

VENTRAALISEN PALLIDUMIN OPIOIDIRESEPTORIEN MERKITYS
ALKOHOLIN JUOMISESSA

Merja Ylitalo
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologian ja lääkehoidon osasto

Tammikuu 2016



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Osasto/Sektion– Department	
Farmasian tiedekunta		Farmakologian ja lääkehoidon osasto	
Tekijä/Författare – Author			
Merja Ylitalo			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Ventraalisen pallidumin opioidireseptorien merkitys alkoholin juomisessa			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Farmakologia			
Työn laji/Arbetets art – Level		Aika/Datum – Month and year	
Pro gradu		Tammikuu 2016	
		Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages	
		66	
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
Etanolin juominen ja riippuvuutta aiheuttavien aineiden väärinkäyttö johtavat endogeenisen opioidijärjestelmän aktivoitumiseen, mikä on tärkeässä osassa elimistön palkitsemisjärjestelmässä ja siten mielihyvävaikutusten välittymisessä. Etanoli vaikuttaa myös monien muiden välittäjäainejärjestelmien, kuten dopaminergisen, GABAergisen ja glutamatergisen järjestelmän kautta. Opioidireseptoriantagonistien kyky vähentää etanolin juomista viittaa endogeenisen opioidijärjestelmän merkittävään rooliin etanolin vaikutusten välittämisessä. Mesolimbisen palkitsemisjärjestelmän tärkeitä aivoalueita ovat ventraalinen tegmentaali alue, accumbens-tumake sekä ventraalinen pallidumi. Ventraalinen pallidumi on mesolimbisen mielihyväradan päätepiste sekä motivaatioon ja palkitsemiseen liittyvien ratojen risteämiskohta. Ventraalisen pallidumin ja erityisesti sen GABAergisen ja opioidergisen järjestelmän rooli etanolin vaikutusten välittämisessä on osoitettu useissa tutkimuksissa. Tämän tutkielman kirjallisuuskatsauksessa paneudutaan palkitsemisjärjestelmän eri aivoalueisiin ja etanolin juomisen säätelyn kannalta tärkeisiin välittäjäainejärjestelmiin. Erityisesti käydään läpi opioidergisen järjestelmän ja ventraalisen pallidumin roolia etanolin palkitsemisvaikutusten välittämisessä. Tutkielman kokeellisessa osassa oli tavoitteena selvittää ventraalisessa pallidumissa olevien μ-opioidireseptorien merkitystä etanolin juomisen säätelyssä etanolia juovaa AA- (Alko, Alcohol) rottakantaa apuna käyttäen. Hypoteesina tutkimuksessa oli, että ventraalisen pallidumin paikallinen inhibitiio ylimäärällä μ-opioidireseptoreita vaikuttaa etanolin juomiseen. AA-rottien ventraaliseen pallidumiin infusoitiin μ-opioidireseptorin geeniä ilmentävää virusvektoria (AAV-MOR), kontrollivektoria tai vehikkeliä. Käsittelyjen vaikutusta etanolin juomiseen havainnoitiin rajoitetun juomisen mallilla. Juomisseurannan jälkeen rotilla annosteltiin opioidireseptoriantagonistia, naltreksonia (0,1 mg/kg ja 0,3 mg/kg, s.c) ja opioidireseptoriantagonistia, morfiinia (3 mg/kg toistetusti, s.c) ja tutkittiin niiden vaikutusta etanolin juomiseen. Virusvektorien biologinen aktiivisuus todennettiin immunohistokemiallisten värjäysten ja qPCR:n avulla. Rottien juomiskokeissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja etanolin juomisessa ryhmien välillä. Naltreksonin 0,1 mg/kg annos vähensi tilastollisesti merkitsevästi etanolin juomista vain AAV-MOR-ryhmällä ja aiheutti tilastollisesti merkitsevän eron kontrolliin suhteutetussa etanolin juomisessa AAV-MOR- ja vektorikontrolliryhmän välillä. Nämä tulokset viittaavat naltreksonin etanolin juomista vähentävän vaikutuksen välittyvän ainakin osittain ventraalisen pallidumin kautta. Morfiinin annostelu ei aiheuttanut tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välille etanolin juomisessa. Tämän tutkimuksen tulokset eivät poissulje ventraalisen pallidumin olevan tärkeässä roolissa etanolin juomisessa.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Etanoli, Ventraalinen pallidumi, Endogeeninen opioidijärjestelmä, μ -Opioidireseptori, AA-rotta			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Farmasian tiedekunta, Farmakologian ja lääkehoidon osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Ohjaajat: prof. Atso Raasmaja, prov. Johanna Uhari-Väänänen			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Osasto/Sektion– Department
Faculty of Pharmacy		Division of Pharmacology and Pharmacotherapy
Tekijä/Författare – Author		
Merja Ylitalo		
Työn nimi / Arbetets titel – Title		
The role of ventral pallidal opioid receptors in ethanol intake		
Oppiaine /Läroämne – Subject		
Pharmacology		
Työn laji/Arbetets art – Level	Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Master's thesis	January 2016	66
Tiivistelmä/Referat – Abstract		
Ethanol intake and the use of several drugs of abuse lead to the activation of the endogenous opioid system which has an important role in reward and reinforcement. Ethanol can affect also many other neurotransmitter systems, for example the dopaminergic, GABAergic and glutamatergic systems. The ability of opioid antagonists to decrease ethanol intake refers to the important role of the opioidergic system in mediating the reinforcement from ethanol. Important brain areas in the mesolimbic reward system are the ventral tegmental area, nucleus accumbens and ventral pallidum. The ventral pallidum is regarded as the endpoint of the mesolimbic reward system and as the cross point of the motivational circuit and reward circuit. The role of the ventral pallidum and its GABAergic and opioidergic systems in ethanol reinforcement has been proven in many studies. This review goes through the brain areas involved in the reward circuit and ethanol's effects on the neurotransmitter systems connected to the reward system. This review concentrates especially on the opioidergic system and on the role of the ventral pallidum in ethanol reinforcement. The aim of this study was to research the role μ-opioid receptors in the ventral pallidum on ethanol intake using an ethanol-preferring AA (Alko, Alcohol) rat line. The hypothesis of the study was that local inhibition of the ventral pallidum with an excess of μ-opioid receptors effects ethanol intake. We infused μ-opioid receptor gene overexpressing viral vectors (AAV-MOR), control vectors or vehicle into the ventral pallidum of rats. Ethanol drinking of the rats was examined in the limited access paradigm. After the ethanol drinking study rats received injections of an opioid receptor antagonist, naltrexone (0.1 mg/kg and 0.3 mg/kg, s.c) and an opioid receptor agonist, morphine (3 mg/kg, repeatedly, s.c) before the ethanol drinking session to see what effect the drugs have on ethanol drinking. The biological activity of the viral vectors was confirmed with immunohistochemical staining and qPCR. In the ethanol drinking study there were no statistically significant differences between the groups. Naltrexone 0.1 mg/kg dose decreased statistically significantly ethanol drinking only in AAV-MOR group and caused statistically significant difference in ethanol drinking between the AAV-MOR and control vector groups when proportionate to the control. These results suggest that possibly part of to that naltrexone's ethanol intake decreasing effects are mediated via the ventral pallidum. Morphine did not cause statistically significant differences in ethanol drinking between the groups. The results of this study do not exclude the role of the ventral pallidum in controlling ethanol drinking.		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords		
Ethanol, Ventral pallidum, Endogenous opioid system, μ -Opioid receptor, AA-rat		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited		
Faculty of Pharmacy, Division of Pharmacology and Pharmacotherapy		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		
Supervisors: Prof. Atso Raasmaja, M.Sc. (Pharm.) Johanna Uhari-Väänänen		

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1	Aivojen palkitsemisjärjestelmä	2
2.2	Alkoholiriippuvuus	5
2.3	Etanolin vaikutukset eri hermovälittäjäainejärjestelmissä	7
2.3.1	Dopaminerginen välittäjäainejärjestelmä	9
2.3.2	GABAerginen välittäjäainejärjestelmä	12
2.3.3	Glutamaterginen välittäjäainejärjestelmä	14
2.3.4	Opioiderginen välittäjäainejärjestelmä	15
2.4	Endogeeninen opioidijärjestelmä	15
2.5	Etanolin vaikutukset endogeenisessä opioidijärjestelmässä	18
2.5.1	Endogeeninen opioidijärjestelmä alkoholiriippuvuudessa	20
2.5.2	Ventraalinen pallidumi ja sen rooli etanolin vaikutusten välittämisessä ..	23
3	TUTKIMUKSEN TAVOITE	25
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	26
4.1	Koe-eläimet	26
4.2	Käytetyt yhdisteet.....	27
4.3	Kokeen suoritus.....	28
4.3.1	Koeryhmät	28
4.3.2	Etanolin juominen.....	29
4.3.3	Stereotaktiset leikkaukset	30
4.3.4	Virusvektorikäsittelyn vaikutus etanolin juomiseen.....	32
4.3.5	Etanolin juomisen inhibointi naltreksonilla ja indusointi morfiinilla.....	32
4.3.6	Rottien lopetus	33
4.4	Immunohistokemialliset värjäykset	33
4.4.1	Fluoresenssivärjäys	34
4.4.2	Diaminobentsidiinivärjäys	35
4.5	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio	36
4.6	Tilastollinen analyysi	37

5	TULOKSET	38
5.1	Virusvektori­käsittelyn vaikutus etanolin juomiseen	38
5.2	Naltreksoniannostelun vaikutus etanolin juomiseen	40
5.3	Toistetun morfiiniannostelun vaikutus etanolin juomiseen	42
5.4	Fluoresenssivärjäys	44
5.5	Diaminobentsidiinivärjäys	46
5.6	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio	48
6	TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA	48
7	YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	55
8	KIRJALLISUUSLUETTELO	56

LYHENTEET

5-HT	5-hydroksitryptamiini
6-OHDA	6-hydroksidopamiini
AA	Alko, Alcohol
AAV-	Adeno-assosioitunut virusvektori
AAV-GFP	Virusvektori, johon liitetty GFP-proteiinia koodaava geeni
AAV-MOR	Virusvektori, johon liitetty μ -opioidireseptoria koodaava geeni
ABC	Avidiini-biotiini-kompleksi
AMPA	α -Amino-3-hydroksi-5-metyyli-4-iso-oksatsolipropionihappo
ANA	Alko, Non-Alcohol
ANOVA	Varianssianalyysi
cAMP	Syklinen adenosiinimonofosfaatti
DAB	Diaminobentsidiini
GABA	γ -Amino-voihappo
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaatti-dehydrogenaasi
GFAP	Gliasolulle tyypillinen fibrilliproteiini
GFP	Vihreää väriä fluoresoiva proteiini
LORR	Oikaisurefleksin katoaminen
MAP	Mitogeeni-aktivoituva proteiini
MOR	μ -Opioidireseptori
mRNA	Lähetä-RNA
NAc	Accumbens-tumake
NeuN	Hermosolulle tyypillinen tuma
NGS	Vuohen normaaliseerumi

NMDA	N-metyyli-D-aspartaatti
PBS	Fosfaattipuskuroitu saliini
PENK	Proenkefaliini
POMC	Pro-opiomelanokortiini
qPCR	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
SEM	Keskiarvon keskivirhe
VP	Ventraalinen pallidumi
VTa	Ventraalinen tegmentaalin alue

1 JOHDANTO

Suuri osa länsimaisista ihmisistä käyttää alkoholia (etanolia) (Spanagel 2009). Tärkeimmät syyt etanolin nauttimiselle ovat sen aiheuttama mielihyvä ja sosiaalisuuden lisääntyminen (Wackernah ym. 2014). Etanolin kohtuullisella käytöllä saattaa olla vähäisiä terveysvaikutuksia esimerkiksi koronaaritauteihin ja 2-tyyppin diabetekseen (Spanagel 2009; Guo ja Ren 2010). Etanolin haitat kohdistuvat muun muassa maksaan, haimaan ja aivoihin. Etanolin aiheuttamat keskushermostovaikutukset välittyvät useiden eri välittäjäainejärjestelmien välityksellä elimistön palkitsemisjärjestelmän kautta (Koob ym. 1998; Spanagel 2009). Pitkäaikainen etanolin väärinkäyttö saattaa johtaa alkoholismiin eli krooniseen sairauteen, jossa elimistö on riippuvainen alkoholista (Vengeliene ym. 2008). Etanolin on todettu olevan osallisena jopa 5,9 prosentissa kaikista kuolemista maailmassa (Alcohol, World Health Organization 2014).

Palkitsemisjärjestelmän, jonka kautta väärinkäytettävät lääkeaineet ja etanoli pääosin välittävät keskushermostovaikutuksensa, tärkeitä aivoalueita ovat ventraalinen tegmentaalin alue, accumbens-tumake sekä ventraalinen pallidumi (Koob ym. 1998; Kalivas ja Volkow 2005). Ventraalisen pallidumin ja sitä säätelevien haarakesolujen on esitetty olevan palkitsemisjärjestelmän päätepiste sekä motivaatioon ja palkitsemiseen liittyvien ratojen risteämiskohta (Smith ja Berridge 2007; Smith ym. 2009). Ventraalisen pallidumin roolia palkitsemisvaikutusten välittämisessä ja riippuvuudessa ei kuitenkaan tunneta tarkasti.

Väärinkäytettävien lääkeaineiden ja etanolin kyky lisätä dopaminergisen radan välittäjäaineen, dopamiinin, erittymistä accumbens-tumakkeessa on ajateltu olevan hyvin tärkeässä asemassa palkitsemisvaikutusten välittämisessä (Wise ja Rompre 1989; Koob ym. 1998). Tutkimukset kuitenkin osoittavat, että etanolin aiheuttamat palkitsemisvaikutukset välittyvät myös dopamiinista riippumattomien järjestelmien kautta (Koistinen ym. 2001; Shoemaker ym. 2002). Etanoli ja muut riippuvuutta aiheuttavat aineet vaikuttavat ainakin osittain myös elimistön endogeenisen opioidijärjestelmän kautta ja saavat sen kautta aikaan mielihyvän tuntemuksia (Gianoulakis 2004). Endogeeninen opioidijärjestelmä on tärkeässä asemassa monissa

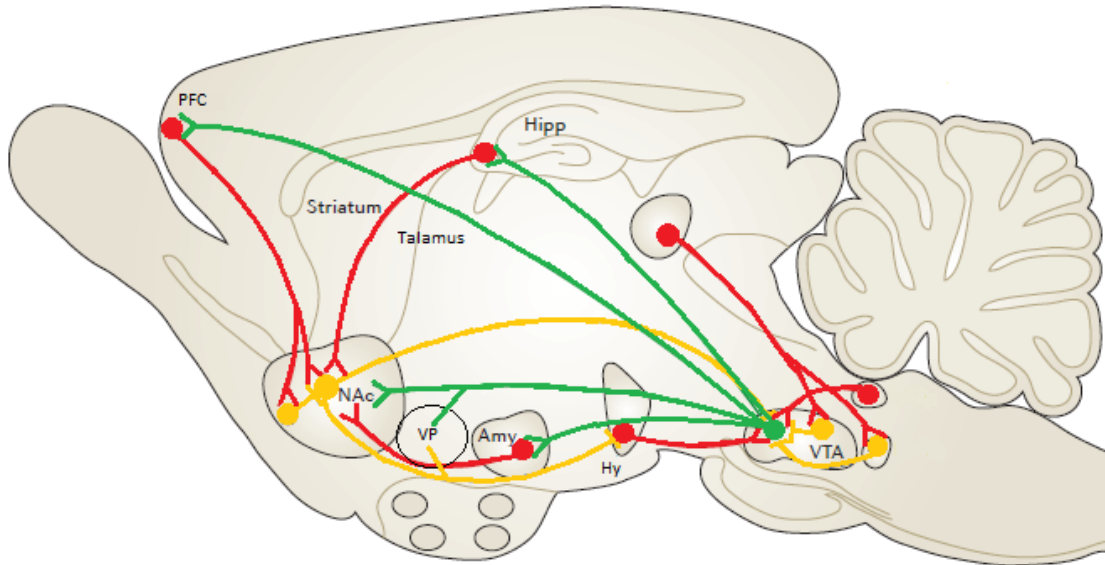
elimistön fysiologisissa toiminnoissa säätelemällä muun muassa kipua, tunteita ja muistia (Bodnar 2014).

Tässä kirjallisuuskatsauksessa paneudutaan aivojen palkitsemisradan eri alueisiin ja etanolin vaikutukseen siihen liittyvissä välittäjäainejärjestelmissä. Erityisesti opioidergisen järjestelmän roolia etanolin palkitsemisvaikutusten välittämisessä käydään läpi. Kokeellisessa osuudessa keskitytään ventraalisen pallidumin ja sen opioidergisen järjestelmän osuuteen etanolin vaikutusten välittämisessä. Aihetta on tärkeä tutkia, koska jos saataisiin tarkemmin selville etanolin vaikutustavat aivoissa, voitaisiin kehittää entistä parempia lääkkeitä alkoholismien hoitoon.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Aivojen palkitsemisjärjestelmä

Mielihyvää tuottavat yhdisteet ja toiminnot välittävät vaikutuksensa elimistön palkitsemisjärjestelmän kautta (Wise ja Rompre 1989; Wise 2002). Palkitsemisjärjestelmä säätelee elimistön reaktioita mielihyvää tuottaviin toimintoihin ja yhdisteisiin, ja se on tärkeässä osassa myös motivaatiossa ja riippuvuudessa. Aivojen palkitsemisjärjestelmää on tutkittu vuosien ajan esimerkiksi elektronisella stimulaatiolla ja aivoinjektioilla (Olds ja Milner 1954; Wise ja Rompre 1989; Wise 1998). Tutkimuksilla on saatu selville palkitsemisrataan liittyvät aivoalueet ja niiden merkitys palkitsemisradalla. Palkitsemisradan muodostaa keski- ja etuaivojen välinen alue, jonka keskusta on accumbens-tumake (Wise 1998; Spanagel ja Weis 1999). Muut aivoalueet, joita pidetään palkitsemisjärjestelmän osina, ovat ventraalinen tegmentaalin alue, ventraalinen pallidumi, septaalinen alue, amygdala, hypothalamus, hippokampus ja etuaivokuori (Wise 1998; Smith ym. 2009). Kuvassa 1 on havainnollistettu palkitsemisjärjestelmään liittyvien aivoalueiden sijaintia ja niihin liittyviä välittäjäainereitoja rotan aivoissa.



Kuva 1. Palkitsemiseen liittyviä aivoalueita ja niiden välisiä hermoyhteyksiä rotan aivoissa sagittaalisesti kuvattuna. ● = Dopaminerginen rata, ● = Glutamaterginen rata, ● = GABAerginen rata, PFC = Etuaivokuori, NAc = Accumbens-tumake, VP = Ventraalinen pallidumi, Amy = Amygdala, Hipp = Hippokampus Hy = Hypotalamus VTA = Ventraalinen tegmentaalin alue (Kuva mukailleen Smith ym. 2009; Russo ja Nestler 2013).

Palkitsemisradan keskus, accumbens-tumake, on jaettu kahteen osaan sen perusteella mitä neuroaktiivisia aineita siellä esiintyy, ytimeen ja kuoreen (Wise 1998). Accumbens-tumakkeen kuoriosaa on tärkeässä asemassa palkitsemisjärjestelmässä. Se on yhteydessä moniin aivoalueisiin, kuten esimerkiksi lateraaliseen hypotalamukseen, mediaaliselle etuaivokuorelle ja ventraaliseen tegmentaaliselle alueeseen (Wise 1998; Kalivas ja Volkow 2005). Amygdala ja talamus ovat tärkeässä osassa opittujen assosiaatioiden osalta (Kalivas ja Volkow 2005). Amygdala on yhteydessä dopaminergisiin hermosoluun muun muassa aivorunkoon, ventraaliselle tegmentaaliselle alueelle ja hypotalamukseen. Aivokuori säätelee yksilön käyttäytymisvasteita palkitsemisjärjestelmän aktivoituessa. Ventraalinen tegmentaalin alue säätelee ja välittää palkitsemisvaikutuksia eteenpäin eri aivoalueisiin. Ventraalisen pallidumin on havaittu olevan palkitsemisradan päätepiste sekä motivaatioon ja palkitsemiseen liittyvien ratojen risteämiskohta (Smith ym. 2009).

Luonnollisten palkintojen, kuten ruuan, juoman ja seksin, mutta myös monien väärinkäytettävien lääkeaineiden ja etanolin, on todettu lisäävän dopamiinin

solunulkoista pitoisuutta accumbens-tumakkeen kuoriosassa sekä ventraalisella tegmentaalisella alueella (Di Chiara ja Imperato 1988; Pontieri ym. 1995). Aktivoituneet dopaminergiset hermosolut stimuloivat etuaivokuorta, mikä johtaa palkitsemistunteisiin ja käyttäytymisvasteisiin (Berns ym. 2001; Gianoulakis 2004). Sekä käyttäytymiskokeet että farmakologiset kokeet osoittavat, että accumbens-tumakkeen dopaminergisellä radalla on tärkeä rooli lääkeaineiden aiheuttamissa palkitsemistunteissa, jotka voivat johtaa riippuvuuteen (Wise ja Rompre 1989; Samson ym. 1992; Russell ym. 1996; Spanagel ja Weiss 1999). Palkitsevat yhdisteet voivat vaikuttaa myös suoraan ventraaliseen tegmentaaliseen alueeseen tai accumbens-tumakkeeseen ja lisätä siten dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa (Spanagel ja Weiss 1999).

Dopamiinijärjestelmän aktivaation on ajateltu olevan riittävä tekijä tuottamaan palkitsemisvaikutuksia, mutta se ei välttämättä ole ainoa mekanismi, jolla palkitsemisvaikutukset välittyvät (Wise ja Rompre 1989; Gianoulakis 2004). Palkitsemisvaikutusten välittämisessä on todennäköisesti mukana useita välittäjäainejärjestelmiä, kuten esimerkiksi opioiderginen, GABAerginen ja glutamaterginen järjestelmä (Spanagel ja Weiss 1999). Näiden välittäjäaineratojen sijaintia aivoissa ja kytköksiä toisiinsa on havainnoitu kuvissa 1 ja 2. Etanolin ja muiden väärinkäytettävien lääkkeiden suorat ja epäsuorat vaikutukset opioidi-, glutamaatti-, GABA- ja kannabinoidijärjestelmiin saattavat johtaa dopamiinin lisääntyneeseen vapautumiseen accumbens-tumakkeessa tai ne voivat välittää palkitsemisvaikutuksia myös dopamiinista riippumattomasti (Gianoulakis 2004; Vengeliene ym. 2008).

Opioidit aktivoivat endogeenisiä opioidireseptoreita ventraalisella tegmentaalisella alueella, accumbens-tumakkeessa ja amygdalassa, ja välittävät muun muassa niiden kautta mielihyvävaikutuksensa (Goldstein 1977; Koob 2013; Bodnar 2014). Etanoli lisää endogeenisten opioidipeptidien vapautumista ventraalisella tegmentaalisella alueella, accumbens-tumakkeessa ja amygdalassa. Palkitsemisradan viimeinen osa, ventraalinen pallidumi, on jatkuvasti inhiboituina johtuen sitä hermottavista opioidipeptidejä koekspressoivista GABAergisistä hermosoluista (Smith ym. 2009).

Näiden GABAergisten hermosolujen inhibition esto opioidipeptideillä accumbens-tumakkeessa johtaa palkitsemiseen ja motivaatioon liittyvien ratojen risteämiskohdan, ventraalisen pallidumin, aktivoitumiseen. Kun ventraalisen pallidumi aktivoituu, se saattaa lisätä motivaatiota etsiä lisää mielihyvää aiheuttavaa toimintoa tai yhdistettä. Etanoli ja useat muut palkitsemisvaikutuksia aiheuttavat lääkeaineet, kuten amfetamiini, kokaiini ja heroini lisäävät GABA:n erittymistä ventraalisella tegmentaalisella alueella, accumbens-tumakkeessa ja amygdalassa, ja vähentävät GABA:n erittymistä ventraalisessa pallidumissa (Koob 2004; Ojanen ym. 2007; Koob 2013; Kemppainen ym. 2015). Nämä muutokset GABAergisessä välittäjäainejärjestelmässä saattavat johtaa palkitsemisvaikutusten välittymiseen.

Myös glutamatergisen järjestelmän on todettu liittyvän palkitsemisvaikutusten välittymiseen (Kalivas ja Volkow 2005). Morfiinin ja muiden väärinkäytettävien lääkeaineiden on havaittu lisäävän glutamaatin solunulkoista pitoisuutta ventraalisella tegmentaalisella alueella ja ventraalisessa pallidumissa ja johtavan sitä kautta mielihyvän tuntemuksiin (Ojanen ym. 2007; Kemppainen ym. 2015). Keskiaivojen palkitsemisjärjestelmä on yhteydessä aivokuoreen, talamukseen sekä amygdalaan glutamatergisiin hermosoluihin (Kalivas ja Volkow 2005). Glutamatergisillä radoilla on tärkeä rooli palkitsemisjärjestelmän aktivoitumisen seurauksena havaittavissa käyttäytymisvasteissa. Ventraalisella tegmentaalisella alueella, accumbens-tumakkeessa ja amygdalassa on todettu olevan myös kannabinoidi1 (CB1)-reseptoreita (Hungund ja Basavarajappa 2000; Koob 2013). Kannabinoidit ja muut palkitsemisen tunnetta aiheuttavat yhdisteet, muiden muassa etanoli, saattavat johtaa palkitsemisvaikutuksiin myös niiden kautta.

2.2 Alkoholi riippuvuus

Riippuvuudet ovat kroonisia aivosairauksia, joihin liittyy riippuvuutta aiheuttavien aineiden käyttö huolimatta siitä, että aineet aiheuttavat monia haittoja (Herz 1997; Trigo ym. 2010). Riippuvuudessa aineiden käyttö on hallitsematonta ja aineisiin voi tulla retkahduksia eli relapseja pitkienkin käyttämättömyysjaksojen jälkeen. Monet mielenterveyteen liittyvät sairaudet, esimerkiksi masennus, voivat ajaa ihmisen etanolin

väärinkäyttöön, mutta yksi tärkeimmistä syistä etanolin väärinkäytölle on alkoholiriippuvuus (Spanagel 2009). Alkoholiriippuvuuden syntyyn vaikuttavat useat eri tekijät, joita ovat esimerkiksi geneettinen alttius ja ympäristön paine (Vengeliene ym. 2008). Alkoholiriippuvainen käyttää pakonomaisesti etanolia ja kokee vieroitusoireita kun etanolia ei ole elimistössä. Riippuvuus kehittyy noin 10–15 prosentille etanolin väärinkäyttäjistä (Trigo ym. 2010).

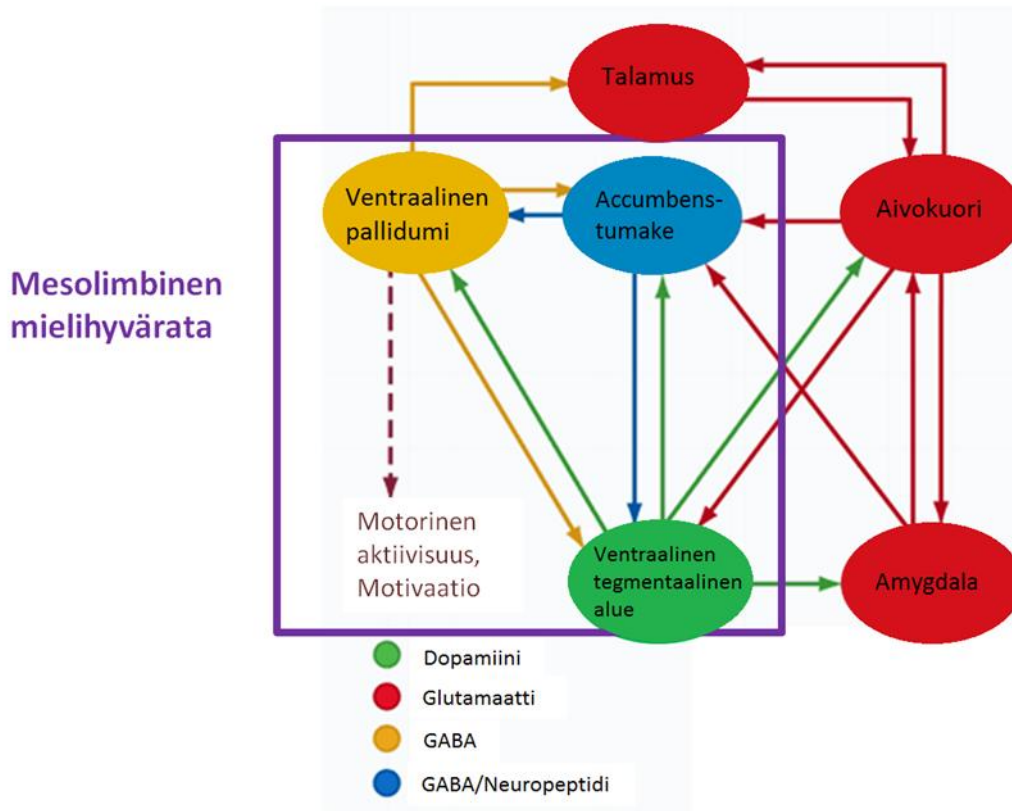
Pitkäaikainen etanolin runsas käyttö johtaa muutoksiin useissa aivojen hermovälittäjäainejärjestelmissä (Fadda ja Rossetti 1998; Spanagel ja Weis 1999; Trigo ym. 2010). Ei ole tiedossa, mitkä näistä järjestelmistä, joihin etanoli vaikuttaa, ovat keskeisimmässä asemassa alkoholiriippuvuuden synnyssä. Todennäköisesti useat välittäjäainejärjestelmät yhdessä aikaansaavat alkoholiriippuvuuden. Alkoholiriippuvuuteen liittyy useita erilaisia vaiheita ja ilmiöitä (Koob ym. 1998; Vengeliene ym. 2008). Vaiheet luokitellaan usein juomisen aloittamiseen (initiation), riippuvuuden syntymiseen, etanolin himoon (craving) ja retkahtamiseen etanolista pidättäytymisen jälkeen (relapse). Etanolin vaikutus eri välittäjäainejärjestelmien suhteen vaihtelee riippuen siitä, mistä riippuvuuden vaiheesta on kyse. Mesolimbisellä dopaminergisellä radalla on suuri rooli etanolin kuluttamisen alkaessa (Kalivas ja Volkow 2005). Riippuvuuden alkuvaiheessa etanoli voi aiheuttaa myös toleranssia, mikä johtuneet etanolin aiheuttamasta neuroadaptaatiosta keskushermostossa (Fadda ja Rossetti 1998). Etanolin käytön jatkuessa myös opioidergisen järjestelmän on todettu olevan mukana riippuvuuden synnyssä (Herz 1997). Alttius retkahtamiseen johtuu muun muassa pitkäaikaisista muutoksista motivaatioon ja oppimiseen liittyvillä aivoalueilla, joita ovat esimerkiksi mesolimbiseen järjestelmään liittyvät aivoalueet (Vengeliene ym. 2008; Trigo ym. 2010).

Pysyviä rakenteellisia muutoksia johtuen jatkuvasta altistumisesta väärinkäytettävälle lääkeaineelle on havaittu etuaivokuorella ja accumbens-tumakkeessa (Robinson ja Kolb 2004). Eräs aivomuutos, jonka väärinkäytettävät yhdisteet, kuten etanoli, voivat aiheuttaa mesolimbisessä järjestelmässä ja etuaivokuorella, on FosB-proteiinin pysyvien muotojen lisääntynyt ekspressointi (Nestler 2008). FosB säätelee tiettyjen palkitsemisrataan liittyvien proteiinien geenejä ja säätelee muun muassa herkistymistä

ja impulsiivisuutta. Riippuvuutta aiheuttavat aineet aiheuttavat myös aivoperäisen hermokasvutekijän pitoisuuden kasvua etuaivokuorella ja accumbens-tumakkeessa (Trigo ym. 2010). Hermokasvutekijä promotoi dendriittien kasvua ja synapsien uudelleenmuodostumista (Bramham ja Messaoudi 2005). Synaptisten yhteyksien uudelleenjärjestyminen saattaa aiheuttaa muutoksia motivaatioon ja palkitsemisvaikutukseen liittyvässä käyttäytymisessä ja voi johtaa riippuvuuteen. Myös endogeenisellä opioidijärjestelmällä ja siinä tapahtuvilla muutoksilla on tärkeä rooli alkoholiriippuvuudessa, ja niiden osuutta käsitellään tarkemmin luvussa 2.5.1 (Herz 1997; Trigo ym. 2010).

2.3 Etanolin vaikutukset eri hermovälittäjäainejärjestelmissä

Aikaisemmin etanolin vaikutusten oletettiin välittyvän niin kutsutun lipiditeorian kautta (Peoples ym. 1996). Sen mukaan etanoli vaikuttaa solujen lipidikalvoihin, jotka sitten välittävät etanolin vaikutuksen. Nykyään on vallalla proteiiniteoria, jonka mukaan etanoli vaikuttaa ennemminkin solukalvon proteiineihin, erityisesti reseptoreihin ja ionikanaviin (Gianoulakis 2004; Spanagel 2009). Etanolilla ei ole omia reseptoreita, joihin sitoutua, vaan se vaikuttaa useiden välittäjäainejärjestelmien aktiivisuuteen (Spanagel ja Weis 1999; Gianoulakis 2004). Välittäjäainejärjestelmiä, joihin etanoli vaikuttaa, on hyvin paljon, eikä niiden kaikkien merkitystä ja molekyylitason mekanismeista tunneta tässä vaiheessa (Vengeliene ym. 2008). Kuvassa 2 on esitetty palkitsemisjärjestelmään kuuluvia aivoalueita ja niihin liittyviä välittäjäainejärjestelmiä, joiden kautta etanoli voi välittää vaikutuksensa.



Kuva 2. Palkitsemiseen liittyvät aivoalueet ja siinä vaikuttavat välittäjäaineet pääpiirteittäin (Kuva mukaillen Kalivas ja Volkow 2005).

Etanolin vaikutukset ionikanaviin tai reseptoreihin johtavat synaptisten tapahtumien kaskadiin, johon liittyy useita eri välittäjäaineita (Vengeliene ym. 2008). Etanoli voi vaikuttaa esimerkiksi dopamiini-, GABA- ja glutamaattijärjestelmiin sekä endogeeniseen opioidijärjestelmään (Mihic ym. 1997; Gianoulakis 2004). Etanolin vaikutukset eri välittäjäainejärjestelmissä saavat aikaan etanolin subjektiiviset vasteet, jotka voivat vaihdella psykotrooppisista vaikutuksista sedaatioon ja jopa hypnoosiin (Vengeliene ym. 2008; Spanagel 2009). Etanolin juomiseen liittyvien välittäjäainejärjestelmien välillä voi olla suuria eroja eri yksilöiden välillä, mikä voi aiheuttaa sen, että etanoli aiheuttaa erilaisia vasteita eri yksilöillä (Vengeliene ym. 2008). Esimerkiksi monet reseptorit, joihin etanoli välillisesti vaikuttaa, koostuvat useista eri alatyypeistä, joiden muotoon taas vaikuttavat useat eri geenit. Alatyypien muotoon vaikuttavissa geeneissä voi olla yksilöiden välisiä eroja. Esimerkiksi NMDA- (N-metyyli-D-aspartaatti), GABA- (γ -amino-voihappo) ja muiden reseptorien alatyypikoostumuksella on merkitystä etanolin vaikutusten välittymisen kannalta.

Myöskään alkoholiriippuvuuden hoidossa käytettävät opioidireseptoriantagonistit eivät vaikuta kaikilla yksilöillä samankaltaisesti (King ym. 1997; Mason ym. 1999). Etanolin metaboliitti, asetaldehydi, voi myös osallistua etanolin vaikutusten välittämiseen ja sen on todettu muun muassa vaurioittavan solunsisäisiä proteiineja ja indusoivan apoptoosia (Quertemont ym. 2005).

Taulukoon 1 on koottu etanolin vaikutuksia dopamiini-, GABA-, glutamaatti- ja opioidijärjestelmissä sekä välittäjäainejärjestelmien reseptoreiden systeemisesti annosteltujen antagonistien ja agonistien vaikutuksia etanolin juomiseen. Seuraavissa kappaleissa käydään läpi tarkemmin etanolin vaikutuksia eri välittäjäainejärjestelmissä sekä kerrotaan lyhyesti vaikutusten merkityksestä etanolin juomiseen.

Taulukko 1. Etanolin päävaikutukset eri välittäjäainejärjestelmissä ja kyseessä olevien välittäjäainejärjestelmien agonistien ja antagonistien systeemisen annostelun vaikutus etanolin juomiseen rotilla. Lähteet: 1 = Di Chiara ja Imperato 1988, 2 = Russell ym. 1996, 3 = Samson ym. 1992, 4 = Krystal ym. 2006, 5 = Janak ja Gill 2003, 6 = Gass ja Olive 2008, 7 = Shelton ja Balster 1997, 8 = Herz 1997, 9 = Ojanen ym. 2006, 10 = Parkes ja Sinclair 2000.

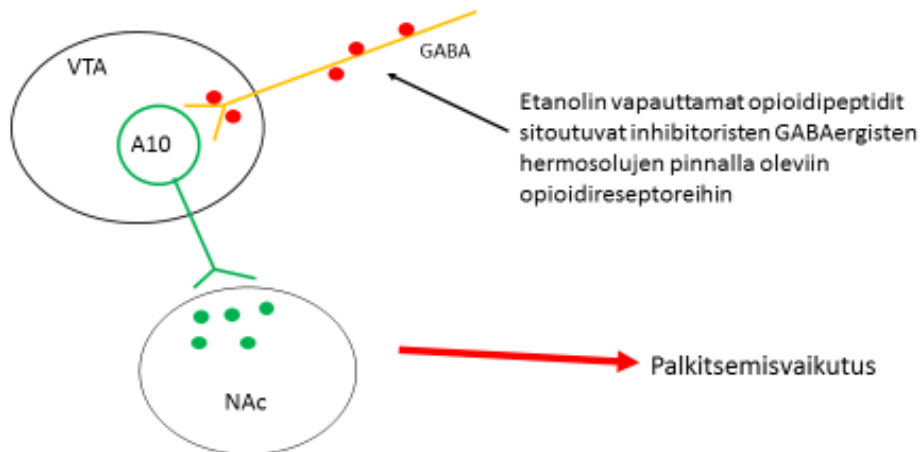
Välittäjäainejärjestelmä	Etanolin päävaikutus	Systeemisesti annostellun agonistin vaikutus etanolin juomiseen	Systeemisesti annostellun antagonistin vaikutus etanolin juomiseen
Dopaminerginen	vapauttaa dopamiinia ¹	vähentää etanolin juomista ²	vähentää etanolin juomista ³
GABAerginen	GABAA-reseptorien stimuloiminen ⁴	vähentää etanolin juomista ⁵	-
Glutamaterginen	NMDA-reseptorien esto ⁶	-	vähentää etanolin juomista ⁷
Opioiderginen	vapauttaa opioidipeptidejä ⁸	lisää etanolin juomista ⁹	vähentää etanolin juomista ¹⁰

2.3.1 Dopaminerginen välittäjäainejärjestelmä

Dopaminergisen mesolimbisen radan on todettu olevan tärkeässä asemassa etanolin ja muiden riippuvuutta aiheuttavien aineiden vaikutusten välittämisessä (Wise ja Rompre 1989; Vengeliene ym. 2008). Etanoli aktivoi mesolimbistä dopamiinijärjestelmää (Di Chiara ja Imperato 1988; Spanagel ym. 1992). Etanoli, kuten muutkin väärinkäytettävät lääkeaineet, lisäävät dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa ja muun muassa

sitä kautta aikaansaavat palkitsemisvaikutuksia (Di Chiara ja Imperato 1988). Etanolin aiheuttama dopamiinin vapautumisen lisääntyminen saattaa johtua myös sen interaktioista GABAergisten ja opioidergisten välittäjäainejärjestelmien kanssa (Krystal ym. 2003; Gianoulakis 2004; Krystal ym. 2006; Fields ja Margolis 2015).

Dopaminergiset solut sijaitsevat rotan keskiaivoissa kolmessa eri ryhmittymässä (A8, A9 ja A10) (Hegarty ym. 2013). A10-ryhmän solut ovat dopaminergisten solujen ryhmittymä, joka sijaitsee ventraalisella tegmentaalisella alueella. GABAergiset (γ -amino-voihappo) hermosolut inhiboivat A10-ryhmän dopaminergisia soluja. Opioidireseptorit inhiboivat näitä A10-ryhmän soluihin johtavia GABAergisiä hermosoluja (Wise 1998; Gianoulakis 2004; Kalivas ja Volkow 2005). Opioidireseptorien stimulaatio endogeenisillä opioidipeptideillä, joita etanoli vapauttaa, estää näiden GABAergisten hermosolujen aiheuttamaa inhibitiota, jolloin dopaminergiset solut eivät ole inhiboituina ja ne vapauttavat dopamiinia accumbens-tumakkeessa (Spanagel ja Weis 1999; Gianoulakis 2004). A10-ryhmän solujen aktivoituminen ja dopamiinin lisääntynyt vapautuminen accumbens-tumakkeessa on esitetty kaavamaisesti kuvassa 3.



Kuva 3. Ventraalisen tegmentaalisen alueen A10-ryhmän solut ja niiden aktivoituminen. Etanoli vapauttaa opioidipeptidejä, jotka sitoutuvat GABAergisten hermosolujen pinnalla oleviin opioidireseptoreihin ja näin estävät GABAergisten hermosolujen inhiboivaa vaikutusta, jolloin A10-ryhmän dopaminergiset solut aktivoituvat ja dopamiinin pitoisuus accumbens-tumakkeessa nousee. ● = Opioidipeptidejä, ● = Dopamiinia, VTA = Ventraalinen tegmentaalin alue, NAc = Accumbens-tumake (Kuva mukaillen Spanagel ja Weis 1999).

Dopamiinin lisääntyneen vapautumisen lisäksi, systeeminen etanoliannostelu aktivoi dopamiinireseptoreita ventraalisella tegmentaalisella alueella (Kohl ym. 1998). Dopaminergisen järjestelmän roolia etanolin juomisessa on tutkittu muun muassa dopamiinireseptorien agonistien ja antagonistien avulla (Samson ym. 1992; Russell ym. 1996; Hodge ym. 1997). Dopamiiniagonistien ja antagonistien systeemisen annostelun on havaittu vähentävän etanolin juomista (Samson ym. 1992; Russell ym. 1996). Dopamiiniagonistien annostelun accumbens-tumakkeeseen on havaittu lisäävän tai vähentävän etanolin juomista riippuen agonistin pitoisuudesta (Samson ym. 1992; Hodge ym. 1997). Pienet määrät lisäsivät etanolin juomista ja suuret määrät vähensivät etanolin juomista (Hodge ym. 1997). Krooninen etanolin käyttö voi aiheuttaa muutoksia dopaminergisessä järjestelmässä ja nämä muutokset voivat johtaa riippuvuuteen ja herkistymiseen (Trigo ym. 2010). Pitkäaikainen etanolin käyttö voi muun muassa vähentää dopamiinireseptoreiden määrää, kun taas dopamiinitransportterin (DAT) määrä saattaa lisääntyä (Volkow ym. 2004).

Aikaisemmin etanolin vaikutusten ajateltiin välittyvän ainoastaan dopaminergisen järjestelmän kautta, mutta tutkimuksissa on havaittu, että etanolin vaikutukset välittyvät myös ilman toimivaa dopaminergista välittäjäainejärjestelmää (Ikemoto ym. 1997; Koistinen ym. 2001; Shoemaker ym. 2002). Muiden välittäjäainejärjestelmien mukanaolosta etanolin vaikutusten välittymisessä kertovat muiden muassa tutkimukset, joissa dopaminergiset hermopäätteet on tuhottu 6-OHDA:lla (6-hydroksi-dopamiini) ventraalisella tegmentaalisella alueella tai accumbens-tumakkeessa. Rottien, jotka olivat juoneet etanolia jo ennen leesiota, etanolin juominen ei muuttunut leesion jälkeen (Koistinen ym. 2001; Shoemaker ym. 2002). Rotat, jotka eivät olleet juoneet etanolia ennen accumbens-tumakkeen 6-OHDA-leesiota, aloittivat etanolin juomisen hitaammin ja joivat vähemmän kuin rotat, jotka olivat juoneet ennen leesiota (Ikemoto ym. 1997). Nämä tutkimukset viittaavat dopaminergisen järjestelmän tärkeään rooliin etanolin juomisen aloittamisessa, mutta ei pitkäaikaisessa etanolin käytön ylläpidossa (Ikemoto ym. 1997; Koistinen ym. 2001; Shoemaker ym. 2002).

2.3.2 GABAerginen välittäjäainejärjestelmä

GABA (γ -amino-voihappo)-reseptorit ovat inhibitorisia reseptoreja (Krystal ym. 2006). GABA-reseptoreihin kuuluvat GABA_A-reseptorit, jotka sisältävät kloridikanavan, GABA_B-reseptorit, jotka ovat G-proteiinikytkentäisiä ja GABA_C-reseptorit, joita ei voi inhiboida bikukulliinilla eikä stimuloida baklofeenilla. GABA_A-reseptorit ovat pentameereja, jotka voivat koostua 19 erilaisesta alatyypistä ja ne ovat tärkeimpiä inhibitorisia reseptoreita nisäkkäiden aivoissa. GABA_A-reseptorit sijaitsevat eri puolilla aivoja ja niitä on todettu olevan erityisesti välineuroneissa, jotka säätelevät muiden hermosolujen toimintaa.

Etanoli aiheuttaa GABAergisen järjestelmän kautta useita subjektiivisia vaikutuksia, joita ovat esimerkiksi sedaatio, anksiolyyttinen vaikutus ja motorisen koordinaation heikentyminen (Kumar ym. 2009). Etanolille altistettujen rottien ja etanolille altistumattomien rottien tutkimuksessa onkin havaittu eroja GABA-välitteisissä tapahtumissa, ja nämä korreloivat etanolin sedatiivisten vaikutusten kanssa (Vengeliene ym. 2008). Alkoholiriippuvuudessa GABAergisessä järjestelmässä tapahtuu pitkäaikaisia muutoksia, jotka johtavat etanolin toleranssiin ja vieroitusoireisiin (Krystal ym. 2006).

Elektrofysiologiset ja biokemialliset tutkimukset ovat osoittaneet, että etanoli vaikuttaa välillisesti erityisesti GABA_A-reseptoreihin aivoissa (Krystal ym. 2006). GABA_A-reseptorien toiminta lisääntyy etanolin vaikutuksesta. Suuri etanoliannos lisää GABA_A-reseptorivälitteistä kloridi-ioni virtausta ja inhibitorista postsynaptista potentiaalia. (Suzdak ym. 1986). Etanolin erilaisten vaikutusten GABA_A-reseptoriin on päätelty riippuvan sen alatyypikoostumuksesta (Vengeliene ym. 2008; Kumar ym. 2009). Useimmat alatyypikoostumukset reagoivat etanoliin vain suurilla konsentraatioilla, mutta on havaittu myös alatyyppejä, joihin etanoli pystyy vaikuttamaan jo hyvin pienillä konsentraatioilla (Krystal ym. 2006; Vengeliene ym. 2008). Tutkimalla GABA_A-reseptorin eri alatyyppien suhteen poistogeenisiä hiiriä, on saatu selville alatyyppien merkitys etanolin vaikutusten välittämisessä (Boehm ym. 2004). Esimerkiksi α -1-alatyypin suhteen poistogeenisillä hiirillä havaittiin enemmän etanolin

aiheuttamia aversiivisia vaikutuksia kuin kontrolliryhmällä, ja poistogeeniset hiiret myös joivat vähemmän etanolia (Blednov ym. 2003).

GABAA- ja GABAB- reseptoriagonisteilla ja antagonisteilla pystytään vaikuttamaan etanolin juomisen määrään (Janak ja Gill 2003; Leggio ym. 2010). GABAA ja GABAB- reseptoriagonistien systeemisen annostelun on havaittu vähentävän etanolin juomista rotilla (Janak ja Gill 2003). Ihmisillä tehdyssä tutkimuksessa GABAB- reseptoriagonistin, baklofeenin, on havaittu vähentävän etanolin juomista ja himoa alkoholiriippuvaisilla potilailla (Leggio ym. 2010). GABA-reseptoriagonistien aiheuttama inhibitoristen GABA-reseptorien aktivointi johtaa todennäköisesti dopamiinineuronien paikalliseen estoon accumbens-tumakkeessa, jolloin etanolin aiheuttama dopamiinin vapautuminen estyy ja etanolin juominen vähentyy.

Palkitsemisjärjestelmän eri aivoalueiden GABAergisen hermotuksen roolia etanolin juomisessa on tutkittu annostelemalla GABA-agonisteja ja antagonisteja paikallisesti palkitsemiseen liittyville aivoalueille (Hyytiä ja Koob 1995; Kemppainen ym. 2012a). GABAA-reseptoriantagonistien paikallisen annostelun amygdalaan on havaittu vähentävän etanolin juomista rotilla (Hyytiä ja Koob 1995). GABAA-agonistin paikallisen annostelun palkitsemisradan viimeiseen osaan, ventraaliseen pallidumiin, on havaittu vähentävän etanolin juomista annosriippuvaisesti, ja GABAA-reseptoriantagonistin lisäävän etanolin juomista (Kemppainen ym. 2012a). GABAB-reseptorin agonistin annostelun ventraaliseen pallidumiin havaittiin vähentävän etanolin juomista, mutta GABAB-reseptorin antagonistilla ei havaittu merkitsevää vaikutusta etanolin juomisessa.

Krooninen etanolin käyttö voi aiheuttaa pitkäaikaisia muutoksia GABAergisessä järjestelmässä (Krystal ym. 2006). Etanolin pitkäaikainen käyttö voi johtaa esimerkiksi GABA-reseptoreiden jatkuvaan aktivoitumiseen. GABA-reseptorien antagonistin, flumatseniilin onkin havaittu vähentävän pitkäaikaisen etanolin käytön lopetuksesta aiheutuvia vieroitusoireita estämällä pitkäaikaisen etanolin käytön aiheuttamaa GABA-reseptoreiden jatkuvaa aktivaatiota (Follesa ym. 2006). Akamprosaattia, joka on GABA-reseptorien agonisti, käytetään alkoholismin hoidossa erityisesti relapsien

estossa (Soyka ja Lieb 2015). Akamprosaatilla saattaa olla vaikutusta myös glutamatergiseen järjestelmään.

2.3.3 Glutamaterginen välittäjäainejärjestelmä

Glutamaatti on yksi tärkeimmistä eksitatorisista eli kiihottavista välittäjäaineista aivoissa (Krystal ym. 2003). Glutamaattireseptoreihin kuuluvat NMDA- (N-metyyli-D-aspartaatti), AMPA- (α -amino-3-hydroksi-5-metyyli-4-iso-oksatsolipropionihappo) sekä kainaatireseptorit. Etanolin interaktio glutamatergisen järjestelmän kanssa saattaa aiheuttaa sekä euforisia että dysforisia vaikutuksia.

Etanoli pystyy välillisesti inhiboimaan glutamaatin NMDA-reseptoria muun muassa accumbens-tumakkeessa, ventraalisella tegmentaaliseella alueella, amygdalassa ja hippokampuksessa (Gass ja Olive 2008). NMDA-reseptoriantagonistien systeemisen annostelun on havaittu vähentävän etanolin juomista rotilla (Shelton ja Balster 1997). NMDA-reseptorien antagonistit pystyvät myös estämään etanolin aiheuttaman paikkapreferenssin rotilla (Biala ja Kotlinska 1999). Alkoholi-riippuvuudessa käytettävän lääkeaineen, akamprosaatin toisen vaikutustavan, GABA-reseptoreiden agonistina toimimisen lisäksi, on arveltu liittyvän NMDA-reseptorien estoon (Mann ym. 2008). Tutkimustulokset vahvistavat, että glutamaatilla ja erityisesti sen NMDA-reseptorilla on tärkeä rooli etanolin vaikutusten välittämisessä.

Etanoli aiheuttaa pitkäkestoisia muutoksia glutamatergiseen järjestelmään (Krystal ym. 2003). Etanolin vaikutuksia glutamatergisessä järjestelmässä on tutkittu muun muassa NMDA-reseptoriantagonistin, ketamiinin, avulla (Meyer ja Phillips 2003). Etanolille altistetut hiiret reagoivat eri tavoin ketamiiniannosteluun kuin etanolille altistumattomat hiiret. Ketamiini lisäsi lokomotoriikkaa enemmän etanolille herkistyneillä kuin herkistymättömällä hiirillä. Myös ihmisillä on havaittu eroja ketamiinin vaikutuksissa sen mukaan, onko yksilöllä alkoholi-riippuvuustaustaa (Petrakis ym. 2004). Kroonisesta etanolin käytöstä johtuva jatkuva NMDA-reseptoreiden inhibointi, saattaa johtaa NMDA-reseptoreiden lisääntymiseen aivokuorella ja hippokampuksessa sekä lisätä glutamaatin vapautumista (Gass ja Olive 2008). Etanolin aiheuttama pitkäaikainen

NMDA-reseptorien esto johtaa myös glutamaatin lisääntyneeseen vapautumiseen accumbens-tumakkeessa ja hippokampuksessa.

Glutamaterginen järjestelmä on liitetty myös typpioksidirataan (Spanagel ym. 2002). NMDA-reseptorin stimuloiminen johtaa kalsiumin sisäänvirtaamiseen ja kalsiumin sitoutuminen saa aikaan kalmoduliinin aktivoitumisen. Kalmoduliini aktivoi neuraalisen typpioksidaasi (NO)-syntaasin, joka tuottaa typpioksidia. NMDA-reseptorin ja NO:n läheinen yhteys viittaa siihen, että myös typpioksidisyntaasi on myös mukana etanolin akuuttien vaikutusten välittämisessä. Farmakologiset tutkimukset, joissa käytettiin NO-syntaasigeenin suhteen poistogeenisiä hiiriä, osoittivat, että typpioksidin signaointi säätelee etanolin vaikutusta ja sen aiheuttaman oikaisurefleksin katoamista (Loss of rightning reflex, LORR) kestoa. LORR on menetelmä, jolla mitataan etanolin aiheuttamaa sekavuus/uupumistilaa (Spanagel 2009). Menetelmässä jyrsijälle annostellaan etanolia, ja jyrsijä käännetään selälleen. Menetelmässä mitataan aikaa, joka kuluu jyrsijän kääntymiseen oikein päin.

2.3.4 Opioiderginen välittäjäainejärjestelmä

Endogeeninen opioidijärjestelmä on välttämätön etanolin palkitsevien vaikutusten välittämisessä (Parkes ja Sinclair 2000; Gianoulakis 2004; Vengeliene ym. 2008; Trigo ym. 2010). Opioidijärjestelmän merkittävyydestä etanolin vaikutusten välittämisessä kertovat muun muassa etanolin aiheuttama opioidipeptidien vapautuminen palkitsemisradalla ja opioidireseptoriantagonistien kyky vähentää etanolin juomista. Opioidien merkityksestä etanolin vaikutusten välittämisessä käsitellään tarkemmin seuraavassa kappaleessa 2.4.

2.4 Endogeeninen opioidijärjestelmä

Opioidireseptorit ja endogeeniset opioidipeptidit ovat laajasti esillä keskushermostossa sekä perifeerisissä kudoksissa (Bodnar 2014). Laaja esiintyminen viittaa niiden tärkeään rooliin monissa eri fysiologisissa toiminnoissa kuten kivuntuntemisessa, tunteissa, oppimisessa ja muistissa. Endogeenisen opioidijärjestelmän toimintaa ei kuitenkaan

täysin tunnetta. Opioidireseptoreilla ja niiden endogeenisilla ligandeilla on todettu olevan suuri rooli aivojen palkitsemisjärjestelmässä, ja niiden on havaittu olevan mukana useiden väärinkäytettävien lääkeaineiden vaikutusten välittämisessä (Mansour ym. 1995; Gianoulakis 2004).

Endogeenisen opioidijärjestelmän yhdisteet sijaitsevat pääasiassa aivoalueilla, jotka ovat tärkeässä asemassa palkitsemisessa ja motivaatiossa (Mansour ym. 1995). Opioidipeptidejä ja niiden reseptoreita on todettu olevan ventraalisella tegmentaalisella alueella, accumbens-tumakkeessa, etuaivokuorella, hypotalamuksessa, amygdalassa ja ventraalisessa pallidumissa. Endogeenisen opioidijärjestelmän välittäjäaineita tuotetaan pro-opiomelanokortiinista (POMC), proenkefaliinista (PENK) tai prodynorfiinista (Gianoulakis 2004; Trigo ym. 2010). Nämä prekursorit tuottavat useaa erilaista aktiivista peptidiä, joita ovat esimerkiksi endorfiini, met- ja leu-enkefaliini, dynorfiinit ja neo-endorfiini (Akil 1984; Kieffer ja Gaveriaux-Ruff 2002). Endogeenisen opioidijärjestelmän välittäjäaineet sitoutuvat erilaisin affiniteetein μ -, κ - tai δ -opioidireseptoreihin (Gianoulakis 2004; Trigo ym. 2010). Endorfiinit sitoutuvat samansuuruisella affiniteetilla δ - ja μ -reseptoreihin, enkefaliinit sitoutuvat suurimmalla affiniteetilla δ -reseptoreihin ja dynorfiinit sitoutuvat suurimmalla affiniteetilla κ -reseptoreihin. Taulukossa 2 on esitetty eri opioidipeptidit prekursoreineen ja affiniteetteineen.

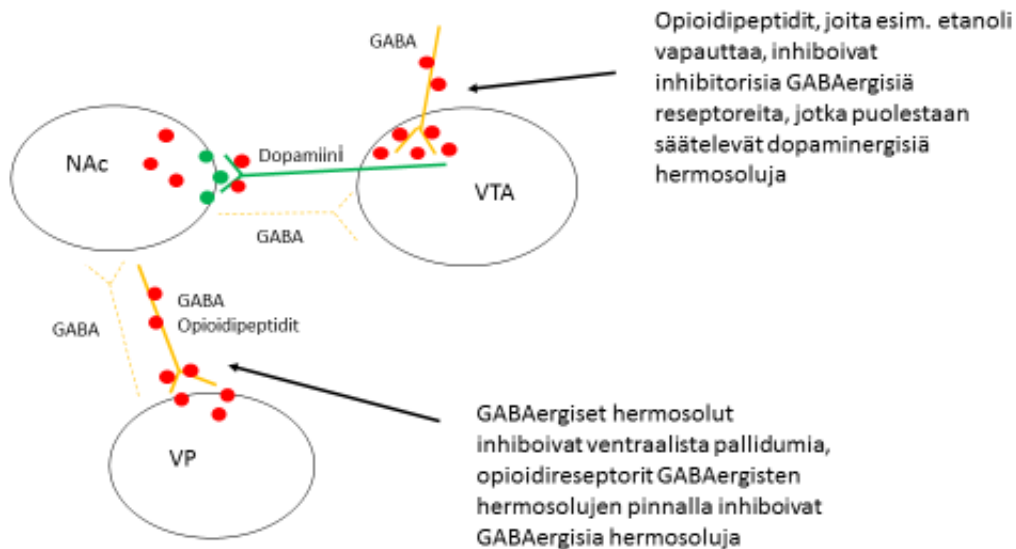
Taulukko 2. Endogeenisen opioidijärjestelmän peptidit, prekursorit ja suhteellinen affiniteetti opioidireseptoreihin (Taulukko mukaillen Gianoulakis 2004).

Prekursorimolekyyl	Opioidipeptidi	Suhteellinen affiniteetti opioidireseptoreihin
Pro-opiomelanokortiini (POMC)	β -endorfiini	μ , δ ($\mu = \delta$)
Proenkefaliini (PENK)	Met-enkefaliini Leu-enkefaliini	δ , μ ($\delta \gg \mu$) δ , μ ($\delta \gg \mu$)
Prodynorfiini	Dynorfiini Leu-enkefaliini	κ δ , μ ($\delta \gg \mu$)

Opioidireseptorit kuuluvat G-proteiinikytkentäisiin solukalvon reseptoreihin, joilla on seitsemän solukalvon läpäisevää domainia (Akil ym. 1998). Tutkimuksista on saatu viitteitä, että μ - ja δ -reseptorit välittävät palkitsevia ja κ -reseptorit aversiivisiä vaikutuksia ja erään teorian mukaan riippuvuudessa olisikin kyse

opioidireseptorijärjestelmien epätasapainosta (Spanagel ym. 1992; Gianoulakis 1996; Gianoulakis 2004).

Endorfiinejä ekpressoivat hermosolut projektioivat accumbens-tumakkeeseen ja lisäksi proenkefaliini- sekä prodynorfiini-lähtöisiä opioidipeptidejä tuotetaan accumbens-tumakkeen hermosoluissa (Akil ym. 1998; Kalivas ja Volkow 2005). Accumbens-tumakkeessa, ventraalisella tegmentaalisella alueella ja ventraalisessa pallidumissa on todettu olevan kaikkia kolmea opioidireseptorityyppiä, ja näitä opioidireseptoreja sijaitsee sekä post- että presynaptisella puolella hermosoluja (Herz 1997). Pre- ja postsynaptisia reseptoreja ja niiden sijaintia accumbens-tumakkeessa, ventraalisella tegmentaalisella alueella ja ventraalisessa pallidumissa on havainnoitu kuvassa 4.



Kuva 4. Opioidireseptorien sijainti accumbens-tumakkeessa, ventraalisella tegmentaalisella alueella ja ventraalisessa pallidumissa. Opioidireseptoreita on sekä pre- että postsynaptisilla puolilla accumbens-tumakkeessa, ventraalisella tegmentaalisella alueella ja ventraalisessa pallidumissa. ● = Opioidireseptoreita, ● = Dopamiinia, VTA = Ventraalinen tegmentaalin alue, NAc = Accumbens-tumake, VP = Ventraalinen pallidumi (Kuva mukaillen Herz 1997; Fields ja Margolis 2015).

Opioidireseptorit ovat solutasolla inhibitorisia (Goldstein 1977; Law ym. 2000). Opioidireseptorien aktivoituminen johtaa syklisen adenosinimonofosfaatin (cAMP) tuotannon estymiseen ja jänniteriippuvaisten kalsiumkanavien sulkeutumiseen (Law ym. 2000). Opioidireseptorien aktivoituminen johtaa myös kaliumkanavien aktivoitumiseen ja MAP (mitogen activated protein) -kinaasireitin aktivoitumiseen.

Solutasolla nämä edellä kuvatut kaskadit johtavat neuraalisen aktiivisuuden estoon eli hermovälittäjäaineen vapautumisen vähentymiseen synapsiraossa presynaptisessa hermopääätteessä sekä hermoimpulssien etenemisen inhiboitumiseen postsynaptisessa hermopääätteessä.

Opioidipeptidi-opioidireseptori-interaktiot säätelevät lääkkeinä käytettävien opioidien palkitsevia ominaisuuksia, kuten myös muiden mielihyvää aiheuttavien lääkeaineiden ja etanolin palkitsevia ominaisuuksia (Akil 1984; Herz 1997; Gianoulakis 2004). Endogeenisten opioidipeptidien, endorfiinien ja enkefaliinien, yhteisvaikutukset μ - ja δ -opioidireseptorien kanssa lisäävät dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa, ja tämä ilmiö saattaa välittää palkitsemista ja voimistumista (Spanagel ym. 1992; Fields ja Margolis 2015). Dynorfiinien yhteisvaikutus κ -reseptorien kanssa accumbens-tumakkeessa inhiboi dopamiinin vapautumista ja saattaa sitä kautta vähentää palkitsemisvaikutuksia (Spanagel ym. 1992; Bals-Kubik ym. 1993).

Opioiderginen järjestelmä välittää palkitsemisvaikutuksia myös dopaminergisesta järjestelmästä riippumatta (Fields ja Margolis 2015). Tutkimuksissa on havaittu, että systeemisesti tai paikallisesti ventraaliselle tegmentaaliselle alueelle annosteltu dopamiiniantagonisti estää morfiinin aiheuttaman paikkapreferenssin opioidiriippuvaisilla rotilla, mutta ei rotilla, jotka eivät olleet riippuvaisia (Bechara ym. 1992; Nader ja Van der Kooy 1997). Dopaminergisellä järjestelmällä saattaakin olla tärkeä rooli lääkeaineriippuvuudessa, mutta ei välttämättä lääkeaineiden akuuttien palkitsemisvaikutusten välittämisessä.

2.5 Etanolin vaikutukset endogeenisessä opioidijärjestelmässä

Etanolin ja endogeenisten opioidipeptidien neurotransmission välinen yhteys on osoitettu useissa tutkimuksissa (Herz 1997; Trigo ym. 2010). Tutkimuksista on saatu viitteitä, että etanoli vaikuttaa kaikkiin kolmeen opioidipeptidijärjestelmään, mutta suurin osa tutkimuksista on keskittynyt aivojen ja aivolisäkkeen β -endorfiinijärjestelmään (Gianoulakis 2004). Akuutin etanolin annostelun on havaittu lisäävän β -endorfiinipeptidien vapautumista ventraalisella tegmentaalisella alueella ja

accumbens-tumakkeessa etanolin annoksesta ja etanolin nauttimisesta kuluneesta ajasta riippuen (Rasmussen ym. 1998; Lam ym. 2008; Jarjour ym. 2009). β -endorfiinin vapautuminen johti myös dynorfiinin pitoisuuden nousuun samoilla aivoalueilla. Akuutista etanoliannostelusta seuraava lisääntynyt β -endorfiinin vapautuminen ja sen sitoutuminen μ - ja δ -opioidireseptoreihin, saattaa olla merkittävässä asemassa etanolin vaikutusten välittämisessä ja etanolin aiheuttamassa dopamiinin pitoisuuden nousussa accumbens-tumakkeessa (Herz 1997). β -endorfiinin tärkeää roolia etanolin vaikutusten välittämisessä verrattuna toiseen opioidipeptidijärjestelmään, enkefaliineihin, tukee muun muassa tutkimus, jossa etanolin kulutus laski hiirillä, jotka olivat poistogeenisiä β -endorfiinia tuottavan proteiinin suhteen, mutta ei hiirillä, joilla oli normaalia vähemmän enkefaliinia (Racz ym. 2008).

μ - Ja δ -opioidireseptorien osuudesta etanolin vaikutusten välittämisessä kertovat useat tutkimukset (Gonzales ja Weiss 1998; Parkes ja Sinclair 2000; Roberts ym. 2000; Hyytiä ja Kiianmaa 2001; Ojanen ym. 2006; Job ym. 2007). μ -Opioidireseptorin suhteen poistogeenisillä hiirillä etanolin itseannostelu ja etanolin aiheuttama dopamiinitason nousu accumbens-tumakkeessa ovat vähäisempiä kuin villityypin hiirillä (Roberts ym. 2000; Job ym. 2007). Morfiini, joka on epäselektiivinen opioidireseptoriagonisti, lisää etanolin juomista ja aiheuttaa etanolille herkistymistä rotilla (Ojanen ym. 2006). μ - Ja δ -reseptoriantagonistin, naltreksonin, systeemisen annostelun on todettu vähentävän etanolin indusoimaa dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa ja vähentävän etanolin vapaaehtoista juomista rotilla (Gonzales ja Weiss 1998; Parkes ja Sinclair 2000; Hyytiä ja Kiianmaa 2001). Amygdalaan annostellun μ -opioidireseptoriantagonistin, CTOP:n, on myös havaittu vähentävän etanolin vapaaehtoista juomista (Hyytiä ja Kiianmaa 2001).

κ -Opioidireseptorien rooli palkitsemisvaikutuksessa ja etanolin vaikutusten välittämisessä on epäselvä (Bals-Kubik ym. 1993; Doyon ym. 2006; Logrip ym. 2009). κ -Reseptoriagonistien annostelun accumbens-tumakkeeseen ja ventraaliselle tegmentaaliselle alueelle on havaittu aiheuttavan aversiivisia vaikutuksia lääkeannosteluun liittyvässä paikkapreferenssitutkimuksessa (Bals-Kubik ym. 1993). κ -Reseptorien stimuloimisen on havaittu vähentävän etanolin juomista, mutta niiden

inhiboinnilla on havaittu olevan joko etanolin juomista lisäävä vaikutus tai ei ole havaittu olevan mitään vaikutusta etanolin juomiseen (Lindholm ym. 2001; Doyon ym. 2006; Logrip ym. 2009).

Etanolin juomisen suhteen eroavilla rotta- ja hiirikannoilla tehdyissä tutkimuksissa, on havaittu korrelaatio etanolin aiheuttaman paikkapreferenssin ja opioidireseptorien jakautumisen välillä (De Waele ym. 1995; Soini ym. 2002). Monet tutkimukset ovat havainneet synnynnäisiä eroavaisuuksia opioidijärjestelmässä etanolia mielellään juovilla kannoilla etanolia vältteleviin kantoihin nähden, muun muassa AA- (Alko, Alcohol) rottakannalla verrattuna ANA- (Alko, Non-Alcohol) rottakantaan sekä C57BL/6-hiirikannalla verrattuna DBA/2-hiirikantaan (De Waele ym. 1995; Herz 1997; Jamensky ja Gianoulakis 1997; Sommer ym. 2006). Esimerkiksi etanolia preferoivilla AA-rotilla on suurempi μ -opioidireseptorimäärä accumbens-tumakkeessa ja ventraalisella tegmentaalisella alueella kuin etanolia välttelevällä ANA-kannalla (De Waele ym. 1995).

Vaikka joissakin etanolin opioidergiseen järjestelmään kohdistuvissa vaikutuksissa on dopaminerginen järjestelmä mukana, pystyy etanoli vaikuttamaan palkitsemisjärjestelmässä myös dopamiinista riippumattomalla tavalla (Gianoulakis 2004; Fields ja Margolis 2015). Etanolin juomisen seurauksena vapautuneet opioidipeptidit sitoutuvat accumbens-tumakkeessa GABAergisten haarakesolujen pinnalla oleviin μ -opioidireseptoreihin ja inhiboivat niitä. GABAergisten hermosolujen inhibointi johtaa esimerkiksi ventraalisen pallidumin aktivoitumiseen ja tämä voi johtaa etanolin juomisen lisääntymiseen (Smith ym. 2009; Kemppainen ym. 2012a). Kuvassa 4 on havainnollistettu tätä. Myös opioidireseptoriantagonistin, naltreksonin, etanolin juomista vähentävä vaikutus välittyy vaikka dopaminerginen rata on tuhottu (Koistinen ym. 2001).

2.5.1 Endogeeninen opioidijärjestelmä alkoholiiriippuvuudessa

Krooninen etanolin käyttö aiheuttaa useita pitkäaikaisia, jopa pysyviä, muutoksia endogeeniseen opioidijärjestelmään (Herz 1997). Toistuva etanolin annostelu saattaa

johtaa esimerkiksi endogeenisen opioidijärjestelmän epätasapainoon, joka voi aiheuttaa alkoholiriippuvuuden (Spanagel 1992; Gianoulakis 1996). Myös synnynnäiset poikkeamat endogeenisessä opioidijärjestelmässä saattavat olla osallisena riippuvuuden synnyssä (Goldstein 1977).

Akuutin etanoliannostelun aikaansaaman β -endorfiinin pitoisuuden lisääntymisen on todettu olevan tärkeässä asemassa etanolin juomisen alkaessa, mutta koska β -endorfiinin vapautuminen ei jatku pidentyneen etanolin läsnäolon aikana, β -endorfiinin aktiivisuus ei välttämättä ole merkittävässä osassa alkoholiriippuvuudessa (Rasmussen ym. 1998; Gianoulakis 2004). Eräissä ihmisillä tehdyssä tutkimuksessa alkoholisteilla onkin havaittu alhaisemmat β -endorfiinitasot plasmassa kuin terveillä koehenkilöillä (Aguirre ym. 1995). Pitkäaikaisessa etanolin käytössä muutokset sekä β -endorfiinijärjestelmässä että muissa endogeeniseen opioidijärjestelmään liittyvissä järjestelmissä, saattavat olla tärkeässä asemassa alkoholiriippuvuuden synnyssä (Herz 1997; Rasmussen ym. 1998; Trigo ym. 2010).

Kroonisen etanoliannostelun on todettu nostavan proenkefaliinin lähettiRNA:n tasoja amygdalassa, mutta vähentävän proenkefaliinin lähettiRNA:n tasoja accumbens-tumakkeessa ja hajukäämissä rotilla (Cowen ja Lawrence 2001). Kroonisen etanolin käytön on todettu myös vähentävän funktionaalista δ - ja μ -opioidireseptorien kytkeytymistä G-proteiiniin mesokortikolimbisellä alueella (Chen ja Lawrence 2000; Saland ym. 2004). Krooninen etanoliannostelu voi vaikuttaa myös κ -reseptoreihin (Lindholm ym. 2000). κ -Reseptorin antagonisti vähentää etanolin itseannostelua alkoholiriippuvaisilla rotilla (Walker ja Koob 2007). Dynorfiinien pitoisuuden on havaittu nousevan accumbens-tumakkeessa etanolin kroonisen annostelun jälkeen (Przewlocka ym. 1997). Dynorfiinit ja κ -reseptorit saattavatkin olla tärkeässä asemassa etanolin vieroitusoireissa ja etanolin himossa.

β -endorfiinin pitoisuuden vähentyminen ja muut endogeenisessä opioidijärjestelmässä tapahtuvat muutokset, jotka ovat aiheutuneet pitkäaikaisesta etanolialtistuksesta saattavat ylläpitää etanolin juomista negatiivisen vahvistumisen kautta (Aguirre ym. 1995; Gianoulakis 2004). Negatiivinen vahvistuminen perustuu epämiellyttäväksi

koetun olotilan välttämiseen (Gianoulakis 2004). Alkoholiriippuvaisella henkilöllä on havaittavissa useita poikkeavuuksia neuroaalisissa systeemeissä, kun etanolia ei ole läsnä. Nämä poikkeavuudet saattavat aiheuttaa pahan olon tunnetta ja johtaa negatiivisen vahvistumisen kautta motivaatioon käyttää etanolia.

Eri eläinkannat eroavat opioidipeptidien ja opioidireseptorien perustason osalta eri aivoalueilla ja samalla tavalla geneettinen monimuotoisuus voi vaikuttaa ihmisillä etanolin juomisen määrään ja alkoholismiin kehittymiseen (De Waele ym. 1995; Hyytiä ja Kiianmaa 2001; Sommer ym. 2006). Eläinkokeiden perusteella löydetty geneettiset variaatiot sekä κ -opioidireseptorissa että prodynorfiinigeenissä saattavat olla riskitekijänä alkoholiriippuvuudelle myös ihmisillä (Xuei ym. 2006; Xuei ym. 2007). Myös polymorfia μ -opioidireseptorin geenissä (OPRM1) ja POMC-geenissä saattavat olla riskitekijöitä alkoholiriippuvuuden kehittämisessä ihmisillä (Zhang ym. 2006; Racz ym. 2008; Zhang ym. 2009). Muun muassa näistä edellä mainituista yksilöiden välisistä eroavaisuuksista johtuen alkoholismiin hoidossa käytetyt opioidireseptoriantagonistit saattavat vaikuttaa eri tavoin eri yksilöillä. Esimerkiksi naltreksonilla on havaittu erilaiset vasteet ihmisillä, jotka ovat suuressa tai pienessä riskissä alkoholismiin kehittämiselle (King ym. 1997; Oslin ym. 2015).

Etanolin juomista hillitsevien lääkeaineiden vaikutuksen oletetaan välittyvän opioidergisen ja dopaminergisen järjestelmän yhteysvaikutuksen kautta, mutta lääkeaineiden tarkkaa mekanismia ei kuitenkaan täysin tunneta (King ym. 1997; Koistinen ym. 2001). Naltreksonin ja nalmefeenin vaikutuksia etanolin juomisessa on tutkittu useissa tutkimuksissa (O'Malley 1996; Mason ym. 1999; Guardia ym. 2002; Zalewska-Kaszubska ym. 2008). Nalmefeeni on naltreksonin johdannainen ja niillä on hyvin samankaltainen rakenne (Mason ym. 1999). Naltreksoni ja nalmefeeni ovat epäselektiivisiä opioidireseptoriantagonisteja (Emmerson ym. 1994). Naltreksoni vaikuttaa pääasiassa μ - ja δ -opioidireseptorin kautta ja nalmefeeni μ -, δ - ja κ -reseptorien kautta (Emmerson ym. 1994; Walker ja Koob 2007). Naltreksonin ja nalmefeenin oletetaan estävän etanolin aiheuttamia palkitsemisvaikutuksia muun muassa vähentämällä etanolin stimuloimaa dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa (Gonzales ja Weis 1998). Opioidireseptoriantagonistit saattavat estää

etanolin vapauttamien opioidipeptidien sitoutumisen dopamiinihermosoluja säätelevien GABAergisten hermosolujen pinnalla oleviin inhibitorisiin opioidireseptoreihin, jolloin dopaminergiset hermosolut ovat inhiboituina ja dopamiinia ei vapaudu.

Dopamiiniin vaikuttamisen lisäksi naltreksonin on myös havaittu aiheuttavan muutoksia opioidipeptidien ja opioidireseptorien esiintymisessä (Parkes ja Sinclair 2000; Gianoulakis 2004). Eräässä rotilla tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että naltreksonin annostelu vähensi etanolin juomista ja nosti β -endorfiinitasoa plasmassa (Zalewska-Kasubaska ym. 2008). Naltreksonin on havaittu vähentävän etanolin juomista myös rotilla, joiden dopaminergiset hermopäätteet ventraalisella tegmentaalisella alueella ja accumbens-tumakkeessa oli tuhottu 6-OHDA:lla (Koistinen ym. 2001; Shoemaker ym. 2002). Nämä tutkimukset tukevat ajatusta, että opioidireseptoriantagonistien kyky vähentää etanolin juomista välittyy myös suoraan opioidireseptorien kautta, dopamiinista riippumatta. Tällä hetkellä Suomessa on markkinoilla naltreksoni- ja nalmefeeni-lääkevalmisteet alkoholismin hoidossa (Alkoholiongelman hoito: Käypä hoito-suositus 2011).

2.5.2 Ventraalinen pallidumi ja sen rooli etanolin vaikutusten välittämisessä

Aikaisemmissa etanolin palkitsemisvaikutuksia tutkivissa tutkimuksissa on keskitytty enimmäkseen accumbens-tumakkeeseen ja ventraaliseen tegmentaaliseseen alueeseen (Spanagel ja Weis 1999). Accumbens-tumakkeen hermotuskohde, ventraalinen pallidumi, on mesolimbisen mielihyväradan päätepiste, ja myös sillä on tärkeä rooli etanolin vaikutusten välittämisessä (Hyytiä ja Kiianmaa 2001; Kalivas ja Volkow 2005; Smith ym. 2009; Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen ym. 2012b). Ventraalinen pallidumi projektoi myös takaisin accumbens-tumakkeeseen. Ventraalinen pallidumi on kytkeytynyt myös muihin mesokortikolimbisiin aivoalueisiin, joita ovat muun muassa lateraalinen hypotalamus, ventraalinen tegmentaalin alue, etuaivokuori ja amygdala. Nämä aivoalueet ja niiden väliset projektioradat ovat mahdollisia palkitsemisvaikutuksen säätelijöitä (Swanson 2000; Kalivas ja Volkow 2005). Ventraaliseen pallidumiin ja palkitsemisrataan liittyviä aivoalueita ja niihin liittyviä välittäjäaineita on havainnoitu kuvissa 1 ja 2.

Farmakologisissa tutkimuksissa on selvinnyt, että ventraalisessa pallidumissa on dopamiini- ja GABA-reseptoreita sekä kaikkia kolmea opioidireseptorityyppiä (Mitrovic ja Napier 1995; Wise 2002). Opioidireseptoreja on ventraalisessa pallidumissa sekä post- että presynaptisella puolella haarakesoluja (Olive ym. 1997). Ventraalinen pallidumi on jatkuvan inhibition alla johtuen sitä hermottavista GABAergisistä haarakesoluista, jotka myös koekspressoivat opioidipeptidejä (Smith ym. 2009; Fields ja Margolis 2015). Inhibitoristen GABAergisten ventraaliseen pallidumiin johtavien hermosolujen esto, aktivoi ventraalista pallidumia, ja saattaa olla yksi tärkeä osa riippuvuutta aiheuttavien aineiden vaikutusten välittämisessä (Wise 2002; Kemppainen ym. 2012a). Kuvassa 4 on havainnollistettu ventraalisen pallidumin aktivaatiota.

Ventraalisen pallidumin palkitsemiseen liittyvä vaikutus johtuu ainakin osittain accumbens-tumakkeesta siihen tulevista haarakesoluista, koska accumbens-tumakkeen ja ventraalisen pallidumin yhteyden estämisen on havaittu estävän kokaiinin relapsia siitä riippuvaisilla rotilla (McFarland ja Kalivas 2001). Elektrofysiologisissa tutkimuksissa on havaittu, että μ -opioidireseptorit ventraalisessa pallidumissa säätelevät accumbens-tumakkeen GABAergisiä projektioita ventraaliseen pallidumiin ja μ -opioidireseptorit säätelevät myös muita ventraaliseen pallidumiin tulevia projektioita kuten etuaivokuoren ja amygdalan glutamatergisiä hermosoluja (Mitrovic ja Napier 1995; Napier ja Mitrovic 1999).

Ventraalisen pallidumiin liittyvissä tutkimuksissa on keskitytty lähinnä GABA- ja opioidireseptoreihin (Olive ja Maidment 1998; Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen ym. 2012b). Useiden riippuvuutta aiheuttavien aineiden, kuten kokaiinin, etanolin, morfiinin on havaittu laskevan GABA:n solunulkoista pitoisuutta sekä nostavan enkefaliinien pitoisuutta ventraalisen pallidumin alueella (Olive ja Maidment 1998; Wise 2002; Tang ym. 2005). GABAa- ja GABAb-reseptorien agonistien paikallisen annostelun ventraaliseen pallidumiin on havaittu vähentävän etanolin juomista annosriippuvaisesti (Kemppainen ym. 2012a).

Ventraalisen pallidumin opioidireseptorien roolia on tutkittu muun muassa annostelemalla opioidireseptoriagonisteja ja -antagonisteja paikallisesti ventraaliseen pallidumiin (Kemppainen ym. 2012b). μ -Opioidireseptorit ovat merkittävässä asemassa ventraalisessa pallidumissa, sillä μ -opioidireseptoriagonistien, DAMGO:n ja morfiinin paikalliset injektiot ventraaliseen pallidumiin vähentävät etanolin juomista annosriippuvaisesti, kun taas μ -opioidireseptoriantagonisti, CTOP, lisää etanolin juomista. δ - tai κ -reseptorien antagonistien tai -agonistien ei ole havaittu aiheuttavan muutoksia etanolin kulutukseen, mistä voidaan päätellä, että ventraalisen pallidumin δ - ja κ -opioidireseptoreilla ei ole suurta roolia etanolin akuuttien vaikutusten välittämisessä. Ventraalisessa pallidumissa on havaittu olevan useita erilaisia alueita, joihin vaikuttamalla saadaan erilaisia tuloksia riippuen vaikutuskohteesta (Smith ja Berridge 2007; Smith ym. 2009). Ventraalisessa pallidumissa on myös todettu olevan alueita, joissa on muun muassa μ -opioidireseptorikeskittymiä.

Naltreksonin systeemisen annostelun on havaittu vähentävän etanolin itseannostelua, mutta paikallinen naltreksonin annostelu ventraaliseen pallidumiin ei aiheuta muutoksia etanolin itseannosteluun (Parkes ja Sinclair 2000; Koistinen ym. 2001, Kemppainen ym. 2012b). Tutkimuksista voidaan päätellä, että naltreksonin vaikutus etanolin juomiseen ei tule ventraalisen pallidumin tasolta. Ventraaliseen pallidumiin liittyvien tutkimusten tulokset viittaavat siihen, että sekä GABAergiset että opioidergiset järjestelmät ventraalisessa pallidumissa ovat tärkeässä asemassa etanolin vaikutusten välittämisessä ja ne voivat olla osallisena myös alkoholiriippuvuuden kehittämisessä (Smith ym. 2009; Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen ym. 2012b).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE

Etanolin palkitsevat ja mielihyvää tuottavat vaikutukset välittyvät ainakin osittain etanolin accumbens-tumakkeessa vapauttamien opioidipeptidien välityksellä (Herz 1997; Gianoulakis 2004). Opioidipeptidit voivat vaikuttaa etanolin juomiseen muun muassa ventraalisen pallidumiin johtavan striatopallidaalisen hermoran kautta (Wise 2002; Gianoulakis 2004; Fields ja Margolis 2015). Ventraalisen pallidumin GABA- ja

opioidergisten järjestelmien on todettu olevan tärkeässä osassa palkitsemisvaikutusten välittämisessä ja niiden kautta välittyvät palkitsemisvaikutukset saattavat ilmetä kokonaan ilman dopaminergista järjestelmää (Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen ym. 2012b; Fields ja Margolis 2015). Ventraalisen pallidumin aktivaation on spekuloitu lisäävän palkitsemisvaikutuksia ja inhibition vähentävän palkitsemisvaikutuksia (Smith ym. 2009; Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen 2012b).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää ventraalisessa pallidumissa olevien μ -opioidireseptorien merkitystä etanolin vaikutusten välittämisessä ja juomisen säätelyssä käyttäen apuna etanolia juovaa rottakantaa. Rottien ventraaliseen pallidumiin aiheutettiin virusvektoreiden (AAV-MOR) avulla paikallinen inhibitio ylimäärällä μ -opioidireseptoreita ja tutkittiin μ -opioidireseptorin yliekspression vaikutusta etanolin juomiseen. Virusvektoreilla tehtävä koe kertoo pitkäaikaisemmasta vaikutuksesta kuin annostelemalla paikallisesti ventraaliseen pallidumiin opioidireseptoriantagonisteja ja -agonisteja. Tutkimuksen hypoteesina oli, että rottien etanolin juominen vähentyisi johtuen ventraalisen pallidumin paikallisesti suurentuneen μ -opioidireseptorimäärän aiheuttamasta inhibitiosta. Varsinaisten juomiskokeiden jälkeen rotille annosteltiin systeemisesti opioidireseptoriantagonistia, naltreksonia, ja opioidireseptoriagonistia, morfiinia, ennen etanolin juomista, jotta nähtiin aiheuttiko virusvektorikäsittely muutoksia lääkeaineiden tunnettuihin vasteisiin etanolin juomisessa.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Koe-eläimet

Tässä tutkimuksessa käytettiin etanolia mielellään juovaa Alko, Alcohol (AA)-rottakantaa (Helsingin yliopisto, Helsinki, Suomi) (Sommer ym. 2006). Rotat ($n = 45$) olivat tutkimuksen alkaessa noin 3 kuukauden ikäisiä ja niiden painot olivat noin 230–310 grammaa. Rotat elivät yksittäisventiloiduissa Blueline-muovihäkeissä (Scanbur Technology, Karlsunde, Tanska) kolmen rotan ryhmissä. Rotilla oli häkissä virikkeenä haapapuukapula. Ruokaa (SDS RM1 (E) SQC, Witham, Essex, England) ja vettä oli

tarjolla *ad libitum*. Rotat elivät käännetyssä 12-tunnin valorytmissä, jossa valot sammuiivat kello 8.30. Huoneen, jossa rotat asuivat ja jossa kokeet suoritettiin, lämpötila oli 22 ± 2 °C ja ilmankosteus 55 ± 5 %.

4.2 Käytetyt yhdisteet

3-Diaminobentsidiini (Sigma-Aldrich, St. Louis, Yhdysvallat)

Biotinyloitu goat anti-rabbit (BA100, Vector Laboratories, Burlingame, Yhdysvallat)

Donkey anti-mouse Alexa 594 (A21207, Invitrogen, Grand Island, Yhdysvallat)

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

Formaldehydi 37 % (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa)

Goat anti-rabbit Alexa 488 (A11008, Invitrogen, Grand Island, Yhdysvallat)

Isofluraani (Vetflurane 1000 mg/g, Virbac, Edmund, Iso-Britannia)

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

Karprofeeni (Rimadyl Vet, 50 mg/ml, Pfizer, Dundee, Iso-Britannia)

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

Lidokaiini (Lidocain 20 mg/ml c. adrenalin, Orion Oyj, Espoo, Suomi)

Metanoli (Merck, KGaA, Darmstadt, Saksa)

Milli-Q-vesi (Valmistettu Millipore Simplicity-puhdistuslaitteella; EMD Millipore, Billerica MA, Yhdysvallat)

Morfiini (Yliopiston Apteekki, Helsinki, Suomi)

Mouse anti-GFAP (MA13360, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Saksa)

Mouse anti-NeuN (MAB377, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Saksa)

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

Natriumkloridi 9 mg/ml (B.Braun, Melsungen, Saksa)

Normal goat serum 1 % (Vector Laboratories, Burlingame, Yhdysvallat)

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

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

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

Pertex (Algol Diagnostics Oy, Espoo, Suomi)

Rabbit anti-GFP (Ab73933, Abcam, Cambridge, Iso-Britannia)

Rabbit anti-MOR (Ab10275, Abcam, Cambridge, Iso-Britannia)

Trimetopriini ja sulfadiatsiini (Oripriim Vet, Orion Oyj, Espoo, Suomi)

Triton X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa)

Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Yhdysvallat)

Vetyperoksidi 30 % (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa)

4.3 Kokeen suoritus

4.3.1 Koeryhmät

Tutkimuksessa käytetyt koeryhmät olivat AAV-MOR-, AAV-GFP- ja vehikkeliryhmä. Tutkimuksessa käytettiin AAV-virusvektoreita (adeno-associated-virus vector). Virusvektorit ovat geeniteknologian työkaluja, joilla kohdesoluun pystytään liittämään geneettistä materiaalia (Merten ym. 2005). Virusvektorissa viruksesta on poistettu tautia aiheuttavat ja lisääntymiseen eli replikaatioon liittyvät ominaisuudet ja sen genomiin on liitetty haluttu geeni. Tässä tutkimuksessa virusvektoreina käytettiin yksijuosteista AAV1-virusvektoria, jonka genomiin oli liitetty ihmisperäistä μ -opioidireseptoria tuottava geeni (AAV-MOR) (NIDA, USA) sekä yksijuosteista AAV1-virusvektoria, jonka genomiin oli liitetty vihreää väriä fluoresoivan proteiinin geeni (AAV-GFP) (NIDA, USA). Virusvektoreiden tiitterit olivat AAV-MOR-virusvektorilla $1,4 \times 10^{12}$ vg/ml ja AAV-GFP-virusvektorilla $5,8 \times 10^{12}$ vg/ml. Virusvektorien vehikkelinä oli fosfaattipuskuroitu saliini, jossa oli 0,5 mM magnesiumkloridia (PBS + 0,5 mM MgCl₂). AAV-GFP-virusvektori toimi virusvektorikontrollina. Pelkkää vehikkeliä käytettiin lisäksi toisena kontrollina. Virusvektoreita ja kontrollia infusoitiin bilateraalisesti 0,5 μ l rottien ventraaliseen pallidumiin.

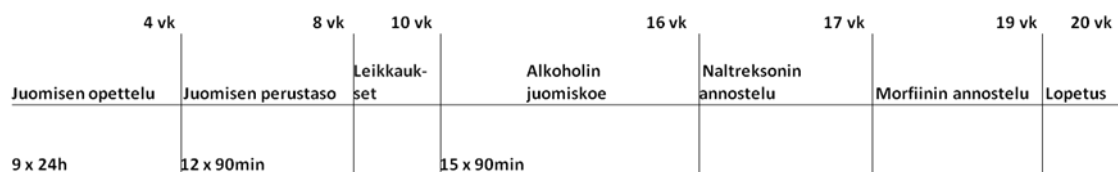
AAV-MOR- ja AAV-GFP-virusvektoreilla oli sama CMV (sytomegalovirus)-promoottori, jolla on tärkeä tehtävä virusvektorin ohjaamisessa kohdesoluun ja proteiinisynteesin aloituksessa (McCown ym. 1996). Koska tutkimuksessa käytetyillä virusvektoreilla oli sama promoottori, AAV-GFP-virusvektorin käyttäminen kontrollina oli perusteltua. Voitiin olettaa, että AAV-MOR- ja AAV-GFP-virusvektorit ohjautuvat samantyyppisiin soluihin.

4.3.2 Etanolin juominen

Tutkimuksessa käytettiin rajoitetun juomisen mallia, jossa rotilla oli mahdollisuus juoda etanolia vain lyhyen aikaa, 90 minuuttia kerrallaan (Kemppainen ym. 2012b). Kun juomisaika oli lyhyt, rotat alkoivat juoda etanolia heti kun ne siirrettiin juomishäkkiin. Mallilla pystyttiin seuraamaan tarkasti etanolin juomisessa mahdollisesti tapahtuvia muutoksia.

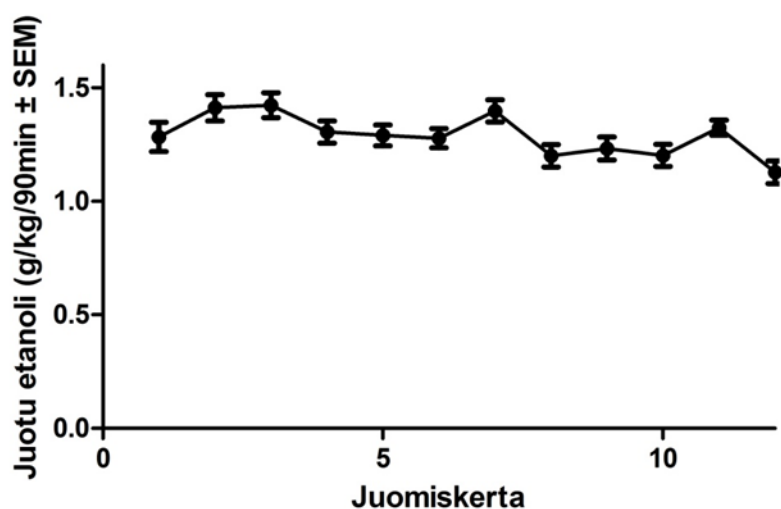
Juomiskokeissa käytetty etanoli valmistettiin laimentamalla 96 prosenttinen etanoli hanavedellä 10 prosenttiseksi. Aluksi rotat opetettiin juomaan etanolia (10 % v/v), ja juodun etanolin määrää seurattiin millilitroissa. Etanolin juomiskoe tapahtui teräksisissä ritiläpohjaisissa juottohäkeissä (21 x 38 x 19 cm), joissa rotat olivat yksittäin ja saivat valita veden tai etanolin välillä. Rotat olivat juomiskokeen ajan yksittäin, jotta juodun etanolin määrä saatiin mitattua tarkasti. Vettä ja etanolia sisältävien juomapillien paikkaa vaihdettiin joka juomakerralla, jotta voitiin estää rottaa suosimasta jompaakumpaa puolta.

Etanolin juomiskoe toteutettiin kolmesti viikossa, maanantaisin, keskiviikkoisin ja perjantaisin. Juomiskokeet aloitettiin noin klo 8.30, kun huoneen valot sammuiivat. Juomisen opetteluaiheessa rotat olivat juottohäkeissä 24 tuntia kerrallaan ja tänä aikana seurattiin 24 tunnin juomismääriä. Yhdeksän 24 tunnin juottokerran jälkeen juomisaika lyhennettiin 90 minuuttiin ja juomista seurattiin 12 kerran ajan. Kuvassa 5 on esitetty kokeen eteneminen koerottien osalta aikajanan tavoin.



Kuva 5. Kokeen suoritus aikajanan tavoin koerottien osalta. Juomisen opetteluaiheessa oli yhdeksän 24 tunnin juottoa, juomisen perustason määrittämisessä oli kaksitoista 90 minuutin juottoa ja varsinaisessa juomiskokeessa oli viisitoista 90 minuutin juottoa. Juomiskokeiden jälkeen rotille annosteltiin naltreksonia ja morfiinia ennen etanolin juomiskoetta. Kokeen lopuksi rotat lopetettiin. Koe kesti koerottien osalta kaikkiaan 20 viikkoa.

Etanolin juomisen perustasojen määrittämisessä otettiin huomioon eri aikapisteissä kumulatiivisesti mitatut etanolin määrät (30, 60, 90) kolmena viimeisenä juomiskertana ja rotat satunnaistettiin eri käsittelyryhmiin. Rotat punnittiin jokaisen juomiskerran jälkeen, jotta saatiin laskettua juodun etanolin määrä rotan painoa kohden. Kuvassa 6 on esitetty rottien juomistasot 12 viimeisimpänä kertana ennen stereotaktisia leikkauksia. Rottien etanolin juomista seurattiin yhteensä seitsemän viikon ajan ennen stereotaktisia leikkauksia.



Kuva 6. Etanolin juomisopettelu ja etanolin juomisen perustason määrittäminen (n = 45). Kuvassa on esitetty etanolin juomistasot ennen stereotaktisia leikkauksia puhtaan etanolin määränä rotan painoa kohden. Hajontana kuvassa on keskiarvon keskivirhe (SEM).

4.3.3 Stereotaktiset leikkaukset

Virusvektorit ja vehikkeli infusoiitiin rottien ventraaliseen pallidumiin stereotaktisissa leikkauksissa. Rotille annosteltiin karprofeenia (Rimadyl vet) kipulääkkeeksi 5,0 mg/kg (injektioilavuudessa 1 ml/kg) ihon alle noin 15 minuuttia ennen stereotaktista leikkausta ja kahtena päivänä stereotaktisen leikkauksen jälkeen. Ennen leikkaushaavan tekoa, rottien pääläeltä ajeltiin karvat ja ihoalue desinfioitiin 70 % etanolilla. Ihon alle annosteltiin 0,1 ml lidokaiinin ja adrenaliinin seosta (Lidocain cum adrenalin) puuduttamaan aluetta ja estämään liiallista verenvuotoa. Rotta nukutettiin isofluraanilla (Vetflurane) nukutuslaitteella (Univentor 400, Anaesthesia Unit, Univentor Ltd., Malta).

Nukutuksen induktion aikana isofluraanipitoisuus oli 4,5 % 10 minuutin ajan, ja leikkauksen aikana isofluraanipitoisuus oli 2,5 % (virtauksella 350 ml/min).

Leikkauksen alussa rotta kiinnitettiin stereotaktiseen laitteeseen (David Kopf instruments, Tujunga, Kalifornia). Ruumiinlämpöä kontrolloitiin rotan lämpöpatjalla, joka oli varustettu lämpömittarilla (Temperature controller, Carnegie Medicin, Tukholma, Ruotsi). Rotan silmiin annosteltiin silmätippoja (Oftagel) estämään silmien kuivumista. Rotan päänahka avattiin leikkausveitsellä pitkittäisesti ja kallon pinta puhdistettiin kalvoista ja verestä pumpulipuikoilla. Bregman koordinaatit määritettiin ja niistä laskettiin infuusiokohdat, jotka merkittiin kallon pintaan. Kalloon porattiin reiät hammasporalla (Volvere GX, Manila, Philippines) merkkien kohdalle. Tavoitekoordinaattina olivat A/P -0,8; M/L $\pm 3,2$ ja H -7,5 (Paxinos ja Watson 2008). Tässä tutkimuksessa tavoitteena oli ventraalisessa pallidumissa oleva hedoninen hotspot, jonka on havaittu säätelevän palkitsemisvaikutuksia ja motivaatiota ja olevan tärkeässä osassa etanolin juomisen säätelyssä (Smith ja Berridge 2007; Smith ym. 2009; Kemppainen ym. 2012b). Ennen neulan laskemista haluttuun koordinaattiin, oikea syvyys määritettiin kovakalvon pinnasta. Infuusio tehtiin mahdollisimman ohuella neulalla (tylppä neula, 33G, Worcester polytechnic institute, Worcester, Yhdysvallat) elektronisella infuusiolaitteella (Stoelting Co., IL, USA). Neulan laskemisen jälkeen odotettiin 1 minuutti, jonka jälkeen rotan aivoihin infusoitiin 0,5 μ l liuosta (AAV-MOR, AAV-GFP tai vehikkeliä). Infuusionopeutena käytettiin 0,5 μ l/min. Infuusion jälkeen odotettiin viisi minuuttia ennen kuin neula nostettiin. Sama toistettiin toiselle aivopuoliskolle. Infuusioiden ja odotusten jälkeen kallon reiät peitettiin luuvahalla ja päänahka tikattiin kiinni.

Leikkauksen jälkeen rotille annosteltiin intraperitoniaalisesti fysiologista suolaliuosta (Natriumkloridi 9 mg/ml) 10 ml/kg, elimistön kuivumisen estämiseksi. Haava pyyhittiin etanolilla ja rotta asetettiin toipumaan häkkiin lämmityslevyjen päälle. Rottien toipumisen nopeuttamiseksi tarjolla oli 5 % sokeriliuosta kahden päivän ajan leikkauksen jälkeen. Rotat punnittiin joka päivä neljän päivän ajan leikkauksesta ja niiden toipumista seurattiin. Tarvittaessa rottien haavan päälle ja ihon alle annosteltiin

0,1 ml antibioottia (Oripriim vet) estämään ja hoitamaan mahdollista haavan tulehdusreaktiota.

4.3.4 Virusvektorikäsittelyn vaikutus etanolin juomiseen

Leikkauksen ja toipumisjakson jälkeen rottien etanolin juomista seurattiin samalla rajoitetun juomisen mallilla kuin ennen leikkauksia viiden viikon ajan yhteensä 15 juomiskertaa. Rotat laitettiin juomishäkkeihin 90 minuutin ajaksi ja niiden juomaa etanolin määrää seurattiin 30, 60 ja 90 minuutin aikapisteissä. Rotat punnittiin jokaisen juomiskerran jälkeen, jotta saatiin laskettua juodun etanolin määrä painokiloa kohden.

4.3.5 Etanolin juomisen inhibointi naltreksonilla ja indusointi morfiinilla

Viidentoista etanolin juomiskokeen jälkeen rotille annosteltiin opioidireseptoriantagonistia, naltreksonia, ja opioidireseptoriagonistia, morfiinia, ennen etanolin juomiskoetta, jotta nähtiin, aiheuttiko ventraalisen pallidumin virusvektorikäsittely muutoksia lääkeaineiden tunnettuihin vasteisiin etanolin juomisessa. Rotille annosteltiin ihon alle naltreksonia kahdella eri annoksella (0,1 mg/kg ja 0,3 mg/kg) tai kontrollina käytettävää fysiologista suolaliuosta (Natriumkloridi 9 mg/ml). Annostelujen välissä oli aina yksi juomiskerta, jolloin rotat eivät saaneet injeksiota. Tämän tarkoituksena oli estää edellisen käsittelyn mahdollinen vaikutus seuraavaan käsittelyyn.

Naltreksonikokeen jälkeen tehtiin morfiinilla indusoitu etanolin juomiskoe. Siinä rotille annosteltiin ihon alle ensin yhdellä juomiskerralla fysiologista suolaliuosta ja sitten morfiinia samalla annoksella (3 mg/kg) toistetusti kolmena peräkkäisenä juomiskertana. Näiden juomiskertojen välissä ei ollut juomiskertoja, jolloin rotta ei saanut injeksiota, koska tutkimuksessa haluttiin havainnoida myös mahdollista morfiinin aiheuttamaa herkistymistä.

Lääkeaineet oli liuotettu fysiologiseen suolaliuokseen ja käytetty injektio-tilavuus oli 1 ml/kg. Lääkkeet annosteltiin noin 20 minuuttia ennen rottien siirtoa juottohäkkeihin.

Juotua etanolin määrää tarkasteltiin 10, 20, 30, 45, 75 ja 90 minuutin aikapisteissä. Lääkeaineiden annostelun jälkeisiä etanolin juomisarvoja verrattiin fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeisiin etanolin juomisarvoihin. Ennen lääkeaineannosteluja rotat totutettiin koemenetelmään.

4.3.6 Rottien lopetus

Tutkimuksen lopuksi osa rotista perfusoiitiin immunohistokemiallisia värjäyksiä varten ja loput lopetettiin dekapitaatiolla kvantitatiivista polymeraasiketjureaktiota varten (qPCR). Ennen perfusoinnin aloitusta rotille annosteltiin karprofeenia (Rimadyl Vet) ihon alle 5 mg/kg (injektiotilavuudessa 1 ml/kg). Rotat tainnutettiin pentobarbitaalilla, jota annosteltiin 90 mg/kg intraperitoniaalisesti. Perfuusio aloitettiin ensin 100 ml:lla natriumkloridiliuosta ja jatkettiin sitten 400 ml:lla paraformaldehydi(PFA)-liuosta. Pumppausnopeus oli 20 ml/minuutissa. Perfuusion jälkeen rottien aivot dissekoitiin ja ne laitettiin 4 % PFA-liuokseen, josta ne siirrettiin 20 % sakkaroosiliuokseen neljän tunnin kuluttua.

Loput rotista dekapitoitiin. Ennen dekapitointia rotat tainnutettiin isofluraanilla (Vetflurane) nukutuslaitteella (Univentor 400, Anaesthesia Unit, Univentor Ltd., Malta). Tainnutuksen aikana isofluraanipitoisuus oli 5 % 10 minuutin ajan (virtauksella 350 ml/min). Rotat dissekoitiin ja niiden aivot pikajäädytettiin isopentaanilla (snap-freeze). Aivot säilöttiin pakastimeen -80 °C lämpötilaan.

4.4 Immunohistokemialliset värjäykset

Virusvektoreiden biologista aktiivisuutta havainnoitiin immunohistokemiallisilla värjäyksillä. Värjäykset tehtiin aivoille, joiden korteksiin oli infusoitu 1 µl AAV-GFP- tai AAV-MOR-virusvektoria, ja rotat oli lopetettu noin kolmen viikon kuluttua stereotaktisesta leikkauksesta. Värjäyksiä varten infuusiota tehtiin korteksiin johtuen korteksin ventraalista pallidumia matalammasta µ-opioidireseptoritasosta (Kitchen ym. 1997). Ventraalisen pallidumin korkean endogeenisen µ-opioidireseptoritason vuoksi virusvektorilla aikaansaatu µ-reseptoriylimäärä olisi vaikea havaita.

Tutkimuksen lopuksi, kun kaikki rotat oli lopetettu, värjäyksiä tehtiin perfusoiduille aivoille, joiden ventraaliseen pallidumiin oli infusoitu 0,5 µl AAV-MOR- tai AAV-GFP-virusvektoria tai vehikkeliä.

Ennen värjäyksiä aivoista tehtiin 40 µm paksuisia free-float-leikkeitä kryostaatilla (Leica CM 3050, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Saksa).

4.4.1 Fluoresenssivärjäys

Fluoresenssivärjäys perustuu siinä käytettävien sekundääristen vasta-aineiden (donkey anti-mouse Alexa 594 ja goat-anti-rabbit Alexa 488) kykyyn fluoresoida tietyllä aallonpituudella (Panchuk-Voloshina ym. 1999). Aivojen, joihin oli infusoitu AAV-MOR-virusvektoria, aivoleikkeille tehtiin gliasoluvasta-aine (anti-GFAP, glial fibrillary acidic protein; gliasoluille tyypillinen fibrilliproteiini), neuronivasta-aine (anti-NeuN, neural nuclei; hermosoluille tyypillinen tuma) ja µ-opioidireseptorin vasta-aine (anti-MOR, µ-opioid receptor) -värjäykset. Aivojen, joihin oli infusoitu AAV-GFP-virusvektoria, aivoleikkeille tehtiin anti-GFAP-, anti-NeuN- ja GFP:n vasta-aine (anti-GFP) -värjäykset. Fluoresenssivärjäysten tarkoituksena oli selvittää mihin solutyyppiin, hermo- vai gliasoluihin, virusvektoriin liitetyn geenin koodaama proteiini paikallistui.

Aluksi leikkeet pestiin kolme kertaa PBS:lla (fosfaattipuskuroitu saliini, phosphate buffered saline). Pesujen jälkeen tehtiin blokkaukset liuoksessa, jossa oli 0,3 % Triton X-100 ja 10 % vuohen normaaliserumia (normal goat serum, NGS) PBS:ssa. Leikkeitä inkuboitettiin huoneenlämmössä tunnin ajan. Blokkauksen jälkeen leikkeitä inkuboitettiin yön yli + 4 °C:ssa primäärivasta-aineessa, joka oli AAV-MOR-virusvektoria saaneiden aivojen leikkeillä rabbit anti-MOR (1:700) ja AAV-GFP-virusvektoria saaneiden aivojen leikkeillä rabbit anti-GFP (1:1000). Lisäksi primäärisinä vasta-aineina käytettiin mouse anti-GFAP (1:700) tai mouse anti-NeuN (1:1000). Primäärivasta-aineliuoksessa oli lisäksi 1 % NGS ja liuoksen pohjana oli PBS. Seuraavana päivänä leikkeet huuhdeltiin kolme kertaa PBS:lla ja inkuboitettiin sekundäärivasta-aineessa tunnin ajan huoneenlämmössä, pimeässä. Sekundäärivasta-aineena käytettiin donkey anti-mouse Alexa:a 594 (1:700) ja goat-anti-rabbit Alexa:a 488 (1:700) ja inkubaatiliuoksessa oli

myös 1 % NGS PBS:ssa. Inkuboinnin jälkeen leikkeet huuhdeltiin PBS:lla 3 kertaa ja leikkeet kerättiin gelatinoiduille lasseille. Leikkeet peitettiin Vectashield:lla ja peitinlasi kiinnitettiin kynsilakalla. Leikkeitä tarkasteltiin ja kuvattiin Zeiss (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Gottningen, Saksa) -mikroskoopilla.

4.4.2 Diaminobentsidiinivärjäys

μ -Opioidireseptorit paikallistettiin diaminobentsidiinivärjäyksen (DAB-värjäys) värireaktiolla. Menetelmä perustuu ABC:n (Avidiini-biotiini-kompleksi) reaktioon vetyperoksidin kanssa (Hsu ym. 1981). ABC, jossa on peroksidaasientsyymeillä konjugoituja biotiinimolekyyliä, sitoutuu biotinyloidun sekundaarisen vasta-aineen biotiinimolekyyliin. ABC:n peroksidaasientsyymit reagoivat reaktioon lisättävän vetyperoksidin kanssa ja reaktiosta syntyvät tuotteet hapettavat DAB:n (3-diaminobentsidiini), josta muodostuu liukenematon ruskea sakka.

Aluksi leikkeet huuhdeltiin kolme kertaa PBS:lla. Seuraavaksi endogeeniset entsyymit sammutettiin inkuboimalla niitä 8 minuuttia liuoksessa, jossa oli 10 % metanolia ja 3 % vetyperoksidia PBS:ssa. Inkuboinnin jälkeen leikkeet huuhdeltiin PBS:lla kolme kertaa. Pesujen jälkeen tehtiin blokkaukset liuoksella, jossa oli 0,3 % Triton X-100 ja 10 % NGS PBS:ssa. Leikkeitä inkuboitettiin huoneenlämmössä tunnin ajan. Blokkauksen jälkeen leikkeitä inkuboitettiin yön yli + 4 °C:ssa primäärivasta-aineessa, joka oli rabbit anti-MOR (1:700). Liuoksessa oli myös 1 % NGS. Liuoksen pohjana oli PBS.

Seuraavana päivänä leikkeet huuhdeltiin kolme kertaa PBS:lla ja inkuboitettiin sekundäärivasta-aineessa kahden tunnin ajan huoneenlämmössä. Sekundäärivasta-aineena käytettiin biotinyloitua goat anti-rabbit:ia (1:200) ja liuoksessa oli myös 0,3 % Triton X-100 PBS:ssa. Inkuboinnin jälkeen leikkeet huuhdeltiin PBS:lla 3 kertaa. Huuhteluiden jälkeen leikkeille tehtiin ABC-reaktio (Vectastain, Vector Elite Kit) pakkauksen ohjeen mukaan. Leikkeitä inkuboitettiin ABC-liuoksessa tunnin ajan. ABC-reaktion jälkeen leikkeet huuhdeltiin 3 kertaa PBS:lla, ja huuhteluiden jälkeen leikkeille tehtiin DAB-reaktio. DAB-liuos valmistettiin sekoittamalla DAB-kantaliuosta PBS:iin ja lisäämällä lopuksi vetyperoksidia. DAB-kantaliuos oli valmistettu liuottamalla 0,5 g

DAB:ia 100 ml milliQ-veteen. Leikkeet olivat DAB-liuoksessa 30 sekuntia. DAB-reaktion jälkeen leikkeet huuhdeltiin kerran PBS:lla. Leikkeet dehydratoitiin etanolilla ja kirkastettiin ksyleenillä. Lopuksi leikkeet kerättiin gelatinoiduille lasseille ja peitinlasi kiinnitettiin Pertex-kiinnitysaineella. Leikkeitä tarkasteltiin ja kuvattiin Zeiss (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Gottningen, Saksa) -mikroskoopilla.

4.5 Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio

Kaksi AAV-MOR-infuusion ventraaliseen pallidumiin saanutta rottaa ja yksi PBS-infuusion ventraaliseen pallidumiin saanut rotta lopetettiin kolmen viikon kuluttua leikkauksista. Näiden rottien ventraalisesta pallidumista otetuille näytteille tehtiin kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (qPCR). Kontrollina oli myös yksi etanolin juomisen ja stereotaktisen leikkauksen suhteen naivi rotta. qPCR:lla tutkittiin virusvektorin kykyä tuottaa siihen liitetyn geenin koodaaman proteiinin eli μ -opioidireseptorin, lähetti-RNA:ta. Halutun proteiinin lähetti-RNA:n määrää verrattiin sisäisen kontrolligeenin (Glyseraldehydi-3-fosfaatti-dehydrogenaasi, GAPDH) lähetti-RNA:n määrään. qPCR-menetelmässä käytetyillä erilaisilla alukkeilla pystyttiin erottamaan ihmisperäinen lähetti-RNA rotalta peräisin olevasta lähetti-RNA:sta.

PCR:ssa tuotetaan entsymaattisesti miljoonia cDNA-kopioita valitusta RNA-segmentistä käänteiskopioijaentsyymien avulla. Reaktio perustuu kahden erilaisen oligonukleotidin eli alukkeen kiinnittymiseen kaksijuosteisen RNA:han (Erlich ym. 1991). Alukkeiden välistä RNA-aluetta monistetaan. PCR-menetelmään kuuluu kolme vaihetta: denaturaatio, alukkeiden sitoutuminen ja cDNA:n synteesi ja kaikki nämä vaiheet vaativat eri lämpötilan. Menetelmässä arvioidaan tuotetun cDNA:n määrää.

RNA eristettiin ventraalisen pallidumin näytteistä TRI-reagent protocol t9424 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Yhdysvallat) mukaan. QPCR tehtiin tässä tutkimuksessa DyNAmo cDNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Yhdysvallat) -synteesikitin mukaan. Käytössä oli TaqMan-kitti, jonka ihmisen μ -opioidireseptorin ja kontrolligeenin alukkeiden sekvenssit on esitetty taulukossa 3. Kokeessa oli lisäksi TaqMan probe rat Oprm1 (Rn1430371) (Cat.No: 4331182, Thermo Fisher Scientific, Waltham,

Yhdysvallat) -seos, joka sisälsi rotan μ -opioidireseptoriin liittyvät alukkeet. Tämä oli kaupallinen valmiste, joten siihen liittyvien alukkeiden sekvenssejä ei ollut tiedossa. TaqMan-kittiin kuuluu normaalien kahden alukkeen lisäksi kolmas oligonukleotidi, joka sisältää fluoresoivan leimamolekyylin molemmissa päissä (TaqMan-koetin). Fluoresoivia leimamolekyylejä käytetään hyväksi tulosten laskemisessa.

Taulukko 3. QPCR:n TaqMan alukkeiden sekvenssit. hMOR = ihmisperäinen μ -opioidireseptori, rGAPDH = rotan kontrolligeeni.

hMOR _{aloitus}	CTTCGAAGGATCACCAGGAT
hMOR _{lopetus}	CTGGGATTGTAACCAAGGCT
hMOR _{koetin}	Fam-CACAGCCACCACCACCAGCA-BHQ1
rGAPDH _{aloitus}	GAACATCATCCCTGCATCCA
rGAPDH _{lopetus}	CCAGTGAGCTTCCCGTTCA
rGAPDH _{koetin}	Fam-CTTGCCCACAGCCTTGGCAGC-BHQ1

4.6 Tilastollinen analyysi

Eri ryhmien käsittelyjen vaikutusta etanolin juomiseen analysoitiin kumulatiivisista juomismäärästä 30, 60 ja 90 minuutin aikapisteissä. Tilastollisiin analyysihin otettiin mukaan 15 leikkauksen jälkeistä juomiskertaa. Tilastolliset analyysit tehtiin toistettujen mittausten varianssianalyysillä (ANOVA). Juodun etanolin määrä analysoitiin puhtaan etanolin määrästä grammoina rotan painokiloa kohden.

Naltreksonin vaikutusta etanolin juomiseen analysoitiin käyttäen tilastollisena testinä kaksisuuntaista ANOVA:a, jossa virusvektoria saaneita ryhmiä verrattiin vehikkeliryhmään. Naltreksonin vaikutuksia etanolin juomiseen analysoitiin myös laskemalla naltreksonin eri annosten jälkeisten etanolin juomisarvojen suhde fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiseen etanolin juomiseen. Tässä tilastollinen analyysi tehtiin erikseen 0,1 mg/kg:n annokselle ja 0,3 mg/kg:n annokselle ja tilastollisena testinä käytettiin yksisuuntaista ANOVA:a. Naltreksonin eri annosten vaikutusta ryhmien sisällä analysoitiin yksisuuntaisella ANOVA:lla, jossa oli mukana yksittäisen ryhmän naltreksonin eri annosten jälkeiset etanolin juomiset ja fysiologisen

suolaliuoksen annostelun jälkeinen etanolin juominen. Analyysit tehtiin 90 minuutin aikapisteessä kumulatiivisista etanolin juomisen arvoista.

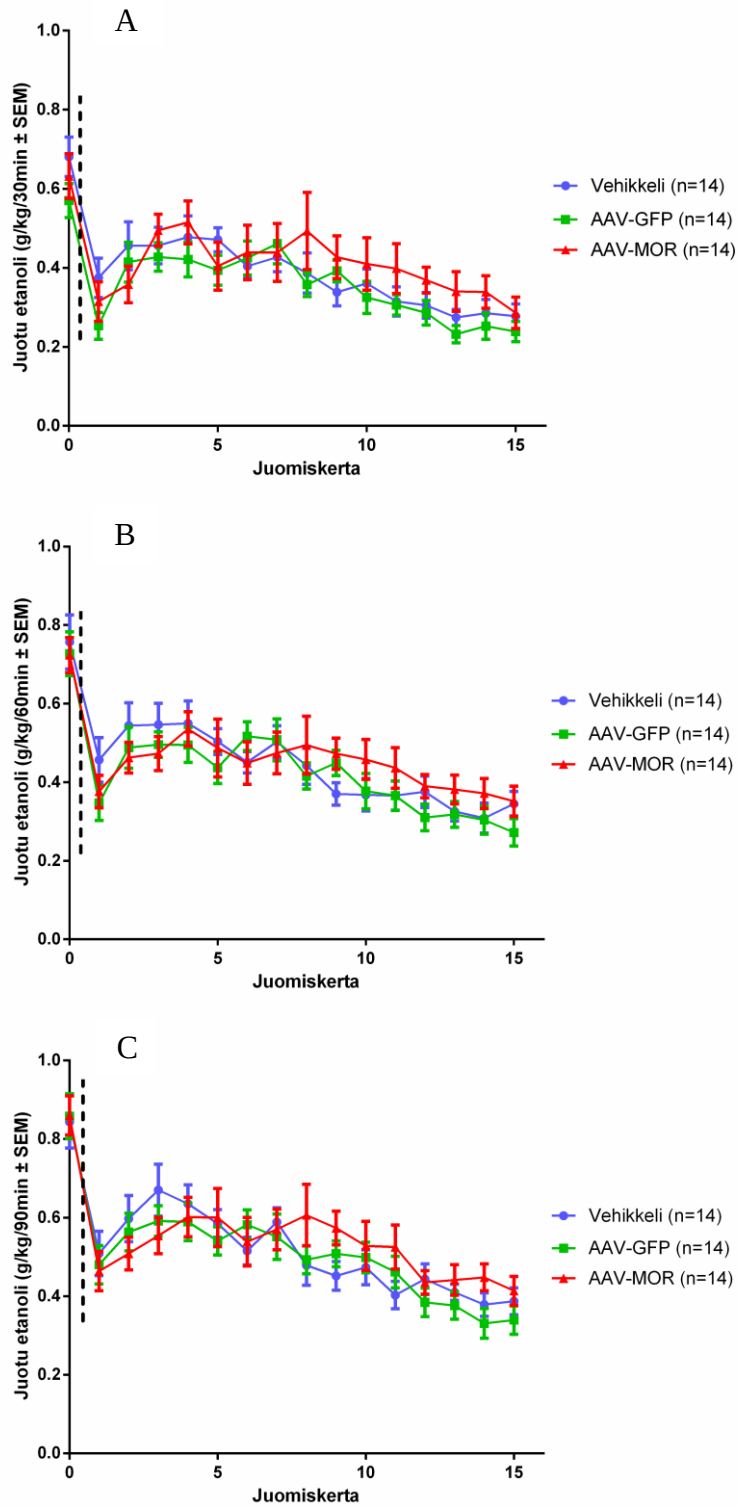
Morfiinin annostelun vaikutusta etanolin juomiseen analysoitiin laskemalla morfiiniannostelujen jälkeiset etanolin juomisarvot yhteen ja laskemalla niiden suhde fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeisiin etanolin juomisarvoihin. Tilastollinen analyysi tehtiin yksisuuntaisella ANOVA:lla. Eri taustakäsittelyjen merkitystä morfiiniannostelun vaikutuksessa etanolin juomiseen analysoitiin myös laskemalla ryhmän sisällä fysiologisen suolaliuoksen annostelun ja kaikkien morfiiniannostelujen jälkeiset etanolin juomiset yhteen ja ryhmien tuloksia verrattiin keskenään yksisuuntaisella ANOVA:lla. Analyysit tehtiin 90 minuutin aikapisteessä kumulatiivisista etanolin juomisen arvoista.

Tilastollisissa analyyseissä tilastollisen merkitsevyyden rajana käytettiin P-arvoa 0,05. ANOVA:n antaessa tilastollisesti merkitsevän tuloksen jatkotestinä käytettiin Dunnetin testiä. Kaikki tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS 21 -ohjelmalla (IBM, Armonk NY, Yhdysvallat) ja tuloksista piirrettiin kuvaajat GraphPad Prism 6,0-ohjelmalla.

5 TULOKSET

5.1 Virusvektorikäsittelyn vaikutus etanolin juomiseen

Juodun etanolin määrää tarkasteltiin 30, 60 ja 90 minuutin aikapisteissä. Rottaryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa 30 minuutin aikapisteessä ($F_{30,585} = 0,910$; $P = 0,572$), 60 minuutin aikapisteessä ($F_{30,585} = 1,010$; $P = 0,448$) eikä 90 minuutin aikapisteessä ($F_{30,585} = 1,196$; $P = 0,261$) analysoituna toistettujen mittausten ANOVA:lla. Kuvissa 7. A-C on esitetty kumulatiiviset etanolin juomistasot eri aikapisteissä 90 minuutin rajoitetussa juotossa puhtaan etanolin määränä rotan painoa kohden.



Kuva 7. A-C. Kumulatiiviset etanolin juomistasot (g/kg/min) A) 30 B) 60 ja C) 90 minuutin aikana 90 minuutin rajoitetun juoton aikana. Kuvassa on esitetty juotu etanolimäärä puhtaana etanolina rotan painoa kohden (g/kg). Poikkiviiva kuvaa stereotaktisia leikkauksia, ja 0 on perustaso ennen leikkauksia. Hajontana kuvassa on keskiarvon keskivirhe (SEM).

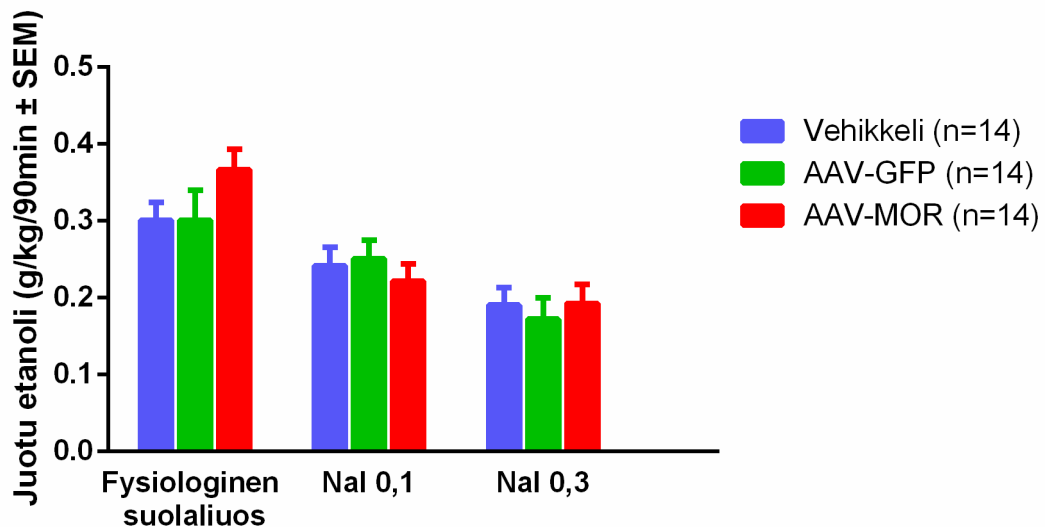
5.2 Naltreksoniannostelun vaikutus etanolin juomiseen

Naltreksonin eri annosten vaikutusta etanolin juomiseen verrattiin fysiologisen suolaliuoksen annosteluun nähden. Tilastollisena testinä käytettiin kaksisuuntaista ANOVA:a, jossa virusvektoria saaneita ryhmiä verrattiin vehikkeliryhmään. Naltreksonin eri annokset eivät aiheuttaneet tilastollisesti merkitsevää eroa AAV-MOR-virusvektoria ja vehikkeliä saaneiden rottien etanolin juomisessa ($F_{2,78} = 1,707$; $P = 0,188$). Naltreksonin eri annokset eivät aiheuttaneet tilastollisesti merkitsevää eroa myöskään AAV-GFP-virusvektoria ja vehikkeliä saaneiden rottien etanolin juomisessa ($F_{2,78} = 0,132$; $P = 0,876$). Kuvassa 8 on esitetty naltreksonin eri annosten (0,1 mg/kg ja 0,3 mg/kg) jälkeiset kumulatiiviset etanolin juomismäärät verrattuna fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiseen juomiseen 90 minuutin aikapisteessä 90 minuutin rajoitetussa juotossa.

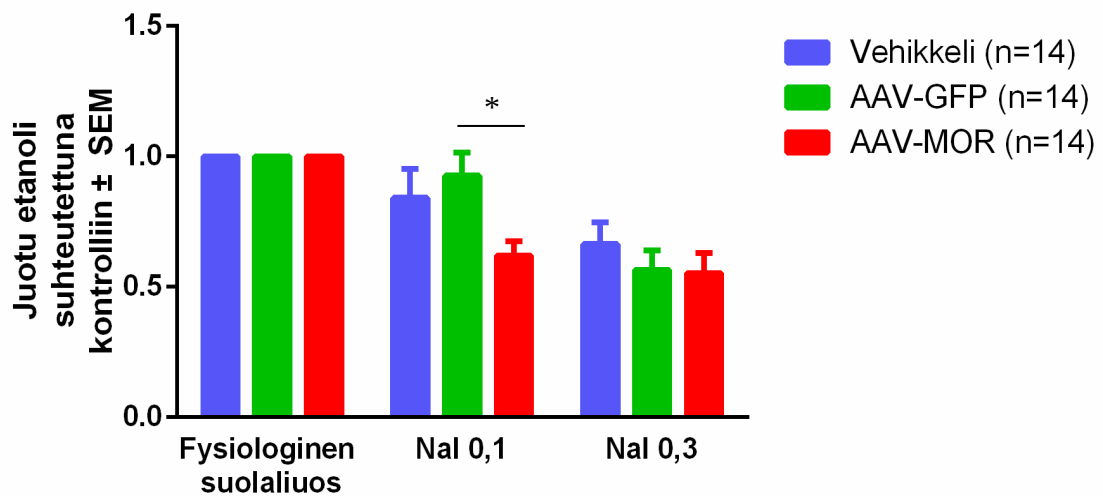
Naltreksonin eri annosten vaikutusta etanolin juomiseen verrattiin fysiologisen suolaliuoksen jälkeisiin etanolin juomisarvoihin myös laskemalla näiden suhde. Analyysissa käytettiin 90 minuutin kumulatiivisia etanolin juomisarvoja. Tässä tilastollisena testinä käytettiin yksisuuntaista ANOVA:a, jossa eri ryhmien naltreksonin eri annosten jälkeisiä etanolin juomisarvoja suhteutettuna fysiologisen suolaliuoksen jälkeisiin etanolin juomisarvoihin verrattiin keskenään. Naltreksonin 0,1 mg/kg:n annos aiheutti tilastollisesti merkitsevän eron eri ryhmien etanolin juomisessa ($F_{2,39} = 3,291$; $P = 0,048$), kuitenkin tilastollisesti merkitsevä ero havaittiin vain AAV-MOR- ja AAV-GFP-ryhmien välillä ($p = 0,032$, Dunnetin jatkotesti). Naltreksonin 0,3 mg/kg:n annos ei aiheuttanut tilastollisesti merkitsevää eroa eri ryhmien etanolin juomisessa ($F_{2,39} = 0,604$; $P = 0,551$). Naltreksonin eri annosten vaikutus etanolin juomiseen suhteessa fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiseen etanolin juomiseen on esitetty kuvassa 9.

Naltreksonin vaikutuksesta etanolin juomiseen tehtiin lisäksi analyysi, jossa ryhmän sisällä verrattiin naltreksonin eri annosten (0, 0,1 ja 0,3 mg/kg) vaikutuksia etanolin juomiseen. Analyysi tehtiin yksisuuntaisella ANOVA:lla 90 minuutin kumulatiivisista juomisarvoista. Naltreksoni vähensi etanolin kulutusta odotetusti kaikissa ryhmissä

(AAV-MOR [$F_{2,39} = 14,533$; $P < 0,005$]; AAV-GFP [$F_{2,39} = 4,299$; $P = 0,021$]; vehikkeliyryhmä [$F_{2,39} = 5,482$; $P = 0,008$]). Naltreksonin 0,1 mg/kg:n annos vähensi tilastollisesti merkitsevästi etanolin juomista kuitenkin vain AAV-MOR ryhmällä ($p < 0,0005$, Dunnetin jatkotesti). Naltreksonin 0,3 mg/kg:n annos vähensi tilastollisesti merkitsevästi etanolin juomista kaikilla ryhmillä (AAV-MOR: $p < 0,005$, AAV-GFP: $p = 0,011$ ja vehikkeliyryhmä: $p = 0,004$, Dunnetin jatkotesti).



Kuva 8. Naltreksonin eri annosten vaikutus rottien etanolin juomiseen 90 minuutin rajoitetussa etanolin juomiskokeessa 90 minuutin kumulatiivisten juomismäärien osalta. Juotu etanoli on laskettu puhtaan etanolin määränä rotan painoa kohden (g/kg). Hajontana kuvassa on keskiarvon keskivirhe (SEM). Nal 0,1 = naltreksonin annos 0,1 mg/kg, Nal 0,3 = naltreksonin annos 0,3 mg/kg.



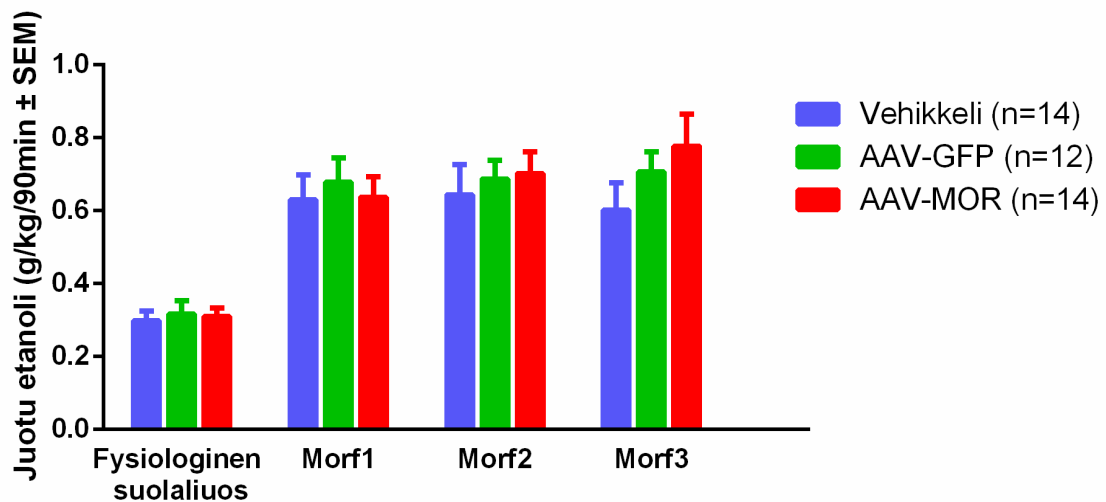
Kuva 9. Naltreksonin eri annosten vaikutus etanolin juomiseen suhteessa fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiseen etanolin juomiseen 90 minuutin rajoitetussa juotossa 90 minuutin kumulatiivisten juomismäärien osalta. Fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiset etanolin juomisarvot saavat arvon 1. Hajontana kuvassa on keskiarvon keskivirhe (SEM). * = tilastollisesti merkitsevä ero AAV-GFP- ja AAV-MOR-ryhmien välillä analysoituna yksisuuntaisella ANOVA:lla (Dunnetin jatkotesti, $p=0,032$, * = $p < 0,05$). Nal 0,1 = naltreksonin annos 0,1 mg/kg, Nal 0,3 = naltreksonin annos 0,3 mg/kg.

5.3 Toistetun morfiiniannostelun vaikutus etanolin juomiseen

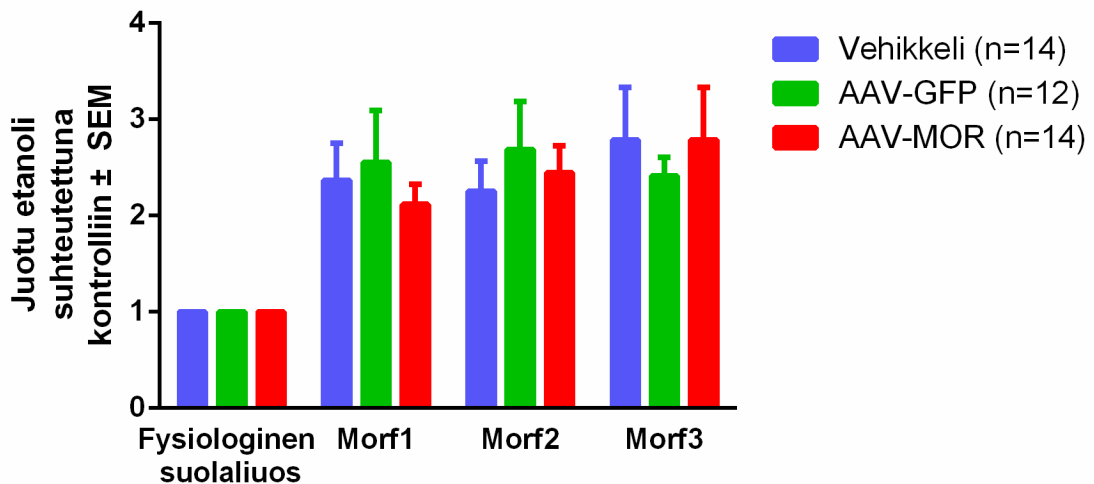
Morfiinin annostelujen jälkeisen etanolin juomisarvot 90 minuutin kohdalla laskettiin yhteen ja ne suhteutettiin fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeisiin etanolin juomisarvoihin. Tilastollisena testinä käytettiin yksisuuntaista ANOVA:a. Morfiinin annostelu ei aiheuttanut tilastollisesti merkitseviä eroja etanolin juomisessa eri ryhmien välillä ($F_{2,37} = 0,350$; $P = 0,707$).

Eri taustakäsittelyjen merkitystä morfiinin vaikutuksessa etanolin juomiseen analysoitiin myös laskemalla ryhmän sisällä fysiologisen suolaliuoksen ja morfiiniannostelujen jälkeiset 90 minuutin kumulatiiviset etanolin juomisarvot yhteen ja vertaamalla niitä keskenään yksisuuntaisella ANOVA:lla. Eri taustakäsittelyillä ryhmillä ei havaittu olevan tilastollisesti merkitseviä eroja etanolin juomisessa morfiinilla indusoidussa etanolin juomiskokeessa ($F_{2,37} = 0,874$; $P = 0,426$).

Kuvassa 10 on esitetty morfiinin annostelun jälkeiset kumulatiiviset etanolin juomismäärät verrattuna fysiologisen suolaliuoksen jälkeiseen juomiseen 90 minuutin aikapisteessä rajoitetussa 90 minuutin juotossa. Morfiinin annostelun vaikutus suhteessa fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiseen etanolin juomiseen on esitetty kuvassa 11. Morfiini annosteltiin toistuvasti peräkkäisinä juomiskertoina samalla annoksella 3 mg/kg.



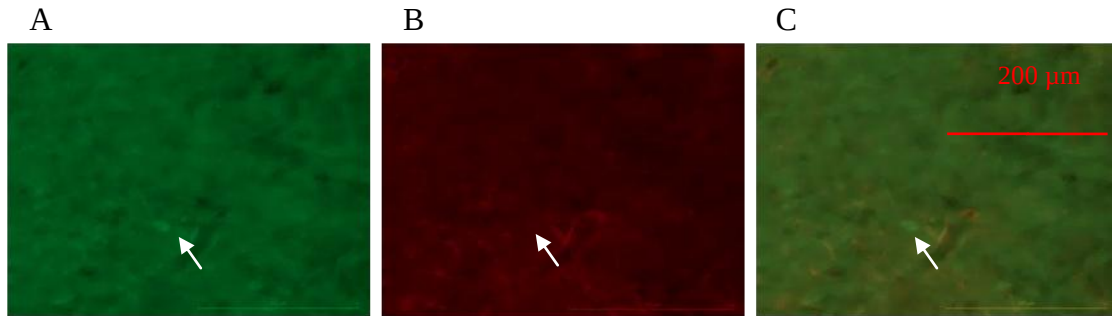
Kuva 10. Morfiinin toistuvan annostelun (3 mg/kg, ihon alle) vaikutus rottien etanolin juomiseen rajoitetussa 90 minuutin juotossa 90 minuutin kumulatiivisten juomismäärien osalta. Juotu etanoli on laskettu puhtaan etanolin määränä rotan painoa kohden (g/kg). Hajontana kuvassa on keskiarvon keskivirhe (SEM). Morf1 = 1.morfiiniannostelu, Morf2 = 2.morfiiniannostelu, Morf3 = 3.morfiiniannostelu.



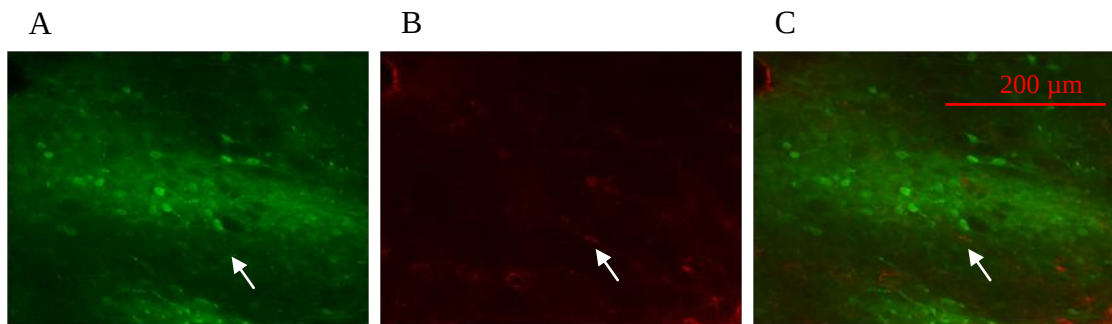
Kuva 11. Morfiinin toistuvan annostelun (3 mg/kg, ihon alle) vaikutus etanolin juomiseen suhteessa fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiseen etanolin juomiseen 90 minuutin rajoitetussa juotossa 90 minuutin kumulatiivisten juomismäärien osalta. Fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiset etanolin juomisarvot saavat arvon 1. Hajontana kuvassa on keskiarvon keskivirhe (SEM). Morf1 = 1.morfiiniannostelu, Morf2 = 2.morfiiniannostelu, Morf3 = 3.morfiiniannostelu.

5.4 Fluoresenssivärjäys

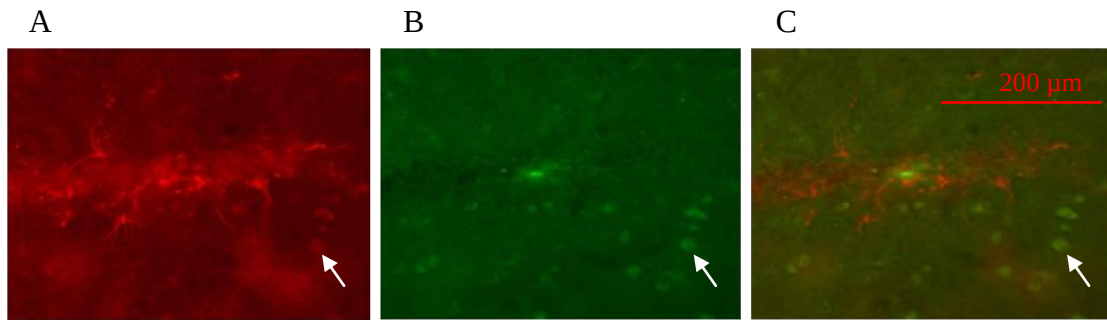
Kuvat 12-15 on fluoresenssivärjäyksistä. Kuvissa nähdään värjäytyneitä gliasoluja, hermosoluja ja μ -opioidireseptoreita sekä virusvektoriin liitetyn geenin koodaamia GFP-proteiineja. Värjäytyneet gliasolut eivät ole päällekkäin värjäytyneiden GFP-proteiinien ja μ -opioidireseptoreiden kanssa (kuvat 12 ja 13). Tämä viittaa siihen, että GFP-proteiinit ja virusvektorin avulla yli-ilmennetyt μ -opioidireseptorit eivät ole lokalisoituneet gliasoluihin. Värjäytyneet μ -opioidireseptorit, GFP-proteiinit ja hermosolut osuvat päällekkäin, mikä viittaa siihen, että virusvektorin avulla yli-ilmennetyt μ -opioidireseptorit ja GFP-proteiinit olisivat lokalisoituneet hermosoluihin (kuvat 14 ja 15). Fluoresenssivärjäysten tulokset viittaavat siihen, että AAV-MOR- ja AAV-GFP-virusvektoreihin liitettyjen geenien koodaamat proteiinit olisivat lokalisoituneet hermosoluihin.



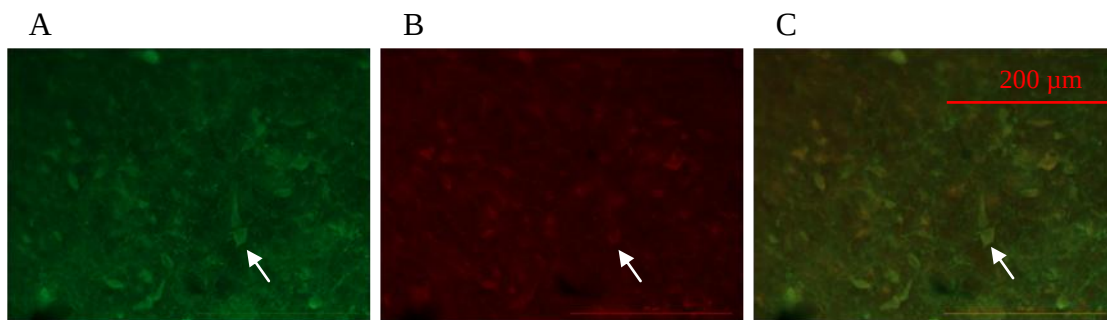
Kuva 12. A-C. Virusvektorin avulla yli-ilmennettyjen μ -reseptoreiden kolokalisaatio gliasolujen kanssa ventraalisessa pallidumissa. Kuvassa A on värjäytyneitä μ -opioidireseptoreita (anti-MOR, 1:700, vihreä väri), kuvassa B on värjäytyneitä gliasoluja (anti-GFAP, 1:700, punainen väri) ja kuvassa C on nämä kaksi kuvaa päällekkäin havainnollistamassa gliasolujen ja μ -opioidireseptorien kolokalisaatiota. Nuoli osoittaa soluun, joka näkyy A- ja C-kuvassa mutta ei B-kuvassa. Kuva on otettu 20-kertaisella suurennoksella. Kuvissa oleviin aivoihin 0,5 μ l:n AAV-MOR-infuusio oli tehty ventraaliseen pallidumiin.



Kuva 13. A-C. Virusvektorin avulla ilmentettyjen GFP-proteiinien kolokalisaatio gliasolujen kanssa korteksissa. Kuvassa A on värjäytyneitä GFP-proteiineja (anti-GFP, 1:700, vihreä väri), kuvassa B on värjäytyneitä gliasoluja (anti-GFAP 1:1000, punainen väri) ja kuvassa C on nämä kaksi kuvaa päällekkäin havainnollistamassa gliasolujen ja GFP-proteiinin kolokalisaatiota. Nuoli osoittaa solua, joka näkyy kuvissa B ja C, mutta ei kuvassa A. Kuva on otettu 20-kertaisella suurennoksella. Kuvissa oleviin aivoihin 1 μ l:n AAV-GFP-infuusio oli tehty korteksiin.



Kuva 14. A-C. Virusvektorin avulla yli-ilmennettyjen μ -reseptoreiden kolokalisaatio hermosolujen kanssa korteksissa. Kuvassa A on värjäytyneitä μ -opioidireseptoreita (anti-MOR, 1:700, punainen väri), kuvassa B on värjäytyneitä hermosoluja (anti-NeuN 1:1000, vihreä väri) ja kuvassa C on nämä kaksi kuvaa päällekkäin havainnollistamassa hermosolujen ja μ -opioidireseptorien kolokalisaatiota. Nuoli osoittaa soluja, joissa on havaittavissa kolokalisaatiota. Kuva on otettu 20-kertaisella suurennoksella. Kuvassa olevissa aivoissa 1 μ l:n AAV-MOR-infusio oli tehty korteksiin, ja kuvassa näkyy infuusioaluetta.

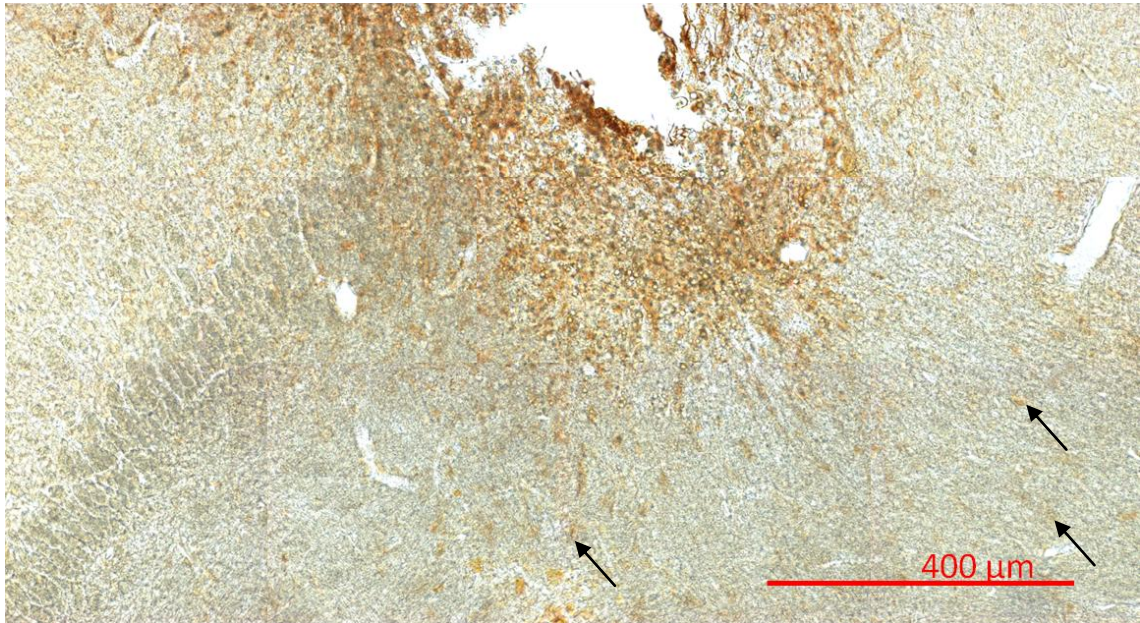


Kuva 15. A-C. Virusvektorin avulla ilmentettyjen GFP-proteiinien ja hermosolujen kolokalisaatio ventraalisessa pallidumissa. Kuvassa A on värjäytyneitä GFP-proteiineja (anti-GFP, 1:1000, vihreä väri), kuvassa B on värjäytyneitä hermosoluja (anti-NeuN 1:1000, punainen väri) ja kuvassa C on nämä kaksi kuvaa päällekkäin havainnollistamassa hermosolujen ja GFP-proteiinin kolokalisaatiota. Nuoli osoittaa soluja, jossa on havaittavissa kolokalisaatiota. Kuva on otettu 20-kertaisella suurennoksella. Kuvissa oleviin aivoihin 0,5 μ l:n AAV-GFP-infusio oli tehty ventraaliseen pallidumiin.

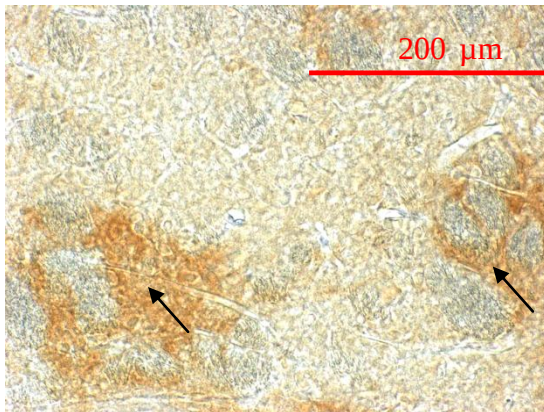
5.5 Diaminobentsidiinivärjäys

DAB-värjäyksessä tarkoituksena oli paikallistaa immunohistokemiallisin reaktion μ -opioidireseptorin ilmentyminen kudoksessa. Kuva 16 on DAB-värjäyksestä, jossa 1 μ l AAV-MOR-virusvektoria oli infusoitu korteksiin. DAB-värjäyksessä sisäisenä kontrollina toimi striatumin alue, jossa on μ -opioidireseptoreja sisältäviä striatosomeja

(kuva 17) (Arvidsson ym. 1995). Tulosten perusteella AAV-MOR-infuusiolla saatiin aikaan μ -opioidireseptorien yli-ilmentyminen korteksissa ja ventraalisessa pallidumissa.



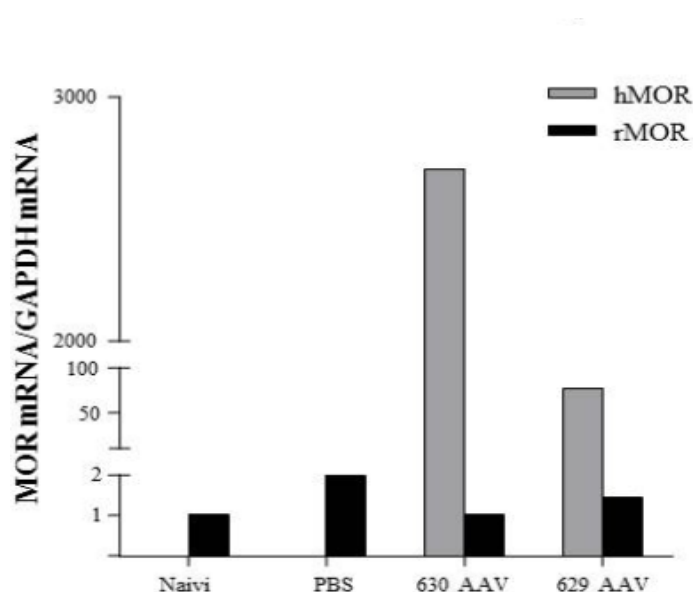
Kuva 16. DAB-värjäyksellä paikallistetut μ -opioidireseptorit korteksissa 1 μ l:n AAV-MOR-virusvektori-infuusion jälkeen. Kuva on DAB-värjäyksestä, jossa selvitettiin μ -opioidireseptorien sijaintia. Nuolet osoittavat värjäytyneitä μ -opioidireseptoreita. Kuva on otettu 20-kertaisella suurennoksella.



Kuva 17. DAB-värjäyksellä paikallistetut endogeeniset μ -opioidireseptorit striatumissa samassa leikkeessä kuin kuvassa 16. Striatumissa on striosomeja, jotka sisältävät endogeenisia μ -opioidireseptoreja ja ne toimivat sisäisenä kontrollina. Nuolet osoittavat värjäytyneitä μ -opioidireseptoreja, jotka näkyvät samanvärisinä kuvassa 16. Kuva on otettu 20-kertaisella suurennoksella.

5.6 Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio

QPCR:n tulosten perusteella kontrollirotilla ei havaittu ihmisperäistä μ -opioidireseptorien lähetti-RNA:ta, jota havaittiin rotilla, joille oli infusoitu AAV-MOR-virusvektoria ventraaliseen pallidumiin. Ero oli 100–2500 -kertainen. Tulosten perusteella AAV-MOR-virusvektoriin liitetty geeni tuotti μ -opioidireseptorin lähetti-RNA:ta. QPCR:n tulokset on esitetty kuvassa 18.



Kuva 18. Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion (qPCR) tulokset. Kuvassa on esitetty ihmisperäisen ja rottaperäisen μ -opioidireseptorin lähetti-RNA:n määrä verrattuna sisäisen kontrolligeenin lähetti-RNA:n määrään. Rotille 629 ja 630 oli infusoitu 0,5 μ l AAV-MOR-virusvektoria ventraaliseen pallidumiin, PBS:a eli vehikkeliä saanut rotta ja etanolin ja stereotaktisen leikkauksen suhteen naivi rotta toimivat kontrollina. Ihmisperäisen μ -opioidireseptorin lähetti-RNA:ta ei havaittu kuin AAV-MOR-virusvektoria saaneissa rotissa. hMOR = ihmisperäinen μ -opioidireseptori, rMOR = rottaperäinen μ -opioidireseptori, GAPDH = rotan kontrolligeeni.

6 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Tässä tutkimuksessa tutkittiin ventraalisen pallidumin roolia etanolin juomisessa rajoitetun juomisen mallilla AA-rotilla. Rottien ventraaliseen pallidumiin pyrittiin aiheuttamaan paikallinen inhibitio yli-ilmentämällä μ -opioidireseptoreita AAV-MOR-virusvektoreiden avulla. Tutkimuksen hypoteesina oli, että ventraalisella pallidumilla ja

sen opioidergisellä järjestelmällä on merkitystä etanolin juomisessa. Etanolin juomiskokeissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja eri ryhmien välillä. Samankaltaista, virusvektoreilla tehtyä tutkimusta ventraalisesta pallidumista ei ole ennen tehty, mutta tutkimus opioidireseptorien agonisteilla ja antagonistilla viittaa siihen, että ventraalisen pallidumin opioidireseptoreilla, erityisesti μ -opioidireseptoreilla on merkitystä etanolin juomisen säätelyssä (Kemppainen ym. 2012b).

Monien riippuvuutta aiheuttavien aineiden, esimerkiksi etanolin, kokaiinin ja morfiinin on havaittu laskevan GABA:n pitoisuutta ja nostavan enkefaliinin pitoisuutta ventraalisessa pallidumissa (Olive ja Maidment 1998; Tang ym. 2005; Kupchik ym. 2014; Kemppainen ym. 2015). Lisäksi GABAa-antagonistin on havaittu lisäävän etanolin juomista (Kemppainen ym. 2012a). Edellä esitellyissä tutkimuksissa yhdisteet ovat saattaneet johtaa ventraaliseen pallidumiin johtavien inhibitoristen GABAergisten haarakesolujen estoon ja ventraalisen pallidumin aktivoitumiseen. Ventraalisen pallidumin inhibition, leesioilla, GABA-agonisteilla tai μ -opioidireseptoriagonisteilla, on havaittu vähentävän lääkeaineiden ja etanolin itseannostelua ja ruuasta saatavaa mielihyvää (McFarland ja Kalivas 2001; Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen ym. 2012b; Ho ja Berridge 2014). Ventraalisen pallidumin aktivaation onkin havaittu olevan tärkeässä asemassa palkitsemisvaikutusten välittämisessä ja sen inhibition on havaittu vähentävän palkitsemisvaikutuksia (Smith ym. 2009). Tässä tutkimuksessa ventraaliseen pallidumiin aiheutettiin paikallinen inhibitio μ -opioidireseptorien ylimäärällä ja odotuksena oli, että etanolin juominen olisi vähentynyt, mitä ei kuitenkaan havaittu.

Opioidergisen järjestelmän tärkeä rooli etanolin juomisessa on osoitettu useissa tutkimuksissa (Herz 1997; Parkes ja Sinclair 2000; Gianoulakis 2004; Trigo ym. 2010). Ventraalisessa pallidumissa on kaikkia kolmea opioidireseptorityyppiä, mutta tutkimukset viittaavat μ -opioidireseptorien merkittävään asemaan ventraalisessa pallidumissa (Mitrovic ja Napier 1995; Kemppainen ym. 2012b). Paikallisesti ventraaliseen pallidumiin annosteltujen μ -opioidireseptoriagonistien on havaittu vähentävän etanolin juomista annosriippuvaisesti, ja μ -opioidireseptoriantagonistin lisäävän etanolin juomista (Kemppainen ym. 2012b). Muiden opioidireseptorien

agonistien tai antagonistien ei ole havaittu aiheuttavan muutoksia etanolin juomiseen. Tässä tutkimuksessa ventraalisen pallidumin inhibitio, joka aikaansaatiiin μ -opioidireseptoreja yli-ilmentämällä, ei kuitenkaan vähentänyt etanolin juomista. Opioidireseptorit ovat solutasolla inhibitorisia, mutta laajoissa hermoverkoissa nettovaikutus voi olla päinvastainen, mikä on voinut aiheuttaa sen, että rottien etanolin juomisessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja (Law ym. 2000).

Palkitsemisvaikutukset saattavat välittyä myös toiseen suuntaan palkitsemisradalla eli niin kutsutusta palkitsemisradan päätepisteestä, ventraalisesta pallidumista, accumbens-tumakkeeseen ja muihin palkitsemisrataan liittyviin alueisiin (Zahm 2000; Smith ym. 2009). Ventraalinen pallidumi on palkitsemisradan päätepiste, joten toiset aivoalueet ja aikaisemmat projektiot palkitsemisradalla, saattavat pystyä kumoamaan virusvektorikäsittelyllä aikaansaadun inhibitorisen vaikutuksen. Esimerkiksi ventraalisen pallidumin lähettämät GABAergiset haarakesolut accumbens-tumakkeeseen saattavat säädellä palautevaikutuksen kautta accumbens-tumakkeen aktiivisuutta ja accumbens-tumakkeen lähettämiä haarakesoluja ventraaliseen pallidumiin, ja aiheuttaa ventraalisen pallidumin aktivoitumisen kumoten virusvektoreilla aiheutetun inhibition (Zahm 2000; Wise 2002; Kalivas ja Volkow 2005; Smith ym. 2009).

Tutkimuksessa käytetyt ventraalisen pallidumin koordinaatit oli valittu aikaisemman ventraalisen pallidumin roolia etanolin juomisessa tutkineen tutkimuksen mukaan (Kemppainen ym. 2012b). Accumbens-tumakkeessa ja ventraalisessa pallidumissa on alueita, joihin paikallisesti vaikuttamalla on saatu erilaisia tutkimustuloksia palkitsemistutkimuksissa (Smith ja Berridge 2007; Ho ja Berridge 2014). Ventraalisessa pallidumissa on havaittu, erityisesti syömiseen keskittyvissä tutkimuksissa, kohtia, joihin vaikuttaminen aiheuttaa erityyppisiä palkitsemiseen liittyviä vasteita: liking, eli pitämistä ja wanting, eli haluamista (Smith ja Berridge 2007). Etanolin suhteen ei vielä tiedetä onko näillä hotspoteilla merkitys etanolin juomisessa.

Tutkimuksessa oli mukana kaksi kontrolliryhmää AAV-GFP-ryhmä ja vehikkeliryhmä, koska haluttiin nähdä aiheuttaako pelkkä virusvektori (AAV-) muutoksia etanolin

juomiseen. Vehikkeli kontrollina havainnoi, aiheuttaako pelkkä stereotaktinen leikkaus ja ventraalisen pallidumin leesio muutoksia etanolin juomiseen. Infuusion aiheuttamia kudოსvaurioita pyrittiin minimoimaan käyttämällä mahdollisimman ohutta neulaa. Rottien juominen laski stereotaktisten leikkausten jälkeen, mutta se tapahtui samalla tavalla kaikilla ryhmillä, mikä saattaa viitata siihen, että ventraalisen pallidumin leesio saattaisi vaikuttaa etanolin juomiseen. Juomisen lasku stereotaktisten leikkausten jälkeen saattaa johtua myös normaalista leikkauksen jälkeisestä toipumisesta. Pelkän virusvektorin infusointi ei aiheuttanut muutoksia etanolin juomiseen verrattaessa muihin käsittelyryhmiin.

Varsinaisten etanolin juomiskokeiden jälkeen rotille annosteltiin systeemisesti opioidireseptoriantagonistia, naltreksonia, ja opioidireseptoriagonistia, morfiinia, jotta nähtäisiin aiheuttaako ventraalisen pallidumin paikallinen inhibitio muutoksia lääkeaineiden tunnettuihin vasteisiin etanolin juomisessa. Naltreksoni vähensi ja morfiini lisäsi etanolin juomista kaikissa käsittelyryhmissä niin kuin niiden on aikaisemmissa kokeissa havaittu tekevän (Gonzales ja Weis 1998; Parkes ja Sinclair 2000; Ojanen ym. 2006).

Tässä tutkimuksessa systeemisesti annostellun naltreksonin 0,1 mg/kg:n annos laski etanolin juomista kaikilla ryhmillä, mutta vain AAV-MOR-ryhmällä etanolin juomisen lasku verrattuna ryhmän fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiseen etanolin juomiseen oli tilastollisesti merkitsevää. Tilastollisesti merkitsevä ero havaittiin 0,1 mg/kg:n annoksella myös AAV-GFP-virusvektoreita saaneiden ja AAV-MOR-virusvektoreita saaneiden ryhmien välillä, kun verrattiin eri ryhmien välistä etanolin juomista suhteutettuna kontrolliin. AAV-MOR-ryhmän juominen laski enemmän kuin AAV-GFP-ryhmällä. Myös 0,3 mg/kg:n annos laski kaikilla ryhmillä etanolin juomista, mutta ryhmien välillä etanolin juomisessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja. 0,3 mg/kg:n annos saattoi olla liian suuri erottamaan ryhmien erilaista herkkyyttä naltreksonin vaikutukselle. 0,1 mg/kg:n annos oli kynnysarvo, jolla havaittiin ryhmien välinen ero.

Naltreksonin vaikutuksen on spekuloitu välittyvän opioidergisen ja dopaminergisen järjestelmän kautta (King ym. 1997; Koistinen ym. 2001). Aikaisemmassa tutkimuksessa, jossa annosteltiin naltreksonia paikallisesti ventraaliseen pallidumiin, ei havaittu muutoksia etanolin juomisessa, mikä viittasi siihen, että ventraalinen pallidumi ei ole osallisena naltreksonin vaikutusten välittämisessä (Kemppainen ym. 2012b). Tämä tutkimus antoi kuitenkin viitteitä siitä, että naltreksonin vaikutus liittyy ainakin osittain ventraaliseen pallidumiin ja sen μ -opioidireseptoreihin. Tuloksista voidaan päätellä, että AAV-MOR-virusvektoria saanut ryhmä oli herkempi naltreksonin vaikutukselle kuin kontrolliryhmät. Tässä tutkimuksessa saatu tulos voidaan selittää esimerkiksi tällä tavoin; kun ventraalisessa pallidumissa on enemmän μ -opioidireseptoreita, naltreksoni voi sitoutua niihin, ja estää inhibitorisia μ -opioidireseptoreja, jolloin ventraalinen pallidumi aktivoituu. Rotilla, joilla oli enemmän μ -opioidireseptoreita, ventraalinen pallidum aktivoituu helpommin, eikä rottien tarvitse juoda yhtä paljon etanolia saadakseen saman palkitsemisvaikutuksen.

Morfiinin annostelu lisäsi etanolin juomista kaikilla ryhmillä, mutta morfiinin annostelu ei aiheuttanut tilastollisesti merkitseviä eroja eri koeryhmien välillä etanolin juomisessa. Morfiinin aiheuttama herkistymisvaikutus on tyypillistä etanolin juomiskokeissa, mutta tässä tutkimuksessa sitä ei yllättäen havaittu millään käsittelyryhmällä (Ojanen ym. 2006). Morfiinin on havaittu aikaisemmissa tutkimuksissa lisäävän lokomotoriikkaa, mutta tässä tutkimuksessa ei havainnoitu sitä (Ojanen ym. 2003). Lisääntynyt lokomotoriikka voi aiheuttaa muutoksia etanolin juomiseen. Ventraalisen pallidumin paikallisen eston ei havaittu aiheuttavan muutoksia systeemisesti annostellun agonistin tunnettuun vaikutukseen etanolin juomisessa.

Immunohistokemialliset värjäykset viittasivat siihen, että virusvektorit onnistuivat ohjaamaan niihin liitettyjen geenien koodaamat proteiinit tuotantoon ja nämä tuotetut proteiinit olivat lokalisoituneet tavoitteen mukaisesti hermosoluihin eivätkä gliasoluihin. μ -Opioidireseptorit haluttiin hermosoluihin, koska rotan keskushermoston endogeenisista opioidireseptoreista suurin osa sijaitsee hermosoluissa, vain muutama prosentti sijaitsee gliasoluissa (Cheng ym. 1997). Tutkimuksessa tehdyn kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion perusteella virusvektori tuotti halutun proteiinin lähetti-

RNA:ta. Sitä, onnistuiko AAV-MOR-virusvektorin avulla liitetty geeni, tuottamaan toimivaa μ -opioidireseptoria ei kuitenkaan voida varmasti sanoa näillä tutkimuksilla. Virusvektorin avulla aikaansaatu yli-ilmentyneiden μ -opioidireseptorien toiminta tulisi osoittaa molekyyelifarmakologisin keinoin. Joskus virusvektori ei onnistu tuottamaan siihen liitetyn geenin koodaamaa proteiinia, koska elimistö hyökkää virusvektoria vastaan immunologisin keinoin tunnistessaan sen elimistölle vieraaksi proteiiniksi (Kafri ym. 1998).

Tutkimuksen koeasetelma oli onnistunut, vaikka tilastollisesti merkitsevät erot ilmenivät vain naltreksonin annostelun kohdalla. Rotat joivat etanolia riittävän määrän ja virusvektoreiden havaittiin toimivan. Naltreksoni ja morfiini vaikuttivat odotetulla tavalla rottien etanolin juomiseen. Tutkimuksen protokolla erosi hieman aikaisemmista etanolin juomiseen liittyvistä tutkimuksista, jotka oli tehty rotilla. Aikaisemmissa ventraaliseen pallidumiin keskittyvissä etanolin juomisen säätelyä havainnoivissa tutkimuksissa ventraalisen pallidumin reseptorien stimuloinnin tai inhiboinnin vaikutus on ollut akuutti, mutta tässä tutkimuksessa on kyse pidempiaikaisesta altistumisesta (Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen ym. 2012b). Useissa aikaisemmissa tutkimuksissa etanolin juomiskokeet on suoritettu valoisana aikana, tässä tutkimuksessa rottien pääsy juomaan oli ajoitettu pimeään ajan alkamiseen. Tässä tutkimuksessa rotat asuivat kolmistaan, mutta etanolin juomiskokeen alkaessa ne siirrettiin yksittäin juomishäkkeihin. Siirto ja yksittäin joutuminen saattoivat aiheuttaa stressiä, joka saattoi vaikuttaa etanolin juomiseen. Aikaisemmissa etanolin juomiskokeissa rotat asuivat yksin koko tutkimusajan (Ojanen ym. 2006; Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen ym. 2012b). Näissä tutkimuksissa rotat ovat saattaneet tottua yksin asumiseen ja siirrosta aiheutuvaa stressiä ei ole. Toisaalta yksin asuminen on rotille suuri stressitekijä, koska rotat ovat laumaeläimiä (Butler ym. 2014). Tutkimusten mukaan rotat juovat enemmän, jos ne ovat asuvat yksin, mikä johtuu nimenomaan yksinasumisen aiheuttamasta stressistä.

Ventraalisen pallidumin rooli etanolin palkitsemisvaikutusten välittämisessä ja juomisen säätelyssä on yhä epäselvä (Wise 2002; Smith ym. 2009; Kemppainen ym. 2012b). On havaittu, että ventraalinen pallidumi on hedoniseen vaikutukseen ja motivaatioon

liittyvän signaloinnin risteämiskohta aivoissa ja viimeinen palkitsemisjärjestelmään liittyvä rakenne (Smith ym. 2009). Ventraalisen pallidumin rooli palkitsemisradan viimeisenä rakenteena voi viitata ventraalisen pallidumin tärkeään asemaan palkitsemisradalla, minkä vuoksi sen roolia alkoholiriippuvuudessa ja etanolin palkitsemisvaikutusten välittämisessä on tärkeä tutkia jatkossakin. Ventraaliseen pallidumiin keskittyvä tutkimus voi osoittaa opioidergisen järjestelmän tärkeän roolin etanolin palkitsemisvaikutusten välittämisessä myös ilman dopaminergista järjestelmää (Smith ym. 2009; Fields ja Margolis 2015). Tässä ja aikaisemmissa ventraaliseen pallidumiin kohdistuvissa tutkimuksissa saatuja tuloksia voidaan tulevaisuudessa soveltaa ihmiseen, koska ventraalisen pallidumin roolin palkitsemisvaikutusten välittämisessä on havaittu olevan samankaltainen kuin jyrksijöillä (Miller ym. 2006; Vijayaraghavan ym. 2008; Smith ym. 2009). Tapaustutkimuksissa ventraalisen pallidumin leesio ihmisillä on aiheuttanut yleistä mielialan laskua ja lääkeaineriippuvuuksien häviämistä sekä etanolin juomisen vähentymistä (Miller ym. 2006; Vijayaraghavan ym. 2008).

Ventraalisen pallidumin merkitystä etanolin juomisessa voitaisiin tutkia jatkossa esimerkiksi tekemällä leesio ventraaliseen pallidumiin ja havainnoimalla sen aiheuttamaa muutosta etanolin juomiseen. Ruuan suhteen tämänkaltaisen tutkimus on tehty, ja siinä leesio ventraalisessa pallidumissa aiheutti syömisen vähentymistä (Ho ja Berridge 2014). Tutkimuksilla voitaisiin havainnoida, toimiiko palkitsemisjärjestelmä etanolin juomisessa normaalisti myös ilman viimeistä, motivaatioon liittyvää rakennetta. Tässä tutkimuksessa käytettiin AA-rottia niiden korkean vapaaehtoiset etanolin kuluttamisen takia. Ventraalisen pallidumin roolia voitaisiin tutkia myös jollakin toisella rottakannalla, koska AA-rotilla, joita tässä ja muissa ventraalisen pallidumin rooliin etanolin juomisessa keskittyvissä tutkimuksissa on käytetty, on havaittu olevan poikkeuksellinen endogeeninen opioidijärjestelmä verrattuna muihin rottakantoihin (De Waele ym. 1995; Hyytiä ja Kiianmaa 2001; Sommer ym. 2006; Kemppainen ym. 2012a; Kemppainen 2012b).

7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Etanolin vaikutusten on todettu välittyvän palkitsemisjärjestelmässä sekä dopaminergisia että opioidergisia ratoja pitkin. Ventraalinen pallidumi on palkitsemisradan viimeinen rakenne ja sen roolia palkitsemisvaikutusten välittämisessä ei tunneta tarkasti. Tässä tutkimuksessa ventraalisen pallidumin roolia etanolin juomisessa tutkittiin inhiboimalla sitä paikallisesti geenitekniikan keinoin aikaansaadulla μ -opioidireseptoriylimäärällä. Tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja etanolin juomisessa eri käsittelyryhmien välillä, vaikka virusvektorit havaittiin värjäysten ja qPCR-menetelmän perusteella toimiviksi ja koeasetelma onnistuneeksi.

Systeemisesti annosteltu naltreksoni vähensi etanolin juomista kaikilla ryhmillä ja systeemisesti annosteltu morfiini lisäsi etanolin juomista kaikilla ryhmillä. Naltreksonin 0,1 mg/kg:n annos vähensi tilastollisesti merkitsevästi vain AAV-MOR-ryhmän etanolin juomista ja aiheutti tilastollisesti merkitsevän eron AAV-MOR- ja AAV-GFP-ryhmien välillä etanolin juomisessa kun se oli suhteutettu fysiologisen suolaliuoksen annostelun jälkeiseen etanolin juomiseen. Tutkimustulos viittaa siihen, että ventraalisella pallidumilla ja sen μ -opioidireseptoreilla saattaa olla merkitystä naltreksonin vaikutusten välittämisessä. Ventraalisen pallidumin paikallinen inhibitio ei aiheuttanut muutoksia systeemisesti annosteltujen opioidireseptoriagonistien aikaisemmissa tutkimuksissa havaittuihin etanolin juomista sääteleviin vaikutuksiin.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu ventraalisen pallidumin ja erityisesti sen μ -opioidireseptorien osallistuvan etanolin juomisen säätelyyn. Tämän tutkimuksen tulokset eivät poissulje ventraalisen pallidumin olevan tärkeä osa palkitsemisjärjestelmää sekä olevan tärkeässä roolissa etanolin juomisen säätelyssä. Tulokset viittaavat ventraalisen pallidumin olevan tärkeässä osassa myös naltreksonin etanolin juomiseen kohdistuvien vaikutusten välittämisessä.

8 KIRJALLISUUSLUETTELO

Aguirre JC, del Arbol JL, Rico J, Raya J, Miranda MT: Classification of alcoholics on the basis of plasma β -endorphin concentration. *Alcohol* 12: 531–534, 1995

Akil H: 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

Alcohol: Global status report on alcohol and health 2014, World Health Organization, 2014

Alkoholiongelmaisen hoito (online). Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Päihdelääketieteen yhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2011 (viitattu 15.9.2015). Saatavilla Internetissä: www.käypähoito.fi

Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R: Distribution and targeting of a μ -opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 15: 3328–3341, 1995

Bals-Kubik R, Ableitner A, Herz A, Shippenberg TS: Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 489–495, 1993

Bechara A, Harrington F, Nader K, Van der Kooy D: Neurobiology of motivation: Double dissociation of two motivational mechanisms mediating opiate reward in drug-naïve versus drug-dependent animals. *Behav Neurosci* 106: 798–807, 1992

Berns G, McClure S, Pagnoni G, Montague P: Predictability modulates human brain response to reward. *Journal Of Neuroscience* 21: 2793–2798, 2001

Biala G, Kotlinska J: Blockade of the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Alcohol And Alcoholism* 34: 175–182, 1999

Blednov Y, Walker D, Alva H, Creech K, Findlay G, Harris R: GABAA receptor α 1 and β 2 subunit null mutant mice: behavioral responses to ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 854–863, 2003

Bodnar RJ: Endogenous opiates and behavior: 2013. *Peptides* 67–136, 2014

Boehm S, Ponomarev I, Jennings AW, Whiting PJ, Rosahl TW, Garrett EM, Blednov YA, Harris RA: γ -Aminobutyric acid A receptor subunit mutant mice: New perspectives on alcohol actions. *Biochem Pharmacol* 68: 1581–1602, 2004

Bramham CR, Messaoudi E: BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76: 99–125, 2005

Butler TR, Ariwodola OJ, Weiner JL: The impact of social isolation on HPA axis function, anxiety-like behaviors, and ethanol drinking. *Frontiers In Integrative Neuroscience* 7: 1–11, 2014

Chen F, Lawrence A: Effect of chronic ethanol and withdrawal on the μ -opioid receptor- and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-stimulated binding of [³⁵S]guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate in the fawn-hooded rat brain: A quantitative autoradiography study. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 159–165, 2000

Cheng P, Liu-Chen L, Pickel V: Dual ultrastructural immunocytochemical labeling of mu and delta opioid receptors in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *Brain Res* 778: 367–380, 1997

Cowen MS, Lawrence A: Alterations in Central Preproenkephalin mRNA Expression After Chronic Free-Choice Ethanol Consumption by Fawn-Hooded Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25: 1126–1133, 2001

De Waele JP, Kiianmaa K, Gianoulakis C: Distribution of the μ and δ 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

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 USA* 85: 5274–5278, 1988

Doyon WM, Howard EC, Shippenberg TS, Gonzales R: κ -opioid receptor modulation of accumbal dopamine concentration during operant ethanol self-administration. *Neuropharmacology* 51: 487–496, 2006

Emmerson P, Liu M, Woods J, Medzihradsky F: Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1630–1637, 1994

Erlich HA, Gelfand D, Sninsky J: Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643–1651, 1991

Fadda F, Rossetti Z: Chronic ethanol consumption: From neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 56: 385–431, 1998

Fields HL, Margolis EB: Understanding opioid reward. *Trends Neurosci* 38: 217–225, 2015

Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G: Neurosteroids, GABA_A receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 186: 267–280, 2006

Gass JT, Olive MF: Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75: 218–265, 2008

Gianoulakis C: Implications of endogenous opioids and dopamine in alcoholism: Human and basic science studies. *Alcohol And Alcoholism* 31: 33–42, 1996

Gianoulakis C: Endogenous Opioids and Addiction to Alcohol and other Drugs of Abuse. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4: 39–50, 2004

Goldstein A: Opioid peptides (endorphins) in pituitary and brain. *Psychoneuroendocrinology* 2: 11–16, 1977

Gonzales R, Weiss F: Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience* 18: 10663–10671, 1998

Guardia J, Caso C, Arias F, Gual A, Sanahuja J, Ramírez M, Mengual I, Gonzalvo B, Segura L, Trujols J, Casas M: A double-blind, placebo-controlled study of naltrexone in the treatment of alcohol-dependence disorder: results from a multicenter clinical trial. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 1381–1387, 2002

Guo R, Ren J: Alcohol and acetaldehyde in public health: From marvel to menace. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7: 1285–1301, 2010

Hegarty SV, Sullivan AM, O'Keefe GW: Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol* 379: 123–138, 2013

Herz A: Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)* 129: 99–111, 1997

Ho C, Berridge KC: Excessive disgust caused by brain lesions or temporary inactivations: Mapping hotspots of the nucleus accumbens and ventral pallidum. *Eur J Neurosci* 40: 3556–3572, 2014

Hodge CW, Samson HH, Chappelle AM: Alcohol self-administration: Further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 21: 1083–1091, 1997

Hungund B, Basavarajappa B: Distinct differences in the cannabinoid receptor binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption. *J Neurosci Res* 60: 122–128, 2000

Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577–580, 1981

Hyytiä P, Kiianmaa K: Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25: 25–33, 2001

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

Ikemoto S, McBride WJ, Murphy J, Lumeng L, Li T: 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. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research* 21: 1042–1046, 1997

Jamensky NT, Gianoulakis C: Content of dynorphins and k-opioid receptors in distinct brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 21: 1455–1464, 1997

Janak PH, Gill MT: Comparison of the effects of allopregnanolone with direct GABAergic agonists on ethanol self-administration with and without concurrently available sucrose. *Alcohol* 30: 1–7, 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. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 33: 1033–1043, 2009

Job MO, Tang A, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Bergeson SE, Gonzales R: Mu (μ) 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

Kafri T, Morgan D, Krah T, Sarvetnick N, Sherman L, Verma I: Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11377–11382, 1998

Kalivas PW, Volkow ND: The Neural Basis of Addiction: A Pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162: 1403–1413, 2005

Kemppainen H, Raivio N, Kiianmaa K: Role for ventral pallidal GABAergic mechanisms in the regulation of ethanol self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 223: 211–221, 2012a

Kemppainen H, Raivio N, Suo-Yrjö V, Kiianmaa K: Opioidergic modulation of ethanol self-administration in the ventral pallidum. *Alcohol Clin Exp Res* 36: 286–292, 2012b

Kemppainen H, Nurmi H, Raivio N, Kiianmaa K: Enhanced extracellular glutamate and dopamine in the ventral pallidum of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats after morphine. *Frontiers in Psychiatry* 6: 1–8, 2015

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

King AC, Volpicelli JR, Frazer A, O'Brien CP: Effect of naltrexone on subjective alcohol response in subjects at high and low risk for future alcohol dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 129: 15–22, 1997

Kitchen I, Slowe SJ, Matthes HWD, Kieffer BL: Quantitative autoradiographic mapping of μ -, δ - and κ -opioid receptors in knockout mice lacking the μ -opioid receptor gene. *Brain Res* 778: 73–88, 1997

Kohl RR, Katner JS, Chernet E, McBride W: Ethanol and negative feedback regulation of mesolimbic dopamine release in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 139: 79–85, 1998

Koistinen M, Tuomainen P, Hyytiä P, Kiianmaa K: Naltrexone suppresses ethanol intake in 6-hydroxydopamine-treated rats. *Alcoholism: clinical and experimental research* 25: 1605–1612, 2001

Koob GF: A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochem Pharmacol* 68: 1515–1525, 2004

Koob GF: Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. *Frontiers in Psychiatry* 4: 1–18, 2013

Koob G, Roberts A, Schulteis G, Parsons L, Heyser C, Hyytia P, Merlo-Pich E, Weiss F: Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research* 22: 3–9, 1998

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

Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, Helfand RS, Morrow AL: The role of GABA_A receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* 205: 529–564, 2009

Kupchik YM, Scofield MD, Rice KC, Kejun C, Roques BP, Kalivas PW: Cocaine Dysregulates Opioid Gating of GABA Neurotransmission in the Ventral Pallidum. *Journal of Neuroscience* 34: 1057–1066, 2014

Lam M, Marinelli P, Bai L, Gianoulakis C: Effects of acute ethanol on opioid peptide release in the central amygdala: an in vivo microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)* 201: 261–271, 2008

Law P, Wong Y, Lih H: Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 389–430, 2000

Leggio L, Garbutt J, Addolorato G: Effectiveness and Safety of Baclofen in the Treatment of Alcohol Dependent Patients. *CNS and Neurological Disorders* 9: 33–44, 2010

Lindholm S, Ploj K, Franck J, Nylander I: Repeated ethanol administration induces short- and long-term changes in enkephalin and dynorphin tissue concentrations in rat brain. *Alcohol* 22: 165–171, 2000

Lindholm S, Werme M, Brené S, Franck J: The selective κ -opioid receptor agonist U50,488H attenuates voluntary ethanol intake in the rat. *Behav Brain Res* 120: 137–146, 2001

Logrip M, Janak P, Ron D: Blockade of ethanol reward by the kappa opioid receptor agonist U50,488H. *Alcohol* 43: 359–365, 2009

Lovinger DM: 5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. *Neurochem Int* 35: 125–30, 1999

Mann K, Kiefer F, Spanagel R, Littleton J: Acamprosate: Recent Findings and Future Research Directions. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 32: 1105–1110, 2008

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

Mason B, Salvato F, Williams L, Ritvo E, Cutler R: A double-blind, placebo-controlled study of oral nalmefene for alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 56: 719–724, 1999

McCown T, Xiao X, Breese G, Samulski R: Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res* 713: 99–107, 1996

McFarland K, Kalivas PW: The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *Journal Of Neuroscience* 21: 8655–8663, 2001

Merten O, Geny-Fiamma C, Douar AM: Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* 12: 51–56, 2005

Meyer PJ, Phillips T: Sensitivity to ketamine, alone or in combination with ethanol, is altered in mice selectively bred for sensitivity to ethanol's locomotor effects. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 27: 1701–1709, 2003

- Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenplat EP, Harris RA, Harrison NL: Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA_A and glycine receptors. *Nature* 389: 385–389, 1997
- Miller JM, Vorel SR, Tranguch AJ, Kenny ET, Mazzoni P, Van Gorp WG, Kieber HD: Anhedonia after a selective bilateral lesion of the globus pallidus. *Am J Psychiatry* 163: 786–788, 2006
- Mitrovic I, Napier TC: Electrophysiological demonstration of μ , δ and κ opioid receptors in the ventral pallidum. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 1260–70, 1995
- Moriguchi S, Zhao X, Marszalec W, Yeh JZ, Narahashi T: Effects of ethanol on excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat cortical neurons. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 31: 89–99, 2007
- Nader K, Van der Kooy D: Deprivation state switches the neurobiological substrates mediating opiate reward in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience* 17: 383–390, 1997
- Napier TC, Mitrovic I: Opioid modulation of ventral pallidal inputs. *Advancing From The Ventral Striatum To The Extended Amygdala* 877: 176–201, 1999
- Nestler EJ: Transcriptional mechanisms of addiction: role of FosB. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences* 363: 3245–3255, 2008
- Ojanen S, Koistinen M, Backstrom P, Kankaanpaa 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
- Ojanen SP, Hyytiä P, Kiianmaa K: Enhanced morphine-induced ethanol drinking in alcohol-preferring alko alcohol rats sensitized to morphine. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 30: 621–629, 2006
- Ojanen SP, Palmen M, Hyytiä P, Kiianmaa K: Extracellular glutamate and GABA in the ventral tegmental area of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats treated repeatedly with morphine. *Eur J Pharmacol* 559: 38–45, 2007
- Olds J, Milner P: Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47: 419–427, 1954
- Olive MF, Maidment NT: Opioid regulation of pallidal enkephalin release: Bimodal effects of locally administered μ and δ opioid agonists in freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 1310–1316, 1998

Olive M, Anton B, Micevych P, Evans C, Maidment N: Presynaptic versus postsynaptic localization of mu and delta opioid receptors in dorsal and ventral striatopallidal pathways. *Journal of Neuroscience* 17: 7471–7479, 1997

O'Malley SS: Opioid antagonists in the treatment of alcohol dependence: Clinical efficacy and prevention of relapse. *Alcohol And Alcoholism* 31: 77–81, 1996

Oslin DW, Leong SH, Lynch KG, Berrettini W, O'Brien CP, Gordon AJ, Rukstalis M: Naltrexone vs placebo for the treatment of alcohol dependence: A randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry* 72: 430–437, 2015

Panchuk-Voloshina N, Haugland R, Bishop-Stewart J, Bhalgat M, Millard P, Mao F, Leung W: Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry* 47: 1179–1188, 1999

Parkes H, Sinclair JD: Reduction of alcohol drinking and upregulation of opioid receptors by oral naltrexone in AA rats. *Alcohol* 21: 215–221, 2000

Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7. painos. Academic Press, San Diego, 2008

Peoples RW: Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 185–201, 1996

Petrakis IL, Limoncelli D, Gueorguieva R, Jatlow P, Boutros NN, Trevisan L, Gelernter J, Krystal JH: Altered NMDA glutamate receptor antagonist response in individuals with a family vulnerability to alcoholism. *Am J Psychiatry* 161: 1776–1782, 2004

Pontieri F, Tanda G, Di Chiara G: Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12304–12308, 1995

Przewlocka B, Turchan J, Lason W, Przewlocki R: Ethanol withdrawal enhances the prodynorphin system activity in the rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 238: 13–16, 1997

Quertemont E, Eriksson CJP, Zimatkin SM, Pronko PS, Diana M, Pisano M, Rodd ZA, Bell RR, Ward RJ: Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 29: 1514–1521, 2005

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 β -endorphin in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 64: 989–997, 2008

Rasmussen DD, Bryant CA, Boldt BM, Colasurdo EA, Levin N, Wilkinson CW: Acute alcohol effects on opiomelanocortinergic regulation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 22: 789–801, 1998

Roberts AJ, McDonald JS, Heyser CJ, Kieffer BL, Matthes HWD, Koob GF, Gold LH: μ -Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 1002–1008, 2000

Robinson TE, Kolb B: Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 33–46, 2004

Russell R, McBride WJ, Lumeng L, Li T, Murphy J: Apomorphine and 7-OH DPAT reduce ethanol intake of P and HAD rats. *Alcohol* 13: 515–519, 1996

Russo SJ, Nestler EJ: The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 14: 609–25, 2013

Saland LC, Abeyta A, Frausto S, Raymond-Stintz M, Hastings C, Carta M, Valenzuela C, Savage D: Chronic ethanol consumption reduces δ - and μ -opioid receptor-stimulated G-protein coupling in rat brain. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research* 28: 98–104, 2004

Samson HH, Tolliver GA, Haraguchi M, Hodge CW: Alcohol self-administration: Role of mesolimbic dopamine. *The neurobiology of drug and alcohol addiction* 654: 242–253, 1992

Shelton K, Balster R: Effects of gamma-aminobutyric acid agonists and n-methyl-D-aspartate antagonists on a multiple schedule of ethanol and saccharin self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 1250–1260, 1997

Shoemaker WJ, Vavrousek-Jakuba E, Arons CD, Kwok F: The acquisition and maintenance of voluntary ethanol drinking in the rat: effects of dopaminergic lesions and naloxone. *Behav Brain Res* 137: 139–148, 2002

Smith KS, Berridge KC: Opioid Limbic Circuit for Reward: Interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *Journal of Neuroscience* 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

Soini SL, Hyytiä P, Korpi ER: Brain regional μ -opioid receptor function in rat lines selected for differences in alcohol preference. *Eur J Pharmacol* 448: 157–163, 2002

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

Soyka M, Lieb M: Recent Developments in pharmacotherapy of alcoholism. *Pharmacopsychiatry* 48: 123–135, 2015

Spanagel R: Alcoholism: A systems approach from Molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89: 649–705, 2009

Spanagel R, Weiss F: The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 22: 521–527, 1999

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

Spanagel R, Siegmund S, Cowen M, Schroff K, Schumann G, Fiserova M, Sillaber I, Wellek S, Singer M, Putzke J: The neuronal nitric oxide synthase gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol. *Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience* 22: 8676–8683, 2002

Suzdak PD: Ethanol stimulates gamma-aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneurosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4071–4075, 1986

Swanson L: Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res* 886: 113–164, 2000

Tang X, McFarland K, Cagle S, Kalivas PW: Cocaine-Induced Reinstatement Requires Endogenous Stimulation of μ -Opioid Receptors in the Ventral Pallidum. *Journal of Neuroscience* 25: 4512–4520, 2005

Trigo JM, Martin-García E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R: The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend* 108: 183–194, 2010

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

Vijayaraghavan L, Vaidya J, Humphreys C, Beglinger L, Paradiso S: Emotional and motivational changes after bilateral lesions of the globus pallidus. *Neuropsychology* 22: 412–418, 2008

Volkow ND, Fowler JS, Wang G, Swanson JM: Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications (Feature Review). *Mol Psychiatry* 9: 557–569, 2004

Wackernah R, Minnick M, Clapp P: Alcohol use disorder: pathophysiology, effects, and pharmacologic options for treatment. *Substance Abuse and Rehabilitation* 2014: 1–12, 2014

Walker BM, Koob GF: Pharmacological evidence for a motivational role of κ -opioid systems in ethanol dependence. *Neuropsychopharmacology* 33: 643–652, 2007

Wise RA: Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51: 13–22, 1998

Wise RA: Brain Reward Circuitry: Insights from unsensed incentives. *Neuron* 36: 229–240, 2002

Wise RA, Rompre PP: Brain dopamine and reward. *Annual review of psychology* 40: 191–225, 1989

Xuei X, Dick D, Flury-Wetherill L, Tian H, Agrawal A, Bierut L, Goate A, Bucholz K, Schuckit M, Nurnberger J, Tischfield J, Kuperman S, Porjesz B, Begleiter H, Foroud T, Edenberg H: Association of the κ -opioid system with alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 11: 1016–1024, 2006

Xuei X, Flury-Wetherill L, Bierut L, Dick D, Nurnberger J, Foroud T, Edenberg H: The opioid system in alcohol and drug dependence: Family-based association study. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 144b: 877–884, 2007

Zahm D: An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 85–105, 2000

Zalewska-Kaszubska J, Gorska D, Dyr W, Czarnecka E: Voluntary alcohol consumption and plasma beta-endorphin levels in alcohol-preferring rats chronically treated with naltrexone. *Physiol Behav* 93: 1005–1010, 2008

Zhang H, Luo X, Kranzler HR, Lappalainen J, Yang B, Krupitsky E, Zvartau E, Gelernter J: Association between two μ -opioid receptor gene (OPRM1) haplotype blocks and drug or alcohol dependence. *Hum Mol Genet* 15: 807–819, 2006

Zhang H, Kranzler HR, Weiss RD, Luo X, Brady KT, Anton RF, Farrer LA, Gelernter J: Pro-opiomelanocortin gene variation related to alcohol or drug dependence: evidence and replications across family- and population-based studies. *Biol Psychiatry* 66: 128–36, 2009