopaminergisten neuroneiden aktiivisuutta. Mesolimbisen dopamiiniradan ventraalisen tegmentaalisen alueen ja accumbens-tumakkeen dopaminergista aktiivisuutta säätelee myös dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonerginen järjestelmä. Mesolimbisen dopamiinirata ja sen toimintaan keskeisesti liittyvät aivoalueet on esitty kuvassa 1.



Kuva 1. Riippuvuuden kannalta keskeiset aivoalueet ja yhteydet rotan aivoissa. Mesolimbisen dopamiinirata on esitetty mustalla. Se saa alkunsa ventraalisesta tegmentaalisesta alueesta (VTA) ja se hermottaa accumbens-tumaketta (N/Acc) ja etuaivokuorta (FC). AMG = amygdala, VP = ventraalinen pallidum. (Kuva kirjasta Farmakologia ja toksikologia 2007, Koulu ja Tuomisto)

Todisteita mesolimbisen dopamiiniradan tärkeydestä päihteisiin liittyvien vahvistavien mekanismien säätelijänä on useita. Esimerkiksi amfetamiinin, dopamiinia vapauttavan lääkeaineen, annostelu tällä alueelle johtaa sen itseannosteluun (Hoebel ym. 1983) sekä aiheuttaa ehdollistettua paikkahakuisuutta rotilla (Carr ja White 1983). Samoin kokaiini, dopamiinin takaisinoton estäjä, saa aikaan itseannostelua kun sitä annostellaan accumbens-tumakkeeseen rotilla (Pierce ja Kumaresan 2006). Puolestaan neurotoksiineilla tehdyt leesiot mesolimbisen dopamiiniradan alueelle estävät kokaiinin ja amfetamiinin aiheuttaman vahvistumisen (Koob ja Volkow 2010). Mesolimbisen radan toimintaa ei kuitenkaan nykytietämyksen mukaan pidetä välttämättömänä kaikkien

palkitsevuutta aiheuttavien päihteiden, kuten opioidien tai etanolin kohdalla ja accumbens-tumakkeen dopamiinipitoisuutta sääteleekin suoraan esimerkiksi endogeeninen opioiderginen järjestelmä (Trigo ym. 2009).

4.2 Striatopallidaalinen rata

Mielihyväradan viimeisen osan muodostavat striatopallidaalinen rata sekä ventraalinen pallidum (Wise 2002). Striatopallidaaliseksi radaksi kutsutaan accumbens-tumakkeesta ventraaliseen pallidumiin projisoituvia haarakesoluja (Jonhson ja Napier 1997). Ventraalisesta tegmentaalisesta alueesta lähtöisin oleva mesolimbinen dopamiinirata synapsoi haarakesolujen kanssa accumbens-tumakkeessa (Wise 2002). Haarakesolujen accumbens-tumakkeessa sijaitsevilla postsynaptisilla päissä on niiden toimintaa sääteleviä dopamiini-, glutamaatti-, kannabinoidi- ja opioidireseptoreita. Suurin osa haarakesoluista on GABAergisiä, jonka lisäksi niissä esiintyy substanssi P:tä ja enkefaliinia (Zahm ym. 1985, Farrar ym. 2008). Haarakesolut säätelevät ventraalisen pallidumin aktiivisuutta vapauttamalla GABAa ja opioidergisiä välittäjäaineita ventraalisen pallidumiin projisoituvista presynaptista hermopäätteistä (Chrobak ja Napier 1993, Olive ym. 1997, Napier ja Mirtovic 1999). Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että striatopallidaalinen rata ja ventraalinen pallidum ovat tärkeitä opiaattien ja psykostimulanttien palkitsevuuden säätelyssä (Hubner ja Koob 1990, Gong ym. 1996, 1997).

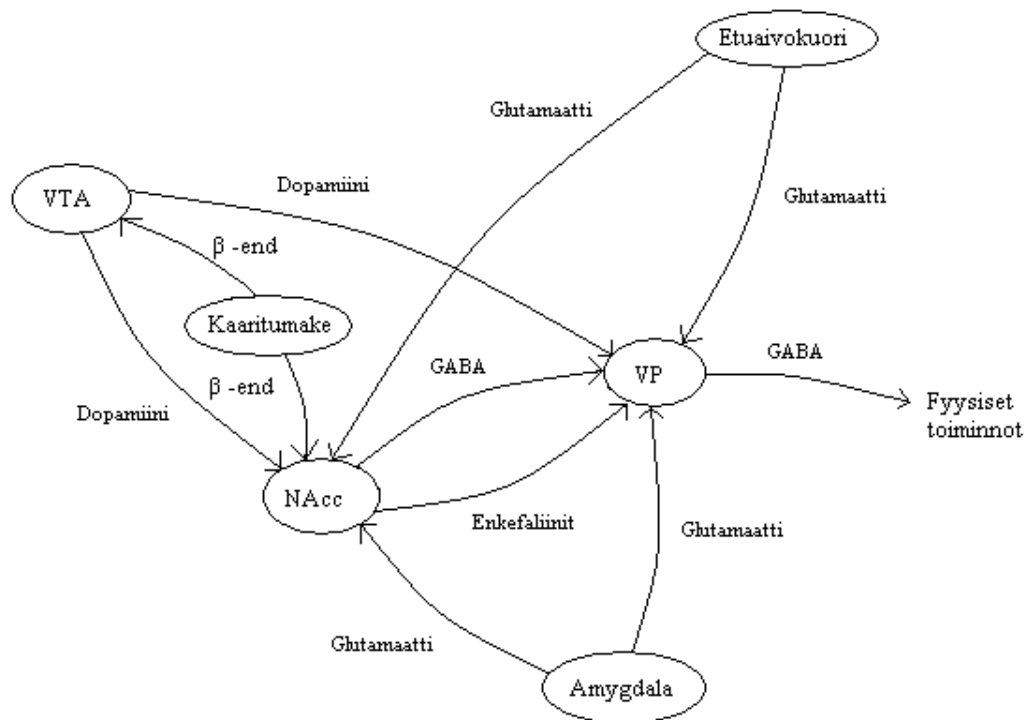
4.3 Ventraalinen pallidum

Ventraalinen pallidum sijaitsee etuaivojen ventraalisessa osassa ja se on keskeinen rakenne aivojen limbisessä järjestelmässä (Mogenson ym 1980, Smith ym. 2009). Sen tiedetään välittävän luonnolliseen mielihyvään ja päihderiippuvuuteen liittyviä toimintoja (Cromwell ja Berridge 1993, Johnson ym. 1996, Stratford ym. 1999, Wise 2002, June ym. 2003, Caille ja Parsons 2004, Tindell ym. 2004). Näiden lisäksi ventraalinen pallidum säätelee motoriikkaan liittyvää käyttäytymistä yhdessä globus palliduksen kanssa (Olive ja Maidment 1998). Ventraalisen pallidumin merkitystä mielihyväjärjestelmässä on tutkittu paljon ja sitä pidetään välttämättömänä normaalin palkitsevuuskäyttäytymisen toiminnan kannalta (Smith ym. 2009). Ensimmäisiä todisteita sen mahdollisesti tärkeästä roolista mielihyväjärjestelmässä olivat rotilla

tehdyt kokeet, joissa ne oppivat painamaan toistuvasti vipua saadakseen aktivoivan sähkösignaalin suoraan ventraaliseen pallidumiin (Paganis ym. 1995 ja 1997). Se on myös ainoa tunnettu aivojen rakenne jossa paikalliset leesiot saavat aikaan rotille normaalisti vastustamattoman sakkaroosiliuoksen juomisen loppumisen ja saavat ne välttelemään sitä (Smith ym. 2009). Myös sakkaroosin aiheuttama paikkapreferenssi estyy ventraalisen pallidumiin tehtyjen leesioiden seurauksena (McAlonan ym. 1993). Lisää tukea ventraalisen pallidumin roolista palkitsevuuteen liittyvän motivaation säätelijänä antavat rotilla tehdyt tutkimukset, joissa on havaittu, että ventraalisen pallidumin inaktivaatio eri lääkaineilla tai leesioilla, vähentää rottien taipumusta painaa vipua saadakseen i.v. annostelua kokaiinia tai sähköstimulaatiota mediaaliseen etuaivokimppuun (Smith ym. 2009). Myös i.v. heroiinin itseannostelu vähenee huomattavasti ventraaliseen pallidumiin tehtyjen leesioiden seurauksena Wistar rotilla tehtyjen tutkimusten perusteella (Hubner ja Koob 1990).

Ventraalisella pallidumilla on striatopallidaalisen radan lisäksi useita sekä afferentteja että efferentteja hermoyhteyksiä muille aivoalueille (Kuva 2) (Johnson ja Napier 1997). Ventraalista palliumia hermottavat amygdalasta tulevat GABA- ja glutamatergiset radat, etuaivokuoresta tuleva glutamaterginen rata sekä ventraaliselta tegmentaaliselta alueelta alkunsa saava mesopallidaalinen dopamiinirata (Zahm ym. 1985, Chrobak ja Napier 1993, Gong ym. 1998). Lisäksi accumbens-tumakkeesta ja caudate-tumakkeesta tulee paljon enkefalinergistä hermotusta ventraaliseen pallidumiin (Olive ja Maidment 1998).

Ventraalisesta pallidumista puolestaan projisoituu GABAergisiä yhteyksiä accumbens-tumakkeeseen, ventraaliseen tegmentaaliseen alueeseen, motorisille aivoalueille ja mediaalis-dorsaaliseen talamukseen (Kalivas ja Volkow 2005). Ventraalisen pallidumin yhteydet muodostuvat aivoalueille jotka säätelävät kognitioon, motoriikkaan ja palkitsevuuteen liittyviä toimintoja (Napier ja Mitrovic 1999, Smith ym. 2009). Tämän takia ventraalisen pallidumin ajatellaan olevan palkitsevuusjärjestelmän osa, joka linkittää limbisen järjestelmän ja motorisen säätelyn alueet toisiinsa.



Kuva 2. Ventraalisen pallidumin afferentit hermoyhteydet. Ventraalisesta tegmentaalisesta alueesta projisoituu ventraaliseen pallidumiin mesopallidaalinen dopamiinirata. Etuaivokuoresta ja amygdalasta tulee ventraaliseen pallidumiin glutamatergistä hermotusta. Accumbens-tumakkeesta lähtee ventraaliseen pallidumiin GABA- sekä opioidergisiä hermoyhteyksiä. Lisäksi esitetty kaaritumakkeesta lähtevät β -endorfiinia vapauttavat neuronit jotka projisoituvat ventraaliseen tegmentaaliseseen alueeseen ja accumbens-tumakkeeseen. VP = ventraalinen pallidum, VTA = ventraalinen tegmentaalisuusalue, NAcc = accumbens-tumake. (Kuva mukailten Smith ym. 2009)

Accumbens-tumakkeesta lähtevät haarakesolut vastaavat ventraalisen pallidumin GABAergisestä säätelystä. Ne pitävät yllä toonista kloridi-ionien sisäänvirtausta ventraalisessa pallidumissa ja näin inhihoivat sen toimintaa (Smith ym. 2009). GABA-, dopamiini-, opioidi- ja kannabinoidireseptori agonistit sekä glutamaatti AMPA-reseptorin antagonistit annosteltuna suoraan accumbens-tumakkeeseen saavat aikaan motivoitumista päihteisiin ja muihin mielihyvää tuottaviin asioihin. Motivoitumista välittävät toiminnot aiheutuvat ilmeisesti kyseisten reseptorien toiminnan säätelyn vaikutuksista accumbens-tumakkeesta ventraaliseen pallidumiin projisoituvien haarakesolujen aktiivisuuteen. Haarakesolujen inaktivaatio saa aikaan GABA:n vapautumisen vähenemisen ventraalisessa pallidumissa mikä johtaa siihen, että ventraalinen pallidum vapautuu GABAergisestä inhibitiosta. GABAergisen inhibition vähentyminen johtaa ventraalisesta pallidumista motorisista ja behavioraalisista

toiminnoista vastaaville aivoalueille lähtevien GABAergisten yhteyksien disinhiboitumiseen. Teorian mukaan näiden efferenttien GABAergisten neuroniyhteyksien disinhibiatio saa aikaan GABAn vapautumisen lisääntymisen motorisilla aivoalueilla ja näin välittää mielihyväradan säätelemiä käyttäytymistoimintoja. Todisteita ventraalisen pallidumin GABAergisen säätelyn merkityksestä mielihyvän vahvistumiseen liittyvässä ketjussa on useita, joista esimerkkejä lueteltu taulukossa 1.

Taulukko 1. Ventraaliseen pallidumiin annosteltujen GABAergisten lääkeaineiden vaikutus palkitsevuutta aiheuttavien aineiden kulutukseen.

Lääkeaine	Tutkimus	Vaikutus	Julkaisu
Bikukulliini	(GABA _A -antagonisti)	Ruoankulutuksen lisääntyminen rotilla	Stratford ym. 1999
Muskimoli	(GABA _A -agonisti)	Rotilla aversio sakkarroosia kohtaan	Shimura ym. 2006
Muskimoli	(GABA _A -agonisti)	Etanolin juomisen lasku AA-rotilla	Kempainen ym. 2009
Baklofeeni	(GABA _B -agonisti)	Etanolin juomisen lasku AA-rotilla	Kempainen ym. 2009

Ventraalinen pallidum on myös suoraan dopaminergisen säätelyn alainen ventraalisesta tegmentaalisesta alueesta projisoituvan mesopallidaalisen dopamiiniradan kautta (Napier ym. 1991, Klitennick ym. 1992, Gong ym. 1998, Geisler ym. 2008). Tällä hermoradalle tiedetään olevan tärkeä, mutta vielä epäselvä tehtävä ventraalisen pallidumin toiminnan säätelyssä (Smith ym. 2009). Dopamiinin tärkeää roolia ventraalisen pallidumin toiminnan moduloinnissa tukevat kuitenkin useat tutkimukset. Esimerkiksi ventraaliseen pallidumiin suoraan annosteltu amfetamiini ja kokaiini aiheuttavat ehdollistettua paikkahakuisuutta ja itseannostelua (Gong ym. 1996). 6-OHDA leesiot ventraalisen pallidumin dopaminergisiin hermopäätteisiin puolestaan estävät ehdollistetun paikkahakuisuuden kehittymisen kroonisen kokaiinin annostelun yhteydessä (Gong ym. 1997). Lisäksi tiedetään, että systeemisesti ja paikallisesti annosteltuna kokaiini nostaa ventraalisen pallidumin solunulkoista dopamiinin määrää.

4.4 Etanolin vahvistavien ominaisuuksien erityispiirteet

Etanolin tiedetään nostavan accumbens-tumakkeen dopamiinipitoisuutta kuten useat muutkin päihteet (Di Chiara ja Imperato 1988). Esimerkiksi akuutti etanoli-injektio (i.p.) nostaa dopamiinipitoisuutta accumbens-tumakkeessa (Yim ym. 1998). Yksi ehdotettu mekanismi dopamiinipitoisuuden nousun taustalla on etanolin vaikutus ventraalisen tegmentaalisesta alueesta accumbens-tumakkeeseen projisoituvien dopamiinineuroneiden aktiivisuutta (Gessa ym. 1985, Brodie ym. 1990). Toisaalta on tehty myös tutkimuksia joissa paikallisesti accumbens-tumakkeeseen annostelu etanolia on nostanut sen solunulkoisen dopamiinin määrää (Wozniak ym. 1991, Benjamin ym. 1993), joten asia ei siis ole aivan yksiselitteinen.

Vaihtoehtoinen teoria on taas se kannalla, että etanolin vaikutus accumbens-tumakkeen dopamiinin olisi riippumaton mesolimbisen dopamiiniradan toiminnasta (Pierce ja Kumaresan 2006). Päätelmä pohjaa useista tutkimuksissa saatuihin tuloksiin, joiden perusteella mesolimbisen dopamiiniradan alueelle tehdyt leesiot tai dopaminergisten terminaalien tuhoaminen accumbens-tumakkeessa, eivät vaikuta etanolin itseannosteluun rotilla (Lyness ja Smith 1992, Rassnick ym. 1993, Ikemoto ym. 1997, Koistinen ym. 2001). Kun taas rotilla, joilta accumbens-tumakkeen dopaminergiset terminaalit on tuhottu 6-OHDA:lla, annostellaan naltreksonia, havaitaan etanolin kulutuksen väheneminen (Koistinen ym. 2001). Edellä mainitut tutkimustulokset puoltavat oletusta mesolimbisesta dopamiiniradasta riippumattomista reiteistä etanolin vahvistumismekanismien taustalla. Lisäksi havainnot siitä, että pelkkä dopamiiniradan toiminnan estäminen ei vähennä etanolin kulutusta, mutta tähän lisäksi annosteltu opioidiantagonisti vähentää, antaa syytä olettaa opioidergisellä järjestelmällä olevan suuri merkitys etanoliin liittyvissä vahvistumismekanismeissa.

5 ENDOGEEININEN OPIOIDIJÄRJESTELMÄ

Endogeeniset opioidit ovat elimistön itse tuottamia molekyylijä jotka muistuttavat vaikutukseltaan morfiinia ja niiden on jo pitkään ajateltu olevan yhteydessä ruoan, huumeiden, etanolin ja muiden palkitsevien tekijöiden mielihyvää ja motivoitumista välittäviin mekanismeihin (Akil ym. 1998, Gilpin ja Koob 2008). Tämän lisäksi niillä on oleellinen merkitys analgesian ja mielialan säätelyssä (Kieffer ja Gaveriaux-Ruff 2002) Opioidireseptorien ja niiden ligandien, endogeenisten opioidien, merkitystä aivojen palkitsemisjärjestelmässä pidetään tärkeänä ja niitä esiintyy aivoalueilla joiden tiedetään säätelevän tätä järjestelmää (Trigo ym. 2009). Näihin aivoalueisiin kuuluvat ainakin accumbens-tumake, ventraalinen pallidum, amygdala, etuaivokuori ja hypotalamus (Delfs ym. 1994, Mansour ym. 1993, 1994, 1995).

Endogeeniset opioidit muodostuvat prekursorimolekyyleistä joita ovat pro-opiomelanokortiini (POMC), proenkefaliini (PENK) ja prodynorfiini (PDYN) (Trigo ym. 2009). Näistä muodostuvat aktiiviset endorfiinipeptidit. Pro-opiomelanokortiinista muodostuu β -endorfiini, proenkefaliinista met- ja leu-enkefaliini ja prodynorfiinista dynorfiinit ja neo-endorfiinit (Herz 1997, Kieffer ja Cavérieaux-Ruff 2002). Ne kaikki välittävät vaikutuksensa opioidireseptorien kautta, joihin niillä jokaisella on erilainen affiniteetti (Trigo ym. 2009). β -endorfiinilla ja enkefaliinilla on suurin affiniteetti μ -että δ -opioidireseptoreihin, kun taas dynorfiinilla on suurin affiniteetti κ -opioidireseptoreihin (Corbett ym. 1982, Akil ym. 1984). Keskushermostossa endorfiineja tai enkefaliineja paikantuu lähinnä alueille, joilla voidaan osoittaa olevan runsaasti opioidireseptoreja. Enkefaliineja esiintyy muun muassa lyhyissä välineuroneissa ja ne välittävät paikallisia vaikutuksia, kun taas β -endorfiinia esiintyy hypofyyysi-hypotalamusalueella, etenkin kaaritimakkeessa, josta sen ajatellaan säätelevän hermoston toimintaa pitkien hermoratojen ja hormonien tavoin.

Opioidireseptorit jaetaan kolmeen ryhmään jotka ovat μ - δ - ja κ -opioidireseptorit (Akil ym. 1998). Reseptorit voidaan jakaa vielä alatyyppeihin (μ_1 ja μ_2 , δ_1 ja δ_2 , κ_1 , κ_2 , κ_3) Kaikki kolme opioidireseptorityyppiä välittävät vaikutuksena $G_{i/o}$ -proteiinien kautta (Trigo ym. 2009). Opioidireseptorit vaikuttavat suoraan G-proteiinin välityksellä estämällä syklisen AMP:n muodostumista ja jänniteherkkien kalsiumkanavien toimintaa sekä avaamalla kaliumikanavia (Sarne ym. 1996, Law ym. 2000).

Opioidireseptoreja sijaitsee sekä neuronien pre- että postsynaptisissa päissä, ja niiden aktivoituminen johtaa solukalvon hyperpolarisoitumiseen (Chesselet 1984, Jiang ja North 1992, Olive ym. 1997). Presynaptisessa hermopääteessä opioidireseptorien aktivaatio estää välittäjäaineiden vapautumista. Postsynaptisessa päässä opioidireseptorien aktivaatio estää hermoimpulssin etenemistä. Opioidiagonistien solukohtainen vaikutus on siis inhibitorien. Opioidireseptorien merkitys jonkin tietyn hermoradan kokonaisaktiivisuudessa saattaa silti olla kiihottava (Koulu ja Tuomisto 2007).

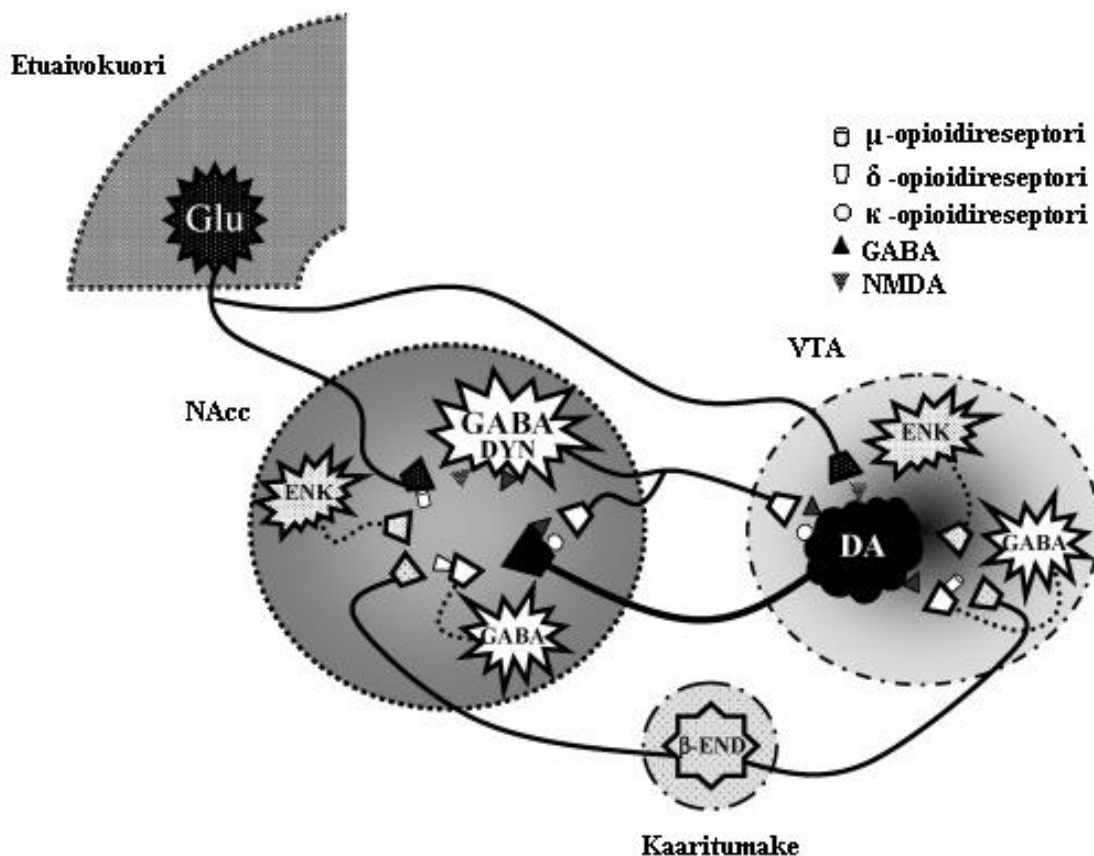
Eksogeenisten opioidien, kuten morfiinin, annostelu aktivoi mesolimbista dopamiinirataa pääasiassa ventraalisen tegmentaalisesta alueen sekä accumbens-tumakkeen opioidireseptorien kautta ja opioidien annostelu ventraaliseen tegmentaalisesta alueeseen aiheuttaa rotilla näiden aineiden itseannostelua (Bozarth 1987, Wise 2002). Ventraalisen tegmentaalisesta alueella opioidit sitoutuvat μ -opioidireseptoreihin jotka sijaitsevat GABAergisissä välineuroneissa (Jonhson ja North 1992, Bonci ja Williams 1997). Tämä vähentää GABAergistä inhibitiota, jonka seurauksena ventraalisesta tegmentaalisesta alueesta accumbens-tumakkeeseen kulkevan dopaminergisen neuronin aktiivisuus lisääntyy ja sen accumbens-tumakkeessa sijaitsevista terminaalista päistä vapautuu dopamiinia. Opioidireseptorit säätelevät myös ventraalisesta tegmentaalisesta alueelta alkunsa saavan mesopallidaalisen dopamiiniradan toimintaa ja voivat näin säädellä ventraaliseen pallidumiin kohdistuvaa dopaminergistä hermotusta ilman, että mesolimbinen rata osallistuu siihen (Napier ja Mitrovic 1999). Tämän mekanismin merkitys on kuitenkin epäselvä. Nykytietämyksen mukaan opioidireseptoreihin vaikuttavien endogeenisten opioidien yhtenä tehtävänä on vapauttaa mielihyväradan rakenteet GABAergisestä inhibiosta, mikä puolestaan johtaa palkitsevuusmekanismien aktivoitumiseen (Trigo ym. 2009).

Ventraalisen tegmentaalisesta alueen lisäksi opioidireseptorit voivat säädellä accumbens-tumakkeen solunulkoisen dopamiinin määrää myös vaikuttamalla suoraan siinä sijaitseviin opioidireseptoreihin (Trigo ym. 2009). Accumbens-tumakkeessa on kaikkia kolmea opioidireseptorityyppiä (μ , δ , κ) (Mansour ym. 1987, Sharif ym. 1989). Näistä ainakin μ - ja δ_2 -reseptoreiden aktivaatio saa aikaan dopamiinikonsentraation nousun accumbens-tumakkeessa (Yoshida ym. 1999, Murakawa ym. 2004, Hirose ym. 2005,

Okutsu ym. 2006). κ -Reseptorien aktivaatio saa puolestaan aikaan laskun solunulkoisen dopamiinin pitoisuudessa (Spanagel ym. 1992).

5.1 Etanolin vaikutus opioidijärjestelmään

Etanoli lisää muiden päihteiden tapaan solunulkoisen dopamiinin määrää accumbens-tumakkeessa ja tiedetään että dopamiinin vapautumista säätelee mesolimbisen dopamiiniradan lisäksi endogeeninen opioidijärjestelmä (Trigo ym. 2009). Arvellaan, että etanolin palkitsevat vaikutukset ja alttius etanolin suurentuneeseen kuluttamiseen välittyisivät merkittävässä määrin endogeenisen opioidijärjestelmän kautta (Herz 1997, Cowen ja Lawrence 1999, Cowen ym. 2004). Tiedetään että etanoli lisää β -endorfiinien ja dynorfiinien vapautumista keskiaivoissa ja ventraalisessa tegmentaalisessa alueessa kohtuullisilla annoksilla, mutta suuremmilla annoksilla myös amygdalassa (Jarjour ym. 2009). Oletettu mekanismi endorfiinien vapautumisen taustalla on aivoissa etanolia hapettavan katalaasientsyymin, sekä etanolin metaboliatuotteen asetaldehydin muodostumisen seurauksena lisääntynyt opioidipeptidien neurotransmissio etuaivojen hypotalamisesta kaariturmakkeesta (Reddy ja Sarkar 1993, Herz 1997, Pastor ym. 2004, Sanchis-Segura ym. 2005). Kaariturmake on aivojen alue josta kulkeutuu β -endorfiineja vapauttavia neuroneita eri aivoalueille, näistä etanolin kannalta kiinnostavimpia ovat accumbens-tumake ja ventraalinen tegmentaalin alue (kuva 3). Kaariturmakeesta alkunsa saavien opioidergisten neuronien merkitystä etanoliin liittyvissä vahvistumismekanismieissa tukee tutkimus jossa havaittiin, että leesiot kaariturmakeen β -endorfiineja syntetisoiviin neuroneihin estävät etanolin indusoiman lokomotorisen aktiivisuuden kasvun rotilla (Sanchis-Segura ym. 2005). On myös havaittu, että β -endorfiinin suhteen poistogeenisten hiiret juovat etanolia vähemmän, verrattuna hiiriin joilla β -endorfiinin määrä on normaali (Racz ym. 2008).



Kuva 3. Kaaritimakkeesta projisoituvat opioidergiset neuronit. Kaaritimakkeesta projisoituu β -endorfiinia vapauttavia neuroneita accumbens-tumakkeeseen (NAcc) ja ventraaliseen tegmentaaliseseen alueeseen (VTA). Kuvasta näkyy myös eri opioidireseptorityyppien sijoittuminen ei-opioidergisten neuronien hermopäätteisiin. Kuvassa näkyy myös etuivokuoresta projisoituva glutamaterginen hermorata. (Kuva mukailten Trigo ym. 2009).

Etanolin ja opioidergisen järjestelmän yhteyttä alkoholiriippuvuudessa on havainnollistettu useilla tutkimuksilla. Esimerksiki δ -opioidireseptoriantagonisti naltrindolin annostelu suoraan accumbens-tumakkeeseen estää kokonaan etanolin indusoiman solunulkoisen dopamiinin määrän kasvun accumbens-tumakkeessa (Acquas ym. 1993). Myös epäspesifin opioidiantagonistin naltreksonin systeeminen annostelu estää accumbens-tumakkeeseen paikallisesti annostellun etanolin indusoiman dopamiinin ja sen metaboliatuotteen DOPAC:n kasvun rotilla (Benjamin ym. 1993). Tämän lisäksi μ -opioidireseptorin suhteen poistogeenisillä hiirillä on havaittu, että etanolin vaikutus accumbens-tumakkeen dopamiinin määrään kasvuun on heikentynyt (Job ym. 2007). Sama reaktio dopamiinin pitoisuudessa havaittiin hiirillä, joille annettiin spesifistä μ -opioidiantagonistia. Merkittävänä näyttönä alkoholiriippuvuuden ja opioidergisen järjestelmän yhteydestä voidaan pitää naltreksonin käytön tehoa

alkoholiriippuvuuden hoidossa ihmisillä (Weis ja Porrino 2002). Koska todisteet viittaavat selkeästi etanolin ja opioidergisen järjestelmän väliseen yhteyteen, ei voida jättää huomiotta tutkimusta jossa accumbens-tumakkeeseen tehdyillä 6-OHDA leesioilla ei havaittu vaikutusta rottien heroiinin, lääkeaineen joka vaikuttaa voimakkaasti opioidergiseen järjestelmään, itseannosteluun (Petit ym. 1984). Kokaiinin itseannosteluun leesioilla puolestaan oli vaikutusta. Tutkimustulos on mielenkiintoinen sen takia, että myös etanolin kohdalla on havaittu että leesiot mesolimbisen dopamiiniradan alueelle eivät vähennä etanolin juomista rotilla (Koistinen ym. 2001). Saattaa siis olla, että näiden aineiden välillä on yhteisiä neuronaalaisia reittejä joiden välityksellä niiden vahvistavat mekanismit välittyvät.

Kuten edellä on mainittu, etanolin vaikutuksen dopamiinin vapautumiseen accumbens-tumakkeessa on arveltu välittyvän ventraalisen tegmentaalisesta alueen kautta, mutta useat tutkimukset antavat kuitenkin syytä epäillä tätä, koska niiden perusteella ventraalisesta tegmentaalisesta lähtevän mesolimbisen radan toiminnan estämisellä ei ole vaikutusta rottien etanolin kulutukseen. Etanolin voi siis olettaa vaikuttavan accumbens-tumakkeen dopamiinin määrään muiden reittien kautta ja opioiderginen järjestelmä vaikuttaa olevan tähän hyvä vaihtoehto.

5.2 Ventraalisen pallidumin opioiderginen säätely

GABAergisten haarakesolujen ja mesopallidaalisen dopamiiniradan lisäksi ventraalisen pallidumin kautta välittyvän palkitsevuuskäyttäytymisen säätelyyn osallistuu opioiderginen järjestelmä (Mitrovic ja Napier 1995). Opioiderginen järjestelmä voi säädellä ventraalisen pallidumin välittämää palkitsevuuteen liittyvää toimintaa vaikuttamalla suoraan ventraalisessa pallidumissa sijaitseviin opioidireseptoreihin tai vaikuttamalla sen afferenttien neuronien aktiivisuuteen. Ventraalisessa pallidumissa on runsaasti opioidireseptoreja ja niiden toiminta on keskeistä päihteiden itseannostelun ja ehdollistetun paikkahakuisuuden kannalta (Smith ym. 2009).

Systemisesti että suoraan ventraaliseen pallidumiin ionofroeesin avulla annostelu opioidiagonisti morfiini muuttaa ventraalisen pallidumin neuronien aktiivisuutta rotilla (Napier ja Mitrovic 1999). Ventraalisen pallidumin merkitystä opioidergisen toiminnan kautta tapahtuvassa mielihyvän säätelyssä vahvistaa myös tutkimus, jossa suoraan

ventraaliseen pallidumiin annostellulla μ -opioidiantagonistilla CTOP:lla (D-Phe-Cys-Try-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂) saatiin aikaiseksi morfiinin indusoiman behavioraalisen herkistymisen estyminen Sprague-Dawley rotilla (Johnson ja Napier 2000). On myös havaittu että perifeerisesti annosteltu morfiini lisää annosriippuvaisesti ventraalisen pallidumin enkefaliinien määrää (Olive ym. 1995). Lisäksi μ - ja δ -opioidiagonistien annostelu suoraan ventraaliseen pallidumiin vaikuttaa met- ja leu-enkefaliinien vapautumiseen (Olive ja Maidment 1998). Matalat konsentraatiot kyseisiä agonisteja lisäävät met- ja leu-enkefaliini määrää ventraalisessa pallidumissa, mutta suuret konsentraatiot vähentävät näiden peptidien vapautumista. Olive ryhmineen (1997) on havainnut, että enkefaliinin vapautumista striatopallidaalisesta radasta säätelevät presynaptiset μ -opioidireseptorit, sekä postsynaptiset δ -opioidireseptorit pallidaalisen takaisinkytkentäjärjestelmän kautta.

Elektrofysiologisten tutkimusten mukaan ventraalisessa pallidumissa on kaikkia kolmea opioidireseptorityyppiä ja näistä μ -opioidireseptoreja on eniten (Moskowitz ja Googman 1984, Lahti ym. 1989). Eri opioidireseptorityypit eivät ole jakaantuneet tasaisesti koko ventraalisen pallidumin alueella, vaan niitä esiintyy eri tiheyksinä eri kohdissa ventraalista pallidumia (Mitrovic ja Napier 1995). μ -reseptorityyppiä esiintyy tiheimmin ventraalisen pallidumin etuosassa (anteriorinen) kuin takaosassa (posteriorinen) ns. infrakomissuraalisessa osassa. Suurin tiheys κ -reseptoreita on ventraalisen pallidumin keskiosassa ja δ -reseptorit ovat jakaantuneet tasaisesti koko ventraalisen pallidumin alueelle (Moskovittz ja Goodman 1984, Lahti ym. 1989). Huolimatta μ -reseptorien suurimmasta esiintymisestä ventraalisen pallidumin etuosassa, on havaittu että ventraalisen pallidumin takaosassa sijaitsee 0,84 mm² kokoinen alue jossa on paljon μ - opioidireseptoreja (Smith ja Berridge 2005). Sakkaroosiliuoksen juonnin yhteydessä tälle alueelle annosteltu μ -opioidireseptori agonisti DAMGO ([D-Ala², NMe-Phe⁴, Gly-ol⁵]-enkefaliini) saa rotilla aikaan hedonisten ärsykkeiden aikaansaamien reaktioiden (rotille tyypilliset kielen liikkeet ja kypälän nuoleminen) lisääntymisen, jonka lisäksi motivoituminen sakkaroosin juontia kohtaan kasvaa (Smith ym 2009). Huomioitavaa on, että nämä vaikutukset tulevat ilmi vain, kun lääkeaine annostellaan takimmaiseen osaan ventraalista pallidumia (Smith ja Berridge 2005). Mielenkiintoinen havainto on, että kyseinen opioidireseptorikeskus sijaitsee samalla alueella jossa leesiot aiheuttavat aversiota sakkaroosia kohtaan ja lakkauttavat motivaation syömiseen (Cromwell ja Berridge 1993). Ventraalisen

pallidumin keskelle tai etuosaan annosteluna μ -opioidiagonisti saa aikaan päinvastaisia vaikutuksia kuin takaosaan annosteltuna, minkä takia on ajateltu että ventraalisen pallidumin eri osilla on erilainen rooli mielihyvän säätelyketjussa (Smith ym. 2009). Tätä puoltaa myös ihmisillä tehdyt aivojen toiminnalliset magneettikuvaukset (funktionaalinen MRI), joissa on havaittu lisääntyneitä aktiivisuutta ventraalisen pallidumin takaosassa ruokahalua herättävien ruoka-aineiden kuvien katsomisen aikana (Beaver ym. 2006, Calder ym. 2007). Samoin on havaittu ventraalisen pallidumin etuosan lisääntyneitä aktiivisuutta näytettäessä kuvia pilaantuneesta ruoasta. Ventraalisen pallidumin etu- ja takaosan opioidireseptorien merkitystä palkitsevuusmekanismien säätelyssä havainnollistaa myös tutkimus, jossa opioidiagonisti annosteltuna mikroinjektiolla suoraan ventraaliseen pallidumin takaosaan rotilla lisäsi motivaatiota vivun painamiseen kallonsisäisen itsestimulaation (intracranial self-stimulation) aikaansaamiseksi mediaaliseen etuaivokimppuun (Johnson ym. 1993). Etuosaan annosteltuna sama lääkeaine laski vivun painamisen määrään alle kontrollitason. Smith tutkimusryhmineen (2009) on pohtinut mahdollisia syitä ventraalisen pallidumin etu- ja takaosan stimulaation eroavaisuuksissa mielihyväjärjestelmässä. Ensinnäkin ventraalisen pallidumin takaosassa on suuremmat enkefaliinipitoisuudet kuin etuosassa (Maidment ym. 1989, Holt ym. 2004) ja takaosassa on myös havaittu olevan enemmän kolinergisiä neuroneita (Bengtson ja Osborne 2000). Kolmas havainto on, että posteriorisessa päässä on vähemmän presynaptisia μ -opioidireseptoreja kuin anteriorisessa osassa (Olive ym. 1997).

On ilmeistä, että opioidergisellä järjestelmällä on tärkeä, mutta monimutkainen merkitys ventraalisen pallidumin toiminnan säätelyssä. Kun samalla tiedetään opioidergisen järjestelmän olevan tärkeä etanolin kulutuksen säätelyssä, ei ventraalisen pallidumin opioidergistä järjestelmää voi jättää huomiotta alkoholiriippuvuuteen liittyvissä mekanismeissa. Kuten edellä on tullut ilmi, todisteet viittaavat myös siihen, että etanolin vahvistavat mekanismit ovat riippumattomia mesolimbisen dopamiiniradan toiminnasta. Mielihyväradassa ei mesolimbisen dopamiiniradan päätepisteen, eikä motorisista ja motivaationaalista toiminnoista vastaavien aivoalueiden välillä ole muita rakenteita kuin ventraalinen pallidum, joten on todennäköistä että striatopallidaalisen radan sekä ventraalisen pallidumin, ja etenkin näiden opioidergisten säätelymekanismien toiminnalla on merkittävä rooli etanolin vahvistavien mekanismien säätelyssä. Siten ventraalisen pallidumin opioidergisen

järjestelmän vaikutusta etanolin kulutukseen voidaan hyvillä perusteilla pitää relevanttina tutkimuksen kohteena.

6 ALKOHOLIRIIPPUVUUDEN ELÄINMALLIT

Suurin osa päihteinä käytetyistä lääkeaineista aiheuttaa positiivista vahvistumista eläimillä (Stolerman 1992). Etanolin on havaittu aiheuttavan vahvistumista useilla eläinlajeilla (Hyytiä ja Sinclair 1988) ja jo vuodesta 1940 on tiedetty, että tietyt jyrsijät (rotat ja hiiret) juovat etanolia vapaaehtoisesti (Spanagel 2000). Useimmin tehtävät alkoholiriippuvuustutkimukset mittaavat eläinten mieltymystä etanolin kulutukseen, kun ne saavat valita vapaasti veden ja etanolin väliltä. Koska aivoalueet jotka säätelevät etanoliin liittyviä vahvistumismekanismeja ovat säilyneet lähes muuttumattomina evoluution aikana, voidaan jyrsijämallien avulla saada merkityksellistä tietoa etanolin kulutukseen liittyvistä neurobiologista perusteista ihmisessä. On selvää, että yhdelläkään eläinmallilla ei pystytä mallintamaan täysin ihmisen alkoholiriippuvuutta, mutta eläinmallit ovat hyvä työkalu tutkittaessa tiettyjä yksittäisiä prosesseja tässä addiktion tyypissä (Koob ja Volkow 2010).

6.1 AA ja ANA rottakannat

Alkoholia (etanolia) suosivat AA (Alko Alcohol) ja alkoholia välttävät ANA (Alko Non Alcohol) rottakannat on kehitetty Alkon tutkimuslaboratoriossa vuonna 1960 (Eriksson 1968, Sinclair ym. 1989, Kiiänmaa ym. 1991). Ne on jalostettu Wistar sekä Sparague – Dawley roduista kaksisuuntaisella jalostuksella, perustuen siihen kuinka paljon ne juovat vapaavalintaisesti 10 % (v/v) etanolia, kun sitä, vettä ja ruokaa on rajattomasti saatavilla. AA ja ANA rotat poikkeavat etanolin kulutuksen suhteen toisistaan paljon. Tämä on havaittavissa kun tarkastellaan näiden kahden rottakannan keskimääräistä etanolin kulutusta vuorokautta kohden. Kun 10 % etanolia ja vettä on vapaasti saatavilla ympäri vuorokauden, AA rotat juovat absoluuttista etanolia 5-7 g/kg/vrk ja ANA rotat alle 1 g/kg/vrk (Sommer ym. 2006). Käytettäessä pakotetun juomisen mallia, missä ainoa tarjolla oleva neste on 12 % etanoli-vesiliuos, ei näiden kahden rottakannan etanolin kulutus eroa edellä mainitusta (Sarviharju ym. 2001). Eroa näiden kahden eri rottakannan etanolin kulutuksessa ei voida selittää esimerkiksi

etanolin metabolianopeudesta johtuvilla syillä, koska mittauksissa joissa etanolia on annettu yhtä suuret annokset i.p. injektiona AA ja ANA rotille, on aivojen etanolin pitoisuuden havaittu olevan yhtä suuri kannasta riippumatta (Kiiänmaa ym. 1995, Nurmi ym. 1994).

AA ja ANA rottien välillä on havaittu eroja palkitsemiseen liittyvien välittäjäainejärjestelmien toiminnassa (Sommer ym. 2006). Näiden erojen avulla on pyritty tutkimaan alkoholiriippuvuuden kannalta tärkeitä mekanismeja. Etenkin opioiderginen järjestelmä ja erot siinä ANA ja AA rottien välillä ovat johtaneet mielenkiintoisiin havaintoihin, jotka auttavat ymmärtämään paremmin alkoholiriippuvuuden monimutkaista perustaa.

6.2 Opioidergisen järjestelmän erot AA ja ANA rottilla

Opioidergisen järjestelmän merkitystä AA-rottien etanolin kulutukseen on tutkittu käyttäen opioidergiseen järjestelmään vaikuttavia agonisteja ja antagonisteja etanolin annostelun yhteydessä (ks. Sommer ym. 2006). Tämän lisäksi on tehty useita neurokemiallisia tutkimuksia, joiden perusteella AA ja ANA rottakantojen välillä on löydetty mielenkiintoisia eroja opioidergisessä järjestelmässä. Esimerkiksi AA rotilla hypotalamisen β -endorfiini spontaani vapautuminen on vähäisempää kuin ANA rotilla (De Waele ym. 1994). AA rotilla havaitaan kuitenkin korkeampi pro-opiomelanokortiinin (POMC) pitoisuutta säätelevän mRNA:n pitoisuus kaaritumakkeessa verrattuna ANA rottiin (Gianoulakis ym. 1992, Marinelli ym. 2000). Pro-enkefaliinin pitoisuudet ovat pienempiä accumbens-tumakkeessa ja pro-dynorfiini pitoisuudet pienempiä VTA:ssa AA rotilla kuin ANA rotilla (Nylander ym. 1994). Mielenkiintoista on kuitenkin että etanolin annostelun yhteydessä accumbens-tumakkeen pro-enkefaliini pitoisuus nousee AA rotilla enemmän etanolin kuin ANA rotilla.

AA ja ANA rottakantojen välillä on havaittu myös eroa opioidergisten reseptorien jakaantumisessa (Sommer ym. 2006). AA rotilla on enemmän μ -opioidireseptoreja accumbens-tumakkeessa ja etuaivokuoressa kuin ANA rotilla (De Waele ym. 1995, Marinelli ym. 2000). ANA rotilla on puolestaan enemmän κ -opioidireseptoreja hypotalamuksen alueella kuin AA rotilla. Mielenkiintoista on se, että κ -

opioidi reseptorien aktiivisuuden ajatellaan liittyvän aversioreaktioon (Mitchell ym. 2005, Logrip ym. 2009). δ -opioidi reseptorien levittäytymisessä eri aivoalueille ei ole havaittu ero AA ja ANA rottien välillä (De Waele ym. 1995, Marinelli ym. 2000).

Etanolin itseannostelun lisäksi AA rotat ovat herkempiä kuluttamaan opioidiagonisteina toimivia lääkkeitä kuin ANA rotat (Sommer ym. 2006). Ne kuluttavat enemmän etoniatseeni- (opioidiagonisti) liuosta kuin ANA rotat (Hyytiä ja Sinclair 1993a). Tämän lisäksi ne oppivat annostelemaan i.v. heroïinia vipua painamalla nopeammin kuin ANA rotat (Hyytiä ym. 1996). AA-rotat herkistyvät myös paremmin morfiinin indusoimalle lokomotoriikan kasvulle (Ojanen ym. 2003). Tämä ja aiemmin mainittu tutkimus (Jonhson ja Napier 2000) jossa morfiinilla indusoitu behavioraalinen herkistystyminen estettiin ventraaliseen pallidumiin annosteltavalla μ -opioidi antagonistilla, antaa syytä olettaa ventraalisen pallidumin merkittävää roolia opioidien ja samalla etanolin välittämien mekanismien säätelijänä myös tämän rottakannan kohdalla.

Tutkimusten tulosten perusteella on saatu lisäksi vahvistusta olettamalle, että mesolimbisen dopamiiniradan suora toiminta ei ole välttämätöntä etanolin itseannostelun kannalta, vaan etanoli voi vaikuttaa sen toimintaa muiden neuronaalisten reittien välityksellä. Esimerkiksi μ -opioidi reseptoriantagonistin (CTOP) tai δ -opioidi reseptoriantagonistin (naltrindoli) injektiot accumbens-tumakkeeseen tai amygdalaan laskevat etanolin kulutusta AA-rotilla (Hyytiä ja Sinclair 1993b, Hyytiä ja Kiiänmaa 2001). Kyseisten lääkkeiden injektiot ventraaliseen tegmentaaliseseen alueeseen eivät puolestaan aiheuta merkittävää muutosta etanolin kulutuksessa. Tämän perusteella voidaan todeta, että ainakaan AA-rotilla mesolimbisen dopamiinirata ei vaikuta olevan merkittävässä roolissa etanolin vahvistavien mekanismien välittämisessä. AA-rottakanta on siten ideaalinen kun tutkimuksen kohteena on opioidiergisten lääkkeiden vaikutusten tutkiminen etanolin juomisen säätelyssä. Etenkin kun tutkittavana aivoalueena on mesolimbisesta dopamiiniradasta erillään oleva rakenne, ventraalinen pallidum.

KOKEELLINEN OSA

1 JOHDANTO

Alkoholin (etanolin) juomisen taustalla olevien neurobiologisten mekanismien ymmärtäminen on tärkeä tehtävä kehitettäessä lääkkeitä alkoholiriippuvuuden hoitoon (Harvey ym. 2002). Alkoholiriippuvuutta ja sen kehittymistä on tutkittu paljon ja tietoa kertyy koko ajan lisää, mutta siitä huolimatta sen tarkat neurobiologiset mekanismit ovat selvittämättä. Havainto siitä, että useiden riippuvuutta aiheuttavien lääkeaineiden kohdalla tärkeän mesolimbisen dopamiiniradan toiminta ei välttämättä ole yhtä merkittävässä roolissa etanoliin liittyvissä vahvistumismekanismeissa, on herättänyt mielenkiintoisia teorioita vaihtoehtoisista reiteistä joilla etanoli voi välittää vahvistumista. Tiedetään että etanolilla on vaikutuksia accumbens-tumakkeen välittäjäaineisiin ja osa näistä vaikutuksista välittyy opioidergisen järjestelmän kautta. Accumbens-tumake vastaa avoissa mielihyvän syntymisestä, mutta se ei kuitenkaan saa aikaan mielihyvän tiedostamista tai motivoitumista sitä aiheuttavia asioita kohtaan, vaan näistä vastaavat muut aivojen alueet. Kun on tarkasteltu mielihyvän välittymistä aivoissa, on havaittu, että ennen kuin hermoimpulssi kulkeutuu accumbens-tumakkeesta näille motivoitumista ohjaaville aivoalueilla, se kulkee vielä yhden aivorakenteen, ventraalisen pallidumin kautta. Ventraalista pallidumia pidetään nykytiedon mukaan mielihyväradan viimeisenä säätelijänä, ennen kuin tiedostamattomat tapahtumat aivoissa muuttuvat fyysisiksi toiminnoiksi. Tämän lisäksi on tiedossa, että ventraalisen pallidumin toimintaa säätelee opioiderginen ja GABAerginen järjestelmä

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ventraalisen pallidumin opioidergisten reseptorien merkitystä etanolin juomisen säätelyssä. Tutkimus on osa suurempaa kokonaisuutta jossa pyrittiin selvittämään ventraalisen pallidumin GABA- ja opioidergisen säätelyn vaikutusta etanolin kulutukseen. Kokeessa käytettiin Alkon laboratoriossa kehitettyä runsaasti etanolia juovaa AA-rottakantaa (Alko Alcohol). Tutkimusmenetelmänä oli ventraaliseen pallidumiin mikroinjeksiolla annosteltujen opioidergisten lääkeaineiden vaikutuksen tutkiminen AA-rottien vapaaehtoiseen etanolin kulutukseen. Tutkimuksen hypoteesina oli, että opioidireseptorien aktivaatio ventraalisessa pallidumissa saa aikaan etanolin kulutuksen vähenemisen ja näiden reseptorien inaktivaatio etanolin kulutuksen lisääntymisen. Tutkimus suoritettiin

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksella (THL), Päihteet ja riippuvuus osastossa, Kalervo Kiiänmaan tutkimusryhmässä.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Eläimet

Kokeessa käytettiin 72 uros AA-rottaa sukupolveista F₉₉ (THL), jotka olivat saapuessaan 2,5-3 kuukauden ikäisiä ja 270 – 340 g. Rottia pidettiin verkkopohjaisissa teräksisissä yksittäishäkeissä [(37 cm (P) x 20 cm (L) x 20 cm (K)] koko koejakson ajan. Häkeissä oli 2/3 pohjasta peittävä muovialusta, haapahapaketta ja haapapalikka. Ruokaa (SDS RM1 (E) SQC, Witham, Essex, England) ja vettä oli saatavilla *ad libitum*. Valorytmi oli 12h/12h (valot päälle klo 6.00). Lämpötila oli 22 ± 1 °C ja ilmankosteus 55 ± 10 %. Kokeet suoritettiin päiväsaikaan klo 8-13 välisenä aikana.

2.2 Käytetyt yhdisteet

Etanoli 96 % (Spiritus Fortis, Berner Oy, Helsinki, Suomi)

Karprofeeni (Rimadyl, Pfizer, Vericore Ltd, Dundee, Iso-Britannia)

Halotaani (2-bromo-2-kloro-1.1.1 trifluoroetaani) (HalothaneBP, Nicholas Piramal India Ltd, Ennore, Chennai)

Lidocain (10mg/ml c.adrenalin) (Orion oyj, Espoo, Suomi)

U50488H (Tocris, St. Louis, Yhdysvallat)

Nor-binaltorfimiini dihydrokloridi (Tocris, St. Louis, Yhdysvallat)

DAMGO [D-Ala², NMe-Phe⁴, Gly-ol⁵]-enkefaliini (Tocris, St. Louis, Yhdysvallat)

CTOP (D-Phe-Cys-Try-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂) (Tocris, St. Louis, Yhdysvallat)

Natriumchlorid 9 mg/ml Baxter (Oriola Oy, Espoo, Suomi)

Formaldehydi 37 % (Merck, KGaA, Darmstadt, Saksa)

Gelatiini (Sigma-Aldrich, St.Louis, Yhdysvallat)

Thioniini (Sigma Chemical Com, St.Louis, Yhdysvallat)

DePex (BDH Laboratory Supplies, Poole, Iso-Britannia)

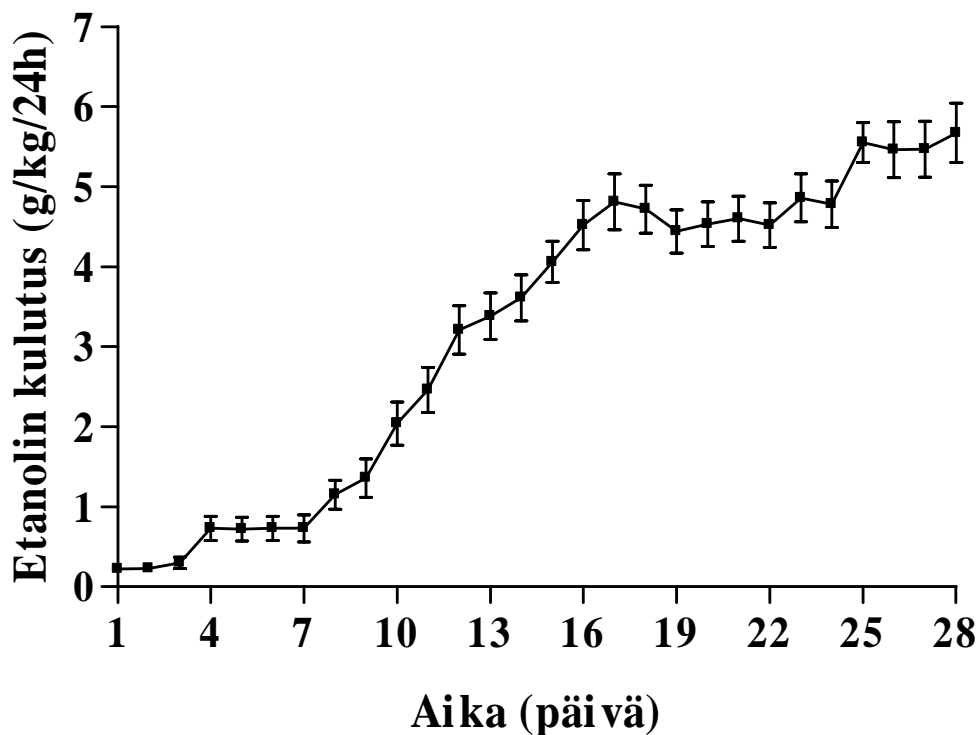
Oftagel 2,5mg/g (Santen Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan)

2.3 Etanolin kulutus

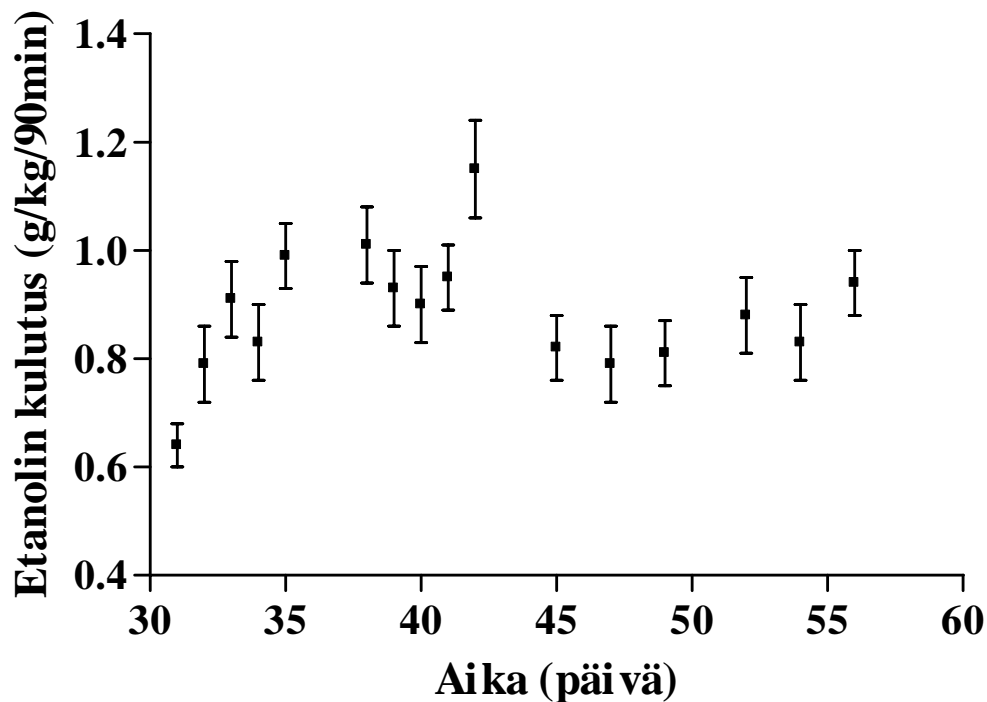
Etanolin juomisen opettamiseen ja kulutuksen mittaamiseen käytettiin Alkon biolääketieteen osaston kehittämää ns. rajoitetun juomisen mallia (The Limited Access Paradigm), joka on hyvä menetelmä silloin kun tavoitteena on tarkastella lääkeaineen vaikutusta etanolin kulutukseen lyhyellä aikavälillä (Sinclair ym. 1992). Menetelmässä rottien etanolin saantia rajoitetaan vain lyhyelle ajanjaksolle (90 min.) kerrallaan, mikä johtaa siihen, että rotat alkavat juoda etanolia heti kun niille annetaan etanolia sisältävä juomaputki ja ne juovat suhteellisen tasaisen etanolimäärän (g/kg) jokaisella kerralla. Menetelmän avulla on mahdollista seurata lääkeaineiden vaikutusta rottien etanolin kulutukseen tarkasti ja tehokkaasti.

Ennen varsinaisen kokeen alkamista rotat opetettiin juomaan 10 % (v/v) etanoli/vesiliuosta vapaaehtoisesti. Rotat pidettiin yksittäishäkeissä, jotta etanolin kulutusta oli mahdollista seurata kunkin rotan kohdalla erikseen. Alkuvaiheessa häkkeihin oli asennettu etanolia sisältävä 100ml lasinen Richter-putki ja samanlainen vettä sisältävä putki 24 tuntia vuorokaudessa. Vesi- ja etanoliputken paikkaa vaihdettiin joka toinen päivä. Rotille juotettiin etanolia 28 päivää, jonka aikana ne saavuttivat riittävän korkean ja tasaisen etanolin kulutuksen tason. Kun taso oli saavutettu, seurasi kahden vuorokauden deprivatioaika jolloin rotille ei annettu ollenkaan etanolia. Juomisen rajoittaminen aloitettiin niin, että rotille juotettiin etanolia viitenä peräkkäisenä päivänä

90 minuuttia kerrallaan (Kuva 4). Tällöin juotto tapahtui 23 ml muovisista Richter-putkista. Samoja putkia käytettiin kokeen loppuun asti. Kahden viikon jälkeen juottoa muutettiin siten, että rotille annettiin etanolijuomaputki aina maanantaina, keskiviikkona ja perjantaina 90 minuutin ajaksi (Kuva 5). Näin tehtiin kahden viikon ajan, jonka jälkeen rotille asennettiin päähän ohjauskanyylit stereotaktisen laitteen avulla. Juominen jatkui viimeiseksi mainitulla aikataululla kokeen loppuun asti. Etanolijuomaputket asennettiin aina aamulla kello 8.00 ja 9.00 välisenä aikana. Juomisen ajan huoneessa pidettiin radiota päällä, jotta rotat tottuivat ihmisten ääniin. Koe oli luonteeltaan käyttäytymisfarmakologinen, joten tätä seikkaa pidettiin tärkeänä, koska muuten koetta suorittavien henkilöiden aiheuttamat äänet olisivat voineet vaikuttaa rottien käyttäytymiseen ja sitä kautta tuloksiin. Rottien painoa, ruoan ja veden kulutusta seurattiin koko koejakson ajan.



Kuva 4. AA-rottien juomaan oppiminen tapahtui 28 päivän aikana. Puhtaan etanolin kulutus vuorokauden aikana painokiloa kohden (g/kg/24h \pm SEM, n=72). Jakson lopussa etanolin vuorokautinen kulutus oli saavuttanut tason 5,7 g/kg \pm 0,4. Tämän jälkeen seurasi kahden vuorokauden deprivaatioaika, jonka jälkeen siirryttiin käyttämään rajoitetun juomisen mallia.



Kuva 5. AA-rottien puhtaan etanolin kulutus painokiloa kohden (g/kg/90min, \pm SEM, n=72) rajoitetun juomisen aikana. Ensimmäiset kaksi viikkoa rotat joivat viitenä peräkkäisenä päivänä 90 minuutin ajan (päivät 31 – 42). Toiset kaksi viikkoa rotat joivat vuoropäivin kolmena päivänä viikossa 90 minuutin ajan (päivät 45 – 56). Rajoitetun juomisen aikana etanolin kulutus kasvoi ensimmäisen kahden viikon aikana tasosta 0,64 g/kg \pm 0,04 tasoon 1,15 g/kg \pm 0,09. Toisella kahden viikon jaksolla kulutus oli alussa 0,79 g/kg \pm 0,07 ja lopussa 0,94 g/kg \pm 0,06.

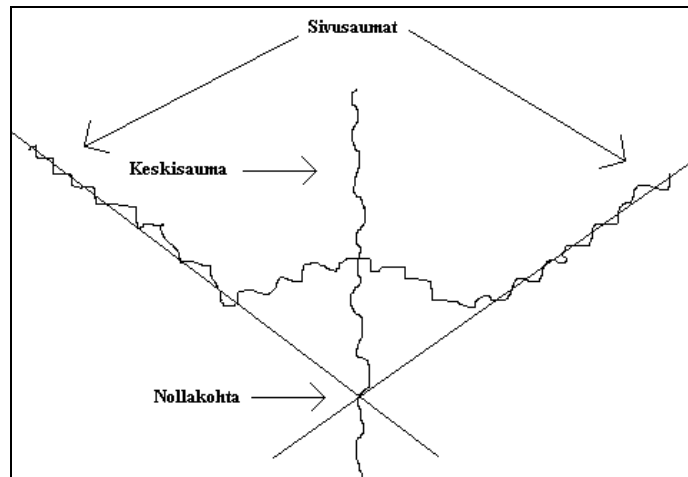
2.4 Leikkaus ja kanyylien asennus

Ohjauskanyylit (CMA Guide Gannulae), joissa oli metalliset täyteneulat, asennettiin rottien aivoihin bilateraalisesti käyttäen stereotaktista laitetta. 30 minuuttia ennen leikkausta rotille annettiin karprofeenia 5 mg/kg (Rimadyl, s.c., tilavuudessa 1 ml/kg). Tämän jälkeen rotta nukutettiin kammiossa halotaanilla (pitoisuus 3.5 – 4 % ja aika 3.5 - 4.5 minuuttia). Rotta asennettiin kiinni stereotaktiseen laitteeseen ja sille laitettiin hengitysmaski. Halotaanin pitoisuus laskettiin 2 %:iin ja se pidettiin samana koko leikkauksen ajan. Rotan pää ajeltiin kaljuksi, jonka jälkeen sen päänahan alle ruiskutettiin 100 μ l 1 % lidokaiini – adrenaliinipuudutetta (Lidocain) Rotan silmiin laitettiin kostuttavaa silmägeeliä (Oftagel). Puudutusaineen annettiin vaikuttaa kaksi minuuttia, jonka jälkeen rotan päähän tehtiin veitsellä viilto. Kallon pintaa peittävät sidekudoskalvot raaputettiin pois. Kallon pinta puhdistettiin ja kuivattiin

pumpulipuikolla. Bregma määritettiin kallonluiden perusteella (kts. kappale 2.4.1). Rotan kalloon porattiin reikä 2,7 mm terällä kallonluiden AP suunnassa muodostaman keskiviivan kohdalle, jolloin saatiin näkyviin aivoissa kulkeva keskisuoni. Poraus suoritettiin, niin että kovakalvo pysyi ehjänä. Apuna porauksessa käytettiin mikroskooppia. Keskisuonesta määritettiin leveyskoordinaatit (L, lateral). Ohjaukanyylit siirrettiin ventraalisen pallidumin kohdalle (Paxinos ja Watson, 1998). Ohjaukanyyliin kohdalle piirrettiin merkit kalloon luukynällä ja samoihin kohtiin porattiin reiät 2,7 mm terällä kovakalvoa vahingoittamatta. Lisäksi kalloon porattiin kaksi reikää ruuveja varten 0,9 mm terällä, yksi etuoikealle ja toinen takavasemmalle. Kun kaikki reiät oli porattu ja ruuvit laitettu paikoilleen, kanyylit laskettiin aivoihin (DV-koordinaatti (dorsal-ventral) 5,3 mm kovakalvosta, Paxinos ja Watson, 1998). DV koordinaatti oli 2 mm korkeammalla kuin ventraalisen pallidumin koordinaatti. Tämä sen takia, että välttyttäisiin aiheuttamasta ohjaukanyyleilla turhaa vahinkoa ventraalisen pallidumin alueelle. Reiät täytettiin luuvahalla. Ohjaukanyylit kiinnitettiin rotan päähän hammassementin avulla. Rotta otettiin pois laitteesta ja sille annettiin 10 ml (s.c.) fysiologista suolaliuosta (natriumkloridi 9 mg/ml), jonka jälkeen se laitettiin omaan häkkiinsä toipumaan. Rottien vointia seurattiin leikkausta seuraavina päivinä ja niille annettiin karprofeenia 5 mg/kg (s.c.) ja fysiologista suolaliuosta 10 ml (s.c.) jos niiden kunto sitä edellytti. Karprofeenia annettiin joka tapauksessa leikkausta seuraavana päivänä. Eläimien annettiin toipua leikkauksesta 2-3 viikkoa (riippuen leikkauspäivästä) ennen injektiosarjan aloittamista.

2.4.1 Bregman määrittäminen

AA-rottien kohdalla oman ongelmansa leikkauksien tekemisessä aiheutti rottien kallonsaumojen epäsymmetria. AA-rottien kallonsaumot risteävät kallon pinnassa siten, että bregman lukeminen saumojen risteyskohdasta ei ole luotettavaa (todettu käytännössä aiempien kokeiden perusteella). Nollakohta jonka perusteella oikea kanyyliin paikka saadaan laskettu koordinaatien mukaan, on määritettävä erikseen. Määrittäminen tapahtui piirtämällä luukynällä viivat kallon sivuttaisten saumojen suorien osien perusteella. Nollakohdaksi valittiin siten luukynällä piirrettyjen viivojen risteyskohta (kuva 6).



Kuva 6. Bregman määrittäminen AA-rotan kallonsaumojen perusteella. Oikean ja vasemman kallonsauman lävitse piiretään viivat luukynällä. Viivojen risteymäkohdan koordinaatti on nollakohdan (bregma) koordinaatti ja sen perusteella lasketaan ventraalisen pallidumin sijainti (Paxinos ja Watson 1998).

2.5 Koeryhmät ja lääkeaineet

Koeryhmiä oli 6, joissa kaikissa oli 12 rottaa. Jokaista lääkeainetta annettiin kolmena eri annoksena, joiden lisäksi annettiin kontrollina ringerin liuosta. Injektio tilavuus oli jokaisen lääkeaineen sekä ringerin kohdalla 0,3 µl ja injektio tapahtui nopeudella 0,3 µl/min. Käytetyt aineet ja annokset on lueteltu taulukossa 2.

Taulukko 2. Kokeessa käytetyt lääkeaineet ja annokset.

Rotille annostellut aineet	Annos (µg/0,3µl)
[D-Ala ² , NMe-Phe ⁴ , Gly-ol ⁵]-enkefaliini (DAMGO) (µ-opioidireseptoriagonisti)	0,01; 0,03; 0,1
D-Phe-Cys-Trp-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂ (CTOP) (µ-opioidireseptoriantagonisti)	0,3; 1,0; 3,0
DPDPE [D-Pen ² , D-Pen ⁵]-enkefaliini (δ-opioidireseptoriagonisti)	0,3; 1,0; 3,0
Naltrindoli (δ-opioidireseptoriantagonisti)	0,03; 0,1; 0,3
U50488H (κ-opioidireseptoriagonisti)	0,1; 0,3; 1,0
Nor-binaltorfimiini dihydrokloridi (κ-opioidireseptoriantagonisti)	0,3; 1,0; 3,0
Ringerin-liuos (147 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.3 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ in 0.1 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7.25)	

2.6 Mikroinjektiokokeet

Ennen injektiokokeiden alkamista rotat totutettiin mahdollisimman samankaltaiseen käsittelyyn kuin varsinainen injektioilanne. Erona varsinaiseen kokeeseen oli se, että injektioneuloja ei työnnetty aivoihin, vaan ainoastaan ohjauskanyyleissa olevat täyteneulat nostettiin pois ja laitettiin takaisin. Näin välttyttiin ventraalisen pallidumin turhalta vaurioittamiselta. Ensimmäinen totutus tehtiin kolmen päivän kuluttua viimeisten rottien leikkaamisesta ja totutuskertoja oli yhteensä neljä. Viimeisellä kerralla aivoihin laitettiin oikeat injektioneulat jotka ylettyivät ventraaliseen pallidumiin saakka. Injektioneuloina käytettiin mikrodialyysikoettimia (CMA 12 MD Probe) joissa ei ollut dialyysimembraania. Injektioneulojen annettiin olla paikoillaan 2 minuuttia (yhtä kauan kuin kokeessa), jonka jälkeen täyteneulat laitettiin takaisin. Täyteneulat olivat ohjauskanyyleissa aina, paitsi injektoiden aikana. Näin välttyttiin ohjauskanyylien tukkeutumiselta ja samalla aivot olivat suojassa infektiolta. Totutusharjoitusten tarkoituksena oli vähentää käsittelyn aiheuttamaa harhaa joka saattaisi vaikuttaa varsinaisen kokeen tuloksiin.

Injektiokoe aloitettiin niin, että jokainen rotta punnittiin juuri ennen injektion antamista. Lisäksi vesilukema sekä ruokamäärä kirjattiin ylös. Injektiot suoritettiin siten, että rotta immobilisoitiin normaalilla kiinnipito-otteella rintaa vasten painamalla ja injektioneulat työnnettiin aivoihin laitettuihin kanyyleihin. Injektion jälkeen lääkeaineen annettiin imeytyä minuutin ajan, jonka jälkeen neulat poistettiin. Jokaisen ryhmän jokainen rotta sai yhtä lääkeainetta kaikkina annoksina, eli yhteensä neljä injektiota neljänä eri päivänä. Injektiot annettiin sekoitetussa järjestyksessä (Taulukko 3).

Taulukko 3. Injektiojärjestys.

Käsittely	Koepäivä 1	Koepäivä 2	Koepäivä 3	Koepäivä 4
Kontrolli	Rotta 1	Rotta 10	Rotta 7	Rotta 4
Kontrolli	Rotta 2	Rotta 11	Rotta 8	Rotta 5
Kontrolli	Rotta 3	Rotta 12	Rotta 9	Rotta 6
Annos 1	Rotta 4	Rotta 1	Rotta 10	Rotta 7
Annos 1	Rotta 5	Rotta 2	Rotta 11	Rotta 8
Annos 1	Rotta 6	Rotta 3	Rotta 12	Rotta 9
Annos 2	Rotta 7	Rotta 4	Rotta 1	Rotta 10
Annos 2	Rotta 8	Rotta 5	Rotta 2	Rotta 11
Annos 2	Rotta 9	Rotta 6	Rotta 3	Rotta 12
Annos 3	Rotta 10	Rotta 7	Rotta 4	Rotta 1
Annos 3	Rotta 11	Rotta 8	Rotta 5	Rotta 2
Annos 3	Rotta 12	Rotta 9	Rotta 6	Rotta 3

Injektiopäivien välillä pidettiin taukoa 48 tuntia, paitsi perjantain ja maanantain välillä jolloin taukoa oli 72 tuntia. Injektion jälkeen rotat siirrettiin välittömästi omiin kotihäkkeihinsä ja niille annettiin etanoliuomapatki. Etanolin kulutusta seurattiin ajanhetkillä 0, 10, 20, 30, 50, 70 ja 90 minuuttia jonka jälkeen juomapatket poistettiin. Juomisen jälkeen ruoan ja veden kulutus kirjattiin ylös. Kun etanolin kulutus oli mitattu kaikkien lääkeaineannosten sekä kontrolliannoksen jälkeen, eläinten etanolin juomisen perustaso mitattiin vielä kerran, ilman mitään injektiota (48 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta) antamalla eläimille etanolia sisältävä juomapatki 90 minuutin ajaksi. Perustaso mitattiin, koska vain sen perusteella voitiin osoittaa, että koejakso ei itsessään vaikuta rottien etanolin kulutukseen. Tämän jälkeen rotat lopetettiin tainnuttamalla ne hiilidioksidilla ja sen jälkeen dekapitoimalla. Aivot laitettiin välittömästi formaliiniliuokseen. Taulukossa 4 on kaavamainen esitys kokeen etenemisestä.

Taulukko 4. Kokeen etenemisjärjestys ja aikataulu.

Vko 1-4	Juomaan oppiminen
	10 % etanolia saatavilla 24h/vrk
	28 päivän jälkeen 2 vuorokauden deprivatio

Vko 5-6	Rajoitettu juominen
	10 % etanolia 90 minuuttia kerrallaan viitenä päivänä viikossa (ma, ti, ke, to, pe)

Vko 7-8	Rajoitettu juominen
	10 % etanolia 90 minuuttia kerrallaan kolmena päivänä viikossa (ma, ke, pe)

Vko 9-10	Leikkaukset ja kanyylien asennus
	10 % etanolia 90 minuuttia kerrallaan kolmena päivänä viikossa (ma, ke, pe)
	1. totutusharjoitus vko 10 perjantaina (leikatuille rotille ei etanolia leikkauspäivinä)

Vko 11	Totutusharjoitukset
	10 % etanolia 90 minuuttia kerrallaan kolmena päivänä viikossa (ma, ke, pe)
	2. totutusharjoitus maanantaina 3. totutusharjoitus keskiviikkona
	Injektioneula VP:iin perjantaina

Vko 12-13	Mikroinjektiokokeet
	10 % etanolia 90 minuuttia kerrallaan kolmena päivänä viikossa (ma, ke, pe)
	1. koepäivä maanantai 2. koepäivä keskiviikko 3. koepäivä perjantai 4. koepäivä maanantai (vko 13)
	Kontrollijuotto keskiviikkona (vko 13)
	Dekapitointi ja aivot formaliiniin perjantaina

2.7 Histologia

Injektiopaikka aivoissa varmistettiin histologisesti hiilidioksidilla jäädytetyistä aivoleikkeistä. Aivoja säilytettiin formaliiniliuoksessa vähintään 24 tuntia ennen kuin niistä tehtiin leikkeet. Aivot leikattiin mikrotomilla 100 µm:n paksuisiksi leikkeiksi. Aivot siirrettiin gelatinoiduille mikroskooppilaseille ja annettiin kuivua. Kuivumisen jälkeen aivot värjättiin thioniinivärjäyksellä. Injektioiden osumakohta tarkistettiin värjäytystä leikkeistä mikroskoopilla. Injektiokohdan tarkkaan määrittämiseen käytettiin apuna millimetritruudukkoa ja injektiokohdan koordinaatit tarkastettiin rotan aivoatlaksesta (Paxinos ja Watson, 1998).

2.8 Tilastollinen analyysi

Tulosten tilastollista analyysia varten 10 % etanolin kulutus (ml) muutettiin siten, että kunkin eläimen puhtaan (100 %) etanolin kulutus pystyttiin ilmoittamaan grammoina painokiloa kohti (g/kg). Etanolin kulutuksesta laskettiin keskiarvo (KA) ja keskiarvon keskivirhe (SEM) ja niiden perusteella piirrettiin aika/annos kuvaajat jokaista lääkeainekäsittelyä kohden. Kuvaajat piirrettiin GraphPad Prism 4.0. ohjelmalla.

Käytetty analyysimenetelmä oli toistettujen mittausten varianssianalyysi (repeated measures ANOVA). Jos aineisto ei täyttänyt toistettujen mittausten varianssianalyysin edellyttämää sfäärisyyssehtoa, käytettiin tulosten tulkinnassa Greenhouse-Geisserin korjauskerrointa. Jos ryhmien välillä haivaittiin tilastollisesti merkitsevä ero, suoritettiin jatkotesti Dunnett'in testillä. Tilastollisten erojen ilmaantuessa tarkasteltiin myös etanolin kokonaiskulutusta tiettyyn aikapisteeseen saakka. Tällöin tilastollinen testaus suoritettiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) ja mahdollisten tilastollisten erojen esiintyessä tehtiin jatkotestinä Dunnett'in testi.

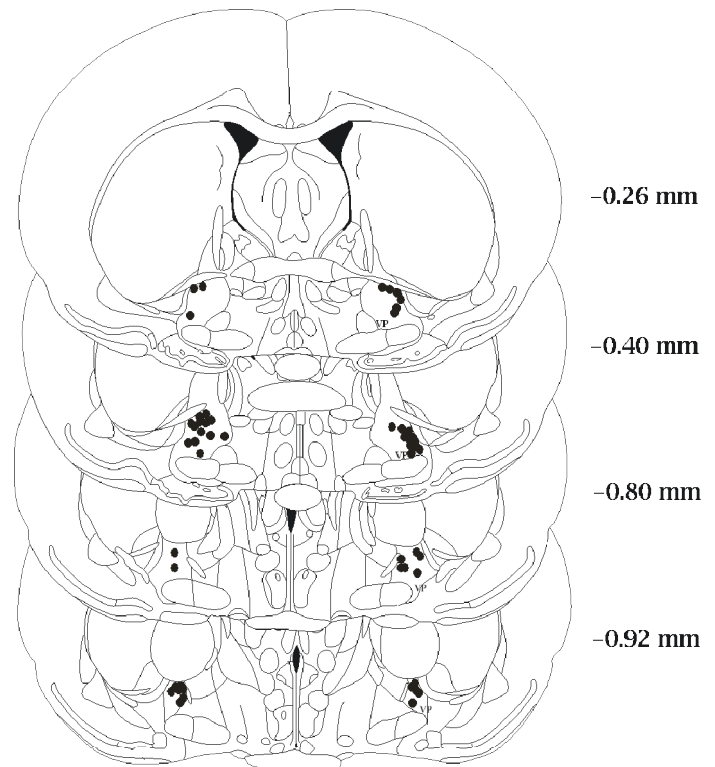
Nollahypoteesi oli, että eri käsittelyjen välillä ei ole eroa etanolin kulutuksessa. P:n arvoksi valittiin 0.05. Tätä suuremmilla p:n arvoilla nollahypoteesi jäi voimaan ja tulosta pidettiin riittämättömänä osoittamaan ero eri käsittelyjen välillä. Tulosten tilastollinen analysointi tehtiin SPSS 17.0 ohjelmalla.

3 TULOKSET

3.1 Injektiopaikan sijainnin tarkastaminen

Injektiopaikat tarkastettiin histologisesti thioniinivärjätystä aivoleikkeistä. Injektiopaikat on esitetty kuvassa 7. Injektio hyväksyttiin jos neulan kärki sijaitsi ventraalisen pallidumin alueella (AP -0,2-(-1,2); L 2,7-3,2; DV 7,5-8,5, Paxinos ja Watson, 1998). Injektion osuminen näiden koordinaattien ulkopuolelle johti kyseisen eläimen poistamiseen aineistosta.

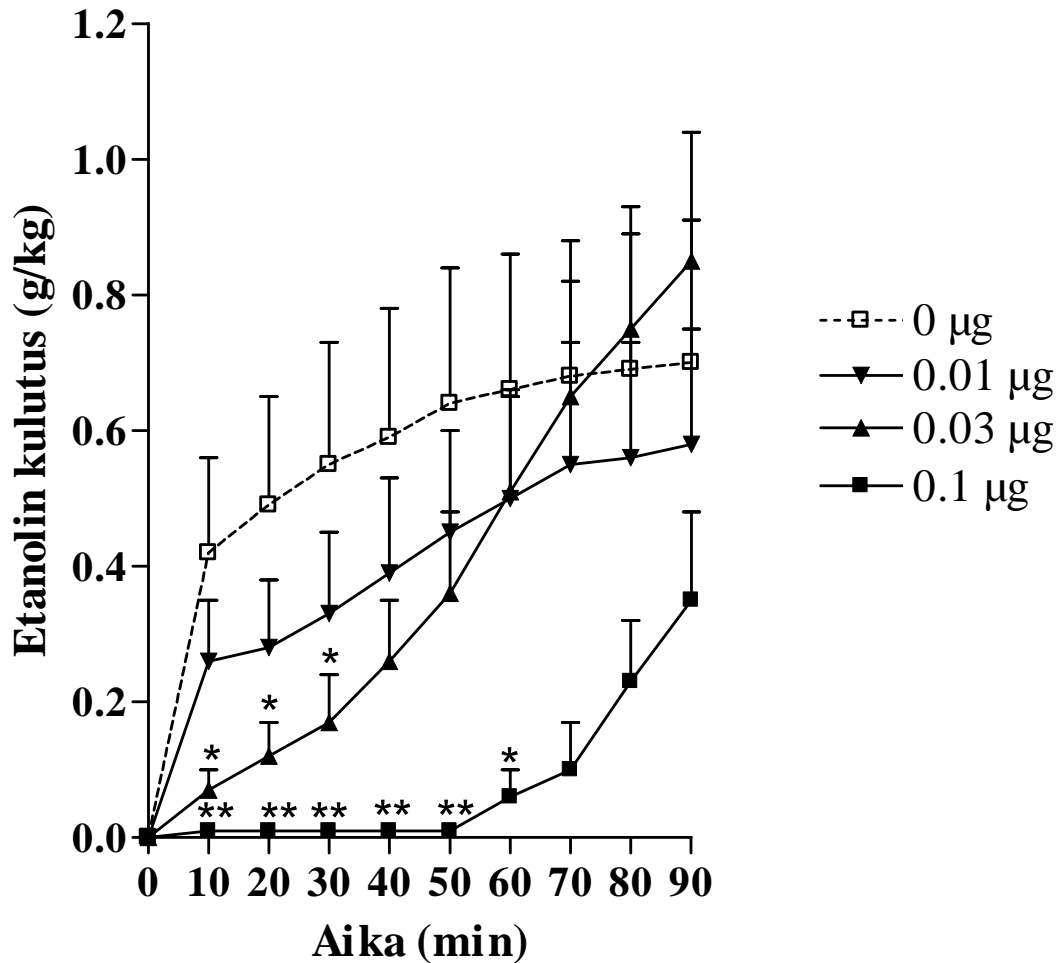
Kuva 7. Kuvassa on esitetty esimerkkejä ventraalisen pallidumin alueelle sijoittuneista injektioista. Osuneet injektiot on esitetty tummilla pisteillä. Yksi piste kuvastaa aina yhtä injektioneulan kärkeä (pisteen koko ei ole suhteessa injektioneulan kokoon). Osa osumista on päällekkäisiä, eikä sen takia erotu kuvasta. Koska leikkeet olivat 100 µm:n paksuisia, havaittiin injektioneulan jälki useassa peräkkäisessä leikkeessä. Osumakohdaksi valittiin se leike jossa havaittiin injektioneulan alimmainen kohta.



3.2 DAMGO-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen

µ-opioidireseptoriagonisti DAMGO:n vaikutus AA-rottien etanolin kulutukseen näkyy kuvassa 8. Toistettujen mittausten varianssianalyysin perusteella etanolin kulutuksessa tapahtui merkittävä muutos ajan suhteen 90 minuutin aikana ($F_{9,49}=35$, $p<0.001$, Greenhouse-Geisser). Myös ajan ja annoksen suhteen tapahtui tilastollisesti merkitsevä muutos ($F_{27,49}=3.3$, $p<0.001$, Greenhouse-Geisser). Lääkeaineen vaikutus 90 minuutin aikana ei kuitenkaan ollut merkitsevä ($F_{3,28}=2.7$, $p>0.05$).

DAMGO



Kuva 8. DAMGO-käsittelyn vaikutus AA-rottien etanolin kumulatiiviseen kulutukseen ajan funktiona. Keskimääräinen etanolin kulutus (g/kg/90min) \pm SEM, n=8. Merkitsevyydet on merkitty yksisuuntaisen varianssianalyysin tulosten perusteella. **p<0.01, *p<0.05

Kuvaajasta oli selvästi näkyvissä DAMGO käsittelyn vaikutuksen olevan suurimmillaan 90 minuutin aikapistettä aiempien aikapisteiden kohdalla. Tämän takia pidettiin perusteltuna suorittaa toistettujen mittausten varianssianalyysi siten, että etanolin kulutusta tarkasteltiin vain tiettyyn aikapisteeseen saakka. Tulokset kaikkien aikapisteiden kohdalla on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Toistettujen mittausten varianssianalyysin tulokset kun kokeen päättymisaikaa on vähennetty aina 10 minuuttia kerrallaan.

Min	Aika	Aika-Annos	Käsittely	Dunnett'in testin p-arvo
90	$F_{9,49}=34.71, p<0.001$	$F_{27,49}=3.34, p=0.01$	$F_{3,28}=2.7, p>0.05$	
80	$F_{8,46}=32.02, p<0.001$	$F_{24,45}=3.40, p=0.011$	$F_{3,28}=3.1, p=0.043$	0.1 μg $p=0.008$
70	$F_{7,43}=28.36, p<0.001$	$F_{21,43}=3.47, p=0.012$	$F_{3,28}=3.46, p=0.03$	0.1 μg $p=0.005$
60	$F_{6,39}=25.86, p<0.001$	$F_{18,39}=3.50, p=0.014$	$F_{3,28}=3.72, p=0.023$	0.1 μg $p=0.004$
50	$F_{5,37}=22.83, p<0.001$	$F_{15,37}=3.58, p=0.015$	$F_{3,28}=3.99, p=0.18$	0.1 μg $p=0.003$, 0.03 μg $p=0.049$
40	$F_{4,34}=21.63, p<0.001$	$F_{12,34}=3.80, p=0.014$	$F_{3,28}=4.18, p=0.014$	0.1 μg $p=0.003$, 0.03 μg $p=0.03$
30	$F_{3,32}=20.13, p<0.001$	$F_{9,32}=4.06, p=0.012$	$F_{3,28}=4.38, p=0.012$	0.1 μg $p=0.003$, 0.03 μg $p=0.018$
20	$F_{2,30}=20.14, p<0.001$	$F_{6,30}=4.39, p=0.01$	$F_{3,28}=4.53, p=0.01$	0.1 μg $p=0.003$, 0.03 μg $p=0.014$
10	$F_{1,28}=19.24, p<0.001$	$F_{3,28}=4.56, p=0.01$	$F_{3,28}=4.56, p=0.01$	0.1 μg $p=0.003$, 0.03 μg $p=0.012$

Tuloksista nähdään, että DAMGO vähensi rottien etanolin kulutusta verrattuna kontrolliin. Vaikutus oli annosriippuvainen siten, että 0,1 μg annoksella etanolin kulutus laski eniten ja lasku oli tilastollisesti merkitsevä aina aikapisteeseen 80 minuuttia asti. Annoksella 0,03 μg etanolin kulutuksen lasku oli myös tilastollisesti merkitsevä, mutta vain aikapisteeseen 50 minuuttia asti.

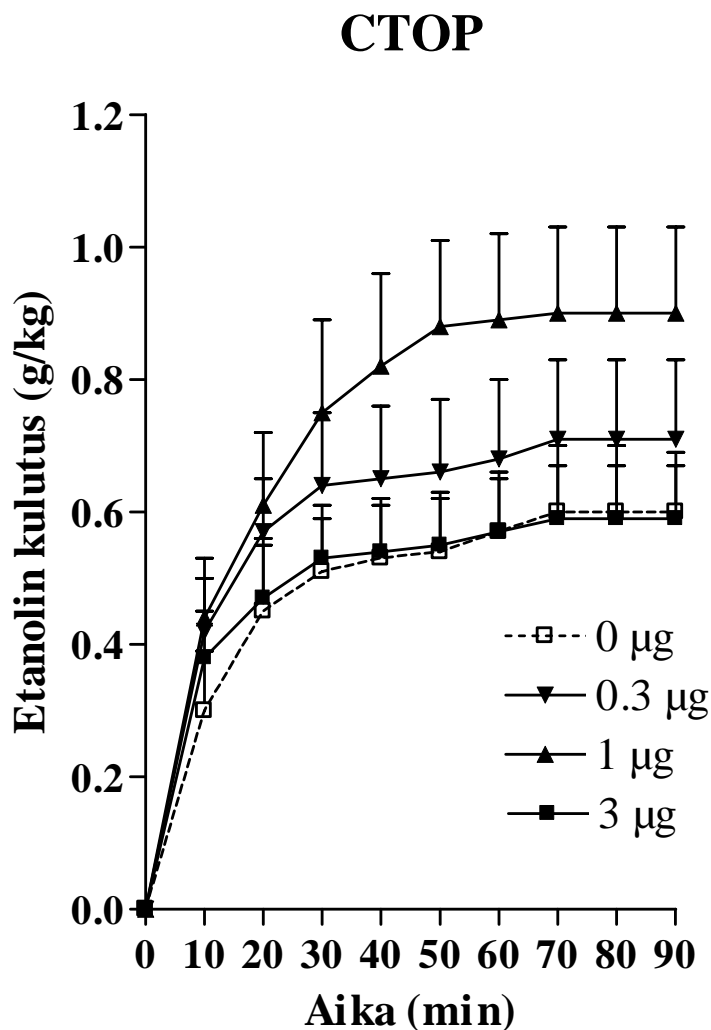
Kun tuloksia tarkasteltiin aikapisteiden 10 – 80 minuuttia kohdalla yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA), ilmeni että etanolin kulutus laski tilastollisesti merkitsevästi DAMGO annoksella 0,1 μg aikapisteissä 60, 50, 40, 30, 20 ja 10 minuuttia (Taulukko 6). DAMGO annoksella 0,03 μg etanolin kulutuksen lasku oli tilastollisesti merkitsevää aikapisteissä 30, 20 ja 10 minuuttia.

Taulukko 6. Yksisuuntaisen varianssianalyysin tulokset ajanhetkiltä 10 - 60 minuuttia.

Min.	ANOVA	Dunnett'in testi
60	$F_{3,28}=3.03, p=0.46$	0.1 μg $p=0.011$
50	$F_{3,28}=3.44, p=0.03$	0.1 μg $p=0.006$
40	$F_{3,28}=3.71, p=0.023$	0.1 μg $p=0.004$
30	$F_{3,28}=4.05, p=0.016$	0.1 μg $p=0.003$, 0.03 μg $p=0.031$
20	$F_{3,28}=4.42, p=0.012$	0.1 μg $p=0.003$, 0.03 μg $p=0.018$
10	$F_{3,28}=4.56, p=0.01$	0.1 μg $p=0.003$, 0.03 μg $p=0.012$

3.3 CTOP-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen

μ -reseptoriantagonisti CTOP:n vaikutus AA-rottien etanolin kulutukseen on esitetty kuvassa 9. Toistettujen mittausten varianssianalyysillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä muutos etanolin kulutuksessa ajan suhteen ($F_{9,52}=117$, $p<0.001$, Greenhouse-Geisser). Aika-annoksen ($F_{27,52}=1.9$, $p>0.05$, Greenhouse-Geisser) ja lääkeaineen vaikutuksen suhteen ($F_{3,28}=1.5$, $p>0.05$) ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa.

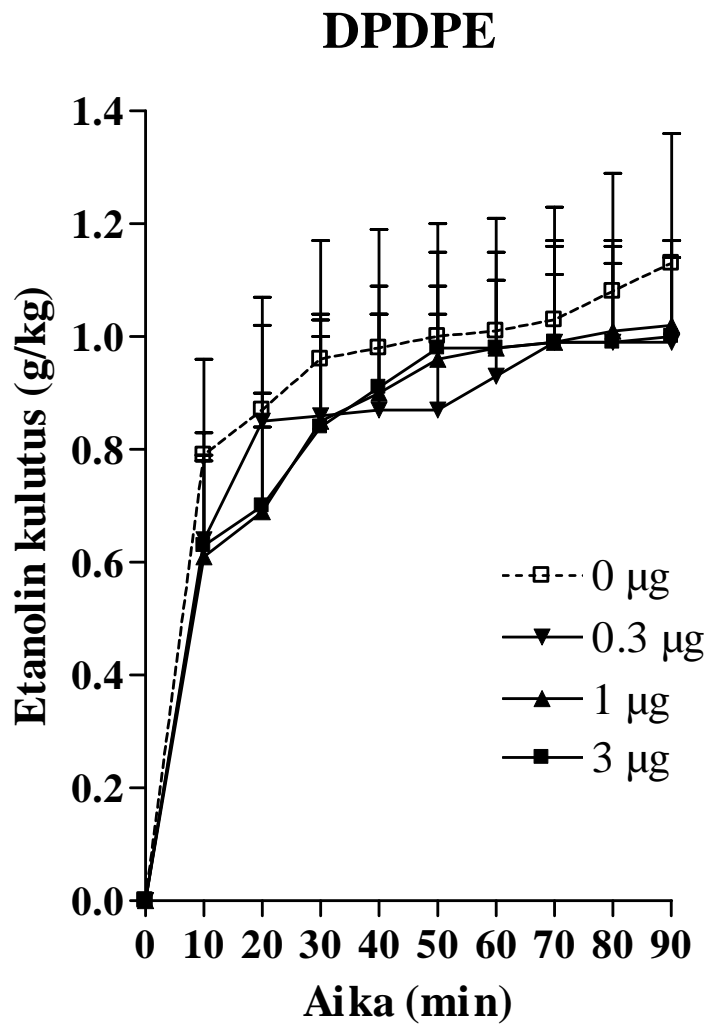


Kuva 9. CTOP-käsittelyn vaikutus AA-rottien etanolin kumulatiiviseen kulutukseen ajan funktiona. Keskimääräinen etanolin kulutus (g/kg/90min) \pm SEM, $n=8$.

Tarkastellessa CTOP:n vaikutusta etanolin kokonaiskulutukseen 90 minuutin aikana yksisuuntaisen varianssianalyysin avulla, ei saatu tilastollisesti merkitsevää eroa ($F_{3,28}=1.68$, $p>0.05$).

3.4 DPDPE-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen

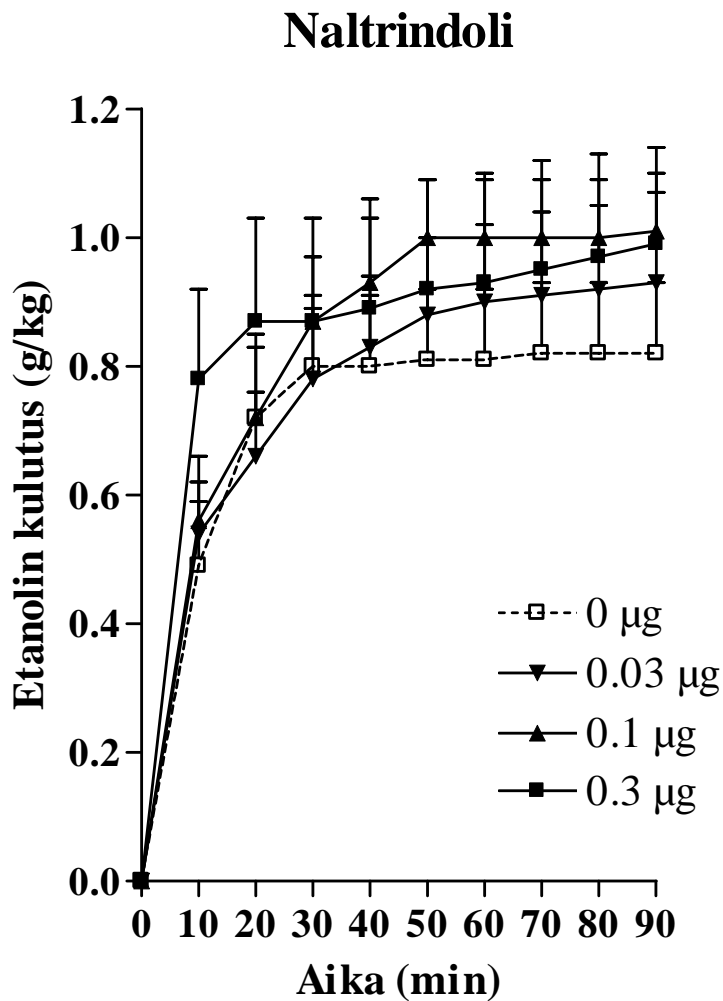
δ -opioidireseptoriagonisti DPDPE:n vaikutus AA-rottien etanolin kulutukseen on esitetty kuvassa 10. Etanolin kulutuksessa tapahtuu tilastollisesti merkitsevä muutos ajan suhteen ($F_{9,49}=83.2$, $p<0.001$, Greenhouse-Geisser). Aika-annoksen suhteen ($F_{27,49}=0.92$, $p>0.05$, Greenhouse-Geisser), sekä annoksen suhteen ($F_{3,24}=$, $p>0.05$) ei ole havaittavissa tilastollisesti merkitsevää eroa.



Kuva 10. DPDPE-käsittelyn vaikutus AA-rottien etanolin kumulatiiviseen kulutukseen ajan funktiona. Keskimääräinen etanolin kulutus (g/kg/90min) \pm SEM, $n=7$.

3.5 Naltrindoli-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen

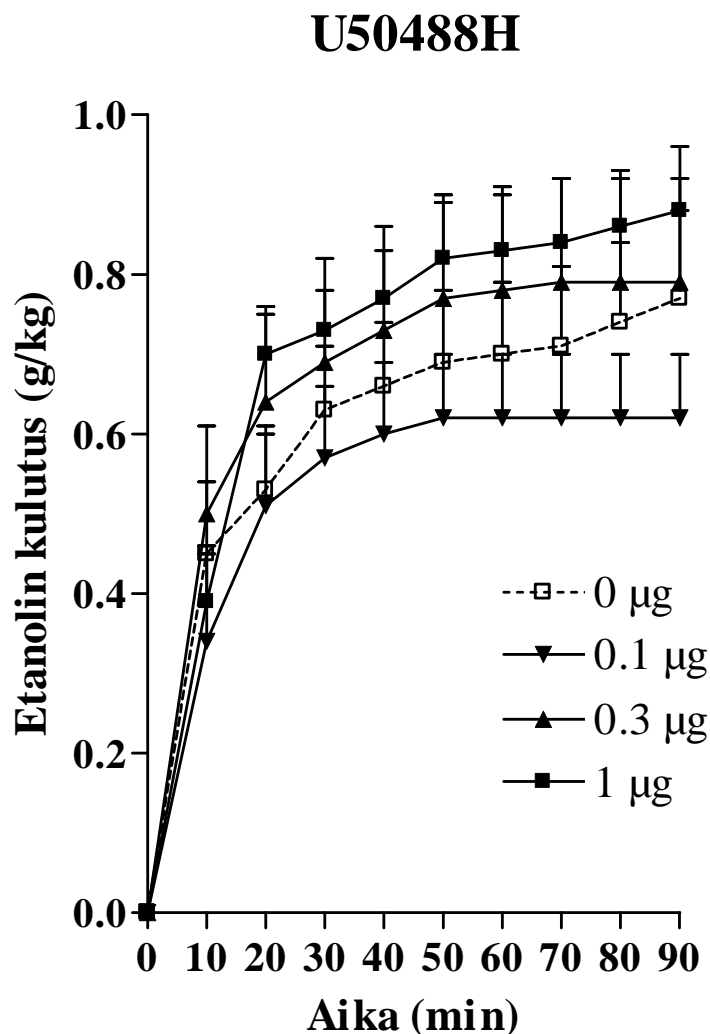
δ -opioidireseptoriantagonisti naltrindolin vaikutus AA-rottien etanolin kulutukseen on esitetty kuvassa 11. Etanolin kulutuksessa tapahtuu tilastollisesti merkitsevä muutos ajan suhteen ($F_{9,61}=127.86$, $p<0.001$, Greenhouse-Geisser). Aika-annoksen suhteen ($F_{27,61}=1.02$, $p>0.05$, Greenhouse-Geisser), sekä annoksen suhteen ($F_{3,28}=0.32$, $p>0.05$) ei ole havaittavissa tilastollisesti merkitsevää eroa.



Kuva 11. Naltrindoli-käsittelyn vaikutus AA-rottien etanolin kumulatiiviseen kulutukseen ajan funktiona. Keskimääräinen etanolin kulutus (g/kg/90min) \pm SEM, n=8.

3.6 U50488H-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen

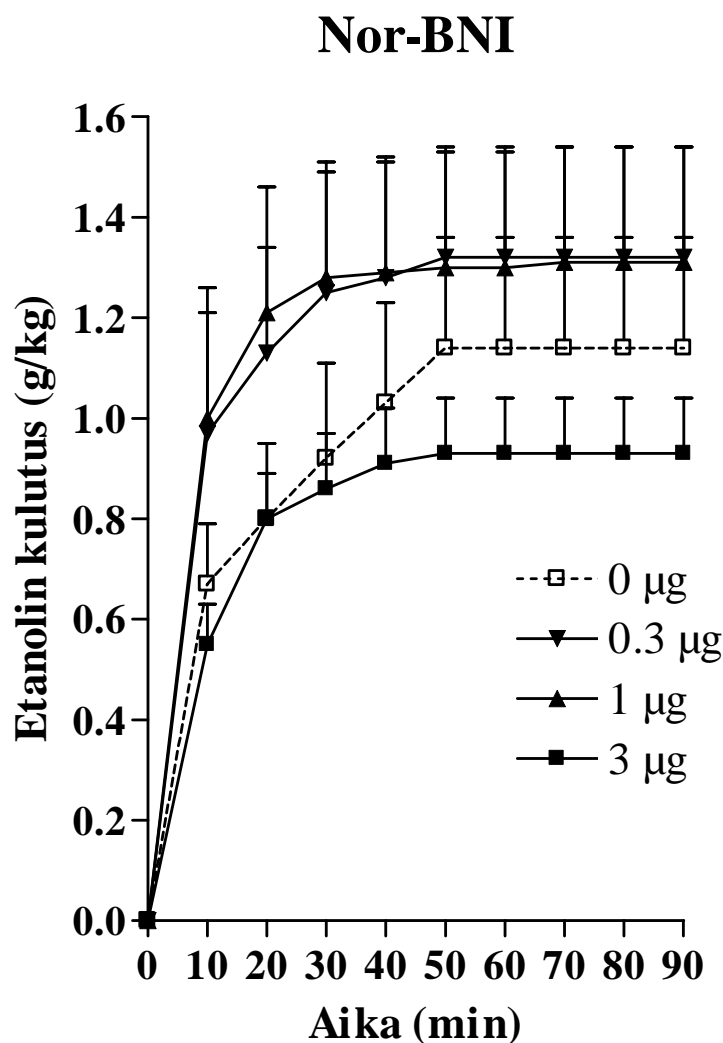
κ -reseptoriagonisti U50488H:n vaikutus AA-rottien etanolin kulutukseen on esitetty kuvassa 12. Etanolin kulutuksen muutoksessa ajan suhteen, havaittiin tilastollisesti merkitsevä tulos ($F_{9,95}=123$, $p<0.001$, Greenhouse-Geisser). Etanolin kulutuksessa ajan ja annoksen suhteen ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ($F_{27,95}=0.92$, $p>0.05$, Greenhouse-Geisser). Myöskään lääkeaineen suhteen ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa ($F_{3,36}=0.99$, $p>0.05$).



Kuva 12. U50,488H-käsittelyn vaikutus AA-rottien etanolin kumulatiiviseen kulutukseen ajan funktiona. Keskimääräinen etanolin kulutus (g/kg/90min) \pm SEM, $n=10$.

3.7 Nor-BNI-käsittelyn vaikutus etanolin kulutukseen

κ -reseptoriantagonisti Nor-BNI:n vaikutus AA-rottien etanolin kulutukseen on esitetty kuvassa 13. Toistettujen mittausten varianssianalyysillä, saatiin tulokseksi että etanolin kulutuksessa tapahtui muutosta ajan suhteen ($F_{9,37}=107$, $p<0.001$, Greenhouse-Geisser). Etanolin kulutuksessa ei aika-annoksen suhteen ($F_{27,37}=1.07$, $p>0.05$, Greenhouse-Geisser) eikä annoksen suhteen ($F_{3,24}=0.94$, $p>0.05$) havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa.



Kuva 13. Nor-BNI-käsittelyn vaikutus AA-rottien etanolin kulutukseen ajan funktiona. Keskimääräinen etanolin kulutus (g/kg/90min) \pm SEM, $n=7$.

4 TULOSTEN TARKASTELO

Tässä tutkimuksessa selvitetiin ventraalisen pallidumin μ -, δ - ja κ -opioidireseptorien toiminnan merkitystä AA-rottien etanolin itseannostelussa. Tuloksista havaittiin, että μ -opioidireseptoriagonisti DAMGO oli ainoa joka aiheutti merkitsevän muutoksen etanolin kulutuksessa, laskemalla kulutusta selvästi alle kontrollitason. Vaikutus oli lisäksi annosriippuvainen siten, että suurimmalla DAMGO annoksella etanolin kulutus laski eniten. μ -opioidireseptori antagonistin CTOP:n kohdalla havaittiin nousu etanolin kulutuksessa toiseksi suurimmalla annoksella, mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä. δ - ja κ -opioidergisten lääkeaineiden vaikutuksissa ei havaittu tilastollisesti merkitsevää vaikutusta etanolin kulukseen.

4.1 Ventraalisen pallidumin μ -opioidireseptorit

Tuloksista nähdään, että DAMGO annosteltuna ventraaliseen pallidumiin laski AA-rottien etanolin kulutusta. Lasku etanolin kulutuksessa oli havaittavissa kaikilla DAMGO annoksilla. Merkitsevänä voidaan kuitenkin pitää vain annosten 0,1 ja 0,03 μg seurauksena tapahtunutta laskua. DAMGO annostelun vaikutus oli lyhykestoinen ja selvin vaikutus etanolin kulutuksen vähenemiseen on nähtävissä ensimmäisen 50 minuutin aikana. 90 minuutin kuluttua lääkeaineen annostelusta juodun etanolin määrä oli jo lähellä kontrollitasoa, riippumatta annostellun lääkeaineen määrästä.

DAMGO annostelun vaikutusta etanolin kulutukseen voidaan ajatella tukevan teoriaa ventraalisen pallidumin toiminnasta palkitsevien aineiden vahvistavien mekanismien säätelyssä. μ -opioidireseptoriaktivaation tiedetään hyperpolarisoivan solukalvoa ja näin inhiboivan solun toimintaa. Vaikutuksen voidaan päätellä välittyvän ventraalisen pallidumin omien μ -opioidireseptorien kautta. Samansuuntaisia tuloksia on saatu kun tutkittavana on ollut suoraan ventraaliseen pallidumiin annostellun morfiinin vaikutus AA-rottien etanolin kulutukseen (Kempainen ym. 2009, julkaisematon). Morfiini laski etanolin kulutusta annosriippuvaisesti. Etanolin kulutuksen lasku oli morfiinin annostelun yhteydessä huomattavasti pidempikestoinen kuin DAMGO annostelun yhteydessä ja etanolin kulutus pysyi alhaisena koko 90 minuutin ajan.

DAMGO:n lyhytkestoinen vaikutus näkyy selkeästi etanolin kulutuksen kasvuna 60 minuutin kohdalla suurimman annoksen annostelun jälkeen. Samansuuntaisia tuloksia DAMGO:n vaikutuksen kestosta ovat saaneet Shimura ryhmineen (2006). He saivat tutkimuksessaan lähes identtisen annos-vastekäyrän kun tutkittavana oli ventraaliseen pallidumiin annosteltavan DAMGO:n vaikutus Wistar rottien sakkariiniliuoksen kulutukseen. Kyseisessä kokeessa DAMGO annos oli 0,0125 µg/aivopuoli. Sakkariiniliuoksen kulutus oli merkitsevästi alhaisempaan DAMGO annostelun kuin kontrolloinnin jälkeen ajanhetkillä 30 ja 60 minuuttia lääkeaineen annostelusta. 90 minuutin kohdalla sakkariiniliuoksen kulutus oli jo samalla tasolla kontrollin kanssa. Nyt saatuja tuloksia on vaikea suoraan verrata muihin tutkimuksiin siitä syystä, että ventraalisen pallidumin merkitystä etanolin kulutukseen ei ole tutkittu ennen tällä tavalla.

Koska suurimman DAMGO annoksen kohdalla ryhmien keskihajonta on huomattavasti pienempi kuin pienemmillä annoksilla (melkein olematon suurimmalla annoksella), voi olla mahdollista, että DAMGO:n vaikutukseen liittyy jotain muitakin vaikutuksia kuin ainoastaan palkitsemismekanismien hillitseminen. On mahdollista myös, että voimakas µ-opioidistimulaatio ventraalisessa pallidumissa estää etanoliin liittyvät vahvistavat mekanismit lähes täydellisesti. Vahvistavien mekanismien estyminen olisi loogista, koska µ-opioidireseptoristimulaatio saa aikaan solukalvon hyperpolarisoitumisen, mikä puolestaan voi estää viestin välityksen ventraalisesta pallidumista eteenpäin. Myös voimakas GABA_A-reseptorien aktivoiminen muskimolilla ventraalisessa pallidumissa saa aikaan voimakkaan ja merkittävän laskun etanolin kulutuksessa AA-rotilla (Kemppainen ym. 2009, julkaisematon). Etanolin kulutus kyseisessä tutkimuksessa pysyi lähes olemattomana koko 90 minuutin ajanjakson aikana.

Rottien käyttäytymisessä ei muuten, kuin etanolin kulutuksen kohdalla, tapahtunut silminnähden merkittäviä muutoksia (ruoan tai veden kulutuksessa). Lisäksi tiedetään, että DAMGO injektiot ventraaliseen pallidumiin lisäävät rottien liikeaktiivisuutta (Shimura ym.2006, Hoffman ym. 1991, Austin ja Kalivas 1989). Vähentyneen etanolin kulutuksen ei siten luultavasti voi olettaa johtuvan esimerkiksi lääkeaineen lamaavasta vaikutuksesta. Nyt saaduista tuloksista voidaan siis päätellä, että ventraalisen pallidumin µ-opioidireseptorien aktivaatio saa aikaan etanoliin liittyvän vahvistumisen

vähenevän AA-rotilla ja vaikutus liittyy luultavasti palkitsemismekanismeja tai motivaatiota hillitseviin mekanismeihin.

CTOP:n annostelun yhteydessä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa etanolin kulutuksessa verrattuna kontrolliin. Annoksella 1 µg oli havaittavissa kuitenkin noin 50 % nousu etanolin kulutuksessa verrattuna kontrollitasoon. Koska nousu etanolin kulutuksessa ei ollut merkitsevä, ei etanolin kulutuksen noususta voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä. Mielenkiintoista CTOP annostelun yhteydessä oli kuitenkin havainto siitä, että mahdollinen lääkeaineesta johtuva vaikutus etanolin kulutukseen ei ollut annosriippuvainen. Korkein etanolin kulutuksen taso saavutettiin keskimmaisella annoksella, joka oli 1 µg ja sen ero kontrolliin ajanhetkellä 50 minuuttia oli lähellä merkitsevyyttä ($p=0.08$). Annoksella 3 µg etanolin kulutus oli lähes identtinen kontrollin kanssa. Tämä tulos yhdessä Smithin ja Berridgen (2005) tutkimushavaintojen kanssa siitä, että ventraalisen pallidumin etu- ja takaosassa sijaitsevilla µ-opioidireseptorikeskuksilla olisi päinvastaiset vaikutukset palkitsemistapahtumassa herättää mielenkiintoisen kysymyksen. Voiko olla mahdollista, että CTOP annos 3 µg on niin suuri, että lääkeaine saturoi injektiokohdan opioidireseptorit, jonka jälkeen se diffundoituu ja sitoutuu viereisillä alueilla oleviin µ-opioidireseptoreihin? Jos tämä on mahdollista, olisi täysin loogista että liian suurella annoksella lääkeaine kumoaa itse omat vaikutuksensa. On myös mahdollista, että annoksen ollessa liian suuri, se levittäytyy alueille jonne sen ei ole tarkoitettu leviävän. Lisäksi on havaittu, että suoraan ventraaliseen pallidumiin annosteltu µ-opioidiagonisti morfiini tai sen aktiivinen metaboliitti MG6 (morfiini-6-glukuronidi) nostaa ventraalisen pallidumin enkefaliinien pitoisuutta pienillä annoksilla (Olive ja Maidment 1998). Enkefaliinitason nousu pystytään estämään annostelemalla samanaikaisesti µ-opioidiantagonistia ventraaliseen pallidumiin. Suurilla morfiiniannoksilla ei havaita muutosta enkefaliinien pitoisuuksissa, mutta suurella annoksella MG6:a saadaan aikaan enkefaliinipitoisuuden lasku. Tulos on mielenkiintoinen siitä syystä, että se antaa syyn olettaa opioidergisten aineiden vaikutuksen ventraalisessa pallidumissa olevan riippuvainen annosteltavan lääkeaineen konsentraatiosta. Olive (1997) ryhmineen on tutkinut myös opioidireseptorien sijaintia ventraalisessa pallidumissa ja sinne projisoituvissa haarakesoluissa. Heidän havaintonsa oli, että µ-opioidireseptoreja sijaitsee sekä post-, että presynaptisella puolella ventraalisen pallidumiin yhteydessä olevia haarakesoluja. Tällöin olisi loogista että suoraan ventraaliseen pallidumiin injektoitu µ-opioidergisen

aineen liian suuri tai huonosti osunut annos sitoutuu molemilla puolilla oleviin reseptoreihin ja kumoaa näin itse oman vaikutuksena. Edellä mainittujen seikkojen perusteella on mahdollista, että CTOP annostelun yhteydessä havaittu vaikutus etanolin kulutukseen on todellinen. Kyseinen pohdinta on aiheellista ainoastaan siitä syystä, että tilastollinen merkitsevyys CTOP annostelun yhteydessä oli niin lähellä.

Aikaisempien tutkimusten perusteella tiedetään, että systeemisesti annosteltu μ -opioidireseptoriantagonisti laskee etanolin itseannostelua useilla eri eläinlajeilla (Ulm ym. 1995). μ -opioidiantagonistien naloksonin tai naltreksonin systeeminen annostelu laskee etanolin kulutusta rotilla, kun taas opioididiagonisti morfiini nostaa etanolin kulutusta (Benjamin ym. 1993). Systeemisen annostelun kohdalla μ -opioidergisten aineiden vaikutus etanolin kulutukseen on siis päinvastainen kuin suoraan ventraaliseen pallidumiin annosteltujen.

4.2 Ventraalisen pallidumin δ -opioidireseptorit

δ -opioidireseptoreihin vaikuttavilla lääkeaineilla ei ollut vaikutusta etanolin kulutukseen. Tutkimusten perusteella δ -opioidireseptoreja on tasaisesti koko ventraalisen pallidumin alueella (Moskovitz ja Goodman 1984, Lahti ym. 1989). Niiden osalta ei ole havaittavissa samanlaista tiheyttä opioidireseptorialueita kuin μ -opioidireseptoreilla. Vaikka δ -opioidireseptorien aktivaation tiedetään hyperpolarisoivan solukalvoa ja tällöin periaatteessa johtavan ventraalisen pallidumin hyperpolarisoitumisen kautta vähentyneeseen etanolin kulutukseen, näin ei kuitenkaan käy. Syynä tähän saattaa olla esimerkiksi se, että δ -opioidireseptoreita sijaitsee ventraalisessa pallidumissa sellaisilla alueilla jotka eivät ole yhteydessä mielihyvän tai motivaation säätelyssä tärkeiden neuronirakenteiden kanssa. Mikä näiden reseptorien merkitys sitten voisi olla? Potentiaalisena vaihtehtona on liikeaktiivisuuden säätely johon ventraalisen pallidumin tiedetään osallistuvan (Austin ja Kalivas 1989, Olive ja Maidment 1998). Ventraalisen pallidumin enkefaliinipitoisuuksissa havaitaan samanlaisia muutoksia suoran δ -opioidiagonistien ja -antagonistien annostelun kohdalla kuin μ -opioidiagonistilla ja -antagonistilla (Olive ja Maidment 1998). Pieni annos δ -agonista lisää enkefaliinien pitoisuutta joka estettävissä δ -antagonistilla. Samaan tapaan kuin μ -opioidergisillä lääkeaineilla, δ -opioidiagonistin suuri annos laskee enkefaliinien määrää. Sijainnin suhteen haarakesolujen δ -opioidireseptorit erovat μ -opioidergisistä

reseptoreista siten, että niitä on vain haarakesolujen postsynaptisissa osissa (Olive ym. 1997). Tämän pitäisi teoriassa tarkoittaa sitä, että haarakesoluihin sitoutuessaan δ -opioidiagonisti vähentää haarakesoluista vapautuvien enkefaliinien ja GABA:n vapautumista ja δ -opioidiantagonisti puolestaan lisää näiden vapautumista. Ventraalisen pallidumin omien δ -opioidireseptorien taas pitäisi inhiboida tai aktivoida sen toimintaa. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella DPDPE:lla eikä naltrindolilla ole kuitenkaan vaikutusta etanolin kulutukseen.

4.3 Ventraalisen pallidumin κ -opioidireseptorit

κ -opioidireseptoriagonisti U50488H:n annostelun kohdalla ei havaittu vaikutusta etanolin kulutuksessa verrattuna kontrolliin. Tämän ryhmän kohdalla hajonnat olivat pieniä ja ryhmäkoko suuri (n=10), joten tuloksia voidaan pitää erittäin luotettavina. Etanolin kulutuksessa ei ollut havaittavissa edes taipumusta tietynsuuntaisella etanolin kulutuksen muutokselle, kuten esimerkiksi CTOP:n kohdalla. Tuloksista voidaan päätellä, että ventraalisen pallidumin κ -opioidireseptoreilla ei ole merkittävää roolia etanolin kulutukseen liittyvän käyttäytymisen säätelyssä.

κ -opioidireseptoriantagonisti Nor-BNI annostelun yhteydessä oli etanolin kulutuksessa havaittavissa jonkin asteista eroa eri annosten välillä, mutta koska hajonnat olivat suuria ja tulokset eivät olleet lähelläkään tilastollista merkitsevyyttä, täytyy todeta että Nor-BNI:llä ei ollut vaikutusta etanolin kulutukseen. Tulos yhdessä U50488H:n tulosten kanssa antaa syytä olettaa, että κ -opioidireseptoreilla ei ole vaikutusta ventraalisen pallidumin kautta tapahtuvassa etanolin kulutuksen säätelyssä. Nor-BNI:n kohdalla on tarkastelun kohteeksi otettava se seikka, että se on kirjallisuuden perusteella pitkävaikutteinen, jopa irreversiibeli κ -opioidireseptoriantagonisti (Mitchell ym. 2005). Jos asia todella on näin, on sen annostelun vaikutusta etanolin kulutukseen tarkasteltava kriittisesti.

κ -opioidergisten lääkeaineiden vaikutusta etanolin kulutukseen on tutkittu systeemisen annostelun muodossa ja tällöin on havaittu, että κ -opioidiagonistit vähentävät ja κ -opioidiantagonistit lisäävät etanolin juomista (Mitchell ym. 2005, Logrip ym. 2009). κ -opioidiagonistien tiedetään myös vähentävän kokaiinin ja heroiinin itseannostelu sekä niihin liittyvää ehdollistettua paikkahakuisuutta rotilla (Mitchell ym. 2005). On myös

havaittu, että rotilla jotka kuluttavat paljon etanolia on vähemmän κ -opioidireseptoreita sekä alentunut dynorfiinitaso aivoissa, kuin rotilla jotka eivät kuluta normaalia enempää etanolia (Logrip ym. 2009). Systemisesti annosteltujen κ -opioidiagonistien tiedetään aiheuttavan dysforiaa koe-eläimissä ja tämän oletetaan vaikuttavan osaltaan päihteiden kulutuksen vähenemiseen. Aivoalue jonka kautta kyseinen vaikutus välittyy, ei ole tarkkaan tiedossa. Systemisen annostelun perusteella ei voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä siitä, minkä aivojen alueen kautta kyseisten aineiden vaikutukset etanolin kulutukseen välittyvät. Tämän todentamiseksi voidaan käyttää kokeita joissa annostelu tapahtuu paikallisesti. Nyt tehdyn tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että aivojen alue jonka kautta κ -opioidergisten lääkeaineiden vaikutus välittyy, ei ainakaan ole ventraalinen pallidum.

4.4 Koeasetelma

Eläinten annettiin toipua vähintään 2 viikkoa leikkauksesta, ennen kuin varsinainen injektio koe aloitettiin. Tällä pyrittiin välttämään leikkauksen aiheuttaman stressin vaikutusta tutkimustuloksiin. Rottien ruoan ja veden kulutusta tarkasteltiin joka päivä ja rotille jotka olivat juoneet alle 10 ml vettä vuorokauden aikana, annettiin keittosuolaliuosta injektiona (i.p.). Jos rotta ei juonut tai syönyt riittävästi tai sen vointi oli muuten huono, se poistettiin kokeesta. Näillä toimin pyrittiin siihen, että rottia joiden vointi oli muuttunut radikaalisti leikkauksen jälkeen, ei otettu kokeeseen, koska ei voitu olla varmoja mistä voinnin muutos johtui.

Koeasetelmaa tarkastellessa on otettava huomioon, se että AA-rottien etanolin kulutus on luonnostaan korkealla tasolla, joten voi olla vaikeaa saada etanolin kulusta nousemaan paljoa tätä korkeammaksi. Tämä voi olla yksi mahdollinen syy CTOP annostelun vähäisestä vaikutuksesta etanolin kulutukseen. Veren liialliseen etanolipitoisuuteen liittyy monia muitakin vaikutuksia kuin mielihyvä ja tämä on otettava huomioon, kun yritetään saada aikaan lisääntyntä etanolin kulutusta lääkeaineen avulla. Esimerkkinä tästä voidaan pitää Kemppaisen ryhmineen (2009, julkaisematon) tekemiä tutkimuksia joissa etanolin kulutus on laskenut merkittävästi GABA_B-reseptoriantagonistin (baklofeeni) vaikutuksesta, mutta GABA_B-reseptoriagonistin (saklofeeni) vaikutuksesta etanolin kulutuksessa ei havaittu merkittävää nousua.

Erityisen huomion kohteeksi on otettava myös injektiokohdan laajuus, joka tässä tutkimuksessa oli koko ventraalisen pallidumin alue. Tämä on huomioitava etenkin μ -opioidireseptoreihin vaikuttavien lääkeaineiden osalta. Smithin ja Berridgen (2007) mukaan ventraalisen pallidumin μ -opioidireseptoristimulaation vaikutus palkitsevuuden säätelyyn on erilainen ventraalisen pallidumin posteriorisessa kuin anteriorisessa päässä.

4.5 Tilastollinen tarkastelu

Ainoat tilastollisesti merkitsevät tulokset saatiin DAMGO käsittelyllä ryhmällä. Muilla lääkeaineilla havaittiin vain tilastollisesti merkityksetöntä nousua tai laskua etanolin kulutuksessa verrattuna kontrolliin.

Tilastollista analysointia vaikeutti se, että vaikka etanolin kulutuksessa oli havaittavissa silminnähden suuri ero CTOP käsittelyjen välillä, olivat hajonnat niin suuret, että tilastollisen eron osoittaminen oli mahdotonta. DAMGO käsittelyn kohdalla tulosten tulkintaa puolestaan vaikeutti suuri ero hajonnoissa eri annosten välillä. Kontrollin keskihajonnat olivat reilusti yli kaksi kertaa isommat kuin keskihajonnat suurimman DAMGO annoksen kohdalla. Muiden kuin μ -opioidergisten aineiden kohdalla, hajonnoista ei ollut haittaa tilastolliselle analysoinnille, koska erot ryhmien välillä olivat jo silminnähden pieniä.

Hajontojen suuruuteen vaikutti olennaisesti se, että jo rottien etanolin kulutuksen perustasoissa oli suuret hajonnat ja tämä heijastui myös lääkeainekäsittelyjen jälkeen saatuihin tuloksiin. Tulevissa kokeissa tämä asia on syytä ottaa erityisen tarkastelun kohteeksi. Rottien valitsemisessa ryhmiin tulisi kiinnittää enemmän huomiota siihen, että etanolin kulutuksen perustaso olisi mahdollisimman samanlainen. Rottien jako ryhmiin perustuen etanolin kulutukseen voi kuitenkin aiheuttaa tuloksiin jonkinasteista harhaa, koska ei voida olla varmoja siitä minkä tekijöiden takia osa rotista kuluttaa spontaanisti enemmän etanoli kuin toiset. Jako näin olisi tästä huolimatta suotavaa, koska tällöin tilastollinen testaus pystyttäisiin suorittamaan luotettavammin. Ilman kunnollisen tilastollisen testauksen mahdollisuutta silminnähden huomattavakaan erot eivät pääse oikeuksiinsa.

4.6 Mikroinjektiot

Vaarana mikroinjektiossa on, että lääkeaine saattaa levitä alueille joihin sen ei ole tarkoitettu kulkeutuvan (Wise 2002). Annosteltaessa opioidergiseen järjestelmään vaikuttavia lääkeaineita ventraalisen pallidumiin, tämä asia on otettava erityisesti huomioon alueen pienen koon takia. Vielä tärkeämmäksi asian tekevät havainnot ventraalisen pallidumin etu- ja takapäin μ -opioidireseptorikeskusten stimuloinnin vastakkaisista vaikutuksista mielihyvätöimintoihin (vert. Smith ja Berridge. 2007).

Esimerkkinä injektiopaikan tarkkuuden merkityksestä voidaan pitää Carlezonin ja hänen ryhmänsä (1995) tutkimusta, jossa accumbens-tumakkeeseen annosteltiin nomifensiiniä ja kokaiinia. Injektiot jotka osuivat accumbens-tumakkeen kuoriosaan, saivat aikaan vasteen, mutta injektiot dorsaaliseen ja lateraaliseen osaan eivät. Toinen esimerkki on tutkimus jossa ventraaliseen tegmentaaliseseen alueeseen injektointiin nikotiinireseptoriagonistia kystiinia (Museo ja Wise 1994). Injektiot saivat aikaan paikkapreferenssiä osuessaan muualle, paitsi ventraalisen tegmentaalisesta alueesta dorsaaliseen osaan.

Smithin ja Berridgen tutkimuksessa (2007) jossa μ -opioidireseptoriagonistia (DAMGO) annosteltiin ventraaliseen pallidumiin tarkasti rajatulle alueelle (AP -0,5 – (-1,2) mm; ML +2,0 – 3,2 mm; DV -7,6 – (-8,5) mm) perusteltiin injektiopaikan tarkkuutta μ -opioidireseptorikeskuksen sijainnilla. Tämän takia on suhtauduttava kriittisesti nyt tehdyn tutkimuksen injektiotarkkuuteen, koska osuneiksi jouduttiin laskemaan kaikki injektiot jotka olivat ventraalisen pallidumin alueella (Paxinos ja Watson 1998). AA-rotilla näin tarkan injektiopaikan saavuttaminen bilateraalisesti riittävän monella rotalla (kallon muodon takia) vaatisi todella suuria ryhmäkokoja, mutta olisi kuitenkin suotavaa. Jos pitää paikkansa, että ventraalisen pallidumin etu- ja takaosan opioidireseptorikeskuksilla on erilainen tehtävä mielihyvän säätelyssä, ei tässä tutkimuksessa injektointien μ -reseptoriagonistin ja -antagonistin vaikutuksista voida tehdä täysin luotettavia johtopäätöksiä ventraalisen pallidumin μ -opioidireseptorien merkityksestä etanolin kulutuksen säätelyssä. Yksi vaihtoehto olisi valita tarkastelun kohteeksi vain ne rotat joilla injektiot osuivat ns. opioidireseptorikimpun alueelle. Tällöin ryhmäkoko muodostuisi kuitenkin niin pieneksi, että tulosten luotettavuus saattaisi kärsiä.

κ -opioidireseptoreita sijaitsee suurimmalla tiheydellä ventraalisen pallidumin keskiosassa, eikä niiden kohdalla ole pystytty osoittamaan samankaltaisia eroja ventraalisen pallidumin toiminnan säätelyssä kuin μ -opioidireseptoreilla. κ -opioidireseptoriagonistin ja -antagonistin injektiot osuivat tasaisesti koko ventraalisen pallidumin alueelle, eikä niiden havaittu aiheuttavan minkäänlaista muutosta etanolin kulutuksessa. Tuloksia voidaan näiden aineiden osalta pitää riittävän luotettavina.

4.6.1 Mikroinjektion aiheuttamat kudsvauriot

Tiedetään, että mikrodialyysikoettimen asentaminen aivoihin aiheuttaa kudsvaurioita aivoissa, jotka voivat muuttaa kyseisen alueen kemiallista ympäristöä (Westerink ja Cremers 2007) Mikrodialyysin ollessa kyseessä, koettimen membraanin ympärille alkaa kasvaa gliasolukkoa, sen jälkeen kun koetin on ollut paikallaan noin kaksi päivää. Kun kyseessä on mikroinjektioneula, joka on aivoissa vain kahden minuutin ajan kerrallaan, ei gliasolukon kasvun voida olettaa vaikuttavan tuloksiin. Injektioiden välisenä aikana ohjauskanyyleissa olevat täyteneulat eivät ylety ventraaliseen pallidumiin asti, joten myöskään niihin kasvavasta gliasolukosta ei oletettavasti ole haittaa ventraalisen pallidumin toiminnalle. Toistuvien injektioiden aiheuttamaa solukudsvaurion mahdollista vaikutusta tuloksiin ei voida kuitenkaan täysin sulkea pois. Varmuus asiaan saataisiin tekemällä samanlainen koe, mutta käyttämällä jokaista rottaa vain yhden kerran ja vertaamalla tuloksia nyt tehtyyn kokeeseen.

Edellä olevissa kappaleissa mainittujen asioiden takia olisi tarpeen tehdä lisäkoee, jossa ryhmäkokoja suurennettaisiin ja rottien ryhmäjako suoritettaisiin niin, että etanolin kulutuksen perustasojen välillä olisi huomattavasti pienempi hajonta. Lisäksi tarvittaisiin tutkimuksia joissa saataisiin selvillä ventraaliseen pallidumiin annostellun lääkeaineen vaikutus halutun alueen opioidireseptorien toimintaan. Mahdollinen menetelmä tässä olisi tutkia fos-proteiinin (fos-like protein) ilmentymistä mikroinjektioalueille ja näin varmistaa millä ventraalisen pallidumin alueella lääkeaine vaikuttaa (Smith ja Berridge 2005).

5 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Ventraalisen pallidumin opioidergisen toiminnan merkitystä etanolin kulutukseen ei ole tutkittu ennen tällä tavalla ja tämä tulee ottaa huomioon tulosten pohdinnassa. Tuloksia ei ollut siis mahdollista suoraan verratta muiden tutkimusryhmien tuloksiin. Nyt saadut tulokset luovat pohjaa tuleville tutkimuksille joissa pyritään selvittämään ventraalisen pallidumin merkitystä etanolin kulutukseen ja alkoholiriippuvuuteen. Tulosten merkitystä pohdittaessa on otettava huomioon teoria ventraalisen pallidumin merkityksestä mielihyvää tuottavien tapahtumien välittämisessä. Ventraalisen pallidumin toiminnan voidaan ajatella olevan tärkeä motivoitumisen säätelyssä, eli siis sen mitä eläin tekee saadakseen etanolia tai jotain muuta palkitsevuutta aiheuttavaa ainetta ja kuinka paljon se on valmis ponnistelemaan saadakseen ainetta.

Vertailtaessa tuloksia ventraaliseen pallidumiin annosteltujen GABAergisten lääkeaineiden vaikutuksesta etanolin kulutukseen, huomioon ottaen kyseisten aineiden vaikutukset solujen kalvojännitteeseen, voidaan päätellä ventraalisen pallidumin toiminnan inhibitiolla olevan etanolin kulutukseen liittyviä palkitsemismekanismia estävä vaikutus. On mielenkiintoista, että ainostaan μ -opioidi reseptorien aktivaatio sai aikaan merkittävän vaikutuksen etanolin kulutuksessa. Kaikkien opioidi reseptorien solukohtainen vaikutus on kuitenkin inhibitorinen. Lisäksi ventraalisessa pallidumissa on havaittu olevan kaikkia opioidi reseptorityyppejä. Voisi siis periaatteessa olettaa, että minkä tahansa opioidi reseptorin aktivaatio inhiboisi ventraalisen pallidumin toimintaa. Näin ei kuitenkaan tämän tutkimuksen tulosten perusteella voida sanoa. Kyseinen ero saattaa johtua siitä, että kaikki reseptorityypit kyllä aktivoituvat tai inhiboituvat lääkeaineannostelun seurauksena, mutta ainoastaan kriittisessä kohdassa olevat reseptorit saavat aikaan vaikutuksen. Ventraalisen pallidumin ollessa kyseessä siis ainostaan μ -opioidi reseptorit. Tutkimuksia tarvittaisiin siis selvittämään mihin neuroneihin ventraalisen pallidumin μ -opioidi reseptorit ovat yhteydessä ja minkä aivoalueiden toimintaa kyseiset neuronit säätelevät.

Nyt tehdyn, sekä aiempien tutkimusten tulosten perusteella voidaan olettaa, että ventraalisen pallidumin toiminnalla on olennainen merkitys etanolin aiheuttamien palkitsemismekanismien säätelyssä. Ottaen huomioon mahdollisuuden, että mesolimbisen dopamiiniradan toiminta ei ole välttämätöntä etanolin kulutuksen

säätelyssä, voi olla että ventraalinen pallidumin on erittäin merkittävässä roolissa etanolin kulutuksen säätelyssä. Se, onko ventraalisen pallidumin rooli ainoastaan välittää etanolin aiheuttamien mielihyvätuntemuksien aikaansaamaa motivaation lisääntymistä etanolin juontia kohden, vai osallistuuko ventraalinen pallidum itse mielihyvätuntemuksen välittämiseen aivoissa, on mielenkiintoinen kysymys, mutta ei selviä tämän tutkimuksen tulosten perusteella. Asiaa voidaan yrittää selvittää hypoteettisen pohdinnan kautta.

Pohdinta voidaan aloittaa miettimällä ihmisen ja eläimen, tässä tapauksessa rotan, aivojen rakenteellisia eroja ja niistä johtuvia eroja käyttäytymisessä. Eläin kuten rotta elää ulkoisten ärsykkeiden ohjaamana, eikä sillä ole mahdollisuuksia vaikuttaa toimintaansa tietoisien mekanismien tavoin kuten ihminen. Ihmisellä on kyky kontrolloida ja hillitä käyttäytymistään isoaivojen alueiden, etenkin etuaivokuoren ansiosta. Rotilta kyseinen mahdollisuus on poissuljettu. Rotan voidaan ajatella käyttäytyvän ikään kuin biologisen robotin tavoin joka ottaa vastaan ulkopuolelta tulevia ärsykejä ja reagoi niihin kuin refleksin omaisesti. Rotan ja ihmisen aivojen välillä on evoluutiosta johtuen tiettyjä samankaltaisia aivoalueita, kuten aivoalueet joiden uskotaan liittyvän mielihyvän välittämiseen. Voidaan siis periaatteessa kuvitella, että ihmisen aivot ovat kuin rotan aivot höystettynä tietoisuudella. Jos asiaa ajatellaan näin, tekee se riippuvuuksien tutkimisesta erittäin vaikean tehtävän. Esimerkiksi ventraalisen pallidumin kohdalla asiaa voitaisiin ajatella seuraavasti. Rotalla ventraalinen pallidum ohjaa rotan käyttäytymistä siten, että rotta kohdistaa motivaationsa vahvistumista aiheuttavia asioita kohtaan. Esimerkkinä etanolin juonti tai heroisiin itseannostelu. Kyseiset aineet saavat aikaan sen, että ventraalisen pallidumin toiminta muuttu siten, että rotan käyttäytyminen suuntautuu kohti näitä aineita. Koska rotalla ei ole mahdollisuutta vaikuttaa tähän ohjaavaan ”käskyyn”, se tekee sen pakonomaisesti. Ihmisillä ventraalisen pallidumin voisi kuvitella toimivan samalla tavalla, mutta sillä erolla että ihminen pystyy tiettyyn rajaan asti vaikuttamaan tietoisesti toimintaansa ja näin hillitä ventraalisen pallidumin kautta välittyvää motivoitumista. Ventraalisen pallidumin kohdalla tämä saattaa esimerkiksi tapahtua etuaivokuoresta projisoituvien glutatergisten hermoyhteyksien välityksellä. Jos käy kuitenkin niin, että ventraalisen pallidumin toiminta voimistuu liikaa (esim. neuroplastisten mekanismien seurauksena), ei etuaivojen tietoinen toiminta enää pysty rajoittamaan ventraalisen pallidumin toimintaa ja yksilön motivaatio suuntautuu

päihdettä kohti yhä voimakkaammin. Ventraalisen pallidumin toiminnan voimistuessa liikaa ihminen ei kykene enää laisinkaan kontrolloimaan sen toimintaa, vaan käyttäytyminen muuttuu rotan tavoin robottimaiseksi, eikä kyseinen yksilö enää pysty hallitsemaan käyttäytymistään.. Edellä kuvatun ajattelutavan perusteella on myös mahdollista ajatella seuraavanlainen tilanne. Jos ventraalinen pallidum ei osallistu mielihyvän kokemiseen, vaan ainoastaan motivoitumiseen, on teoriassa mahdollista, että yksilö, jolla ventraalisen pallidumin toiminta on häiriintynyt kuluttaa päihdettä ilman, sen tuottamaa mielihyvätuntemusta. Tämä saattaisi johtaa tilanteeseen jossa esimerkiksi alkoholisti joisi alkoholia pakonomaisesti saamatta siitä mielihyvää tai vaihtoehtoisesti ihminen joka ei pysty kontrolloimaan syömistään, söisi jatkuvasti ilman, että ruoka tuottaisi hänelle minkäänlaisia mielihyvän tuntemuksia. On syytä painottaa, että edellä kuvattu pohdinta on täysin hypoteettista selityksen etsimistä ventraalisen pallidumin toiminnassa palkitsevien tapahtumien säätelijänä.

Ainakin yksi kysymys jää vielä avoimeksi pohdittaessa riippuvuuden syitä ja ventraalisen pallidumin roolia sen säätelyssä. Kysymys on se, että mikä todella on opioidergisen järjestelmän merkitys etanoliin liittyvän vahvistumisen taustalla. Asiaa voidaan pohtia riippuvuuden dilemman pohjalta, eli siis kumpi tässä tapauksessa aiheuttaa rottien etanolin juomisen lisääntymistä? Vähentynyt spontaani opioiderginen aktiivisuus jota rotat pyrkivät kompensoimaan juomalla etanolia vai etanolin aiheuttama kroonisesti lisääntynyt opioiderginen aktiivisuus joka voimistaa etanoliin liittyvää vahvistumista. Eli tapahtuuko ventraalisen pallidumin kohdalla niin, että μ -opioidireseptorien aktivaatio lääkaineella saa aikaan rottilla mielihyvää, jonka takia niillä ei ole tarvetta juoda enempää. Vastauksen etsimistä kysymykseen vaikeuttaa olennaisesti se, että kun samoja lääkaineita kuin tässä tutkimuksessa annostellaan syteemisesti, saadaan erilaisia, jopa päinvastaisia vaikutuksia etanolin kulutukseen kuin nyt saadut tulokset. Esimerkkinä voidaan pitää aiemmin mainittuja tutkimustuloksia naloksonin ja naltreksonin vaikutuksista rottien etanolin kulutukseen. Tämä antaa syytä olettaa, että esimerkiksi μ -opioidergisten reseptorien toiminta etanolin kulutuksen kokonaisvaltaisessa säätelyssä ohjaa etanolin kulutusta joidenkin aivoalueiden kautta joilla on ventraalista pallidumia voimakkaampi vaikutus etanolin kulutuksen säätelyyn. Koska kyse on systeemisestä annostelusta, on mahdollista, että ventraalisen pallidumin rooli on erittäin tärkeä, mutta koska vaikutus kohdistuu useaan kohtaan aivoissa nettovaikutus näyttää olevan päinvastainen kuin tässä tutkimuksessa saatujen tulosten

perusteella voidaan olettaa. Systeemisessä annostelussa lääkeaineiden konsentraatiot saattavat olla myös erilaisia kuin paikallisen annostelun yhteydessä ja tämä saattaa johtaa erisuuntaisiin tuloksiin. Etenkin kun otetaan huomioon aiemmin kuvatut havoinnot pre- ja postsynaptisten opioidireseptorien vastakkaissuuntaisista vaikutuksista ja siitä, että saman aivoalueen (esim. ventraalinen pallidum) toimintaa voi säädellä kumpikin mekanismi. On syytä painottaa kuitenkin, että nyt tehdyn tutkimuksen tarkoituksena oli tarkastella nimenomaan ventraalisen pallidumin toimintaa etanolin liittyvässä vahvistumiskäyttäytymisessä, eikä näiden tulosten perusteella voida tehdä suoria johtopäätöksiä esimerkiksi siitä, että jokin opioiderginen lääkeaine saa aikaan etanolin kulutuksen laskun jos sitä annosteltaisiin esim. tablettimuodossa. Tässä vaiheessa voidaan todeta, että edellä kuvatut asiat jäävät tältä erää vielä pohtimisen asteelle, mutta selvää kuitenkin on, että lisää tutkimuksia tämän mielenkiintoisen aivoalueen toiminnasta tarvitaan, jotta sen merkitys mielihyvätieton osana pystytään ymmärtämään.

6 YHTEENVETO

Lähes kaikki päihteenä käytetyt aineet lisäävät dopamiinin vapautumista mesolimbisen dopamiiniradan päätepisteenä olevassa accumbens-tumakkeessa. Tämän takia niiden vaikutukset on liitetty tiiviisti dopaminergisen järjestelmän toimintaan. Mesolimbisen dopamiiniradan toiminta näyttää olevan välttämätön esimerkiksi kokaiinin ja amfetamiinin palkitsevien vaikutusten osalta. Etanolin kohdalla palkitsevat vaikutukset näyttäisivät kuitenkin välittyvän mesolimbisesta dopamiiniradasta poikkeavia neuronaaalisia reittejä pitkin. Tätä puoltaa havainto jonka mukaan mesolimbisen dopamiiniradan hermoyhteyksien tuhoaminen accumbens-tumakkeessa ei vaikuta etanolin kulutukseen rotilla. Etanolin mahdollinen vaikutuskohta mielihyväjärjestelmässä saattaa siten olla accumbens-tumakkeen suoran stimulaation lisäksi, siitä ventraaliseen pallidumiin projisoituvat GABA- ja opioidergiset haarakesolut, sekä ventraalisen pallidumin GABA- ja opioidergiset reseptorit. Ventraalinen pallidum on aivojen rakenne jota pidetään mielihyväradan viimeisenä rakenteena ja sen on todettu välittävän luonnolliseen mielihyvään ja päihteisiin liittyvää vahvistumista.

Tutkimuksen tarkoitus oli selvittää ventraalisen pallidumin opioidergisten reseptorien toiminnan merkitystä etanolin kulutuksessa. Tutkimuksessa käytettiin etanolia suosivaa AA-rottakantaa joille annosteltiin opioidergiseen järjestelmään vaikuttavia lääkeaineita mikroinjektion avulla suoraan ventraaliseen pallidumiin. Tuloksista havaittiin, että ainoastaan μ -opioidireseptoriagonistilla (DAMGO) oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus etanolin kulutukseen. Etanolin kulutuksen lasku oli annosriippuvainen ja laski kahdella suurimmalla annoksella. Selkein ero havaittiin ensimmäisen 50 minuutin aikana etanolin juomisen aloittamisesta. Muilla lääkeaineilla ei havaittu eroa etanolin kulutuksessa. μ -opioidireseptoriantagonistilla (CTOP) etanolin kulutuksen nousu oli lähellä merkitsevyyttä ($p=0.08$) toiseksi suurimmalla annoksella. Johtopäätöksenä oli, että μ -opioidireseptoriaktivaatio ventraalisessa pallidumissa vähentää etanolin juomiseen liittyvää vahvistumista AA-rotilla. μ -opioidireseptorin toiminnan estämisellä oli lievä etanolin kulutusta nostava vaikutus, mutta tätä ei voida pitää luotettavana vaan lisätutkimuksia tarvitaan. δ - ja κ -opioidireseptorien aktivaatiolla tai inaktivaatiolla ei ollut vaikutusta etanolin juomiseen kyseisellä rottakannalla. Tuloksista tehdyt johtopäätökset tukevat teoriaa ventraalisen pallidumin roolista mielihyväjärjestelmän osana. Vertailtaessa tuloksia ventraaliseen pallidumiin annosteltujen GABAergisten lääkeaineiden vaikutuksesta etanolin kulutukseen, huomioon ottaen kyseisten aineiden vaikutukset solujen kalvojäännitteeseen, voidaan päätellä ventraalisen pallidumin toiminnan inhibitiolla olevan etanolin kulutukseen liittyviä palkitsemismekanismeja estävä vaikutus.

7 KIITOKSET

Kiitokseni osoitan erityisesti erikoistyöni ohjaajalle Kalervo Kiianmaalle erinomaisesta mahdollisuudesta saada tehdä kyseinen työ hänen tutkimusryhmässään, sekä lukuisista hyvistä ja rohkaisevista neuvoista työn edetessä. Haluan kiittää myös Heidi Kempaista ja Leena Tanner-Väisästä loistavasta ohjauksesta kokeisiin liittyvissä kirurgisissa toimenpiteissä, kokeen toteuttamisessa sekä useissa mieltäni askarruttavissa asioissa, joihin en olisi yksinäni löytänyt vastausta. Haluan kiittää myös koko Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Päihteet ja riippuvuus osaston henkilökunta hyvästä työilmapiiristä ja kannustavasta asenteesta. Lisäksi haluan kiittää erityisesti vaimoani ja poikaani siitä, että ovat jaksaneet olla tukenani koko tämän haasteellisen, pitkiäkin päiviä vaativan ajanjakson aikana.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Acquas E, Meloni M, Di Chiara G: Blockade of delta-opioid receptors in the nucleus accumbens prevents ethanol-induced stimulation of dopamine release. *Eur J Pharmacol* 230: 239-241, 1993.

Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM: Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7: 223-255, 1984.

Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S: Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend* 51: 127-140, 1998.

Alan A. Boulton, Glen B. Baker, Peter H. Wu: Animal models of drug addiction. 1. painos. Humana Press. New Jersey 1992.

Austin MC, Kalivas PW: Enkephalinergic and GABAergic modulation of motor activity in the ventral pallidum. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 1370-1377, 1989.

Beaver JD, Lawrence AD, van Ditzhuijzen J, Davis MH, Woods A, Calder AJ: Individual differences in reward drive predict neural responses to images of food. *J Neurosci* 26: 5160-5166, 2006.

Bengtson CP, Osborne PB: Electrophysiological properties of cholinergic and noncholinergic neurons in the ventral pallidal region of the nucleus basalis in rat brain slices. *J Neurophysiol* 83: 2649-2660, 2000.

Benjamin D, Grant ER, Pohorecky LA: Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res* 621: 137-140, 1993.

Biggio G, Concas A, Follesa P, Sanna E, Serra M: Stress, ethanol, and neuroactive steroids. *Pharmacol Ther* 116: 140-171, 2007.

Bonci A, Williams JT: Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* 17: 796-803, 1997.

Bozarth MA: Neuroanatomical boundaries of the reward-relevant opiate-receptor field in the ventral tegmental area as mapped by the conditioned place preference method in rats. *Brain Res* 414: 77-84, 1987.

Brodie MS, Shefner SA, Dunwiddie TV: Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Res* 508: 65-69, 1990.

Budygin EA, Phillips PE, Wightman RM, Jones SR: Terminal effects of ethanol on dopamine dynamics in rat nucleus accumbens: an in vitro voltammetric study. *Synapse* 42: 77-79, 2001.

Bunney EB, Appel SB, Brodie MS: Electrophysiological effects of cocaethylene, cocaine, and ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 696-703, 2001.

- Caille S, Parsons LH: Intravenous heroin self-administration decreases GABA efflux in the ventral pallidum: an in vivo microdialysis study in rats. *Eur J Neurosci* 20: 593-596, 2004.
- Calder JA, Beaver JD, Davis MH, van Ditzhuijzen J, Keane J, Lawrence AD: Disgust sensitivity predicts the insula and pallidal response to pictures of disgusting foods. *Eur J Neurosci* 25: 3422–3428, 2007.
- Carboni S, Isola R, Gessa GL, Rossetti ZL: Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-D-aspartate in the rat striatum. *Neurosci Lett* 152: 133-136, 1993.
- Carlezon WA, Jr Devine DP, Wise RA: Habit-forming actions of nomifensine in nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 122: 194-197, 1995.
- Carr GD, White NM: Conditioned place preference from intra-accumbens but not intra-caudate amphetamine injections. *Life Sci* 33: 2551-2557, 1983.
- Chesselet MF: Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: facts and hypothesis. *Neuroscience* 12: 347-375, 1984.
- Chrobak JJ, Napier TC: Opioid and GABA modulation of accumbens-evoked ventral pallidal activity. *J Neural Transm Gen Sect* 93: 123-143, 1993.
- Colombo G, Grant K: NMDA receptor complex antagonists have ethanol-like discriminative stimulus effects. *Ann N Y Acad Sci* 28: 421-423, 1992.
- Corbett AD, Paterson SJ, McKnight AT, Magnan J, Kosterlitz HW: Dynorphin and dynorphin are ligands for the kappa-subtype of opiate receptor. *Nature* 299: 79-81, 1982.
- Cowen MS, Lawrence AJ: The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23: 1171-1212, 1999.
- Cowen MS, Chen F, Lawrence AJ: Neuropeptides: implications for alcoholism. *J Neurochem* 89: 273-285, 2004.
- Cromwell HC, Berridge KC: Where does damage lead to enhanced food aversion: the ventral pallidum/substantia innominata or lateral hypothalamus? *Brain Res* 624: 1-10, 1993.
- De Waele JP, Kiianmaa K, Gianoulakis C: Spontaneous and ethanol-stimulated in vitro release of beta-endorphin by the hypothalamus of AA and ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res* 18: 1468-1473, 1994.
- De Waele JP, Kiianmaa K, Gianoulakis C: Distribution of the mu and delta opioid binding sites in the brain of the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA lines of rats. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 518-527, 1995.

- Delfs JM, Kong H, Mestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T, Chesselet MF: Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level. *J Comp Neurol* 345: 46-68, 1994.
- Di Chiara G, Imperato A: Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5274-5278, 1988.
- Eriksson K: Genetic selection for voluntary alcohol consumption in albino rat. *Science* 159: 739-741, 1968.
- Farrar AM, Font L, Pereira M, Mingote S, Bunce JG, Chrobak JJ, Salamone JD: Forebrain circuitry involved in effort-related choice: Injections of the GABAA agonist muscimol into ventral pallidum alter response allocation in food-seeking behavior. *Neuroscience* 152: 321-330, 2008.
- Geisler S, Marinelli M, Degarmo B, Becker ML, Freiman AJ, Beales M, Meredith GE, Zahm DS: Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33: 2688-2700, 2008.
- Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G: Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 348: 201-203, 1985.
- George Paxinos ja Charles Watson: *The Rat Brain: in stereotaxic coordinates*. 4. painos. Academic press, San Diego, California 1998.
- Gianoulakis, C, de Waele JP, Kiianmaa K: Differences in the brain and pituitary beta-endorphin system between the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res* 16: 453-459, 1992.
- Gilpin NW, Koob GF: *Neurobiology of Alcohol Dependence: Focus on Motivational Mechanisms*. *Alcohol Res Health* 31: 185-195, 2008.
- Gong W, Neill D, Justice JB Jr: Conditioned place preference and locomotor activation produced by injection of psychostimulants into ventral pallidum. *Brain Res* 707: 64-74, 1996.
- Gong W, Neill D, Justice JB Jr: 6-Hydroxydopamine lesion of ventral pallidum blocks acquisition of place preference conditioning to cocaine. *Brain Res* 754: 103-112, 1997.
- Gong W, Neill DB, Justice JB Jr: GABAergic modulation of ventral pallidal dopamine release studied by in vivo microdialysis in the freely moving rat. *Synapse* 29: 406-412, 1998.
- Harvey SC, Foster KL, McKay PF, Carroll MR, Seyoum R, Woods JE, Grey C, Jones CM, McCane S, Cummings R, Mason D, Ma C, Cook JM, June HL: The GABA(A) receptor alpha1 subtype in the ventral pallidum regulates alcohol-seeking behaviors. *J Neurosci* 22: 3765-3775, 2002.

Herz A: Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology* 129: 99-111, 1997.

Hirose N, Murakawa K, Takada K, Oi Y, Suzuki T, Nagase H, Cools AR, Koshikawa N: Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta1- and delta2-opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 135: 213-225, 2005.

Hoebel BG, Monaco AP, Hernandez L, Aulisi EF, Stanley BG, Lenard L: Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology* 81: 158-163, 1983.

Hoffman DC, West TE, Wise RA: Ventral pallidal microinjections of receptor-selective opioid agonist produce differential effects on circling and locomotor activity in rats. *Brain Res* 550: 205-212, 1991.

Holt AG, Newman SW: Distribution of methionine and leucine enkephalin neurons within the social behavior circuitry of the male Syrian hamster brain. *Brain Res* 1030: 28-48, 2004.

Hubner CB, Koob G.F: The ventral pallidum plays a role in mediating cocaine and heroin self-administration in the rat. *Brain Res* 508: 20-29, 1990.

Hyytiä P, Sinclair JD: Demonstration of lever pressing for oral ethanol by rats with no prior training or ethanol experience. *Alcohol* 6: 161-164, 1988.

Hyytiä P, Sinclair JD: Oral etonitazene and cocaine consumption by AA, ANA and Wistar rats. *Psychopharmacology* 111: 409-414, 1993.

Hyytiä P, Sinclair JD: Responding for oral ethanol after naloxone treatment by alcohol-preferring AA rats. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 631-636, 1993.

Hyytiä P, Koob GF: GABA_A receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *Eur J Pharmacol* 283:151-159, 1995.

Hyytiä P, Schulteis G, Koob GF: Intravenous heroin and ethanol self-administration by alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Psychopharmacology* 125: 248-254, 1996.

Hyytiä P, Kiianmaa K: Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 25-33, 2001.

Ikemoto S, McBride WJ, Murphy JM, Lumeng L, Li TK: 6-OHDA-lesions of the nucleus accumbens disrupt the acquisition but not the maintenance of ethanol consumption in the alcohol-preferring P line of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 1042-1046, 1997.

Jack R. Cooper, Floyd E. Bloom, Robert H. Roth: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 8. painos. Oxford University Press Inc., New York 2003.

Jarjour S, Bai L, Gianoulakis C: Effect of acute ethanol administration on the release of opioid peptides from the midbrain including the ventral tegmental area. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 1033-1043, 2009.

Jiang ZG, North RA: Pre- and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. *J Neurosci* 12: 356-361, 1992.

Job MO, Tang A, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Bergeson SE, Gonzales RA: Mu opioid receptor regulation of ethanol-induced dopamine response in the ventral striatum: evidence of genotype specific sexual dimorphic epistasis. *Biol Psychiatry* 62: 627-634, 2007.

Johnson SW, North RA: Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12: 483-488, 1992.

Johnson PI, Stellar JR, Paul AD: Regional reward differences within the ventral pallidum are revealed by microinjections of a mu opiate receptor agonist. *Neuropharmacology* 32: 1305-1314, 1993.

Johnson PI, Parente MA, Stellar JR: NMDA-induced lesions of the nucleus accumbens or the ventral pallidum increase the rewarding efficacy of food to deprived rats. *Brain Res* 722: 109-117, 1996.

Johnson PI, Napier TC: Morphine modulation of GABA- and glutamate-induced changes of ventral pallidal neuronal activity. *Neuroscience* 77: 187-197, 1997.

Johnson PI, Napier TC: Ventral pallidal injections of a mu antagonist block the development of behavioral sensitization to systemic morphine. *Synapse* 38: 61-70, 2000.

June HL, Foster KL, McKay PF, Seyoum R, Woods JE, Harvey SC, Eiler WJ, Grey C, Carroll MR, McCane S, Jones CM, Yin W, Mason D, Cummings R, Garcia M, Ma C, Sarma PV, Cook JM, Skolnick P: The reinforcing properties of alcohol are mediated by GABA(A1) receptors in the ventral pallidum. *Neuropsychopharmacology* 28: 2124-2137, 2003.

Kalivas PW, Volkow ND: The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162: 1403-1413, 2005.

Kemppainen H, Raivo N, Kiianmaa K: Opioidergic and GABAergic modulation of ethanol self-administration in the ventral pallidum of alcohol-preferring AA rats. *Abstrakti ESBRA (European Society for Biomedical Research on Alcoholism)* 2009.

Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C: Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66: 285-306, 2002.

Kiianmaa, K, Stenius K, Sinclair JD: Determinants of alcohol preference in the AA and ANA rat lines selected for differential ethanol intake. *Alcohol Alcohol Suppl* 1: 115-120, 1991.

Kiianmaa K, Nurmi M, Nykänen I, Sinclair JD: Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 29-34, 1995.

Kiianmaa K: Alkoholi. Kirjassa: Päihdelääketiede, ss. 120, 2. painos. Toim. Salaspuro M, Kiianmaa K, Seppä K, Duodecim, Helsinki 2003.

Kiianmaa K, Hyytiä P: Päihteiden vaikutusten neurobiologinen perusta. Kirjassa: Päihdelääketiede, ss. 110, 2. painos. Toim. Salaspuro M, Kiianmaa K, Seppä K, Duodecim, Helsinki 2003.

Klitenick MA, Deutch AY, Churchill L, Kalivas PW: Topography and functional role of dopaminergic projections from the ventral mesencephalic tegmentum to the ventral pallidum. *Neuroscience* 50: 371-386, 1992.

Koistinen M, Tuomainen P, Hyytiä P, Kiianmaa K: Naltrexone suppresses ethanol intake in 6-hydroxydopamine-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 1605-1612, 2001.

Koulu M, Tuomisto J: Johdanto neurofarmakologiaan, neurotransmissio. Kirjassa: Farmakologia ja toksikologia, ss. 149, 6. painos. Toim. Koulu ja Tuomisto, Kuopio 2007.

Korpi E: Alkoholin vaikutus hermosoluihin. *Duodecim* 106: 1587-1595, 1990.

Korpi E, Setälä T: Alkoholin vaikutusmekanismi, interaktiot ja väärinkäyttöön liittyvä hoito. *Duodecim* 114: 1029-1036, 1998.

Korpi E: Etanoli. Kirjassa: Farmakologia ja toksikologia, ss. 403, 6. painos. Toim. Koulu ja Tuomisto, Kuopio 2007.

Koob GF, Le Moal M: Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-58, 1997.

Koob GF: A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochem Pharmacol* 15: 1515-1525, 2004.

Koob GF, Volkow ND: Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35: 217-238, 2010.

Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC: N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther* 99: 79-94, 2003.

Krystal JH, Staley J, Mason G, Petrakis IL, Kaufman J, Harris RA, Gelernter J, Lappalainen J: Gamma-aminobutyric acid type A receptors and alcoholism: intoxication, dependence, vulnerability, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 63: 957-968, 2006.

Lahti RA, Mickelson MM, Jodelis KS, McCall JM: Comparative neuroanatomical distribution of the kappa and mu opioid receptors in guinea pig brain sections. *Eur J Pharmacol* 166: 563-566, 1989.

Lambert JJ, Belelli D, Harney SC, Peters JA, Frenguelli BG (2001) Modulation of native and recombinant GABA(A) receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. *Brain Res Rev* 37: 68-80, 2001.

Law PY, Wong YH, Loh HH: Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 389-430, 2000.

Leone P, Pocock D, Wise RA: Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release. *Pharmacol Biochem Behav* 39: 469-472, 1991.

Lyness WH, Smith FL: Influence of dopaminergic and serotonergic neurons on intravenous ethanol self-administration in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 42: 187-192, 1992.

Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ: Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* 7: 2445-2464, 1987.

Mansour A, Thompson RC, Akil H, Watson SJ: Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *J Chem Neuroanat* 6: 351-362, 1993.

Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ: Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350: 412-438, 1994.

Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ: Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18: 22-29, 1995.

Marinelli PW, Kiianmaa K, Gianoulakis C: Opioid propeptide mRNA content and receptor density in the brains of AA and ANA rats. *Life Sci* 66: 1915-1927, 2000.

Matsumoto H, Fukui Y: Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. *Addict Biol* 7: 5-14, 2002.

McAlonan GM, Robbins TW, Everitt BJ: Effects of medial dorsal thalamic and ventral pallidal lesions on the acquisition of a conditioned place preference: further evidence for the involvement of the ventral striatopallidal system in reward-related processes. *Neuroscience* 52: 605-620, 1993.

Mitchell JM, Liang MT, Fields HL: A single injection of the kappa opioid antagonist norbinaltorphimine increases ethanol consumption in rats. *Psychopharmacology* 182: 384-392, 2005.

Mitrovic I, Napier TC: Electrophysiological demonstration of mu, delta and kappa opioid receptors in the ventral pallidum. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 1260-1270, 1995.

Mogenson GJ, Jones DL., Yim CY: From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14: 69-97, 1980.

Moskowitz AS, Goodman RR: Light microscopic autoradiographic localization of mu and delta opioid binding sites in the mouse central nervous system. *J Neurosci* 4: 1331-1342, 1984.

Murakawa K, Hirose N, Takada K, Suzuki T, Nagase H, Cools AR, Koshikawa N: Deltorphin II enhances extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens via opioid receptor-independent mechanisms. *Eur J Pharmacol* 491: 31-36, 2004.

Museo E, Wise RA: Place preference conditioning with ventral tegmental injections of cytisine. *Life Sci* 55: 1179-1186, 1994.

Napier TC, Muench MB, Maslowski RJ, Battaglia G: Is dopamine a neurotransmitter within the ventral pallidum/substantia innominata? *Adv Exp Med Biol* 295: 183-195, 1991.

Napier TC, Mitrovic I: Opioid modulation of ventral pallidal inputs. *Ann N Y Acad Sci* 877: 176-201, 1999.

Nurmi M, Kiianmaa K, Sinclair JD: Brain ethanol in AA, ANA, and Wistar rats monitored with one-minute microdialysis. *Alcohol* 11: 315-321, 1994.

Nylander I, Hyytiä P, Forsander O, Terenius L: Differences between alcohol-preferring (AA) and alcohol-avoiding (ANA) rats in the prodynorphin and proenkephalin systems. *Alcohol Clin Exp Res* 18: 1272-1279, 1994.

Ojanen S, Koistinen M, Backström P, Kankaanpää A, Tuomainen P, Hyytiä P, Kiianmaa K: Differential behavioural sensitization to intermittent morphine treatment in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats: role of mesolimbic dopamine. *Eur J Neurosci* 17: 1655-1663, 2003.

Okutsu H, Watanabe S, Takahashi I, Aono Y, Saigusa T, Koshikawa N, Cools AR: Endomorphin-2 and endomorphin-1 promote the extracellular amount of accumbal dopamine via nonopioid and mu-opioid receptors, respectively. *Neuropsychopharmacology* 31: 375-383, 2006.

Olive MF, Bertolucci M, Evans CJ, Maidment NT: Microdialysis reveals a morphine-induced increase in pallidal opioid peptide release. *Neuroreport* 6: 1093-1096, 1995.

Olive MF, Anton B, Micevych P, Evans CJ, Maidment NT: Presynaptic versus postsynaptic localization of mu and delta opioid receptors in dorsal and ventral striatopallidal pathways. *J Neurosci* 17: 7471-7479, 1997.

Olive MF, Maidment NT: Opioid regulation of pallidal enkephalin release: bimodal effects of locally administered mu and delta opioid agonists in freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 1310-1316, 1998.

Panagis G, Miliareisis E, Anagnostakis Y, Spyraiki C: Ventral pallidum self-stimulation: a moveable electrode mapping study. *Behav Brain Res* 68: 165-172, 1995.

Panagis G, Nomikos GG, Miliareisis E, Chergui K, Kastellakis A, Svensson TH, Spyraiki C: Ventral pallidum self-stimulation induces stimulus dependent increase in c-fos expression in reward-related brain regions. *Neuroscience* 77: 175-186, 1997.

Pastor R, Sanchis-Segura C, Aragon CM: Brain catalase activity inhibition as well as opioid receptor antagonism increases ethanol-induced HPA axis activation. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 1898-1906, 2004.

Petit HO, Ettenberg A, Bloom FE, Koob GF: Destruction of the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 54: 167-173, 1984.

Pierce RC, Kumaresan V: The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30: 215-238, 2006.

Pulvirenti L, Diana M: Drug dependence as a disorder of neural plasticity: focus on dopamine and glutamate. *Rev Neurosci* 12:141-158, 2001.

Racz I, Schurmann B, Karpushova A, Reuter M, Cichon S, Montag C, Furst R, Schutz C, Franke PE, Strohmaier J, Wienker TF, Terenius L, Osby U, Gunnar A, Maier W, Bilkei-Gorzo A, Nothen M, Zimmer A: The opioid peptides enkephalin and beta-endorphin in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 64: 989-997, 2008.

Rassnick S, Stinus L, Koob GF: The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat. *Brain Res* 623: 16-24, 1993.

Reddy BV, Sarkar DK: Effect of alcohol, acetaldehyde, and salsolinol on beta-endorphin secretion from the hypothalamic neurons in primary cultures. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 1261-1267, 1993.

Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR: Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2053-2058, 2003

Roberto M, Madamba SG, Stouffer DG, Parsons LH, Siggins GR: Increased GABA release in the central amygdala of ethanol-dependent rats. *J Neurosci* 24: 10159-10166, 2004.

Roberto M, Schweitzer P, Madamba SG, Stouffer DG, Parsons LH, Siggins GR: Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: an in vitro and in vivo analysis. *J Neurosci* 24: 1594-1603, 2004.

Sanchis-Segura C, Correa M, Miquel M, Aragon CM: Catalase inhibition in the Arcuate nucleus blocks ethanol effects on the locomotor activity of rats. *Neurosci Lett* 376: 66-70, 2005.

Sarne Y, Fields A, Keren O, Gafni M: Stimulatory effects of opioids on transmitter release and possible cellular mechanisms: overview and original results. *Neurochem Res* 21: 1353-1361, 1996.

Sarviharju M, Jaatinen P, Hyytiä P, Hervonen A, Kiianmaa K: Effects of lifelong ethanol consumption on drinking behavior and motor impairment of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol* 23: 157-166, 2001.

Sharif NA, Hughes J: Discrete mapping of brain Mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors. *Peptides* 10: 499-522, 1989.

Shimura T, Imaoka H, Yamamoto T: Neurochemical modulation of ingestive behavior in the ventral pallidum. *Eur J Neurosci* 23: 1596-1604, 2006.

Sinclair JD, Le AD, Kiianmaa K: The AA and ANA rat lines, selected for differences in voluntary alcohol consumption. *Experientia* 45: 798-805, 1989.

Sinclair JD, Hyytiä, P, Nurmi M: The limited access paradigm: description of one method. *Alcohol* 9: 441-444, 1992.

Smith KS, Berridge KC: The ventral pallidum and hedonic reward: neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake. *J Neurosci* 25: 8637-8649, 2005.

Smith KS, Berridge KC: Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *J Neurosci* 27: 1594-1605, 2007.

Smith KS, Tindell AJ, Aldridge JW, Berridge KC: Ventral pallidum roles in reward and motivation. *Behav Brain Res* 196: 155-167, 2009.

Sommer W, Hyytiä P, Kiianmaa K: The alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats: neurobiology of the regulation of alcohol drinking. *Addict Biol* 11: 289-309, 2006.

Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS: Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2046-2050, 1992.

Spanagel R: Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health* 24: 124-131, 2000.

Stolerman I: Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms. *Trends Pharmacol Sci* 13: 170-176, 1992.

Stratford TR, Kelley AE, Simansky KJ: Blockade of GABA_A receptors in the medial ventral pallidum elicits feeding in satiated rats. *Brain Res* 825: 199-203, 1999.

Tacke ja Tuomisto: Riippuvuus ja väärinkäyttö. Kirjassa: Farmakologia ja toksikologia, ss. 413, 6. painos. Toim. Koulu ja Tuomisto, Kuopio 2007.

Tindell AJ, Berridge KC, Aldridge JW: Ventral pallidal representation of pavlovian cues and reward: population and rate codes. *J Neurosci* 24: 1058-1069, 2004.

Trigo JM, Martin-Garcia E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R: The endogenous opioid system: A common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend* 108: 183-94, 2009.

Ulm RR, Volpicelli JR, Volpocelli LA: Opiates and alcohol self-administration in animals. *J Clin Psychiatry* 56 (supplement 7): 5-14, 1995.

Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R: Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol* 154: 299-315, 2008

Weiss F, Porrino LJ: Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. *J Neurosci* 22: 3332-3337, 2002.

Westerink BH, Cremers TIFH: *Handbook of Microdialysis: Methods, Applications and Clinical Aspects*. 1. painos. Academic Press, London 2007.

Wise RA: Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6: 243-251, 1996.

Wise RA: Brain reward circuitry: Insights from unsensed incentives. *Neuron* 36: 229-240, 2002.

Wozniak KM, Pert A, Mele A, Linnoila M: Focal application of alcohols elevates extracellular dopamine in rat brain: a microdialysis study. *Brain Res* 540: 31-40, 1991.

Yim HJ, Schallert T, Randall PK, Gonzales RA: Comparison of local and systemic ethanol effects on extracellular dopamine concentration in rat nucleus accumbens by microdialysis. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 367-374, 1998.

Yoshida Y, Koide S, Hirose N, Takada K, Tomiyama K, Koshikawa N, Cools AR: Fentanyl increases dopamine release in rat nucleus accumbens: involvement of mesolimbic mu- and delta-2-opioid receptors. *Neuroscience* 92: 1357-1365, 1999.

Zahm DS, Zaborszky L, Alones VE, Heimer L: Evidence for the coexistence of glutamate decarboxylase and Met-enkephalin immunoreactivities in axon terminals of rat ventral pallidum. *Brain Res* 325: 317-321, 1985.

