

## Pre-clinical Addiction Research: Selected Methods

### *Vybrané metody preklinického výzkumu v adiktologii*



PUSHKINA, N.<sup>1</sup>, ŠUSTKOVÁ-FIŠEROVÁ, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Addictology, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Institute of Pharmacology, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

**Citation:** Pushkina, N., Šustková-Fišerová, M. (2014). Pre-clinical Addiction Research: Selected Methods [Vybrané metody preklinického výzkumu v adiktologii]. *Adiktologie*, 14(3), 264–283.

**SUMMARY:** The wide-ranging issue of drug use and substance addiction makes addictology a multifaceted field of study. Accordingly, research into such issues must be equally multifaceted and comprehensive in embracing the bio-psycho-socio-spiritual model of addiction. Preclinical approaches play an indispensable role in the research methods employed in addictology. Animal model-based experiments are common and useful tools for studying factors that are significant in terms of the development and maintenance of addiction, while providing valuable information needed to understand the core addiction-related mechanisms. The use of animals in pre-clinical research requires strict adherence to the ethical code, the choice of alternative methods, where applicable, and the refinement of the existing animal models. The present re-

**SOUHRN:** Adiktologie je velmi komplexním oborem, jenž zahrnuje veškerou širokou problematiku užívání drog a závislostí na návykových látkách. Proto i výzkum této problematiky musí být komplexní a mnohoúrovňový, s akceptací stále aktuálního bio-psycho-socio-spirituálního modelu závislosti. V rámci výzkumných metod užívaných v adiktologii hrají preklinické přístupy nezastupitelnou roli. Experimenty na zvířecích modelech jsou výhodně a široce užívané ke studiu faktorů významných pro rozvoj a udržování závislostí a poskytují cenné informace nutné k porozumění klíčovým mechanismům v problematice závislostí. Nezbytnou součástí užívání zvířat v preklinickém výzkumu je přísná akceptace etického kodexu, eventuální volby alternativních metod, zdokonalování již existujících zvířecích modelů atp. V tomto přehledovém článku jsou

**Submitted:** 1 / OCTOBER / 2014

**Accepted:** 23 / OCTOBER / 2014

**Grant support:** Project CZ.2.17/3.1.00/36064 OPPA "Innovation of the Doctorate Study Program of Addictology at the General University Hospital in Prague and the 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague with Recent Perspectives in Biomedicine". GAUK 742214, PRVOUK34.

**Address for correspondence:** Nina Pushkina, M.D. / [Nina.pushkina@vfn.cz](mailto:Nina.pushkina@vfn.cz) / Department of Addictology, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Apolinářská 4, 128 00 Prague 2, Czech Republic

view summarises selected methods commonly used in pre-clinical addiction research. In addition to general basic behavioural methods, specific models of addiction are presented. Animal models of addiction are utilised in research into the addictive potential of drugs and in testing new pharmaceuticals to be used to treat addiction. They also provide a framework for psychological therapeutic or preventive tools intended to promote coping strategies in clients with a chemical dependency.

**KEY WORDS:** PRE-CLINICAL RESEARCH – BEHAVIOUR METHODS – ANIMAL MODELS OF ADDICTION – DRUG-CONDITIONED PLACE PREFERENCE – DRUG “SELF-ADMINISTRATION” METHOD – DRUG DISCRIMINATION – MICRODIALYSIS

## ● 1 INTRODUCTION

Recently the problem of addiction has been perceived (not only by addictology) in terms of the bio-psycho-social model, which is sometimes extended to include the spiritual dimension (Kudrle, 2008). This is also one of the reasons why in the Czech Republic the discipline of addictology has been defined as a standalone transdisciplinary field of study to integrate all these perspectives into a single domain. Accordingly, addictological research is very comprehensive and multifaceted in its nature.

The progressive development of neurosciences, intensive research making use of specific experimental (mostly animal) models and methods, the use of highly sensitive brain imaging techniques (in humans too), neurochemical methods (*in vivo* microdialysis in the CNS), molecular biology, and genetics have yielded an extensive body of important evidence. Research into addictive behaviours (including overeating and pathological gambling) has received much attention in developed countries. A thorough understanding of the mechanisms that are responsible for the effects of drugs and the development of addiction is vital for the effective prevention and treatment of addiction. Using the powerful resources of modern neurosciences, addiction science should seek to understand the genetic/epigenetic, cellular, and molecular mechanisms that mediate the transition/change from occasional controlled drug use to drug dependence, i.e. the loss of behavioural control over drug-seeking and drug-taking, and to chronic relapse

shrnuty vybrané, často užívané metody preklinického výzkumu v oboru adiktologie. Jsou zde uvedeny obecné základní behaviorální metody a především pak specifické modely závislosti. Animální modely závislosti se uplatňují ve výzkumu návykového potenciálu drog, při testování nových léčiv v terapii závislosti a zároveň také poskytují podklad pro psychologické terapeutické či preventivní prostředky ke zlepšení zvládnání zátěžových situací u pacientů závislých na návykových látkách.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** PREKLINICKÝ VÝZKUM – BEHAVIORÁLNÍ METODY – ANIMÁLNÍ MODEL Y ZÁVISLOSTI – DROGOU PODMÍNĚNÁ PREFERENCE MÍSTA – METODA „AUTOAPLIKACE“ DROGY – ROZPOZNÁVÁNÍ DROGY – MIKRODIALÝZA

## ● 1 ÚVOD

V posledních letech (nejen v adiktologii) se na problém závislosti nahlíží jako na bio-psycho-sociální model, který bývá někdy rozšířen o rovinu spirituální (Kudrle, 2008). I proto je obor adiktologie v ČR definován jako samostatný transdisciplinární vědecký obor, který spojuje všechna tato hlediska do jednotné sféry. Proto také má výzkum v adiktologii velmi komplexní a víceúrovňový charakter.

Progresivní rozvoj neurověd, intenzivní výzkum s využitím specifických experimentálních (především animálních) modelů a metod, užití vysoce citlivých zobrazovacích technik mozku (i u lidí), metod neurochemických (mikrodialýza CNS *in vivo*), molekulární biologie, genetiky atp., byly a jsou stálým zdrojem velkého množství zásadních poznatků. Ve vyspělých zemích se výzkumu závislostního chování (jež zahrnuje i přejídání, patologické hráčství atp.) dlouhodobě věnuje značná pozornost. Co nejdůležitější poznání mechanismů účinků drog i mechanismů závislostních je nezbytným základem pro účinnou prevenci i terapii v adiktologii. Současným úkolem adiktologického výzkumu v rámci neurověd je především porozumět genetickým/epigenetickým, buněčným a molekulárním mechanismům, jež zprostředkovávají přechod/změnu z občasného, kontrolovaného užívání drogy na drogovou závislost, tedy ztrátu behaviorální kontroly nad vyhledáváním a příjmem drogy a nad chronickými relapsy po třeba i velmi dlouhodobé době abstinence (Koob and Volkow, 2010).

V rámci výzkumu problematiky nadužívání látek (psychotropních, omamných atp.) a závislostního chování (včet-

even after a very long period of abstinence (Koob and Volkow, 2010).

The scientific enquiry into the abuse of (psychotropic, narcotic, etc.) substances and addictive behaviour involves practically all levels of research, i.e. pre-clinical and clinical research featuring a wide range of investigational approaches, from preparatory phases taking place separately from the organism (e.g. syntheses of substances, including potential medicinal agents), binding studies (the testing of substances in terms of their abilities to influence binding sites/receptors) etc., the (sub-)molecular level (*in vitro*) and research into tissues/tissue cultures and entire organs (*in situ* methods) to methods involving the entire organism (*in vivo*) (in organisms that are either alert and unrestrained or anaesthetised) (Tables 1–6).

State-of-the-art research at all levels has been using cutting-edge instrumentation and automated testing, specifically computerised data collection and evaluation, which helps in standardising and objectivising the research techniques (making them more independent of the researcher=investigator). In addition, the correct statistical assessment of data (including the choice of statistical method and the size of the samples under comparison) is crucial for any research.

This review article deals only with selected methods of pre-clinical experimental addiction research. Animal testing plays a significant role in the understanding of both the biological and environmental factors which are involved in the development of substance addiction. Animal experimentation makes it possible to create specific conditions and model situations where changes can be looked for with respect to selected elements only, which is hardly feasible in human studies. Recent addiction research has used a number of specific experimental animal models of drug addiction designed to examine various stages of the addiction process (including the initiation of substance use, recreational use, the loss of control over usage, drug withdrawal syndrome, and relapse) and factors which affect liability to the development of addiction.

Research into substance addiction is concerned with the individual stages (and their mutual correlates) of a composite addiction cycle, consisting of three basic reiterating and interacting components – a) binge/intoxication, b) withdrawal/negative affect, and c) preoccupation/anticipation (craving). As previously stated, major progress in our understanding of drug addiction mechanisms has been achieved by trials performed on animal models of chemical dependency (in mice, rats, primates, etc). While no animal model can fully capture the human condition in all its aspects, they can be used to study specific elements of the process of drug addiction. Such elements can be defined as animal models of different stages of the addiction cycle – for example, a) binge/intoxication (drug self-administration

ně závislosti na návykových látkách) se využívají prakticky veškeré výzkumné roviny: tedy výzkum předklinický/preklinický a klinický v širokém spektru rovin přístupů/výzkumu: od přípravných fází mimo organismus (např. syntézy látek včetně potenciálních léčiv) a dále např. vazebných studií (testování schopnosti látek ovlivňovat vazebná místa/receptory) atp., od (sub)molekulární úrovně (*in vitro*) přes výzkum v rovině tkání/tkáňových kultur a celých orgánů (*in situ* metody) k metodám prováděným na celém organismu (*in vivo*) (v bdělém stavu u volně se pohybujících organismů nebo v anestetizovaném stavu) (tabulka 1–6).

Současný výzkum stále více a na všech úrovních využívá různé, často špičkové přístrojové vybavení a automatizaci testování resp. počítačový sběr a vyhodnocování dat, což výzkumné techniky standardizuje a navíc je objektivizuje (činí je více nezávislými na výzkumníkovi/pozorovateli) atp. Velice významnou úlohu ve veškerém výzkumu má správné statistické zhodnocení dat (volba statistické metody, velikost porovnávaných souborů atp.).

Tento přehledový článek se věnuje pouze vybraným metodám preklinického experimentálního výzkumu v adiktologii. Pokusy na zvířatech mají podstatnou roli pro pochopení jak biologických faktorů, tak faktorů prostředí, které se podílejí na rozvoji závislosti na návykových látkách. Experiment na zvířeti totiž umožňuje vytvoření specifických podmínek a modelových situací, kdy můžeme studovat změny pouze u vybraných prvků. To je v případě humánních studií jen těžko proveditelné. V poslední době je v adiktologickém výzkumu využívána řada specifických experimentálních modelů drogových závislostí na zvířatech, zaměřených na výzkum různých fází procesu závislosti (zahájení

**Table 1 / Tabulka 1**

Pre-clinical and clinical research  
*Preklinický a klinický výzkum*

<b>Pre-clinical research</b>	Research conducted outside the human organism, mostly on animals, on various levels – see below
<b>Clinical research</b>	Research conducted on humans, on various levels again, involving: epidemiological methods, social (questionnaire) methods, psychological methods, qualitative methods (methods based on the grounded theory approach), narrative methods, case studies, molecular methods (biological sampling), highly sensitive imaging techniques, clinical trials of medicinal products, genetic studies, combinations of approaches, etc.

**Table 2 / Tabulka 2**

Addiction research methodologies – general categorisation – by level of enquiry

*Možné základní rozdělení výzkumných metodik v adiktologii – podle zkoumané úrovně*

(sub-)molecular methods:  binding studies, biological tissue sampling, blood sampling, collection of samples of cerebral and other structures/tissues and their subsequent analysis, etc.	Methods at the level of a tissue culture, or the entire organ – “in situ”, etc.	Methods at the level of the entire organism/animal – “in vivo” (subjects either anaesthetised or unrestrained)  (see Table 3)
---	---	---

**Table 3 / Tabulka 3**

*In vivo* methods at the entire animal level used in addiction research

*Metody na úrovni celého zvířete – „in vivo“ užívané v adiktologii*

1	Behavioural methods – (see Table 4)	
2	Electrophysiological methods – EEG Highly sensitive imaging techniques etc.	
3	Combined methods	Neurobiological methods – e.g. <i>in vivo</i> brain microdialysis (behavioural + molecular method), etc.  Neurophysiological methods – scanning of electrical activities in the CNS structures (behavioural + electrophysiological methods), etc.
4	Special models of addiction – (see Table 5)	
5	and others	

**Table 4 / Tabulka 4**

The most common behavioural methods used in addiction research

*Nejužívanější behaviorální metody užívané v adiktologii*

1	Testing of motor activities	Basic motor skills, general locomotor activity, exploratory activities in an activity cage – “open field”, etc.
2	Testing of emotionality	Anxiety – “elevated plus-maze” Aversive ultrasonic vocalisation test, etc.  Social behaviour – social interaction method; social defeat method (“intruder-resident test”), etc.
3	Testing of memory	Various types of maze, Morris water maze, etc.

**Table 5 / Tabulka 5**

Special models of addiction

*Speciální modely závislosti*

1	Drug-conditioned place preference test
2	Drug self-administration test
3	Drug discrimination test
4	Electrical self-stimulation of CNS structures test

**Table 6 / Tabulka 6**

Effects of well-known drugs of abuse in selected experimental models of drug addiction (M. Šustková, according to Koob 2009, Koob and Volkow 2010 and others)

*Účinek známých zneužívaných drog ve vybraných experimentálních modelech drogové závislosti (M. Šustková podle Koob, 2009; Koob et Volkow, 2010 a dalších)*

Experimental model	Substances with a “reinforcing” effect	Substances the “reinforcing” effect of which was not proved
<b>Self-administration test</b>	Psychostimulants (amphetamine, cocaine), opiates (morphine, heroin), dissociative anaesthetics (PCP), barbiturates, benzodiazepines, ethyl alcohol, nicotine, solvents, cannabis (the effect was not confirmed beyond reasonable doubt)	Hallucinogens
<b>Drug-conditioned place preference test</b>	Psychostimulants (amphetamine, cocaine), opiates (morphine, heroin), benzodiazepines, ethyl alcohol, nicotine, solvents, barbiturates (in a specific test arrangement)	Dissociative anaesthetics (PCP) (induce aversion to a drug-conditioned place)
<b>Discriminative-cue effect test</b>	The test shows that practically all currently well-known drugs can be distinguished by an animal from other substances	

methods; drug-conditioned place preference-based testing; brain stimulation and reward thresholds-based testing), b) withdrawal/negative affect (anxiety testing; conditioned place/taste aversion; testing of elevated reward thresholds; the method of increased motivation for self-administration in dependent animals), c) craving/anticipation (the method based on drug-, cue-, or stress-induced reinstatement of drug-seeking behaviour) (Koob and Volkow 2010; Koob 2009; Koob et al. 2009; Šustková 2014). The models use behavioural, neurochemical (e.g. microdialysis), molecular and genetic/epigenetic techniques and various combinations thereof.

Animal experiments are often brought up as an ethical issue. In "The Principles of Humane Experimental Technique", W. M. S. Russell and R. L. Rurch introduced the "Three Rs" (Replacement, Reduction, Refinement) tenet, which is currently considered the core principle of the responsible and reasonable use of animals in experiments. The 3 Rs principle is sometimes extended to include a fourth "R" (Responsibility). "Replacement" means that test animals must be replaced by non-animal alternatives, such as *in vitro* methods (involving cellular and organ cultures), whenever possible. "Reduction" refers to the smaller number of test animals which can be achieved by applying sensible testing designs, selecting suitable kinds of animals, using biomodels and appropriate statistical procedures, and by sharing animals used for research. As in human studies, each study involving animals must be based on statistical rules which determine the minimum size of experimental groups for the study results, or statistical significance levels, to have sufficient validity. "Refinement" implies that animals should be treated considerately throughout their participation in research. "Responsibility" refers to responsible attitudes to animals (Vaculín, 2000).

Besides the above-mentioned ethical principles, experimental research is governed by a number of additional general rules of major importance. Both experiments on animals and their husbandry when the experiments are not under way must take place in an accredited standard setting (an accredited menagerie and test rooms for experiments on the whole animal) and under standard conditions as defined by the law (in the Czech Republic Act No. 246/1992 Coll. on the protection of animals against cruelty is the relevant legal regulation in this respect). These include a standard room temperature and humidity, sufficient soundproofing, and the observance of a lighting regime (mostly set at 12-hour cycles). The persons who come into contact with laboratory animals (both attendants and researchers) must be properly qualified and trained for work with laboratory animals (staff accreditation). Furthermore, each experimental study must feature a control animal group (this also applies to molecular and other types of both pre-clinical and clinical research). In comparison to

užívání návykové látky, rekreační užívání, ztráta kontroly nad užíváním, syndrom odnětí drogy, recidiva atp.) a dále na faktory, které ovlivňují náchylnost k rozvoji závislosti.

Výzkum závislosti na návykových látkách zkoumá jednotlivé fáze (a jejich vzájemné souvislosti) složeného cyklu závislosti, který sestává ze tří základních komponent, jež se opakují a navzájem interagují – a) aplikace/zaplavení organismu drogou („binge“, příjem drogy do přebytku), b) odnětí drogy/negativní dopad („withdrawal“, c) zabývání se drogou/očekávání/„craving“ („preoccupation/occipitation“). Jak už bylo uvedeno, pokroku v porozumění mechanismů DZ výrazně přispívají výzkumné experimenty na zvířecích modelech DZ (u myší, potkanů, primátů atp.). Žádný zvířecí model nemůže úplně a komplexně postihnout lidské podmínky, zato však naopak lze studovat jednotlivé prvky procesu DZ. Takové prvky mohou být definovány jako animální modely různých stadií závislostního cyklu – např. a) komponenty aplikace/intoxikace (metody autoaplikace drogy; test drogou podmíněné preference místa; testy mozkové stimulace a prahové odměny), b) odnětí drogy/negativní příznaky (testování anxiety; podmíněná averze k místu/chuti; testování zvýšeného prahu odměny; metoda zvýšené motivace pro autoaplikaci u závislých zvířat), c) craving/očekávání (metody drogou, jinou látkou nebo stresem vyvolaného návratu k droze – obnova příjmu drogy atp.) (Koob et Volkow, 2010; Koob, 2009; Koob et al., 2009; Šustková, 2014). V modelech jsou využívány behaviorální, neurochemické (např. mikro dialýza), molekulární i genetické/epigenetické techniky a jejich kombinace.

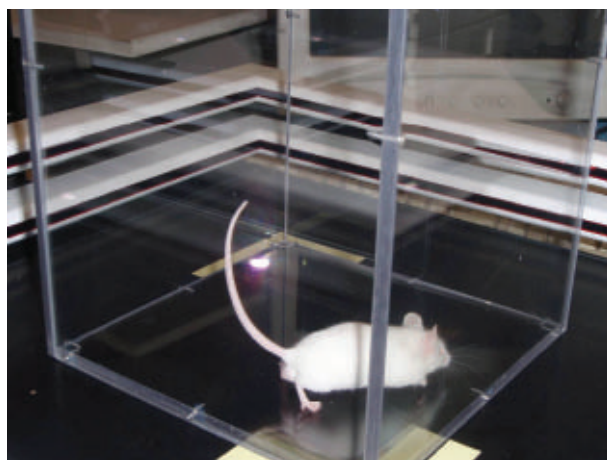
Z etického hlediska jsou experimenty na zvířatech velmi často diskutovaným problémem. V roce 1959 formulovali W. M. S. Russel a R. L. Rurch ve své knize „The Principles of humane experimental technique“ koncepci tří „R“ (reduction, replacement, refinement), která je v současné době považována za hlavní zásadu odpovědného a rozumného užití zvířat v pokusech. Někdy se k zásadě 3 „R“ přidává ještě čtvrté „R“ (responsibility). „Replacement“ znamená, že pokud je to možné, je bezpodmínečně nutné pokusné zvíře nahradit využitím jiných metodik, např. *in vitro* (buněčné a orgánové kultury). „Reduction“ je snížení počtu pokusných zvířat, kterého je možno dosáhnout rozumným projektováním pokusu, výběrem vhodných druhů zvířat, užitím biomodelů, adekvátních statistických postupů a sdílením používaných pokusných zvířat. Každá studie na zvířatech (stejně jako u humánních studií) musí vycházet ze statistických pravidel, jež určí minimální velikost experimentálních skupin tak, aby výsledky studie resp. dosažené statistické významnosti byly dostatečně validní. „Refinement“ označuje šetrné zacházení se zvířetem po celou dobu jeho účasti ve výzkumu. „Responsibility“ znamená zodpovědný přístup ke zvířatům (Vaculín, 2000).

Experimentální výzkum se vedle výše zmíněných etických principů řídí řadou dalších důležitých obecných pravi-





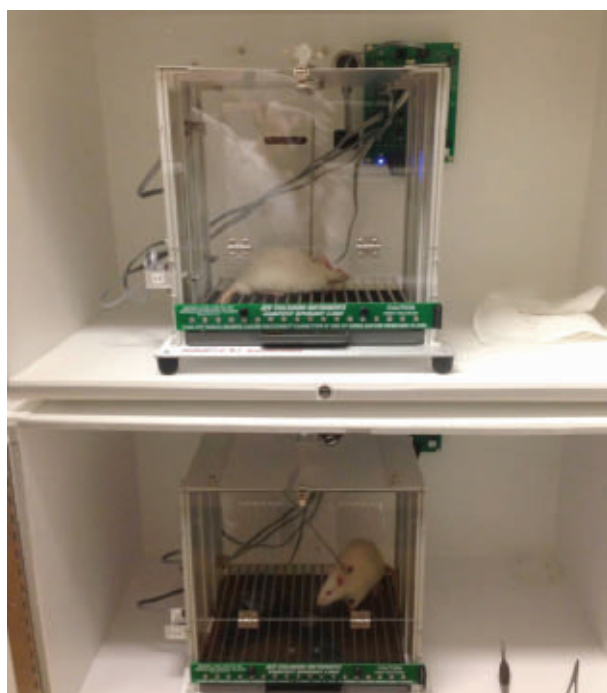
**Figure 1 / Obrázek 1**  
Breeding of laboratory animals / *Chov zvířat*



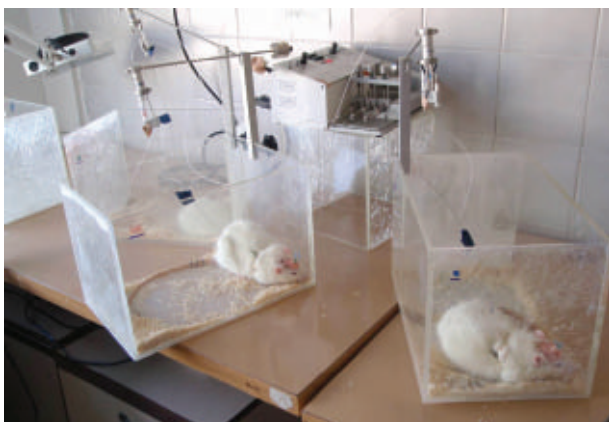
**Figure 2 / Obrázek 2**  
Open Field Test / *Test Open Field*



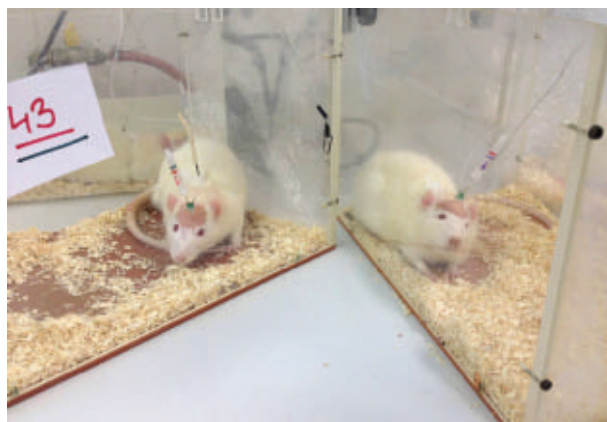
**Figure 3 / Obrázek 3**  
Elevated plus-maze / *Vyvýšené bludiště tvaru plus*



**Figure 4 / Obrázek 4**  
Intravenous self-administration / *Intravenózní autoaplikace*



**Figure 5 / Obrázek 5**  
*In vivo* microdialysis / *In vivo mikrodialýza*



**Figure 6 / Obrázek 6**  
*In vivo* microdialysis / *In vivo mikrodialýza*

the “standard” reference group (where a well-established agent, a “standard”, is applied instead of a new substance under investigation), “control” experimental subjects are exposed to testing conditions and procedures which are totally identical to those applied to “investigational” subjects, but a “placebo/vehicle” is administered instead of a study agent. (*Fig. 1.*)

The next part of the article provides a general description of selected common methods and specific models of addiction used in pre-clinical experimental addiction research (see the division of methods in the *Tables 1–6*).

## ● 2 BEHAVIOURAL METHODS

Behavioural methods refer to a largely diversified set of experimental methods (applied to the whole animal) aimed at observing the behaviour of a subject in various model situations. As “drug”-type substances always influence individual behaviour, behavioural methods are widely used in addictological research. These methods are based on the principles of ethology. Ethology is a field of study concerned with the investigation of animal behaviour. Behaviour is a body of spontaneous actions performed by animals (e.g. the exploratory activities of rodents in unknown environments) in response to changes in their environment, as well as internal changes (such as pain). The methods use the knowledge of the spontaneous behaviour/responses of specific animal species (mostly small animals, rodents, etc.) under certain conditions. Behavioural experiments are very often conducted in reversed daily rhythm, as mice or rats, for example, show their greatest activity at night. The basic types of behaviour employed in addiction research include animals’ spontaneous activities (the testing of motor and exploratory actions), emotionality (e.g. fear and anxiety and social behaviour and interaction), learning, and memory.

### ● 2 / 1 Testing of spontaneous activities in animals

The easiest way to test spontaneous animal behaviour, i.e. mostly natural exploratory activities in new environments, is to observe the subject “in **the open field**”. (*Fig. 2.*) This method was first described by two American psychology professors, Calvin Hall and Egerton Ballachey, as early as 1932 (Barclay and Gibson, 1982; Hall and Ballachey, 1932)

In this test, an animal (usually a small rodent) is placed in a novel environment, generally a square arena of adequate size, located in a quiet setting (preferably an isolated room). The behaviour of the animal in the arena is usually monitored (i) by a video camera positioned above the arena and connected to an authorised computer system (such as EthoVision by Noldus) or (ii) the movement of the animal is monitored automatically by means of a system of photocells installed in two parallel planes in the walls of the

del. Experimenty i chov zvířat v době mimo pokusy musí probíhat v akreditovaném standardním prostředí (akreditovaný zvěřinec a pokusné místnosti pro experimenty na celém zvířeti) za standardních podmínek, jež jsou definovány zákonem (v ČR je v současné době platný Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání). Jedná se např. o standardní teplotu a vlhkost v místnosti, dostatečnou zvukovou izolaci, dodržování světelného režimu (většinou nastaveného na 12hod. cykly) atp. Osoby, které přicházejí do styku s laboratorními zvířaty (ošetřovatelé i výzkumní pracovníci), musí mít odpovídající kvalifikaci a absolvovat proškolení pro práci s pokusnými zvířaty (akreditace pracovníků). Dále, každá experimentální studie musí mít vždy tzv. kontrolní srovnávací skupinu zvířat (což platí i v případě molekulárních a jiných rovin preklinického a někdy i klinického výzkumu). Na rozdíl od „standardní“ srovnávací skupiny (kde je např. místo nové testované látky aplikována již dobře známá látka, tzv. „standard“), „kontrolní“ experimentální jedinci procházejí naprosto stejnými pokusnými podmínkami i procedurami jako „testování“ jedinci, ale místo testované látky je aplikováno „placebo“/vehikulum. (*Obr. 1.*)

V následujícím textu článku bude uveden základní popis vybraných, často užívaných metod a specifických modelů závislosti užívaných v preklinickém experimentálním adiktologickém výzkumu (viz rozdělení metod v *tabulkách 1–6*).

## ● 2 BEHAVIORÁLNÍ METODY

Pod pojmem behaviorální metody rozumíme celou různorodou skupinu experimentálních metod (na celém zvířeti), jež sledují změny chování jedince v různých modelových situacích. Látky typu „drog“ vždy ovlivňují chování jedince, a proto jsou behaviorální metody v adiktologickém výzkumu široce využívány. Tyto metody jsou tedy založeny na principech etologie. Etologie je vědní obor zabývající se studiem chování živočichů. Chování je souhrn reakcí, kterým se živočich (zde zvíře) spontánně projevuje (pátrací aktivita v novém prostředí u hlodavců atp.) a kterým reaguje na změny prostředí, eventuálně i na vnitřní změny (bolest atp.). Metody využívají znalostí spontánního chování/reakcí daného zvířecího druhu (většinou malá zvířata, hlodavci) v určitých podmínkách. Velmi často probíhají behaviorální experimenty v převráceném denním/nočním rytmu, protože např. myši nebo potkani vykazují největší aktivitu v noci. Mezi základní typy chování používané ve výzkumu v adiktologii patří spontánní aktivita zvířete (testování motoriky a explorační aktivity), emocionalita (strach a úzkost, sociální chování a interakce), učení a paměť.

### ● 2 / 1 Testování spontánní aktivity zvířat

Spontánní aktivita zvířat, tedy nejčastěji přirozená explorační/pátrací aktivita v novém prostředí, se nejjednodušeji testuje sledováním pohybu zvířete v tzv. „**otevřeném poli**“

arena, which makes it possible to track the horizontal and vertical activities and the movement trajectories.

This automated record of the activity of the animal in the arena can also be complemented by the behavioural parameters (e.g. grooming, shaking, sniffing, licking, stereotypical subtle movements, etc.) being watched by an independent observer (Curzon et al., 2008).

The locomotor activities under observation may be influenced by the administration/effect of psychoactive substances. Stimulants (cocaine, amphetamines, etc.), for example, tend to increase the overall motor activities at lower doses, while at higher doses they cause the activity of the animal to decrease and give way to repetitive behaviour (such as typical head movements). Sedatives tend to reduce animal activity (Schramm-Sapyta et al., 2009; Curzon et al., 2008).

To a certain degree, the "open field" may be used to assess the level of anxiety in the animal. Elevated anxiety is manifested by reduced exploratory activity, thigmotaxis (the animal spending less time in the centre of the arena), and freezing (the time the animal spends motionless). The frequency of defecation is sometimes also considered a measure of fear (Curzon et al., 2008).

The assessment of the locomotor activities of animals must take into account a number of other influences and factors, including motivation (hungry animals tend to show increased motor activity), age (activity decreases with older age), and general health, which can be compensated for by using an adequate control group (Curzon et al., 2008).

## ● 2 / 2 Testing of Emotionality

Models for testing emotionality in animals have their inevitable limitations, which are determined by the natural constraints of the communication of emotions on the part of animals. A researcher can thus only derive animal emotions from typical signs/elements of their behaviour.

### 2 / 2 / 1 Testing of anxiety and fear

Anxiety and fear are among the easiest emotions to test. A number of experimental methods can be used for this purpose. An **elevated plus-maze** is a simple method for anxiety testing. (Fig. 3.)

Elaborating on the original Y-shaped maze designed by K. C. Montgomery (1955), an elevated plus-maze to test rats was first used by Pellow et al. in 1985 in London as a novel and simple method for the selective identification of the anxiolytic and anxiogenic effects of drugs (Pellow et al., 1985; Montgomery, 1955).

An elevated maze makes use of the innate exploratory activities of rodents and their preference for dark, closed spaces and natural avoidance of open and elevated areas (Becker, 2000). Positioned 40-70 cm above the floor, the plus-maze features two closed (from the sides) and two open

(„**open field**“) (Obr. 2). Metoda byla poprvé popsána dvěma americkými profesory psychologie Calvinem Hallem a Egertonem Ballacheyem již v roce 1932 (Barclay et Gibson, 1982; Hall et Ballachey, 1932).

Zvíře (nejčastěji malý hlodavec) je v testu umístěno do neznámého prostředí, nejčastěji čtvercové arény přiměřené velikosti, umístěné v tichém prostředí (nejlépe v oddělené místnosti). Chování zvířete v aréně je monitorováno většinou (i) pomocí videokamery umístěné nad arénou a napojené na autorizovaný počítačový systém (např. systém „Ethovision“, Noldus) nebo (ii) je pohyb zvířete automaticky monitorován pomocí systému fotobuněk umístěných ve dvou rovnoběžných rovinách ve stěnách arény, takže umožňuje sledovat horizontální a vertikální aktivitu i průběh dráhy pohybu.

Automatický záznam aktivity zvířete v aréně lze ještě doplnit monitorováním jednotlivých prvků chování (grooming, třes, čenichání, olizování, stereotypické jemnější pohyby atp.) nezávislým pozorovatelem (Curzon et al., 2008).

Sledovaná pohybová aktivita může být ovlivňována aplikací/účinkem psychoaktivních látek. Například stimulancia (kokain, amfetaminy) mají tendenci celkovou pohybovou aktivitu zvyšovat při nízkých dávkách, naopak při vysokých dávkách aktivitu zvířete tlumí a převažují stereotypické projevy (typické pohyby hlavou atp.). Sedativa aktivitu zvířat tlumí atp. (Schramm-Sapyta et al., 2009; Curzon et al., 2008).

Pomocí „open field“ lze do určité míry hodnotit i hladinu úzkosti zvířete. Zvýšená úzkost se projevuje snížením explorační aktivity, thigmotaxí (zvíře je méně často ve středu arény), freezingem (doba, po kterou se zvíře nehýbe). Někdy se hodnotí i frekvence defekací jako míry strachu (Curzon et al., 2008).

Při hodnocení pohybové aktivity zvířat je nutno brát v úvahu řadu dalších vlivů a faktorů, např. motivaci (hladová zvířata mají vyšší pohybovou aktivitu), věk (s věkem zvířete klesá pohybová aktivita), celkový zdravotní stav zvířete, což vykompenzujeme užitím odpovídající kontrolní skupiny (Curzon et al., 2008).

## ● 2 / 2 Testování emocionality

Modely, jež testují emocionálnost u zvířat, mají své limity, protože sdělnost pocitů u zvířat je pro výzkumného pracovníka omezená, takže emoce zvířete odhadujeme z určitých typických projevů/prvků v chování.

### 2 / 2 / 1 Testování úzkosti a strachu

Jedněmi z nejsnáze testovatelných emocí jsou úzkost a strach. Můžeme využít řadu experimentálních metod. **Vyvýšené křížové bludiště tvaru plus („elevated plus maze“)** patří mezi nejjednodušší způsoby testování úzkosti. (Obr. 3.)



arms. An animal (a rat or mouse) is placed in the centre where the arms intersect and allowed to move freely around the maze for some time (generally 5-10 minutes) while being tracked by a video camera installed above the maze. The (i) number of entries into the open and closed arms and the (ii) total time spent in each of the arms are recorded. Other elements of behaviour, such as grooming, rearing, and stretching, can also be looked for. A tendency to stay in the open arms suggests a low level of anxiety (Walf and Frye, 2007).

It was found, for example, that acute alcohol intoxication prolongs the time spent by the animal in the open arms of the maze, while alcohol withdrawal elicits anxiety manifested by the rodents avoiding open illuminated spaces (Becker, 2000). The administration of benzodiazepines and other anxiolytic medication significantly increases the time spent in the open arms, without affecting locomotion (Bailey and Crawley, 2008).

Another way of modelling anxiety is by monitoring **aversive ultrasonic vocalisation** (generally in rats). Mutual communication among rats takes place by means of ultrasonic vocalisations (sounds at a frequency over 20 kHz) which are beyond the hearing capacity of the human ear. Rats emit these sounds at three different basic frequencies, depending on their age, affective state, and environmental conditions (Portfors, 2007). Rat pups emit 40-kHz vocalisations when they are separated from their mothers. Short high-pitched sounds (50 kHz) are emitted by rats under non-aversive conditions (e.g. during juvenile play, in relation to sexual behaviour, when overcoming others in a fight, and in response to tactile stimulation by a person they know). 50-kHz vocalisation is thus an indication of positive affect in the animal. On the contrary, sounds at a frequency of 22 kHz are emitted by rats under conditions perceived by them as unpleasant or even aversive (e.g. exposure to stress, the presence of predators, being overcome in a fight, tactile stimulation by a person they do not know). This sonic frequency is also used to warn other animals against potential threats and to inhibit the aggressive behaviour of other rats (Portfors, 2007). The vocalisation of this frequency therefore signals a negative affective state in the animal and functions as an indicator when fear and anxiety in rats are being tested. The communication is monitored by automated sound recording using equipment such as that provided by Med Associates.

Recent studies have found that the administration or self-administration of methamphetamine (Mahler, 2013), MDMA (Sarabanda et al., 2012), and cocaine (Maier et al., 2012) is associated with 50-kHz vocalisations in rats. On the other hand, heroin and alcohol withdrawal states are associated with 22-kHz sound frequencies (Williams et al., 2012).

Vyvýšené křížové bludiště, novou jednoduchou metodu pro selektivní identifikaci anxiolytických a anxiogenních účinků léků užíli poprvé u potkanů Sharon Pellow et al. v roce 1985 v Londýně, inovovali původně Y-tvarované bludiště K. C. Montgomeryho (z roku 1955) (Pellow et al., 1985; Montgomery, 1955).

Vyvýšené bludiště využívá vrozené pátrací aktivity hlodavců, jejich preference tmavých, uzavřených prostor a přirozené vyhýbání se otevřenému vyvýšenému prostředí (Becker, 2000). Bludiště ve tvaru plus má dvě protilehlá ramena krytá (z boků uzavřená) a dvě otevřená a je vyvýšeno (40–70 cm nad podlahou). Zvíře (potkan nebo myš) je umístěno do středu oblasti křížení ramen bludiště a po určitou dobu (většinou 5–10 min) je pomocí videokamery umístěné nad bludištěm sledován jeho volný pohyb v bludišti a je monitorován (i) počet vstupu do otevřených a uzavřených ramen a (ii) celkový čas strávený v každém typu ramen. Kromě toho lze hodnotit další prvky chování jako grooming, pánáčkování, stretching (protážení se) atp. Převaha pobytu v oblasti otevřených ramen je známkou nízké hladiny anxiety (strachu a úzkosti) (Walf et Frye, 2007).

Bylo např. popsáno, že akutní intoxikace alkoholem prodlužuje pobyt zvířete v otevřených ramenech bludiště, naopak odvykávací stav po alkoholu vyvolává úzkost a hlodavci se vyhýbají otevřeným osvětleným prostorům (Becker, 2000). Podávání benzodiazepinů a jiných anxiolytických léků, jež vedou ke snížení úzkosti, výrazně prodlužují pobyt v otevřených ramenech bez ovlivnění lokomoce (Bailey et Crawley, 2008).

Dalším modelem anxiety (strachu a úzkosti) je monitoring **averzivní ultrasonické vokalizace** (nejčastěji u potkanů). Potkani komunikují mezi sebou pomocí ultrazvuku (zvuk o frekvence více než 20 kHz), který leží nad hranicí slyšitelnosti lidského ucha. Potkani vydávají tyto zvuky ve 3 základních frekvencích v závislosti na jejich věku, emotivitě, náladě a okolních podmínkách (Portfors, 2007). Potkani mláďata vydávají zvuky o frekvence 40 kHz v momentě, kdy jsou izolována od matky. Krátce trvající zvuky o vysokých frekvencích (50 kHz) vydávají potkani za příjemných okolností (např. hrající si mláďata, sexuální chování, vítězství v bitce, taktilní stimulace známou osobou). Zvuky o frekvence 50 kHz jsou tedy pro experimentátora signálem pozitivního afektivního stavu zvířete. Naopak, zvuky o frekvence 22 kHz jsou vydávány potkanem v subjektivně nepříjemných, až averzivních podmínkách. Patří sem expozice stresu, predátor, porážka v bitce, taktilní stimulace cizí osobou. Tato zvuková frekvence se také používá k varování ostatních zvířat před eventuální hrozbou, ke zmírnění agresivního chování jiného jedince (Portfors, 2007). Zvuková frekvence 22 kHz je tedy signálem o negativním afektivním stavu zvířete, je indikátorem pro testování strachu a úzkosti u potkanů. Sledování komunikace se

### 2 / 2 / 2 Testing of social behaviour/social interaction

Social interaction models are used to observe interaction between two or more individuals of the same species or even multiple species. In these the observation of behavioural changes is generally based on the monitoring/scoring of selected typical elements of behaviour (postures, positions, etc.) by an impartial observer.

Long-term isolation of individuals (including rodents) was found to highlight certain personality traits, such as a tendency to shyness or aggression. An example of a **social interaction method** is the interaction of a subject which has been kept isolated (singly in a cage) with a non-aggressive individual (kept in a group). In an encounter with the non-aggressive counterpart, the originally isolated subject is likely to show either aggressive or sociable, at times even inhibited, behaviour (these behaviours can be further influenced, e.g. by pre-medication).

The **“social defeat method”** was first described by a psychology professor, Klaus Miczek, in the 1970s (Miczek and O'Donnell, 1978). The method can be used to study aggression, defensive behaviour, and social defeat stress in rodents. By nature, male rats (or mice) (= residents) defend their home territory. In this test, the experimental animal (= male intruder) is placed into the home cage of the male resident, which aggressively defends its territory (its home cage). As a result, the intruder is exposed to social aggression and experiences great social defeat stress, which may repeat over several days (**the chronic social defeat stress model**). To avoid severe injuries in animals during testing, after being physically attacked by the resident for the first time, the intruder is protected by a breathable cover which prevents further physical attacks, but not other manifestations of social antagonism. Repeated exposure to social defeat stress, in particular, may trigger depressive and anxious states (as in humans), which manifest themselves through anhedonia, social isolation, anxiety, elements of learnt helplessness, etc. This method is also used to investigate the effects of stress on substance use. It was found, for example, that animals that were repeatedly exposed to social defeat stress showed an increased intake of cocaine (Cruz et al., 2011) and amphetamine (Burke et al., 2013); the data on the effects of alcohol and opiates was not conclusive in this respect (Becker et al., 2011; Cruz et al., 2011).

### ● 2 / 3 Testing of memory and learning

Memory is the capacity of the organism to encode, store, and retrieve information (including that associated with drug use). Learning is the process of storing information in memory. The learning process involves changes in the neural system which take the form of creating short-term and long-term memory records.

provádí automatickým snímáním zvuků, např. pomocí přístroje Med Associated.

V dosavadních studiích bylo např. zjištěno, že aplikace či autoaplikace metamfetaminu (Mahler, 2013), MDMA (Sarabanda et al., 2012) nebo kokainu (Maier et al., 2012) je spojena s projevy s 50 kHz frekvencí u potkanů. Naopak abstinence od heroinu nebo alkoholu je spojena s 22kHz frekvencí (Williams et al., 2012).

### 2 / 2 / 2 Testování sociálního chování/sociální interakce

V modelech sociální interakce se sleduje interakce mezi dvěma nebo více jedinci stejného druhu nebo i různých živočišných druhů. Sledování změn chování je zde založeno většinou na monitorování/skórování vybraných typických prvků chování (postojů, pozic atp.) nezaujatým pozorovatelem.

Bylo zjištěno, že dlouhodobá izolace u jedince (i u hlodavců) zvýrazňuje určité povahové rysy – např. tendenci k plachosti či tendenci k agresivitě. Jedním z příkladů **metod sociální interakce** je tedy interakce jedince chovaného izolovaně (samostatně v chovné kleci) s neagresivním jedincem (chovaným skupinově). Původně izolovaný jedinec vykazuje při setkání s neagresivním partnerem buď agresivní, nebo sociabilní, výjimečně i plaché chování (tyto projevy chování lze dále ovlivňovat premedikací látek atp.)

**Metoda „sociálního stresu“ („social defeat“)** byla poprvé popsána profesorem psychologie Klausem Miczekem v sedmdesátých letech (Miczek et O' Donnell, 1978). Metoda může být používána pro studium agrese, obranného chování a sociálního stresu u hlodavců. Potkaní (případně myši) samci přirozeně brání své domácí teritorium (=rezident). Při tomto testu je experimentální zvíře (=samec „veteřelec“, „intruder“) umístěno do domácí klece samce rezidenta, který agresivně brání své teritorium (svou domácí klec). Intruder je tedy vystaven sociální agresi a prožívá silný sociální stres, který může být případně v řadě dnů i opakován (**model chronického sociálního stresu**). Aby nedošlo k vážným zraněním zvířat během testování, bývá intruder po prvním fyzickém napadení rezidentem chráněn prodyšným krytem, jenž zabrání fyzickému napadení, ale ne dalším projevům sociální agrese. Zejména opakované vystavení jedince sociálnímu stresu může být spouštěčem depresivních a úzkostných stavů (stejně jako u lidí), které se projevují anhedonií, sociální izolací, úzkostí, prvky naučené bezmocnosti atp. Pomocí této metody se zkoumá i vliv stresu na užívání návykových látek. Zjistilo se např., že opakované vystavení zvířete sociálnímu stresu vede ke zvýšenému příjmu kokainu (Cruz et al., 2011), amfetaminu (Burke et al., 2013), data o účincích alkoholu a opiátů jsou nejednoznačná (Becker et al., 2011; Cruz et al., 2011).

Spatial memory is a type of memory characterised by the ability to encode, store, and retrieve information about the spatial arrangement of the environment. It helps a subject to learn to identify and recognise their position in relation to reference points that surround them. This type of memory involves the creation of a cognitive map of the environment. Spatial orientation in rats is considered an animal model for the study of human memory (Kelemen and Pašálková, 2000).

Various types of mazes (including T-shaped, Y-shaped, and multi-arm designs) are used to examine spatial memory in animals. The “water maze” method, developed by a British professor, Richard Morris, in 1981 (Morris, 1981) – hence also known as the “**Morris water maze**” – is employed very often. This model is widely used because of its high reliability, specificity, and cross-species utility (rats and mice are the most common subjects to be used) (Vorhees and Williams, 2006).

The Morris water maze consists of a circular pool 1.5–2 metres in diameter filled with dyed water. In this pool, a rat must learn to locate a platform hidden under the water surface which is the only place for it to rest. In searching for the platform, the animal can orient itself in the pool only by environmental indications outside the pool structure, i.e. the positions of windows, doors, furniture, lighting, etc. A healthy animal learns to find the way to the platform relatively quickly, within a few days. The behaviour of the animal is tracked by a video camera connected to a computer system. Variables that are measured include latency (the time spent by the rat locating the target site, thigmotaxis (the percentage of time spent by the animal following the wall around the outer perimeter of the pool), total swim path length, types of swim trajectories, and swimming speed.

This method may be utilised to test the potential of addictive substances to influence learning and memory and the reversibility of any disorders that may be caused by such effects. Acute intoxication with ethanol or THC, for example, impairs spatial learning in the water maze. The same effect on learning was also found in relation to acute intoxication with psychostimulants such as cocaine and methamphetamine (Schramm-Sapyta et al., 2009).

## ● 3 SPECIAL MODELS OF ADDICTION

### ● 3 / 1 Conditioned place preference

“**Conditioned place preference**” is a highly acclaimed pre-clinical behavioural method used to assay the rewarding and aversive effects of a substance under study. It is relatively inexpensive and time-saving, requires no surgery, and can be adapted to multiple species (Bardo and Bevins, 2000). Nevertheless, information about the addictive poten-

### ● 2 / 3 Testování paměti a učení

Paměť je schopnost organismu ukládat, uchovávat a vybavovat informace (včetně těch spojených s užíváním drogy). Učení je proces ukládání informace do paměti. Při procesu učení dochází ke změnám nervového systému, které se projevují jako postupné vytváření krátkodobé a dlouhodobé paměťové stopy.

Prostorová paměť je druh paměti charakterizovaný schopností ukládat, uchovávat a vybavovat informace o prostorovém uspořádání okolního prostředí. Tímto způsobem se subjekt učí určovat a rozeznávat vlastní polohu vzhledem k okolním orientačním bodům. Tento druh paměti zahrnuje vytvoření kognitivní mapy prostředí. Prostorová orientace u potkanů je považována za zvířecí model pro studium lidské paměti (Kelemen et Pašálková, 2000).

Pro výzkum prostorové paměti se u zvířat užívají nejrozličnější typy bludišť (např. tvaru „T“, „Y“, víceramenná bludiště atp.). Velmi často se užívá metoda „vodního bludiště“. Metoda byla vyvinuta britským profesorem Richardem Morrisem v roce 1981 (Morris, 1981), proto je nazývána **Morrisovo vodní bludiště** („**Morris water maze**“). Tento oblíbený model je považován za vysoce spolehlivý a vysoce specifický, mezidruhově použitelný (nejčastěji se užívají potkani a myši) (Vorhees et Williams, 2006).

Morrisovo vodní bludiště je tvořeno kruhovým bazénem velikosti 1,5–2 metry v průměru, který je naplněn obarvenou vodou. V bazénu se potkan učí co nejdříve najít ostrůvek ukrytý pod hladinou, jenž je i jediným místem k odpočinku. Zvíře se může v bazénu orientovat (hledat ostrůvek) pouze podle znaků z prostředí mimo prostor bazénu – tj. poloha oken, dveří, nábytku, světlo atp. Zdravé zvíře se naučí najít cestu k ostrůvku relativně rychle během několika dní. Chování zvířete je sledováno pomocí videokamery propojené s počítačovým systémem. Měří se latence (čas), který potkan stráví hledáním ostrůvku, tigmotaxe (procento času, které zvíře stráví blízko stěny při kroužení po obvodu bazénu), celková uplavaná dráha, typ pohybové trajektorie, rychlost plavání atp.

Pomocí metody lze testovat potenciál návykových látek ovlivňovat učení a paměť a reverzibilitu eventuálních poruch. Například akutní intoxikace etanolem nebo THC zhoršuje prostorové učení ve vodním bludišti. Stejný účinek na učení má i akutní intoxikace psychostimulanty, jako jsou kokain a metamfetamin (Schramm-Sapyta et al., 2009).

## ● 3 SPECIÁLNÍ MODELY ZÁVISLOSTI

### ● 3 / 1 Drogou podmíněná preference místa

„Drogou podmíněná preference místa“ („**conditioned place preference**“) patří mezi uznávané preklinické behaviorální metody používané ke studiu odměňovacích a averzivních účinků zkoumané látky. Je to metoda, která je relativ-

tial of a substance being tested that is obtained by means of the self-administration method is still of greater weight.

The conditioned place preference method is based on the proposition of an association/conditioned relationship between the effect of the study substance and a certain well-defined environment in which the substance is administered (Prus et al., 2008). This method is implemented using a set of three interconnectable cages/compartments: both side compartments are the same size, but otherwise easy to distinguish/differentiate (e.g. one compartment has a smooth floor and vertical stripes on its side walls, while the floor of the other consists of a grate and its walls are single-coloured). Smaller and visually neutral, the central compartment is separated from the compartments on the sides by a guillotine/removable doors that make it possible to move between all three compartments.

The conditioned place preference paradigm comprises three steps. In Step I/Part I of the experiment, the animal is placed in the central compartment, and the partitions between the compartments are removed. The time spent by the animal in each of the side compartments is measured (generally as a percentage of the total time, i.e. 100%). The compartment in which the animal spends less time (= unpreferred environment) will be chosen as the site where the study substance will be administered. Step II of the experiment involves the phase of multi-day conditioning/pairing/associating of the administration, or effect, of the study substance with the unpreferred compartment. At this stage, the compartment which was originally preferred by the animal is in turns paired with the administration of a placebo (usually a 0.9% sodium chloride solution). The testing takes place during Step/Phase III. Neither the experimental substance nor the placebo is administered to the animal at the testing stage. The animal is placed into the central compartment again, with the doors to the other compartments being open, and time spent in each of the side compartments is measured. The test result referred to as “drug-conditioned place preference” is achieved when the animal is found to be spending statistically more time in the compartment in which it received the study substance during the conditioning phase of the experiment. If the animal spends a significantly greater amount of time in the compartment paired with the placebo, the indication is that the study substance produces aversive effects – “**conditioned place aversion**” (Prus et al., 2008; Gardner, 2008; Planeta, 2013).

The preference for one environment over the other provides information about the motivational effect of the study substance. If the substance induces a pleasurable state, the subject is expected to spend more time in the compartment where it repeatedly received such a substance (Lynch et al., 2010).

ně levná, časově nenáročná, nevyžaduje chirurgický zákrok, je adaptabilní pro více druhů zvířat (Bardo et Bevin, 2000). Nicméně informace o závislostním potenciálu testované látky získané metodou autoaplikace/selfadministrace mají přece jenom větší váhu.

Metoda conditioned place preference je založena na tom, že se vytvoří spojení/podmíněná vazba mezi účinkem zkoumané látky a určitým, dobře definovaným prostředím, v němž je látka aplikována (Prus et al., 2008). Metoda se provádí v setu tří vzájemně propojených klecí/ komor: obě postranní komory jsou stejně velké, ale jinak jednoznačně rozlišitelné/rozdílné (např. jedna komora má hladké dno a vertikální pruhy na stěnách, druhá komora má dno tvořené roštem a stěny jednobarevné atp.). Menší a vzhledově neutrální centrální komora je od obou postranních komor oddělená gilotinovými/odstranitelnými dveřmi, jež umožní propojení všech tří komor.

Metoda conditioned place preference se skládá ze tří kroků. V prvním kroku/části pokusu se zvíře umístí do centrální komory, otevře se propojení mezi komorami a určuje se doba, kterou zvíře stráví v každé z postranních komor (většinou procenta z celkového měřeného času = 100 %). Komora, ve které zvíře stráví méně času (= nepreferované prostředí), se určí jako komora, v níž bude posléze aplikována zkoumaná látka. Druhým krokem pokusu je fáze několika-denního podmiňování/párování/spojování aplikace resp. účinku testované látky s nepreferovanou komorou. Většinou je v této fázi střídavě zvířetem původně preferovaná komora párována s aplikací placebo (nejčastěji 0,9% roztok chloridu sodného). Během třetího kroku/fáze probíhá vlastní testování. V průběhu testování se zvířeti neaplikuje žádná látka ani placebo. Zvíře je znovu umístěno do centrální komory s otevřenými vstupy do obou postranních komor a sleduje se čas strávený v každé ze dvou postranních komor. Jako „drogou podmíněná preference místa“ se označuje výsledek testu v případě, že zvíře stráví statisticky významně více času v komoře, ve které dostával v podmiňovací fázi pokusu testovanou látku. Pokud ale zvíře stráví významně více času v komoře spárované s placebem, znamená to, že testovaná látka má averzivní účinky – „**podmíněná averze místa**“ („**conditioned place aversion**“) (Prus et al., 2008; Gardner, 2008; Planeta, 2013).

Preference jednoho prostředí před druhým nám poskytuje informaci o motivačním účinku zkoumané látky. Jestliže zkoumaná látka vyvolává stav libosti, můžeme očekávat, že pokusné zvíře stráví více času v komoře, ve které tuto látku opakovaně dostávalo (Lynch et al., 2010).

Za předchůdce metody conditioned place preference se pokládá důmyslná studie amerického psychologa S. D. Spragga „Morfinová závislost u šimpanze“ zveřejněná v roce 1940 (Spragg, 1940). V práci dostávali šimpanzi injekce morfinu tak dlouho, až se u nich rozvinula závislost. Potom byla zvířata vycvičena vybírat mezi dvěma boxy; v černém



In 1940 the American psychologist S. D. S. Spragg published his “Morphine Addiction in Chimpanzees“ (Spragg, 1940). As part of this ingenious study, considered by many as pioneering the conditioned place preference method, chimpanzees were given injections of heroin until they had developed addiction. Then the animals were trained to choose between two boxes; the black box contained a banana, the white box a syringe with morphine. In the drug withdrawal state, the chimpanzee opted for the white box with a syringe, while the black box with a banana was the choice in the state of intoxication.

Horace D. Beach, another American psychologist, is considered the founder of the conditioned place preference method (Liu et al., 2008; Beach, 1957; Bozarth, 1987). This achievement is attributed to his 1955 works in which he described the preference of rats in a Y-shaped maze for the arm associated with morphine injections.

The result of the conditioned place preference-based test is determined by the type of drug, the route of administration, and the dose. Some addictive substances induce both a conditioned place preference and conditioned place aversion, depending on the size of the dose. Other important criteria include the latency and duration of the effects. The rewarding properties of substances with a long latency and duration of action are weaker than those of substances with a rapid onset and short effect (Prus et al., 2008; Bardo and Bevins, 2000).

This method can be used to test the presence of rewarding or aversive effects associated with the administration of the substance/drug, to compare the addictive potential of substances and the potential of substances or other parameters to provoke relapse/reinstatement of drug-seeking behaviour, and to test potential therapeutic compounds that could alleviate the urge to use the drug or block the conditioned place preference (Lynch et al., 2010; Gardner, 2008; Liu et al., 2008).

### ● 3 / 2 Self-administration

Based on a generally accepted model of addiction, the **self-administration** method is considered a “gold standard” in the testing of the addictive potential of substances (Carter and Griffiths, 2009). Substances with the potential to create physical dependence in humans are also self-administered in animal models (Mello and Negus, 1996). The method belongs to the traditional behavioural animal models that reveal the action of drugs as positive reinforcers, which are more potent than “natural reinforcers”, such as food, water, and sex (Lynch et al., 2010).

Independently of each other, several scientists introduced this method in the 1960s. In 1962 James R. Weeks published a work describing the self-administration of morphine in rats (Planeta, 2013; Weeks, 1962) and in 1964 Travis Thomson and Charles R. Shuster reported about

boxu byl banán, v bílém boxu stříkačka s morfinem. Ve stavu odnětí drogy šimpanzi volili bílý box se stříkačkou, ve stavu intoxikace – černý box s banánem.

Za zakladatele metody conditioned place preference se považuje jiný americký psycholog, Horace D. Beach (Liu et al., 2008; Beach, 1957; Bozarth, 1987), který v roce 1955 publikoval práci popisující, jak potkani vycvičení v Y-tvarovaném bludišti, kde pobyt v jednom rameni byl spojen s injekcí morfinu, upřednostňovali pobyt v tomto rameni.

Výsledek testu conditioned place preference je dán typem léku, způsobem podání i velikostí dávky. Některé návykové látky navozují jak conditioned place preference, tak i conditioned place aversion v závislosti na velikosti aplikované dávky. Dalším důležitým kritériem je latence účinku a délka trvání účinku. Látky s dlouhou latencí účinku a dlouhým působením nemají tak výrazné odměňovací vlastnosti na rozdíl od látek, které mají rychlý nastup účinku a krátký efekt (Prus et al., 2008; Bardo et Bevins, 2000).

Pomocí této metody lze testovat: přítomnost odměňovacích nebo averzivních účinků spojených s aplikací látky/drogy, porovnávat potenciál látek k vyvolání závislosti a potenciál látek či jiných parametrů k navození relapsu/návratu k droze, případně testovat potenciální léčiva, jež by snížila touhu po droze, resp. drogou podmíněnou preferenci místa dostávalo (Lynch et al., 2010; Gardner, 2008; Liu et al., 2008).

### ● 3 / 2 Metoda „autoaplikace“

Metoda „**autoaplikace**“ („**self-administrace**“, „**self-administration**“) je nejvíce akceptovaným modelem závislosti, je považována za „zlatý standard“ testování potenciálu látky vyvolávat závislost (Carter et Griffiths, 2009). Látky, jež vyvolávají závislost u lidí, jsou autoaplikovány/sebeadministrovány i ve zvířecích modelech (Mello et Negus, 1996). Metoda patří mezi tradiční behaviorální zvířecí modely odhalující působení drogy jako pozitivního odměňovače/„reinforcer“, který je potentnější než „přírodní odměňovače“, jako např. potrava, voda, sex (Lynch et al., 2010).

Poprvé byla tato metoda popsána v průběhu 60. let 20. století nezávisle na sobě několika vědci. Doktor James R. Weeks v roce 1962 publikoval práci popisující autoaplikaci morfinu u potkanů (Planeta, 2013; Weeks, 1962), Travis Thomson a Charles R. Shuster v roce 1964 popsali autoaplikaci morfinu u opic (Mello et Negus, 1996; Thompson et Schuster, 1964).

Principem metody je získání/dosažení odměny (dávka návykové látky) podmíněné vykonáním určitého úkolu (nejčastěji stlačení páčky, výběr správného otvoru, správná identifikace/výběr nádoby s drogou atp.) (Fišerová, 2000).

Metoda self-administrace se nejčastěji provádí na hlodavcích, ale je vysoce adaptabilní i na jiné druhy zvířat jako psy, kočky, ptáky (Gardner, 2008) a primáty (Lynch et al.,

morphine self-administration in monkeys (Mello and Negus, 1996; Thompson and Schuster, 1964).

The method is based on a reward (a dose of an addictive substance), the receipt/gaining of which is conditioned by the performance of a certain task (pressing a lever, choosing a correct hole, identifying/selecting the correct container with the drug, etc.) (Fišerová, 2000).

The self-administration method is generally applied to rodents, but is highly adaptable to other kinds of animals such as dogs, cats, and birds (Gardner, 2008) and primates (Lynch et al., 2010; Panlilio and Goldberg, 2007; Howell and Fantegrossi, 2008).

The investigational substances/drugs can be administered by various routes, including intravenous, intramuscular, oral, intranasal, intracerebroventricular, and intragastric (Lynch et al., 2010; Schramm-Sapyta et al., 2009; Pechnick et al., 2007; Panlilio and Goldberg, 2007). It generally holds that the same routes of administration as in humans, e.g. alcohol orally, heroin intravenously, etc., should be used.

In the case of oral self-administration (e.g. with alcohol or morphine), animals are offered the drug in drinking containers. For example, one container with plain water and one or more containers with alcohol of various concentrations (5-20%) are placed into a cage at the same time. The position/location of the containers in the cage changes every day. If the animal experiences alcohol as a reward, it starts seeking the container(s) with alcohol. During the experiment (involving self-administration ranging from several days to chronic) regular measurements (usually on a daily basis) of the consumption of the liquids in the containers are taken.

The testing based on the **intravenous self-administration (IVSA)** method begins with an intravenous catheter being surgically implanted in the internal jugular vein (Gardner, 2008). Self-administration sessions are launched after the animal has recovered from the surgery (within several days). The animal learns that a certain action (e.g. pressing the active lever/response device that is connected to a programmed perfusion pump) is followed by/associated with the administration of a substance/drug, i.e. a rewarding sensation. If the animal experiences the administration of the substance as a reward, it tends to repeat the action (pressing the active lever). There are a number of modifications of this test. "Fixed ratio" (FR) refers to a schedule which requires that the animal completes a fixed number of tasks to receive the reward (for example, FR=1 means that each time the active lever is pressed one dose of the substance/drug is delivered into the animal; in the FR=5 arrangement, the animal must press the lever five times to receive one dose of the drug, etc). In a "progressive ratio" (PR) schedule, the number of non-reward presses on the active lever needed to trigger the administration of the drug in-

2010; Panlilio et Goldberg, 2007; Howell et Fantegrossi, 2008).

Testované látky/drogy mohou být aplikované různými cestami – intravenózně, intramuskulárně, perorálně, intranazálně, intracerebroventrikulárně, intragastricky atp. (Lynch et al., 2010; Schramm-Sapyta et al., 2009; Pechnick et al., 2007; Panlilio et Goldberg, 2007). Obecně platí, že se používá stejný způsob podání, jakým je látka aplikovaná u lidí, např. alkohol perorálně, heroin intravenózně atp.

V případech perorální autoaplikace (např. u alkoholu nebo morfinu atp.) je zvířatům nabízena droga v pitných nádobách. Např. do klece jsou umístěny současně: 1 nádoba s čistou vodou a 1 nebo více nádob s různými koncentracemi alkoholu (5–20 %). Pozice/umístění nádob v kleci se každý den mění. Pokud zvíře pocítuje alkohol jako odměnu, začne vyhledávat nádobu/y s alkoholem. Během pokusu (většinou několikadenního až chronického) se pravidelně (většinou denně) měří konzumace tekutin v nádobách.

Testování metodou intravenózní self-administrace (IVSA) začíná chirurgickou implantací intravenózního katétru do v. jugularis interna (Gardner, 2008). Po chirurgickém výkonu se zvíře v průběhu několika dní zotavuje. Potom začínají autoaplikační sezení. Zvíře se naučí, že určitý úkon (např. stlačení aktivní páčky/tlačky, té, jež je spojena s naprogramovanou perfuzní pumpou) je následován/spojen s aplikací látky/drogy, tedy s pocitem odměny. Pokud aplikaci látky zvíře pocítuje jako odměnu, má tendenci úkon (stlačení aktivní tlačky) opakovat. Existuje řada různých modifikací testu. „Fixovaný poměr“ (fixed ratio – FR) znamená, že zvíře dostane odměnu po správném vykonání určitého pevně stanoveného počtu úkolů (např. FR=1 znamená, že při každém stlačení aktivní páčky je zvířeti aplikována jedna dávka látky/drogy; při FR=5 musí zvíře pro dosažení jedné aplikace drogy stisknout páčku 5krát atp.). Při tzv. „progresivním poměru“ (progressive ratio – PR) je počet prázdných stlačení aktivní páčky (=bez odměny) pro dosažení každé aplikace drogy zvyšován geometrickou řadou (Carter et Griffiths, 2009). Toto uspořádání IVSA se používá k posouzení motivace zvířete k získání drogy (Gardner, 2008), resp. k testování potenciálu látky k navození závislosti. Princip autoaplikace zvířetem je provázen řadou nutných ochranných opatření – např. je definován maximální počet injekcí (maximální autoaplikovaná dávka) v určitém časovém intervalu i celkově, každá injekce je následována určitou „přestávkou“ (time out), kdy není droga po stlačení páčky k dispozici (aby nedošlo ke kumulaci dávek) atp. (Carter et Griffiths, 2009). Jako „zlomový bod“ (breakpoint) se označuje nejvyšší počet úkolů (prázdných stlačení aktivní páčky), které je zvíře ochotno provést pro získání odměny (=dávka drogy). (Obr. 4.)

Metoda „autoaplikace“ se používá zejména pro testování potenciálu látky navodit závislost, dále pro testování potenciálních léčiv pro substituci (látky s agonistickým účín-

creases exponentially (Carter and Griffiths, 2009). This IVSA variant is used to assess the motivation of the animal to obtain the drug (Gardner, 2008), or to test the addictive potential of the substance. The principle of self-administration by the animal requires a number of protective measures: e.g. the maximum number of injections (maximum self-administration dose) both within a specific time interval and in total is defined, each injection is followed by a "timeout" during which the drug is not delivered in response to the lever being pressed (to prevent the accumulation of doses), etc. (Carter and Griffiths, 2009). A "breakpoint" refers to the highest number of responses (pressing the active lever with no drug delivery) which the animal is willing to make to be rewarded (= receive the drug). (Fig. 4.)

The self-administration method is primarily used to test the addictive potential of a drug and to test potential substitution agents (substances with agonistic effects) and medication which may be effective in reducing drug consumption (Mello and Negus, 1996). For example, premedication with an opioid receptor antagonist in a self-administration test resulted in a lower breakpoint level (a smaller number of self-administration episodes) (Pechnick et al., 2007). Similar tests may be performed to test environmental influences on drug consumption/self-administration. It has been demonstrated, for example, that the exposure of the animal to stress (e.g. electric shock or social defeat stress) increases the breakpoint level (escalated drug consumption/self-administration) (Gardner, 2008).

### ● 3 / 3 Drug Discrimination

**The drug discrimination method is a valid behavioural technique used in addiction research. It is often utilised in combination with the self-administration and place preference approaches (Stolerman et al., 2011).**

This method is based on the ability of higher living organisms (including rodents and primates) to distinguish various types of central effects, i.e. various states of mind they may be experiencing (Glennon and Young, 2011).

The method is underpinned by the model of learnt operant behaviour. It is generally tested on rats, monkeys, and mice (Carter and Griffiths, 2009; Young, 2009).

The drug discrimination method was first reported in 1951 by the American psychology professor John Janeway Conger. His work compared the behaviour of animals in the states of acute alcohol intoxication and sobriety (Donald and Overton, 1991).

The drug discrimination test assays the subjective effect of an addictive substance on an animal organism. It comprises four elements: (i) a motivated animal (a food-deprived animal learns more easily if food is the reward), (ii) the administration of an addictive substance capable of altering the state of mind and perception or a pla-

cem), nebo léčiv snižujících konzumaci drogy (Mello et Negus, 1996). Např. premedikace antagonistou opioidních receptorů v testu self-administrace vede ke snížení hodnoty zlomového bodu (pokles autoaplikací) (Pechnick et al., 2007). Obdobně lze testovat i vliv prostředí na konzumaci/autoaplikaci drogy, např. bylo prokázáno, že vystavení zvířete stresu (např. elektrický šok, sociální stres atp.) naopak zvyšuje hodnotu zlomového bodu (zvýšená konzumace/autoaplikace drogy) (Gardner, 2008).

### ● 3 / 3 Rozpoznávání drogy („drug discrimination“)

Metoda „roznání látky mezi různými látkami“ („drug discrimination“) patří mezi validní behaviorální techniky používané v adiktologii. Často se používá v kombinaci s metodou „autoaplikací“ a „preferenci místa“ (Stolerman et al., 2011).

Metoda se zakládá na schopnosti vyšších živých organizmů (např. i hlodavců, primátů atp.) rozlišovat různé typy centrálních účinků, resp. různé typy stavu vědomí, ve kterém se nacházejí (Glennon et Young, 2011).

Podkladem metody je model naučeného operantního podmiňování. Nejčastěji se testuje na potkanech, opicích a myších (Carter et Griffiths, 2009; Young, 2009).

Metoda drug discrimination byla poprvé referována v roce 1951 americkým profesorem psychologie Johnem Janeway Congerem. Tato práce popisovala rozdíly v chování zvířat ve stavu akutní intoxikace alkoholem a ve střízlivém stavu (Donald et Overton, 1991).

Test „roznání mezi různými látkami“ zkoumá subjektivní účinek návykové látky na živočišný organismus. Skládá se ze čtyř prvků: prvním prvkem je motivované zvíře (hladové/deprivované zvíře se lépe učí, v případě, když je odměnou jídlo), druhým prvkem je aplikace návykové látky, která změní stav vědomí a vnímání, nebo aplikace placebo (nejčastěji se jako placebo používá ekvivalentní množství 0,9% roztoku chloridu sodného) určitou dobu před testováním, třetím prvkem – správně vykonaný úkol, a posledním čtvrtým prvkem je obdržení odměny (ve většině případů jídlo nebo slazené mléko) (Glennon et Young, 2011; Young, 2009).

Výcvik zvířat probíhá v operační komoře se dvěma páčkami (podobně jako u metody IVSA). Nejdříve se zvíře naučí jenom mačkat páčku. Potom začíná trénink s aplikací testované látky. V průběhu „testovacího/drogového sezení“ se dávka testované látky aplikuje určitou dobu před umístěním zvířete do testovací komory. Úkolem zvířete je zmáčknout páčku, která byla předem stanovena jako „drogová“ (např. pravou páčku). Zmáčknutí správné páčky má za následek obdržení odměny – jídla. Druhý den je „sezení s placebem“, místo návykové látky se aplikuje fyziologický roztok. V průběhu tohoto sezení by zvíře mělo zmáčknout „placebovou páčku“, je to jiná páčka než u drogového sezení

cebo (an equivalent quantity of 0.9% sodium chloride solution is commonly used for this purpose) a certain period of time prior to testing, (iii) a correct response, and (iv) a reward/reinforcement (mostly food or sweetened milk) (Glennon and Young, 2011; Young, 2009).

Animals are trained in an operant chamber equipped with two levers (as in IVSA). First the animal only learns to press the lever. Then the administration of the study substance is included in the training. During a “testing/drug session”, a dose of the study substance is administered some time before the animal is placed inside the testing chamber. The animal is expected to press the response lever designated in advance as the “drug lever” (the one on the right, for example). Pressing the correct lever yields a reward – food. On another day, a “placebo session” takes place, where saline solution is applied instead of the addictive substances. During this session the animal should press the “placebo lever”, the other lever from that activated at the “drug session” (the one on the left, for example), to receive a reward (Glennon and Young, 2011; Lynch et al., 2010; Fišerová, 2000). A correct response percentage of the total number of instances of pressing the lever during the session (=100%) is looked for. The test is considered accomplished after the animal has made 80% or more “correct responses” (Carter and Griffiths, 2009). This relatively time-consuming training takes several weeks, sometimes months. The ability of the animal to opt for the “correct” pressing device as a result of the administration of a centrally acting substance demonstrates the discrimination of the effect, i.e. the substance.

The drug-discriminating procedure can be used to examine the effects of common centrally acting substances and their pharmacological properties, such as the onset and duration of effects, the relationship between the effect and the route of administration of the substance, and the presence of active metabolites, and to test receptor agonists and antagonists (Glennon and Young, 2011; Carter and Griffiths, 2009). This method can also be used to test unknown substances/new drugs, the number of which on the black market has risen dramatically. If a new compound generates the same response as the previously trained drug, it appears to belong to the same group of compounds and to elicit similar subjective experiences (e.g. both methadone and morphine are opiates). If a study substance has the same action as the placebo, it is affiliated with a different group of compounds and induces different subjective alterations in the animal (e.g. cocaine vs. morphine, as by principle cocaine is a stimulant, while morphine ranks among the depressants) (Lynch et al., 2010; Carter and Griffiths, 2009).

The test can entail several modifications, such as testing of a study substance vs. a placebo, the assay of the effects of different doses of the same substance, and the test-

(např. levá páčka), aby dostalo odměnu (Glennon et Young, 2011; Lynch et al., 2010; Fišerová, 2000). Sleduje se procento správných odpovědí z celkového množství zmáčknutí v průběhu sezení (=100 %). O splnění testu hovoříme, když zvíře dosáhne během sezení 80 nebo více procent správných zmáčknutí (Carter et Griffiths, 2009). Tento poměrně časově náročný výcvik trvá několik týdnů, někdy i měsíců. Schopnost zvířete zvolit „správnou“ tlačku pod vlivem příslušného centrálního účinku vyvolaného právě aplikovanou látkou dokládá rozpoznání daného typu účinku, resp. dané látky.

Metodu „rozpoznání mezi různými látkami“ lze užít ke zkoumání základních centrálních účinků látek i farmakologických vlastností zkoumaných látek, jako je latence účinku, doba trvání účinku, ovlivnění efektu látky v závislosti na způsobu podání, přítomnost aktivních metabolitů, testování receptorových agonistů a antagonistů (Glennon et Young, 2011; Carter et Griffiths, 2009). Tímto způsobem se mohou testovat i neznámé sloučeniny/ nové drogy, jejichž počet na černém trhu poslední dobou lavinovitě stoupá. Jestliže nová sloučenina vyvolává stejnou reakci jako předtím navčičená droga, znamená to, že patří do stejné skupiny sloučenin a vyvolává podobné subjektivní prožívání (např. metadon a morfin, oba patří mezi opioidy). Pokud zkoumaná látka účinkuje stejně jako placebo, v tomto případě patří do jiné skupiny sloučenin a vyvolává jiné subjektivní změny u zvířete (např. kokain a morfin, protože principiálně patří kokain mezi stimulanty, kdežto morfin mezi látky tlumivé) (Lynch et al., 2010; Carter et Griffiths, 2009).

Test může mít několik modifikací, nejčastější jsou: testování zkoumané látky versus placebo, zkoumání účinků různých dávek stejné látky, testování dvou různých látek atp. (Glennon et Young, 2011; Stolerman et al., 2011).



ing of two different substances (Glennon and Young, 2011; Stolerman et al., 2011).

## ● 4 NEUROBIOLOGY METHODS

### ● 4 / 1 Microdialysis

**Microdialysis** is an *in vivo* technique used to assay concentrations of low-molecular substances (such as neuromediators, low-molecular peptides, and hormones) in the interstitial space. It is used for collecting samples of tissue from various organs, including blood and eye, liver, muscle, and brain tissue (Darvesh et al. 2011). In addiction research, microdialysis of various brain areas is of major relevance. The technique is widely used to sample and quantify neurotransmitters, neuropeptides, and hormones in the brain and its periphery (Chefer et al., 2009). The invaluable and unique benefit of microdialysis is that it allows the long-term (even repeated) measurement of changes in (neuro-)mediators in the structure/tissue of interest in unrestrained animals and thus the study of changes occurring within chronic models or during other behavioural tests, such as self-administration and CPP, or the investigation of the responses of the animal to pharmacological and other stimuli (Torregrossa and Kalivas, 2008; Šustková, 2003)

A microdialysis system consists of a microdialysis probe/cannula with a semipermeable membrane to be implanted in the tissue under study, a perfusion/dialysis pump with perfusion solution (artificial tissue fluid), and a microtube into which the sample/dialysate is collected at certain intervals. (*Fig. 5, 6.*)

The principle of microdialysis is based on Fick's law of diffusion, which explains the passive passage of molecules through a semipermeable membrane according to the concentration gradient, i.e. from a higher-concentration environment into a low-concentration environment. The function of a semipermeable membrane is fulfilled by a microdialysis probe which is very slowly perfused with perfusion/dialysis solution (of zero concentration). The permeability of the membrane (cut-off) is determined by the size of its pores; a permeability of 5,000-100,000 daltons is generally used. The probe is inserted into an area of interest (e.g. a selected brain structure). Through the pores of the semipermeable membrane which contains the microdialysis probe, substances from the extracellular fluid pass into the probe, where they are collected (at certain intervals) into the microtube. The concentration of the study substances in the diasolyte is then determined using an appropriate analytical method, which must be extremely sensitive, as the concentrations of the substances in the diasolyte are very low (pmol concentrations and lower). Indeed, experimental analytical possibilities are a major limi-

## ● 4 NEUROBIOLOGICKÉ METODY

### ● 4 / 1 Mikrodialýza

**Mikrodialýza** je technika, která se používá k *in vivo* monitoraci koncentrace nízkomolekulárních látek v intersticiálním prostoru tkání (jako jsou např. neuromediátory, nízkomolekulární peptidy, hormony atp.). Používá se pro odběr vzorků z různých orgánů, jako jsou krev, oko, játra, svaly, mozek (Darvesh et al., 2011). V adiktologickém výzkumu má nejšířší použití mikrodialýza různých oblastí mozku. Technika mikrodialýzy je široce používána pro odběr vzorků a kvantifikaci neurotransmiterů, neuropeptidů a hormonů v mozku či na periférii (Chefer et al., 2009). Neocenitelnou a unikátní výhodou mikrodialýzy je možnost provádět dlouhodobé (dokonce i opakované) měření změn (neuro)mediátorů v příslušné struktuře/tkáni u volně se pohybujících zvířat a tím studovat změny v rámci chronických modelů či v průběhu jiných behaviorálních testů jako např. autoaplikace, CPP nebo sledovat reakci zvířete na farmakologické aj. podněty (Torregrossa et Kalivas, 2008; Šustková, 2003).

Mikrodialyzační systém se skládá z mikrodialyzační sondy/kanyly se semipermeabilní membránou, která je implantovaná do příslušné tkáně, perfuzní/dialyzační pumpy s perfuzním roztokem (umělým tkáňovým mokem), a mikrozkuhavky, do níž je vzorek/dialyzát v určitých intervalech odebírán. (*Obr. 5, 6.*)

Mikrodialýza je založena na principu Fickova zákona difúze o pasivním průchodu molekul semipermeabilní membránou dle koncentračního gradientu, tj. z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o nižší koncentraci. Funkci semipermeabilní membrány plní mikrodialyzační sonda velmi pomalu promývaná perfuzním/dialyzačním roztokem (roztok s nulovou koncentrací). Velikost póru v membráně určuje její propustnost („cut off“), většinou se užívá propustnost 5000–100000 Daltonů. Sonda je zavedena do zkoumané oblasti (např. vybrané mozkové struktury). Póry semipermeabilní membrány mikrodialyzační sondy prochází látky z extracelulární tekutiny do sondy a odtud jsou jímány (v určitých časových intervalech) do mikrozkuhavky. Koncentrace sledovaných látek v dialyzátu se potom stanovuje příslušnou analytickou metodou, která musí být mimořádně citlivá, protože koncentrace látek v dialyzátu jsou velmi nízké (pmol koncentrace a nižší). Experimentální analytické možnosti jsou zásadním limitem této techniky (Koob et al., 2007; Darvesh et al., 2011).

První studie měřící extracelulární koncentraci neurotransmitteru v mozku provedl britský profesor farmakologie John Henry Gardam v roce 1961 použitím techniky „push-pull“ (Darvesh et al., 2011), inspirovaný prací jiných britských vědců Foxe a Histona, kteří prováděli stejné výzkumy v podkoží v roce 1958 (Fox et Histon, 1958). Na vývoji současných mikrodialyzačních typů sond a celosvětově

tation of this technique (Koob et al. 2007; Darvesh et al. 2011).

The first studies involving the measurement of the extracellular neurotransmitter concentration in the brain were carried out by a British professor of pharmacology, John Henry Gardam, in 1961, using the push-pull technique (Darvesh et al. 2011). His work was inspired by other British scientists, Fox and Hilton, who conducted the same research on the subcutis in 1958 (Fox and Histon, 1958). The Swedish professor Urban Ungerstedt contributed significantly to the development of the current types of microdialysis probes and the methods which are now commonly used worldwide (Darvesh et al. 2011).

In addiction research, the *in vivo* brain microdialysis technique is of key relevance to the development of new pharmacotherapeutic approaches and procedures with respect to addiction treatment. Microdialysis makes it possible to moderate mediator changes induced by the effects of addictive substances, as well as by potential receptor antagonists and agonists (Darvesh et al. 2011). In view of the neural mechanisms of addiction, the greatest attention is focused on the study of neurochemical changes in the mesocorticolimbic circuitry, including the ventral tegmental area, nucleus accumbens, frontal cortex, striatum, and amygdala (Torregrossa and Kalivas, 2008). Another advantage of this method is that one sample may be used to establish concentrations of more substances at a time. The most common neurotransmitters of which the study is of relevance to addictology include glutamate, GABA, dopamine, serotonin, noradrenalin/norepinephrine, acetylcholine, peptides, and endogenous cannabinoids (Torregrossa and Kalivas, 2008).

## ● 5 CONCLUSION

This review article summarises selected common pre-clinical addiction research methods. Animal model-based experiments are widely used to study factors which are salient for the development and maintenance of addiction and provide valuable information needed to understand the key addiction-related mechanisms. The transferability of research evidence obtained from animal models and experiments to humans may have its limitations; it can raise doubts and issues. Nevertheless, as shown in *Table 6*, for example, the experimental testing of the potential of substances to provoke a “reinforcing” effect (= one that increases the urge to use the drug, a “craving”) has demonstrated that common addictive drugs of abuse available on the black market lead to (mostly intravenous) self-administration in rats, mice, and monkeys (self-administration model) and produce a conditioned place preference and animals can distinguish these substances within the drug discrimination model. Animal experiments have also shown that practically all well-known addictive drugs increase the dopamine level in

používaných metod se velkou měrou podílel např. švédský profesor Urban Ungerstedt (Darvesh et al., 2011).

V adiktologickém výzkumu má technika CNS mikrodiálýzy *in vivo* mimořádně důležité uplatnění při vývoji nových farmakoterapeutických směrů a postupů v léčbě závislostí. Mikrodiálýza umožňuje moderování mediátorových změn vyvolaných účinkem návykových látek, potenciálních receptorových antagonistů a agonistů atp. (Darvesh et al., 2011). Vzhledem k neuronálním závislostním mechanismům je největší pozornost věnována zkoumání neurochemických změn v mezokortikolimbických obvodech, včetně ventrální tegmentální oblasti, nukleus accumbens, frontální kůry, striatu, amygdaly atd. (Torregrossa et Kalivas, 2008). Další výhodou metody je, že z jednoho vzorku lze současně stanovit koncentraci více látek najednou. Nejčastěji stanovené neurotransmitery v adiktologii jsou glutamát, GABA, dopamin, serotonin, noradrenalin/norepinefrin, acetylcholin, peptidy, endogenní kanabinoidy atp. (Torregrossa et Kalivas, 2008).

## ● 5 ZÁVĚR

V tomto přehledovém článku jsou shrnuty vybrané, často užívané metody preklinického výzkumu v oboru adiktologie. Experimenty na zvířecích modelech jsou široce používané ke studiu faktorů významných pro rozvoj a udržování závislostí, poskytujících cenné informace nutné k porozumění klíčovému mechanismům v problematice závislostí. Přenositelnost výzkumných informací získaných ve zvířecích modelech a experimentech na lidskou úroveň nemusí být obecně vždycky stoprocentní, resp. může být někdy nejednoznačná nebo problematická. Nicméně, jak je zřejmé z *tabulky 6*, např. při testování potenciálu látek vyvolat „posilující“ účinek (=efekt posilující touhu po droze, „craving“) bylo u nejznámějších látek zneužívaných na černém trhu a vyvolávajících závislost experimentálně prokázáno, že navozují (většinou intravenózní) autoaplikaci u potkanů, příp. myší či opic (model autoaplikace), že navozují drogou podmíněnou preferenci místa a zvířata tyto látky rozpoznávají v modelu schopnosti rozpoznání drogy. V animálních experimentech bylo také zjištěno, že prakticky všechny známé drogy navozující závislost při akutním podání zvyšují hladinu dopaminu v nukleu accumbens atp. (Koob, 2009; Koob et Volkow, 2010 atp.).

Preklinické animální modely patří mezi unikátní screeningové techniky pro zkoumání návykového potenciálu u drog, ale i k testování nových léčiv v terapii závislostí, stejně jako psychologické terapeutické či preventivní prostředky pro zlepšení zvládnání zátěžových situací u pacientů závislých na návykových látkách atp. Nezbytnou součástí užívání zvířat v preklinickém výzkumu je přísná akceptace etického kodexu, eventuální volba alternativních metod, zdokonalování již existujících zvířecích modelů atp.

the nucleus accumbens when administered acutely (Koob, 2009, Koob and Volkow, 2010, etc.).

Pre-clinical animal models represent unique screening techniques used to explore the addictive potential of drugs and to test new addiction therapies, as well as psychological treatment and prevention resources that may enhance the coping skills of drug-dependent patients. Last but not least, pre-clinical research involving animal subjects must strictly adhere to the relevant ethical code, seek alternative options whenever possible, and improve the existing animal models.

**The role of the authors:** *Nina Pushkina conducted the literature search and the review of relevant evidence. Magdalena Šustková-Fišerová participated in the drafting of the manuscript. Both authors contributed to the article and approved the final version of the manuscript.*

**Role autorů:** *Nina Pushkina provedla rešerši literatury a shrnutí souvisejících prací. Magdalena Šustková-Fišerová se podílela na přípravě rukopisu. Obě autorky přispěly ke vzniku článku a schválily konečnou podobu manuskriptu.*

## REFERENCES / LITERATURA

- Bailey, K. R. & Crawley, J. N. (2008). Anxiety-related behaviors in mice. In Buccafusco, J. J. (Ed.), *Methods of behavior analysis in neuroscience*, 2nd edition (s. 77–101). Boca Raton (FL): CRC Press.
- Barclay, L. L. & Gibson, G. E. (1982). Spontaneous open-field behavior in thiamin-deficient rats. *Journal of Nutrition*, 112(10), 1899–1905.
- Bardo, M. T. & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153(1), 31–43.
- Beach, H. D. (1957). Morphine addiction in rats. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie*, 11(2), 104–112.
- Becker, H. C. (2000). Animal model of alcohol withdrawal. *Alcohol research*, 24(2), 105–113.
- Becker, H. C., Lopez, M. F., & Doremus-Fitzwater T. L. (2011). Effects of stress on alcohol drinking: a review of animal studies. *Psychopharmacology*, 218(1), 131–156.
- Bozarth, M. A. (1987). Conditioned place preference: a parametric analysis using systemic heroin injections. In Bozarth, M. A. (Ed.) *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*. (s. 241–273). New York, Springer.
- Burke, A. R., Forster, G. L., Novick, A. M., Roberts, C. L., & Watt, M. W. (2013). Effects of adolescent social defeat on adult amphetamine-induced locomotion and corticoaccumbal dopamine release in male rats. *Neuropharmacology* 67, 359–369.
- Carter, L. P. & Griffiths, R. R. (2009). Principles of laboratory assessment of drug abuse liability and implications for clinical development. *Drug Alcohol Depend*, 105(Supplement 1), 14–25.
- Chefer, V. I., Thompson, A. C., Zapata, A., & Shippenberg, T. S. (2009). Overview of brain microdialysis. *Current Protocols in Neurosciences*, 47(7).
- Cruz, F. C., Quadros, I. M., Hogenelst, K., Planeta, C. S., & Miczek, K. A. (2011). Social defeat stress in rats: Escalation of cocaine and “speedball” binge self-administration, but not heroin. *Psychopharmacology*, 215(1), 165–175.
- Curzon, P., Zhang, M., Radek, R. J., & Fox, G. B. (2008). The behavioral assessment of sensorimotor processes in the mouse: acoustic startle, sensory gating, locomotor activity, rotarod, and beam walking. In Buccafusco, J. J. (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd edition (s. 145–177). Boca Raton (FL): CRC Press.
- Darvesh, A. S., Carroll, R. T., Geldenhuys, W. J., Gudelsky, G. A., Klein, J., Meshul, C. K., & Schyl C. J. (2011). In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 6(2), 109–127.
- Donald, A. & Overton, D. A. (1991). A Historical perspective on drug discrimination. In: Glennon, R. A., *Drug discrimination: Applications to drug abuse research* (s. 5–25). U.S. Government printing office.
- Fišerová, M. (2000). Historie, příčiny a léčení drogových závislostí. *Postgraduální medicína*, 2(3), 288–298.
- Fox, R. H. & Histon, S. M. (1958). Bradykinin formation in human skin as a factor in heat vasodilatation. *Journal of Physiology*, 142(2), 219–232.
- Gardner, E., L. (2008). Use of animal models to develop antiaddiction medications. *Current Psychiatry Reports*, 10(5), 377–384.
- Glennon, R. A. & Young, R. (2011). An introduction to drug discrimination. In Glennon, R. A., & Young, R. (Eds.) *Drug Discrimination: Applications to Medicinal Chemistry and Drug Studies*, First Edition. (s. 3–17). Wiley.
- Grolmusová, & L., Mravčík, V. (2013) Situace ve věcech drog v České republice v roce 2012, Souhrn výroční zprávy. *Zaostřeno na drogy*, 10(8). Praha: Úřad vlády ČR.
- Hall, C., & Ballachey, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, 6, 1–12.
- Howell, L. L., & Fantegrossi, W. E. (2008). Intravenous drug self-administration in nonhuman primates. In Buccafusco, J. J. (Ed.), *Methods of behavior analysis in neuroscience*, 2nd edition (s. 179–198). Boca Raton (FL): CRC Press.
- Kelemen, E. & Pašalková, E. (2000). O studiu paměti u lidí a zvířat. *Vesmír*, 79, 633–635.
- Koob, G. F., Caine, S. B., Roberts, A. J., & Parsons, L. H. (2007). Drug self-administration and microdialysis in rodents. In: Crawley, J. (Ed.) *What's wrong with my mouse? Strategies for rodent behavior phenotyping*. (s. 35–54). San Diego, CA: Society for Neuroscience.
- Koob, G. F. (2009). Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology*. 56(Suppl 1), 18–31.
- Koob, G. F., Lloyd, G. K., & Mason, B. J. (2009). Development of pharmacotherapies for drug addiction: a Rosetta Stone approach. *Nature Review Drug Discovery*, 8(6), 500–515.

- Koob, G. F. & Volkow, N. D. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238.
- Kudrle, S. (2008). Bio-psycho-sociálně-spirituální model závislosti jako východisko k primární, sekundární a terciární prevenci a kvalifikované pomoci. In Kalina, K., Adameček, D., Broža, J., Dvořáček, J., Dobiášová, D., Frouzová, M., ... Zábranský, T. *Základy klinické adiktologie*. Praha: Grada Publishing.
- Liu, Y., Foll, B. L., Liu, Y., Wang, X., & Lu, L. (2008). Conditioned place preference induced by licit drugs: establishment, extinction, and reinstatement. *The Scientific World Journal*, 8, 1228–1245.
- Lynch, W. J., Nicholson, K. L., Dance, M. E., Morgan, R. W., & Foley, P. L. (2010). Animal models of substance abuse and addiction: implications for science, animal welfare, and society. *Comparative Medicine*, 60(3), 177–188.
- Mahler, S. V., Moorman, D. E., Feltenstein, M. W., Cox, B. M., Ogburn, K. B., ... See, R. E. (2013) A rodent „self-report“ measure of methamphetamine craving? Rat ultrasonic vocalizations during methamphetamine self-administration, extinction, and reinstatement. *Behavioural Brain Research*, 236(1), 78–89.
- Maier, E. Y., Abdalla, M., Ahrens, A. M., Schallert, T., & Duvauchelle, C. L. (2012). The missing variable: ultrasonic vocalizations reveal hidden sensitization and tolerance-like effects during long-term cocaine administration. *Psychopharmacology*, 219(4), 1141–1152.
- Mello, N. K. & Negus, S. S. (1996). Preclinical evaluation of pharmacotherapies for treatment of cocaine and opioid abuse using drug self-administration procedures. *Neuropsychopharmacology*, 14(6), 375–424.
- Miczek, K. A. & O'Donnell, J. M. (1978). Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. *Psychopharmacology*, 57(1), 47–55.
- Montgomery, K. C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48(4), 254–260.
- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12(2), 239–260.
- Mravčík, V., Chomynová, P., Grohmannová, K., Nečas, V., Grolmusová, L., Kiššová, L., ... Jurystová, L. (2013). *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2012*. Praha: Úřad vlády České republiky.
- Panlilio, L. V. & Goldberg, S. R. (2007). Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction*, 102(12), 1863–1870.
- Pechnick, R. N., Glasner-Edwards, S., Hrymoc, M., & Wilkins, J. N. (2007). Preclinical development and clinical implementation of treatments for substance abuse disorders. *Focus*, 5(2), 151–162.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167.
- Planeta, C. S. (2013). Animal models of alcohol and drug dependence. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 35(2), 140–146.
- Prus, A. J., James, J. R., & Rosecrans, J. A. (2008). Conditioned place preference. In: Buccafusco, J. J. (Ed.), *Methods of behavior analysis in neuroscience*, 2nd edition (s. 59–76). Boca Raton (FL): CRC Press.
- Sadananda, M., Natusch, C., Karrenbauer, B., & Schwarting, R. K. (2012) 50-kHz calls in rats: effects of MDMA and the 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 101(2), 258–64.
- Schramm-Sapota, N. L., Walker, O. D., Caster, J. M., Levin, E. D., & Kuhn, C. M. (2009). Are adolescents more vulnerable to drug addiction than adults? Evidence from animal models. *Psychopharmacology*, 206(1), 1–21.
- Spragg, S. D. S. (1940). Morphine addiction in chimpanzees. *Comparative Psychology Monographs*, 15(7), 132.
- Stolerman, I. P., Childs, E., Ford, M. M., & Grant, K. A. (2011). The role of training dose in drug discrimination: a review. *Behavioural Pharmacology*, 22(5–6), 415–429.
- Šustková, M. (2003). Neurobiologie drogových závislostí. In: Kalina, K. & Radimecký, J. (Eds.) *Drogy a drogové závislosti: mezioborový přístup I a II*. Praha: Úřad vlády ČR.
- Šustková, M. (v tisku). Neurobiologie závislostí. In: Kalina, K., et al. *Základy klinické adiktologie*. Kapitola 6. Praha: Grada Publishing
- Thompson, T. & Schuster, C. R. (1964). Morphine self-administration, food-reinforced and avoidance behaviors in rhesus monkeys. *Psychopharmacologia*, 7(5), 87–94.
- Torregrossa, M. M., & Kalivas, P. W. (2008). Microdialysis and the neurochemistry of addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(2), 261–272.
- Vaculín, Š. (2000). Etické a právní aspekty použití zvířat k experimentální práci. *Československá fyziologie*, 49(1), 30–33.
- Vorhees, C. V. & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858.
- Wolf, A. A. & Frye C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328.
- Weeks, J. R. (1962). Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Science*, 138(3537), 143–144.
- Williams, A. M., Reis, D. J., Powell, A. S., Neira, L. J., Nealey, K. A., ... Walker, B. M. (2012). The effect of intermittent alcohol vapor or pulsatile heroin on somatic and negative affective indices during spontaneous withdrawal in Wistar rats. *Psychopharmacology*, 223(1), 75–88.
- Young, R. (2009). Drug discrimination. In: Buccafusco, J. J. (Ed.), *Methods of behavior analysis in neuroscience*, 2nd edition (s. 39–58). Boca Raton (FL): CRC Press.