

Praca poglądowa*Review*

PAWEŁ MIERZEJEWSKI

Synteza białek *de novo* a procesy pamięciowe związane z warunkowaniem instrumentalnym: nowe perspektywy leczenia zaburzeń psychicznych*De novo protein synthesis and memory processes in instrumental conditioning: new perspectives in the treatment of psychiatric disorders*

Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono aktualną wiedzę dotyczącą możliwości wpływania za pomocą inhibitorów syntezy białek (ISB) na procesy pamięciowe związane z warunkowaniem instrumentalnym oraz dyskusję nad potencjalnym zastosowaniem klinicznym ISB w leczeniu zaburzeń i chorób psychicznych. Szczegółowo omówiono rolę syntezy nowych białek w mózgu w procesach konsolidacji, przywołania i rekonsolidacji pamięci oraz wygaszania reakcji instrumentalnej. Dokonano porównania wpływu ISB na procesy pamięciowe związane z warunkowaniem klasycznym i instrumentalnym, oraz przedyskutowano różnice w działaniu ISB na te procesy.

SUMMARY

The paper presents the actual knowledge about possibilities of influencing on memory processes in instrumental conditioning by protein synthesis inhibitors (PSIs) and a possibility of therapeutic application of PSIs in the treatment of psychiatric disorders. The author discussed the role of *de novo* protein synthesis in the brain in the processes of consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction of instrumental responding. Moreover the effects of PSIs on memory processes in classical and instrumental conditioning were compared and differences between their effects on these processes discussed.

Słowa kluczowe: warunkowanie instrumentalne, synteza białek *de novo*, konsolidacja, rekonsolidacja, wygaszanie

Key words: instrumental conditioning, *de novo* protein synthesis, consolidation, reconsolidation, extinction

WPROWADZENIE

Celem tej pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej możliwości wpływania za pomocą inhibitorów syntezy białek (ISB) na procesy pamięciowe związane z warunkowaniem instrumentalnym oraz dyskusja nad potencjalnym zastosowaniem klinicznym ISB w leczeniu zaburzeń i chorób psychicznych. Nomenklatura dotycząca procesów pamięciowych i uczenia jest w chwili obecnej bardzo rozbudowana i skomplikowana, często ze względu na mnogość teorii niespójna (patrz np. Unsworth i Engle, 2007). Na

potrzeby niniejszej pracy przyjęto następujący schemat procesów pamięciowych: nabywanie (*acquisition*) → konsolidacja (*consolidation*) → przechowywanie (*storage*) → przywoływanie (*retrieval*) → rekonsolidacja (*reconsolidation*) → wygaszanie (*extinction*) → nawrót (*relapse*).

Pod pojęciem sesji przywołania pamięci autor rozumie sesję, podczas której obiekt doświadczalny (szczur) z wcześniej wyuczoną reakcją instrumentalną umieszczany jest ponownie w klatce eksperymentalnej, tj. w kontekście związanym z wcześniejszym nabywaniem reakcji instrumentalnej. Podczas sesji

przywoływania pamięci mogą, ale nie muszą, być prezentowane bodźce dyskretne (skojarzone wcześniej z podaniem nagrody) i wzmocnienie (nagroda).

PAMIĘĆ A CHOROBY PSYCHICZNE: USUWANIE „PATOLOGICZNEJ” PAMIĘCI

W terapii zaburzeń psychicznych takich jak zaburzenia lękowe, czy uzależnienia często stosuje się techniki polegające na wygaszeniu patologicznej reakcji lub zachowania (patrz np. Landon i Barlow, 2004). W przypadku uzależnień bierne wystawienie uzależnionego na działanie bodźców dyskretnych (warunkowych), związanych z zażywaniem narkotyku może prowadzić do indukcji silnego głodu narkotykowego i zwiększonego ryzyka nawrotu kompulsywnego poszukiwania narkotyku (Drummond, 2000; Rohsenow i wsp., 2001; Sinha i Li, 2007). Podobny schemat obserwuje się u pacjentów cierpiących na zaburzenia odżywiania (Bulik i wsp., 1998; Jansen, 1998; Sobik i wsp., 2005). Teoretycznie substancje o działaniu amnestycznym, takie jak np. ISB mogą mieć zastosowanie terapeutyczne w chorobach, w których ekspozycja na bodźce dyskretne prowadzi do indukcji niekontrolowanego zachowania (Jansen i wsp., 1998; Sinha i Li, 2007). Poza tym ISB mogłyby być stosowane jako leczenie wspomagające w terapii behawioralnej, związanej z ekspozycją na bodźce dyskretne (Jansen, 1998; Rohsenow i wsp., 2001).

Bardzo ciekawe doświadczenie kliniczne przeprowadził Rubin (1976). Pacjentów cierpiących na zaburzenia obsesyjno-kompulsywne lub omamy poproszono o wyobrażenie sobie natręctw/omamów związanych z ich chorobą, a następnie zastosowano elektrowstrząsy. U wszystkich leczonych pacjentów obserwowano znaczącą poprawę, a w ciągu 10 lat tylko u jednej osoby wystąpił nawrót choroby. Interesujące jest, że kiedy u tych samych pacjentów stosowano elektrowstrząsy, w sposób standardowy, bez przywołania pamięci poprawa była niewielka i jedynie tymczasowa. Eksperyment ten wskazuje na istotne znaczenie etapu przywołania pamięci przed zastosowaniem elektrowstrząsów, a także sugeruje możliwość zastosowania klinicznego leków o działaniu pro-amnestycznym, takich jak ISB.

Celowe wymazywanie pamięci mogłoby stanowić ważny element terapii wielu schorzeń psychiatrycznych, w tym uzależnień. Można sobie wyobrazić, że przywołanie „złej pamięci”, a następnie zaburzenie procesu rekonsolidacji tej pamięci spowoduje jej „uszkodzenie” czy nawet usunięcie, a w konsekwencji zaprzestanie niekorzystnego zachowania.

PROCESY PAMIĘCIOWE ZWIĄZANE Z WARUNKOWANIEM A SYNTEZA NOWYCH BIAŁEK

Nabywanie i konsolidacja

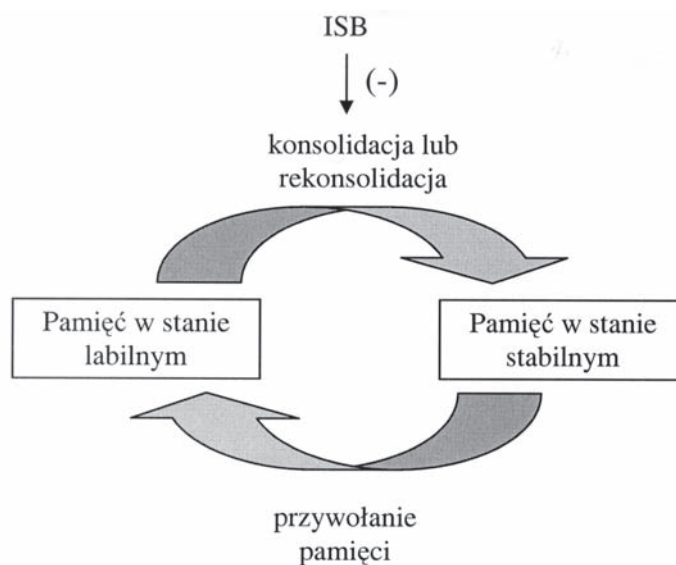
Nabywanie jest procesem, podczas którego organizm uczy się nowych doświadczeń. Początkowo „nowa” pamięć jest nietrwała (*Short Term Memory-STM*) i łatwo ulega zaburzeniu, jednak pod wpływem czasu dochodzi do jej utrwalenia (*Long Term Memory-LTM*). Proces utrwalania pamięci związany jest z tworzeniem nowych struktur białkowych (np. receptorów, enzymów, białek strukturalnych) w mózgu i zachodzi w ściśle określonym oknie czasowym. Badania na zwierzętach wskazują, że jest to czas około 4-6 godzin po zakończeniu sesji uczenia (patrz np. Nader, 2003).

W XIX wieku zaobserwowano, że wydarzenia okołourazowe są często objęte niepamięcią (Ribot, 1882). Spostrzeżenie to nasunęło hipotezę konsolidacji, zgodnie z którą, pamięć początkowo funkcjonuje jako pamięć nietrwała i dopiero z biegiem czasu ulega utrwaleniu (konsolidacji). Dalsze badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że mechanizm konsolidacji pamięci jest uniwersalny dla różnych gatunków zwierząt (od ślimaka po człowieka) i zależy od syntezy białek *de novo* w OUN (Barraco i Stettner, 1976; Davis and Squire 1984, Kandel i wsp., 2001). Kluczowe znaczenie syntezy nowych białek w procesie konsolidacji wykazano dla wielu różnych technik uczenia się, np. dla nabywania orientacji przestrzennej w teście labiryntu wodnego Morris'a (Meiri i Rosenblum, 1998; Lattal i Abel, 2001) lub orientacji w labiryncie Y (Patterson i wsp., 1987), czy nabywania warunkowej reakcji znieruchomienia (Lattal i Abel, 2001, Mierzejewski i wsp. 2006).

Przywoływanie i rekonsolidacja

Przez długi czas uważano, że pamięć, która została skonsolidowana jest stabilna, a w związku z tym oporna na próby jej modyfikacji i/lub wymazywania (McGaugh, 1966). Spojrzenie na ten problem radykalnie zmieniło się, kiedy Misanin i wsp. (1968) wykazali, że pamięć związana z warunkowanym strachem, krótko po przywołaniu, staje się wrażliwa na amnestyczne działanie elektrowstrząsów. Badanie to otworzyło nowy kierunek poszukiwań nad metodami wymazywania/modyfikowania wcześniej skonsolidowanej pamięci.

Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują, że wcześniej skonsolidowana pamięć w momencie jej przywołania (z ang. *retrieval*) przechodzi w stan labilny i jest ponownie podatna na zaburzenia (patrz rycina 1). Następnie, w wyniku procesu



Rycina 1. W wyniku procesu konsolidacji nowo nabyta pamięć przechodzi z formy labilnej w formę stabilną. Przywołanie pamięci prowadzi do jej ponownego przejścia w formę labilną. Następnie w wyniku procesu rekonsolidacji pamięć jest powtórnie utrwalana. Zdaniem wielu autorów proces konsolidacji i rekonsolidacji jest zależny od syntezy nowych białek i może zostać zaburzony poprzez podanie ISB.

rekonsolidacji, ulega ona ponownemu utrwaleniu i uaktualnieniu (Dudai, 2002; Frenkel i wsp. 2005; Rodriguez-Ortiz i wsp., 2005). Hipoteza rekonsolidacji została potwierdzona w wielu badaniach dotyczących awersyjnego warunkowania typu pawłowowskiego, w tym na gryzoniach (Przybysławski i Sara, 1997; Nader i wsp. 2000; Taubenfeld i wsp. 2001), pisklętach (Anokhin i wsp., 2002), krabach (Pedreira i Maldonado 2003) i węzłach (Sangha i wsp. 2003a). Proces rekonsolidacji, podobnie jak proces konsolidacji, zależy od syntezy białek *de novo* (patrz Sara, 2000; Nader i wsp., 2000; Nader, 2003; Dudai 2004; Alberini, 2005).

Wygaszanie i rekonsolidacja

Wygaszaniem nazywamy zaprzestanie wykonywania wyuczonej reakcji w wyniku zaprzestania jej wzmacniania bodźcem bezwarunkowym (np. nagrodą) (Pavlov, 1927). Wygaszanie jest w chwili obecnej uważane za proces nowego uczenia się (Bouton, 1994; Bouton, 2002; Berman i Dudai, 2001; Myers i Davis, 2002; Akirav i wsp., 2006). Wiele badań wskazuje, że procesy pamięciowe, zachodzące podczas wygaszania, są podobne do tych zachodzących podczas konsolidacji (Berman i Dudai, 2001; Ledgerwood i wsp., 2003; Lin i wsp., 2003; Maruki i wsp. 2003; Sangha i wsp. 2003b; Vianna i wsp. 2003; Bahar i wsp. 2004). Proces wygaszania jest zależny od syntezy nowych białek w OUN, co wykazano w przypadku wygaszania: warunkowej awersji smaku (Berman i Dudai, 2001), warunkowego unikania (Vianna i wsp., 2003), warunkowanego zniechęcenia

(Santini i wsp., 2004), czy reakcji instrumentalnej u węży (Sangha i wsp., 2003b).

Badania na zwierzętach sugerują, że procesy rekonsolidacji i wygaszania konkurują w czasie i w zależności od długości trwania sesji przywołania pamięci przeważa rekonsolidacja (krótkie sesje) albo wygaszanie (długie sesje) (Pedreira i Maldonado, 2003; Mierzejewski i wsp., 2008). W badaniach na krabach *Chasmagnathus* prowadzonych przez Pedreira i Maldonado (2003) pokazano, że jeżeli inhibitor syntezy białek cykloheksymid (CHX) podawano po krótkiej (5 min.) sesji reekspozycji na kontekst, to podczas kolejnej sesji obserwowano osłabienie reakcji warunkowej, co interpretowano jako wymazanie pamięci. Natomiast, jeżeli przeprowadzono długą (60 min.) sesję reekspozycji na kontekst, a następnie podano CHX, to obserwowano zahamowanie procesu wygaszania reakcji warunkowej, tzn. podczas kolejnej sesji eksperymentalnej grupa, która otrzymała CHX wykazywała silniejszą reakcję unikania niż grupa kontrolna.

WARUNKOWANIE INSTRUMENTALNE A SYNTEZA NOWYCH BIAŁEK

Warunkowanie instrumentalne polega na kojarzeniu wykonywania danej reakcji z otrzymaniem nagrody (np. pokarm) lub kary (np. bólu) (patrz np. Skinner, 1953; Balleine i Dickinson, 1998). W przypadku, kiedy reakcja jest wzmacniana dochodzi do zwiększenia prawdopodobieństwa jej wykonywania. Jeżeli naciśnięcie na dźwignię powoduje np. prezentację atrak-

cyjnego słodkiego roztworu, zwierzę zaczyna coraz częściej naciskać na dźwignię. Procedura instrumentalnego samopodawania jest powszechnie stosowana w badaniach nad mechanizmem pozytywnie wzmacniającego działania leków i substancji naturalnych. Model samopodawania jest także często stosowany w badaniach nad uzależnieniami (Ettenberg i wsp., 1982; Mierzejewski i wsp., 2003a,b).

W dalszej części pracy przedstawiono obecną wiedzę na temat roli syntezy białek *de novo* w procesach pamięciowych, związanych z warunkowaniem instrumentalnym oraz potencjalnych możliwościach farmakologicznego wpływania na te procesy.

Wpływ ISB na konsolidację reakcji instrumentalnej

Synteza nowych białek wydaje się być krytyczna dla procesu uczenia się (nabywania) reakcji instrumentalnej wzmacnianej zarówno nagrodą naturalną – np. pokarmem, cukrem (Castro-Larrazabal i wsp., 1983; Hernandez i wsp., 2002), jak i nagrodą sztuczną – np. kokainą (Mierzejewski i wsp. 2006). Hernandez i wsp. (2002) wykazali, że podawanie ISB – anizomycyny do jądra półleżącego przegrody (*nucleus accumbens septi*) zaburza konsolidację uczenia się (nabywania) naciskania na dźwignię wzmacnianego cukrem. Anizomycyna była podawana po kolejnych sesjach treningowych, podczas których zwierzęta uczyły się zadanej reakcji instrumentalnej. Autorzy wykazali, że synteza nowych białek, związana z uczeniem nowej reakcji, zachodzi w dość wąskim oknie czasowym, gdyż odsunięcie podania anizomycyny o 2 lub 4 godziny od zakończenia sesji treningowej powodowało, że proces nabywania reakcji przebiegał w sposób niezakłócony (Hernandez i wsp., 2002). Wyniki otrzymane przez Hernandeza i wsp. (2002) sugerują istnienie uniwersalnego mechanizmu konsolidacji pamięci zarówno dla procesów warunkowania instrumentalnego, jak i warunkowania klasycznego. W naszym laboratorium postanowiliśmy zweryfikować tę hipotezę rozszerzając badania na nagrodę farmakologiczną, tj. kokainę (Mierzejewski i wsp., 2006). Zwierzęta były uczone instrumentalnego samopodawania kokainy przez 12 kolejnych sesji treningowych trwających 60 min. Po każdej sesji podawany był ISB – cykloheksymid (CHX) w dawce 3 mg/kg lub sól fizjologiczna. Ze względu na toksyczne właściwości CHX (patrz np. Barraco i Stettner, 1976; Davis i Squire, 1984) kolejne sesje treningowe były prowadzone co 5 dni.

Wyniki przeprowadzonego badania potwierdziły hipotezę, że synteza nowych białek jest niezbędna podczas nabywania reakcji instrumentalnej wzmacnianej

kokainą. Zwierzęta, które otrzymywały CHX nie nauczyły się samopodawania kokainy, natomiast zwierzęta z grupy kontrolnej już po 5-6 sesjach nauczyły się wykonywać zadaną reakcję instrumentalną.

Przeprowadzone przez nas eksperymenty kontrolne potwierdziły, że CHX w dawce 3 mg/kg blokuje syntezę białek *de novo* i przy zachowaniu pięciodniowych odstępów między podaniami nie wpływa na ogólne zachowanie zwierząt (Mierzejewski i wsp., 2006). Dodatkowo wykazano, że CHX w dawce 3 mg/kg znacząco zaburza proces nabywania warunkowej reakcji znieruchomienia (Mierzejewski i wsp., 2006).

Podsumowując: wyniki badań nad instrumentalnym samopodawaniem cukru i kokainy wskazują na występowanie zależnej od syntezy białek *de novo* fazy konsolidacji nowej pamięci. Można więc wysunąć hipotezę, że mechanizm konsolidacji nowej pamięci jest uniwersalny i nie zależy od rodzaju warunkowania (Lattal i Abel, 2001; Hernandez i wsp., 2002; Mierzejewski i wsp., 2006).

Wpływ ISB na wygaszanie i rekonsolidację reakcji instrumentalnej

Hipoteza mówiąca o tym, że wygaszanie nie jest biernym procesem zapomnienia, a procesem nowego uczenia się, wymagającym syntezy nowych białek, powstała głównie na podstawie badań nad awersyjnym warunkowaniem klasycznym (patrz: Davis i Squire, 1984; Myers i Davis, 2002).

W kolejnych badaniach przeprowadzonych w naszym laboratorium postanowiliśmy sprawdzić czy proces wygaszania reakcji instrumentalnej można zaburzyć podaniem ISB.

Do badań wybrano model samopodawania kokainy (Mierzejewski i wsp., 2006) i sacharyny (Mierzejewski i wsp., 2008a).

W pierwszym eksperymencie zwierzęta z dobrze wyuczoną reakcją samopodawania kokainy zostały poddane procedurze wygaszania. Podczas sesji wygaszania trwającej 60 min. reakcja instrumentalna nie była wzmacniana, co prowadziło do szybkiego zaprzestania jej wykonywania. Zarówno grupa szczurów, która otrzymywała CHX, jak i grupa, która otrzymywała sól fizjologiczną, praktycznie całkowicie zaprzestała wykonywania niewzmacnianej reakcji. Nie zaobserwowano żadnych znamienych różnic pomiędzy badanymi grupami. Wyniki eksperymentu sugerują, że proces wygaszania reakcji instrumentalnej wzmacnianej kokainą, nie zależy od syntezy białek *de novo*.

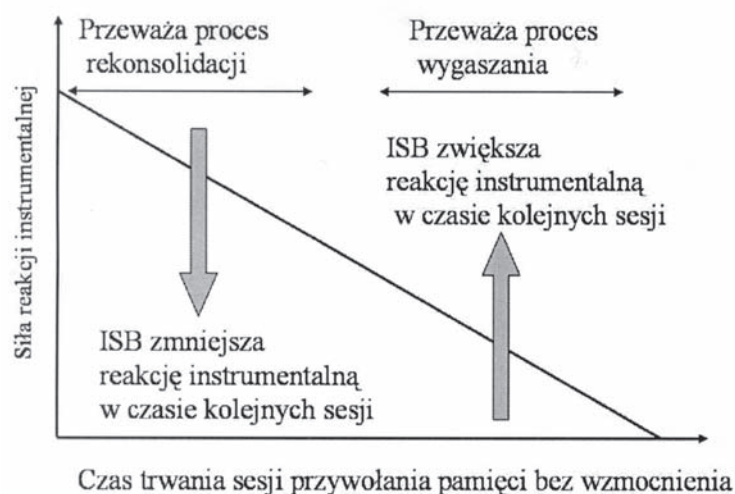
W kolejnym eksperymencie postanowiliśmy sprawdzić czy również proces wygaszania reakcji

wzmacnianej sacharyną będzie niewrażliwy na działanie CHX (Mierzejewski i wsp., 2008a). Dodatkowo postanowiono sprawdzić hipotezę rekonsolidacji mówiącą, że krótka sesja wygaszania prowadzi głównie do przywołania oryginalnej pamięci, a następnie do jej rekonsolidacji, natomiast dłuższe sesje wygaszania prowadzą do przewagi procesu wygaszania związanego z nowym uczeniem się (Pedreira i Maldonado, 2003; Sara i wsp., 2000).

Na początku zwierzęta były uczone naciskania na dźwignię w celu uzyskania 0,1% roztworu sacharyny. Po ustabilizowaniu się liczby naciśnięć na dźwignię przystąpiono do przeprowadzenia sesji wygaszania, podczas których naciskanie na dźwignię nie było wzmacniane oraz nie towarzyszyły mu wcześniej prezentowane bodźce dyskretne (tj. dźwięk unoszonego podajnika i zapalenie się lampki). Przeprowadzono sesje wygaszania trwające 5 minut (krótkie sesje) lub 30 minut (długie sesje). Natychmiast po każdej sesji zwierzęta otrzymywały CHX (3 mg/kg s.c.) lub sól fizjologiczną. CHX podawany po krótkich sesjach

kiem, jakim jest kokaina, w odróżnieniu od procesu wygaszania samopodawania sacharyny, jest niezależny od syntezy nowych białek. Po drugie w doświadczeniu z samopodawaniem kokainy (Mierzejewski i wsp., 2006) zastosowano 60 min. sesje wygaszania. Jest więc możliwe, że synteza nowych białek, która rozpoczęła się już w trakcie sesji była wystarczająca dla wystąpienia wygaszania.

Otrzymane przez nas rezultaty potwierdziły hipotezę dotyczącą „przełączania” pomiędzy konkurencyjnym procesem rekonsolidacji i wygaszania (patrz: Pedreira i Maldonado, 2003). Prawdopodobnie podczas krótkiej reekspozycji na kontekst eksperymentalny dochodzi do przywołania oryginalnej pamięci związanej z wyuczoną reakcją instrumentalną, a następnie dochodzi do jej ponownego utrwalenia (rekonsolidacji). Podczas tego procesu uruchamiana jest kaskada procesów molekularnych, prowadzących do syntezy nowych białek w OUN. Z biegiem czasu (długie sesje) zaczyna przeważać proces wygaszania i reakcja ulega osłabieniu (patrz rycina 2). Tak więc,



Rycina 2. Procesy pamięciowe zachodzące podczas przywoływania pamięci – wpływ ISB zależy od czasu trwania sesji przywołania

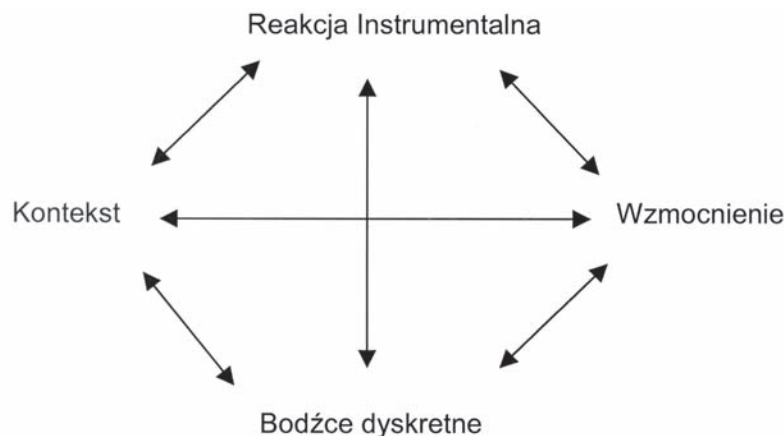
prowadził do przyspieszonego wygaszania reakcji instrumentalnej, natomiast CHX podawany po długich sesjach opóźniał wygaszanie (Mierzejewski i wsp., 2008a). Uzyskane wyniki wskazują, że w odróżnieniu od procesu wygaszania samopodawania kokainy (Mierzejewski i wsp., 2006), proces wygaszania samopodawania sacharyny jest wrażliwy na działanie ISB (Mierzejewski i wsp., 2008a). Różnice te mogą wynikać z kilku zasadniczych powodów. Po pierwsze wykazano, że samopodawanie sacharyny i kokainy aktywują inne mechanizmy molekularne w mózgu (Carroll i wsp., 1990). Możliwe jest więc, że proces wygaszania reakcji, wzmacnianej silnym narkoty-

w zależności od tego, jak długo trwa sesja przywoływania pamięci przeważa proces rekonsolidacji oryginalnej pamięci (krótka sesja) lub proces wygaszania (nowego uczenia) zadanej reakcji instrumentalnej (długa sesja).

W kolejnym eksperymencie postanowiliśmy sprawdzić, czy CHX podawany po sesji wygaszania trwale zaburza pamięć związaną z samopodawaniem sacharyny. W tym celu u zwierząt, którym wcześniej po sesjach wygaszania podawano CHX, przeprowadzono sesję, podczas której za pomocą zestawu bodźców dyskretnych, skojarzonych wcześniej z prezentacją nagrody, wywoływano nawrót reakcji

instrumentalnej (Mierzejewski i wsp., 2008a; Maccioni i wsp., 2007). Należy w tym miejscu podkreślić, że podczas wygaszania nie były prezentowane wszystkie oryginalne asocjacje związane z samopodawaniem sacharyny (patrz rycina 3), w tym przede

lidacji pamięci zależnej od syntezy nowych białek. Możliwe jest również, że zastosowany schemat doświadczenia w ogóle nie prowadził do procesu rekonsolidacji. Być może przypadkowa (niezwiązana ze wzmocnieniem ani reakcją instrumentalną) pre-



Rycina 3. Schemat asocjacji wytwarzanych podczas warunkowania instrumentalnego

wszystkim nie były prezentowane asocjacje związane z zestawem bodźców dyskretnych i wzmocnieniem (nagrodą). Możliwe więc, że pamięć związana z tymi asocjacjami nie została zaburzona przez CHX. Zgodnie z przewidywaniem nie zaobserwowano różnic w nawrocie pomiędzy grupą kontrolną i grupą, która otrzymywała CHX. Oznacza to, że pamięć związana z asocjacjami, dotyczącymi bodźców dyskretnych, nie została zaburzona przez podawany wcześniej CHX. Pojawiło się więc przypuszczenie, że w celu „skutecznego” wymazania pamięci należy podczas sesji przywoływania pamięci zaprezentować zestaw bodźców dyskretnych.

Wpływ ISB na rekonsolidację i nawrót reakcji instrumentalnej

W celu weryfikacji ostatniej hipotezy (patrz rozdział wyżej) przeprowadzono doświadczenie, w którym CHX był podawany po kolejnych sesjach nawrotu, wywoływanego prezentacją zestawu bodźców dyskretnych (Mierzejewski i wsp., 2008b). Podczas sesji nawrotu zwierzęta zaczynały spontanicznie naciskać na dźwignię, jednak naciskaniu nie towarzyszyły żadne konsekwencje (reakcja nie była wzmocniana). Podczas kolejnych sesji nawrotu, trwających 10 min., zwierzęta, które otrzymywały CHX prezentowały taki sam poziom naciskania na dźwignię jak zwierzęta z grupy kontrolnej (Mierzejewski i wsp., 2008b). Oznacza to, że przywoływanie asocjacji związanych z bodźcami dyskretnymi nie prowadziło do rekonsolidacji

zestawu bodźców dyskretnych jest niewystarczająca do pełnej reaktywacji pamięci dotyczącej asocjacji bodziec dyskretny-reakcja instrumentalna.

W kolejnym eksperymencie postanowiliśmy sprawdzić, czy przywołanie wszystkich asocjacji związanych z samopodawaniem sacharyny, co ma miejsce podczas „pełnej” (niemodyfikowanej) sesji samopodawania, może spowodować, że aktywowana pamięć stanie się wrażliwa na działanie CHX. Podobne badanie przeprowadzili wcześniej Hernandez i Kelley (2004). W badaniu tym zastosowali anizomycynę, którą podawali po sesji samopodawania trwającej 15 min. W trakcie sesji każdemu naciśnięciu na dźwignię towarzyszyła prezentacja bodźców dyskretnych i podanie cukru. Grupa zwierząt, która otrzymywała anizomycynę znacząco zredukowała liczbę naciśnień na dźwignię, co mogłoby wskazywać na silny efekt pro-amnestyczny. Dodatkowe eksperymenty kontrolne wykazały jednak, że za obserwowany efekt odpowiedzialna jest warunkowa awersja na cukier wywołana przez anizomycynę. Autorzy wysunęli hipotezę, że dobrze utrwalona pamięć, związana z warunkowaniem instrumentalnym, nie podlega procesowi rekonsolidacji zależnej od syntezy nowych białek, a wpływ ISB związany jest głównie z działaniami niespecyficznymi. Postanowiliśmy zweryfikować tę hipotezę w nieco innym modelu doświadczalnym (Mierzejewski i wsp., 2008c). W celu uniknięcia indukcji warunkowej awersji smaku (wtórne kojarzenie smaku słodkiego z awersyjnym działaniem ISB) zastosowaliśmy krótkie (5 min.) sesje samopodawania 0,1% roztwo-

ru sacharyny. Sesje te były prowadzone w odstępach pięciodniowych. W trakcie kolejnych sesji eksperymentalnych poziom naciskania na aktywną dźwignię był stabilny, podobny dla grupy zwierząt otrzymujących CHX i sól fizjologiczną. Zastosowana przez nas procedura nie indukowała warunkowej awersji smaku, co wykazał test wolnego wyboru pomiędzy wodą i 0,1% roztworem sacharyny. Preferencja sacharyny w grupie, która otrzymywała CHX i w grupie kontrolnej była podobna (Mierzejewski i wsp., 2008c).

Podsumowując: zastosowana przez nas procedura pozwoliła na wyeliminowanie niespecyficznych efektów związanych z działaniem CHX i potwierdziła, że dobrze utrwalona pamięć reakcji instrumentalnej jest niewrażliwa na działanie ISB.

Rola syntezy białek *de novo* w warunkowaniu instrumentalnym: podsumowanie

• Proces nabywania reakcji instrumentalnej i konsolidacji związanej z nią pamięci jest zależny od syntezy nowych białek w OUN. Dotyczy to zarówno nagród naturalnych (Hernandez i wsp., 2002; Mierzejewski i wsp., 2008) jak i nagród farmakologicznych (kokaina) (Mierzejewski i wsp., 2006). Także w przypadku innych form uczenia, takich jak labirynt wodny Morrisa czy labirynt Y, proces konsolidacji w sposób krytyczny jest zależny od syntezy nowych białek (Meiri i Rosenblum, 1998; Lattal i Abel, 2001; Patterson i wsp., 1987). Można więc przypuszczać, że **mechanizmy molekularne, związane z konsolidacją, mają charakter uniwersalny i obejmują syntezę białek *de novo*.**

• Proces wygaszania reakcji instrumentalnej, wzmocnianej kokainą, nie zależał od syntezy białek *de novo* (Mierzejewski i wsp., 2006). Proces wygaszania reakcji instrumentalnej, wzmocnianej sacharyną, można zaburzyć podaniem ISB, przy czym kierunek działania ISB zależy od długości trwania sesji wygaszania (Mierzejewski i wsp., 2008a). CHX podany po krótkiej sesji wygaszania (5 min.) zaburza prawdopodobnie proces rekonsolidacji, natomiast podany po długiej sesji wygaszania (30 min.) wpływa na proces wygaszania reakcji, opóźniając wygaszanie.

Podobne wyniki uzyskano na krabach *Chasmagnathus* w badaniach prowadzonych przez Pedreira i Maldonado (2003). Powyższe wyniki wspierają hipotezę, że **w zależności od czasu trwania sesji wygaszania przeważa albo proces rekonsolidacji (krótkie sesje) albo wygaszania (długie sesje).** Może to mieć istotne znaczenie praktyczne, gdyż długość sesji terapeutycznej może w istotny sposób wpływać na efekt terapeutyczny.

• Dobrze utrwalona pamięć, związana z warunkowaniem instrumentalnym, po przywołaniu bodźcami kontekstowymi przechodzi przez proces rekonsolidacji zależny od syntezy nowych białek (Mierzejewski i wsp., 2008a). **Jednak podanie ISB po reaktywacji pamięci bodźcami kontekstowymi nie zaburza oryginalnych asocjacji, obejmujących bodźce dyskretne.**

• Jeżeli podczas przywoływania pamięci, związanej z warunkowaniem instrumentalnym, prezentowane są bodźce dyskretne lub wzmocnienie, to nie dochodzi do procesu rekonsolidacji zależnego od syntezy nowych białek (Mierzejewski i wsp., 2008b,c). Oznacza to, że **nie można zaburzyć za pomocą ISB dobrze utrwalonych asocjacji, obejmujących bodźce dyskretne i bodziec wzmocniający.**

Czynniki wpływające na rekonsolidację pamięci związanej z warunkowaniem instrumentalnym: dyskusja

Ostatni wniosek wymaga szczegółowej dyskusji. Rozbieżności w wynikach, uzyskanych w badaniach nad procesem rekonsolidacji w awersyjnym warunkowaniu pawłowowskim i w apetytywnym warunkowaniu instrumentalnym, sugerują istotne różnice w mechanizmach molekularnych leżących u podłoża obu procesów.

Badania nad awersyjnym warunkowaniem pawłowowskim wskazują, że przywołanie pamięci poprzez prezentację samego bodźca warunkowego, jak i poprzez przeprowadzenie kolejnej sesji warunkowania (prezentacja bodźca warunkowego i następcza prezentacja bodźca bezwarunkowego) prowadzi do przejścia pamięci w stan labilny, wrażliwy na działanie ISB (Duvarci i Nader, 2004). W wielu badaniach po podaniu ISB obserwowano trwałą amnezję (Dębiec i wsp., 2002; Bozon i wsp., 2003; Duvarci i Nader, 2004; Suzuki i wsp., 2004), jednak część prac wskazuje, że zaburzenie pamięci miało jedynie charakter przejściowy (Anokhin i wsp., 2002; Lattal i Abel, 2004).

W przypadku warunkowania instrumentalnego przywołanie pamięci, podczas krótkiej sesji wygaszania, prowadziło do rekonsolidacji zależnej od syntezy nowych białek (Mierzejewski i wsp., 2008b), jednak zaburzenie pamięci w wyniku podania ISB nie było trwałe, gdyż reakcja instrumentalna natychmiast powracała po prezentacji zestawu bodźców dyskretnych. Natomiast, kiedy prezentowano bodźce dyskretne lub wzmocniano reakcję instrumentalną nie występowała rekonsolidacja zależna od syntezy białek *de novo* (Mierzejewski i wsp., 2008b; Mierzejewski i wsp., 2008c; Hernandez i wsp., 2002; Hernandez i Kelley, 2004).

Należy zaznaczyć, że w przypadku warunkowania instrumentalnego stosowano wiele sesji trenin-
gowych (>10 sesji), a w związku z tym pamięć była
silnie utrwalona. Być może więc trudno ją wpro-
wadzić ponownie w stan labilny, zależny od syntezy
białek *de novo*. Wielokrotne przywoływanie pamięci
(reaktywacja) powoduje, że pamięć staje się coraz
bardziej stabilna (trwała) i mniej wrażliwa na dzia-
łanie czynników amnestycznych. Możliwe jest, że
dobrze utrwalona pamięć składowana jest w postaci
wielu kopii (*backup'ów*) i podczas jej przywołania
i wprowadzenia w stan labilny można zaburzyć/
wymazać tylko jedną jej kopię, co w konsekwencji
nie wpływa w znaczący sposób na cały zasób pamię-
ciowy.

Możliwe jest także, że w przypadku prezentacji
bodźca dyskretnego lub bodźca bezwarunkowego
(wzmocnienia) nie dochodzi do przejścia pamięci
z fazy stabilnej w fazę labilną, i w konsekwencji
nie dochodzi do procesu rekonsolidacji. Hipotezę
taką wspierają badania na krabach *Chasmagnathus*
(Pedreira i wsp., 2004). Kraby uczone były reakcji
warunkowego zneruchomienia poprzez powtarza-
ną prezentację bodźca obrazującego zagrożenie. W
przypadku kiedy dochodziło do krótkiej (5 min.) re-
ekspozycji na kontekst, po której podawano CHX,
podczas kolejnej sesji obserwowano zmniejszoną re-
akcję lękową. Kiedy jednak reekspozycja składała się
dodatkowo z prezentacji bodźca obrazującego zagro-
żenie, CHX nie wpływał na ekspresję reakcji lęko-
wej. Tak więc, jednoczasowa ekspozycja na kontekst
i bodziec bezwarunkowy nie prowadziła do urucho-
mienia mechanizmów molekularnych zależnych od
syntezy białek *de novo*.

Biedenkapp i Rudy (2004) stawiają hipotezę, że jeże-
li bodziec (sygnał, obiekt) jest nierozzerwalnie związany
z kontekstem podczas fazy treningu, wtedy reekspozycja
na kontekst + bodziec nie prowadzi do wprowadzenia
pamięci w stan labilny. Konieczna jest jakaś znacząca
zmiana w warunkach eksperymentalnych, aby urucho-
mić procesy pamięciowe, związane z jej przebudową
i modyfikacją. Hipotezę taką wspiera dobrze znane zja-
wisko utajonego hamowania (*latent inhibition*). Jeżeli
zwierzę jest wielokrotnie wystawiane na działanie ja-
kiegoś bodźca, np. dźwięku dzwonka, to późniejsze ko-
jarzenie tego bodźca z bodźcem bezwarunkowym (np.
jedzeniem) nie prowadzi, albo prowadzi tylko w ogra-
niczonym stopniu do wytworzenia reakcji warunkowej
na ten bodziec (Lubow, 1973). Możliwe jest, że w tym
przypadku, w trakcie warunkowania nie dochodzi do
przejścia pamięci dotyczącej bodźca w stan labilny, a to
jest niezbędne do skojarzenia go z bodźcem bezwarun-
kowym (wytworzenia nowych asocjacji).

Podsumowując: przedstawione wyniki badań
wskazują na ograniczone możliwości zastosowania
ISB jako potencjalnych leków proamnestycznych.
ISB tylko częściowo zaburzały proces rekonsolidacji
pamięci, związanej z dobrze wyuczoną reakcją instru-
mentalną, wpływając jedynie na asocjacje związane
z kontekstem ekperymentalnym. Pamięć dotycząca
asocjacji obejmujących nagrodę i bodźce dyskretnie
po jej przywołaniu i podaniu ISB nie została istotnie
zaburzona. Być może pamięć ta nie podlega procesowi
rekonsolidacji lub podlega rekonsolidacji w ograni-
czonym stopniu, lub też proces jej rekonsolidacji nie
zależy od syntezy nowych białek

*Praca powstała w ramach realizacji tematu sta-
tutowego nr 68/08, realizowanego w Instytucie Psy-
chiatрії i Neurologii.*

PIŚMIENNICTWO

1. Akirav I, Khatsrinov V, Vouimba RM, Merhav M, Ferreira G, Rosenblum K i wsp. Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learn Mem* 2006; 13: 254-258.
2. Alberini CM. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 2005; 28: 51-66.
3. Anokhin KV, Tiunova AA, Rose SP. Reminder effects - reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 1759-1765.
4. Bahar A, Dorfman N, Dudai Y. Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 1115-1118.
5. Balleine BW, Dickinson A. Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* 1998; 37: 407-419.
6. Barraco RA, Stettner LJ. Antibiotics and memory. *Psychol Bull* 1976; 83: 242-302.
7. Berman DE, Dudai Y. Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 2001; 291: 2417-2419.
8. Bouton ME. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry* 2002; 52: 976-986.
9. Bouton ME, Nelson JB. Context-specificity of target versus feature inhibition in a feature-negative discrimination. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1994; 20: 51-65.
10. Bozon B, Davis S, Laroche S. A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 2003; 40: 695-701.
11. Bulik CM, Sullivan PF, Joyce PR, Carter FA, McIntosh VV. Predictors of 1-year treatment outcome in bulimia nervosa. *Compr Psychiatry* 1998; 39: 206-214.
12. Carroll ME, Lac ST, Ascencio J, Kragh R. Intravenous cocaine self-administration in rats is reduced by dietary l-tryptophan. *Psychopharmacol* 1990; 100: 293-300.

13. Castro-Larrazábal G, Colotla VA, Rojas-Ramírez JA. Effects of anisomycin on performance under a fixed ratio schedule (FR 25). *Proc West Pharmacol Soc* 1983; 26: 193-196.
14. Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 1984; 96: 518-559.
15. Dębiec J, LeDoux JE, Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 2002; 36: 527-538.
16. Drummond DC. What does cue-reactivity have to offer clinical research? *Addiction* 2000; 95, Suppl 2: 129-144.
17. Dudai Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12: 211-216.
18. Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 2004; 55: 51-86.
19. Duvarci S, Nader K. Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* 2004; 24: 9269-9275.
20. Ettenberg A, Pettit HO, Bloom FE, Koob GF. Heroin and cocaine intravenous self-administration in rats: mediation by separate neural systems. *Psychopharmacology (Berl)* 1982; 78: 204-209.
21. Frenkel L, Maldonado H, Delorenzi A. Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 1757-1766.
22. Hernandez PJ, Sadeghian K, Kelley AE. Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 2002; 5: 1327-1331.
23. Hernandez PJ, Kelley A. Long-term memory for instrumental responses does not undergo protein synthesis-dependent reconsolidation upon retrieval. *Learn Mem* 2002; 11: 748-754.
24. Jansen A. A learning model of binge eating: cue reactivity and cue exposure. *Behav Res Ther* 1998; 36: 257-272.
25. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001; 294: 1030-1038.
26. Landon TM, Barlow DH. Cognitive-behavioral treatment for panic disorder: current status. *J Psychiatr Pract* 2004; 10: 211-226.
27. Lattal KM, Abel T. Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J Neurosci* 2001; 21: 5773-5780.
28. Lattal KM, Abel T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4667-4672.
29. Lee JL, Milton AL, Everitt BJ. Cue-induced cocaine seeking and relapse are reduced by disruption of drug memory reconsolidation. *J Neurosci* 2006; 26: 5881-5887.
30. Ledgerwood L, Richardson R, Cranney J. Effects of D-cycloserine on extinction of conditioned freezing. *Behav Neurosci* 2003; 117: 341-349.
31. Lin CH, Yeh SH, Lu HY, Gean PW. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J Neurosci* 2003; 23: 8310-8317.
32. Lubow RE. Latent inhibition. *Psychol Bull* 1973; 79: 398-407.
33. Maruki K, Izaki Y, Akema T, Nomura M. Effects of acetylcholine antagonist injection into the prefrontal cortex on the progress of lever-press extinction in rats. *Neurosci Lett* 2003; 351: 95-98.
34. McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 1966; 153: 1351-1358.
35. Meiri N, Rosenblum K. Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res* 1998; 789: 48-55.
36. Mierzejewski P, Koroš E, Goldberg SR, Kostowski W, Stefański R. Intravenous self-administration of morphine and cocaine: a comparative study. *Pol J Pharmacol* 2003a; 55: 713-726.
37. Mierzejewski P, Rogowski A, Stefański R, Goldberg S, Kostowski W, Bieńkowski P. Ethanol-reinforced behaviour predicts acquisition but not extinction of cocaine self-administration in the rat. *Alcohol Alcohol* 2003b; 38: 543-549.
38. Mierzejewski P, Siemiątkowski M, Radwańska K, Szyndler J, Bieńkowski P, Stefański R i wsp. Cycloheximide impairs acquisition but not extinction of cocaine self-administration. *Neuropharmacology* 2006; 51: 367-373.
39. Mierzejewski P, Olczak M, Rogowski A, Kostowski W, Samochowiec J, Filip M i wsp. Effects of cycloheximide on extinction in an appetitively motivated operant conditioning task depend on re-exposure duration. *Neurosci Lett* 2008a; 441: 307-310.
40. Mierzejewski P, Rogowski A, Korkosz A, Bieńkowski P, Filip M, Samochowiec J i wsp. A protein synthesis inhibitor, cycloheximide does not alter cue-induced reinstatement of saccharin seeking. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008b; 32: 1533-1537.
41. Mierzejewski P, Korkosz A, Rogowski A, Korkosz I, Kostowski W i wsp. Post-session injections of a protein synthesis inhibitor, cycloheximide do not alter saccharin self-administration. *Neurosci Lett* 2008 [praca wysłana do druku].
42. Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 1968; 160: 554-555.
43. Myers KM, Davis M. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 2002; 36: 567-584.
44. Nader K. Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 2003; 26: 65-72.
45. Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 2000; 406: 722-726.
46. Patterson TA, Rosenzweig MR, Bennett EL. Amnesia produced by anisomycin in an appetitive task is not due to conditioned aversion. *Behav Neural Biol* 1987; 47: 17-26.
47. Pavlov IP. Conditioned Reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Oxford Univ. Press, Londyn, 1927.
48. Pedreira ME, Maldonado H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 2003; 38: 863-869.
49. Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem* 2004; 11: 79-85.
50. Przybysławski J, Sara SJ. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 1997; 84: 241-246.
51. Ribot T. Diseases of memory. Appleton-Century-Crofts, Nowy Jork, 1882.
52. Rodriguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutiérrez R, Bermudez-Rattoni F. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem* 2005; 12: 533-537.
53. Rohsenow DJ, Monti PM, Rubonis AV, Gulliver SB, Colby SM, Binkoff JA, Abrams DB. Cue exposure with coping skills training and communication skills training for alcohol dependence: 6- and 12-month outcomes. *Addiction* 2001; 96: 1161-1174.
54. Rubin RD. Clinical use of retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock. A conditioning hypothesis. *Can Psychiatr Assoc J* 1976; 21: 87-90.
55. Sangha S, Scheibenstock A, Lukowiak K. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J Neurosci* 2003a; 23: 8034-8040.
56. Sangha S, Scheibenstock A, Morrow R, Lukowiak K. Extinction requires new RNA and protein synthesis and the soma of the cell right pedal dorsal 1 in *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci* 2003b; 23: 9842-9851.

57. Santini E, Ge H, Ren K, Peña de Ortiz S, Quirk GJ. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 2004; 24: 5704-5710.
58. Sara SJ. Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1: 212-213.
59. Sinha R, Li CS. Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. *Drug Alcohol Rev* 2007; 26: 25-31.
60. Skinner BF. *Science and human behavior*. Macmillan, Nowy Jork, 1953.
61. Sobik L, Hutchison K, Craighead L. Cue-elicited craving for food: a fresh approach to the study of binge eating. *Appetite* 2005; 44: 253-261.
62. Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 2004; 24: 4787-4795.
63. Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 2001; 4: 813-818.
64. Unsworth N, Engle RW. On the division of short-term and working memory: an examination of simple and complex span and their relation to higher order abilities. *Psychol Bull* 2007; 133: 1038-1066.
65. Vianna MR, Igaz LM, Coitinho AS, Medina JH, Izquierdo I. Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 2003; 7: 199-203.

Adres korespondencyjny:

Paweł Mierzejewski

Zakład Farmakologii i Fizjologii OUN

Instytut Psychiatrii i Neurologii

ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa

tel. 22 45 82 899, fax 22 842 76 44, e-mail: mierzaje@ipin.edu.pl
