

Viselkedési vizsgálatok a gesztációs-laktációs időszakban morfin-kezelt patkányon

SOBOR MELINDA^{1,2}, TIMÁR JÚLIA², RIBA PÁL², KIRÁLY KORNÉL P.², MAHMOUD AL-KHRASANI²,
GYARMATI ZSUZSANNA² ÉS FÜRST ZSUZSANNA^{2,3}

¹GYEMSZI-Országos Gyógyszerészeti Intézet, Budapest

²Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

³Neuropszichofarmakológiai Kutatócsoport, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest

Kísérleti állatokban az opioidok gátolják az utódgondozással kapcsolatos viselkedési formákat. A teljes gesztációs és a laktációs időszakban morfinnal kezelt patkány viselkedési változásait mindeddig nem vizsgálták szisztematikusan. **Célkitűzés:** Munkánk során a perinatális időszakban alkalmazott mérsékelt, állandó dóziszú, folyamatos morfin-kezelés patkányra gyakorolt viselkedési hatásait vizsgáltuk. **Módszerek:** Nullipara nőstény patkányokat a pároztatás napjától kezdve a napi egyszeri 10 mg/kg s.c morfinnal kezeltük. Megfigyeltük az anyaállatok utódgondozási tevékenységét, valamint vizsgáltuk, hogy az anyai viselkedésre milyen hatással van az akut morfin-kezelés, a morfin akut hatása antagonizálható-e naloxonnal. Regisztráltuk a naloxon precipitálta fizikális, illetve egyéb viselkedési (szorongás-szerű jelek emelt-keresztspalló teszten, változás a lokomotoros aktivitásban) elvonási tüneteket. Az elválasztás után a morfin megerősítő hatása iránti szenzitivitást kondicionált helypreferencia-, valamint a naloxon averzív hatását kondicionált helyaverzió teszten vizsgáltuk. A krónikus morfin-kezelés hatására a morfin antinociceptív hatásának változását tail-flick teszten mértük. **Eredmények:** A krónikus morfinkezelésben részesült anyaállatokon jelentős mértékben romlott az utódgondozási viselkedés. Az egyszeri 10 mg/kg s.c. morfin ebbéli hatása naponta legalább 2-3 óráig tartott, dóziszfüggést mutatott, és kifejezettebb volt a morfin-kezelt csoportban (szenzitivizáció). A naloxon csupán enyhe fizikális elvonási tüneteket precipitált, egyéb, viselkedési elvonási jeleket (szorongás-szerű viselkedés, hipolokomóció) nem tudtunk kimutatni. Helypreferencia-teszteken a morfin pozitív megerősítő hatása és a NX averzív hatása jelentősen fokozódott. Szignifikáns antinociceptív tolerancia nem volt kimutatható. **Következtetések:** Bár a humán droghasználati szokásokat nehéz modellezni kísérletes körülmények között, az általunk választott, a gesztáció és a laktáció ideje alatt folyamatosan, naponta egyszer adagolt, relatíve mérsékelt, konstans dóziszú morfinkezelés számos finom viselkedésbeli eltérést okoz az anyaállatokban. Az irodalomból közismert, hogy perinatálisan opioid-expozíciónak kitétt utódokban rövid és hosszú távú, káros viselkedési hatások lépnek fel; ebben nemcsak a morfin direkt farmakológiai hatásának, hanem az anyai gondozó szerep gyengülésének is szerepe lehet.

(*Neuropsychopharmacol Hung 2013; 15(4): 239-251*)

Kulcsszavak: anyai viselkedés, antinocicepció, dependencia, gesztáció, kondicionált helypreferencia, laktáció, megvonás, morfin, naloxon, patkány, perinatális

Az endogén opioidok fontos szabályozó szerepet játszanak a terhesség fenntartásában, a szülés megindításában, a laktáció és az utódgondozás beindulásában (Brunton & Russell 2008).

A gesztáció alatt az oxitocin-neuronok és a tubero-infundibularis dopaminerg neuronok opioidokat is

expresszálnak (enkefalinok, dinorfin), melyek gátolják az oxitocin-, illetve prolaktin-kiáramlást. A terhesség végén ez a hatás csökken, szülés után az emelkedett opioid tónus a terhesség előtti szintre esik vissza (Wardlaw & Frantz 1983; Brunton & Russell 2008); az oxitocin kiáramlik, prolaktin szabadul fel; előse-

gítve ezzel a szülés megindulását, optimális lefolyását és az azonnali anyai gondoskodás és a tejelválasztás beindulását (Merchenthaler et al. 1995, Leng et al. 1997, Andrews & Grattan 2002).

Számos tanulmány igazolja, hogy az opioidok gátlják az anyai/utódgondozási viselkedést, ez a gátlás opioid antagonistákkal ellensúlyozható (Bridges & Grimm 1982; Grimm & Bridges 1983; Hammer & Bridges 1987; Rosenblatt et al. 1988; Kinsley et al. 1993; Blass et al. 1995; Miranda-Paiva et al. 2001; Brunton & Russell 2008). Ezekben a kísérletekben az anyai viselkedés különféle paramétereit vizsgálták: például az utód fészekbe történő visszavitelét (Grimm & Bridges 1983; Miranda-Paiva et al. 2001; Yim, Miranda-Paiva et al. 2006), placentofágiát (Mayer et al. 1985), az utódgondozást és szoptatási pozíciókat (Rayner et al. 1988; Slamberová et al. 2001), a fészek minőségét (Rayner et al. 1988). Többszörös dózisu MO (PD2-8) az első és az utána következő négy napon gátolta az utódgondozási viselkedést; a MO-kezelés 6. és 7. napján azonban a kontroll és a MO-kezelt anyaállatok utódgondozása már nem különbözött (Rayner et al. 1988). Ezzel ellentétben leírták, hogy hosszú távú MO-kezelés (a közvetlenül a fogantatás előtt, majd a gesztáció, illetve a laktáció alatt adagolt) után a MO anyai viselkedést gátló hatásához szenzitizáció alakul ki (Miranda-Paiva et al. 2001; Yim et al. 2006). Az utódgondozási viselkedés gátlását figyelték meg akkor is, ha a MO-t csak a fialásig, késői gesztációs időszakban adagolták (Slamberová et al. 2001).

A μ -agonisták (DAGO, MO, β -endorfin) dózisfüggően rontják az anyai viselkedést. A szelektív μ -agonista DAGO e tekintetben sokkal potensebb, mint a MO és a β -endorfin. A δ -agonista DPDPE és az κ -agonista U50488H nem hatott az anyai viselkedésre (Mann et al. 1991). A κ -receptor szerepe ellentmondásos, bár leírták, hogy az akut, egyszeri dózisu κ -agonistával (U69593) végzett kezelés gátolja az anyai viselkedést (Teodorov et al. 2008).

Krónikus opioid-használat során a szer pozitív megerősítő hatása csökken, a negatív megerősítő hatás viszont kifejezettebb lesz: az elvonási tünetek elkerülése kerülhet előtérbe (negatív megerősítés), az opioid adagolása, habár rendszerint nagy dózisban, de állandóvá válik (Cheek et al. 1976; Sherman et al. 1989; Handelsman et al. 1992; Hutcheson et al. 2001; Hosztafi 2003); a krónikus opioid használat modellezésére ezért is választottuk a gesztáció és laktáció ideje alatt folyamatosan adagolt, konstans dózisu MO-kezelést. A következőket vizsgáltuk: Hogyan befolyásolja a MO-kezelés az anya utódgondozási viselkedését? Megváltozik-e a MO, illetve az antagonistá

naloxon (NX) anyai viselkedésre kifejtett hatása a MO-kezelés során? Kialakul-e mérhető dependencia (fizikális és/vagy pszichésjellegű) az anyaállatokban Megváltozik-e a MO antinociceptív hatása, azaz kimutatható-e tolerancia vagy szenzitizáció kialakulása?

MÓDSZEREK

Állatok

200-220 g-os Wistar nullipara nőtény patkányokat használtunk (Charles River, Budapest). A gesztáció 1 napja (GD1) az a nap, amikor a spermiumok a nőtény hüvelyváladékában kimutathatóak voltak. Az anyaállatok tömegét a teljes gesztáció és laktáció alatt heti egyszer mértük. GD1 naptól kezdve a nőtény állatokat külön ketrecben helyeztük el és két kezelési csoportba osztottuk őket. Egyik csoportot fiziológiás sóoldattal (SAL) kezeltünk, a másikat MO-nal; a MO-t az első két kezelési napon 5 mg/kg/nap, majd a továbbiakban naponta 10 mg/kg dózisban adagoltuk. A fialás időpontja az 1. posztpartum nap (PD1). A táplálékhoz és ivóvízhez szabadon hozzáfértek az állatok, állandó, 20-21 °C-os hőmérsékleten és állandó, 55±5% pártartalmú helyiségben tartottuk őket, szabályozott, standard 12-12 h világos/sötét ciklusokban (a világos időszak reggel 6 órakor kezdődött). A kísérleteket a Helsinki Egyezmény és a Semmelweis Egyetem kísérleti állatok felhasználására vonatkozó irányelvei alapján, az Állatkísérletes Etikai Bizottság engedélyével végeztük.

Anyagok

A morfin-hidrokloridot (ICN Magyarország Zrt., Tiszavasvári, Magyarország), a naloxont (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) fiziológiás sóoldatban oldottuk fel és 0.1 ml/100g mennyiségben s.c. adagoltuk.

Kísérleti módszerek

Az anyai viselkedési formákat (MB – maternal behaviour) Slamberová és Myers (Myers et al. 1989; Slamberová et al. 2001) módosított módszere szerint figyeltük meg, illetve mértük. Két órán keresztül, 5 percenként regisztráltuk az **anyai viselkedést (obszervált, „o”-MBo)**: aktív utódgondozás (aktív szoptatási pozíció vagy az utód tisztogatása), passzív utódgondozás, fészekgondozás; valamint a **nem anyai viselkedést (non-MBo)**: táplálék- és folyadékfelvétel, öntisztogatás/öngondozás, egyéb fészken kívüli tevé-

kenység, például kereső-kutató tevékenység, pihenés, alvás. Egy adott viselkedésformára „1” pontot adunk (teljes MBo-ra vagy non-MBo-ra tehát max. 24 pont). A megfigyelésen túl **visszaviteli tesztet (RT - retrieval test)** végeztünk: az utódok eltávolítása után 5 perc elteltével öt kölyköt visszahelyeztünk a ketrec fészekkel ellentétes sarkába. Mértük azt a latencia időt, mely alatt az anyaállat az első, illetve az ötödik kölyköt visszavitte a fészekbe (max. 1200 s-ig mértük).

Irodalmi adatok (Slamberová et al. 2001) és saját előzetes kísérleteink alapján az anyai viselkedési vizsgálatokat a fialás utáni első héten végeztük. Vizsgáltuk a MO akut utódgondozási viselkedést rontó hatásának időtartamát, a dózis-hatás összefüggést és a MO-érzékenység változását, a naloxon (NX) hatását az anyai viselkedésre, valamint a NX hatását a MO által gátolt anyai viselkedésre.

Dependencia vizsgálata

Fizikális elvonási tünetek

Az utolsó MO dózis után 24 órával, az elválasztás után az anyaállatokat a teszthelyiségbe szállítottuk, majd 60 perccel később 10 mg/kg NX-t kaptak s.c.. 10 perc elteltével a fizikális elvonási tüneteket Buckett módszere (Buckett, 1964) szerint pontoztuk: vonaglás (pontszám: 3), vokalizáció (squeling) és diarrhoea (mindegyik pontszáma: 2), hallható fogcsattogtatás, ptosis, „vizes kutya” testrázás (wet dog shake) (mind-egyik pontszáma 1) (max. pontszám: 10).

Lokomotoros aktivitás vizsgálata

MO-dependens patkányban a lokomotoros aktivitás csökkenése nem-szomatikus („pszichés”) viselkedési elvonási tünetnek tekinthető (Schulteis et al. 1994; Timar et al. 2005). Kísérletünkben az anyaállatok az utolsó kezelésük után 24 órával 10 mg/kg s.c. NX-t kaptak, majd 10 perc múlva a mérést habituáció nélkül, azonnal elkezdtük és 40 percig végeztük a „CONDUCTA” (Experimetria Kft., Budapest) mozgás-analizáló készülék segítségével. A három, egyenként 40x50x50 cm-es, fekete tesztkompartimentben a horizontális (ambuláció) és függőleges (ágaskodás) irányú mozgást és az azokkal eltöltött időt több sorban sűrűn elhelyezett infravörös diódák detektálják.

Emelt keresztpalló teszt (EPM)

A készülék két, egymásra merőleges keresztpallóból áll (kettő 50x15 cm-es kar nyitott, megvilágított, kettő pedig 40 cm magas fallal határolt zárt kar) amely a padlótól 70 cm-es magasságban helyezkedik el. A kísérleti állat viselkedését a tesztkörnyezetben a terep felderí-

tésének motiváló ereje és a világos, nyitott területek iránti averzió konfliktusa határozza meg (Schmitt & Hiemke 1998). Az EPM a szorongásoldók hatásának tesztelése mellett alkalmas opioid-dependens állatokon NX-precipitálta elvonási tünetek (szorongásos jelek) mérésére is (Avila et al. 2008; Zhang & Schulteis 2008). Kísérletünkben az elválasztás utáni napon az anyaállatok 10 mg/kg s.c. NX-t kaptak. Öt perc elteltével az alábbi paramétereket regisztráltuk 5 percen keresztül: a nyitott karba történő belépések száma, bármely karba történő belépések száma, valamint a nyitott karban eltöltött idő.

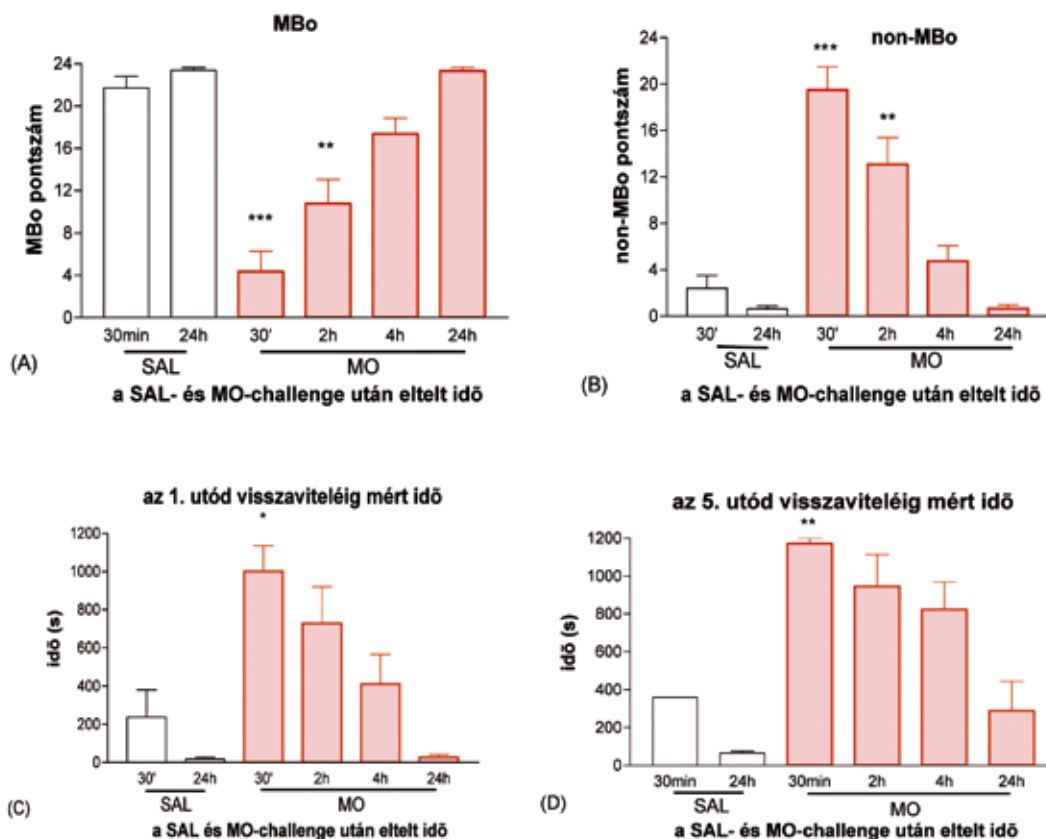
Kondicionált helypreferencia (CPP)

és -helyaverzió (CPA)

A CPP általánosan használt teszt a kísérleti szerek megerősítő hatásának és az abúzus iránti vulnerabilitásnak kimutatására (Carboni et al. 1989). Az izolált, sötét szobában elhelyezett készülék két azonos méretű (38 x 32 x 30 cm) dobozfélből áll (fehér falú-megvilágított, illetve szürke falú-sötét), melyek guillotine-ajtóval szeparálhatók. Az állatok szabad átjárás mellett a sötét kompartmentet preferálják. A kondicionálási periódus idején az állat zárt ajtó mellett SAL-injekció után 60 percre a szürke falú dobozfélbe kerül, majd 4 óra múlva MO adását követően újabb 60 percre a fehér falú, megvilágított dobozfélbe helyezük. CPA teszt esetén a SAL-nal párosított kompartment a világos, a NX-nal (averzív hatás) párosított pedig a sötét. A helypreferencia teszten a nem preferált (MO-nal párosított) világos dobozfélben (illetve a CPA-teszten a preferált (NX-nal párosított) sötétben) a kondicionálás után és előtt eltöltött időtartam-különbség (Ät) utal a helypreferencia megváltozására. Az anyaállatokon a CPP és CPA kísérletet az elválasztás utáni napon kezdtük, a CPP esetében a kondicionálást 3 mg/kg s.c. MO-nal, a CPA esetében 10 mg/kg s.c. NX-nal végeztük az utolsó MO- (vagy SAL-) adagjuk után 24 órával.

Antinociceptív teszt

A MO fájdalomcsillapító hatását tail-flick teszten mértük (Furst et al. 1993). Ebben a kísérletben az állat farkát intenzív, fókuszált hővel sugározzuk, amikor az állat fájdalmat érez, elrántja a farkát, és az idő, amíg az állat a farkát a vályúban tartotta (tail-flick latencia) a kijelzőről leolvasható. Az alapérték felvételét követően ugyanazon az állaton a MO s.c. adása után 30 perccel ismét megmértük a tail-flick latenciát. A 4 másodpercnél hosszabb alap latenciaidejű állatot kizártuk a kísérletből. A szövetsérülést elkerülendő, a teszt cut-off értékét 8 másodpercben határoztuk



1. ábra A morfin-challenge anyai viselkedést gátló hatásának időtartama (PD2-3)

Üres oszlopok: SAL-csoportok (N=8-10), challenge: SAL, bordó oszlopok: MO-csoportok (N=8-13), challenge: MO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ a SAL 30 min csoporthoz viszonyítva (Kruskal-Wallis-teszt, Dunn-poszt hoc teszt).

meg. Az antinociceptív hatást, mint maximális lehetséges hatás %-át MPE% értékkel jellemeztük: $MPE\% = [(T' - T_0) / (\text{cut-off} - T_0)] \times 100\%$.

A tail-flick tesztet az elválasztás utáni napon az utolsó MO- (vagy SAL-) adag után 24 óra múlva kezdtük. A dózis-hatás összefüggést három-három MO dózissal vizsgáltuk: 1,5-3-6 mg/kg s.c. MO-t kaptak a naív állatok, a MO-nal kezelt állatok pedig (a korábbi tapasztalatok alapján) 3-6-12 mg/kg s.c. MO-t kaptak. Egy-egy mérési ponthoz 5 állat tail-flick latenciáját mértük meg.

Statisztika

Az eredmények statisztikai kiértékelése a Windows alatt futó 3.00 verziószámú és az 5.0 próba verziójú GraphPad Prism szoftverrel (San Diego California USA, www.graphpad.com Copyright (c) 1994-1999 by GraphPad Software) történt. A módszer megneve-

zését ld. az ábrafeliratokon. Az ábrákon átlagértékeket és az átlag hibáját (S.E.M.) ábrázoltuk.

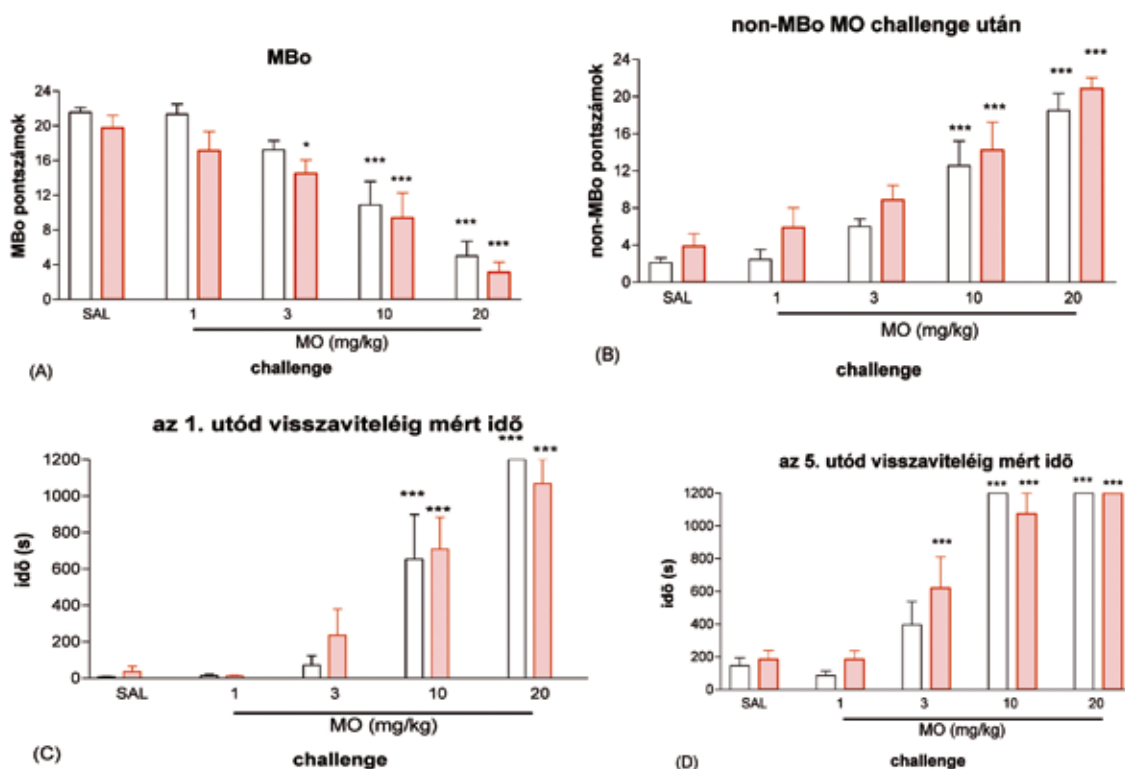
EREDMÉNYEK

Anyai viselkedés

A morfin-challenge anyai viselkedést gátló hatásának időtartama

A MO-csoportban a MO-challenge után 30 perccel, valamint 2 órával elkezdett megfigyelések során az MBo szignifikánsan csökkent (a rang-szám különbségek: $d=30,84$; $p < 0,001$ a 30 perces értékekre és $d=22,23$; $p < 0,01$; a 2 órás értékekre), míg a non-MBo szignifikánsan nőtt ($d=30,04$; $p < 0,001$ a 30 perces értékekre és $d=21,81$; $p < 0,01$ a 2 órás értékekre).

A visszaviteli teszten hasonló eredményeket kaptunk: a kezelés után 30 perccel az MO-csoport anya-



2. ábra A morfin anyai viselkedésre kifejtett hatásának dózis-hatás összefüggése (PD2-3)

Üres oszlop: SAL-csoport (N=9), bordó oszlop: MO-csoport (N=8). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (kétszemponos ANOVA, Dunnett-poszt hoc teszt).

állatainál a latencia hosszabb volt, mint a SAL-csoport anyaállatainál ($d=19,61$; $p < 0,001$ az 1. kölyökre és $d=23,00$; $p < 0,05$ az 5. kölyökre).

A kezelések után 24 órával a SAL-és MO-csoport egyik paraméterben sem különbözött egymástól. (1. ábra)

A morfin anyai viselkedésre kifejtett hatásának dózis-hatás összefüggése

Mint azt a 2. ábra is mutatja, a MO-kezelés a SAL-csoportban és a MO-csoportban is dóziszfüggően gátolta az anyai viselkedést.

A perinatális kezelések hatása jelentősen különböző volt az MBo pontszámait tekintve ($F(1;74)=4,62$; $p < 0,05$) és a non-MBo pontszámain mérve is ($F(1;74)=4,73$; $p < 0,05$).

A poszt hoc teszt alapján a 10 és 20 mg/kg s.c. MO-challenge az anyai viselkedés szignifikáns romlását okozta mindkét kezelési csoportban, az összes paraméteren (MBo, non-MBo, 1. és 5. RT; $p < 0,001$).

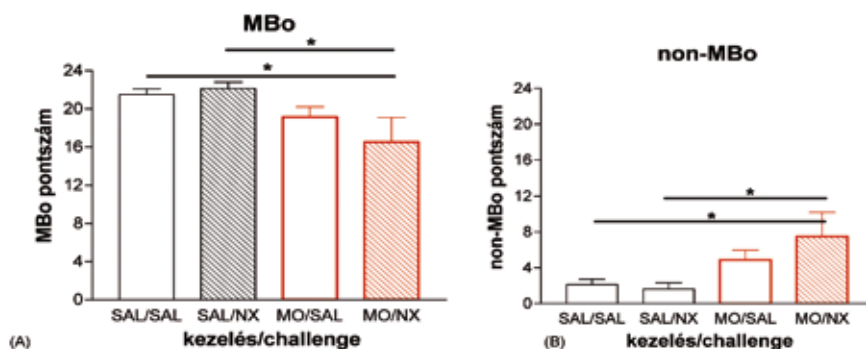
Fentiekén túlmenően, a MO-csoportban a 3 mg/kg MO-challenge statisztikailag szignifikánsan csökkentette az MBo pontszámokat ($d=7,06$; $p < 0,05$) és növelte az 5. kölyök visszaviteléig mért latenciát ($d=531,4s$; 95%; $p < 0,001$). A SAL-csoportban a 3 mg/kg s.c. MO-challenge egyik paraméteren mérve sem rontotta az anyai viselkedést.

A két faktor („kezelési” faktor és „challenge” faktor) közötti interakció nem volt szignifikáns.

A naloxon-challenge hatása az anyai viselkedésre

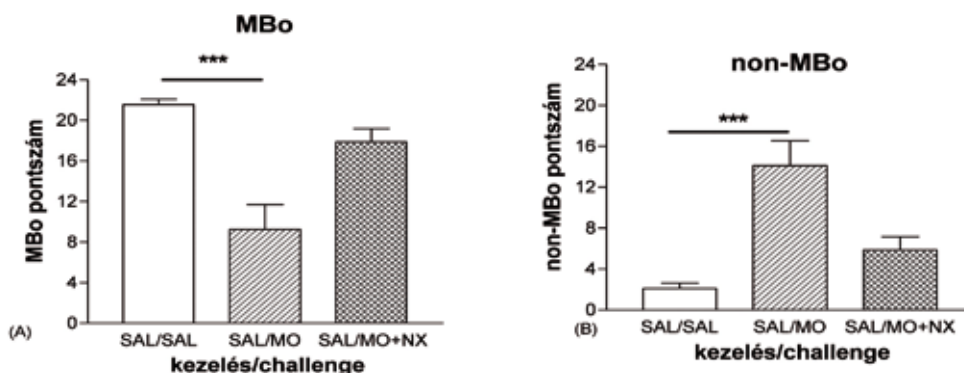
A 3. ábra mutatja, hogy a 3 mg/kg NX-adás (challenge) a MO-csoportban az anyai viselkedést rontotta, míg a SAL-csoportban nem.

Az MBo paraméteren a perinatális kezelések (SAL vagy MO) hatásának különbsége szignifikáns volt ($F(1;27)=10,52$; $p < 0,01$), a non-MBo paraméter esetében úgyszintén ($F(1;27)=11,60$; $p < 0,01$). A NX-t kapott SAL- és MO-csoportok átlagpontszámainak különbsége szignifikáns volt (SAL/NX vs. MO/NX



3. ábra Az anyai viselkedés NX (3 mg/kg) challenge után (1. posztpartum hét)

SAL/SAL-csoport N=8, SAL/NX-csoport N=8, MO/SAL-csoport N=8, MO/NX-csoport N=6. * $p < 0,05$. (kétszemponos ANOVA, Newman-Keuls-poszt hoc teszt).



4. ábra A MO (10 mg/kg) anyai viselkedést gátló hatásának antagonizálhatósága NX-nal (3 mg/kg) a SAL-csoportban (1. posztpartum hét) SAL-challenge csoport N=9, MO-challenge csoport N=8, MO+NX-challenge csoport N=9. *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis-teszt, Dunn-poszt hoc teszt).

$d=5,622$; $p < 0,05$, illetve SAL/SAL vs. MO/NX $d=5,00$; $p < 0,05$).

A non-MBo esetében is a NX-adás csak a MO-csoportban növelte meg szignifikánsan a pontszámokat (SAL/NX vs. MO/NX $d=5,875$; $p < 0,05$ és SAL/SAL vs. MO/NX $d=5,37$; $p < 0,05$).

A naloxon hatása a morfin által gátolt anyai viselkedésre
Az előző kísérletekhez hasonlóan (A/1., 2., 3.) a SAL-csoportban az akut MO-challenge erőteljesen rontotta az MBo-t (Kruskal-Wallis- $H=14,39$; $p < 0,001$) és növelte a non-MBo pontszámot ($H=15,42$; $p < 0,001$). A NX (3 mg/kg s.c.) a MO akut hatását teljes mértékben antagonizálta (4. ábra).

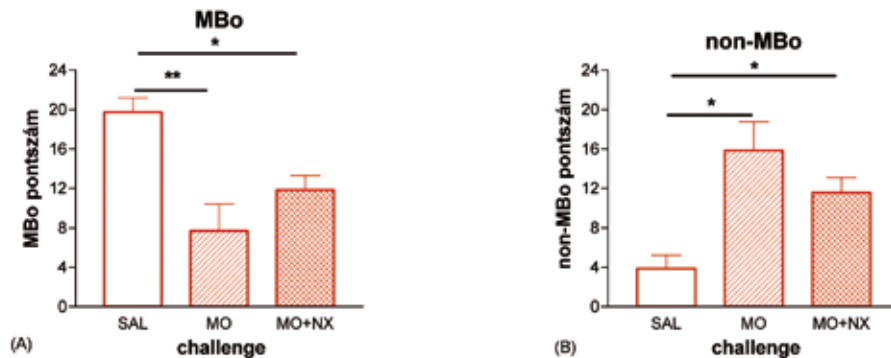
A MO-csoportban a NX sem a MBo paraméteren ($d=8,241$; $p < 0,05$), sem a non-MBo paraméteren ($d=8,795$; $p < 0,05$) nem antagonizálta teljesen a MO hatását (5. ábra).

Fizikális elvonási tünetek

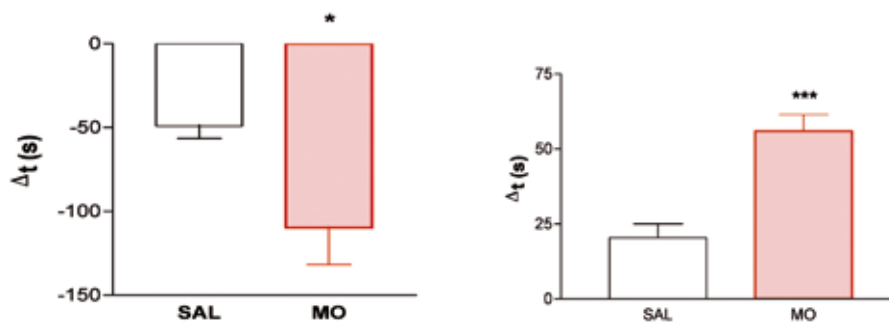
A MO-csoport anyaállataiban a 10 mg/kg dózisú NX csupán enyhe fizikális elvonási tüneteket precipitált: a 7 állatra számolt pontszám 1,86 volt, szemben a maximálisan lehetséges 10-el. NX precipitációt a SAL-csoport állatain értelemszerűen nem végeztünk.

Lokomotoros aktivitás NX adását követően

10 mg/kg NX adását követően a SAL- és MO-



5. ábra A MO (10 mg/kg) anyai viselkedést gátló hatásának antagonizálhatósága NX-nal (3 mg/kg) a MO-csoportban (1. posztpartum hét) SAL-challenge csoport N=8, MO-challenge csoport N=7, MO+NX-challenge csoport N=7. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis-teszt, Dunn-poszt hoc teszt).



6. ábra

(A) NX-indukálta CPA az anyaállatokon (PD22)

Üres oszlop: SAL-csoport (N=7), bordó oszlop: MO-csoport (N=8). * $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-teszt).

(B) MO-indukálta CPP az anyaállatokon (PD22)

Üres oszlop: SAL-csoport (N=8), bordó oszlop: MO-csoport (N=8). *** $p < 0,001$ (Mann-Whitney U-teszt).

csoport között a lokomotoros aktivitásban nem volt különbség.

Emelt keresztpalló teszt NX adását követően

A SAL- és MO-csoport között egyik paraméteren (nyitott karban eltöltött idő, a nyitott karba történt belépések száma, illetve a bármely karba történt összes belépés száma) sem volt szignifikáns különbség 10 mg/kg NX adását követően.

Az anyaállatokon végzett kondicionált helyaverzió kísérlet

A NX-nal párosított, szürke dobozfélben a kondicionálás előtt és után eltöltött idő különbsége szignifi-

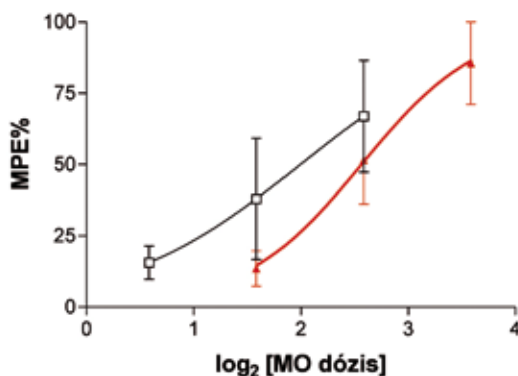
kánsan nagyobb volt a MO-, mint a SAL-csoportban ($U = 9,5$; $p < 0,05$). (6.(A)ábra)

Az anyaállatokon végzett morfin-indukálta kondicionált helypreferencia kísérlet

A MO-nal párosított kompartmentben a kondicionálás után és előtt eltöltött idő különbsége a MO-csoport anyaállatai esetében szignifikánsan nagyobb volt, mint a SAL-csoportnál ($U = 2$; $p < 0,001$). (6. (B)ábra)

A morfin antinociceptív hatása az anyaállatokon

Amint azt a 7. ábra mutatja, az elválasztás utáni napon MO dózisfüggő antinociceptív hatása mindkét csoportban kimutatható volt. Az ED50 értékek (mg/



7. ábra A MO antinociceptív hatása anyaállatokon (PD22)

-□- SAL-csoport, -△- MO-csoport.

kg) [95% CI] numerikusan kisebbek voltak a SAL- (ED₅₀=3,99; [2,23-7,13]), mint a MO- csoportban (ED₅₀=5,92; [4,16- 8,41]), azonban a különbség nem volt szignifikáns.

Az anyaállatok testsúlya

A SAL- és MO-csoport állatainak testsúlyai között, sem a gesztáció sem a laktáció alatt nem volt különbség.

MEGBESZÉLÉS

Irodalmi adatok szerint a néhány napig tartó, többszörös dózisu MO-kezelés az utódgondozási funkciók romlását okozza (Rayner et al. 1988; Miranda-Paiva et al. 2001; Slamberová et al. 2001). Az általunk alkalmazott MO-kezelési séma mellett az előbbiekhöz hasonlóan az anyai viselkedés romlását tapasztaltuk: a MBo pontszám csökkent, a non-MBo nőtt, az utódok visszaviteléig mért latencia nőtt.

Egyszeri 10 mg/kg MO s.c. injekció után 4 óra múlva gyakorlatilag nem mérhető a MO koncentrációja sem a plazmában (t_{max}=0,25 h), sem az agyi extracelluláris térben (t_{max}=1,25 h) (Stain et al. 1995). Patkányban a MO felezési ideje körülbelül 30 perc (Aasmundstad et al. 1995; Stain et al. 1995), így várhatóan a MO hatása 2 óra múlva jelentősen csökken. Kísérleteinkben egy dózis (10 mg/kg s.c.) MO anyai viselkedésre gyakorolt gátló hatása a mindkét kezelési csoportban az alkalmazás után 2 órával még jelentős volt, 4 óra múlva már alig kimutatható. Krónikus MO kezelési sémánk a MO hatástartamát nem befolyásolta. Saját eredményeink és a mienkkel összhangban

Grimm és munkatársai eredményei szerint is a MO gátló hatása az anyai viselkedésre hasonló időfüggést mutat, mint a MO egyéb akut hatásai, például az antinociceptív vagy légzésdepresszív hatások (Grimm & Bridges 1983; Shimoyama et al. 2001; Al-Khrasani et al. 2007). A kontroll és a MO-nal kezelt anyaállatok a világos ciklusban több időt töltenek utódgondozással, mint a sötét ciklusban (Slamberová et al. 2001), ezért a világos ciklusban 2-3 órás „kiesés” az utódok gondozásában jelentős romlást okoz. A fialáskor abahagyott, gesztáció alatti MO-kezelés (GD11-18 napi 2x10 mg/kg s.c.) hatására romlottak az anyai funkciók (Slamberová et al. 2001), tehát nemcsak a MO közvetlen hatása, hanem maga a megvonás is befolyásolhatja az anyai viselkedést. A mi kezelési sémánk mellett 24 órával az anyai viselkedés romlása, mint spontán elvonási tünet nem volt kimutatható (tulajdonképpen szignifikáns hatás már a MO-adás után 4 órával sem volt megfigyelhető), NX-nal precipitálva azonban az elvonás erőteljesebben jelent meg, mely az anyai viselkedés romlásában is megfigyelhető volt.

Krónikus MO-kezelés során számos hatáshoz tolerancia alakul ki, például az antinociceptív hatáshoz, a légzésdepresszióhoz, a hányingerhez/hányáshoz (Kanjhan 1995; Riba et al. 2002a; Riba et al. 2002b; Freye & Latasch 2003; Dumas & Pollack 2008; Furst 2008). Ezzel ellentétben, a fialás körüli időszakban (GD17-PD1) ismételt adagolt MO anyai viselkedést rontó hatásához szenzitizációt mutattak ki (PD5-6) (Miranda-Paiva et al. 2001; Yim et al. 2006). MO-naív állatban a MO 5 és 10 mg/kg dózisban is jelentősen rontotta az anyai viselkedést, a kisebb adagokban hatástalanok voltak (Kinsley & Bridges 1988).

Az irodalmi adatokat figyelembe véve a dózis-hatás összefüggést mindegyik kezelési csoportban (SAL-, illetve MO-csoportok) 0-1-3-10-20 mg/kg s.c MO-nal vizsgáltuk. A MO dóziszfüggő hatása mindkét csoportban kimutatható volt. A megfigyelt viselkedésben a MO-kezelt csoportban mindegyik MO- dózis nagyobb mértékű gátlást okozott, illetve a MO-hatás iránti érzékenységi küszöb is különböző volt: a 3 mg/kg MO-challenge csak a MO-csoportban okozott szignifikáns viselkedési romlást, a kontrollban nem, azaz a kezelési sémánk a MO anyai viselkedést rontó akut hatásának fokozódását eredményezte.

Irodalmi adatok szerint MO-naív állapotban a MO akut, anyai viselkedést gátló hatása NX-nal antagonizálható (Bridges & Grimm 1982; Grimm & Bridges 1983), azonban a NX-nak önmagában anyai viselkedésre kifejtett hatását nem mutatták ki (Kinsley & Bridges 1986; Byrnes et al. 2000). MO-kezelt (GD17-PD3 napi 1x5 mg/kg MO) patkányban a NX antagonizálta a MO anyai viselkedést gátló akut hatását (Miranda-Paiva et al. 2001). Ezekkel az adatokkal ellentétben a kísérleteinkben a teljes gesztáció időtartama alatt adott és a laktáció során tovább folytatott MO-kezelés után a NX még nagy dózisban (3 mg/kg) adagolva is csak csökkentette, de nem védte ki maradéktalanul a MO akut, anyai viselkedést gátló hatását. Ez a megfigyelés is arra utal, hogy a hosszú távú, mérsékelt, konstans dózisével MO-kezelés megváltoztatja az opioid-érzékenységet.

A dependencia vizsgálatát a szomatikus elvonási tünetek Buckett módszere szerinti megfigyelésével kezdtük. A MO-kezelés befejezése után 1 nappal még igen nagy dózisével (10 mg/kg) NX is csak alacsony pontszámú (1,86), gyenge fizikális elvonási tüneteket precipitált, az anyaállatainkban tehát csak enyhe fizikális függőség alakult ki. Lényegesen nagyobb MO-dózisok (Buckett-400 mg/kg, Furst-170 mg/kg) adása után a szomatikus elvonás is értelemszerűen sokkal kifejezettebb volt (5,8-8,8 pont, illetve 7,2 pont, sorrendben) (Buckett 1964; Furst et al. 1993).

MO-kezelést követően a NX-adás után egyéb, nem-fizikális („pszichés”) jelek is kimutathatóak, például emelt keresztállás teszten MO elvonás során szorongás-szerű viselkedés (a nyitott karban eltöltött idő csökkenése) (Zhang & Schulteis 2008; Avila et al. 2008), illetve motiméterben vizsgálva hipolokomóció (Schulteis et al. 1994; Timar et al. 2005) jelenik meg. Ezeket a kísérleteket többnyire hím, esetleg nem gravid nőstény patkányokon végezték. Jelen kísérleteinkben vemhes nőstény patkányoknak 6 héten keresztül adagolt közepes, konstans dózisével MO-kezelés mellett azonban még igen nagy dózisével (10 mg/kg) NX

adása után sem mutattunk ki nem-fizikális, „pszichés” elvonási jelként értékelhető változást sem az EPM teszten, sem a lokomócióban.

MO-kezelt állapotban opioid-antagonista adagolása helyaverziót indukál, amely elvonási tünetként (negatív motiváció) is értékelhető. Ezt a hatást - egyszeri, vagy ismételt MO adagolás után - már igen kis dózisével NX (0,004 - 0,01 mg/kg) is kiváltja (Mucha 1987; Schulteis et al. 1994; White et al. 2005), sőt, a NX (0,1-45 mg/kg) még MO-naív állapotban is helyaverziót hoz létre (Mucha et al. 1982). Ez utóbbi arra utal, hogy NX averziót indukáló hatásában az endogén opioid rendszer gátlása is közrejátszik. A fenti eredményekhez hasonlóan jelen kísérleteinkben az elválasztás (és egyben a kezelés befejezése) utáni napon adagolt 10 mg/kg NX a kontroll csoportban is kiváltott helyaverziót, a MO-csoportban azonban az averzió mértéke szignifikánsan nagyobb volt. Ez elvonási tünetnek, illetve fokozott NX érzékenységnek egyaránt tekinthető.

Egy vegyület helypreferenciát kiváltó hatása arra utal, hogy a vegyület kisebb-nagyobb abúzus potenciállal rendelkezik (Mucha et al. 1982; Iwamoto 1985; Olmstead & Franklin 1997a,b). A MO helypreferencia-változást előidéző hatása fokozódik krónikus MO-kezelést követően (Advokat 1985; He et al. 2004). Az irodalomban található adatok azonban hím, illetve esetleg nem terhes nőstény állatokra vonatkoznak, a perinatális MO-kezelés mellett nem találtunk adatokat. Eredményeink szerint a teljes perinatális időszakban MO-kezelt anyaállatokban az elválasztást követő napon (MO adagolás befejezése utáni napon) kezdett kísérletsorozatban a MO helypreferenciát indukáló hatása szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollban.

A MO antinociceptív hatásának csökkenését (tolerancia) már 7 napos, napi 2x10 mg/kg s.c. MO-kezelés után megfigyelték (Király et al. 2006). Nem találtunk azonban az irodalomban adatokat arra, hogy befolyásolja-e a gesztáció/laktáció a tolerancia kialakulását. A kísérleteinkben alkalmazott konstans, mérsékelt dózisével, hosszan tartó MO-kezelés az anyaállatokban a MO antinociceptív hatásának csak kismértékű numerikus, statisztikailag nem szignifikáns csökkenését okozta. Feltételezhető, hogy a gesztáció/laktáció alatti hormonális és neurális változások az antinociceptív tolerancia kialakulása ellen hatnak.

A krónikus MO-kezelés hatására létrejövő viselkedési változások hátterében valószínűleg nem a receptorok számának változása áll. Krónikus MO-kezelés esetén a μ -receptorok down- és upregulációját is leírták (Stafford et al. 2001; Fabian et al. 2002), a MO nem okoz receptor internalizációt, illetve

a μ -receptor denzitása nem változik idegszövet preparátumon (Whistler et al. 1999). Kötési kísérletekben MO-kezelést követően (60 mg/kg-ig titrálva) szubcelluláris szintű eltéréseket lehet detektálni: a mikroszomális frakcióban a μ a μ -kötőhelyek száma, illetve a G-fehérje-kötődés is (Fabian et al. 2002). Ez azonban önmagában nem bizonyítja, hogy fokozottabb G-fehérje aktiválás a morfinnak a sejt felszíni receptorokhoz történő kötődése során is bekövetkezne, és a kísérleteinkben tapasztalt szenzitizációs jelenség oka lehetne. A gesztáció idején az endogén opioid mechanizmusok kifejezettebbek, általában gátló hatásuk jobban érvényesül (Wardlaw & Frantz 1983; Brady et al. 1994; Douglas et al. 1995; Merchenthaler et al. 1995; Leng et al. 1997; Andrews & Grattan 2002; Douglas et al. 2002; Brunton et al. 2005; Brunton et al. 2006; Brunton & Russell 2008). A gesztáció és fialás, valamint az utódgondozási viselkedés megjelenésével egyidejű hormonális és egyéb (például opioid rendszerbeli) változások a krónikus MO-kezelés opioid rendszerre kifejtett hatásait is megváltoztathatják. Az utódgondozási funkciókon mérhető és a MO pozitív és negatív megerősítő hatásában látható hatásfokozódást saját megfigyeléseink és irodalmi adatok (Miranda-Paiva et al. 2001; Advokat 1985; Mucha 1987; Schulteis et al. 1994; He et al. 2004; White et al. 2005) is bizonyítják.

Az anyai viselkedés és a fizikális elvonási tünetek közvetítésében a μ -opioid receptoroknak tulajdonítanak szerepet (Iwamoto 1985; Mann et al. 1990; Mann et al. 1991), míg a CPA kialakulásában a μ - és a δ -opioid receptorok is szerepet játszhatnak. Ezt bizonyítja például, hogy MO-dependens patkányban a nagyobb dózisban a μ - és a δ -opioid receptoron egyaránt ható NX fizikális elvonási tüneteket és helyaverziót is okozott, míg a szelektív δ -antagonista naltrindol nem indukált fizikális megvonási tüneteket, azonban helyaverziót igen (Funada et al. 1996). Nem zárható ki, hogy az általunk alkalmazott állandó, mérsékelt dózisú perinatális időszakban történő MO-kezelés a μ és a δ -receptorok érzékenységét is befolyásolja.

Az opioid rendszer mellett a krónikus MO-kezelés egyéb transzmitter-rendszerek működését is megváltoztatja. A dopaminerg struktúrák például a központi idegrendszernek olyan részei, amelyeknek a posztpartum utódgondozási viselkedésben és az abúzuspotenciállal bíró szerek pozitív (és negatív) megerősítő hatásában is jelentőséget tulajdonítanak. A medialis preopticus area, ventralis pallidum, nucleus accumbens dopaminerg afferenciát kap, ezek a struktúrák az anyai viselkedés kialakításában is részt vesznek (Numan et al. 2005a; Numan et al.

2005b); a nucleus accumbens pedig a reward-kör egyik központja (van Ree et al. 1999). Irodalmi adatok szerint egyszeri dózisú MO-kezelés után (0,5-3,5 mg/kg) az A10 (ventralis tegmentalis area-ban található) és az A9 (substantia nigra-ban található) dopaminerg neuronok spontán tüzelése megnövekedett (Gysling & Wang 1983). A krónikus (6-7 napig tartó) MO-kezelés hatásáról számos – és némelykor ellentmondó – adat található az irodalomban, bár ezek nagy része a dopamin-transzmisszió fokozódásáról számol be (De Vries et al. 1993; Tjon et al. 1994; Spangler et al. 2003). A nucleus accumbensben és a striatumban a dopamin D2-receptorokat kódoló mRNS-szint megnövekedéséről is beszámoltak (Georges et al. 1999), míg más közlemények szerint a nucleus caudatusban a D2-mRNS-szint enyhén csökkent, a D3-receptort kódoló mRNS-szint viszont erősen megnövekedett több agyi régióban is (striatumban, ventralis tegmentalis area-ban és a substantia nigra-ban) (Spangler et al. 2003).

Az általunk alkalmazott MO-kezeléshez némi-képp hasonló tartós, mérsékelt dózisú MO-kezelés (napi 1x10 mg/kg, 14 napig) abbahagyása után az elektromosan kiváltott dopamin-, illetve acetilkolin-felszabadulás hosszú ideig tartó emelkedését mérték. A szerzők konklúziója szerint a tartós, mérsékelt dózisú MO-kezelés hosszú távú adaptív változásokat idézhet elő a központi idegrendszerben, mely változásoknak szerepe lehet az abúzus-szerek iránti fokozott vulnerabilitásban (Tjon et al. 1994; Tjon et al. 1995).

Összességében megállapítható, hogy az általunk alkalmazott konstans, közepes dózisú, hosszantartó MO-kezelés az anyaállatok opioid érzékenységét megváltoztatta anélkül, hogy jelentősebb dependenciát okozó hatás kimutatható lett volna.

Rövidítések

ANOVA	analysis of variance (varianciaanalízis)
CPA	conditioned place aversion (kondicionált helyaverzió)
CPP	conditioned place preference (kondicionált helypreferencia)
CI	confidence interval (megbízhatósági határ)
DPDPE	[D-Pen2,5]-enkephalin, [D-Pen2,D-Pen5]-enkephalin, szelektív δ -opioid receptor agonista
ED50	az a dózis, ami a kísérleti populáció 50%-ban kiváltja a kívánt hatást
EPM	elevated plus maze (emelt keresztállás)
d	difference, átlagok vagy rangszámok különbsége
GD	gestational day (gesztációs nap)
i.c.v.	intracerebroventrikuláris
MB	maternal behaviour (anyai viselkedés)
MBo	observed maternal behaviour (megfigyelt anyai viselkedés)
MO	morfin

MPE%	maximal possible effect (maximális lehetséges hatás %-a)
non-MBo	observed non maternal behaviour (megfigyelt nem anyai viselkedés)
NX	naloxon
PD	postpartum/postnatal day (posztpartum vagy posztnatális nap)
RT	retrieval test (visszaviteli teszt)
s.c.	szubkután
SAL	fiziológias sóoldat

Levelező szerző: Sobor Melinda, GYEMSZI-Országos Gyógyszerészeti Intézet, 1051 Budapest, Zrínyi u. 3.
e-mail: sobor.melinda@gyemszi.hu

IRODALOM

- Aasmundstad, T. A., J. Morland, et al. (1995). "Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling." *J Pharmacol Exp Ther* 275(1): 435-41.
- Advokat, C. (1985). "Evidence of place conditioning after chronic intrathecal morphine in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 22(2): 271-7.
- Al-Khrasani, M., M. Spetea, et al. (2007). "DAMGO and 6beta-glycine substituted 14-O-methyloxymorphone but not morphine show peripheral, preemptive antinociception after systemic administration in a mouse visceral pain model and high intrinsic efficacy in the isolated rat vas deferens." *Brain Res Bull* 74(5): 369-75.
- Andrews, Z. B. and D. R. Grattan (2002). "Opioid control of prolactin secretion in late pregnant rats is mediated by tuberoinfundibular dopamine neurons." *Neurosci Lett* 328(1): 60-4.
- Avila, M. A., R. N. Ruggiero, et al. (2008). "Involvement of the midbrain tectum in the unconditioned fear promoted by morphine withdrawal." *Eur J Pharmacol* 590(1-3): 217-23.
- Blass, E. M., D. J. Shide, et al. (1995). "Mother as shield: differential effects of contact and nursing on pain responsivity in infant rats—evidence for nonopioid mediation." *Behav Neurosci* 109(2): 342-53.
- Brady, L. S., A. B. Lynn, et al. (1994). "Systemic interleukin-1 induces early and late patterns of c-fos mRNA expression in brain." *J Neurosci* 14(8): 4951-64.
- Bridges, R. S. and C. T. Grimm (1982). "Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone." *Science* 218(4568): 166-8.
- Brunton, P. J., S. L. Meddle, et al. (2005). "Endogenous opioids and attenuated hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge in pregnant rats." *J Neurosci* 25(21): 5117-26.
- Brunton, P. J. and J. A. Russell (2008). "The expectant brain: adapting for motherhood." *Nat Rev Neurosci* 9(1): 11-25.
- Brunton, P. J., N. Sabatier, et al. (2006). "Suppressed oxytocin neuron responses to immune challenge in late pregnant rats: a role for endogenous opioids." *Eur J Neurosci* 23(5): 1241-7.
- Buckett, W. R. (1964). "A new test for morphine-like physical dependence (addiction liability) in rats." *Psychopharmacologia* 6(6): 410-6.
- Byrnes, E. M., B. A. Rigero, et al. (2000). "Opioid receptor antagonism during early lactation results in the increased duration of nursing bouts." *Physiol Behav* 70(1-2): 211-6.
- Carboni, E., E. Acquas, et al. (1989). "5HT₃ receptor antagonists block morphine- and nicotine- but not amphetamine-induced reward." *Psychopharmacology (Berl)* 97(2): 175-8.
- Cheek, F. E., C. N. Holstein, et al. (1976). "From heroin to methadone—social role changes and reinforcement differentials in relation to outcome on methadone. Part I. The study of reinforcement differentials." *Int J Addict* 11(4): 659-79. Crawford, GA, Washington, MC, Senay, EC. Careers with heroin. *The International journal of the addictions* 1983;18:701-715.
- De Vries, T. J., G. H. Tjon Tien Ril, et al. (1993). "Chronic exposure to morphine and naltrexone induces changes in catecholaminergic neurotransmission in rat brain without altering mu-opioid receptor sensitivity." *Life Sci* 52(21): 1685-93.
- Douglas, A. J., R. J. Bicknell, et al. (2002). "Beta-endorphin cells in the arcuate nucleus: projections to the supraoptic nucleus and changes in expression during pregnancy and parturition." *J Neuroendocrinol* 14(10): 768-77.
- Douglas, A. J., I. Neumann, et al. (1995). "Central endogenous opioid inhibition of supraoptic oxytocin neurons in pregnant rats." *J Neurosci* 15(7 Pt 1): 5049-57.
- Dumas, E. O. and G. M. Pollack (2008). "Opioid tolerance development: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective." *Aaps J* 10(4): 537-51.
- Fabian, G., B. Bozo, et al. (2002). "Chronic morphine-induced changes in mu-opioid receptors and G proteins of different subcellular loci in rat brain." *J Pharmacol Exp Ther* 302(2): 774-80.
- Freye, E. and L. Latasch (2003). "[Development of opioid tolerance – molecular mechanisms and clinical consequences]." *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 38(1): 14-26.
- Funada, M., C. G. Schutz, et al. (1996). "Role of delta-opioid receptors in mediating the aversive stimulus effects of morphine withdrawal in the rat." *Eur J Pharmacol* 300(1-2): 17-24.
- Furst, Z. (2008). "[Central and peripheral mechanisms in antinociception: current and future perspectives]." *Neuropsychopharmacol Hung* 10(3): 127-30.
- Furst, Z., B. Buzas, et al. (1993). "Highly potent novel opioid receptor agonist in the 14-alkoxymetopon series." *Eur J Pharmacol* 236(2): 209-15.
- Georges, F., L. Stinus, et al. (1999). "Chronic morphine exposure and spontaneous withdrawal are associated with modifications of dopamine receptor and neuropeptide gene expression in the rat striatum." *Eur J Neurosci* 11(2): 481-90.
- Grimm, C. T. and R. S. Bridges (1983). "Opiate regulation of maternal behavior in the rat." *Pharmacol Biochem Behav* 19(4): 609-16.
- Gysling, K. and R. Y. Wang (1983). "Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat." *Brain Res* 277(1): 119-27.
- Hammer, R. P., Jr. and R. S. Bridges (1987). "Preoptic area opioids and opiate receptors increase during pregnancy and decrease during lactation." *Brain Res* 420(1): 48-56.
- Handelsman, L., M. J. Aronson, et al. (1992). "The dysphoria of heroin addiction." *Am J Drug Alcohol Abuse* 18(3): 275-87.
- He, S., N. Li, et al. (2004). "Long-term opiate effects on amphetamine-induced dopamine release in the nucleus accumbens core and conditioned place preference." *Pharmacol Biochem Behav* 77(2): 327-35.
- Hosztafi, S. (2003). "[Heroin, part III: the pharmacology of heroin]." *Acta Pharm Hung* 73(3): 197-205.
- Hutcheson, D. M., B. J. Everitt, et al. (2001). "The role of withdrawal in heroin addiction: enhances reward or promotes avoidance?" *Nat Neurosci* 4(9): 943-7.
- Iwamoto, E. T. (1985). "Place-conditioning properties of mu, kappa, and sigma opioid agonists." *Alcohol Drug Res* 6(5): 327-39.

34. Kanjhan, R. (1995). "Opioids and pain." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22(6-7): 397-403.
35. Kinsley, C. H. and R. S. Bridges (1986). "Opiate involvement in postpartum aggression in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 25(5): 1007-11.
36. Kinsley, C. H. and R. S. Bridges (1988). "Parity-associated reductions in behavioral sensitivity to opiates." *Biol Reprod* 39(2): 270-8.
37. Kinsley, C. H., J. C. Wellman, et al. (1993). "Opioid regulation of parental behavior in juvenile rats." *Pharmacol Biochem Behav* 44(4): 763-8.
38. Kiraly, K. P., P. Riba, et al. (2006). "Alterations in prodynorphin gene expression and dynorphin levels in different brain regions after chronic administration of 14-methoxymetopon and oxycodone-6-oxime." *Brain Res Bull* 70(3): 233-9.
39. Leng, G., S. Dye, et al. (1997). "Kappa-opioid restraint of oxytocin secretion: plasticity through pregnancy." *Neuroendocrinology* 66(6): 378-83.
40. Mann, P. E., C. H. Kinsley, et al. (1991). "Opioid receptor subtype involvement in maternal behavior in lactating rats." *Neuroendocrinology* 53(5): 487-92.
41. Mann, P. E., G. W. Pasternak, et al. (1990). "Mu 1 opioid receptor involvement in maternal behavior." *Physiol Behav* 47(1): 133-8.
42. Mayer, A. D., P. L. Faris, et al. (1985). "Opiate antagonism reduces placentophagia and pup cleaning by parturient rats." *Pharmacol Biochem Behav* 22(6): 1035-44.
43. Merchenthaler, I., D. E. Lennard, et al. (1995). "Induction of proenkephalin in tuberoinfundibular dopaminergic neurons by hyperprolactinemia: the role of sex steroids." *Endocrinology* 136(6): 2442-50.
44. Miranda-Paiva, C. M., A. G. Nasello, et al. (2001). "Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior." *Brain Res Bull* 55(4): 501-5.
45. Mucha, R. F. (1987). "Is the motivational effect of opiate withdrawal reflected by common somatic indices of precipitated withdrawal? A place conditioning study in the rat." *Brain Res* 418(2): 214-20.
46. Mucha, R. F., D. van der Kooy, et al. (1982). "Drug reinforcement studied by the use of place conditioning in rat." *Brain Res* 243(1): 91-105.
47. Myers, M. M., S. A. Brunelli, et al. (1989). "Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures." *Dev Psychobiol* 22(1): 29-53.
48. Numan, M., M. J. Numan, et al. (2005)a. "The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats." *Behav Neurosci* 119(6): 1588-604.
49. Numan, M., M. J. Numan, et al. (2005)b. "Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens-ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats." *Behav Brain Res* 158(1): 53-68.
50. Olmstead, M. C. and K. B. Franklin (1997)a. "The development of a conditioned place preference to morphine: effects of lesions of various CNS sites." *Behav Neurosci* 111(6): 1313-23.
51. Olmstead, M. C. and K. B. Franklin (1997)b. "The development of a conditioned place preference to morphine: effects of microinjections into various CNS sites." *Behav Neurosci* 111(6): 1324-34.
52. Rayner, V. C., I. C. Robinson, et al. (1988). "Chronic intracerebroventricular morphine and lactation in rats: dependence and tolerance in relation to oxytocin neurones." *J Physiol* 396: 319-47.
53. Riba, P., Y. Ben, et al. (2002)a. "[Dmt(1)]DALDA is highly selective and potent at mu opioid receptors, but is not cross-tolerant with systemic morphine." *Curr Med Chem* 9(1): 31-9.
54. Riba, P., Y. Ben, et al. (2002)b. "Morphine tolerance in spinal cord is due to interaction between mu- and delta-receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 300(1): 265-72.
55. Rosenblatt, J. S., A. D. Mayer, et al. (1988). "Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat." *Psychoneuroendocrinology* 13(1-2): 29-46.
56. Schmitt, U. and C. Hiemke (1998). "Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22(7): 1197-215.
57. Schulteis, G., A. Markou, et al. (1994). "Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis." *J Pharmacol Exp Ther* 271(3): 1391-8.
58. Sherman, J. E., M. C. Zinser, et al. (1989). "Subjective dimensions of heroin urges: influence of heroin-related and affectively negative stimuli." *Addict Behav* 14(6): 611-23.
59. Shimoyama, M., N. Shimoyama, et al. (2001). "Antinociceptive and respiratory effects of intrathecal H-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (DALDA) and [Dmt1] DALDA." *J Pharmacol Exp Ther* 297(1): 364-71.
60. Slamberová, R., B. Szilagyi, et al. (2001). "Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior." *Psychoneuroendocrinology* 26(6): 565-76.
61. Spangler, R., N. L. Goddard, et al. (2003). "Elevated D3 dopamine receptor mRNA in dopaminergic and dopaminocceptive regions of the rat brain in response to morphine." *Brain Res Mol Brain Res* 111(1-2): 74-83.
62. Stafford, K., A. B. Gomes, et al. (2001). "mu-Opioid receptor downregulation contributes to opioid tolerance in vivo." *Pharmacol Biochem Behav* 69(1-2): 233-7.
63. Stain, F., M. J. Barjavel, et al. (1995). "Analgesic response and plasma and brain extracellular fluid pharmacokinetics of morphine and morphine-6-beta-D-glucuronide in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* 274(2): 852-7.
64. Teodorov, E., A. T. Tomita, et al. (2008). "Behavioral effects of acute stimulation of kappa-opioid receptors during lactation." *Pharmacol Biochem Behav* 90(4): 534-9.
65. Timar, J., Z. Gyarmati, et al. (2005). "The development of tolerance to locomotor effects of morphine and the effect of various opioid receptor antagonists in rats chronically treated with morphine." *Brain Res Bull* 64(5): 417-24.
66. Tjon, G. H., T. J. De Vries, et al. (1995). "Intermittent and chronic morphine treatment induces long-lasting changes in delta-opioid receptor-regulated acetylcholine release in rat striatum and nucleus accumbens." *Eur J Pharmacol* 283(1-3): 169-76.
67. Tjon, G. H., T. J. De Vries, et al. (1994). "Repeated and chronic morphine administration causes differential long-lasting changes in dopaminergic neurotransmission in rat striatum without changing its delta- and kappa-opioid receptor regulation." *Eur J Pharmacol* 252(2): 205-12.
68. van Ree, J. M., M. A. Gerrits, et al. (1999). "Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine." *Pharmacol Rev* 51(2): 341-96.
69. Wardlaw, S. L. and A. G. Frantz (1983). "Brain beta-endorphin during pregnancy, parturition, and the postpartum period." *Endocrinology* 113(5): 1664-8.
70. Whistler, J. L., H. H. Chuang, et al. (1999). "Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction." *Neuron* 23(4): 737-46.
71. White, D. A., M. L. Hwang, et al. (2005). "Naltrexone-induced conditioned place aversion following a single dose of mor-

- phine in the rat." *Pharmacol Biochem Behav* 81(3): 451-8.
72. Wikler, A., H. Norrell, et al. (1972). "Limbic system and opioid addiction in the rat." *Exp Neurol* 34(3): 543-57.
73. Yim, A. J., C. M. Miranda-Paiva, et al. (2006). "A comparative study of morphine treatment regimen prior to mating and during late pregnancy." *Brain Res Bull* 68(5): 384-91.
74. Zhang, Z. and G. Schulteis (2008). "Withdrawal from acute morphine dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze." *Pharmacol Biochem Behav* 89(3): 392-403.

Behavioural studies during the gestational-lactation period in morphine treated rats

Opioids impair the maternal behaviour of experimental animals. The effect of morphine on maternal behaviour in rat dams treated chronically with morphine during the whole pregnancy and lactation has not been yet analysed systematically. **Objective:** The aim of our work was to investigate the behavioural effects of moderate dose morphine administered constantly in the whole perinatal period in rats. **Methods:** Nulliparous female rats were treated with 10 mg/kg morphine s.c. once daily, from the day of mating. Maternal behaviour was observed, the effects of acute morphine treatment on the maternal behaviour and whether this effect could be antagonised by naloxone were also investigated. Physical and other behavioural (anxiety-like signals in elevated plus maze, changes in locomotor activity) withdrawal signs precipitated by naloxone were registered. After weaning sensitivity to the rewarding effect of morphine was measured by conditioned place preference and to the aversive effect of naloxone by conditioned place aversion tests. Antinociceptive test on tail-flick apparatus was performed to investigate the changes in morphine antinociceptive effects due to chronic morphine treatment. **Results:** Maternal behaviour was significantly impaired in morphine-treated dams. This effect of morphine lasted c.a. 2-3 hours a day, it showed dose-dependency and was enhanced in MO-treated group (sensitisation). Only weak physical and no other behavioural (anxiety-like behaviour or hypolocomotion) withdrawal signs were precipitated by naloxone. The positive reinforcing effect of morphine and aversive effect of naloxone were markedly increased on conditioned place paradigm. Significant antinociceptive tolerance was not seen. **Conclusion:** Although human drug abuse can be hardly modelling under experimental circumstances, our constant, relatively moderate dose morphine treatment administered once daily during the whole pregnancy and lactation resulted in several subtle behavioural changes in dams. In perinatally opioid-exposed offspring short- and long-term behavioural disturbances can be detected which is well-known from literature. Besides direct pharmacological effects of morphine impaired maternal responsiveness and pup care could play a role in these disturbances.

Keywords: antinociception, conditioned place preference, dependence, gestation, lactation, morphine, maternal behaviour, naloxone, perinatal, rat, withdrawal