

1. Cel naukowy projektu

Oslabienie powstałych asocjacji pamięciowych środowisko-substancja uzależniająca (tzw. „pamięć o narkotyku”) leży u podstaw potencjalnej farmakoterapii uzależnienia, tym niemniej brakuje dowodów empirycznych wyjaśniających molekularne mechanizmy jak i sekwencje wydarzeń komórkowych zachodzących w okresie abstynencji. Wygaszanie jakiegokolwiek zachowania lub nabytej reakcji warunkowej jest procesem nowej i aktywnej nauki, a liczne dowody wskazują na to, że glutaminianergiczne receptory NMDA należą do kluczowych elementów powyższych procesów. Celem projektu jest weryfikacja hipotezy, że molekularne mechanizmy związane z receptorami NMDA w okresie abstynencji kokainowej mogą być krytycznymi markerami kontroli szybkości i siły zachowania poszukiwawczego i nawrotu do nałogu.

W tym celu u szczurów będziemy badać strukturę i mechanizmy funkcjonalne *ex vivo* podjednostek receptorów NMDA i ich interakcje z białkami rusztowania komórkowego (ang. scaffolding proteins) w różnych strukturach mózgu w okresie wymuszonej abstynencji kokainowej u zwierząt, które wcześniej aktywnie pobierały substancję uzależniającą. Jeśli w trakcie prowadzonych badań okaże się, że powstałe zmiany w obrębie receptorów NMDA nasilają głód narkotykowy i zwikszą szybkość nawrotu do nałogu, w dalszym etapie badań ujęmy narząd „*in vivo*”, aby odwrócić powstałe zaburzenia. W badaniach „*in vivo*” zostaną zastosowane nowe, penetrujące przez błony komórkowe peptydy (które kontrolują asocjacje podjednostka receptora NMDA-białko rusztowania komórkowego) oraz wektory wirusowe (które zmieniają skład podjednostek receptora NMDA).

Innymi słowami zamierzamy poznać na poziomie komórkowym i molekularnym mechanizmy zachodzące podczas abstynencji kokainowej, wyjaśnić zjawiska odpowiedzialne za nawroty po okresach abstynencji oraz możliwości wykorzystania zdobytej wiedzy w farmakoterapii uzależnienia.

2. Jakie badania będą realizowane

W Katedrze Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UJ CM we współpracy z Pracownią Farmakologii Uzależnienia Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie zamierzamy badać różne zmiany neuroadaptacyjne w obrębie receptora NMDA zachodzące u zwierząt pod wpływem kokainy. W badaniach zostaną wykorzystane najlepsze procedury behawioralne wykorzystywane w badaniach nad uzależnieniami oraz technologicznie zaawansowane analizy molekularne. Behawioralny model dołnego samopodawania kokainy u szczurów doskonale odzwierciedla cykl wejścia w nałóg, od momentu okazjonalnego użycia substancji psychoaktywnej, poprzez przymus jej pobierania oraz utratę kontroli nad zachowaniem i nawroty do nałogu. W modelu tym zwierzęta są trenowane do naciskania na dźwignię zlokalizowaną w klatce do wiadczałnej. Naciśnięcie na dźwignię powoduje uruchomienie pompy infuzyjnej i dożylną iniekcję kokainy, której towarzyszy mogą być sygnały jej dostępu (bodce warunkowe). U tak wygenerowanych szczurów, wymuszona abstynencja kokainowa prowadzona będzie w różnych warunkach eksperymentalnych (izolacja społeczna, wzbogacone środowisko, wygaszanie reakcji instrumentalnej w klatkach do samopodawania kokainy), które odmiennie indukują zachowanie poszukiwawcze i nawrót do nałogu; te ostatnie reakcje zachodzą pod wpływem substancji uzależniającej, bodca warunkowego kojarzonego z jej samopodawaniem lub są wyzwalane przez czynnik stresogeny.

Modyfikacja powyższego modelu (tzw. procedura sprężenia), polegająca na łczeniu kałdego szczura aktywnie pobierającego kokainę z szczurem, który biernie otrzymuje tę substancję uzależniającą lub sól fizjologiczną, umożliwia wytworzenie odpowiednich grup kontrolnych.

W dalszych analizach przedklinicznych u zwierząt poddanych uprzednio procedurze samopodawania kokainy i różnym okresom odstawienia zostaną wykonane analizy molekularne w grzbiętowym przokowiu, korze przedczołowej, hipokampie oraz boczno podstawnej części migdałowatego; te struktury mózgu zaangażowane są w regulację zachowań poszukiwawczych i nawrotów do nałogu. Analizy molekularne mają za cel określenie współwystępowania białek receptora NMDA i białek rusztowania komórkowego (procedura ko-immunoprecypitacji), określenie składu oraz ekspresji białek receptorów NMDA w postsynaptycznej i pozasynaptycznej frakcji (analizy TIF i Western blot) oraz określenie mobilności komórkowej receptorów NMDA i białek rusztowania komórkowego (wizualizacja krzywe z BS3). Celem odwrócenia zmian molekularnych w receptorze NMDA pod wpływem wymuszonej abstynencji kokainowej prowadzonej w różnych warunkach będziemy stosować wektory wirusowe oraz nowe peptydy penetrujące przez błony komórkowe. Te same związki i ich specyficzność będą badane w zwierzęcych modelach do oceny zachowania poszukiwawczego i nawrotu do nałogu.

3. Powody podjęcia tematu badawczego

Uzależnienie to poważna choroba układu nerwowego, która zagraża zdrowiu a nawet życiu ludzi. Charakteryzuje się ona niekontrolowanym dążeniem do pobrania i użycia substancji uzależniającej (przymus), głodem narkotykowym przy braku substancji uzależniającej oraz nawrotami, które pojawiają się nawet po długim okresie abstynencji. Dużym zagrożeniem ze strony tej wyniszczającej cały organizm choroby skłania badaczy do poszukiwania skutecznych metod farmakoterapii uzależnienia od psychoaktywnych substancji; wiele badań naukowych koncentruje się także na wyjaśnieniu neurobiologicznych podstaw powstawania uzależnienia. Spośród substancji psychoaktywnych, kokaina obdarzona jest wysokim potencjałem uzależniającym. Jej użycie w ostatnich 5 latach niepokojaco wzrosło na kontynencie europejskim i w Polsce, a uzależnienie od kokainy stanowi wciąż nierozwiązany problem medyczny i społeczny na świecie.

U podstaw nawyku kokainowego leżą - obok zmian w funkcjonowaniu mezo limbicznego układu dopaminergicznego - deficyt metaboliczny w obrębie struktur kory mózgu prowadzący m.in. do zmiany oceny wartości nagrody (kokainy) i szansy na sukces po podjęciu wysiłku potrzebnego na jej zdobycie oraz zaburzenia w procesach zapamiętywania się i uczenia. Powstawanie pamięci może być opisane jako utrwalanie tzw. łańcuchów pamięciowych, polegające na wytwarzaniu i stabilizacji nowych połączeń między komórkami nerwowymi, natomiast utrata wspomnień jest zanikaniem części z nich. W ostatnich latach jedna z hipotez postuluje - jako mechanizm powstawania uzależnienia - zaburzenia procesów uczenia się. W wyniku takich zaburzeń dochodzi do wytworzenia silnego nawyku sterowanego asocjacyjnym bodźcem warunkowym (np. środowisko kojarzone z przyjmowaniem substancji uzależniającej)-reakcja (zachowanie poszukiwawcze substancji uzależniającej), i w modulacji powstałych asocjacji pamięciowych rozpatrywana jest potencjalna terapia uzależnienia.

Biorąc pod uwagę istotne zaangażowanie neurotransmisji glutaminianergicznej w kontroli plastyczności synaptycznej, procesów uczenia się i warunkowania, w ostatnich latach zwrócono uwagę na receptory glutaminianergiczne NMDA i ich udział w mechanizmach abstynencji i nawrotów do nałogów. Receptory NMDA nie są statycznymi elementami błony synaptycznej; utworzone z czterech podjednostek (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN3), występują w poło eniu synaptycznym lub pozasynaptycznym, tworzą kompleksy z innymi białkami (np. białka rusztowania komórkowego), podlegają różnym procesom (np. wbudowywanie do błony postsynaptycznej lub internalizacja) oraz – w zależności od składu podjednostkowego i lokalizacji – pełni odmienne funkcje fizjologiczne.

Badania przedkliniczne nad uzależnieniem od kokainy i innych psychoaktywnych nadużywanych substancji (podczas chronicznych podażów) wykazały rolę receptorów NMDA w efektach nagradzających, nawrotach do nałogu oraz w konsolidacji pamięci wytworzonej podczas asocjacji substancja uzależniająca-bodziec kontekstowy, natomiast badania molekularne ostatnich lat, w tym i te prowadzone przez nasz zespół, dostarczyły dowodów na zmiany w receptorach NMDA pod wpływem biernych (przez eksperymentatora) i motywacyjnych (w modelu samopodawania) iniekcji substancji uzależniającej. Dotychczasowe wyniki nie pozwalają jednak na stworzenie pełnego obrazu dotyczącego zaangażowania receptorów NMDA i ich podjednostek w fenomen uzależnienia od kokainy, w tym abstynencji kokainowej.

W projekcie zamierzamy wyjaśnić zmiany zachodzące podczas abstynencji kokainowej oraz odkryć nowe krytyczne markery zaangażowane w rozwój nałogu. Odpowiemy także na pytanie, czy peptydy penetrujące przez błony komórkowe, które kontrolują asocjacje podjednostka receptora NMDA-białko rusztowania komórkowego, mogą w przyszłości – na bazie analiz molekularnych i farmakologicznych – być podstawą nowoczesnej, racjonalnej farmakoterapii hamującej nałóg kokainowy. Ponieważ nadużywane psychoaktywne substancje, naturalne nagrody, patologiczne zachowania wytwarzają zmiany adaptacyjne w tych samych strukturach mózgu, otrzymane wyniki mogą przyczynić się do odkrycia nowych „ogólnych” terapeutycznych strategii uzależnienia i do wytyczenia nowego kierunku badań. Warto podkreślić, że uzależnienie od substancji psychoaktywnych jest przyczyną niebagatelnych szkód medycznych i społecznych oraz poważnych problemów natury ekonomicznej, a zatem wyniki uzyskane w tym projekcie – poprzez zainicjowanie badań nad nową terapią – mogą przyczynić się do zmniejszenia powyższych konsekwencji choroby.