

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



Pavλίna Nováková

## STIMULAČNÍ DROGY A JEJICH FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY

STIMULANT DRUGS AND THEIR PHYSIOLOGICAL EFFECTS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2011

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne ..... 2011

.....

Pavλίna Nováková

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména vedoucímu mé práce RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za čas, který mi věnoval.

Vděčnost bych chtěla vyjádřit též blízké i vzdálené rodině a přátelům za jejich emocionální a ekonomickou pomoc, bez které si své studium ani vznik této práce nedovedu představit.

## ABSTRAKT

Kategorie stimulačních drog je různorodou skupinou látek, jejichž poměr užitečnosti ku nebezpečí poškození organismu se velmi liší. Tato práce se systémovým přístupem k problému snaží charakterizovat podstatu fyziologických účinků vybraných zástupců stimulačních drog na mozek. Krátký farmakologický popis kofeinu, nikotinu, kokainu, amfetaminu a metamfetaminu je následován identifikací hlavních cílových molekul a příslušných neurotransmiterových systémů. Velká pozornost je věnována akutním a chronickým molekulárním mechanismům působení vybraných stimulačních drog s přesahem na úroveň relevantních neuronálních sítí. Další část představuje stimulační drogy jako trojské koně působící v nitru motivačního systému mozku. Nejprve je teoretická analýza odměny a neuroanatomická studie systému spojeného s odměnou použita jako základ pro formulaci současných představ o vzniku závislosti. Nakonec jsou společné vlastnosti představených drog na molekulární úrovni spojeny s konkrétními aspekty odměny ve snaze podchytit neurobiologický základ závislosti.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** stimulační drogy, fyziologické účinky, dopamin, odměna, motivace, závislost

## ABSTRACT

The category of stimulant drugs is a heterogenous group of substances which benefit-to-harm ratio varies widely. This work attempts to use a systemic approach in order to characterize the underlying basis of the physiological effects of their selected representatives in brain. A brief pharmacological description of caffeine, nicotine, cocaine, amphetamine and methamphetamine is followed by an identification of the main molecular targets of these drugs in the context of respective neurotransmitter systems. Major attention is given to both acute and chronic molecular mechanisms of action of the selected stimulant drugs up to the level of selected relevant neural circuits. In the next section stimulant drugs are presented as Trojan horses that bias the motivational system of the brain. Initially, a theoretical analysis of reward together with a neuroanatomical dissection of reward-related circuitry serves as a basis for the formulation of contemporary theories of drug addiction. Finally, an effort is made to synthesize common molecular events with specific aspects of reward in order to draw a picture of the neurobiological view of addiction.

**KEY WORDS:** stimulant drugs, physiological effects, dopamine, reward, motivation, addiction

## ZKRATKY

AC	adenylátcykláza	MAT	monoaminový transportér
ADO	adenozin	MAPK	kináza aktivovaná mitogenem
ACh	acetylcholin	MDNs	dopaminové neurony středního mozku
AMP	adenozin monofosfát	MSN(s)	neuron(y) se střední velikostí dendritických trnů
AR(s)	adenozinový(é) receptor(y)	NAC	nucleus accumbens
ATP	adenozin trifosfát	nAChR(s)	nikotinový(é) acetylcholinový(é) receptor(y)
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-dependentní proteinkináza II	NET	norepinefrinový transportér
cAMP	cyklický adenosin monofosfát	NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Cdk5	cyklin-dependentní kináza 5	NMDA	N-metyl-D-asparagová kyselina
CICR	Ca <sup>2+</sup> -indukovaný výlev Ca <sup>2+</sup>	PFC	prefrontální kortex
CNS	centrální nervový systém	PI3K	fosfoinositid-3-kináza
CREB	cAMP response element-binding	PKA	proteinkináza A
CS	podmíněný stimulus	PKC	proteinkináza C
CStr	corpus striatum	PPTg	nucleus tegmentalis pedunculo pontinus
DA	dopamin	SERT	serotoninový transportér
DARPP-32	neuronální fosfoprotein řízený dopaminem a cAMP	SNpc	substantia nigra pars compacta
DAT(s)	dopaminový(é) transportér(y)	SNpr/Gpi	substantia nigra pars reticulata/ globus pallidus pars interna
DS	dorzální striatum	S-R	stimulus-odpověď
DYN	dynorfin	S-S	stimulus-stimulus
ENK	enkefalin	STN	nucleus subthalamicus
ERK	kináza spojená s extracelulárním signálem	TF	transkripční faktor
GABA	γ-aminomáselná kyselina	VMAT	vezikulární monoaminový transportér
KO	vyřazení genu	VOCC	napětově ovládané Ca <sup>2+</sup> kanály
Glu	glutamát	VP	ventrální pallidum
GPCRs	receptory spřažené s G proteiny	vSub	ventrální subikulum hipokampu
Gpe	globus pallidus pars externa	VTA	oblast ventrálního tegmenta
IEGs	geny bezprostřední odpovědi		
LDT	nucleus tegmentalis posterolateralis		
LTP	dlouhodobá potenciace		

## OBSAH

1	Úvod .....	6
2	Stručná farmakologická charakteristika vybraných stimulačních drog .....	7
3	Cílové molekuly a systémy.....	9
3.1	Adenozinergní systém a cílové molekuly kofeinu .....	9
3.1.1	Stručný úvod do fungování adenozinergního systému.....	9
3.1.2	Struktura, distribuce a funkce adenozinových receptorů .....	10
3.2	Cholinergní systém a cílové molekuly nikotinu.....	11
3.2.1	Stručný úvod do fungování cholinergního systému.....	11
3.2.2	Struktura, distribuce a funkce acetylcholinových receptorů nikotinového typu .....	12
3.3	Monoaminergní systém a cílové molekuly kokainu, amfetaminu a metamfetaminu.....	13
3.3.1	Stručný úvod do fungování monoaminergního systému .....	13
3.3.2	Struktura, distribuce a funkce monoaminergních transportérů .....	13
4	Molekulární mechanismy působení stimulačních drog.....	14
4.1	Molekulární a farmakologické aspekty působení kofeinu .....	14
4.1.1	Akutní a chronické účinky .....	14
4.1.2	Účinky kofeinu na úrovni fyziologických funkcí.....	15
4.2	Molekulární a farmakologické aspekty působení nikotinu .....	18
4.2.1	Akutní a chronické účinky .....	18
4.2.2	Účinky nikotinu na úrovni fyziologických funkcí.....	20
4.3	Molekulární a farmakologické aspekty působení kokainu, amfetaminu a metamfetaminu ..	22
4.3.1	Akutní a chronické účinky .....	22
4.3.2	Účinky kokainu, amfetaminu a metamfetaminu na úrovni fyziologických funkcí.....	25
5	Závislost jako dominantní důsledek požívání stimulačních drog .....	26
5.1	Definice závislosti .....	26
5.2	Analýza motivačního systému.....	26
5.2.1	Rozbor odměny.....	26
5.2.2	Funkční neuroanatomie motivačního systému .....	28
5.3	Vznik závislosti z pohledu současných teorií.....	30
5.4	Společné vlastnosti stimulačních drog a vznik závislosti .....	32
6	Závěr.....	35
7	Seznam použité literatury .....	36

## 1 ÚVOD

Stimulační drogy jsou přírodní nebo syntetické návykové látky, jejichž společnou vlastností je jejich stimulační efekt. Po jejich požití se obvykle dostavuje euforie spolu s ústupem únavy, potřeby spánku a chuti k jídlu. Zvyšuje se nabídka představ, aktivita, zlepšuje se sebehodnocení. U některých drog této skupiny se též prohlubuje empatie, pocit souznění s okolím apod. Na mnohé stimulační drogy vzniká poměrně snadno psychická závislost vedoucí k nutkavé potřebě opakovaného užívání. Na rozdíl od opiátů u nich není příliš vyjádřena závislost fyzická [i].

V ČR bylo v uplynulých 15 letech provedeno několik studií, které se zabývaly užíváním nelegálních drog. Během tohoto období byl zjištěn patrný nárůst zkušeností s konopnými drogami, pervitinem, amfetaminem, metamfetaminem a kokainem ve věkové skupině 18 - 34 let. Přičemž se ukázalo, že kontakt s alkoholem či tabákem často předchází užívání nelegálních drog. V této souvislosti je alarmující, že ve věkové skupině, ve které meziročně stoupá zkušenost s mnoha druhy drog, také dochází k výraznému nárůstu podílu osob, které kouří [ii].

Závislost je spojená se zdravotními, sociálními i ekonomickými výzvami. Mezi narkomany je výrazně vyšší výskyt infekcí virem hepatitidy typu B a C, se závislostí je spojeno celkové tělesné zchátrání a hrozí smrtelné předávkování drogou. Závislý člověk musí dále čelit zhoršené pracovní, rodinné a bytové situaci, která může vést až k bezdomovectví a sociálnímu vyloučení. Pro společnost představuje problém i s drogou spojená trestná činnost. Po ekonomické stránce je léčba drogově závislých financována z veřejných i soukromých zdrojů, přičemž například v roce 2007 dosáhly celkové náklady 741,1 milionů korun, z nichž 204,4 milionů pocházelo z veřejného rozpočtu [ii].

Stimulační drogy jsou však i dobrými sluhý - jejich terapeutické využití, jež vychází ze studovaných molekulárních mechanismů jejich působení, je široké. Kokain je v současnosti využíván jako povrchové anestetikum. Amfetamin je často předepisován k terapii narkolepsie, obezity a poruch pozornosti u dětí. Metylxantiny mají široké využití - od léčby předávkování látkami tlumícími centrální nervový systém (CNS), po odstranění únavy, dušnosti a bolesti hlavy. Nikotin pomáhá překonat abstinenci příznaky kuřákům, kteří touží s touto závislostí přestat [ii].

Cílem této práce je popsat způsob, jakým vybrané drogy s centrálně stimulačním účinkem zasahují do přirozeného systému v mozku, a to prostřednictvím ukázky akutních a chronických změn na molekulární úrovni s přesahem na úroveň vybraných relevantních neuronálních sítí. Zvláštní důraz je kladen na mechanismus vzniku závislosti.

## 2 STRUČNÁ FARMAKOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH STIMULAČNÍCH DROG

### KOFEIN

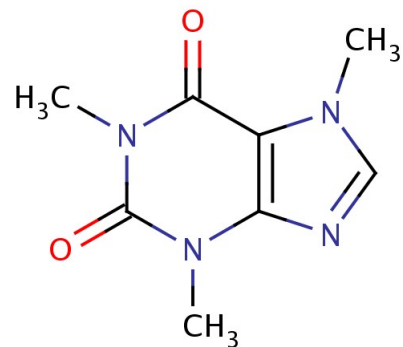
**CHEMICKÝ NÁZEV:** 1,3,7-trimetylxantin (Obrázek 1)

**ZDROJ:** zpracování částí rostlin obsahujících kofein (semena druhů rodu *Coffea*, listy *Camellia sinensis*, semena stromu *Theobroma cacao*, semena druhů rodu *Cola*, listy *Ilex paraguayensis*) na poživatiny (káva, čaj, kakao, čokoláda, kola, nápoj maté) [1a]

**ZPŮSOB PODÁNÍ:** nejčastěji orálně, rektálně, intramuskulárně, intravenózně [1a]

**ABSORPCE A DISTRIBUCE:** Rychlá a téměř 99% absorpce z gastrointestinálního traktu s dosažením maximálních koncentrací v plasmě 30 - 60 minut po podání. Kofein je v organismu snadno distribuován do všech kompartmentů, neboť díky vysoké rozpustnosti v lipidech snadno prostupují membránami [iii].

**METABOLIZMUS A EXKRECE:** Hlavní místo metabolického odbourání jsou játra. V metabolismu je zapojen enzym cytochrom P450 1A2. Asi 80 % dávky je konvertováno na paraxantin (1,7-dimetylxantin), 10 % na theobromin (3,7-dimetylxantin) a 4 % na theofylin (1,3-dimetylxantin) [1a]. Polovina podané dávky je eliminována do 3 až 7 hodin. Drtivá většina látky je z krve eliminována v moči ve formě derivátů kyseliny močové či demetylovaných xantinů do 15 - 35 hodin [iii].



**Obrázek 1: Chemická struktura kofeinu.**  
Převzato z [iii].

### NIKOTIN

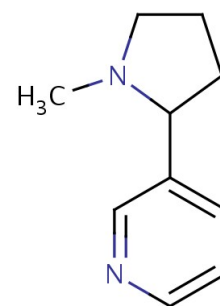
**CHEMICKÝ NÁZEV:** 3-(1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridin (Obrázek 2)

Nikotin je opticky aktivní látka, přirozeně se v tabáku vyskytuje převážně v (S) enantiomerní formě, která vykazuje silnější biologický efekt a je metabolizována pomaleji než (R) enantiomer.

**ZDROJ:** zpracování částí rostlin obsahujících nikotin (listy druhů rodu *Nicotiana*) na tabák [1b]

**ZPŮSOB PODÁNÍ:** inhalace aerosolu vznikajícího spalováním tabáku, orálně žvýkáním tabákových listů či přikládání k slizničním povrchům, šňupání tabáku, transdermálně [1b]

**ABSORPCE A DISTRIBUCE:** Při spalování se nikotin uvolňuje do kouře a vyskytuje se v něm v podobě kapének obsahujících vodu a dehet. Tyto kapénky jsou unášeny vznikajícími plyny, kterými jsou zejména oxid uhličitý, kyanovodík a oxidy dusíku - vzniká aerosol. Po inhalaci se kapénky usazují na dýchacích površích, přes které se nikotin velmi rychle absorbuje do krevního oběhu [1b]. Z jedné



**Obrázek 2: Chemická struktura nikotinu.**  
Převzato z [iii].

cigarety, která osahuje průměrně 8,4 mg nikotinu, jsou absorbovány asi 1 - 3 mg. Absorpce přes bukalní sliznici je mnohem pomalejší než přes nasální sliznici [iii].

*METABOLIZMUS A EXKRECE:* Hlavní metabolismus probíhá v játrech cytochromem P450 2A6 především na kotinin, ale i jiné látky. Poločas nikotinu v krvi je u člověka asi 1 - 2 hodiny [iii].

## KOKAIN

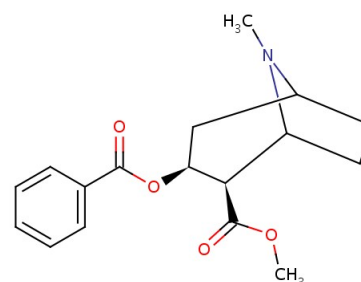
*CHEMICKÝ NÁZEV:* benzoylekgoninmetylester (Obrázek 3)

*ZDROJ:* zpracování částí rostliny obsahující kokain (listy druhu *Erythroxylon coca*) [1c]

*ZPŮSOB PODÁNÍ:* orálně, aplikací na dásně, žvýkáním listů koky nebo požitím výluhu z listů, nasálně šňupáním prášku, inhalace par vzniklých zahřáním extrémně čisté formy kokainu (crack), volné báze (free base) nebo kokainové pasty, intravenózní aplikace [1c]

*ABSORPCE A DISTRIBUCE:* Orální způsob aplikace je spojen s pomalou a málo efektivní (30 - 60 % dávky) absorpcí, maximální hladina v krvi je dosažena až po hodině. Rychlost i efektivita absorpce přes nosní sliznici je mnohem vyšší (60 - 80 % dávky). Maximální hladina v krvi je dosažena po 20 - 30 minutách. Intravenózní aplikace a inhalace poskytují okamžitý vzestup hladiny kokainu v krvi [iii].

*METABOLIZMUS A EXKRECE:* Hlavní metabolismus probíhá v játrech cytochromem P450 3A4, jehož hlavním odpadním produktem je benzoylekgonin, dále pak ekgonin, norkokain a jiné. Tyto jsou pak vyloučeny do moče. Poločas kokainu v plazmě je přibližně jedna hodina [iii].



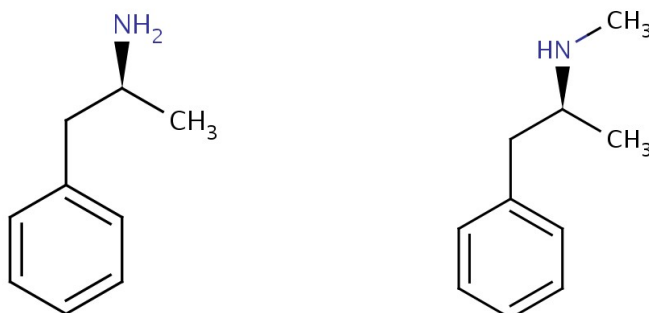
**Obrázek 3: Chemická struktura kokainu.**  
Převzato z [iii].

## AMFETAMIN A METAMFETAMIN

*CHEMICKÝ NÁZEV AMFETAMINU:* 1-fenylpropan-2-amin (Obrázek 4 - vlevo)

*CHEMICKÝ NÁZEV METAMFETAMINU:* N-metyl-1-fenylpropan-2-amin (Obrázek 4 - vpravo)

Amfetamin i metamfetamin jsou opticky aktivní látky, silnější biologický efekt na centrální nervový systém však vykazují jejich (S) enantiomery.



**Obrázek 4: Chemická struktura amfetaminu a metamfetaminu.**  
Převzato z [iii].



*ZDROJ:* syntetické drogy [1d, e]

*ZPŮSOB PODÁNÍ:* intravenózní aplikace a šňupání (společné oběma drogám), orální polykáním prášku rozpuštěného v nápoji nebo kašovitě báze zabalené do papírku specifické pro amfetamin, orální polykáním pilulek či prášku, inhalační vdechováním kouře vznikajícího po zahřátí pevné formy (ice) specifické pro metamfetamin [1d, e]

*ABSORPCE A DISTRIBUCE:* Efektivitu absorpce dle způsobu podání lze seřadit následovně: intravenózní > inhalační (specifické pro metamfetamin) > nasální > orální, přičemž u orálního podání pozorujeme přibližně 60 % absorpci podané dávky. Absorpce a distribuce v těle je usnadněna lipofilním charakterem látek [iii].

*METABOLIZMUS A EXKRECE:* Hlavní metabolismus probíhá v játrech pomocí cytochromu P450, přičemž do odbourání metamfetaminu je zapojeno více různých enzymů a výsledkem je nejméně 7 metabolitů, z nichž nejvýznamnější je amfetamin, norefedrin a jejich hydroxyderiváty. Exkrece probíhá v moči s významným podílem látek v nezměněné podobě. Poločas amfetaminu v krvi je přibližně 10 hodin, zatímco u metamfetaminu je to asi 4 - 5 hodin [iii].

### 3 CÍLOVÉ MOLEKULY A SYSTÉMY

#### 3.1 ADENOZINERGNÍ SYSTÉM A CÍLOVÉ MOLEKULY KOFEINU

##### 3.1.1 STRUČNÝ ÚVOD DO FUNGOVÁNÍ ADENOZINERGNÍHO SYSTÉMU

Adenozin (ADO) je běžnou součástí všech buněk a základní molekulou mnoha metabolických drah. Intracelulární koncentrace ADO je přísně regulována enzymy metabolismu adenozin monofosfátu (AMP): 5'-nukleotidázou ( $AMP \rightarrow ADO$ ) a adenzinkinázou ( $ADO \rightarrow AMP$ ). Tato regulace je esenciální z důvodu modulačního charakteru ADO a snadného vyrovnávání koncentrací vně a uvnitř buňky [2]. ADO není typickým neurotransmiterem - není akumulován ani skladován ve váčcích. Do extracelulárního prostoru se může dostat dvěma způsoby: (a) pomocí membránového nukleosidového transportéru, přičemž směr pohybu je dán koncentračním spádem; (b) ve formě lokálně uvolněného adenozin trifosfátu (ATP) či cyklického adenozin monofosfátu (cAMP), jež jsou konvertovány na ADO pomocí ektonukleotidáz. Souhra přísně regulovaného metabolismu a vyrovnávacího transportu vede k udržování rovnováhy extracelulárních koncentrací, které spadají za běžných podmínek do rozmezí 25 - 250 nM [3]. Jeho funkce zahrnuje modulaci aktivity nervového systému na buněčné úrovni prostřednictvím přímých presynaptických i postsynaptických mechanismů a nepřímých "vyladovacích" účinků na aktivaci receptorů jiných neurotransmiterů či neuromodulátorů [4].

### 3.1.2 STRUKTURA, DISTRIBUCE A FUNKCE ADENOZINOVÝCH RECEPTORŮ

Adenozinové receptory (ARs) patří do rodiny heptahelikálních receptorů spřažených s G-proteiny. V současnosti jsou známy čtyři podtypy, které jsou rozlišitelné afinitou k ADO a lokalizací v tkáních -  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  a  $A_3$  [5]. ADO je agonistou těchto receptorů, s nejvyšší afinitou se váže na  $A_1$  a  $A_{2A}$ , poté na  $A_3$ . K receptoru  $A_{2B}$  vykazuje dramaticky nižší afinitu než k ostatním. Významná je především informace, že k 10 - 50% aktivaci receptorů s vysokou afinitou k ADO dochází za klidových fyziologických hodnot koncentrace tohoto modulátoru [6]. Z hlediska fyziologické relevance vazby je též nutné brát v úvahu též hustotu exprese těchto receptorů v cílových tkáních, která je pro receptor  $A_3$  v mozku velmi nízká [5]. Takže za normální situace (hustota ARs, příslušná afinita, fyziologická koncentrace ADO) jsou fyziologické účinky ADO v mozku zprostředkovány především receptory  $A_1$  a  $A_{2A}$ .

$A_1$  a  $A_{2A}$  receptory vykazují prostorově komplementární expresní profil. Zatímco  $A_1$  receptor má nejvyšší hladiny v oblasti mozkové kůry, hipokampu a mozečku, receptor  $A_{2A}$  je oproti tomu v těchto oblastech exprimován podstatně méně [7]. Naopak vysoká exprese  $A_{2A}$  receptoru je detekovatelná v dorzálním striatu (DS) na striatopalidových neuronech se střední velikostí dendritických trnů (MSNs), kde je výskyt  $A_1$  receptoru pouze průměrný [8].

$A_{2B}$  a  $A_3$  receptory mají nízkou hladinu exprese, zároveň však poměrně širokou tkáňovou distribuci. Podstatné je, že významnější exprese byla v mozku zaznamenána pouze pro  $A_3$  receptory v oblasti hipokampu a mozečku [5].

Jak již bylo řečeno, ARs jsou metabotropní receptory spojené intracelulárně s heterotrimerními G-proteiny. Typ G-proteinu pak určuje povahu signalizace. S inhibičním  $G_i$  proteinem, který tlumí cAMP/proteinkináza A (PKA) signální dráhu, jsou spojeny receptory  $A_1$  a  $A_3$ . Se stimulačním  $G_s$  proteinem, jež tuto dráhu naopak stimuluje a zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP, jsou spojeny  $A_2$  receptory. Kromě toho bylo pozorováno pro  $A_{2A}$  spojení s  $G_{\text{olf}}$  v *corpus striatum* (CStr), který též aktivuje cAMP/PKA signální dráhu [5].

Výsledné změny aktivity cAMP/PKA signální dráhy vedou k aktivaci či inhibici cílových molekul, kterými jsou zejména  $K^+$  a napětově ovládané  $Ca^{2+}$  kanály. Aktivace  $G_i$  vede k inhibici AC, stimulaci  $K^+$  kanálů a tím k hyperpolarizaci buňky [9] a zároveň inhibuje činnost napětově ovládaných  $Ca^{2+}$  kanálů [10], čímž zabraňuje vstupu  $Ca^{2+}$  do neuronu na napětový signál a tím výlevu přenašeče.

Aktivace PKA může vést i k efektům, které mají pomalejší nástup, ale trvalejší charakter - změny ve stavu fosforylace regulačních molekul a transkripčních faktorů (TF). Změna míry fosforylace fosfoproteinu DARPP-32 vede k posílení iničiálního signálu [11] a fosforylace TF cAMP response element-binding (CREB) k aktivaci exprese genů bezprostřední odpovědi (IEGs) [12], které jsou využívány jako indikátory schopnosti látky dlouhodobě ovlivnit konkrétní část neuronální sítě [13].

Heteromery receptorů pro neurotransmitery jsou funkční jednotky se specifickými biochemickými parametry odlišnými od těch, kterými se vyznačují jejich součásti. Tyto odlišnosti zahrnují změny ve schopnosti vázat ligand a v signalizaci jeho vazby, což ovlivňuje hlavně excitabilitu neuronů a uvolňování neurotransmiteru. Změny v těchto parametrech mohou být přímým důsledkem heteromerizace nebo kostimulačního zpracování informace. Na molekulární úrovni si funkční heteromery lze představit jako přímé interakce receptor-receptor a jako interakce na úrovni druhých posílů [14].

Pro ARs bylo detekováno hned několik významných interakcí, které se podílí na regulaci:

(a) heteromery adenosinových a dopaminových receptorů, jejich role v postsynaptické regulaci

Kolokalizace  $A_1$ - $D_1$  receptorů byla prokázána v postsynaptické membráně MSNs přímé cesty, zatímco pro  $A_{2A}$ - $D_2$  byla zjištěna v postsynaptické membráně MSNs cesty nepřímé [15]. Fyzické interakce těchto receptorů byly prokázány v umělých buněčných systémech [16, 17] i v živé tkáni [14]. Existují důkazy pro vzájemný antagonistický vztah těchto receptorů na intramembránové i intracelulární úrovni. Stimulace  $A_1$  receptorů vede k inhibici vazby dopaminu (DA) na  $D_1$  receptor a aktivace cAMP/PKA signální dráhy zprostředkované receptorem  $D_1$  [18]. Aktivace  $A_{2A}$  receptoru redukuje afinitu  $D_2$  receptorů k agonistům. Na intracelulární úrovni se působení obou aktivovaných receptorů stýká na úrovni regulace aktivity AC, kdy  $G_i$  (spražený s  $D_2$  receptorem) ji tlumí a  $G_{off}$  ( $A_{2A}$ ) naopak [19].

(b) heteromery adenosinových receptorů, jejich role v presynaptické regulaci

Heteromery  $A_1$ - $A_{2A}$  receptorů byly identifikovány v transfekčních experimentech i v CStr u potkana. Tyto funkční jednotky představují zajímavý koncentračně závislý přepínací mechanismus působení na presynaptickou membránu. Nízká koncentrace ADO stimuluje převážně  $A_1$  receptory, které inhibují jak cAMP/PKA signální dráhu, tak napětově ovládané  $Ca^{2+}$  kanály, čímž snižují pravděpodobnost výlevu neurotransmiteru z nervového zakončení. Naopak vysoká koncentrace ADO stimuluje i  $A_{2A}$  receptory, jež po aktivaci tlumí signalizaci z  $A_1$  a stimulací cAMP/PKA signální dráhy zvyšují pravděpodobnost uvolnění neurotransmiteru. Tímto mechanismem dochází k odstínění šumu ve formě nespecifické či nízkofrekvenční stimulace při přenosu na synapsi [20].

## 3.2 CHOLINERGNÍ SYSTÉM A CÍLOVÉ MOLEKULY NIKOTINU

### 3.2.1 STRUČNÝ ÚVOD DO FUNGOVÁNÍ CHOLINERGNÍHO SYSTÉMU

Cholinergní systém nad oblastí mozkového kmene se skládá ze tří hlavních subsystému: (a) projekce z *nucleus tegmentalis pedunculopontinus* a *nucleus tegmentalis posterolateralis* do oblasti talamu a dopaminových neuronů středního mozku (MDNs); (b) projekce jader bazální části předního mozku difúzně do kortexu a hipokampu; (c) lokální projekce cholinergních interneuronů ve CStr [21].

Difúzní charakter cholinergní inervace a specifická distribuce nikotinových receptorů acetylcholinového typu (nAChRs) podporuje současný model cholinergního přenosu, kdy přímá synaptická spojení jsou považována spíše za výjimku a za hlavní způsob přenosu je považován tzv. objemový přenos. Uvolnění acetylcholinu (ACh) do extracelulárního objemu se děje synaptickým přeléváním a mimosynaptickým uvolňováním neurotransmiteru. Difúze je omezena aktivitou acetylcholinesterázy [21]. Synaptický a objemový výskyt ACh působí přes nAChRs v synaptických a mimosynaptických polohách [21].

### 3.2.2 STRUKTURA, DISTRIBUCE A FUNKCE ACETYLCHOLINOVÝCH RECEPTORŮ NIKOTINOVÉHO TYPU

nAChRs jsou ligandem ovládané kationtové kanály. Vazba endogenního či exogenního agonisty způsobí otevření iontového kanálu a umožnění vtoku kationtů dovnitř. Tento ionotropní receptor může oscilovat mezi 4 stavy: (a) klidový stav (kanál uzavřen, bez agonisty); (b) aktivovaný stav (kanál otevřen, agonista navázán); (c) desenzitizovaný stav (kanál uzavřen, agonista navázán) a (d) inaktivní stav (dlouhodobý desenzitizovaný stav). V nepřítomnosti agonisty se kanál nachází převážně v klidovém stavu, avšak po krátkém působení agonistů na receptor dochází k posunu rovnováhy směrem k aktivovanému stavu. Delším působením vysokých a relativně stabilních koncentrací agonistů vede k přechodu na desenzitizovaný stav. Také existuje tzv. vysokoafinitní desenzitizace, která je vyvolána nízkou hladinou agonisty bez aktivace nAChR [22].

nAChRs jsou pentamerní transmembránové proteiny. Bylo identifikováno 12 neuronálních podjednotek nAChRs, které dělíme do dvou kategorií podle přítomnosti ( $\alpha$  podjednotka) či nepřítomnosti ( $\beta$  podjednotka) specifického páru cysteinů, jež je nezbytný pro vazbu agonisty - 9  $\alpha$  podjednotek ( $\alpha 2 - \alpha 10$ ) a 3  $\beta$  podjednotky ( $\beta 2 - \beta 4$ ). Studie prokázaly, že z nepřeberného množství kombinací lze v nervovém systému nejčastěji narazit na homomerní  $\alpha 7$  receptory a heteromerní receptory složené z jednoho typu  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky ve stechiometrii dvě  $\alpha$  : tři  $\beta$ , z nichž nejčastěji je identifikována kombinace  $\alpha 4\beta 2$  [23]. Na úrovni mozku je distribuce nAChRs široká, přičemž pro jednotlivé druhy pentamerů se liší [22]. Po navázání agonisty dochází k takovým konformačním změnám molekuly, jejichž výsledkem je odhalení póru o velikosti 3 Å, jež je dostatečný pro průchod monovalentních i bivalentních iontů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) [24].

Za podmínek klidového membránového potenciálu je proud po otevření nAChR tvořen převážně  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, což vede ke změně membránového potenciálu a ke zvýšení lokální koncentrace intracelulárního vápníku [25]. Další posílení tohoto primárního signálu je možné sekundární aktivací napětově ovládaných  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů (VOCC) nebo mobilizací vnitřních zásob  $\text{Ca}^{2+}$  indukovanou samotným  $\text{Ca}^{2+}$  vstupujícím přes plasmatickou membránu (CICR) [25]. Pokud zároveň vezmeme do

úvahy funkční heterogenitu nAChRs, lze rozpoznat  $\text{Ca}^{2+}$  signály s různými kinetickými, prostorovými i časovými vlastnostmi [25].

Generované  $\text{Ca}^{2+}$  signály jsou důležitým pojítkem mezi akutní stimulací nAChR a dlouhodobými synaptickými změnami. Zvýšená hladina intracelulárního vápníku může aktivovat některé izoformy adenylátcyklázy (AC), PKA,  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependentní proteinkinázu II (CaMKII) a fosfoinositid-3-kinázu (PI3K), jež fosforylují příslušné efektorové kinázy jako např. kináza spojená s extracelulárním signálem (ERK). Ty pak přímo ovládají aktivitu TF, transkripci samotnou či rovnováhu mezi pro- a antiapoptotickými faktory [25].

### 3.3 MONOAMINERGNÍ SYSTÉM A CÍLOVÉ MOLEKULY KOKAINU, AMFETAMINU A METAMFETAMINU

#### 3.3.1 STRUČNÝ ÚVOD DO FUNGOVÁNÍ MONOAMINERGNÍHO SYSTÉMU

Neurony, které syntetizují, skladují a uvolňují monoaminové neurotransmitery (norepinefrin, DA, serotonin), jsou v mozku široce rozšířeny. Tyto neurotransmitery jsou syntetizovány v cytoplazmě a do sekretorických váčků, které zajišťují jejich uvolňování do synaptického prostoru, se dostávají prostřednictvím vezikulárního monoaminového transportéru (VMAT) [26]. Monoaminergní signalizace, zejména její rozsah a trvání, je regulována zpětným vychytáváním neurotransmiteru pomocí monoaminových transportérů (MAT) na plasmatické membráně [27]. K degradaci monoaminů slouží intracelulárně lokalizované enzymy - monoaminoxidáza a katechol-O-metyltransferáza [28]. Uvolněné neurotransmitery působí na pre- i postsynapticky lokalizované monoaminové receptory, jež jsou v drtivé většině spojené s G-proteiny [29].

#### 3.3.2 STRUKTURA, DISTRIBUCE A FUNKCE MONOAMINERGNÍCH TRANSPORTÉRŮ

VMAT je integrální membránový protein, který je součástí rodiny vezikulárních aminových transportérů. Lze rozlišit VMAT-1, který se nachází převážně v periferním nervovém systému, kůži, GI traktu a nadledvinách, a VMAT-2, který se nachází kromě zmíněných lokací i v CNS a buňkách imunitního systému [26]. V CNS je specificky v membráně váčků dopaminových neuronů ventrálního striata (VS), norepinefrinových neuronů *locus coeruleus* a serotoninových neuronů *nuclei raphe*s [27].

Tento transportér má 12 transmembránových domén. Cytoplazmatický C-konec obsahuje sekvenci, která určuje cílové subcelulární umístění, umožňuje recyklaci endocytózou a fosforylaci s regulativní funkcí [26]. Funkce těchto proteinů spočívá v akumulaci kladně nabitých aminů v lumen sekretorických váčků na úkor protonového gradientu, jež byl předem vytvořen V-ATPázou. Se stechiometrií  $2 \text{H}^+ : 1$  monoamin je dosaženo výsledné koncentrace asi 500 mM, což 10 000x převyšuje koncentraci cytosolickou [26]. Afinita k monoaminovým neurotransmiterům je přibližně stejná [27].

MAT je integrální membránový glykoprotein plasmatické membrány, který je součástí rodiny  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  symportních proteinů. Na základě různé substrátové specifity lze rozlišit dopaminový (DAT), serotoninový (SERT) a norepinefrinový (NET) transportér. DAT je lokalizován perisynapticky v nervových zakončeních dopaminových neuronů, zvláště hustě pak u projekcí z VS. Vysoké hladiny SERT jsou zaznamenány v serotoninergních projekcích do VS a *nuclei raphe*. Nízké hladiny NET byly naměřeny v hipokampu, kortexu i CStr, avšak norepinefrinové neurony v oblasti *locus coeruleus* a *nuclei raphe* obsahují relativně velké množství NET [27].

Tento transportér má 12 transmembránových domén, celkový počet aminokyselin pro transportéry s různou specifikou se liší stejně jako sekvence důležité při regulaci [27]. Funkce těchto proteinů spočívá v přenosu uvolněné molekuly neurotransmiteru do buňky na úkor gradientu  $\text{Na}^+$  vytvořeného  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázou. Stechiometrie kotransportu je  $2 \text{Na}^+ : 1 \text{Cl}^- : 1$  monoamin, ale není příliš striktní [27]. DAT, SERT i NET vykazují selektivní afinitu k příslušným monoaminům. Jejich funkce se však částečně překrývají, navíc mohou přenášet i jiné (strukturně příbuzné) přirozené i uměle aplikované látky [27]. Vzhledem k významu dopaminu se sledované účinky v této práci omezí na DAT.

Vzhledem k centrální úloze DAT v regulaci prostorové a časové složky DAergní signalizace a relativně pomalému procesu syntézy tohoto proteinu je nutná dynamická regulace, která by umožňovala rychlé reakce na změny v signalizaci v důsledku působení endogenních či exogenních faktorů. Tato regulace je zprostředkována dvěma možnými způsoby - přímou modifikací parametrů transportéru nebo ovlivněním distribuce transportéru v rámci buňky. Experimenty ukazují, že oba způsoby jsou možné, ale druhý z nich převládá [30]. Regulace distribuce transportéru nastává po působení (a) malých ligandů přímo na DAT nebo na presynaptické receptory spřažené s G proteiny (GPCRs), (b) komponent intracelulárních signálních kaskád, jež DAT enzymaticky modifikují a (c) jiných proteinů ve formě přímých protein-proteinových interakcí mezi DAT a cytoskeletárními či různými transmembránovými proteiny [31].

## 4 MOLEKULÁRNÍ MECHANIZMY PŮSOBENÍ STIMULAČNÍCH DROG

### 4.1 MOLEKULÁRNÍ A FARMAKOLOGICKÉ ASPEKTY PŮSOBENÍ KOFEINU

#### 4.1.1 AKTUNÍ A CHRONICKÉ ÚČINKY

Fyziologické účinky kofeinu lze vysvětlit jeho antagonistickým účinkem na ARs. Často zmiňované efekty na fosfodiesterázu či receptory benzodiazepinů jsou vyvolány milimolárními koncentracemi kofeinu, které jsou již vysoce toxické. Pro fyziologicky dosažitelné koncentrace se podařilo prokázat tento antagonismus u  $A_1$  a  $A_2$  receptorů [32]. Protože však kofein vstupuje do signalizace endogenního ADO, z již dříve zmíněných důvodů je při interpretaci jeho účinků nutné brát v úvahu především receptory  $A_1$  a  $A_{2A}$ . Z farmakologických studií afinity ARs ke kofeinu navíc vyplývá, že  $A_{2A}$  receptor má několikanásobně nižší disociační konstantu oproti  $A_1$ . Na druhou stranu se také ukazuje,

že afinita ke kofeinu se mění v heteromerech - v  $A_1$ - $A_{2A}$  především výrazně klesá afinita receptoru  $A_{2A}$ , čímž se dostává přibližně na úroveň afinity receptoru  $A_1$ , která se vlivem heteromerizace nemění. Ve skutečnosti je afinita receptoru  $A_{2A}$  v heteromeru  $A_1$ - $A_{2A}$  nižší než v  $A_{2A}$ - $D_2$  [20].

Akutní účinky kofeinu byly prokázány hned na několika místech výše popsaného přirozeného systému. Rozlišujeme presynaptické (tj. modulace uvolňování neurotransmiterů) a postsynaptické (tj. modulace aktivity neuronů) mechanismy působení kofeinu. Pozorujeme typický dvojfázový profil, kdy nízké dávky v rozmezí 15 - 30 mg/kg způsobují u potkana stimulaci lokomoce, kdežto vysoké dávky na úrovni 100 mg/kg mají tlumící efekt. Stejný profil vykazují i behaviorální efekty kofeinu - nízké dávky mají stimulační účinky, kdežto vysoké dávky vedou k souboru klinicky významných kofeinem indukovaných poruch, které se vyznačují insomnií, nervozitou a úzkostí [32].

Z chronických efektů je nutné zdůraznit změny v samotných receptorech i úrovni aktivity intracelulárních cílů. Někteří autoři zmiňují zvýšení exprese  $A_1$  receptorů [33], ale v literatuře nebyl v tomto ohledu dosaženo konsenzu. Nicméně na molekulární úrovni bylo v experimentech s vazbou radioligandu dokázáno, že dochází k modifikaci funkce receptorového heteromeru  $A_1$ - $A_{2A}$ . Byla zaznamenána zvýšená schopnost aktivací  $A_2$  receptoru indukované inhibice vazby agonisty na  $A_1$  receptor a zároveň významná redukce afinity  $A_{2A}$  receptoru ke kofeinu [20]. Chronické podávání kofeinu vyvolává také zvýšení hladiny plasmatického ADO [33], což, vezmeme-li v úvahu nízkou afinitu  $A_{2A}$  receptoru ke kofeinu, by mohlo způsobit aktivaci  $A_{2A}$  receptoru endogenním ADO i v přítomnosti kofeinu. V této situaci bychom mohli očekávat chronické vypnutí signalizace z  $A_1$  receptoru v důsledku jeho blokády kofeinem a současně zvýšené schopnosti aktivovaného  $A_{2A}$  receptoru inhibovat vazbu agonisty na  $A_1$  receptor [20]. Kofein také způsobuje dlouhodobou na dávce závislou aktivační fosforylaci neuronálního fosfoproteinu řízeného DA a cAMP (DARPP-32), který prodlužuje původní akutní tlumivé efekty kofeinu na cAMP/PKA signální dráhu prostřednictvím inhibice PKA [32].

#### 4.1.2 ÚČINKY KOFEINU NA ÚROVNI FYZIOLOGICKÝCH FUNKCÍ

##### 4.1.2.1 Vliv na cerebrální hemodynamiku

Těsné funkční spojení mezi aktivitou neuronů a lokálním CBF zajišťuje, že přísun živin odpovídá lokální metabolické poptávce. Pro znázornění spolupráce neuronů a vaskulárních elementů byl navržen koncept neurovaskulární jednotky - zahrnuje neurony, astrocyty a cévní buňky (hladký sval a endotel). Zvýšená synaptická aktivita spouští vazodilatační signál pomocí ATP (kromě jiných cest), jež se uvolňuje spolu s neurotransmiterem do synaptické štěrbiny. Uvolněné ATP může být konvertováno na ADO pomocí ektonukleotidáz, který se následně váže na  $A_{2A}$  receptory na přilehlých astrocytech, kde mobilizuje intracelulární zásoby  $Ca^{2+}$ . Výsledná  $Ca^{2+}$  vlna zajišťuje pozitivní zpětnou

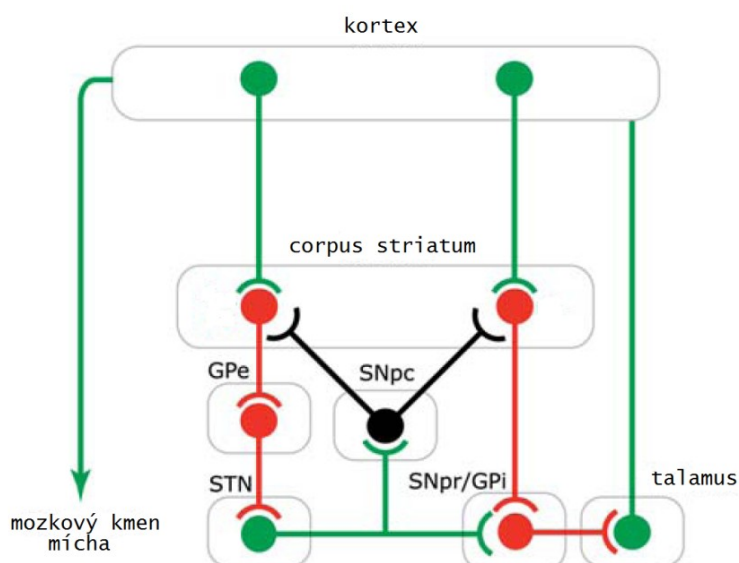
vazbu (tj. přispívá k transastrocytárnímu šíření signálu a podněcuje výlev ATP z astrocytu do synaptické štěrbině) a efektorový mechanismus (tj. výlev ATP do blízkosti arteriol, kde dojde ke konverzi na ADO). Následná interakce ADO s  $A_{2A}$  receptorem na membráně buněk hladkého svalstva arteriol aktivuje cAMP/PKA signální dráhu - cílovými molekulami jsou  $K^+$  kanály, jejichž otevření způsobí hyperpolarizaci buněk hladkého svalstva a snížený vtok  $Ca^{2+}$  přes napětově ovládané  $Ca^{2+}$  kanály, a komponenty regulace kontraktálního aparátu, jejichž citlivost k  $Ca^{2+}$  se fosforylací snižuje. Snížená hladina  $Ca^{2+}$  i samotná senzitivita k tomuto prvku vede k relaxaci svalu [34].

Při akutním podání kofeinu jsou cílem jeho antagonistických účinků  $A_{2A}$  receptory astrocytů a arteriol, což způsobuje narušení  $Ca^{2+}$  signálního mechanismu v astrocytu, snížení výlevu ATP a tím redukcí množství ADO dostupného pro receptory na buňkách hladkého svalstva arteriol, které zároveň též blokuje. Kofein tak zamezí posílení i šíření signálu v astrocytech a příjem signálu v efektorových buňkách - dochází k vazokonstrikci [34].

#### 4.1.2.2 Vliv na motorickou aktivitu

CStr má v dorzální oblasti a v jádrové oblasti NAc specifické strukturní uspořádání. Na MSNs produkujících kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABAergní) se sbíhají dva hlavní aferentní vstupy vytvářející kontakty preferenčně v oblasti dendritických trnů MSNs: (a) glutamatergní (Glu-ergní) z kortikálních, talamických a limbických oblastí; (b) DAergní z mezencefalonu - *substantia nigra pars compacta* (SNpc) a ventrální oblast tegmenta (VTA) [35].

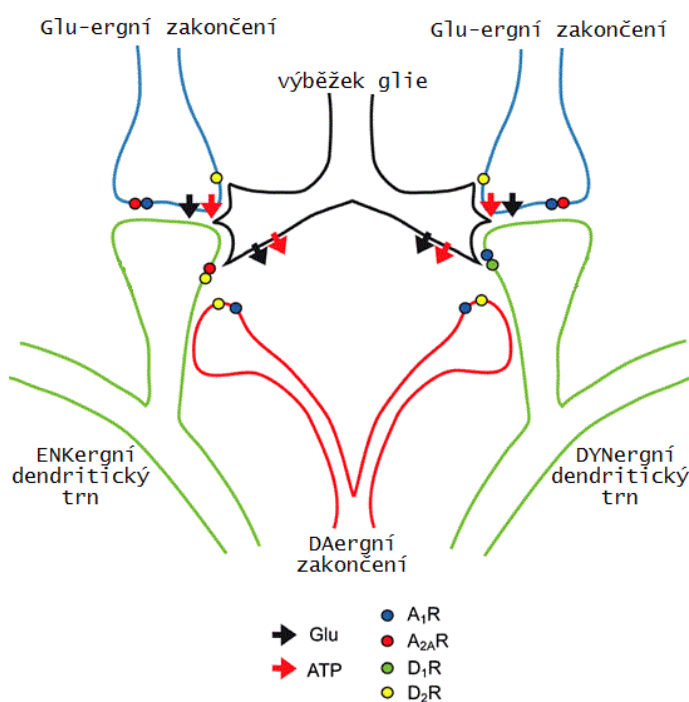
MSNs jsou zdrojem dvou typů výstupů, jež oba konvergují na úrovni *substantia nigra pars reticulata/globus pallidus pars interna* (SNpr/Gpi): (a) enkefalinergní (ENKergní) MSNs vysílající výběžky do cílové oblasti přes *globus pallidus pars externa* (Gpe) a *nucleus subthalamicus* (STN) - tzv. nepřímá cesta; (b) dynorfinergní (DYNergní) MSNs vysílající výběžky přímo do cílové oblasti bez přepojování - tzv. přímá cesta [36] (Obrázek 5).



**Obrázek 5: Funkční organizace bazálních ganglií.** Na CStr se sbíhají excitační Glu-ergní vstupy (zelená) z kortexu a modulační DAergní vstupy (černá) ze SNpc. GABAergní MSNs v CStr inervují přímou či nepřímou cestou SNpr/Gpi. Převezato z [32] a upraveno.



Pro vysvětlení fungování řízení motoriky byl navržen koncept "lokálního modulu", který představuje minimální konfiguraci jednotek (tj. neuronů a gliových buněk) schopných nezávisle integrovat signál. Dendritický výběžek, Glu-ergní a DAergní nervové zakončení představují hlavní komponenty tzv. modulu striatálního výběžku (SSM). Rozeznáváme ENKergní a DYNergní SSM, které se liší druhem přítomného receptorového heteromeru v dendritickém výběžku - v tzv. přímé dráze  $A_1$ - $D_1$  receptory, kdežto v tzv. nepřímé dráze  $A_{2A}$ - $D_2$  [37]. Kromě postsynaptické lokalizace lze pozorovat i presynaptickou kolokalizaci obou ARs v Glu-ergních nervových zakončeních [20]. Nedávné výsledky prokázaly existenci funkčního  $A_1$  receptoru na DAergních nervových zakončeních v CStr [38]. Antagonistické vztahy mezi receptory v obou druzích heteromerů modulují aktivitu příslušných drah. Schopnost  $A_{2A}$  receptorů zvýšit aktivitu ENKergních MSNs působením proti tonickému inhibičnímu efektu DA přes  $D_2$  a tak aktivovat nepřímou dráhu vede k inhibici talamokortikálních neuronů a tím inhibici motorické aktivity. Naopak tlumení stimulace DYNergních MSNs přes  $A_1$  receptory má na tyto neurony a potažmo i motorickou aktivitu stimulační efekt [39, 40] (Obrázek 6).



**Obrázek 6: Schéma modulu striatálního výběžku.**

Modul se skládá z dendritických výběžků ENKergních či DYNergních MSNs, které jsou v synaptickém kontaktu s Glu-ergními a DAergními zakončeními, a z výběžků glie, které obepínají Glu-ergní synapse. ADO pochází zejména z ATP uvolňovaného společně s Glu.  $A_1$ - $A_2$  heteromery receptorů jsou lokalizovány na Glu-ergních zakončeních,  $A_{2A}$ - $D_2$  heteromery receptorů jsou lokalizovány na ENKergních dendritických výběžcích a  $A_1$ - $D_1$  heteromery receptorů jsou lokalizovány na DYNergních dendritických výběžcích.  $A_1$  receptory, které modulují výlev dopaminu, jsou lokalizovány na části striatálních DAergních zakončení. Převzato z [41] a upraveno.

Pro postsynaptické působení kofeinu byl navržen  $A_{2A}$  receptor jako hlavní cíl antagonistického působení. Motorické stimulační účinky jsou důsledkem blokády bazální aktivace  $A_{2A}$  receptoru a jemu příslušné signální dráhy, zároveň s tím mizí jeho inhibiční efekt na  $D_2$  receptor [42]. Příslušný pokles aktivity signální dráhy se odráží v míře fosforylace a tím aktivity intracelulárních cílů (např. DARPP-32, CREB a tím IEGs aj.). Celkově tedy dochází k poklesu aktivity GABAergních ENKergních MSNs a tím disinhibici talamokortikálních neuronů a motorické stimulaci [43].

Pro presynaptické působení je významný heteromer  $A_1$ - $A_{2A}$  receptorů - vzhledem k velmi nízké afinitě  $A_{2A}$  receptorů ke kofeinu v rámci heteromeru lze uvolňování Glu v CStr po akutním systémovém či intrastriatálním podání kofeinu přičíst jeho schopnosti blokovat inhibiční efekt aktivovaného  $A_1$  receptoru [33].

Významným činitelem v motoricky stimulačních účincích kofeinu by mohla být jeho schopnost blokovat inhibici výlevu DA přes  $A_1$  receptor lokalizovaný presynapticky v DAergních zakončeních v CStr [38].

#### 4.1.2.3 *Vliv na cyklus spánku a bdění*

Důkazy o zapojení  $A_1$  receptorů ve spánkové regulaci vychází z výsledků mnoha farmakologických studií, které indikují, že cholinergní buňky v bazální oblasti předního mozku jsou zodpovědné za akumulaci extracelulárního ADO během bdění. Tento akumulovaný ADO pak působí na  $A_1$  receptory lokalizované presynapticky, což vede ke snížení aktivity cholinergních neuronů [44]. Tyto představy jsou podporovány experimentálními daty, kdy podání antagonisty  $A_1$  receptoru mikrodialýzou způsobilo koncentračně závislý pokles ve výlevu ACh v prefrontálním kortexu, kdežto podání antagonisty ovlivnilo výlev ACh v této oblasti opačným směrem. Zdá se, že význam  $A_{2A}$  v této oblasti v přímé regulaci spánkového cyklu není velký, protože podání antagonisty  $A_{2A}$  receptoru zde nemá vliv na výlev ACh [45].

Ve světle těchto skutečností jsou překvapivé výsledky působení kofeinu na myších, u kterých byla vyřazena funkce genů (KO) pro ARs. Zatímco u  $A_1R$  KO myši je kofeinem indukovaná stimulace neporušená, u  $A_{2A}R$  KO myši ji nelze navodit [46]. V souvislosti s tím byla zdůrazněna důležitost  $A_{2A}$  receptorů v regulaci bdělosti, ale data pořízená na modelech KO myši je nutno interpretovat s opatrností. Bylo totiž poukázáno na to, že během embryonálního vývoje mohlo dojít ke kompenzačním změnám nahrazujícím částečně chybějící funkci, což potvrzují studie spánkového cyklu těchto KO myši, jež se jeví neporušen [47, 48].

Avšak  $A_{2A}$  receptor může mít roli v řízení bdělosti v jiných centrech zapojených do kontroly spánkového cyklu. Například podání agonisty  $A_{2A}$  receptoru do oblasti retikulární formace pons Varoli vedlo ke stimulaci výlevu ACh. Výsledkem bylo utlumení bdělosti, pravděpodobně v důsledku zvýšené inhibice neuronů vzestupného retikulární aktivační systém, jež se podílí na regulaci spánku a probouzení [49].

## 4.2 MOLEKULÁRNÍ A FARMAKOLOGICKÉ ASPEKTY PŮSOBENÍ NIKOTINU

### 4.2.1 AKUTNÍ A CHRONICKÉ ÚČINKY

Nikotin působí jako agonista ionotropních nAChRs [50]. Obecné principy akutního působení nikotinu na neurony prostřednictvím nAChRs závisí na (a) podjednotkovém složení konkrétního

exprimovaného nAChRs (determinuje zejména kinetiku aktivace/desenzitizace, afinitu k agonistům a iontově specifickou propustnost) a (b) subcelulární lokalizaci receptoru (determinuje způsob, jakým ovlivňuje přenos informací na synapsi či mimo ni) [51]. Konkrétní kinetické parametry jednotlivých podtypů pak opodstatňují zdánlivou molekulární redundanci, kterou v případě nAChRs pozorujeme. Působením jednoho mediátoru (ACh či nikotin) totiž v důsledku existence množství podtypů s různou subcelulární i orgánovou lokalizací můžeme vyvolat různou odpověď.

Homomerní  $\alpha 7$  nAChRs se vyznačují nízkou afinitou k nikotinu, zároveň jsou aktivovány nízkou a desenzitizovány vysokou koncentrací. Významná je především jejich vysoká permeabilita pro vápník, kterou lze srovnat s NMDA receptory. Heteromerní  $\alpha 4\beta 2$  mají k nikotinu velkou afinitu, ale desenzitizují již při nízkých koncentracích. Jejich permeabilita pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty je oproti homomerním receptorům poloviční až pětinová [50, 52]. Nikotin v krvi kuřáka dosahuje koncentrace přibližně 500 nM, což simultánně aktivuje  $\alpha 7$  i  $\alpha 4\beta 2$  receptory, avšak v důsledku různé kinetiky desenzitizace zůstávají po určité době aktivní pouze nízkoafinní  $\alpha 7$  receptory [53].

nAChRs mohou zaujímat klasické synaptické lokace, častěji však modulují výlev různých neurotransmiterů z nervového zakončení prostřednictvím presynaptické či preterminální pozice přímou aktivací výlevu vyvolaným  $\text{Ca}^{2+}$  signálem a/nebo nepřímou aktivací VOCC. Jejich převážně modulatorní role je dále podpořena aktivitou na mimosynaptických pozicích (axonální, dendritické a somatické), kde ovládním lokální vzrušivosti membrány či, díky široké distribuci, přímo buněčného membránového potenciálu ovlivňuje efektivitu šíření elektrických signálů a citlivost buněk [21].

Chronické působení nikotinu se vyznačuje změnami v aktivitě signálních kináz, genové expresi a vlastnostech nAChRs, které jsou typické pro iniciaci plastických změn synapsí.

Jak již bylo řečeno, nAChRs jsou schopny vyvolat komplexní  $\text{Ca}^{2+}$  signál, který aktivuje CaMKII, PI3K a PKA, jejichž prostřednictvím se též mění aktivita ERK a tím i TF CREB [54]. Tyto molekuly pak spouští expresi IEGs, z nichž zajímavá je zejména akumulace stabilní isoformy FosB proteinu -  $\Delta$ FosB, která byla pozorována v CStr potkanů po opakovaném podávání nikotinu [21]. Zvýšená hladina mRNA a aktivita in vivo (závislá na působení PKA a  $\text{Ca}^{2+}$  signálu) byla prokázána pro tyrozinhydroxylázu - enzym, který je významným kontrolním bodem biosyntézy katecholaminů [55]. V souladu s těmito poznatky je i zjištění zvýšené fosforylace synapsinu-1, což dohromady se zvýšenou aktivitou tyrozinhydroxylázy ukazuje na dlouhodobou modulaci výlevu neurotransmiterů. Dlouhotrvající změny v hladině  $\text{Ca}^{2+}$  nejsou pozorovatelné po podání antagonistů homomerních  $\alpha 7$  receptorů či u  $\alpha 7$  KO myší, což ukazuje na jejich významnou roli v tomto procesu, která je po uvážení jejich vysoké permeability pro  $\text{Ca}^{2+}$  očekávána [56]. Prostřednictvím microarray čipů byly identifikovány další změny v expresi proteinů zapojených v buněčné signalizaci, struktuře a regulaci exprese. Všechny

provedené pokusy shodně poukazují na geny, jež kódují komponenty intracelulárních transportních drah [57], což by mohlo být zvláště důležité z hlediska změn v počtu nAChRs.

Ve vztahu k adaptacím nAChRs na chronické působení nikotinu je nutné zmínit dva rysy: desenzitizaci a zvýšenou tvorbu nAChRs.

Dlouhodobá či opakovaná stimulace může vést k poklesu či ztrátě biologické odpovědi receptoru na stimulaci, jež může být reverzibilní, ale úplná obnova funkce nemusí nastat. Vzhledem k pozorovaným komplexním účinkům fosforylace na alosterické stavy nAChRs a zvýšené aktivitě kináz po chronickém podávání nikotinu lze spekulovat o stabilizaci desenzitizovaných stavů [58].

Zvýšená tvorba nAChRs pozorovaná v mnohých experimentech [21] je nově vysvětlována jeho vlastnostmi podobnými chaperonům - totiž podpora maturace nAChRs přímou interakcí s podjednotkou v endoplazmatickém retikulu. Po akumulaci nikotinu v buňkách dochází ke zvýšení množství maturované podjednotky  $\beta 2$  a též změně stechiometrie vznikajících AChRs [59]. Receptory obsahující  $\beta 2$  podjednotku také vykazují největší míru zvýšení jejich tvorby, zatímco experimenty prokazují pro ostatní typy smíšené výsledky, což pravděpodobně odráží vnitřní odlišnosti, jež ovlivňují efektivitu takového působení nikotinu [21].

#### 4.2.2 ÚČINKY NIKOTINU NA ÚROVNI FYZIOLOGICKÝCH FUNKCÍ

##### 4.2.2.1 Vliv na fungování neuronální sítě hipokampu a účinky na paměť

Cholinergní inervace hipokampu vychází z oblasti bazální části předního mozku. V této oblasti je prokázán synaptický i objemový cholinergní přenos [21]. nAChRs jsou výrazně exprimovány GABAergními interneurony, které obsahují presynapticky lokalizované  $\alpha 7$  i  $\alpha 4\beta 2$  receptory. Podání nikotinu způsobí aktivaci těchto inhibičních neuronů, které tlumí eferentní signalizaci pyramidálních buněk hipokampu [60]. Méně výrazně jsou též přítomny  $\alpha 7$  receptory presynapticky na Glu-ergních zakončení, kde podání nikotinu také zvyšuje pravděpodobnost uvolnění Glu [61]. V souvislosti s tím je třeba zmínit i postsynaptickou aktivitu nAChRs, jejíž účinky na synaptickou plasticitu závisí na časové synchronizaci s presynaptickým výlevem Glu - v souladu s ním zvyšuje intracelulární koncentraci  $Ca^{2+}$  a depolarizací pomáhá uvolnit  $Mg^{2+}$  blokádu NMDA receptorů [62]. Vliv nikotinu na paměť lze částečně vysvětlit jeho podílem na vzniku dlouhodobé potenciace (LTP) v hipokampu [56].

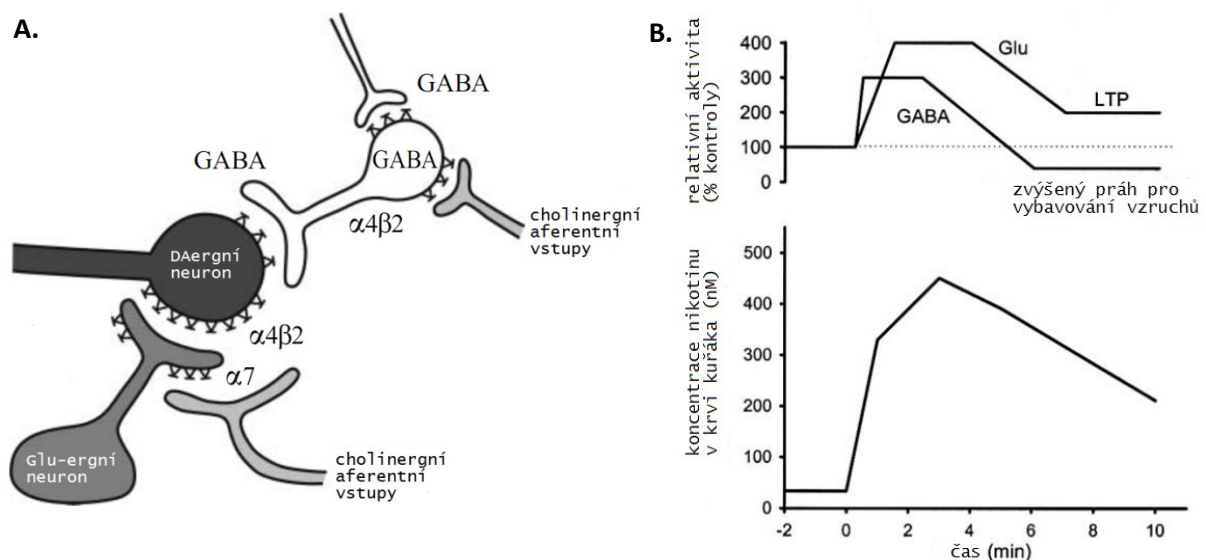
##### 4.2.2.2 Vliv na fungování neuronální sítě v kortexu a účinky na efektivitu kognitivních funkcí

Cholinergní inervace kortexu z bazální oblasti předního mozku dosahuje do všech kortikálních vrstev, přičemž V. vrstva obsahuje nejhustší roztroušené varikozity [21]. Pyramidální buňky této vrstvy nevykazují expresi ani těch nejběžnějších typů nAChRs, avšak ta je prokázána u GABAergních interneuronů [56]. Podání nikotinu proto zvyšuje práh pro vznik LTP redukcí  $Ca^{2+}$  signálů v distálních dendritech pyramidálních buněk aktivací blízkých inhibičních neuronů. Zvýšená aktivita v úkolech

stimulujících prefrontální kortex (PFC) podmínky pro LTP obnovuje [56]. Nikotin tak může fungovat jako agens zvyšující poměr signál-šum v neurální síti, což dokazují pokusy, kdy podání nikotinu zdravým hlodavcům redukuje kognitivní výkon, kdežto u velmi náročných úkolů nebo u jedinců s kognitivními deficity je zaznamenáno signifikantní zlepšení pracovní paměti i pozornosti [63].

#### 4.2.2.3 Vliv na fungování neuronální sítě osy VTA-NAc a účinky na přirozený motivační systém

Mesolimbický DAerní systém je tvořen dopaminovými neurony, které vychází z oblasti VTA a směřují do *nucleus accumbens* (NAc). Těla dopaminových neuronů lokalizovaná ve VTA přijímají konvergentní Glu-erní a GABAerní aferentace. V oblasti jsou i cholinerní zakončení mozkového kmene, u nichž detekujeme synaptický a objemový přenos [21] (Obrázek 7A). Po podání dávky nikotinu relevantní pro simulaci plasmatických koncentrací u kuřáka dochází k aktivaci a následné desenzitizaci  $\alpha 4\beta 2$  receptorů lokalizovaných na GABA interneuronech a dopaminových neuronech. Zároveň s touto aktivací jsou stimulovány presynapticky lokalizované  $\alpha 7$  receptory na Glu-erních zakončeních, které pod vlivem takových dávek nikotinu jen pomalu desenzitizují. Výlev DA je tak kombinovanou souhrou přímé počáteční aktivace dopaminových neuronů s nepřímou aktivací výlevu stimulačního Glu, což vede k LTP Glu-erní aferentací. Důležitým faktorem je též disinhibice dopaminových neuronů v důsledku poklesu aktivity GABAerních interneuronů [56] (Obrázek 7B).



**Obrázek 7: Pozice a typ nAChRs ve VTA s grafem diferenciální změny aktivity zúčastněných neuronů po působení nikotinu.** **A.** Schématické zobrazení prostorových vztahů neuronů ve VTA, kde nikotin působí na osu ACh-Glu-GABA-dopamin. Významná je především distribuce a druh znázorněných nAChRs. Převzato z [64]. **B.** Graf závislosti časového průběhu změny relativní aktivity excitačních Glu-erních a inhibičních GABAerních aferentací VTA DA neuronů v souvislosti s koncentrací nikotinu v arteriální krvi u kuřáka po vykouření cigarety. Během první minuty kouření dochází k vzestupu koncentrace nikotinu nad 250 nM. Během tohoto vzestupu jsou  $\alpha 4\beta 2$  receptory na DA i GABA neuronech aktivovány a následně rychle desenzitizují, což se odráží ve vzestupu a následném poklesu relativní aktivity těchto neuronů. Jakmile k tomu dojde, aktivita inhibičních aferentací k DA neuronům klesá. Simultánně stoupá aktivita Glu-erních aferentací, protože podíl desenzitizovaných  $\alpha 7$  neuronů je při těchto koncentracích nikotinu nízký. Pokud je stimulace Glu-erního přenosu dostatečná, může dojít k indukci LTP. Nikotin tak vyvolá změny, jež přetrvávají i po aktivaci nAChRs a jeho odbourání. Převzato z [65] a upraveno.

## 4.3 MOLEKULÁRNÍ A FARMAKOLOGICKÉ ASPEKTY PŮSOBNÍ KOKAINU, AMFETAMINU A METAMFETAMINU

### 4.3.1 AKUTNÍ A CHRONICKÉ ÚČINKY

Stimulační drogy moduluji monoaminergní signalizaci působením na normální funkci MAT i VMAT-2. Liší se však relativní afinitou k jednotlivým typům MAT [66]. Zatímco kokain má pro všechny tři typy přibližně stejnou funkční sílu jako inhibitor, amfetamin a metamfetamin vykazují relativně nízkou afinitu k SERT oproti ostatním (Tabulka 1). Je však nutné poznamenat, že studie se značně rozcházejí ve výsledných afinitách k jednotlivým MAT v závislosti na experimentálním protokolu, expresním systému a tkáňové preparaci [66]. Afinita (+)-amfetaminu a (+)-metamfetaminu k VMAT-2 se pohybuje v řádech mM [67].

**Tabulka 1: Afinity stimulačních drog k monoaminovým transportérům**

stimulační droga	DAT	SERT	NET
(-)-kokain <sup>a</sup>	478	304	779
(+)-amfetamin <sup>b</sup>	34	3830	39
(+)-metamfetamin <sup>c</sup>	114	2137	48

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> (nM): [68] Matecka et al. (1996), J. Med. Chem., 39, 4704-16

<sup>b</sup> K<sub>i</sub> (nM): [69] Rothman et al. (2001), Synapse, 39, 32-41

<sup>c</sup> K<sub>i</sub> (nM): [70] Rothman et al. (2000), Synapse, 35, 222-7

Tyto stimulační drogy vykazují dva profily účinku. Inhibitory zpětného vychytávání neurotransmiteru ze synaptické štěrbiny blokuji transportní funkci MAT v plasmatické membráně. Tím zabraňují snížení koncentrace neurotransmiteru, které normálně následuje bezprostředně po vylití z nervového zakončení, čímž prodlužují jeho působení na pre- i postsynaptické receptory. Nefungují však jako substrát pro MAT, tudíž nejsou transportovány do nervového zakončení [71]. Efektivita jejich působení na monoaminergní systém závisí na bazální frekvenci výlevu příslušného neurotransmiteru [27]. Typickým zástupcem tohoto typu působení je kokain [71].

Látky způsobující uvolňování neurotransmiterů nezávislé na váčcích účinkují na úrovni VMAT-2 i MAT. Mezi tyto látky řadíme zejména amfetamin a jeho deriváty [71]. Z chemického hlediska jsou to slabé báze lipofilního charakteru, takže za fyziologických podmínek existuje určitá frakce v nenabitém stavu, který umožňuje molekulám procházet přes membrány bez pomoci transportéru. Nicméně zároveň fungují jako substráty pro VMAT-2 i MAT [72]. Hypotéza slabé báze byla formulována za účelem vysvětlení působení amfetaminu a jeho derivátů na úrovni váčků. V sekretorických váčcích je trvale udržováno pH v rozmezí 5,0 - 5,6. Sloučeniny se slabě bazickým charakterem, které se do váčku dostanou, přijmou proton, čímž naruší vybudovaný pH gradient nutný k akumulaci neurotransmiteru. To však vede nejen k poklesu jejich akumulace, ale i k redistribuci do cytoplazmy, čímž se snižuje velikost kvant a zvyšuje cytoplazmatická koncentrace neurotransmiteru [73]. Výsledky pokusu, při kterém inhibice V-ATPázy snížila pH gradient a způsobila jen částečnou redistribuci neurotransmiteru do cytoplazmy oproti amfetaminu, dokazují, že roli hrají i jiné faktory [74]. Navržena je zejména

kompetice s neurotransmitery v místě vazby substrátu na VMAT-2 [73]. Fungování amfetaminu a jeho derivátů na úrovni MAT vysvětluje hypotéza usnadněné výměnné difúze. Během translokace těchto látek do buňky prostřednictvím MAT se zvyšuje pravděpodobnost, že vazebné místo pro substrát bude otevřeno do cytoplazmy. Intracelulární koncentrace neurotransmiteru je v důsledku výše zmíněného účinku těchto drog zvýšená a váže se na dostupná místa MAT, čímž dochází k reverznímu transportu ven z neuronu. Teorie také předpokládá, že poměr transportovaných molekul je 1 : 1 [73]. Jednoduchý experiment, kdy přímá injekce amfetaminu do velkého dopaminového neuronu okružáka ploského (*Planorbis corneus*) způsobila reverzní transport DA, dokazuje, že toto vysvětlení nemůže být úplné [75]. Nové práce, jež integrují poznatky o vlivu iontů (zejména pak intracelulární koncentrace  $\text{Na}^+$ ) navrhují model asymetrického transportéru, který za normálních okolností preferuje zpětné vychytávání neurotransmiterů, ale reverzní transport z buňky může nastat vlivem elektrochemického, iontového či substrátového gradientu [76]. Amfetamin a jeho deriváty zvyšují extracelulární koncentraci neurotransmiteru efektivněji než inhibitory zpětného vychytávání, protože zvětšují jeho celkové uvolněné množství a nejsou závislé na bazální frekvenci presynaptické stimulace [27].

Látky způsobující nekvantový výlev DA (amfetamin, metamfetamin) a inhibitory zpětného vychytávání DA vykazují protichůdnou akutní regulaci buněčné distribuce DAT. Zatímco amfetamin způsobuje redistribuci povrchově lokalizovaných DATs do endozomálních kompartmentů [77], kokain zvyšuje jejich lokalizaci v plasmatické membráně [78]. U amfetaminu byly prozkoumány i další vlastnosti ve vztahu k DATs. Například bylo zjištěno, že účinek amfetaminu má dvojfázový charakter. V časovém horizontu 30 - 60 s je opačný, tj. zvyšuje povrchovou lokalizaci DATs, která pak klesá pod původní úroveň. Navíc se v tomto shoduje s působením DA jako přirozeného substrátu [79]. Změny, které jsou vyvolané jednou injekcí či inkubací buněk s drogou v délce minut až jednotek hodin, nebyly pozorovány po 24 hodinách [31].

V regulaci distribuce DATs jsou zapojeny kinázy. Aktivace nejprostudovanější z nich, proteinkinázy C (PKC), vede ke zvýšené fosforylaci DATs, po níž následuje internalizace transportéru do endozomálních kompartmentů [31]. Souvislost mezi fosforylací DATs, internalizací a aktivitou PKC přinesl experiment, v němž podání metamfetaminu vedlo k zvýšení fosforylace transportéru a spuštění jeho internalizace. Tento účinek byl blokován inhibitory PKC [80]. Vztah mezi PKC a fosforylací transportéru je však složitější - nebyla demonstrována přímá fosfotranferázová reakce a mutagenese cílových míst PKC na DAT nezabrání internalizaci DAT po aktivaci PKC, což naznačuje zapojení dalších proteinů [81]. Otázkou je také aktivace PKC, která je zajišťována  $\text{Ca}^{2+}$  a diacylglycerolem, jež je produktem fosfolipázy C. Tento enzym je aktivován některými GPCRs, ale amfetamin ani metamfetamin nemají afinitu k žádnému z majoritních typů těchto receptorů [31].

Roli by tedy mohla hrát zvýšená koncentrace DA a jeho aktivita na dopaminových receptorech, podání antagonistů  $D_1$  či  $D_2$  receptorů však na fosforylaci a internalizaci v důsledku působení metamfetaminu nic nezměnilo [80]. Překvapivě aktivace  $D_3$  receptoru vedla k podobnému dvojfázovému charakteru lokalizace DATs jako amfetamin [82], jestli ale tento receptor zprostředkovává spojení s PKC či jinou drahou není jasné. Velmi zajímavé je, že inhibice  $Na^+/Ca^{2+}$  antiporteru zablokovala amfetaminem indukovanou aktivaci PKC. Proto byla navržena hypotéza, že akumulace  $Na^+$  v cytoplazmě po transportu substrátu prostřednictvím DAT může zvrátit tento antiport a vyvolat transport  $Ca^{2+}$  iontů dovnitř buňky, které pak aktivují fosfolipázu C i PKC [83].

Tedy je zřejmé, že role kináz v regulaci distribuce DATs působením substrátových molekul (amfetamin, DA) je velká, přestože přímé mechanistické spojení mezi aktivací kináz a fosforylací DATs ještě nebylo odhaleno. Role fosforylace v regulaci DATs prostřednictvím jejich inhibitorů (kokain) je podle některých autorů malá [84]. Pokus o shrnutí faktů ale může naznačovat opak - kokainem indukovaná zvýšená lokalizace DATs v plasmatické membráně je potlačena současným podáváním antagonistů  $D_2$  receptoru [85]. Za normálních okolností vede aktivace tohoto receptoru k zvýšené lokalizaci DATs v plasmatické membráně, které je zabráněno inhibicí MAPK dráhy [86]. Stejně jako kokain a aktivace  $D_2$  receptorů, i aktivace MAPK dráhy zvyšuje lokalizaci DATs v plasmatické membráně zároveň s jeho fosforylací [31].

Chronická aplikace kokainu či amfetaminu a metamfetaminu vede k mnoha různým (i protichůdným) výsledkům v závislosti na dávce, délce podávání a abstinence. Pokud byly pozorovány změny v distribuci DATs v souvislosti s chronickým podáváním kokainu, pak jejich zvýšení při žádné nebo velmi krátké abstinenci následované snížením pod bazální hodnotu při delší abstinenci [87]. Regulace tohoto typu nastávala též častěji při nižších dávkách a byla regionálně shodná se změnami zejména v mesolimbickém DAergním systému oproti nigrostriálnímu [87]. Co se týče snížení lokalizace DATs v plasmatické membráně po chronickém užívání metamfetaminu, část z toho lze vysvětlit jeho neurotoxickým potenciálem, který se projeví v redukci ostatních markerů DAergních synapsí [87]. V souvislosti s metamfetaminem byl dokumentován i vznik vysokomolekulárních komplexů DATs, ve kterých transportér ztrácí funkčnost [88].

Akutní působení metamfetaminu a amfetaminu způsobuje pokles počtu VMAT-2 asociovaného s membránou, který není doprovázen vzestupem cytoplasmatické frakce [89]. Kokainu způsobuje vzestup počtu cytoplasmaticky lokalizovaných VMAT-2 se současným poklesem v membránové frakci, což značí pravděpodobné redistribuci [89]. Podání antagonistů  $D_2$  receptorů zabraňuje působení obou typů drog na distribuci VMAT-2 [71]. Chronické požívání jakékoliv z těchto drog způsobuje celkové snížení počtu VMAT-2, což je v případě metamfetaminu důsledek jeho neurotoxicity [72].



Zvýšený výlev DA v důsledku akutního působení drog moduluje neurony přes dopaminové GPCRs. Zatímco presynapticky lokalizované D<sub>2</sub> receptory moduluji spíše výlev DA, postsynaptické D<sub>1</sub> receptory mohou vyvolat bezprostřední i dlouhodobé účinky regulací transkripce. Po aktivaci D<sub>1</sub> receptoru akutním podáním kokainu dochází ke stimulaci aktivity ERK v MSNs NAc, která vede k expresi IEGs - např. c-Fos, FosB a jiné. Aktivace AC a následná tvorba cAMP vede ke stimulaci PKA a TF CREB. PKA pak zvyšuje aktivitu DARPP-32 [29]. Po aktivaci D<sub>2</sub> receptorů dochází k inhibici indukce c-Fos [29], inhibici tyrozinhydroxylázy a snížení výlevu DA [90].

V souvislosti s dopaminovými receptory je dobré zmínit profil chronických změn v jejich počtu indukovaný u opic druhu Makak rhesus denním požíváním kokainu po dobu 18 - 22 měsíců - autoradiografií byl zaznamenán pokles hustoty D<sub>1</sub> a D<sub>2</sub> receptorů, který byl nejvýznamnější v oblasti CStr [91]. Pomocí pozitronové emisní tomografie na stejném modelu byl kvantifikován tento pokles na 15 - 20 % u D<sub>2</sub> receptorů a bylo zjištěno, že se projeví již první týden po započetí požívání kokainu a že je detekovatelný i rok po ukončení poslední dávky [92].

#### 4.3.2 ÚČINKY KOKAINU, AMFETAMINU A METAMFETAMINU NA ÚROVNI FYZIOLOGICKÝCH FUNKCÍ

##### 4.3.2.1 *Vliv na motorickou aktivitu*

DS je součástí bazálních ganglií, z jejichž funkce v selekci motorických programů se specializuje převážně na vyladění aktivace či inhibice talamokortikálních neuronů [36] a v poslední době se ukazuje, že léze v této oblasti vede k narušení tvorby motorických zvyků [93]. I přes částečnou diferenciální distribuci D<sub>1</sub> a D<sub>2</sub> receptorů na neuronech výstupních projekcí (Obrázek 6) vede jejich aktivace ke stimulaci talamokortikálních drah [39, 40] (Obrázek 5). Kombinované podávání agonistů D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> receptorů vedlo u potkana ke stimulaci lokomoce a stereotypních pohybů, které s vyššími dávkami převládaly [94]. Tyto efekty byly přibližně ekvivalentní předchozím pokusům s podáváním kokainu či amfetaminu [95]. V elektrofyziologických experimentech bylo zjištěno, že selektivní stimulace D<sub>1</sub> či D<sub>2</sub> receptorů vedla pouze k lokálním změnám v aktivitě neuronů ve výstupním modulu bazálních ganglií - SNpr. Jejich současná stimulace však vedla k aditivnímu stimulačnímu účinku na tyto neurony [96]. O tom, že synchronizace obou drah vede k největší stimulaci motorické aktivity, svědčí i společné aditivní účinky kofeinu a kokainu [97].

##### 4.3.2.2 *Vliv na rovnováhu aferentních vstupů do NAc*

Jedny z hlavních excitačních aferentních projekcí do NAc jsou Glu-ergní vstupy z ventrální části subikula hipokampu a prefrontálního kortexu [98] (Obrázek 8). Osa ventrální subikulum hipokampu (vSub)-NAc řídí aktivní "up" stavy neuronů NAc [99] a hraje roli v upevňování naučeného jednání [100]. Osa PFC-NAc stimuluje lokální inhibiční síť [101] a hraje roli v dynamické změně strategie v reakci na nové podmínky [100]. V obou drahách lze zaznamenat synaptickou plasticitu v reakci na

opakovanou stimulaci [102]. Obě dráhy jsou také ovládány DAerním systémem v NAc - zatímco vliv aferentního vstupu vSub je stimulován aktivací postsynaptických D<sub>1</sub> receptorů náhlým vzestupem výlevu DA, osa PFC-NAc je tlumena aktivací presynaptických D<sub>2</sub> receptorů tonickou hladinou DA [100].

Vzájemná interakce těchto aferentních vstupů na úrovni NAc je silně závislá na načasování jejich integrace. Jestliže stimulace z vSub dorazí dříve, aktivace PFC tuto stimulaci podpoří. Pokud je však PFC aktivován dříve, vSub je utlumen [103]. Vzájemná vylučnost aktivace/tlumení těchto vstupů jde až na úroveň synaptické plasticity [102]. Rovnováha je modulována DAerním systémem, kdy zvýšený výlev DA obvykle spojený se signalizací odměny [104] zvýrazňuje vliv osy vSub-NAc a tlumí druhý aferentní systém. Tím dochází k posílení zvoleného jednání, které vedlo k zisku odměny. Ve chvíli, kdy je zvolená strategie již neefektivní, dojde k poklesu výlevu DA [105] a disinhíbici PFC-NAc, což vede ke změně strategie.

## 5 ZÁVISLOST JAKO DOMINANTNÍ DŮSLEDEK POŽÍVÁNÍ STIMULAČNÍCH DROG

### 5.1 DEFINICE ZÁVISLOSTI

Závislost na návykové látce je definována jako patologické užívání určité látky, které se vyznačuje několika vlastnostmi: (a) tolerance - potřeba významného zvyšování dávky k dosažení požadovaného výsledku nebo snižování intenzity efektu stále stejné dávky; (b) abstinenci příznaky - charakteristický soubor symptomů po ukončení užívání návykové látky; (c) zhoršená kontrola - problémy s volní kontrolou počátku a ukončení braní návykové látky, problémy s limitací dávky; (d) zanedbávání jiných aktivit - omezení alternativních požitků či koníčků; (e) časová náročnost aktivit spojených s návykovou látkou - trávení velkého množství času sháněním a užíváním návykové látky, zotavováním se z jejích účinků; (f) trvalý užívání návykové látky, i přes problémy s tím spojené - vědomí škodlivých fyzických a psychických následků nezabrání užívání návykové látky; (g) nutkání - silná touha nebo nevladatelné myšlenky pohánějící k užívání návykové látky [106].

### 5.2 ANALÝZA MOTIVAČNÍHO SYSTÉMU

#### 5.2.1 ROZBOR ODMĚNY

Odměna je definována jako objekt či podnět, pro jehož získání vyvíjí organismus cílenou aktivitu. Pochopení neurobiologie odměny vyžaduje rozbor na její jednotlivé psychologické složky: (a) učení; (b) afektivní složka; (c) motivace. Jinými slovy během vnímání podnětu se organismus *učí*, že daný podnět poskytuje odměnu ve spojení s *afektem* a že pro jisté kvality se stává *žádaným* [107].

Všechny tři složky se mohou vyskytovat v explicitní (tj. vědomě prožívané) nebo v implicitní (tj. procesy bez přímého přístupu do vědomé roviny) formě. Neuronální zpracování implicitních procesů může vyústit v explicitní projev, ale ten není nutný pro vliv implicitních procesů na chování. Například

závislí vykazují zvýšenou motivaci k získání tak nízké dávky stimulačních drog, že nevyvolá měřitelný subjektivní ani autonomní účinek [108]. Přestože podstata explicitních a implicitních procesů může být i v rámci každé kategorie velmi různá, je důležité si uvědomit, že pro zprostředkování odměny kontinuálně interagují. Zároveň existence implicitních složek odměny činí měřitelnost fungování odměnového systému přístupnější [107].

Paměťové stopy se vytváří v procesu asociativního učení, kdy vznikají Pavlovovské vztahy mezi stimuly (tzv. S-S asociace) nebo vztahy mezi stimulem a odpovědí (tzv. S-R asociace) a operační vztahy. Dalším zdrojem uchovávaných informací je kognitivní učení, které tvoří časové, prostorové a kauzální vztahy mezi jednáním a jeho následky zpracováním přijímaných informací. Oba typy stop jsou pak využity ke spouštění anticipační reakce, k interpretaci podnětů a predikci odměny [107].

Afektivní složka odměny se skládá z vědomého pocitu blaha a z tzv. objektivní afektivní reakce. Tato reakce je měřitelná například jako afektivní tvářové výrazy, které jsou vyvolány po podání chuťových podnětů a jsou poměrně homologní u různorodých organismů (lidé, šimpanzi, orangutani, potkani, myši). Po podání sladkého podnětu byl vyvolán výraz obliby charakterizovaný vysunutým jazykem. Po podání hořkého byl naopak vyvolán výraz nechuti charakterizovaný široce otevřenými ústy [109]. Zdá se, že na molekulární úrovni by tuto část odměny mohly zprostředkovávat opioidy působením na GABAergní neurony v NAc [110]. Role DA ve zprostředkování hedonického efektu není prokazatelná. Afektivní tvářové výrazy nejsou ovlivněny mesolimbickým DAergním systémem [111].

Motivační složka odměny se skládá ze subjektivní vědomé složky, kterou nazýváme touha, a objektivní implicitní složky. Ta je přisuzována sensorickým vstupům prostřednictvím neuronálních sítí a její síla reflektuje vnitřní hodnotu připisovanou stimulu. Takový stimulus (nebo signál s ním asociovaný) pak poutá pozornost, podněcuje kontakt, vyhledávání a konzumaci [112]. Implicitní složka motivace se dynamicky mění tak, že při každém novém setkání se stimulem je znovu zpracovávána informace o jeho předchozí hodnotě a srovnávána se současným fyziologickým stavem (hlad, žízeň, odvykání). Se změnami fyziologických stavů lze pozorovat posun v motivačních hodnotách bez toho, aniž by se musela měnit zapamatovaná či predikovaná užitečnost odměn [113]. Na rozdíl od afektivní složky odměny, implicitní složka motivace je na úrovni mozku zprostředkována DAergním mesolimbickým systémem [111, 113]. Kognitivní motivace vstupuje do vědomé roviny s explicitní touhou po objektech či vjemech. Význam spočívá v generování komplexních cílených strategií - jsou vytvářeny predikce o budoucí hodnotě ze zapamatovaných minulých stavů příslušné odměny a na základě pochopených příčinných souvislostí mezi jednáním a následkem je zvolena nejlepší cesta k maximalizaci získané odměny. Ve zprostředkování fungování kognitivní motivace jsou zapojeny zejména kortikální oblasti [107].

### 5.2.2 FUNKČNÍ NEUROANATOMIE MOTIVAČNÍHO SYSTÉMU

Motivační systém v mozku, za jehož stěžejní anatomickou část je považován komplex kortex-bazální ganglia, je hlavní složkou, která vytváří a monitoruje motivované jednání. To vyžaduje koordinaci hodnocení odměn, asociativního učení a selekci vhodných jednání. Nezbytný je vznik rozhraní motivace-motorická kontrola, které je lokalizováno právě v síti bazálních ganglií. Zde dochází k integraci různých aspektů zpracovávání odměny a interakci neuronové sítě zajišťující odměnu s oblastmi v mozku, jež se týkají kognitivní a motorické kontroly [114].

Funkčním modelem navrženým pro popis volního jednání řízeného motivačním systémem je tzv. modul, tj. jednotka biologické struktury, která zprostředkovává konkrétní funkci. Pro fungování motivačního systému jsou nutné informace ze sensorického a percepčního modulu (příjem externího signálu), kognitivního modulu (kontrola, predikce, paměť), behaviorálně selekčního a motorického modulu (realizace motorických programů) a viscerálního modulu (vnitřní prostředí) [115].

Významným integračním centrem je koordinační modul - NAc jako součást VS. NAc se dělí na dvě části - jádro a obal, které se liší v cílech svých eferentních projekcí. Obě části jsou tvořeny z 90 % z MSNs a zbylých 10 % připadá na lokální interneurony [101].

Excitační aferentní vstupy pochází z několika oblastí. Jedná se zejména o Glu-ergní projekce z PFC (paměťová reprezentace odměny a její dynamické hodnoty, inhibiční exekutivní funkce), hipokampu (prostorové a kontextuální informace) a amygdaly (informace o afektivních stavech), které konvergují na dendritech MSNs. Význam inhibičních aferentních vstupů je méně jasný. Naopak klíčový je modulační efekt DAergních projekcí z mediální oblasti VTA. Odpověď vyvolaná stimulačními projekcemi je modulována DA přímo v tzv. triádách dendrit MSN-stimulační synapse-DAergní synapse. Podle posledních zjištění je však tato duální synaptická konvergence spíše v menšině a v modulaci pomocí DA se tak významně uplatňuje i nepřímá mimosynaptická objemová složka. Můžeme tudíž mluvit i o tonické aktivaci NAc řízené DA [101]. MSNs v NAc vykazují tzv. "up" (depolarizované) a "down" (hyperpolarizované) stavy, které reflektují membránový potenciál. "Up" stav je výsledkem působení aferentních stimulačních vstupů a funguje jako propustný ventil, protože MSNs vysílají akční potenciály jen z "up" stavů. Vzrušivost MSNs v jakémkoliv ze stavů je regulována právě DA. Tonická aktivace  $D_1$  receptorů ji zvyšuje, kdežto tonická aktivace  $D_2$  receptorů ji naopak snižuje. Také se zdá, že aktivace  $D_2$  receptorů má presynaptický tonický inhibiční vliv na aferentní vstupy z PFC, kdežto aktivace  $D_1$  receptorů má stimulační vliv na aferentní vstupy z hipokampu [116]. Výlev DA tedy ovlivňuje přímo vzrušivost buněk NAc a rovnováhu aferentních vstupů.

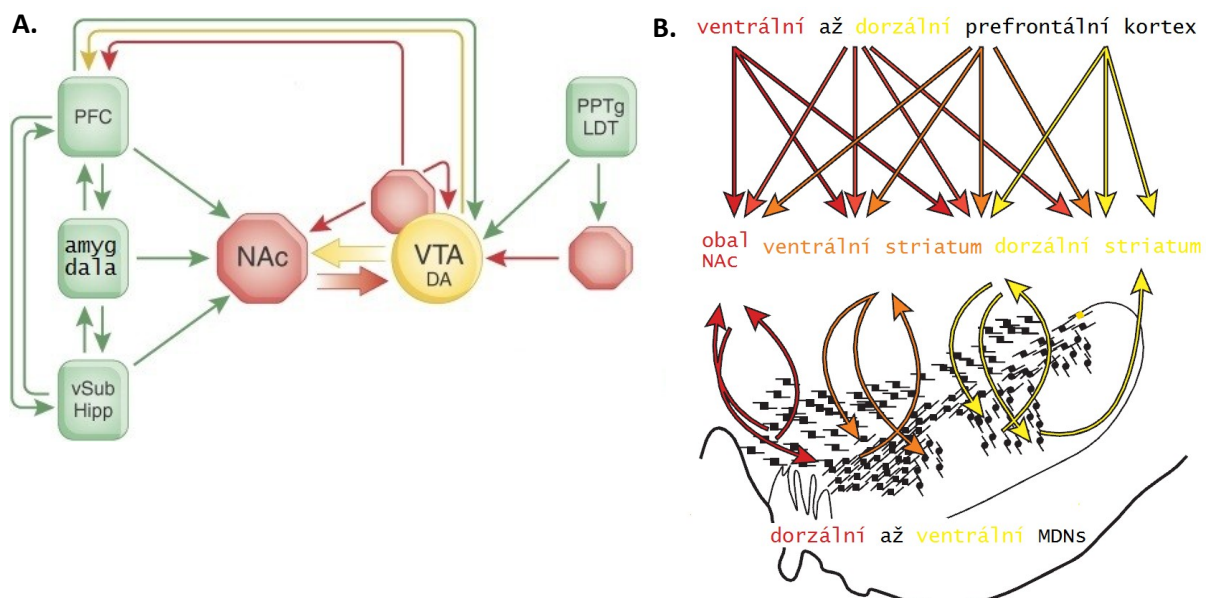
DAergní projekce vychází z oblasti středního mozku a zvláště významný je pak dorzální pás MDNs (dorzální část SNpc a VTA). Tyto neurony specificky vstupují do oblastí spojených se zpracováním odměny - difúzně do kortexu a fokálně do NAc, projekce menšího významu vstupují též do oblasti

hipokampu, amygdaly a jiných oblastí. Z experimentů vyplývá, že důležitým spojením pro přirozené odměny (a drogy) je osa mediální část VTA-obal NAc [114].

Dopaminové neurony v oblasti VTA tvoří přibližně 60 % všech buněk, zbytek je tvořen zejména GABA neurony, které postupují paralelně s axony dopaminových neuronů a zapojují se též do lokálních sítí [101]. Excitační aferentní vstupy do VTA pochází z PFC, *nucleus tegmentalis pedunculopontinus* (PPTg) a *nucleus tegmentalis posterolateralis* (LDT). Zatímco projekce z PFC jsou převážně Glu-ergní, projekce z PPTg/LDT jsou cholinergního, Glu-ergního i GABAergního typu, přičemž vznikají stimulační synapse s dopaminovými neurony a inhibiční s GABA neurony ve VTA [101]. Hlavní inhibiční dráhy mají původ v obalu NAc, ventrální pallidum (VP), vzestupných drahách mozkového kmene a lokálních GABA neuronech [101] (Obrázek 8A).

Za bazálních podmínek dopaminové neurony ve VTA vysílají spontánní, pomalé a nepravidelné signály. Inhibiční projekce z VP udržují část populace dopaminových neuronů ve zcela neaktivním stavu. Aktivita NAc nepřímou determinuje podíl aktivních dopaminových neuronů v populaci, protože tlumí inhibici VP. Tím určuje, kolik neuronů může odpovídat na stimulační vstupy z PPTg/LDT [101].

Vzájemné vztahy CStr a MDNs vytváří výraznou striato-nigro-striatální síť, která tvoří rozhraní mezi striatálními oblastmi zajišťujícími odměnu (VS) a těmi, které zpracovávají převážně motorické výstupy (DS). Tato síť má formu vzestupných spirálních spojení od VS k DS skrze platformu MDNs v dorzoventrálním směru [114] (Obrázek 8B).



**Obrázek 8: Hlavní aferentní vstupy do oblastí osy NAc-VTA a model vzájemných spojení těchto dvou oblastí. A.** Schéma stimulačních (zelená barva), inhibičních (červená barva) a modulačních (žlutá barva) vztahů v oblasti anatomické reprezentace kooperativního modulu. Za zmínku stojí především výrazné vzájemné vztahy limbických oblastí a PFC, jež poskytují stimulační aferentní vstup do NAc. Aktivita neuronů v NAc je dále ovlivňována DA a GABA neurony z VTA. Modulační vliv dopaminu z oblasti středního mozku je ovlivňován z mozkového kmene. Převzato z [101] a upraveno. **B.** Model striato-nigro-striatálních spirálních smyček, který ukazuje funkční rozhraní motivace-motorická aktivita. Prvotní aktivace osy obal NAc-dorzální MDNs zpracováním odměny vede skrze tyto smyčky postupně k přesunu k dorzálnějším částem CStr, které spouští motorické programy. Jejich úlohu v motorické aktivitě potvrzují i aferentní vstupy z motorické oblasti kortexu. Převzato z [114] a upraveno.

### 5.3 VZNIK ZÁVISLOSTI Z POHLEDU SOUČASNÝCH TEORIÍ

Vytvoření závislosti souvisí s přechodem z příležitostného užívání substance na užívání kompulzivní. Podstatou tohoto přechodu jsou drogou indukované neuroadaptace na molekulární, buněčné a neurální úrovni motivačního systému mozku, jež v evoluci vznikl za účelem přiřazení psychologické odměny ke stimulům prospěšným pro přežití (tj. potrava, voda, sexuální partneři, bezpečí aj.) tak, aby se z neutrálních podnětů staly objektem pozornosti a cíleného jednání [117]. Předmětem teorií je však spor o psychologickou funkci, která je v důsledku těchto neuroadaptací pozměněna a jakým způsobem změna této funkce vede k závislosti.

*Teorie oponentních procesů* pracuje s těsným spojením motivace a afektivních stavů jako psychologické odměny. Stimulem indukovaný pozitivní či negativní afektivní stav (proces a) aktivuje opačný homeostatický proces b, jež redukuje odklon od hedonické neutrality. Výsledný subjektivní zážitek je součtem účinku obou stavů. Příjemný akutní efekt drogy vyvolá aktivaci procesu a, který se projeví jako pozitivní afektivní reakce. Současně aktivovaný proces b (sám o sobě nepříjemný) pouze redukuje amplitudu procesu a. Zatímco proces a se s opakováním nemění, b proces roste na síle a trvá déle. Postupně se tak projevuje jako tolerance (tj. snížení efektu stejné dávky drogy) a v bodě, kdy převáží úplně nad a procesem, jako úplná absence pozitivního afektu s pozdějším nástupem negativních abstinčních příznaků. Takovým způsobem deregulovaný proces b je podle této teorie příčinou kompulzivity příjmu drog. Dlouhodobá abstinence pak vede k návratu této složky do původních mezí a jedinec pak již není závislý [118].

Jako neurobiologická podstata procesu b jsou navrženy dva mechanismy, které se snaží obnovit drogami narušenou regulaci afektivních stavů: nízká aktivita motivačního systému mozku a aktivace stresového systému mozku. Výsledkem je chronický vzestup prahu pro psychologickou odměnu, jež vede k převážně negativnímu hedonickému stavu a kompulzivně závislosti [118].

Tato teorie tedy tvrdí, že opakované požití drogy je důsledkem snahy vyhnout se negativním afektivním účinkům abstinence. Pokusy ale prokázaly, že opětovné podání drogy po dlouhém období abstinence je mnohem efektivnější při obnově intenzivního hledání drogy než simulovaný stav akutní abstinence [119]. Navíc akutní abstinční příznaky trvají několik dní, potom by mělo dojít k návratu procesu b do normálu, ale náchylnost k obnově závislosti přetrvává týdny a měsíce [120].

*Teorie aberantního asociativního učebního procesu* tvrdí, že vznik závislosti je důsledkem vytvoření abnormálně silných paměťových asociací spojených s drogou. Na vědomé úrovni vznikají kauzální vztahy mezi činem a důsledkem (požití drogy a její účinek) a prediktivní vztahy mezi signálem v prostředí a následnou odměnou. Aberantní učení pak může způsobit, že vědomě dosažitelné vzpomínky na drogové prožitky jsou mimořádně živé a odměna s nimi spojená je nadhodnocená. Na nevědomé úrovni jde o patologicky silné asociace S-R a podmíněný stimulus (CS)-nepodmíněný

stimulus (signál spojený s drogou a odměna). Chování, jež je řízeno kognitivní selekcí ověřených a adekvátních motorických programů, se mění v chování automatické, řízené jednoduchými stereotypními vztahy S-R. Asociace mezi signálem a očekávanou odměnou dominuje nad ostatními. Kompulzivita drogové závislosti je tedy podle této teorie způsobena stereotypizací chování a zkrácením významnosti drogy oproti jiným stimulům [121].

Příčinou abnormálních asociací je synaptická plasticita vyvolaná účinkem drog především v oblasti VTA a NAc. Výsledkem jsou dlouhotrvající změny v síle a četnosti synaptických spojení [121].

Zásadní otázkou je, zda se automatizované S-R asociace skutečně mohou stát kompulzivními pouze na základě jejich častého opakování a výjimečně silné asociace. Bylo prokázáno, že požívání drog skutečně může u experimentálních zvířat vést k vytvoření silných stereotypních S-R asociací, ale ty jsou většinou spojeny s konzumací drogy (např. stisk tlačítka pro přístup k droze) [122]. Tyto asociace jsou dokonce reflektovány na úrovni mozku trvalým přesunem aktivity z VS do DS při prezentaci drogy nebo s ní spojených signálů chronicky závislým [123]. Podle některých autorů se tvorba silných stereotypů nedá přirovnat ke každodenní realitě závislého člověka, který komplexně adaptuje vzorce chování za jediným účelem - získat drogu [124].

*Teorie senzitivace motivačních efektů stimulů (drog a s nimi spojených signálů)* tvrdí, že procesem senzitivace (tj. zvětšování efektu drogy opakovaným požíváním) dochází k umocnění schopnosti drog upoutat pozornost a vzbudit patologickou motivaci k jejich získání a požívání. Stimul z vnějšího prostředí (např. bílý prášek na podlaze) získá schopnost podnítit motivaci asociací s odměnou (např. dávka kokainu), čímž vznikne CS, který sám o sobě převezme specifické motivační vlastnosti. Takové CS pak mají schopnost strhávat pozornost, podněcovat přiblížení a cílené jednání. Opakované požívání drog pak vede k senzitivaci neurálních sítí zapojených v přidělování implicitní formy motivační složky psychologické odměny CS, což vede k jejich hyperaktivaci ve věcech spojených s drogou a kompulzivně brání drog [124].

Bylo prokázáno, že senzitivace je na úrovni v mozku alespoň z části reprezentována změnami v DAergním systému mozku v oblasti NAc, dosud však není jasné, které z mnoha změn to jsou [124].

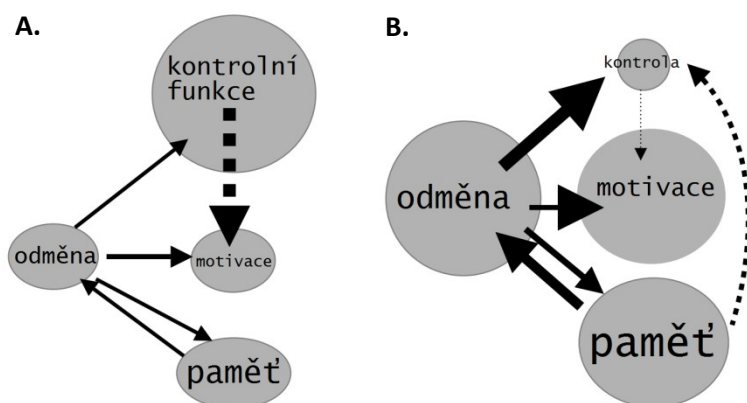
Hypersenzitivace motivačního systému mozku by měla vést k vyšší aktivitě DAergního systému NAc. Studie toto skutečně potvrzují po opakovaném podávání drogy [125] a přímá stimulace NAc vede ke zvýšení implicitní složky motivace přidělované signálům spojeným s odměnou [126]. Zajímavé je, že zvýšený výlev DA koreluje se zvýšenou implicitní složkou motivace [127]. Problémem je, že literatura je s ohledem na toto téma poměrně bohatá a často s protichůdnými výsledky - některé studie ukazují pokles výlevu DA a jiné změny spojené spíše s hypofunkcí DAergního systému [124].

*Teorie kognitivní dysfunkce* vysvětluje závislost jako důsledek narušených exekutivních funkcí vzniklých dlouhodobým působením drog na frontální kortikální systémy. Tyto funkce můžeme rozdělit do čtyř kategorií: (a) aktualizace uchovávaných informací; (b) inhibice impulzivních reakcí; (c) přeřazování mentálních souborů mezi procesy; (d) rozhodování. Takové narušení pak může vést k eskalaci požívání drog a kompulzivité [128].

Změny, které lze pozorovat po chronickém působení drog na tuto oblast, jsou patrné na makroskopické (průtok krve, utilizace glukózy, změny objemu PFC) i mikroskopické (strukturální anomálie dendritů pyramidálních buněk) úrovni. Pokles aktivity v této oblasti navíc může být doprovázen vzestupem v subkortikálním DAerním systému [128].

Výzkum ukázal, že drogově závislí mají narušenou pracovní paměť, činí jim problém alternovat chování při změně podmínek pro udělování odměn, vykazují větší pravděpodobnost riskantního chování a útlum schopnosti inhibiční kontroly, při rozhodování volí bezprostřední zisk bez ohledu na budoucí negativní důsledky. Otázkou zůstává, zda tyto poruchy nebyly přítomny už před počátkem drogové závislosti nebo zda nejsou nepřímým důsledkem jiné z mnoha neuroadaptací [128].

V poslední době je zdůrazňován model závislosti integrující roli odměny, motivace, učení a kognitivních funkcí v jejím vzniku. Účinky drog zmanipulují prisuzování odměn vnějším stimulům tak, že všechny přirozené odměny se zdají oproti nim slabé. Vidina zisku takové odměny pak významně rekrutuje motivační systém schopný vybudit cílené jednání. Pokud se vše odehrává za současné dysfunkce exekutivních funkcí frontálního kortexu, kontrola takového jednání může být velmi obtížná. Vzniklé asociativní vzpomínky uchovávají představu objektu zájmu, jeho hodnotě a prediktivních signálech o jeho přítomnosti [129] (Obrázek 9).



**Obrázek 9: Integritivní model interakcí psychologických funkcí za normální situace a při vzniku závislosti. A.** Interakce odměny, motivace, paměti a kognitivních exekutivních funkcí v mozku neovlivněném drogami vede k tomu, že přirozené odměny uchovávané v paměti jsou schopné vzbudit motivaci a tlumit inhibiční kontrolní mechanismy. Výsledná vybraná adekvátní aktivita pak vede k zisku dané odměny. **B.** Během závislosti je význam některých složek tohoto systému posílen, jiné jsou utlumeny. Mění se též relativní schopnost vzájemného ovlivnění. Převzato z [129] a upraveno.

#### 5.4 SPOLEČNÉ VLASTNOSTI STIMULAČNÍCH DROG A VZNIK ZÁVISLOSTI

Výše uvedené informace o účincích stimulačních drog naznačují, že jejich společným cílem je ovlivnění aktivity DAerního systému, který je zároveň významně zapojen do vzniku závislosti. Zatímco nikotin a kofein působí přes receptory, jejichž hlavní funkce je spíše modulační, kokain a



amfetamin a jeho deriváty přímo zasahují do systému, který manipuluje s DA. Výsledkem je zvýšený výlev DA v cílových oblastech DAerních projekcí, z nichž zvláště oblast NAc hraje roli v závislosti.

Jaká informace je ale zakódována ve výlevu DA v NAc? První představy směřovaly k tomu, že DA reprezentuje hedonickou hodnotu odměny, ale tyto představy se ukázaly být nesprávné ve světle experimentů s myši, kterým byl zablokován DAerní systém a které nepřestaly projevovat hedonické preference [130].

Ukázalo se, že to, co nefunguje po odstavení DAerního systému, je schopnost využít informace o odměnách pro vyvolání motivace k cílenému jednání [130]. Dle terminologie teorie senzitivace motivačních efektů stimulů, výlev DA způsobuje přiřazení implicitní složky motivace odměnám a signálům o jejich přítomnosti [130].

Jiná představa, která není nutně v rozporu s předchozí, vychází z předpokladu, že jedinec se vždy snaží chovat tak, aby maximalizoval budoucí odměny. Teorie říká, že mozek uchovává vnitřní hodnoty minulých činů, které jim byly přiděleny na základě velikosti odměny, ke kterým tyto schémata jednání v minulosti vedly. Na základě těchto informací pak jedinec provede predikci výsledné odměny zvoleného jednání v konkrétní situaci. Reálně získaná odměna je pak porovnána s touto predikcí a jejich rozdíl představuje odchylku v predikci odměny. Výlev DA pak představuje právě tuto odchylku a jeho působení směřuje k pozměnění budoucího jednání za účelem maximalizace odměny [131]. Tato teorie byla nedávno podpořena experimentem, v němž byla měřena odpověď dopaminových neuronů ve VTA na odměnu u opic. V klidu vykazovaly bazální tonickou aktivaci, na kterou nasedala náhlá přechodná zvýšení při zisku neočekávané odměny. Jakmile se opice naučily spolehlivě predikovat odměnu na základě signálu, náhlá zvýšení aktivity se vytratila (tj. odměna odpovídala predikci). Pokud však odměna nenásledovala po signálu, tonická aktivita neuronů poklesla [132]. Jinými slovy tonická aktivita signalizuje, že odměna odpovídá predikci (tj. odchylka je nulová), náhlá přechodná zvýšení vypovídají o tom, že odměna byla větší než predikce (tj. pozitivní odchylka), snížení tonické aktivity reflektuje negativní odchylku (tj. odměna byla menší než predikce) [131].

Přirozené odměny způsobují krátká a specifická zvýšení aktivity dopaminových neuronů, kdežto stimulační drogy (např. amfetamin) vyvolávají zvýšení synaptické koncentrace DA v délce hodin, čímž narušují oba zmíněné normální profily aktivity dopaminových neuronů. Ty jsou nahrazeny časově i rozměrově přehnaným DAerním signálem [133]. Kdykoliv je tedy droga požitá, výsledná odměna je interpretována jako větší než predikce. Takové hodnocení vytváří pro drogu výhodu oproti jiným odměnám a v důsledku toho je jednání přizpůsobováno vyhledávání takové odměny [131].

Jak již bylo řečeno, z VTA vychází projekce difúzně do kortexu. Ten je funkční součástí motivačního systému, výlev DA v této oblasti zajišťuje aktualizaci uchovávaných informací o cíli motivovaného jednání tak, aby mohly být uloženy a případně v budoucnu sloužily k jeho získání. Zvýšení výlevu DA

působením stimulačních drog vede k akumulaci informací o signálech spojených s přítomností drogy kvůli jejich uměle vysoké hodnotě [131].

Intracelulární signální mechanismy přetvářejí iniciální bezprostřední účinky drog (jako je například výlev DA) na dlouhodobé změny ve fungování neuronů. To se projevuje zejména změnami v genové expresi na úrovni přechodných zvýšení, které vedou k remodelaci synapsí a reorganizaci neurálních sítí, a na úrovni dlouhodobých změn, které vedou k trvalému zvýšení či snížení genové exprese v důsledku modifikací chromatinu [134].

Je nutné zmínit zejména dva důležité faktory, které zprostředkovávají fyziologické účinky stimulačních drog - TF CREB a Fos. Srovnání jejich exprese pod vlivem podávaného kokainu v různých časových horizontech ukázalo, že krátkodobému podávání drogy dominuje akumulace TF CREB, ale podíl stabilní formy Fos proteinu na celkové změně genové exprese stabilně roste s časem [135].

TF CREB je aktivován různými signálními drahami přechodnou (PKA, CAMKII aj.) i dlouhodobější (ERK) fosforylací a jinými specifickými modifikacemi [136]. Aktivita CREB v NAc stoupá po akutní i chronické aplikaci stimulačních drog [137]. Zvýšená funkce CREB v NAc snižuje senzitivitu k umělé i přirozené odměně, zároveň zprostředkovává adaptaci na stres a negativní stimuly [138]. Funguje tak jako homeostatický modulátor tlumící výchyly systému libovolné polarity. Pravděpodobným molekulárním mechanismem této zpětnovazebné smyčky při indukci tolerance na odměnu poskytovanou drogou je tlumení aktivity dopaminových neuronů VTA přes opioidní receptory prostřednictvím indukované exprese DYN [139] a stimulace excitability MSNs NAc [140].

Expresí členů rodiny Fos proteinů v NAc je vyvolaná prakticky všemi známými drogami [141]. Rychlý a přechodný vzestup hladin těchto proteinů (c-Fos, FosB) v NAc a DS v důsledku akutního působení drog vede k potenciaci účinků na odměnu a lokomoci. Všechny vyjmenované proteiny jsou však degradovány v časovém horizontu hodin. Zároveň je však alternativním sestřihem FosB generována extrémně stabilní forma, tzv.  $\Delta$ FosB, která je po opakovaném užívání drog postupně akumulována a přetrvává v mozku i po týdnech od poslední aplikace. Funguje jako TF, prokázanými cíli jsou proteiny zvětšující hustotu dendritů (Cdk5, NF- $\kappa$ B) a měnící vzrušivost buněk (podjednotky receptorů) [142]. Indukce exprese v NAc zvyšuje senzitivitu k účinkům umělých i přirozených odměn [143] a snížením prahu pro odměnu podporuje odolnost vůči sociálnímu stresu [144]. Se svým časovým profilem vlivu na expresi a behaviorálními účinky představuje  $\Delta$ FosB molekulární "přepínač", který v rané fázi indukuje stav zvýšené motivace snížení prahu pro odměnu a později se podílí na jeho udržení [137].

Schopnost drog vyvolat opětovné požívání i po dlouhých obdobích abstinence nelze vysvětlit ani pomocí  $\Delta$ FosB, přestože je to jeden z nejdéle působících dosud známých molekulárních signálů (vymizí po 6 - 8 týdnech). Současné první pokusy týkající se remodelace chromatinu v souvislosti s

chronickou aplikací kokainu ukazují, že tato droga indukuje změny v acetylaci, fosforylaci a metylaci histonů a úrovni metylace samotné deoxyribonukleové kyseliny v NAc. Tyto změny mohou zprostředkovat bezprostřední i dlouhodobé změny v chování [145].

## 6 ZÁVĚR

Zatímco historie využívání stimulačních drog z přírodních zdrojů je dlouhá celá staletí, syntetické drogy jsou produktem přelomu 19. a 20. století. Jejich specifické účinky, zejména pak amfetaminu a metamfetaminu, byly využity ve 2. světové válce ke stimulaci vojáků v poli. Oproti kokainu tak byla mnohem dříve zjištěn jejich návykový potenciál a během 50. let se postupně dostává na seznamy kontrolovaných látek několika zemí. Systematické studium fyziologických účinků stimulačních drog vedlo k povolení terapeutických využití, při nichž je riziko závislosti převáženo pozitivními účinky.

Identifikace a charakterizace cílů působení stimulačních drog je dnes na již poměrně pokročilé úrovni. Mechanistický charakter většiny těchto poznatků je důležitý pro pochopení podstaty pozorovaného účinku. Tyto molekulární jednotlivosti jsou však zároveň součástí komplexního prostředí buňky, ta zase heterogenního společenství tkáně. Výsledný výstup z takového systému je proto závislý na povaze a načasování aktivity a prostorové lokalizaci molekulárního cíle na několika úrovních. S dostatkem informací roste potřeba jejich řazení do kontextu a integrace, o což se v náznaku pokusila i tato práce.

O působení této kategorie látek na molekulární úrovni je shromážděno množství podrobností, které jsou nyní zpětně dávány do souvislosti s behaviorálními účinky drog. V tomto procesu je zvláště důležitá tvorba teoretických konstruktů, kterou lze pozorovat například v případě teorií o vzniku závislosti. Ty jsou poté využity k interpretaci výsledků studií na molekulární úrovni. Hlavní otázkou je v současnosti mechanismus přechodu ke kompulzivité požívání drog, interpretace změn na molekulární úrovni a jakým způsobem by tyto změny mohly souviset s dlouhodobou hrozbou návratu ke konzumaci drog u chronicky závislých.

Neméně významný je redukcionistický přístup k chápání odměny - až jednotlivé aspekty tohoto "platidla" motivačního systému rozkryjí komplexní interakci více molekulárních i anatomických struktur. Nejvíce je v tomto ohledu známo o ose NAc-VTA. Přesná úloha ostatních struktur a jejich interakce ve zprostředkování motivovaného jednání je předmětem probíhajících výzkumů.

Výzkum v oblasti působení stimulačních drog, zejména pak směřující k nalezení látek s minimálním návykovým potenciálem v porovnání s terapeutickým účinkem, by mohl být přínosem pro medicínu, vědu i společnost.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1a] Silverman K., Griffiths R. R. (2001) Caffeine, Encyclopedia od drugs, alcohol and addictive behavior, 2nd edition, Volume 1, Carson-DeWitt R., Macmillan Reference USA, New York, 209 - 15.
- [1b] Benowitz N. L., Fredericks A. B. (2001) Nicotine, Encyclopedia od drugs, alcohol and addictive behavior, 2nd edition, Volume 2, Carson-DeWitt R., Macmillan Reference USA, New York, 783 - 8.
- [1c] Fischman M. W. (2001) Cocaine, Encyclopedia od drugs, alcohol and addictive behavior, 2nd edition, Volume 1, Carson-DeWitt R., Macmillan Reference USA, New York, 267 - 72.
- [1d] Fischman M. W. (2001) Amphetamine, Encyclopedia od drugs, alcohol and addictive behavior, 2nd edition, Volume 1, Carson-DeWitt R., Macmillan Reference USA, New York, 110 - 21.
- [1e] Fischman M. W. (2001) Methamphetamine, Encyclopedia od drugs, alcohol and addictive behavior, 2nd edition, Volume 2, Carson-DeWitt R., Macmillan Reference USA, New York, 722 - 3.
- [2] Cunha R. A. (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.*, 38, 107 - 25.
- [3] Wei C. J., Li W., Chen J. F. (2011) Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1808, 1358 - 79.
- [4] Sebastião A. M., Ribeiro J. A. (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21, 341 - 6.
- [5] Fredholm B. B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G., Wasserman W. (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 362, 364 - 74.
- [6] Fredholm B. B., Irenius E., Kull B., Schulte G. (2001) Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.*, 61, 443 - 8.
- [7] Dixon A. K., Gubitz A. K., Sirinathsinghji D. J., Richardson P. J., Freeman T. C. (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 118, 1461 - 8.
- [8] Svenningsson P., Hall H., Sedvall G., Fredholm B. B. (1997) Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse*, 27, 322 - 35.
- [9] Trussel L. O., Jackson M. B. (1985) Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4857 - 61.
- [10] Park T.J., Chung S., Han M.K., Kim U.H., Kim K.T. (1997) Inhibition of voltage-sensitive calcium channels by the A2A adenosine receptor in PC12 cells. *J. Neurochem.*, 71, 1251 - 60.
- [11] Nishi A., Bibb J. A., Snyder G. L., Higashi H., Nairn A. C., Greengard P. (2000) Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12840 - 5.
- [12] Sheng M., Greenberg M. E. (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4, 477 - 85.
- [13] Hughes P., Dragunow M. (1995) Induction of immediate early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 47, 133 - 78.
- [14] Ferré S., Ciruela F., Woods A. S., Lluís C., Franco R. (2007) Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.*, 30, 440 - 6.
- [15] Ferré S., Fredholm B. B., Morelli M., Popoli P., Fuxe K. (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.*, 20, 482 - 7.
- [16] Ginés S., Hillion J., Torvinen M., Le Crom S., Casadó V., Canela E. I., Rondin S., Lew J. Y., Watson S., Zoli M., Agnati L. F., Verniera P., Lluís C., Ferré S., Fuxe K., Franco R. (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8606 - 11.
- [17] Hillion J., Canals M., Torvinen M., Casado V., Scott R., Terasmaa A., Hansson A., Watson S., Olah M. E., Mallol J., Canela E. I., Zoli M., Agnati L. F., Ibanez C. F., Lluís C., Franco R., Ferré S., Fuxe K. (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.*, 277, 18091 - 7.
- [18] Ferré S., Torvinen M., Antoniou K., Irenius E., Civelli O., Arenas E., Fredholm B. B., Fuxe K. (1998) Adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J. Biol. Chem.*, 273, 4718 - 24.

- [19] Schiffmann S. N., Fisone G., Moresco R., Cunha R., Ferré S. (2007) Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.*, 83, 277 - 92.
- [20] Ciruela F., Casado V., Rodrigues R. J., Luján R., Burgeño J., Canals M., Borycz J., Rebola N., Goldberg S. R., Mallol J., Cortés A., Canela E. I., López-Giménez J. F., Milligan G., Lluís C., Cunha R. A., Ferré S., Franco R. (2006) Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J. Neurosci.*, 26, 2080 - 7.
- [21] Dani J. A., Bertrand D. (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 699 - 729.
- [22] Changeux J. P., Bertrand D., Corringier P. J., Dehaene S., Edelstein S., Lena C., Le Novère N., Marubio L., Picciotto M., Zoli M. (1998) Brain nicotinic receptors: Structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res. Rev.*, 26, 198 - 216.
- [23] Millar N. S., Gotti C. (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 56, 237 - 46.
- [24] Unwin, N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 346, 967 - 89.
- [25] Dajas-Bailador F., Wonnacott S. (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 25, 317 - 24.
- [26] Eiden L. E., Schäfer M. K.-H., Weihe E., Schütz B. (2004) The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.*, 447, 636 - 40.
- [27] Howell L. L., Kimmel H. L. (2008) Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 196 - 217.
- [28] Bortolato M., Chen K., Shih J. C. (2008) Monoamine oxidase inactivation: From pathophysiology to therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60, 1527 - 33.
- [29] Goodman A. (2008) Neurobiology of addiction: An integrative review. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 266 - 322.
- [30] Zahniser N. R., Sorkin A. (2009) Trafficking of dopamine transporters in psychostimulant actions. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 20, 411 - 7.
- [31] Schmitt K. C., Reith M. E. (2010) Regulation of the dopamine transporter, aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1187, 316 - 40.
- [32] Fisone G., Borqvist A., Usiello A. (2004) Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol. Life Sci.*, 61, 857 - 72.
- [33] Antoniou K., Papadopoulou-Daifoti Z., Hyphantis T., Papatheanasiou G., Bekris E., Marselos M., Muller M., Goldberg S. R., Ferré S. (2005) A detailed behavioral analysis on the motor effects of caffeine and the involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the rat. *Psychopharmacology*, 183, 154 - 62.
- [34] Pelligrino D. A., Xu H.-L., Vetri F. (2010) Caffeine and the Control of Cerebral Hemodynamics. *J. Alzheimers Dis.*, 20, S51 - S62.
- [35] DeLong M. R., Wichmann T. (2007) Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia. *Arch. Neurol.*, 64, 20 - 4.
- [36] Gerfen C. R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Ann. Rev. Neurosci.*, 15, 285 - 320.
- [37] Ferré S., Agnati L. F., Ciruela F., Lluís C., Woods A. S., Fuxe K., Franco R. (2007) Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in 'local modules': the striatal spine module. *Brain Res. Rev.*, 55, 55-67.
- [38] Borycz J., Pereira M. F., Melani A., Rodrigues R. J., Kofalvi A., Panlilio L., Pedata F., Goldberg S. R., Cunha R. A., Ferré S. (2007) Differential glutamate-dependent and glutamate-independent adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine release in different striatal compartments. *J. Neurochem.*, 101, 355 - 63.
- [39] Mayfield R., Larson G., Orona R. A., Zahniser N. R. (1996) Opposing actions of adenosine A2a and dopamine D2 receptor activation on GABA release in the basal ganglia: evidence for an A2a/D2 receptor interaction in globus pallidus. *Synapse*, 22, 132 - 8.

- [40] Popoli P., Gimenez-Llort L., Pezzola A., Reggio R., Martinez E., Fuxe K., Ferré S. (1996) Adenosine A1 receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D1 receptor stimulation in rodents. *Neurosci. Lett.*, 218, 209 - 13.
- [41] Ferré S. (2008) An update on the mechanisms of psychostimulant effects of caffeine. *J. Neurochem.*, 105, 1067 - 79.
- [42] Hervé D., Le Moine C., Corvol J. C., Belluscio L., Ledent C., Fienberg A. A., Jaber M., Studler J. M., Girault J. A. (2001) Galpha(olf) levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *J. Neurosci.*, 21, 4390 - 9.
- [43] Svenningsson P., Nomikos G. G., Fredholm B. B. (1995) Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *J. Neurosci.*, 15, 7612 - 24.
- [44] Basheer R., Strecker R.E., Thakkar M.M., McCarley R.W. (2004) Adenosine and sleep-wake regulation, *Prog. Neurobiol.*, 73, 379 - 96.
- [45] Van Dort C. J., Baghdoyan H. A., Lydic R. (2009) Adenosine A1 and A2A receptors in mouse prefrontal cortex modulate acetylcholine release and behavioral arousal. *J. Neurosci.*, 29, 871 - 81.
- [46] Huang Z.L., Qu W.M., Eguchi N., Chen J.F., Schwarzschild M.A., Fredholm B.B., Urade Y., Hayaishi O. (2005) Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat. Neurosci.*, 8, 858 - 9.
- [47] Urade Y., Eguchi N., Qu W. M., Sakata M., Huang Z. L., Chen J. F., Schwarzschild M. A., Fink J. S., Hayaishi O. (2003) Sleep regulation in adenosine A2A receptor-deficient mice. *Neurology*, 61, S94 - S96.
- [48] Stenberg D., Litonius E., Halldner L., Johansson B., Fredholm B. B., PorkkaHeiskanen T. (2003) Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. *J. Sleep. Res.*, 12, 283 - 90.
- [49] Coleman C. G., Baghdoyan H. A., Lydic R. (2006) Dialysis delivery of an adenosine A2A agonist into the pontine reticular formation of C57BL/6J mouse increases pontine acetylcholine release and sleep. *J. Neurochem.*, 96, 1750 - 9.
- [50] Albuquerque E. X., Alkondon M., Pereira E. F., Castro N. G., Schrattenholz A., Barbosa C. T., Bonfante-Cabarcas R., Aracava Y., Eisenberg H. M., Maelicke A. (1997) Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280, 1117 - 36.
- [51] Poorthuis R. B., Goriounova N. A., Couey J. J., Mansvelder H. D. (2009) Nicotinic actions on neuronal networks for cognition: General principles and long-term consequences. *Biochem. Pharmacol.*, 78, 668 - 76.
- [52] Fucile S. (2004) Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*, 35, 1–8.
- [53] Woollorton J. R., Pidoplichko V. I., Broide R. S., Dani J. A. (2003) Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J. Neurosci.*, 23, 3176 - 85.
- [54] Brunzell D.H., Rusell D. S., Picciotto M. R. (2003) In vivo nicotine treatment regulates mesocorticolimbic CREB and ERK signaling in C57Bl/6J mice. *J. Neurochem.*, 84, 1431 - 41.
- [55] Gueorguiev V.D., Zeman R. J., Hiremaqalur B., Menezes A., Sabban E. L. (1999) Differing temporal roles of Ca<sup>2+</sup> and cAMP in nicotine-elicited elevation of tyrosine hydroxylase mRNA. *Am. J. Physiol.*, 276, C54 - C65.
- [56] Mansvelder H. D., Mertz M., Role L. W. (2009) Nicotinic modulation of synaptic transmission and plasticity in cortico-limbic circuits. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 20, 432 - 40.
- [57] Wang J., Gutala R., Hwang Y. Y., Kim J. M., Konu O., Ma J. Z., Li M. D. (2008) Strain- and region-specific gene expression profiles in mouse brain in response to chronic nicotine treatment. *Genes Brain Behav.*, 7, 78 - 87.
- [58] Quick M. W., Lester R. A. (2002) Desensitization of neuronal nicotinic receptors *J. Neurobiol.*, 53, 457 - 78.
- [59] Nashmi R., Lester H. (2007) Cell autonomy, receptor autonomy, and thermodynamics in nicotine receptor up-regulation. *Biochem. Pharmacol.*, 74, 1145 - 54.
- [60] Ji D., Dani J. A. (2000) Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *J. Neurophysiol.*, 83, 2682 - 90.

- [61] Gray R., Rajan A. S., Radcliffe K. A., Yakehiro M., Dani J. A. (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, 383, 713 - 6.
- [62] Ge S., Dani J. A. (2005) Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation. *J. Neurosci.*, 25, 6084 - 91.
- [63] Levin E. D., McClernon F. J., Rezvani A.H. (2006) Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*, 184, 523 - 39.
- [64] Markou A. (2008) Neurobiology of nicotine dependence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.*, 363, 3159-3168.
- [65] Mansvelder H.D., Keath J.R., McGehee D.S. (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*, 33, 905 - 19.
- [66] Han D. D., Gu H. H. (2006) Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol.*, 6, 6.
- [67] Gonzalez A. M., Walther D., Pazos A., Uhl G. R. (1994) Synaptic vesicular monoamine transporter expression: distribution and pharmacologic profile. *Brain Res., Mol. Brain Res.*, 22, 219 - 26.
- [68] Matecka D., Rothman R. B., Radesca L., de Costa B. R., Dersch C. M., Partilla J. S., Pert A., Glowa J. R., Wojnicki F. H., Rice K. C. (1996) Development of novel, potent, and selective dopamine reuptake inhibitors through alteration of the piperazine ring of 1-[2-(diphenylmethoxy)ethyl]- and 1-[2-[bis(4-fluorophenyl)methoxy]ethyl]-4-(3-phenylpropyl)piperazines (GBR 12935 and GBR 12909). *J. Med. Chem.*, 39, 4704 - 16.
- [69] Rothman R. B., Baumann M. H., Dersch C. M., Romero D. V., Rice K. C., Carroll F. I., Partilla J. S. (2001) Amphetamine-type central nervous stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*, 39, 32 - 41.
- [70] Rothman R. B., Partilla J. S., Baumann M. H., Dersch C. M., Carroll F. I., Rice K. C. (2000) Neurochemical neutralization of methamphetamine with high-affinity nonselective inhibitors of biogenic amine transporters: a pharmacological strategy for treating stimulant abuse. *Synapse*, 35, 222 - 7.
- [71] Riddle E. L., Fleckenstein A. E., Hanson G. R. (2005) Role of monoamine transporters in mediating psychostimulant effects. *AAPS J.*, 7, E847 - E851.
- [72] Fleckenstein A. E., Hanson G. R. (2003) Impact of psychostimulants on vesicular monoamine transporter function. *Eur. J. Pharmacol.*, 479, 283 - 9.
- [73] Sulzer D., Sonders M. S., Poulsen N. W., Galli A. (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog. Neurobiol.*, 75, 406 - 33.
- [74] Floor E., Meng L. (1996) Amphetamine releases dopamine from synaptic vesicles by dual mechanisms. *Neurosci. Lett.*, 215, 53 - 6.
- [75] Sulzer D., Chen T. K., Lau Y. Y., Kristensen H., Rayport S., Ewing A. (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J. Neurosci.*, 15, 4102 - 8.
- [76] Khoshbouei H., Wang H., Lechleiter J. D., Javitch J. A., Galli A. (2003) Amphetamine-induced dopamine efflux. A voltage-sensitive and intracellular Na<sup>+</sup>-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 278, 12070 - 7.
- [77] Kahlig K. M., Javitch J., Galli A. (2004) Amphetamine regulation of dopamine transport. Combined measurements of transporter currents and transporter imaging support the endocytosis of an active carrier. *J. Biol. Chem.*, 279, 8966 - 75.
- [78] Little K. Y., Elmer L. W., Zhong H., Scheys J. O., Zhang L. (2002) Cocaine induction of dopamine transporter trafficking to the plasma membrane. *Mol. Pharmacol.*, 61, 436 - 45.
- [79] Furman C. A., Chen R., Guptaroy B., Zhang M., Holz R. W., Gnegy M. (2009) Dopamine and amphetamine rapidly increase dopamine transporter trafficking to the surface: live-cell imaging using total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Neurosci.*, 29, 3328 - 36.
- [80] Cervinski M. A., Foster J. D., Vaughan R. A. (2005) Psychoactive substrates stimulate dopamine transporter phosphorylation and down-regulation by cocaine-sensitive and protein kinase C dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 280, 40442 - 9.
- [81] Chang M. Y., Lee S. H., Kim J. H., Lee K. H., Kim Y. S., Son H., Lee Y. S. (2001) Protein kinase C-mediated functional regulation of dopamine transporter is not achieved by direct phosphorylation of the dopamine transporter protein. *J. Neurochem.*, 77, 754 - 61.

- [82] Zapata A., Kivell B., Han Y., Javitch J. A., Bolan E. A., Kuraguntla D., Jaligam V., Oz M., Jayanthi L. D., Samuvel D. J., Ramamoorthy S., Shippenberg T. S. (2007) Regulation of dopamine transporter function and cell surface expression by D3 dopamine receptors. *J. Biol. Chem.*, 282, 35842 - 54.
- [83] Giambalvo C. T. (2004) Mechanisms underlying the effects of amphetamine on particulate PKC activity. *Synapse*, 51, 128 - 39.
- [84] Gorentla B. K., Vaughan R.A. (2005) Differential effects of dopamine and psychoactive drugs on dopamine transporter phosphorylation and regulation. *Neuropharmacology*, 49, 759 - 68.
- [85] Parsons L. H., Schad C. A., Justice J. B. Jr. (1993) Co-administration of the D2 antagonist pimozide inhibits up-regulation of dopamine release and uptake induced by repeated cocaine. *J. Neurochem.*, 60, 376 - 9.
- [86] Bolan E. A., Kivell B., Jaligam V., Oz M., Jayanthi L. D., Han Y., Sen N., Urizar E., Gomes I., Devi L. A., Ramamoorthy S., Javitch J. A., Zapata A., Shippenberg T. S. (2007) D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and 2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism. *Mol. Pharmacol.*, 71, 1222 - 32.
- [87] Zahniser N. R., Doolen S. (2001) Chronic and acute regulation of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> -dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacol. Ther.*, 92, 21 - 55.
- [88] Bauucum A. J. 2., Rau K. S., Riddle E. L., Hanson G. R., Fleckenstein A. E. (2004) Methamphetamine increases dopamine transporter higher molecular weight complex formation via a dopamine- and hyperthermia-associated mechanism. *J. Neurosci.*, 24, 3436 - 43.
- [89] Fleckenstein A. E., Voltz T. J., Hanson G. R. (2009) Psychostimulant-induced alterations in vesicular monoamine transporter-2 function: neurotoxic and therapeutic implications. *Neuropharmacology*, 56, 133 - 8.
- [90] Pothos E. N., Przedborski S., Davila V., Schmitz Y., Sulzer D. (1998) D2-like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. *J. Neurosci.*, 18, 5575 - 85.
- [91] Nader M. A., Daunais J. B., Moore T., Nader S. H., Moore R. J., Smith H. R., Friedman D. P., Porrino L. J. (2002) Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys. Initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology*, 27, 35 - 46.
- [92] Nader M. A., Morgan D., Gage H. D., Nader S. H., Calhoun T. L., Buchheimer N., Ehrenkauf R., Mach R. H. (2006) PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. *Nat. Neurosci.*, 9, 1050 - 6.
- [93] Yin H. H., Knowlton B. J., Balleine B. W. (2004) Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 181 - 9.
- [94] Chamtikov S., Der-Ghazarian T., Herbert M. S., Horn L. R., Widarma C. B., Gutierrez A., Varela F. A., McDougall S. A. (2011) Importance of D1 and D2 receptors in the dorsal caudate-putamen for the locomotor activity and stereotyped behaviors of preweanling rats. *Neuroscience*, 183, 121 - 33.
- [95] Dickson P. R., Lang C. G., Hinton S. C., Kelley A. E. (1994) Oral stereotypy induced by amphetamine microinjection into striatum: an anatomical mapping study. *Neuroscience*, 61, 81 - 91.
- [96] Waszczak B.L., Martin L.P., Finlay H.E., Zahr N., Stellar J.R. (2002) Effects of individual and concurrent stimulation of striatal D1 and D2 dopamine receptors on electrophysiological and behavioral output from the rat basal ganglia. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 300, 850 - 61.
- [97] Bedingfield J. B., King D. A., Holloway F. A. (1998) Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity and additivity. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 61, 291 - 6.
- [98] Sesack S. R., Grace A. A. (2010) Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35, 27 - 47.
- [99] O'Donnell P., Grace A. A. (1995) Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J. Neurosci.*, 15, 3622-3639.
- [100] Goto Y., Grace A. A. (2005) Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nat. Neurosci.*, 8, 805 - 12.
- [101] O'Donnell P., Grace A. A. (1993) Physiological and morphological properties of accumbens core and shell neurons recorded in vitro. *Synapse*, 13, 135 - 60.
- [102] Goto Y., Grace A. A. (2005) Dopamine-dependent interactions between limbic and prefrontal cortical plasticity in the nucleus accumbens: disruption by cocaine sensitization. *Neuron*, 47, 255 - 66.



- [103] Goto Y., O'Donnell P. (2002) Timing-dependent limbic-motor synaptic integration in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 13189 - 93.
- [104] Schultz W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol.*, 80, 1 - 27.
- [105] Schultz W., Dickinson A. (2000) Neuronal coding of prediction errors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 23, 473 - 500.
- [106] Hasin D., Hatzenbuehler M. L., Keyes K., Ogburn E. (2006) Substance use disorders: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition (DSM-IV) and International Classification of Diseases, tenth edition (ICD-10). *Addiction*, 101, 59 - 75.
- [107] Berridge K. C., Robinson T. E. (2003) Prasing reward. *Trends Neurosci.*, 26, 507 - 13.
- [108] Foltin R. W., Fischman M. W. (1992) Self-administration of cocaine by humans: choice between smoked and intravenous cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261, 841 - 9.
- [109] Steiner J. E., Glaser D., Hawilo M. E., Berridge K. C. (2001) Comparative expression of hedonic impact: affective reactions ot taste by human infants and other primates. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25, 53 - 74.
- [110] Peciña S., Berridge K. C. (2000) Opioid eating site in accumbens shell mediates food intake and hedonic 'liking': map based on microinjection Fos plumes. *Brain Res.*, 863, 71 - 86.
- [111] Berridge K. C., Robinson T. E. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res. Rev.*, 28, 309 - 69.
- [112] Zhang J., Berridge K. C., Tindell A. J., Smith K. S., Aldridge J. W. (2009) A Neural Computational Model of Incentive Saliency. *PLoS Comput. Biol.*, 5.
- [113] Berridge K. C. (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, 191, 391 - 431.
- [114] Haber S. N., Knutson B. (2010) The Reward Circuit: Linking Primate Anatomy and Human Imaging. *Neuropsychopharmacology*, 35, 4 - 26.
- [115] Ikemoto S. (2010) Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35, 129 - 50.
- [116] West A. R., Grace A. A. (2002) Opposite Influences of Endogenous Dopamine D1 and D2 Receptor Activation on Activity States and Electrophysiological Properties of Striatal Neurons: Studies Combining In Vivo Intracellular Recordings and Reverse Microdialysis. *J. Neurosci.*, 22, 294 - 304.
- [117] Kelley A. E., Berridge K. C. (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J. Neurosci.*, 22, 3306 - 11.
- [118] Koob G. F., Le Moal M. (2008) Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B. Biol. Sci.*, 363, 3113 - 23.
- [119] Stewart J., Wise R. A. (1992) Reinstatement of heroin self-administration habits: morphine prompts and naltrexone discourages renewed responding after extinction. *Psychopharmacology*, 108, 79-84.
- [120] Grimm J. W., Hope B. T., Wise R. A., Shaham Y. (2001) Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature*, 412, 141 - 2.
- [121] Hyman S. E., Malenka R. C., Nestler E. J. (2006) Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 565 - 98.
- [122] Nelson A., Killcross S. (2006) Amphetamine exposure enhances habit formation. *J. Neurosci.*, 26, 3805 - 12.
- [123] Everitt B. J., Belin D., Economidou D., Pelloux Y., Dalley J. W., Robbins T. W. (2008) Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B Biol Sci.*, 363, 3125 - 35.
- [124] Robinson T. E., Berridge K. C. (2008) The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B. Biol Sci.*, 363, 3137 - 46.
- [125] Boileau I., Dagher A., Leyton M., Gunn R. N., Baker G. B., Diksic M., Benkelfat C. (2006) An [<sup>11</sup>C]Raclopride/Positron Emission Tomography Study in Healthy Men. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63, 1386 - 95.
- [126] Wyvell C. L., Berridge K. C. (2001) Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue-triggered "wanting" for sucrose reward. *J. Neurosci.*, 21, 7831 - 40.
- [127] Evans A. H., Pavese N., Lawrence A. D., Tai Y. F., Appel S., Doder M., Brooks D. J., Lees A. J., Piccini P. (2006) Compulsive Drug Use Linked to Sensitized Ventral Striatal Dopamine Transmission. *Ann. Neurol.*, 59, 582 - 58.

- [128] Beveridge T. J., Gill K. E., Hanlon C. A., Porrino L. J. (2008) Parallel studies of cocaine-related neural and cognitive impairment in humans and monkeys. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B. Biol. Sci.*, 363, 3257 - 66.
- [129] Volkow N. D., Wang G.-J., Fowler J. S., Telang F. (2008) Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B. Biol. Sci.*, 363, 3191 - 200.
- [130] Robinson S., Sandstrom S. M., Denenberg V. H., Palmiter R. D. (2005) Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. *Behav. Neurosci.*, 199, 336 - 41.
- [131] Montague P. R., Hyman S. E., Cohen J. D. (2004) Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature*, 431, 760 - 67.
- [132] Schultz W., Apicella P., Ljungberg T. (1993) Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J. Neurosci.*, 13, 900 - 13.
- [133] Knutson B., Bjork J. M., Fong G. W., Hommer D., Mattay V. S., Weinberger D. R. (2004) Amphetamine modulates human incentive processing. *Neuron*, 43, 261 - 9.
- [134] Nestler E. J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 119 - 28.
- [135] McClung C. A., Nestler E. J. (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat. Neurosci.*, 6, 1208 - 15.
- [136] Johannessen M., Delghandi M. P., Moens U. (2004) What turns CREB on? *Cell Signal.*, 16, 1211 - 27.
- [137] McClung C. A., Nestler E. J. (2008) Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology*, 33, 3 - 17.
- [138] Barrot M., Olivier J. D., Perrotti L. I., DiLeone R. J., Berton O., Eisch A. J., Impey S., Storm D. R., Neve R. L., Yin J. C., Zachariou V., Nestler E. J. (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 11435 - 40.
- [139] Cole R. L., Konradi C., Douglass J., Hyman S. E. (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron*, 14, 813 - 23.
- [140] Dong Y., Green T., Saal D., Marie H., Neve R., Nestler E. J., Malenka R. C. (2006) CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nat. Neurosci.*, 9, 475 - 7.
- [141] Perrotti L. I., Weaver R. R., Robison B., Renthal W., Maze I., Yazdani S., Elmore R. G., Knapp D. J., Selley D. E., Martin B. R., Sim-Selley L., Bachtell R. K., Self D. W., Nestler E. J. (2008) Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse*, 62, 358 - 69.
- [142] Nestler E. J. (2008) Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B. Biol. Sci.*, 363, 3245 - 55.
- [143] Wallace D., Vialou V., Rios L., Carle-Florence T. L., Chakravarty S., Kumar A., Craham D. L., Green T. A., Kirk A., Iñiguez S. D., Perrotti L. I., Barrot M., DiLeone R. J., Nestler E. J., Bolaños-Guzmán C. A. (2008) The influence of DeltaFosB in the nucleus accumbens on natural reward-related behavior. *J. Neurosci.*, 28, 10272 - 7.
- [144] Vialou V., Robison A. J., Laplant Q. C., Covington H. E. 3., Dietz D. M., Ohnishi Y. N., Mouzon E., Rush A. J. 3., Watts E. L., Wallace D. L., Iñiguez S. D., Ohnishi Y. H., Steiner M. A., Warren B. L., Krishnan V., Bolaños C. A., Neve R. L., Ghose S., Berton O., Tammimga C. A., Nestler E. J. (2010) DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant response. *Nat. Neurosci.*, 13, 745 - 52.
- [145] Maze I., Nestler E. J. (2011) The epigenetic landscape of addiction. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1216, 99 - 113.

#### INTERNETOVÉ ZDROJE

[i] [www.lekarske.slovníky.cz](http://www.lekarske.slovníky.cz) (4. 8. 2011)

[ii] [www.drogy-ingo.cz](http://www.drogy-ingo.cz) (4. 8. 2011)

[iii] [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) (4. 8. 2011)