

NEURONALNE I MOLEKULARNE PODSTAWY UZALEŻNIEŃ OD OPIATÓW

Ryszard Przewłocki, Barbara Przewłocka

Zakład Neurofarmakologii Molekularnej

Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

NEURONAL AND MOLECULAR ASPECTS OF OPIATE DEPENDENCE

ABSTRACT – Opiate dependence is a central nervous system disorder of unknown mechanism. Neuronal basis of positive reinforcement, which is essential to opioid action as well as to the action of other drugs of abuse, lays in activation of dopaminergic neurons resulting in an increased dopamine release in mesolimbic brain structures. Certain aspects of dependence and withdrawal syndrome are also related to the activity of noradrenergic and serotonergic systems, as well as to excitatory and inhibitory aminoacid systems, which receive lately much attention. The latter have been recently proved to be involved both in the development of dependence and in counteracting the states related to relapses. Important role in neurochemical mechanisms of reinforcement and dependence is played by endogenous opioid systems, particularly by the μ opioid receptors, which are the targets of morphine. Especially important to the pharmacotherapy of dependence is an understanding of adaptive reactions, which take place in the nervous system at the cellular and molecular level as the result of opiate abuse. Recent research indicates that important role in dependence development is played also by intracellular mechanisms of signal transmission – from the receptor, through the G proteins, cyclic AMP and transcription factors. The latter may modify synthesis of target genes and in this manner be responsible for long lasting changes caused by substances of abuse.

Key words: opiate dependence, opioide peptides, noradrenergic neurons, c-AMP, transcription factors.

WSTĘP

Uzależnienia lekowe, określane jako konieczność czasowego lub stałego pobierania leku bez względu na wynikające z tego konsekwencje, stanowią zagrożenie funkcjonowania społeczeństw wywierając niszczący wpływ na zdrowie i poziom życia. Ogromne koszty uzależnień lekowych, to z jednej strony koszty negatywnego wpływu wielu leków uzależniających na stan zdrowia, a z drugiej wysokie, choć trudno wymierne koszty niszczącego wpływu uzależnień na możliwości i zdolności adaptacyjne poszczególnych osób.

Uważa się obecnie, że uzależnienie lekowe, w szczególności zależność od opiatów (morfina, heroina i związki o podobnym działaniu na receptory opioidowe), jest cho-

robą ośrodkowego układu nerwowego o nieznanym mechanizmie. Ta choroba mózgu prowadzi do poważnych, często trudnych do przewidzenia konsekwencji społecznych.

Skuteczne leki i metody zapobiegania rozwojowi uzależnień a również nawrotom choroby nie są jeszcze dostępne. Pomimo wielu lat badań nie udało się opracować zadowalającej terapii tego schorzenia. Współczesne postępowanie kliniczne pozwala bowiem na skuteczną detoksykację, to jest usunięcie z organizmu chorego substancji uzależniającej oraz uwolnienie go od ujemnych objawów będących skutkiem pobierania leków uzależniających. Jednakże nie oznacza to wyleczenia, gdyż uzależnienie prowadzi do utrwalonych zmian psychologicznych i dramatycznych nawrotów choroby. W przypadku uzależnienia od opiatów dochodzi do nawrotów u 90% chorych, a w chorobie alkoholowej u 75-90%. Tak więc sytuacja w zakresie leczenia uzależnień lekowych jest niepokojąca i wymaga szybkiego i skutecznego działania. Głównym celem poszukiwań i badań prowadzonych przez wiele światowych zespołów naukowych jest nowoczesna, racjonalna farmakoterapia wpływająca na neuronalne i molekularne mechanizmy uzależnienia. Znaczenie szczególne ma poznanie reakcji adaptacyjnych w układzie nerwowym, rozwijających się w wyniku przyjmowania środków uzależniających. Te zmiany adaptacyjne warunkują skomplikowany zespół zachowań określany jako zależność. Leżą one również u podstawy takich przewlekłych aspektów uzależnienia, jak nieopanowane pragnienie zażycia narkotyku i niepokój związany z brakiem substancji uzależniającej (*craving*) i powrót do stosowania substancji uzależniającej (*relapse*). Warunkiem niezbędnym do stworzenia skutecznej terapii są intensywne badania neurobiologiczne i molekularne niewyjaśnionych dotychczas mechanizmów uzależnień. Liczną grupę badań stanowią prace na modelach zwierzęcych, co jest tym bardziej uzasadnione, że w porównaniu z modelami innych chorób układu nerwowego, dobrze odzwierciedlają one fazy rozwoju choroby u ludzi. Badania na zwierzętach w korelacji z badaniami klinicznymi, mają prowadzić do opracowania przesłanek do syntezy nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwozależnościowym.

Neuronalne podstawy uzależnień

Neurony dopaminergiczne

Podłożem neuronalnym zjawiska zwanego wzmocnieniem pozytywnym, które leży u podstaw działania leków uzależniających, jest układ dopaminowy (Davidson i Stamford 1993, Koob 1992, Kornetsky i Porrino 1992). Dopaminowy system mezolimbiczny składa się z neuronów dopaminowych znajdujących się w polu brzusznej nakrywki (VTA) i miejsc docelowych ich projekcji czyli jądra półleżącego (NAS), brzuszno-przedniej części jądra ogoniastego, jądra migdałowego czy kory przedczołowej. Podstawowym warunkiem wzmocnienia pozytywnego jest pobudzenie dopaminowych neuronów w VTA i wzrost wydzielania dopaminy w NAS. Wspólnym efektem działania należących do różnych farmakologicznych grup leków uzależniających – opioidów, jak i innych leków uzależniających, takich jak kokaina, amfetamina, etanol, nikotyna, tetrahydrokanabinol – jest właśnie wzrost wydzielania dopaminy w NAS. Efekt ten może wynikać zarówno z ich bezpośredniego działania na neurony dopami-

nowe (kokaina i amfetamina), jak i z pośredniego wpływu (etanol, opioidy). Podanie wielokrotne substancji uzależniających o różnym farmakologicznym mechanizmie działania wywołuje podobne zmiany w zachowaniu (np. *craving*, sensytyzacja lokomotoryczna) co sugeruje, że mogą one powodować podobne komórkowe i molekularne adaptacje w mezolimbicznym systemie dopaminowym. Pogląd taki jest poparty danymi behawioralnymi wykazującymi, że długotrwała ekspozycja na opioidy lub środki psychostymulujące powoduje krzyżową sensytyzację na efekty tych substancji (Cunningham i Kelly 1992, Vezina i Steward 1990). Przypuszcza się, że w wyniku wielokrotnego podania substancji uzależniających dochodzi do nasilenia uwalniania dopaminy w NAS.

Wzmacniające działanie opiatów jest mediowane głównie poprzez receptor opioidowy μ , skoro zarówno pozbawienie zwierząt tego receptora, jak i jego antagoniści hamują to działanie (Negus i wsp. 1993). Opiaty działają na układ dopaminowy zarówno w VTA, gdzie blokują interneurony hamujące, oraz bezpośrednio w NAS, gdzie wywołują działanie wzmacniające poprzez receptor μ i δ . Z drugiej strony hamują uwalnianie dopaminy *via* receptor κ .

Ostatnio Hyytia i Koob (1995) zwrócili uwagę na znaczenie dla uzależnień układu neuronalnego, zlokalizowanego w części brzusznej przodomózgowia, zespołu połączonych ze sobą struktur wykazujących morfologiczne i neurochemiczne podobieństwa, który nazwali rozszerzonym ciałem migdałowatym (*extended amygdala*). Do tego zespołu struktur należy zewnętrzna część (*shell*) NAS, które jest uważane za główną strukturę mezolimbicznego układu dopaminowego, odpowiedzialną za wzmocnienie pozytywne. Pozostałe główne składowe, czyli centralno-środkowa część jądra migdałowatego oraz jądro prążka krańcowego to struktury układu limbicznego, zaangażowane w istotny sposób w zachowania emocjonalne.

Neurony opioidowe

Wśród systemów neuropeptydowych, mających szczególne znaczenie w uzależnieniach, należy wymienić przede wszystkim bardzo ważną grupę peptydów opioidowych.

Opiaty, czyli substancje działające poprzez receptory opioidowe, są najstarszą i bardzo liczną grupą substancji uzależniających. Wywierają one silny wpływ na motywację. Od odkrycia i identyfikacji receptorów opioidowych i wyizolowania w roku 1975 ich pierwszych endogennych ligandów Met- i Leu-enkefaliny, doprowadzono do wielu ustaleń w zakresie struktury i funkcji tych peptydów. Obecność aktywnych biologicznie peptydów opioidowych stwierdzono w strukturach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego oraz w innych systemach m.in. pokarmowym, endokrynnym i immunologicznym.

Prekursorami peptydów opioidowych są: proopiomelanokortyna (POMC, 265 aminokwasów), proenkefalina (PENK, 263 aminokwasów) oraz prodynorfina (PDYN, 256 aminokwasów), kodowane przez trzy niezależne geny. Z POMC powstają peptydy opioidowe α -, β -, γ -endorfina, oraz ponadto peptydy nieopiodowe: ACTH, α - i β -MSH. PENK jest prekursorem Leu- i Met-enkefaliny, Met-enkefaliny-Arg⁶ Gly⁷-Leu⁸, Met-enkefaliny-Arg⁶-Phe⁷, Peptydu E i F, a z PDYN powstaje dynorfina, rimorfina oraz β - i α -neondorfina (α -NEO).

Szereg dowodów wskazuje na istotną rolę endogennych systemów opioidowych w neurochemicznych mechanizmach wzmocnienia pozytywnego i awersji oraz zależności lekowych. Przyjmuje się, że peptydy powstające z PENK i POMC, poprzez aktywację receptorów μ i δ w VTA, pośrednio (przez hamowanie inhibicyjnego wpływu neuronów GABAergicznyc) zwiększają uwalnianie dopaminy i wywierają działanie pozytywnie wzmacniające. Działanie to znoszone jest przez selektywnego antagonistę receptora μ a także nie występuje u myszy pozbawionych tego receptora. Z drugiej strony peptydy pochodzące z PDYN, działając poprzez receptory κ zlokalizowane presynaptycznie na neuronach dopaminowych w układzie mezo limbicznym, hamują wydzielanie dopaminy w NAS i wykazują działanie awersyjne. Postulowano, że długotrwałe podawanie egzogennych agonistów receptorów μ i δ , a także innych substancji uzależniających może prowadzić do długotrwałego obniżenia biosyntezy PENK i POMC prowadzącego do niedoboru endogennych agonistów receptora μ i δ , co w konsekwencji może stanowić podłoże zależności lekowej. W tym przypadku, byłoby to osłabienie endogennego układu nagrody. Jednakże badania biochemiczne nie wykazały wyraźnego obniżenia poziomu peptydów czy kodującego ich mRNA w tych dwóch systemach opioidowych po przewlekłych podaniach substancji uzależniających (Bronstein i wsp. 1990, Przewłocka i wsp. 1997, Turchan i wsp. 1997). Dalsze badania zakładały, że w mechanizmach zależności lekowych wyraźniejsze mogą być zmiany adaptacyjne w aktywności systemu PDYN, gdyż mogą decydować o wystąpieniu efektów awersyjnych, charakterystycznych dla stanu odstawienia zarówno opiatów, jak i innych substancji uzależniających. Wyniki badań biochemicznych wykazały, że substancje uzależniające, należące do różnych farmakologicznie grup leków, prowadzą do wzrostu ekspresji genu PDYN i wydzielania α -NEO (peptydu pochodzącego z PDYN), a także do wzrostu poziomu α -NEO w tkance (Cole i wsp. 1995, Przewłocka i wsp. 1996a, 1997, Turchan i wsp. 1998). Każda z zastosowanych substancji uzależniających wpływała na powyższe parametry ze swoją dynamiką, niemniej największe nasilenie zmian obserwowano w okresie odstawienia substancji uzależniających. Dodatkowo wykazano, że indukowany podaniem amfetaminy wzrost ekspresji genu prodynorfinowego w prążkowiu i NAS jest hamowany przez inhibitora syntazy tlenu azotu, L-NAME (Przewłocka i wsp. 1996b). Fakt, że różne leki uzależniające wywołują podobny efekt wzrostu aktywności układu prodynorfinowego oraz obniżenie gęstości receptorów opioidowych κ (Przewłocka i wsp. 1997, Spangler i wsp. 1996, Turchan i wsp. 1998), przemawia za istnieniem wspólnego, neurochemicznego mechanizmu powstawania uzależnień lekowych. Wydaje się też, że w wyniku działania leków uzależniających dochodzi do swoistego oddziaływania różnych układów opioidowych, których rezultatem jest zachowanie homeostazy neuronalnej. Zaburzenie tej homeostazy może mieć istotne znaczenie w procesach powstawania uzależnień.

Istotnym problemem, o którym należy wspomnieć omawiając fizjologiczne aspekty uzależnień, są systemy anty-opioidowe. Badania wykazały, że pod wpływem przewlekłego podawania opioidów dochodzi do wzrostu aktywności innych systemów peptydowych, które działają przeciwstawnie do opioidów. Należy tu wymienić cholecystokinę (CCK), neuropeptyd FF (NPFF) oraz tyreoliberynę (TRH). Peptydy te osłabiają rozwój morfinowej tolerancji (CCK, TRH), łagodzą objawy odstawienia (TRH) oraz ich poziom wzrasta w płynie mózgowo-rdzeniowym pod wpływem przewlekłych

podają morfiny (NPPF) (Malin i wsp. 1990, Pu i wsp. 1994, Ramaro i Barghava 1990, Rothman i wsp. 1993, Stanfa i wsp. 1994). Wzrostem aktywności tych peptydów próbuje się tłumaczyć wiele niewyjaśnionych efektów przewlekłego podawania leków uzależniających, np. fakt, że dawka naloksonu potrzebna do wywołania syndromu odstawienia maleje wraz ze stopniem rozwoju tolerancji, czy też brak wpływu przewlekłych podań morfiny na gęstość i powinowactwo opioidowych receptorów. Jeżeli weźmiemy pod uwagę fakt, że gęstość receptorów opioidowych ulega zmianom pod wpływem podania NPPF lub przeciwciała do NPPF, to zmiana aktywności tego peptydu może, przynajmniej według niektórych autorów, wpływać na pewne efekty morfiny. Należy więc zwrócić uwagę na zmiany aktywności systemów antyopiodowych w trakcie powstawania uzależnienia, traktując je jako potencjalnego sprzymierzeńca w walce z długotrwałymi efektami leków uzależniających.

Neurony noradrenergiczne

Óśrodkowy układ noradrenergiczny składa się trzech głównych szlaków, grzbietowego, brzuszego i pęczka okołokomorowego. Szlak grzbietowy tworzą aksony komórek znajdujących się w miejscu sinawym (*locus coeruleus*, LC) dochodzące do kory mózgu i struktur limbicznych. Szlak brzuszny rozpoczyna się w nakrywce mostu i rdzeniu przedłużonym w skupiskach komórek określanych jako grupy A-1, A-2, A-5 i A-7 i dochodzi do struktur podkorowych, jądra migdałowatego, kory gruszkowej, przegrody i wzgórza. Trzeci szlak składa się z komórek znajdujących się w obrębie istoty szarej okołokomorowej. LC jest strukturą składającą się w 90% z neuronów noradrenergicznych, zaangażowaną z jednej strony w regulację układu uwagi oraz z drugiej w aktywność autonomicznego układu nerwowego. Wydaje się, że wiele objawów odstawienia leków uzależniających wiąże się ze wzrostem aktywności neuronów w tej strukturze. Także najsilniejsze behawioralne objawy odstawienia u zwierząt uzależnionych od morfiny uzyskuje się po podaniu antagonistów opioidowych bezpośrednio do tej właśnie struktury (Bozarth 1994, Maldonado i wsp. 1992). Komórki adrenergiczne w LC posiadają na ciałach komórkowych wiele receptorów opioidowych i α_2 adrenergicznych i są hamowane pod wpływem ich aktywacji. W strukturze tej wykazano obecność receptorów opioidowych μ i κ zlokalizowanych na dochodzących do niej zakończeniach nerwowych (Mansour i wsp. 1988), ale ich rola w uzależnieniach nie jest jeszcze w pełni poznana. Większość bezpośrednich efektów na neurony miejsca sinawego wywołują opioidy poprzez receptor μ . Pojedyncze podanie opioidów prowadzi do zahamowania czynności neuronu (Aghajanian i Wang 1987). Podania opioidów, powodując wielokrotną stymulację receptorów opioidowych μ , prowadzą do rozwoju tolerancji na ten inhibicyjny efekt, co oznacza, że aktywność elektrofizjologiczna neuronów w miejscu sinawym powraca do poziomu kontrolnego. Przy powtarzających się podaniach rozwija się w tych układach zależność od opioidów – podanie antagonisty wywołuje wzrost aktywności tych neuronów, a co za tym idzie nasilenie aktywności układu noradrenergicznego w przodomózgowiu. Efekty elektrofizjologiczne są silnie skorelowane z behawioralnymi objawami syndromu odstawienia. Jest kilka sposobów hamowania lub łagodzenia jego objawów. Jednym z nich jest podstawienie opioidu substancją aktywującą wprawdzie receptor μ , lecz posiadającą mniejszy potencjał uzależniający. Do takich substancji należy metadon,

który jest obecnie z powodzeniem stosowany w wielu krajach w terapii uzależnień. Ponieważ, jak już wspomniano, receptory adrenergicznych α_2 również hamują aktywność tych komórek, istnieje też możliwość łagodzenia objawów odstawienia związanych ze wzrostem aktywności systemu noradrenergicznego przez stymulację tego receptora, np. klonidyną, co powoduje wzmocnienie hamowania aktywności tego neuronu (Aghajanian 1978). Terapia ta jest stosowana w leczeniu zespołów odstawienia. Istnieje jeszcze możliwość wyhamowania wzrastającej po odstawieniu opioidu aktywności glutaminianergicznej przez podanie np. MK-801 antagonisty receptora NMDA (Akaoka i Aston-Jones 1991).

Aminokwasy pobudzające

Układ glutaminianergiczny to dominujący system neuronalny, który wydaje się mieć istotny, choć nie w pełni jeszcze poznany udział w efektach leków uzależniających. Receptory tego układu – jonotropowe receptory NMDA, kainowe i AMPA oraz receptory metabotropowe, głównie postsynaptyczne – występują szeroko w strukturach włączonych w proces uzależnienia. Receptory NMDA i AMPA występują w dużych ilościach w korze mózgu, w prążkowie, przegrodzie, w zakręcie zębatym hipokampa. Receptory NMDA są aktywowane przez intensywne sygnały nerwowe i ich pobudzenie prowadzi do długotrwałej depolaryzacji komórki. Pobudzenie tych receptorów może też prowadzić do synaptycznych zmian plastycznych i adaptacyjnych ważnych dla procesów uczenia się i pamięci, jakże istotnych w powstawaniu uzależnień.

Szereg danych zgromadzonych w ciągu ostatnich lat wskazuje na zmiany zachodzące w transmisji glutaminianergicznej w procesie powstawania uzależnienia. Wykazano, że antagoniści receptorów glutaminianergicznych, w szczególności receptora NMDA, osłabiają rozwój tolerancji na przeciwbólowe działanie opiatów, jak również osłabiają sensytyzację motoryczną spowodowaną lekami uzależniającymi. Jednakże interakcja leków uzależniających i antagonistów NMDA jest bardziej skomplikowana. Substancje te bowiem wykazują działanie psychostymulujące i mogą wywoływać także pozytywne wzmocnienie. Inny jonotropowy receptor, AMPA także ulega modyfikacji pod wpływem przewlekłego podawania opiatów i kokainy (Fitzgerald i wsp. 1996). W rezultacie wzmoczonej ekspersji podjednostek tego receptora w neuronach dopaminergicznych dochodzi do nasilenia stymulacji glutaminianergicznej a w konsekwencji i nasilonej aktywności układu mezo limbicznego. Adaptacyjne zmiany receptora AMPA wydają się mieć istotne znaczenie w molekularnych procesach leżących u podłoża procesów sensytyzacji.

Aktywacja receptora NMDA poprzez zwiększenie napływu jonów Ca^{2+} do komórki prowadzi do aktywacji enzymu zwanego syntazą tlenu azotu, który bierze udział w powstawaniu tlenu azotu w komórce nerwowej. Aktywacja receptora NMDA poprzez zwiększenie napływu jonów Ca^{2+} do komórki prowadzi do aktywacji enzymu, który wytwarza tlenek (East i Garthwaite 1991). Tlenek azotu to niezwykle aktywna substancja, która może modyfikować funkcje różnych etapów transmisji sygnału w komórce włącznie z ekspresją genów. Inhibitory syntezy tlenu azotu, podobnie jak antagoniści kanałów wapniowych oraz jak antagoniści receptora NMDA, istotnie hamują rozwój tolerancji oraz niektóre objawów odstawienia (Przewłocka i wsp. 1996b, Vetulani, 2000).

Kortykoliberyna (CRF)

CRF i neuropeptydy należące do tego systemu (urotensyna I, urokortyna) nie tylko uczestniczą w hormonalnej odpowiedzi na bodźce stresowe, lecz także działają neurotropowo w ośrodkowym systemie nerwowym pośrednicząc w odpowiedziach behawioralnych na stres. Neurony wytwarzające CRF wydają się uczestniczyć z jednej strony w zaburzeniach hormonalnych wywoływanych przez leki uzależniające, a z drugiej w zachowaniach lękowych czy efektach awersyjnych wywołanych w szczególności odstawieniem leków czy stresie związanym z nawrotem do nałogu. Szereg badań wskazuje, że morfina wpływa na neurony wytwarzające CRF. Efekty te są szczególnie poznane w podwzgórzu, gdzie stwierdzono po morfinie zwiększenie uwalniania CRF w konsekwencji wyrzutu ACTH z przysadki (Nikolarakis i wsp. 1989). Ostatnio stwierdzono również, że jednorazowe podanie morfiny podnosi poziom CRF w jądrze prążka krańcowego, natomiast chroniczne podawanie powoduje jego obniżenie (Milanes i wsp. 1997). Liczne dane wskazują, że kokaina również nasila uwalnianie CRF w jądrze migdałowatym (Richter i wsp. 1995). Dane te wyraźnie wskazują na wpływ leków uzależniających na funkcję neuronów zawierających CRF w strukturach rozszerzonego jądra migdałowatego. Wykazano też, że wspólnym korelatem wczesnego okresu odstawienia różnych substancji uzależniających mogą być wspólne neurochemiczne mechanizmy – pobudzenie systemu CRF w układzie limbicznym i obniżenie funkcji dopaminy w układzie mezo limbicznym (Koob i LeMoal 1997). Jest również prawdopodobne, że endogenne peptydy opioidowe biorą udział w regulacji aktywności tego układu w jądrze migdałowatym. Wydaje się więc, że CRF uczestniczy w reakcjach stresowych związanych z efektami leków uzależniających zarówno w układzie limbicznym (w szczególności w jądrze migdałowatym), jak również w regulacji hormonalnej osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej. Odkrycia ostatnich lat, takie jak opisanie dwóch typów receptorów CRF-1 i CRF-2, białka wiążącego CRF, podobnego do CRF peptydu zwanego urokortyną (która może być endogennym agonistą receptora CRF-2) oraz niepeptydowych antagonistów CRF, otwierają nowe możliwości badawcze w obszarze uzależnień. Najnowsze badania wykazały, że urokortyna może być włączona w związane z apetytem reakcje na bodźce stresowe (Spina i wsp. 1996]. Wydaje się, że stres odgrywa istotną rolę w różnych aspektach procesu uzależnienia, szczególnie w czasie odstawienia oraz w negatywnych stanach emocjonalnych. Stres, a pośrednio CRF, wydają się być głównymi czynnikami związanymi z podatnością na nawroty do nałogu.

Molekularne podstawy uzależnień

Receptory

Dopaminowe i opioidowe receptory, należące do rodziny receptorów związanych z białkami G, są krytyczne dla powstawania pozytywnego wzmocnienia po lekach uzależniających.

Obecnie przyjmuje się, że istnieją trzy typy receptorów opioidowych μ , δ i κ , a także ich podtypy, co potwierdziły badania farmakologiczne. Już w latach 80.

stosując techniki wiązania radioaktywnych ligandów wykazano obecność w mózgu podtypów receptora μ , opisując je jako $\mu 1$ i $\mu 2$. Miejsca wiążące $\mu 1$ i $\mu 2$ występują oddzielnie w strukturach mózgu myszy i szczura, a stosunek tych dwóch populacji podtypów receptora μ różni się w poszczególnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego; np. w gałce bladej i jądrze pasma samotnego wykazano jedynie obecność podtypu $\mu 2$. Natomiast większą gęstość podtypu $\mu 1$ stwierdzono w korze czołowej i w rdzeniu kręgowym. Receptory $\mu 1$ wiążą z wysokim powinowactwem morfinę. Podtyp $\mu 2$ wiąże z niskim powinowactwem klasycznych agonistów receptora m , tj. morfinę oraz analog enkefaliny DAMGO. Ostatnie badania wykazały, że podtypem receptora μ zaangażowanym we wzmocnienie pozytywne jest receptor $\mu 1$. Pośredniczy on w naturalnym zachowaniu motywacyjnym, a specyficzny antagonistą tego receptora, naloxonazyna znosi wzmocnienie pozytywne wywołane morfiną (Suzuki i wsp. 1993). Nie znosi go natomiast specyficzny antagonistą receptora δ naltrindol, pomimo że morfina jest również agonistą receptora δ , co świadczy o braku udziału receptora δ w nagradzającym efekcie morfiny. Morfina i metadon wykazują większe powinowactwo do ludzkiego receptora m niż do szczurzego receptora μ .

Badania farmakologiczne sugerują istnienie podtypów receptora δ - $\delta 1$ i $\delta 2$, których selektywnymi agonistami są odpowiednio DPDPE oraz $[D-Ala^2, Glu^4]$ deltorfina. Istnieje opinia, że selektywni agonści receptora opioidowego δ mogą posiadać korzystniejszy profil terapeutyczny niż klasyczne analgetyki opioidowe będące agonistami receptora μ . Agonistów receptora δ cechuje bowiem niższe ryzyko wywołania zależności, brak wpływu depresyjnego na ośrodek oddechowy oraz brak istotnego wpływu na funkcje układu pokarmowego.

Dane farmakologiczne wskazują również na istnienie podtypów receptora κ . Uważa się, że związki o budowie aryloacetamidowej, (np. U69,593) wiążą się do receptora $\kappa 1$, podczas gdy pochodne benzomorfanu, takie jak bromazocyna i etyloketocyklazocyna, wiążą się głównie do receptora $\kappa 2$. Istnieją również sugestie wskazujące na występowanie podtypu $\kappa 3$.

Receptory opioidowe posiadają charakterystykę receptorów związanych z białkami G. Aktywacja receptorów opioidowych μ i δ wywołuje wzrost wydzielania dopaminy w NAS (DiChiara i Imperato 1988). Ten wzrost wydzielania dopaminy spowodowany jest hamującym działaniem agonistów receptorów opioidowych μ i δ w stosunku do hamujących neuron dopaminowy interneuronów GABA. Badania wykazały, że aktywacja opioidowych receptorów występujących w mezokortykolimbicznym systemie jest wystarczająca, aby wywołać motywacyjny efekt opioidów (Joyce i Iversen 1979). Dostosowane lub dokomorowe podania agonistów receptora μ w dawkach wywołujących wzmocnienie pozytywne, stymulują wydzielanie i nasilają metabolizm dopaminy w NAS. Ten sam efekt obserwowano w odpowiedzi na podanie tych substancji do VTA, lecz nie do NAS. Interesujący jest fakt, że aktywacja innego receptora opioidowego – receptora κ wywołuje stany awersyjne i dysforyczne (Bals-Kubik i wsp. 1989). Podanie agonistów receptora κ , w dawkach wywołujących reakcje awersyjne, hamuje wydzielanie dopaminy po podaniu dokomorowym, lub systemowym, podczas gdy podanie do VTA pozostaje bez efektu (Spanagel i wsp. 1992, Spanagel i wsp. 1994). Uszkodzenie szlaków dopaminergicznych przy pomocy 6-OHDA, powodujące znaczne obniżenie poziomu dopaminy, lub specyficzna blokada receptorów dopami-

nowych w NAS osłabia zarówno efekt agonistów receptora μ , jak i receptora κ (Stinus i wsp. 1980, Kalivas i wsp. 1983), co uzasadnia stwierdzenie, że dopaminowe neurony z VTA do NAS są krytyczną strukturą dla ekspresji dwóch przeciwnych efektów opioidów (Koob i wsp. 1989, Nestler 1996).

Liczne badania wykazały, że receptory dopaminowe oraz opioidowe ulegają procesom desensytyzacji i *down*-regulacji w wyniku krótkotrwałej ekspozycji na agonistów. Mechanizm tej desensytyzacji wydaje się być wynikiem fosforylacji receptorów przez kinazy receptorów związanych z białkami G, które fosforylują tylko receptory związane z agonistą i związane z nim białko arrestyny, która sekwestruje ufosforylowany receptor (Terwilliger i wsp. 1994). Wykazano, że taka fosforylacja receptorów opioidowych i dopaminowych prowadzi do ich desensytyzacji. W badaniach *in vitro* wykazano również, że internalizacja receptorów opioidowych podlega pewnym zmianom pod wpływem morfiny. Należy przypuszczać, że procesy fosforylacji i internalizacji mają znaczenie w długoterminowych zmianach. Problem ten jest niejasny, chociaż badania wskazują, że kinazy związane z tymi procesami ulegają *up*-regulacji pod wpływem chronicznego podawania opiatów.

Białka G

Następnym, po aktywacji receptora, procesem mogącym mieć wpływ na rozwój uzależnienia są zmiany w białkach G. Wiąże one receptor z systemem efektorowym komórki, czyli wtórnymi przekaźnikami, kinazami, fosfatazami i fosfoproteinami. Regulacja tych wewnątrzkomórkowych przekaźników uczestniczy w mechanizmach oddziaływania systemu neuroprzekaźnik-receptor na różne aspekty funkcji neuronalnej. Przekaz informacji na etapie białek G może być regulowany na trzy sposoby. Pierwszym byłaby zmiana fosforylacji tej części receptora, która jest odpowiedzialna za interakcję z białkiem G, co w konsekwencji uniemożliwia aktywację tego białka, a co za tym idzie nie dochodzi do aktywacji cykazy adenylanowej. Inną drogą może być zmiana preferencji różnych podtypów podjednostek α , β i γ . Badania wskazują, że w uzależnieniach dochodzi do powstania specyficznego, powtarzalnego układu tych podjednostek, co może mieć znaczenie funkcjonalne.

Istnieje jeszcze inna możliwość zmiany w zakresie funkcji białek G, a mianowicie zmiana ekspresji genów kodujących poszczególne podjednostki białek G, a więc zmiana dostępności tych podjednostek albo zmiany ekspresji szeregu białek, które modulują funkcje białek G. Rzeczywiście, opiaty i kokaina powodują obniżenie poziomu podjednostki α białek G_i i G_o w mózgu (Self i wsp. 1994, Nestler i wsp. 1990). Leki uzależniające mogą też regulować podjednostki b i g a także białka regulujące funkcję białka G jak również białka kanałów jonowych (K^+ i Ca^{2+}) związanych z białkami G.

Badania ostatnich lat wykazały zmiany w aktywności białek G, które mogą pośredniczyć w działaniu uzależniającym opioidów. Wydaje się, że tolerancja na lek może wynikać z osłabienia oddziaływania pomiędzy receptorem opioidowym a białkami G. To z kolei może być rezultatem osłabienia ekspresji, jak to np. wykazano dla białek G_i lub nasilenia ekspresji białek G_s , czy też zwiększonej fosforylacji kompleksu ligand-receptor i nasilenia procesów internalizacji i w konsekwencji regulacji „w dół”, czyli *down*-regulacji receptora. Badanie poziomów mRNA kodujących białka G

wykazuje, że po przewlekłym podawaniu opioidów w hipokampie zwiększa się poziom białka G_o a zmniejsza G_s (Przewłocka i wsp. 1994).

Cykliczny AMP

Kolejnym elementem wewnątrzkomórkowej transmisji sygnału uczestniczącym w działaniu leków uzależniających, jest droga cyklicznego AMP (cAMP). Głównym efekтором receptora opioidowego, na który działają zaktywizowane jednostki białek G, jest cyklaza adenylanowa odpowiadająca za syntezę cAMP. W rozwoju badań nad mechanizmem zależności hipoteza udziału cAMP stanowiła ważny etap. Opioidy podane jednorazowo hamują cyklazę adenylanową obniżając poziom cAMP w komórce (Beitner i wsp. 1989). Przewlekłe podanie opioidów prowadzi do kompensacyjnej *up*-regulacji cAMP. Zwiększa się poziom cyklazy adenylanowej, kinazy zależnej od cAMP, PKA i wielu fosfoprotein MARPPs (*Morphine and cAMP Regulated Phospho Proteins*). Wzrost aktywności systemu cAMP jest homeostatyczną odpowiedzią neuronów (np. w LC, lecz nie tylko) na przewlekłe podawanie opiatów. Zgodnie z tym stwierdzeniem opioidowa *up*-regulacja systemu cAMP zwiększa wewnętrzną pobudliwość neuronów i to może być podstawą przynajmniej części mechanizmów uzależnienia, w szczególności w czasie odstawienia, kiedy ma miejsce znaczne nasilenie aktywności drogi cAMP.

Zaangażowanie drogi cAMP w przewlekłym działaniu różnych substancji uzależniających postuluje się na podstawie badań behawioralnych oraz rezultatów badań *in vitro*, jak również wyników badań przeprowadzonych w szeregu struktur mózgu, jak LC, NAS, jądro migdałowe, VTA. Sugeruje się, że np. proces sensytyzacji, kiedy to reakcja na lek uzależniający nasila się wraz z jego kolejnymi podaniami, może być związany ze wzrostem poziomu cAMP w niektórych drogach neuronalnych.

Czynniki transkrypcyjne

Jedną z istotnych funkcji cAMP jest regulacja genów poprzez fosforylację zależną od wtórnych przekaźników lub przez indukcję niektórych jądrowych czynników transkrypcyjnych. Są to białka wiążące się do specyficznej sekwencji DNA na promotorze, które regulują transkrypcję szeregu genów. Fakt, że uzależnienie ma charakter przewlekły, zainspirował pogląd, że proces ten może być związany ze zmianą ekspresji niektórych genów. Istotnie, wiele badań wskazuje, że leki uzależniające wpływają na poziom i aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych. Opiaty podane jednorazowo hamują różne elementy drogi cAMP w komórkach nerwowych, a obniżając poziom cAMP obniżają aktywność kinazy białkowej A (PKA) i fosforylację różnych kanałów i pomp jonowych w błonie komórkowej, a także szeregu innych białek komórkowych. Zahamowanie drogi cAMP wywołuje więc wiele wtórnych zmian funkcjonalnych w komórce. Najistotniejsze dotyczą zmian aktywacji niektórych czynników transkrypcyjnych, w szczególności czynnika CREB (*cAMP response element binding protein*). W odpowiedzi na przewlekłe podawanie opiatów, kokainy i alkoholu dochodzi do wzrostu cAMP, m.in. w neuronach NAS (Terwilliger i wsp. 1991). W konsekwencji, przewlekłe podawanie opiatów wywołuje wzrost ilości białka cyklazy adenylanowej typu I i VIII, podjednostki katalitycznej i regulacyjnej typu II PKA a także innych fosfoprotein w tym CREB. Ostatnie badania w naszym laborato-

rium wykazały, że opioidy zwiększają fosforylację CREB a także ekspresję aktywowanych przez te czynniki transkrypcyjne genów (Bilecki i wsp. 2000; Bilecki i Przewłocki 2000). Białko CREB wiąże się w wielu genach do sekwencji CRE i wpływa na regulację ich ekspresji. Ta i podobne molekularne adaptacje mogą więc prowadzić do przewlekłych zmian w neuronach, a co za tym idzie zmian plastycznych w zachowaniu osobników. Przypuszcza się, że *up*-regulacja drogi cAMP, jako reakcja komórkowa na inhibicyjne działanie opiatów, przeciwstawia się behawioralnym mechanizmom pozytywnego wzmocnienia, a tym samym prowadzi do nasilenia procesów wywołujących awersję, szczególnie w stanie odstawienia. W procesie tym, przynajmniej w niektórych strukturach mózgu, jak np. NAS, może aktywnie uczestniczyć opioidowy system PDYN, który w NAS ma działanie awersyjne, a ekspresja genu PDYN jest aktywowana przez białko CREB (Hyman 1996). Wykazano, że podanie morfiny i kokainy wpływa na ten czynnik transkrypcyjny zmieniając jego fosforylację i ekspresję w mózgu oraz hodowlach tkankowych *in vitro*. Sugeruje się, że to właśnie CREB mediuje działanie cAMP, którego poziom podnosi się w wyniku przewlekłego działania morfiny. Za udziałem czynnika CREB w uzależnieniach świadczą też wyniki badań przeprowadzonych u zwierząt pozbawionych CREB. Zwierzęta te wykazują osłabienie pewnych zachowań związanych np: z odstawieniem morfiny. Szczególną uwagę poświęcono też innym genom wczesnej odpowiedzi komórkowej jak np. c-fos i c-jun (Hope i wsp. 1992, 1994). Substancje uzależniające indukują te geny, w szczególności w strukturach mózgu zaangażowanych w proces uzależnienia. Efekt ten osłabia się wraz z wielokrotnym podaniem leków, a wspomniane geny zastępują geny zwane chronicznymi FRA (*Fos-related antigen*). Ustalono, że są to izoformy Δ FosB, skrócone warianty białka transkrypcyjnego FosB. Białka Δ FosB akumulują się w strukturach mózgu w wyniku wielokrotnego podawania leku. Tak więc wydaje się, że białka z rodziny Fos i Jun mogą brać udział w odpowiedzi transkrypcyjnej wywołanej ostrym podaniem substancji uzależniającej, z chwilą gdy białka Δ FosB uczestniczą w przewlekłym procesie adaptacji do leku.

Jeśli opisane powyżej czynniki transkrypcyjne odgrywają jakąś rolę w molekularnych mechanizmach uzależnień polekowych, to stanowią one jedynie niewielką część rodziny czynników transkrypcyjnych. Ponadto otwarte pozostaje pytanie, jakie geny docelowe, będące pod ich wpływem, modyfikowane są w wyniku procesu uzależnienia. Niektóre z tych genów mogą być krytyczne dla rozwoju uzależnienia i tym samym mogą stać się potencjalnym celem w terapii uzależnień.

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat przyniosły duży postęp w zrozumieniu przewlekłych zmian adaptacyjnych, jakie wywołują leki uzależniające. Przewlekłe podawanie opioidów a także innych leków uzależniających może prowadzić do długotrwałych zmian w procesach neuroprzekaznictwa. Można wyróżnić kilka kluczowych punktów o szczególnym znaczeniu dla tych zjawisk.

Badania wskazują na zmiany w strukturze dopaminowych neuronów w VTA pod wpływem przewlekłej ekspozycji na leki uzależniające. Inną grupę adaptacji stanowiłyby zmiany na poziomie receptorowym oraz białek G, które pociągają za sobą kaska-

dę zmian w poziomie kinaz białkowych i poziomie fosforylacji różnych białek w komórce, prowadzących w efekcie do zmian w ekspresji czynników transkrypcyjnych oraz genów docelowych, determinujących stan aktywności funkcjonalnej komórek nerwowych. Te długotrwałe zmiany w ekspresji genów mogą leżeć u podstaw utrzymujących się stanów zależności, a w konsekwencji uzależnień lekowych.

STRESZCZENIE

Uzależnienia od opiatów jest chorobą ośrodkowego układu nerwowego o nieznanym mechanizmie. Podłożem neuronalnym wzmocnienia pozytywnego, które leży u podstaw działania opioidów, a także innych leków uzależniających, jest pobudzenie dopaminowych neuronów i wzrost wydzielania dopaminy w strukturach mezolimbicznego układu dopaminowego. Oprócz tego układu, pewne elementy uzależnienia i zespołu zwanego syndromem odstawienia, zależą od neuronów noradrenergicznych, serotoninowych oraz ostatnio intensywnie badanych układów hamujących i pobudzających aminokwasów. Dla tych ostatnich udowodniono istotne znaczenie zarówno w rozwoju uzależnienia, jak i hamowaniu stanów związanych z powrotem do nałogu. Istotną rolę w neurochemicznych mechanizmach wzmocnienia pozytywnego i zależności odgrywają endogenne układy opioidowe, a w szczególności receptory opioidowe μ , na które działa morfina. Szczególne znaczenie dla farmakoterapii uzależnień ma poznanie reakcji adaptacyjnych na poziomie komórkowym i molekularnym w układzie nerwowym, rozwijających się w wyniku przyjmowania opiatów. Ostatnio uważa się, że istotną rolę w powstawaniu uzależnienia odgrywają wewnątrzkomórkowe mechanizmy transmisji sygnału począwszy od receptora, przez białka G, cykliczny AMP oraz czynniki transkrypcyjne. Te ostatnie mogą zmieniać syntezę genów docelowych i w ten sposób odpowiadać za utrzymujące się przez długi okres zmiany zachodzące pod wpływem substancji uzależniających.

Słowa kluczowe: uzależnienie od opiatów, opioidowe peptydy, neurony noradrenergiczne, c-APM, czynniki transkrypcyjne.

PIŚMIENNICTWO

1. Aghajanian G.K. (1978): *Tolerance of locus coeruleus neurons to morphin and suppression of withdrawal response by clonidine*. Nature, 267, 186-188.
2. Aghajanian G.K., Wang Y.Y. (1987): *Common alpha-2 and opiate effector mechanisms in locus coeruleus: intracellular studies in brain slices*. Neuropharmacology, 26, 789-800.
3. Akaoka A., Aston-Jones G. (1991): *Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input*. J. Neurosci., 11, 3830-3839.
4. Bals-Kubik R., Herz A., Shippenberg T.S. (1989): *Evidence that the aversive effects of opioid antagonists and -agonists are centrally mediated*. Psychopharmacology, 98, 203-206.

5. Beitner D.B., Duman R.S., Nestler E.J. (1989): *A novel action of morphine in the rat locus coeruleus: persistent decrease in adenylate cyclase*. Mol. Pharmacol., 35, 559-564.
6. Bilecki W., Holtt V., Przewłocki R. (2000): *Acute delta-opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG108-15 cells*. Eur. J. Pharmacol., 390, 1-6.
7. Bilecki W., Przewłocki R. (2000): *Effect of opioids on Ca²⁺/cAMP responsive element binding protein*. Acta Neurobiol. Exp., 60, 557-567.
8. Bozarth M.A. (1994): *Physical dependence produced by central morphine infusions: an anatomical mapping study*. Neurosci. Biobehav. Rev., 18, 373-383.
9. Bronstein D.M., Przewłocki R., Akil H. (1990): *Effects of morphine treatment on proopiomelanocortin systems in rat brain*. Brain Res., 519, 102-111.
10. Cole R.L., Konradi C., Douglas J., Hyman S.E. (1995): *Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum*. Neuron, 14, 813-823.
11. Cunningham S.T., Kelly A.F. (1992): *Evidence for opiate-dopamine cross-sensitization in nucleus accumbens: studies of conditioned reward*. Brain Res. Bull., 29, 675-680.
12. Davidson C., Stamford J.A. (1993): *Neurochemical evidence of functional A10 dopamine terminals innervating the ventromedial axis of the neostriatum in vitro voltammetric data in rat brain slices*. Brain Res., 615, 229-239.
13. DiChiara G., Imperato A. (1988): *Opposite effects of mu and kappa opiate agonist on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats*. J. Pharm. Exp. Ther., 244, 1067-1080.
14. Fitzgerald L.W., Ortiz J., Hamedani A.G., Nestler E.J. (1996): *Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral area: common adaptations among cross-sensitizing agents*. J. Neurosci., 16, 274-284.
15. Hope B.T., Kosofsky B., Hyman S.E., Nestler E.J. (1992): *Regulation of IEG expression and AP-1 binding by chronic cocaine in the rat nucleus accumbens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5764-5768.
16. Hope B.T., Nye H.E., Kelz M.B., Self D.W., Iadarola M.J., Nakabeppu Y., Duman R.S., Nestler E.J. (1994): *Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered fos-like protein in brain by chronic cocaine and other chronic treatments*. Neuron, 13, 1235-1244.
17. Hyman S.E. (1996): *Addiction to cocaine and amphetamine*. Neuron, 16, 901-904.
18. Hyytia P., Koob G.F. (1995): *GABA_A receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats*. Eur. J. Pharmacol., 283, 151-159.
19. Joyce E.M., Iversen S.D. (1979): *The effect of morphine applied locally locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat*. Neurosci. Lett., 14, 207-212.

20. Kalivas P.W., Widerfov E., Stanley D., Breese G., Prange A.J. (1983): *Enkephalin action on the mesolimbic system: A dopamine-dependent and a dopamine-independent increase in locomotor activity*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 227, 229-237.
21. Koob G.F. (1992): *Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways*. TIPS, 13, 177-184.
22. Koob G.F., LeMoal M. (1997): *Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation*. Science, 278, 52-58
23. Koob G.F., Wall T.L., Bloom F.E. (1989): *Nucleus accumbens as a substrate for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal*. Psychopharmacology, 98, 530-534.
24. Kornetsky C., Porrino L.J. (1992): *Brain mechanisms of drug-induced reinforcement*. Research Publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease, 70, 59-77.
25. Mansour A., Khachaturian H., Lewis M.E., Akil H., Watson S.J. (1988): *Anatomy of CNS opioid receptors*. Trends Neurosci., 11, 308.
26. Malin D. H., Lake J. R., Hammond M. V., Vogler D. E., Rigillio R. B., Brown S. R., Sims J. L., Leecraft B. M. Y., Yang H. Y. (1990): *FMRF-NH₂-like mammalian octapeptide: possible role in opiate dependence and abstinence*. Peptides, 11, 969-972.
27. Maldonado R., Stinus L., Gold L.H., Koob G.F. (1992): *Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 261, 669-677.
28. Milanés M.V., Laorden M.L., Chapleur-Chateau M., Burlet A. (1997): *Differential regulation of corticotropin releasing factor and vasopressin in discrete brain regions after morphine administration: correlation with hypothalamic noradrenergic activity and pituitary-adrenal response*. Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol., 356, 603-610.
29. Negus S.S., Henriksen S.J., Mattox A., Pasternak G.W., Portoghese P.S., Takemori A.E., Weinger M.B., Koob G.F. (1993): *Effect of antagonists selective for mu, delta and kappa opioid receptors on the reinforcing effects of heroin in rats*. Pharmacol Exp Ther., 265, 1245-52.
30. Nestler E.J. (1996): *Under siege: the brain on opiates*. Neuron, 16, 897-900.
31. Nestler E.J., Terwiliger R.Z., Walker J.R., Sevarino K.A., Duman R.S. (1990): *Chronic cocaine treatment decreases levels of the G-protein subunits Gi alpha and Go alpha in discrete regions of rat brain*. J. Neurochem., 55, 1079-1082.
32. Nikolarakis K.E., Pfeiffer A., Stalla G.K., Herz A. (1989): *Facilitation of ACTH secretion by morphine is mediated by activation of CRF releasing neurons and sympathetic neuronal pathways*. Brain Res., 498, 385-388.
33. Przewłocka B., Lasoń W., Przewlocki R. (1994): *The effect of chronic morphine and cocaine on Gs and Go protein messenger RNA levels in the rat hippocampus*. Neuroscience, 63, 1111-1116.

34. Przewłocka B., Turchan J., Lasoń W., Przewłocki R. (1997): *Ethanol withdrawal enhances prodynorphin system activity in the rat nucleus accumbens*. Neurosci. Lett., 238, 13-16.
35. Przewłocka B., Turchan J., Lasoń W., Przewłocki R. (1996a): *The effect of single and repeated morphine administration on prodynorphin system activity in nucleus accumbens and striatum of the rat*. Neuroscience, 70 (3), 749-754.
36. Przewłocka B., Turchan J., Machelska H., Łabuz D., Lasoń W. (1996b): *Nitric oxide synthase inhibitor L-NAME prevents amphetamine-induced prodynorphin gene expression in the rat*. Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat., 20, 1229-1237.
37. Pu S. T., Zhuang H. X., Han J. S. (1994): *Cholecystokinin octapeptide (CCK-8) antagonizes morphine analgesia in nucleus accumbens of the rat via the CCK-B receptor*. Brain Res., 657, 159-164.
38. Ramarao T., Bhargava H. N. (1990): *Effect of thyrotropin releasing hormone on the development of tolerance to the analgesic and hyperthermic actions of morphine in the rat*. Neuropeptides, 15, 213-217.
39. Richter R.M., Pich E.M., Koob G.F., Weiss F. (1995): *Sensitization of cocaine-stimulated increase in extracellular levels of corticotropin-releasing factor from the rat amygdala after repeated administration as determined by intracranial microdialysis*. Neurosci Lett., 187, 169-172.
40. Rothman R. B., Brady L. S., Long J. B. (1993): *Chronic intracerebroventricular infusion of the antiopioid peptide, Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂ (NPF), downregulates mu opioid binding sites in rat brain*. Peptides. 14(6), 1271-1277.
41. Self D.W., Nestler E.J., Stein L. (1994): *Inactivation of Gi and Go proteins in nucleus accumbens reduces both cocaine and heroin reinforcement*. J. Neurosci., 14, 6239-6247.
42. Spanagel R., Herz A., Shippenberg T.S. (1992): *Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2, 2046-2050.
43. Spanagel R., Almeida O.F., Bartl C., Shippenberg T.S. (1994): *Endogenous kappa-opioid systems in opiate withdrawal: role in aversion and accompanying changes in mesolimbic dopamine release*. Psychopharmacology, 115, 121-127.
44. Spangler R., Ho A., Zhou Y., Maggos C.E., Yuferov V., Kreek M.J. (1996): *Regulation of kappa opioid receptor mRNA in the rat brain binge pattern cocaine administration and correlation with preprodynorphin mRNA*. Mol. Brain Res., 19, 323-327.
45. Spina M., Merlo-Pich E., Chan R.K.W., Basso A.M., Rivier J., Vale W., Koob G.F.: (1996): *Appetite suppressing effect of urocortin, a CRF-related neuropeptide*. Science, 273, 1561-1564.
46. Stanfa L., Dickenson A., Xu X-J., Wiesenfeld-Hallin Z., (1994): *Cholecystokinin and morphine analgesia: variations on a theme*. TIPS, 15, 65-66.

47. Stinus L., Koob G.F., Ling N., Bloom F.E., Le Moal M. (1980): *Locomotor activation induced by infusion of endorphins into the ventral tegmental area: Evidence for opiate-dopamine interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77, 2323-2327.
48. Suzuki T., Funada M., Narita M., Misawa, M., Nagase H. (1993): *Morphine-induced place preference in the CXBK: characteristics of mu opioid receptor subtypes*. Brain. Res., 602, 45-52.
49. Terwilliger R.Z., Beitner-Johnson D., Sevarino K.A., Crain S.M., Nestler E.J. (1991): *A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function*. Brain Res., 548, 100-110.
50. Terwilliger R.Z., Ortiz J., Guitart X., Nestler E.J. (1994): *Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (betaARK) levels in the rat locus coeruleus*. J. Neurochem., 63, 1983-1986.
51. Turchan J., Lasoń W., Budziszewska B., Przewłocka B. (1997): *Effects of single and repeated morphine administration on the prodynorphin, proenkephalin and dopamine D2 receptor gene expression in the mouse brain*. Neuropeptides, 31, 24-28.
52. Turchan J., Przewłocka B., Lasoń W., Przewłocki R. (1998): *Effects of repeated psychostimulant administration on the prodynorphin system activity and kappa opioid receptor density in the rat brain*. Neuroscience, 85, 1051-1059
53. Vetulani J. (2000): *Uzależnienia lekowe na przełomie wieków*. w: Neuropsychofarmakologia. Dziś i jutro. (red. M. Bijak, W. Lasoń), Instytut Farmakologii PAN, str. 263-332.
54. Vezina P., Steward J. (1990): *Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects*. Brain Res., 519, 99-106.