

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

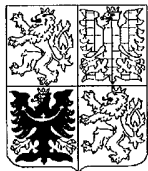
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2001 -394

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.08.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.08.1998 09.11.1998
11.12.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/129253 1998/189166
1998/209952**

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.08.2001**
(Věstník č. 8/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/17220**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/07583**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/195

A 61 P 25/30

(71) Přihlašovatel:

**BROOKHAVEN SCIENCE ASSOCIATES, Upton, NY
US;**

(72) Původce:

**Dewey Stephen L., Manorville, NY, US;
Brodie Jonathan D., Cos Cob, CT, US;
Ashby Charles R. Jr., Miller Place, NY, US;**

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob léčení drogové závislosti a s ní
spojeného chování**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje způsob změny chování spojeného se závislostí savce trpícího závislostí na návykových látkách. Způsob zahrnuje podávání savci účinného množství *gamma*-vinylGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo jejího enantiomeru či racemické směsi, přičemž účinné množství je postačující pro zmírnění, utlumení nebo odstranění chování spojeného s přemáhající touhou (bažením) po návykových látkách jejich užíváním.

Způsob léčení drogové závislosti a s ní spojeného chování

Předkládaná přihláška je částečně pokračovací přihláška k patentové přihlášce Spojených Států č. 09/209 952, podané 11. prosince, 1998, k patentové přihlášce Spojených Států č. 09/189 166, podané 9. listopadu, 1998, a k patentové přihlášce Spojených Států č. 09/129 253, podané 5. srpna, 1998, všechny jsou zde zahrnuty formou odkazu.

Tento vynález byl učiněn za podpory vlády se smlouvou s U.S. Department of Energy Office of Biological and Environmental Research (USDOE/OBER DE-AC02-98CH10886), s National Institutes of Mental Health (NIMH MH49165 a NIMH R2955155) a National Institute on Drug Abuse (Y1-DA7047-01). Vláda má tudíž na vynález určitá práva.

Oblast techniky

Tento vynález se týká použití ireverzibilního inhibitoru GABA-transaminázy pro léčbu závislosti na návykových látkách a pro modifikaci chování s touto závislostí spojeného. Závislost na návykových látkách, jako například abususe drog, a výsledné chování s ní spojené představují nesmírné sociální a ekonomické problémy, jejichž nárůst pokračuje se zničujícími důsledky.

Dosavadní stav techniky

Závislost na návykových látkách může nastat při užívání legálních a ilegálních látek. Nikotin, kokain, amfetamin, metamfetamin, etanol, heroin, morfin a další návykové látky

jsou snadno dostupné a jsou běžně užívány velkou částí populace Spojených Států.

Mnoho návykových látek se vyskytuje přirozeně. Například kokain je přirozeně se vyskytující neamfetaminové stimulant pocházející z listů rostliny koka, *Erythroxylon coca*. Listy koky obsahují pouze přibližně polovinu procenta čistého kokainového alkaloidu. Když jsou žvýkány, uvolňuje se pouze malé množství kokainu a absorpce gastrointestinálním traktem je pomalá. Rozhodně to vysvětluje, proč žvýkání listů koky v Latinské Americe prakticky nikdy nebylo veřejným zdravotním problémem. Situace se výrazně mění při abusu alkaloidu samotného.

Bylo zjištěno, že návykové látky, jako například nikotin, kokain, amfetamin, metamfetamin, etanol, heroin a morfin zvyšují (v některých případech přímo, v jiných případech nepřímo nebo dokonce trans-synapticky) dopamin (DA) v mezotelencefalickém okruhu odměna/zesílení v předním mozku, pravděpodobně produkující zvýšený pocit „odměny“ v mozku, který vyvolává stavy „výšky“ u uživatele návykových látek. Změny funkce těchto DA systémů byly také zapojeny do silné přemáhající touhy (bažení) brát tyto návykové látky a do relapsu braní návykových látek u uzdravujících se závislých uživatelů. Například kokain působí na tyto DA systémy vazbou na přenašeč dopaminu (DAT) a zabraňuje zpětnému vstřebávání DA do presynaptického zakončení.

Existují významné důkazy, že náchylnost k návyku na nikotin, kokain, amfetamin, metamfetamin, etanol, heroin, morfin a další návykové látky je spojena s bloádou zpětného vstřebávání v metabolických drahách odměna/zesílení centrálního nervového systému (CNS). Například kokainem vyvolané zvýšení extracelulárního DA je spojováno s jeho působením na odměňování a bažení u hlodavců. U lidí farmakokinetický vazebný profil ^{11}C -kokainu ukazuje, že

vstřebávání značeného kokainu přímo koreluje s udávanými „výškami“. Kromě toho lidé závislí na kokainu, kteří byli vystaveni prostředí s podněty spojovanými s kokainem, pociťovali zvýšené bažení po kokainu, proti kterému působil antagonist DA receptoru haloperidol. Na základě předpokládané vazby mezi náchylností k návyku na kokain a DA okruhem odměna/zesílení v předním mozku bylo navrženo mnoho farmakologických strategií pro léčbu závislosti na kokainu.

V minulosti byla jedna léčebná strategie zaměřena přímo na DAT prostřednictvím kokainového analogu s vysokou afinitou, a tím se blokovala vazba kokainu. Další léčebná strategie byla modulovat synaptický DA přímo pomocí agonisty nebo antagonisty DA. Ještě další léčebná strategie byla zaměřena na modulaci synaptického DA, nepřímo nebo trans-synapticky specifickým cílením funkčně spojeného, ale biochemicky odlišného neurotransmitterového systému.

Pro použití při odvykání uživatelů kokainu od jejich závislosti byla navržena celá řada léků. Při hypotéze „dopaminové deplece“ byly preferovány určité terapeutické přípravky. Je dobře zjištěno, že kokain blokuje zpětné vstřebávání dopaminu, čímž prudce zvyšuje synaptickou koncentraci dopaminu. Ale v přítomnosti kokainu je synaptický dopamin metabolizován jako 3-metoxytyramin a je vyloučen. Synaptická ztráta dopaminu klade požadavky na organismus pro zvýšení syntézy dopaminu, jak doloženo zvýšením aktivity tyrozinhydroxylázy po podání kokainu. Když jsou vyčerpány zásoby prekursoru, vyvíjí se deficit dopaminu. Tato hypotéza vedla k testování bromokriptinu, agonisty dopaminového receptoru. Další přístup také založený na hypotéze dopaminové deplece poskytoval prekurzory dopaminu, jako je například L-dopa.

Agonisté nejsou výhodné terapeutické přípravky. Podávaný agonista může působit na několik receptorů nebo na podobné

receptory na různých buňkách, nemusí působit právě na jeden konkrétní receptor nebo buňku, kterou je žádoucí stimulovat. Jak se vyvíjí tolerance na drogu (prostřednictvím změn v počtu receptorů a jejich afinitě k droze), může se také vyvinout tolerance na agonistu. Konkrétní problém například s agonistou bromokriptinem je ten, že sám o sobě může vyvolat lékovou závislost. Tudíž léčebné strategie používané v minulosti nezbavily pacienta bažení po kokainu. Kromě toho při používání určitých agonistů jako je například bromokriptin, bylo pravděpodobné, že pacient jedno bažení nahradil druhým.

Další návyková látka, která je často zneužívaná, je nikotin. Alkaloid (-)-nikotin se vyskytuje v cigaretách a dalších tabákových produktech, které se kouří nebo žvýkají. Bylo zjištěno, že nikotin se podílí na různých nemocích, včetně rakoviny, srdečních onemocnění, dýchacích nemocí a dalších stavů, u kterých je užívání tabáku rizikový faktor, obzvláště u srdečních chorob.

Probíhaly intenzivní kampaně proti užívání tabáku nebo nikotinu a nyní je obecně známo, že ukončení užívání tabáku sebou nese četné nepříjemné příznaky z odnětí (abstinenční příznaky), které zahrnují podrážděnost, úzkost, nervozitu, ztrátu koncentrace, závratě, nespavost, třes, větší hlad a přírůstek hmotnosti a samozřejmě intenzivní bažení po tabáku.

Náchylnost k návyku na nikotin byla spojována s působením okruhu odměna/zesílení a jeho účinkem na DA neurony v odměňovacích drahách mozku (Nisell et al., 1995, Pontieri et al., 1996). Například akutní systémové podávání nikotinu, jakož i četných dalších návykových látek, vytváří zvýšení extracelulárních hladin DA v nucleus accumbens (NACC), důležité složce odměňovacího systému (Damsma et al., 1989, Di Chiara a Imperato, 1988, Imperato et al., 1986, Nisell et al., 1994a, 1995, Pontieri et al., 1996). Podobně infúze nikotinu

do ventrální tegmentální oblasti (VTA) hlodavců vyvolává významné zvýšení hladin DA v NACC (Nisell et al., 1994b).

Bylo publikováno, že několik farmaceutických přípravků bylo použitelných k léčbě závislosti na nikotinu, včetně nikotinové substituční terapie, jako jsou například nikotinové žvýkačky, transdermální nikotinové náplasti, nosní spreje, nikotinové inhalátory a bupropion, první beznikotinová léčba pro ukončení kouření (Henningfield, 1995, Hurt et al., 1997).

Bohužel nikotinová substituční terapie zahrnuje podávání nikotinu, což často vede k nikotinovým abstinenčním příznakům a následnému relapsu používání tabákových produktů. Trvá tudíž potřeba terapie mající žádoucí profil vedlejších účinků, která ulehčí nikotinové abstinenční příznaky, včetně dlouhotrvajícího bažení po nikotinu.

Další dobře známé návykové látky jsou narkotická analgetika, jako například morfin, heroin a další opioidy jak přirozené, tak umělé. Abusus opioidů vyvolává toleranci a závislost. Abstinenční příznaky při odnětí opioidů široce kolísají co do intenzity v závislosti na četných faktorech včetně dávky používaného opioidu, stupně, do jakého se kontinuálně projevují účinky opioidu na CNS, délka chronického užívání a rychlost, kterou je opioid odstraňován z receptorů. Tyto abstinenční příznaky zahrnují bažení, úzkost, dysforii, zívání, pocení, slzení, rinoreu, neklidný a přerušovaný spánek, podrážděnost, dilatované pupily, bolesti kostí, svalů a zad, piloerekcii, návaly horka a zimy, nauzeu, zvracení, průjem, ztrátu hmotnosti, horečku, zvýšený krevní tlak, zrychlený puls a dechovou frekvenci, křeče svalstva a mimovolné pohyby dolních končetin.

Lékařské komplikace asociované s injekcí opioidů zahrnují celou řadu patologických změn v CNS včetně degenerativních změn v globus pallidum, nekrózy spinální šedé hmoty, transverzální myelitidu, amblyopii, plexitidu, periferní

neuropatii, Parkinsonův syndrom, zhoršení intelektu, změny osobnosti, a patologické změny svalů a periferních nervů. Infekce kůže a systémových orgánů jsou také zcela běžné, včetně stafylokokové pneumonitidy, tuberkulózy, endokarditidy, septikémie, virové hepatitidy, lidského viru imunodeficitu (HIV), malárie, tetanu a osteomyelitidy. Předpokládaná délka života osob závislých na opioidech je výrazně snížena, a to díky předávkování, infekcím, které jsou s návykovou látkou asociovány, sebevraždám a vraždám.

Farmaceutické přípravky používané v léčbě závislosti na opioidech zahrnují metadon, což je opioid, a antagonisty opioidů, primárně naloxon a naltrexon. Bylo prokázáno, že klonidin potlačuje některé příznaky odnětí opioidů, ale má jako vedlejší příznaky hypotenzi a sedaci, které mohou být poměrně výrazné. Ve spojení s farmaceutickými přípravky se jako doplňková léčba často používá psychologické léčení modifikující chování a trénink. Pro úlevu od závislosti na opioidech a od abstinenčních příznaků je zapotřebí léčby, která má vhodnější profil vedlejších příznaků.

Etanol je pravděpodobně nejčastěji používaná a zneužívaná látka s tlumivým účinkem ve většině kultur a hlavní příčina nemocnosti a úmrtnosti. Opakovaný přívod velkých množství etanolu může postihnout téměř každý tělesný orgánový systém, obzvláště gastrointestinální trakt, kardiovaskulární systém a centrální a periferní nervové systémy. Gastrointestinální účinky zahrnují gastritidu, žaludeční vředy, duodenální vředy, cirhózu jater a pankreatitidu. Navíc je zvýšený výskyt rakoviny jícnu, žaludku a dalších částí gastrointestinálního traktu. Kardiovaskulární účinky zahrnují hypertenzi, kardiomyopatii a další myopatie, významně zvýšené hladiny triglyceridů a cholesterolu lipoproteinů o nízké denzitě. Tyto kardiovaskulární účinky přispívají k výrazně zvýšenému riziku srdečního onemocnění. Může se vyskytovat periferní neuropatie,

jak dokládá svalová slabost, parestézie a snížené periferní cití. Účinky na centrální nervový systém zahrnují kognitivní deficit, vážné paměť zhoršující degenerativní změny v cerebellu a etanolem indukovanou přetrvávající amnestickou poruchu, kdy je vážně zhoršena schopnost pamatovat si nové věci. Obecně jsou tyto účinky vztahované k deficitům vitamínů, obzvláště vitamínů B.

Jedinci s návykem nebo závislostí na etanolu projevují příznaky a tělesné změny včetně dyspepsie, nauzey, plynatosti, jícnových varixů, hemoroidů, třesu, vratké chůze, nespavosti, erektilní dysfunkce, snížené velikosti varlat, feminizace spojené se sníženými hladinami testosteronu, spontánních abortů a fetálního alkoholového syndrom. Symptomy spojené s odnětím etanolu nebo abstinenčními příznaky zahrnují nauzeu, zvracení, gastritidu, hematemesis, sucho v ústech, opuchlou skvrnitou pleť, a periferní otoky.

Obecně přijímaná léčba závislosti na etanolu a léčba abstinenčních příznaků je prováděna podáváním mírných trankvilizérů, jako je například chlórdiazepoxid. Typicky jsou také podávány vitamíny, zejména vitamíny B. Volitelně se také podávají sulfát hořečnatý a/nebo glukóza. Nauzea, zvracení a průjem jsou léčeny symptomaticky dle úsudku ošetřujícího lékaře. Pro napomáhání při dodržování abstinence se může také podávat disulfiram. Jestliže se při podávání disulfiramu konzumuje etanol, akumuluje se acetaldehyd, který vyvolává nauzeu a hypotenzi. Pro úlevu od závislosti na etanolu a zmírnění abstinenčních příznaků je zapotřebí léčba, která má vhodnější profil vedlejších příznaků.

V nedávné době bylo publikováno, že se znepokojivou rychlostí zvyšuje abusů více návykových látek nebo jejich kombinace. Například kokain a heroin jsou často užívány dohromady v kombinaci návykových látek známé jako „speedball“.

Má se za to, že tento pozorovaný nárůst je výsledkem synergického působení, které zvyšuje euforii uživatele.

V souladu s tím v léčbě závislosti na návykových látkách stále trvá potřeba zajistit nové metody, které mohou zmírnit pacientovo bažení změnou farmakologického účinku návykových látek na centrální nervový systém. Existuje také potřeba zajištění nových metod pro léčbu abusu kombinace návykových látek.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález, který se týká potřeb stavu techniky, poskytuje způsoby pro léčbu závislosti na návykových látkách a změny chování spojeného s touto závislostí u savce, například primáta, trpícího závislostí na návykových látkách, a to prostřednictvím podávání účinného množství farmaceutického přípravku nebo léčiva obsahujícího gamavinyLGABA (GVG) savci. Množství GVG kolísá od přibližně 15 mg/kg do přibližně 2 g/kg, výhodně od přibližně 100 mg/kg do přibližně 600 mg/kg a nejvýhodněji od přibližně 150 mg/kg do přibližně 300 mg/kg.

Ve výhodném provedení předkládaný vynález poskytuje způsob eliminace následků závislosti na nikotinu léčbou savce účinným množstvím přípravku nebo léčiva obsahujícího GVG. Při léčbě následků závislosti na nikotinu je množství GVG přítomného ve farmaceutickém přípravku nebo léčivu od přibližně 15 mg/kg do přibližně 2 g/kg. Výhodně je 75 mg/kg až přibližně 150 mg/kg a nejvýhodněji od přibližně 18 mg/kg do přibližně 20 mg/kg.

V ještě dalším provedení poskytuje předkládaný vynález způsob, jak změnit chování spojené se závislostí savce, který trpí závislostí na návykových látkách, což zahrnuje podávání savci účinného množství GVG nebo její farmaceuticky přijatelné soli, přičemž účinné množství zmírňuje odměňující/stimulující

účinky návykových látek vybraných ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů, nikotinu a jejich kombinací bez výskytu změn odměňujících/stimulujících účinků potravy u uvedeného savce.

Množství GVG kolísá od přibližně 15 mg/kg do přibližně 2 g/kg, výhodně od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg a nejvýhodněji od přibližně 150 mg/kg do přibližně 300 mg/kg.

Jako výsledek předkládaného vynálezu jsou poskytnuty způsoby snižující závislost na návykových látkách a měnící chování s ní spojené, které jsou založeny na farmaceutickém přípravku nebo léčivu, které samo o sobě není návykové, ale je vysoce účinné při zmírňování závislosti a návykového chování závislých pacientů. Farmaceutický přípravek nebo léčivo použitelné pro způsob podle předkládaného vynálezu inhibuje nebo eliminuje bažení, které zakouší závislí uživatelé při užívání návykových látek. Kromě toho eliminace chování spojeného s návykovými látkami nastává bez averzivní nebo apetitivní reakce na GVG. Kromě toho charakteristické chování spojené se závislostí na návykových látkách je redukováno nebo eliminováno bez výskytu změn v pohybové funkci primáta.

V ještě dalším provedení vynález zahrnuje způsob změny chování spojeného se závislostí u savce, který trpí závislostí na návykových látkách, což zahrnuje podávání účinného množství GVG nebo její farmaceuticky přijatelné soli, nebo jejího enantiomeru či racemické směsi savci, přičemž účinné množství je postačující ke zmenšení, inhibici nebo eliminaci chování spojeného s bažením nebo užíváním návykových látek.

V dalším příkladném provedení předkládaného vynálezu způsob zahrnuje změnu chování spojeného se závislostí u savce, který trpí závislostí na návykových látkách, což zahrnuje podávání savci účinného množství přípravku nebo léčiva, které zvyšuje hladiny GABA v centrálním nervovém systému, přičemž účinné množství je postačující ke zmenšení, inhibici nebo

eliminaci chování spojeného s bažením nebo užíváním návykových látek.

V ještě dalším příkladném provedení předkládaný vynález poskytuje způsob změny chování spojeného se závislostí u savce, který trpí závislostí na kombinaci návykových látek, což zahrnuje podávání účinného množství GVG nebo její farmaceuticky přijatelné soli, nebo jejího enantiomeru či racemické směsi savci, přičemž účinné množství je postačující ke zmenšení, inhibici nebo eliminaci chování spojeného s bažením nebo užíváním kombinace návykových látek.

V dalším provedení předkládaný vynález poskytuje způsob léčby savce, který trpí závislostí na návykových látkách, což zahrnuje podávání účinného množství GVG nebo její farmaceuticky přijatelné soli, nebo jejího enantiomeru či racemické směsi savci.

V ještě dalším provedení předkládaný vynález poskytuje způsob prevence závislosti na návykových látkách, což zahrnuje podávání účinného množství GVG nebo její farmaceuticky přijatelné soli, nebo jejího enantiomeru či racemické směsi savci.

Další zlepšení, která předkládaný vynález poskytuje oproti stavu techniky, budou označena jako výsledek následujícího popisu, který vykládá výhodná provedení předkládaného vynálezu. Popis není žádným způsobem zamýšlen jako omezení rozsahu předkládaného vynálezu, ale spíše pouze jako poskytnutí pracovního příkladu provedení předkládaného vynálezu. Rozsah předkládaného vynálezu je určen připojenými patentovými nároky.

Popis obrázků

Obrázek 1 je graf ukazující procentové změny distribučního objemu (DV) pro tři skupiny zvířat léčených kokainem.

Obrázek 2 je fotografie transaxiálních parametrických snímků poměru DV mozku primáta (ne člověka) na úrovni corpus striatum.

Obrázek 3A a 3B jsou grafy ilustrující účinky GVG na pohybové funkce ve srovnání s kontrolami s fyziologickým roztokem.

Obrázek 4 je graf ukazující účinky GVG na extracelulární dopamin vyvolaný nikotinem.

Obrázek 5A a 5B jsou grafy ilustrující účinky nikotinu a GVG na hladiny extracelulárního dopaminu v nucleus accumbens u volně se pohybujících laboratorních potkanů.

Obrázek 6 je graf ukazující účinky metamfetaminu na hladiny extracelulárního dopaminu v nucleus accumbens volně se pohybujících laboratorních potkanů.

Obrázek 7 je graf ukazující účinky GVG na změny hladin extracelulárního dopaminu v nucleus accumbens vyvolané metamfetaminem u volně se pohybujících laboratorních potkanů.

Obrázek 8 je graf ukazující účinky GVG na změny hladin extracelulárního dopaminu v nucleus accumbens vyvolané alkoholem u volně se pohybujících laboratorních potkanů.

Obrázek 9 je graf ukazující účinky GVG na hladiny extracelulárního dopaminu v nucleus accumbens vyvolané kokainem, heroinem a kombinací kokainu a heroinu u volně se pohybujících laboratorních potkanů.

Předkládaný vynález poskytuje vysoce účinný způsob léčení závislosti na návykových látkách a způsob změny chování spojeného se závislostí savců, například primátů, trpících závislostí na návykových látkách.

Ve smyslu jak se v tomto popisu používá, chování spojené se závislostí na návykových látkách znamená chování plynoucí z nutkavého užívání psychoaktivních látek a je charakterizováno zjevnou naprostou závislostí na droze. Příznačné pro toto chování je I) nepřekonatelná angažovanost v užívání návykové látky, II) zajišťování zásob návykové látky a III) vysoká pravděpodobnost relapsu po odnětí návykové látky.

Například uživatelé kokainu prožívají tři stadia působení návykové látky. První stadium, akutní intoxikace („mejdán“), je euforické, nápadné sníženou úzkostí, zvýšenou sebedůvěrou a sexuální touhou, a může být pokaženo sexuální nerozvážností, nezodpovědnými výdaji a nehodami, které lze přisoudit bezohlednému chování. Druhé stadium („krach“) nahradí euforii úzkostí, únavou, podrážděností a depresí. V tomto období někteří uživatelé spáchali sebevraždu. Nakonec třetí stadium „anhedonie“ je období omezené schopnosti čerpat potěšení z normálních aktivit a období bažení po euforických účincích kokainu, které vede k užívání této návykové látky. (Viz Gawin a Kleber, Medical Management of Cocaine Withdrawal, 6-8, APT Foundation). Co se týká uživatelů kokainu, chování spojené se závislostí zahrnuje chování ve všech třech stadiích působení návykové látky.

Návykové látky

Návykové látky zahrnují, ale bez omezení, psychostimulační látky, narkotická analgetika, alkoholy a návykové alkaloidy, jako je například nikotin, nebo jejich kombinace. Některé příklady psychostimulačních látek zahrnují, ale bez omezení,

amfetamin, dextroamfetamin, metamfetamin, fenmetrazin, dietylpropion, metylfenidát, kokain a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Specifické příklady narkotických analgetik zahrnují alfentanyl, alfaprodin, anileridin, bezitramid, kodein, dihydrokodein, difenoxylát, etylmorfin, fentanyl, heroin, hydrokodon, hydromorfon, isometadon, levometorfan, levorfanol, metazocin, metadon, metopon, morfin, extrakty opia, tekuté extrakty opia, práškové opium, granulované opium, surové opium, opiovou tinkturu, oxykodon, oxymorfon, petidin, fenazocin, piminodin, racemotorfan, racemorfan, tebain a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Návykové látky také zahrnují látky s tlumivým účinkem působící na CNS, jako například barbituráty, chlórdiazepoxid, a alkoholy jako například etanol, metanol a isopropylalkohol.

Způsob podle předkládaného vynálezu může být použit k léčbě savců závislých na kombinaci návykových látek. Například savec může být závislý na etanolu a kokainu, v tomto případě je předkládaný vynález obzvláště vhodný pro změnu chování spojeného se závislostí savce prostřednictvím podávání účinného množství GVG.

Jak se zde používá, kombinace návykových látek zahrnuje kombinaci psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů a návykových alkaloidů, jak jsou uvedeny výše. Například kombinace návykových látek zahrnuje kokain, nikotin, metamfetamin, etanol, morfin a heroin. Velice návyková kombinace je kokain a heroin.

Při použití kombinace návykových látek je pozorována synergie. Například, když jsou heroin, nepřímě uvolňující dopamin, a kokain, inhibitor zpětného vstřebávání dopaminu, podávány hlodavcům, pozoruje se synergické zvýšení hladin dopaminu v cerebrálním NACC. Synergie může být prokázána například větším zvýšením hladin dopaminu v mozku než by bylo

očekáváno u každé látky samotné. Výhodně je synergie prokázána zvýšením hladin dopaminu o přibližně 500 % až o přibližně 1000 % v cerebrálním NACC u kombinace kokainu a heroinu ve srovnání s podáváním každé návykové látky samostatně.

Nutkové užívání návykové látky zahrnuje tři nezávislé složky: toleranci, psychickou závislost a fyzickou závislost. Tolerance vytváří potřebu zvyšovat dávku látky po několika aplikacích, aby se dosáhlo stejně velikého účinku. Fyzická závislost je adaptivní stav vytvořený opakovaným podáváním drogy a manifestuje se intenzivními somatickými poruchami, když je zastaveno podávání drogy. Psychická závislost je stav charakterizovaný intenzivním úsilím, bažením nebo užíváním drogy, jejíž účinky uživatel cítí jako nezbytné pro pocit pohody. (Viz Feldman, R.S., a Quenzer, L.F., „Fundamentals of Neuropsychopharmacology“, 418-422, Sinaur Associates, Inc., 1984, zahrnuto zde plně formou odkazu). Na základě předchozích definic, termín „charakteristika závislosti“, jak se zde používá, zahrnuje všechny vlastnosti spojené s nutkovým užíváním drog, vlastnosti, které mohou být ovlivněny biochemickou osobností uživatele, fyzickými a psychickými vlastnostmi uživatele.

Jak je vysvětleno výše, nutkové užívání návykových látek nebo kombinace návykových látek vyvolává euforické stadium následované stadiem bažení po euforických účincích dané drogy, které vede k užití drogy nebo kombinace drog. Jak se zde používá odměňující/stimulující účinky návykových látek se týkají každého stimulu (v tomto případě drogy), který vyvolává anhedonii nebo zvyšuje pravděpodobnost naučené odpovědi. To je synonymum s pojmem zesílení. Co se týče pokusných zvířat, stimul je považován za odměňující při použití paradigm, o kterých se předpokládá, že měří odměnu. To může být uskutečněno měřením toho, zda podněty vyvolají přístupovou reakci, také nazývanou apetitivní reakce, nebo ústupovou

reakci, kdy se zvíře stimulům vyhýbá, také nazývanou averzivní reakce. Podmíněná preference prostředí (CPP) je paradigma, které měří přístupovou (apetitivní) nebo ústupovou (averzivní) reakci. Usuzuje se, že odměňující stimuly vyvolávají přístupové chování. Ve skutečnosti jednou definicí odměny je každý stimul, který vyvolává přístupové chování. Kromě toho důsledky odměny by mohly zesílit stimulující vlastnosti podnětů spojených s odměnou.

Odměna může být také měřena zjišťováním, zda dodání odměny je podmíněné konkrétní reakcí, a tím se zvyšuje pravděpodobnost, že se reakce znovu objeví v podobné situaci, tj. paradigma zesílení. Například laboratorní potkan, který zmáčkne páku určitým počtem stisknutí, aby dostal injekci kokainu, je příkladem zesílení. Ještě další způsob, jak měřit odměnu, je zjišťování, zda stimul (např. droga) prostřednictvím mnohonásobného párování s neutrálními podněty prostředí může způsobit, že dříve neutrální podněty prostředí vyvolají chování, které bylo dříve spojeno pouze s drogou - to je podmíněné zesílení. CPP je považována za formu podmíněného zesílení.

Stimulující motivační hodnota drogy (nebo jiného stimulu) může být stanovena s použitím podmíněné preference prostředí (CPP). Co se týče kokainu, nikotinu, heroinu, morfinu, metamfetaminu, etanolu nebo jiných návykových látek či jejich kombinací, zvířata jsou testována ve stavu abstinence, zda preferují prostředí, ve kterém předtím dostávala návykovou látku ve srovnání s prostředím, ve kterém předtím dostávala fyziologický roztok. V paradigmatu CPP je zvířatům podávána droga v jednom charakteristickém prostředí a v alternativním prostředí je podáváno příslušné vehikulum. Paradigma CPP je široce používáno k vyhodnocení stimulujících motivačních účinků drog u laboratorních zvířat (Van Der Kooy, 1995). Jestliže si zvíře po podmiňování nebo párování s drogou ve

stavu abstinence důsledně vybírá prostředí dříve asociované s návykovou látkou, je uzavíráno, že apetitivní hodnota návykové látky byla zakódována do mozku a je přístupná ve stavu bez drogy. CPP je vyjádřena delší dobou strávenou v přítomnosti stimulů asociovaných s drogou ve srovnání s kontrolními zvířaty, kterým byla podávána injekce vehikula. Může být také použita ke stanovení závislosti na kombinaci návykových látek.

Předpokládá se, že podmiňovací paradigmaty jako CPP, mohou být použita pro modelování bažení u laboratorních zvířat, protože bažení u člověka je často vyvoláváno senzoryckými stimuly předem asociovanými s užíváním návykové látky.

Jak se zde používá, termín bažení po návykové látce nebo kombinaci návykových látek je intenzivní touha po autoaplikaci drogy (drog) savcem dříve užívané. Savec nepotřebuje návykovou látku pro prevenci abstinčních příznaků.

Náchylnost na návyk na návykové látky, jako je například kokain, nikotin, metamfetamin, morfin, heroin, etanol nebo jiné návykové látky, byl spojován s jejich farmakologickým působením na mezotelencefalické dopaminové (DA) dráhy odměna/zesílení v centrálním nervovém systému (CNS). Dopaminergní transmise v těchto drahách je modulována kyselinou gama-aminomáselnou (GABA).

Například kokain, nikotin, metamfetamin, morfin, heroin a etanol inhibují presynaptické zpětné vstřebávání monoaminů. Zdá se, že dopaminergní neurony mezokortikolimbického DA systému, jejichž somata leží ve ventrální tegmentální oblasti (VTA) a projikují primárně do nucleus accumbens (NACC), jsou zapojeny do zesílení kokainu, nikotinu, metamfetaminu, morfinu, heroinu nebo etanolu. Elektrická stimulace center odměny ve VTA zvyšuje extracelulární hladiny DA v NACC, zatímco 6-hydroxy-dopaminové léze NACC ruší autoaplikaci kokainu, nikotinu, metamfetaminu, morfinu, heroinu nebo

etanolu. Mikrodialyzační studie *in vivo* potvrdily schopnost kokainu, nikotinu, metamfetaminu, morfinu, heroinu a etanolu zvýšit extracelulární DA v NACC.

Neurony s přenašečem kyselinou -aminomáselnou (GABAergní) v NACC a ventrálním pallidu projikují na DA neurony ve VTA. Farmakologické a elektrofyziologické studie ukazují, že tyto projekce jsou inhibiční. Inhibice VTA-DA neuronů je pravděpodobně výsledkem stimulace GABA_B receptorů. Kromě toho mikroinjekce baklofenu do VTA, působící prostřednictvím těchto receptorových subtypů, může snížit DA koncentrace v NACC. Vzato dohromady, je zřejmé, že farmakologická manipulace GABA může ovlivnit DA hladiny v NACC prostřednictvím modulace VTA-DA neuronů.

GamavinyLGABA

GamavinyLGABA (GVG) je selektivní a ireverzibilní inhibitor GABA-transaminázy (GABA-T), o které je známo, že potencuje GABAergní inhibici. Je také známo, že GVG mění biochemické účinky kokainu tím, že vyvolává na dávce závislou a dlouhotrvající elevaci extracelulárních hladin endogenní GABA v mozku.

GVG je $C_6H_{11}NO_2$ nebo 4-amino-5-hexanová kyselina dostupná jako Vigabatrin® od firmy Hoechst Marion Roussel a může být získána od firmy Marion Merell Dow z Cincinnati, Ohio. GVG se neváže na žádný receptor nebo komplex zpětného vstřebávání, ale zvyšuje endogenní intracelulární hladinu GABA selektivní a ireverzibilní inhibicí GABA-transaminázy (GABA-T), enzymu, který normálně katabolizuje GABA.

Jak se zde používá, GVG zahrnuje racemickou sloučeninu nebo směs, která obsahuje stejná množství S(+)-gamavinyLGABA a R(-)-gamavinyLGABA. Tato racemická sloučenina GVG je dostupná

jako Vigabatrin® od firmy Hoechst Marion Roussel a může být získána od firmy Marion Merrell Dow z Cincinnati, Ohio.

GVG obsahuje asymetrické atomy uhlíku a je tudíž schopná existovat ve formě enantiomerů. Předkládaný vynález obsahuje každou enantiomerní formu GVG včetně racemátů nebo racemických směsí GVG. V některých případech může být výhodné, tj. více účinné, použít konkrétní enantiomer ve srovnání s druhým enantiomerem nebo racemátem nebo racemickou směsí ve způsobech předkládaného vynálezu a tyto výhody mohou být snadno určeny odborníkem.

Například enantiomer S(+)-gamavinyLGABA zvyšuje endogenní intracelulární hladinu GABA účinněji než enantiomer R(-)-gamavinyLGABA.

Odlišné enantiomery mohou být syntetizovány z výchozích chirálních látek nebo racemáty mohou být rozštěpeny obvyklými postupy, které jsou dobře známy v oborech chemie, jako jsou například chirální chromatografie, frakční krystalizace diastereomerních solí a podobně.

Podávání gamavinyLGABA

Živým savcům (*in vivo*) může být GVG nebo její farmaceuticky přijatelné soli podávána systémově parenterálními a enterálními způsoby, které také zahrnují aplikační systémy s řízeným uvolňováním. GVG může být například snadno podávána intravenózně nebo intraperitoneálně (*i.p.*), což je výhodný způsob podávání. Intravenózní nebo intraperitoneální podávání se může provádět smísením GVG s vhodným farmaceutickým nosičem (vehikulem) nebo excipientem, jak odborníci vědí.

Předpokládá se také perorální nebo enterální užívání a mohou být použity formulace jako například tablety, tobolky, pilulky, pastilky, elixíry, suspenze, sirupy, oplatky, žvýkáci

gumy apod. pro poskytnutí GVG nebo jejích farmaceuticky přijatelných solí.

Jak se zde používá, farmaceuticky přijatelné soli zahrnují ty kyseliny a zásady tvořící soli, které v podstatě nezvyšují toxicitu sloučeniny. Několik příkladů vhodných solí zahrnuje soli minerálních kyselin, jako je například kyselina chlorovodíková, jodovodíková, bromovodíková, fosforečná, metafosforečná, dusičná a sírová, jakož i soli organických kyselin, jako je například kyselina vinná, octová, citronová, jablečná, benzoová, glykolová, glukonová, gulonová, jantarová, arylsulfonová, např. p-toluensulfonová kyselina apod.

Účinné množství, jak je zde používáno, je množství, které účinně dosáhne specifické změny chování spojeného se závislostí u savce. Je to množství, které zmenší nebo odstraní jeden nebo více příznaků nebo stavů vyplývajících z přerušení nebo odnětí psychostimulačních látek, narkotického analgetika, alkoholu, nikotinu nebo jejich kombinace. Je ale nutné zdůraznit, že vynález není omezen na nějakou konkrétní dávku.

GVG je výhodně podávána v množství, které vyvolá malé nebo žádné vedlejší účinky. Například podávané množství může být od přibližně 15 mg/kg do přibližně 2 g/kg nebo od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg.

Například pro léčbu závislosti na kokainu je GVG podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 2 g/kg, výhodně od přibližně 100 mg/kg do přibližně 300 mg/kg nebo od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg a nejvýhodněji od přibližně 150 mg/kg do přibližně 300 mg/kg nebo od přibližně 75 mg/kg do přibližně 150 mg/kg.

Například pro léčbu závislosti na nikotinu je GVG podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 2 g/kg nebo od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg, výhodně od přibližně 100 mg/kg do přibližně 300 mg/kg nebo od přibližně 150 mg/kg do přibližně 300 mg/kg a nejvýhodněji od přibližně

18 mg/kg do přibližně 20 mg/kg nebo od přibližně 75 mg/kg do přibližně 150 mg/kg.

Například pro léčbu závislosti na metamfetaminu je GVG podávána savci v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 2 g/kg, výhodně od přibližně 100 mg/kg do přibližně 300 mg/kg nebo od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg a nejvýhodněji od přibližně 150 mg/kg do přibližně 300 mg/kg nebo od přibližně 75 mg/kg do přibližně 150 mg/kg.

Když je savec závislý na kombinaci návykových látek, jako jsou například kokain a heroin, je GVG savci podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 2 g/kg, výhodně od přibližně 100 mg/kg do přibližně 300 mg/kg nebo od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg a nejvýhodněji od přibližně 150 mg/kg do přibližně 300 mg/kg nebo od přibližně 75 mg/kg do přibližně 150 mg/kg.

Savci zahrnují například člověka, paviány a další primáty, a také domácí zvířata, jako jsou například psi a kočky, laboratorní zvířata, jako jsou například laboratorní potkani a myši a hospodářská zvířata, jako jsou například koně, ovce a krávy.

GamavinylGABA (GVG) je selektivní a ireverzibilní inhibitor GABA-transaminázy (GABA-T), o které je známo, že potencuje GABAergní inhibici. Je také známo, že GVG mění biochemické účinky kokainu tím, že vyvolává na dávce závislou a dlouhotrvající elevaci extracelulárních hladin endogenní GABA v mozku.

Na základě znalosti, že kokain, jakož i jiné návykové látky, zvyšuje extracelulární DA v NACC, a faktu, že GABA inhibuje DA ve stejném nukleu, ukázali původci, že GVG může zeslabit změny extracelulárního DA vyvolané kokainem, nikotinem, metamfetaminem a etanolem. V jednom příkladu byly použity *in vivo* mikrodialyzační techniky u volně se pohybujících zvířat, aby bylo ukázáno působení akutního (jedna

injekce) a chronického (11 dnů) podávání GVG na zvýšení extracelulární koncentrace DA v NACC vyvolané kokainem. (Viz specificky Morgan, A.E., et al., „Effects of Pharmacologic Increases in Brain ABA Levels on Cocaine-Induced Changes in Extracellular Dopamine“, Synapse, 28: 60-65, 1998, jehož obsah je zahrnut v plnosti formou odkazu).

Neočekávaně bylo zjištěno, že příjem GVG mění chování a obzvláště chování spojené se závislostí asociované s biochemickými změnami vyplývajícími z příjmu návykových látek. Například GVG významně snížila zvýšení DA v synapsích neostriatu vyvolané kokainem v mozku primáta (pavián), jak bylo hodnoceno pozitronovou emisní tomografií (PET) a odstranila jak expresi, tak získání podmíněné preference prostředí, CPP, vyvolané kokainem. Neměla ale žádný vliv na CPP vyvolanou potravní odměnou nebo na účinek kokainu na mozkovou pohybovou aktivitu. Tato zjištění svědčí pro možné terapeutické použití farmakologické strategie cílené na GABAergní neurotransmiterový systém, systém odlišný, ale funkčně spojený s DA mezotelencefalickým systémem odměna/zesílení při závislosti na kokain. Ale spíše než cílení GABA receptorového komplexu přímým GABA agonistou, tento nový přístup s GVG využívá prodlouženého účinku ireverzibilního enzymového inhibitoru, který zvyšuje hladinu endogenní GABA bez náchylnosti k návyku spojené s GABA agonisty působícími přímo na samotný receptor.

Ačkoliv je v předkládaných příkladech používána GVG, odborníci rozumí, že mohou být použity další přípravky nebo léčiva, o kterých je známo, že potencují GABAergní systém nebo zvyšují hladinu extracelulární endogenní GABA v CNS.

Tyto přípravky nebo léčiva zahrnují látky, které zvyšují produkci nebo uvolňování GABA v CNS. Tyto látky zahrnují, ale bez omezení, gabapentin, kyselinu valproovou, progabid, kyselinu gama-hydroxymáselnou, fengabin, cetylGABA, topiramát,

tiagabin, akamprosát (homo-kalcium-aetyltaurin) nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli, nebo jejich enantiomery či racemickou směs.

Předkládaný vynález obsahuje každou enantiomerní formu gabapentinu, kyseliny valproové, progabidu, kyseliny gama-hydroxymáselné, fengabinu, cetylGABA, topiramátu, tiagabinu nebo akamprosátu, včetně jejich racemátů nebo racemických směsí.

Jak bylo uvedeno výše, v některých případech může být výhodné, tj. účinnější, použít konkrétní enantiomer ve srovnání s druhým enantiomerem nebo racemátem či racemickou směsí ve způsobech předkládaného vynálezu a tyto výhody mohou být snadno odborníky zjištěny.

Předkládaný vynález obsahuje přípravky nebo léčiva, která zahrnují předléky GABA nebo léky, které obsahují GABA jako skupinu ve své chemické struktuře. Tyto předléky se stanou farmakologicky aktivní, když jsou metabolicky, enzymaticky nebo neenzymaticky biologicky transformovány nebo štěpeny na GABA v CNS. Příkladem předléku GABA je progabid, který při přestupu hematoencefalické bariéry zvyšuje hladiny endogenní GABA v mozku.

Jak uvedeno výše, gamavinyLGABA (GVG) je selektivní a ireverzibilní inhibitor GABA-transaminázy (GABA-T), o které je známo, že potencuje GABAergní inhibici. Další přípravky nebo léčiva, která inhibují zpětné vstřebávání GABA v CNS, jsou také obsažena předkládaným vynálezem. Příkladem inhibitoru zpětného vstřebávání GABA je tiagabin.

Způsob podle předkládaného vynálezu je použitelný pro potenciaci GABAergního systému nebo zvýšení hladiny extracelulární endogenní GABA v CNS. Jak se zde používá, zesílení nebo zvýšení hladiny endogenní GABA v CNS je definováno jako nárůst nebo zvýšení hladiny GABA podstatně nad normální hladinu *in vivo*, u savce. Hladina endogenní GABA

v CNS je výhodně zvýšena alespoň o přibližně 10 % až o přibližně 600 % nad normální hladinu.

Jak uvedeno výše, účinné množství, jak je zde používáno, je množství, které účinně dosáhne specifické změny chování spojeného se závislostí u savce. Je to množství, které zmenší nebo odstraní jeden nebo více příznaků nebo stavů vyplývajících z přerušení nebo odnětí psychostimulační látky, narkotických analgetik, alkoholu, nikotinu nebo jejich kombinace. Je ale nutné zdůraznit, že vynález není omezen na nějakou konkrétní dávku.

Například účinné množství gabapentinu podávané savci je množství od přibližně 500 mg do přibližně 2 g/den. Gabapentin je dostupný jako Neurontin® od firmy Parke-Davis ve Spojených Státech.

Účinné množství kyseliny valproové podávané savci je například výhodně množství od přibližně 5 mg/kg do přibližně 100 mg/kg/den. Kyselina valproová je dostupná jako Depakene® od firmy Abott ve Spojených Státech.

Účinné množství topiramátu podávané savci je například výhodně množství od přibližně 50 mg do přibližně 1 g/den. Topiramát je dostupný jako Topamax® od firmy McNeil ve Spojených Státech. Účinné množství progabidu podávané savci je výhodně množství od přibližně 250 mg do přibližně 2 g/den. Progabid je dostupný jako Gabren® od firmy Synthelabo, Francie. Chemický vzorec progabidu je $C_{17}H_{16}N_2O_2$.

Účinné množství fengabinu podávané savci je výhodně množství od přibližně 250 mg do přibližně 4 g/den. Fengabin je dostupný jako SL 79229 od firmy Synthelabo, Francie. Chemický vzorec fengabinu je $C_{17}H_{17}C_{12}NO$.

Účinné množství kyseliny gama-hydroxymáselné podávané savci je výhodně množství od přibližně 5 mg/kg do přibližně 100 mg/kg/den. Kyselina gama-hydroxymáselná je dostupná od

firmy Sigma Chemical. Chemický vzorec kyseliny gama-hydroxymáselné je $C_4H_7O_3Na$.

Detaily vynálezu zde byly vyloženy ve formě příkladů, které jsou popsány níže. Plný rozsah vynálezu je vyznačen v připojených patentových nárocích.

Příklady provedení vynálezu

Příklady jsou vyloženy dále s cílem podrobněji ilustrovat a vysvětlit vynález a popisují nejlepší způsoby provedení předkládaného vynálezu. Rozsah vynálezu není žádným způsobem omezen příklady zde uvedenými.

Materiál a metody použité v příkladech

1. PET studie na primátech

Pro všechny studie bylo použito dvacet dospělých samic paviána (*Papio anubis*, 13 až 18 kg) a raklopid značený uhlíkem-11, o kterém bylo dříve prokázáno, že je citlivý na změny synaptického DA, byl syntetizován tak, jak bylo popsáno dříve (Volkow et al., 1994). V průběhu studie byly odebírány vzorky arteriální krve a vybrané vzorky plazmy byly analyzovány na výskyt nezměněného radioaktivního indikátoru, uhlíku-11. Zvířata nebyla mezi injekcemi izotopu přesunuta z portálu. Zkoumané oblasti (ROI) byly zakresleny přímo na PET snímky. Stručně, bilaterálně byl udělán obrys kolem corpus striatum na každém transaxiálním řezu, na kterém se vyskytovalo. Cerebelární ROI byla načrtnuta přes střední čáru na úrovni vermis cerebelli. ROI z první studie pak byly zkopírovány přímo na odpovídající řez z druhé studie. Vyšetřením umístění ROI na druhém skanu mohly být učiněny

změny, bylo-li nutné, pouze v pozici ROI. Tato víceplošná metoda analýzy omezila rozdíly, které mohly vzniknout při pohybu zvířete na portálu během skanovacího intervalu.

Grafická metoda zjišťování distribučního objemu (DV) byla vyvinuta dříve pro kinetickou analýzu dat získaných s [^{11}C]-raklopridem. Nejlépe reprodukovatelná míra vstřebávání raklopridu je poměr DV. Poměr se rovná DV z oblasti bohaté na receptory (corpus striatum) vzhledem k DV z oblasti bez receptorů (cerebellum). Koncentrace volných receptorů byla přímo úměrná k DV poměru rovnajícímu se 1. Příprava zvířat byla prováděna podle dřívějšího detailního popisu (Dewey et al., 1992).

Byla navržena statistická analýza pro testování hypotézy, že 1) kokainový podnět se lišil od variability test/opakovaný test radioaktivního indikátoru uhlíku-11 (prováděno na stejných zvířatech ve stejných pokusných podmínkách) a 2) podmínky podnětu se navzájem lišily. Fakt, že signifikantní výsledky byly získány pro striatum a poměr striata k cerebellu, ale ne pro cerebellum, ukazoval, že vliv zákroku byl omezený na specifickou, ale ne na nespecifickou vazebnou složku. GVG nezměnila regionální distribuci ani rychlost metabolismu radioaktivního indikátoru.

2. Kokainem vyvolaná podmíněná preference prostředí u hlodavců

Ve všech studiích na hlodavcích byli použiti samci laboratorního potkana kmene Sprague-Dawley (200 až 225 g, Taconic farms, Germantown, NY). Zvířata byla ponechána aklimatizovat se ve zvěřinci alespoň 5 dnů před začátkem pokusů. Původci použili komory pro podmíněnou preferenci prostředí, jak byly popsány dříve (Lepore et al., 1995), ale místo toho, aby byla jedna komora celá bílá a druhá černá, byla první komora celá světle modrá s podlahou z nerezavějící

oceli a druhá komora byla světle modrá s horizontálními černými pruhy (širokými 2,5 cm) vzdálenými 3,8 cm a s hladkou podlahou z plexiskla. Ve všech CPP studiích s GVG byl objem fyziologického roztoku 1 ml/kg a dávky kokainu byla 20 mg/kg. Fyziologický roztok, kokain a GVG byly podávány intraperitoneální injekcí (i.p.). Podmiňovací procedura pro akviziční fázi sestávala z 12 sezení prováděných postupně v průběhu 12 dnů.

CPP párování byla: 1) fyziologický roztok/fyziologický roztok, 2) fyziologický roztok/kokain, 3) GVG/fyziologický roztok, 4) fyziologický roztok/kokain a GVG. Zvířata v každé skupině byla náhodně přiřazena do 2 x 2 faktorového experimentu, kde jedním faktorem byla jedna ze dvou komor a druhým faktorem bylo pořadí podmiňování. Zvířatům, která dostávala buď fyziologický roztok nebo kokain, byla podána injekce a zvířata byla zavřena do příslušného prostoru na dobu 30 minut. Injekce GVG byly podávány 3 hodiny před injekcí fyziologického roztoku a následným umístěním zvířat v příslušné komoře. Test byl prováděn takto, protože bylo prokázáno, že hladina GABA dosahuje maximálních hodnot 3 až 4 hodiny po podání GVG.

Testovací den (den 12) nebyly podány injekce ani drog ani fyziologického roztoku a zvířatům byl ponechán volný pohyb mezi oběma komorami po dobu 15 minut. Délka doby strávené v každé komoře byla zaznamenávána s použitím automatického infračerveného paprsku elektronicky spojeného se stopkami. Pro expresní fázi CPP na kokain, byla zvířata navykána a podmiňována na kokain tak, jak je popsáno v akvizičních studiích, ale žádnému zvířeti v expresní studii nebyla v podmiňovacích dnech podávána GVG. V testovací den (den 12) zvířata, která byla testována v expresní fázi, na rozdíl od zvířat v akviziční fázi, dostala buď fyziologický roztok nebo

GVG 2,5 hodiny před tím, než byla umístěna do zařízení s volným přístupem do obou komor po dobu 15 minut.

3. Potravou vyvolaná podmíněná preference prostředí u hlodavců

Aby se u hlodavců testovala CPP vyvolaná potravou, byl čtyřem skupinám laboratorních potkanů během všech 12 sezení procedury CPP umožněn přístup k potravě *ad libitum*. 12 sezení procedury CPP probíhalo zcela stejně jako postup použitý ve studii CPP vyvolané kokainem, kromě toho, že apetitivní látkou byla potrava a ne kokain. První skupině byl podáván fyziologický roztok, druhé skupině bylo podáváno intraperitoneálně 150 mg/kg GVG, třetí skupině byl podáván fyziologický roztok a čtvrté skupině bylo podáváno intraperitoneálně 300 mg/kg GVG před expozicí potravě a CPP párováním na komory CPP. Zvířata ve všech čtyřech skupinách byla navykána na Froot Loops, cereálie ke snídani s ovocnou příchutí, které jsou pro laboratorní potkany velice přitažlivé, v příslušné komoře v testovací místnosti během čtyř návykových sezení. Dvacet čtyři hodin po posledním CPP párování byla zvířata umístěna do komory a nebyla podávána (nebyla dostupná) žádná droga ani fyziologický roztok (ani potrava) a zvířatům byl ponechán volný pohyb v zařízení CPP po dobu 15 minut. Délka doby strávená v párovaných a nepárovaných komorách byla zaznamenávána s použitím automatizovaného zařízení.

4. Měření pohybové aktivity u hlodavců

Zvířata byla brána do ruky každý den 5 minut po dobu jednoho týdne před pokusem, aby se snížil manipulační stres. V den studie byla podávána intraperitoneálně GVG (150 mg/kg nebo 300 mg/kg) nebo fyziologický roztok (1 ml/kg nebo

0,5 ml/kg) 2,5 hodiny před pokusem. Zvířata byla přenesena do testovacího prostoru jednu hodinu před každým pokusem. 2,5 hodiny po podání GVG nebo fyziologického roztoku byla zvířata umístěna do behaviorálních klecí a pohybová aktivita byla zaznamenávána v 10 minutových intervalech po 90 minut do PC-AT počítače s použitím hardware pro Photobeam Activity System. Klece pro testování pohybu samotné jsou průhledné akrylové klece o velikosti 41,3 x 41,3 x 30,5 cm. Elektronický systém (Photobeam Activity System, San Diego Instruments, San Diego, Calif.) použitý k monitorování pohybové aktivity se skládá ze 16 infračervených paprsků vrhaných napříč klecí zleva doprava a 16 paprsků zepředu dozadu. Všechny infračervené paprsky jsou přibližně 0,39 cm nad podlahou.

5. Studie katalepsie hlodavců

Pomocí testu s pákou byl zjišťován stupeň katalepsie po podávání 150 mg/kg GVG intraperitoneálně, 300 mg/kg GVG intraperitoneálně nebo fyziologického roztoku (1 ml/kg, i.p., 0,9% fyziologický roztok). Stručně, samci laboratorních potkanů kmene Sprague-Dawley byli bráni do ruky a přeneseni do testovací místnosti tři dny před pokusy, aby se aklimatizovali. Testovací den dostala zvířata ($n = 10$ v každé ošetřované skupině) buď fyziologický roztok nebo GVG a byl měřen stupeň katalepsie 60, 120 a 240 minut po injekci. Experimentátorovi nebylo známo, jaké ošetření zvířata obdržela. Páka byla vytvořena ze dřeva a měla průměr 1,2 cm a výška od podlahy k vršku páky byla 10 cm. Při každém měření byly přední končetiny zvířete jemně položeny přes páku a měřil se čas, během kterého zvíře přemístilo obě přední končetiny na podlahu.

6. Studie s [^{11}C]-kokainem u hlodavců a primátů

Zvířata ($n = 10$) byla rozdělena do dvou skupin. První skupině byl podáván fyziologický roztok (1 ml/kg) intraperitoneální (i.p.) injekcí 3 hodiny před podáním [^{11}C]-kokainu. Druhé skupině byla podávána GVG (300 mg/kg) i.p. injekcí 3 hodiny před podáním [^{11}C]-kokainu. Zvířata byla utracena 10 minut po injekci [^{11}C]-kokainu. Byly vyňaty mozky a měřila se v nich radioaktivita. Ve dvou dalších PET studiích na primátech byla podávána GVG (300 mg/kg) okamžitě po výchozím skenu se značeným kokainem. Přibližně 3 hodiny později byl opět podán značený kokain a zvířata byla skenována 30 minut.

7. Mikrodialyzační studie u hlodavců

Se všemi zvířaty bylo zacházeno podle protokolu schváleného IACUC a přesně podle směrnic NIH. Dospělí samci laboratorního potkana kmene Sprague-Dawley (200 až 300 g, Taconic Farms), umístění ve zvěřinci za podmínek 12:12 světlo/tma, byli rozmístěni do 6 skupin ($n = 5-9$), byla jim podána anestezie a do pravého NACC (2,0 mm anteriorně a 1,0 mm laterálně k bregma a 7,0 mm ventrálně k povrchu kortexu) byla stereotakticky implantována silikonová zaváděcí kanyla přinejmenším 4 dny před studií. Mikrodialyzační sondy (2,0 mm, Bioanalytical Systems, BAS, West Lafayette, IN) byly umístěny do zaváděcí kanyly a umělý mozkomíšní mok (ACSF, 155,0mM Na^+ , 1,1mM Ca^{2+} , 2,9mM K^+ , 132,76mM Cl^- a 0,83mM Mg^{2+}) byl podáván prostřednictvím sondy s použitím CMA/100 mikroinfúzní pumpy (BAS) s rychlostí průtoku 2,0 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zvířata byla umístěna do nádob a sondy byly vloženy a proplachovány přes noc s ACSF. V den studie byly injikovány minimálně tři vzorky, aby se zjistila stabilita bazálních hodnot. Vzorky byly odebírány

20 minut a injikovány on-line (CMA/160, BAS). Průměrná koncentrace dopaminu těchto tří stabilních vzorků byla definována jako kontrola (100 %) a všechny hodnoty z následujících ošetření byly transformovány na procenta této kontroly. Po stanovení stabilní bazální hodnoty byl podáván intraperitoneální (i.p.) injekcí nikotin. Systém vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se skládal z BAS kolony s převráceným poměrem fází (3,0 C-18), z BAS LC-4C elektrochemického snímače s dvojitou/skleněnou uhlíkovou elektrodou nastavenou na 650 mV, počítače, který analyzoval data on-line s použitím komerčního balíku software (Chromograph Bioanalytical Systems) a dvojitého liniového zapisovače. Mobilní fáze (rychlost průtoku 1,0 ml/min) se skládala z 7,0% metanolu, 50mM dihydrogenfosforečnanu sodného, 1,0 mM oktylsulfátu sodného a 0,1mM EDNA, pH 4,0. DA byl eluován v 7,5 minut. Po ukončení studie byla zvířata dekapitována a pro verifikaci umístění sondy byly získány zmrazené řezy.

Paralelně s kvantitativním hodnocením koncentrace dopaminu byla současně kvantifikována pohybová odpověď těchto zvířat na podávání stimulační látky s použitím infračerveného senzoru pohybu. Tento infračervený detektor optické blízkosti monitoroval pohyby závěsného raménka, integrální složky volně se pohybujícího systému. Digitální výstup detektoru byl připojen k IBM osobnímu počítači a programován tak, aby počítal jak pozitivní tak negativní odchylky raménka. Tato data byla sbírána a sumarizována s použitím stejného časového protokolu pro odběr vzorků použitého při dialýze. Pohybová aktivita pak byla vyjádřena jako počet odchylek v intervalu pro odběr vzorků.

Příklad 1

Studie na primátech jiného než lidského původu (paviánech)

V tomto příkladu byly dvaceti primátům jiného než lidského původu podávány dvě injekce [^{11}C]-raklopridu podle postupu popsaného v části 1 Materiály a metody. První sloužila jako bazální hodnota a druhá následovala po podání kokainu nebo placebo. Testování/opakovaně testování primáti ($n = 7$) uvedení jako skupina 1 v tabulce 1 níže dostali placebo (0,9% fyziologický roztok, 1 ml/kg) před druhou injekcí radioaktivního indikátoru, aby se zjistila variabilita této zobrazovací metody během testu/opakovaného testu.

Tabulka 1

Skupiny a experimentální podmínky

Skupina	Farmakologické podmínky
1	Kontroly (test/opakovaný test)
2	Ošetření kokainem
3	Ošetření GVG/kokainem

Všichni zbylí primáti ($n = 13$) dostali systémovou injekci kokainhydrochloridu (0,5, 1,0 nebo 2,0 mg/kg) buď 5 nebo 30 minut před druhou injekcí [^{11}C]-raklopridu. 5 zvířat z těchto 13 dostalo GVG (300 mg/kg, i.v.) 3 hodiny před podáním kokainu.

Různé dávky kokainu a časové intervaly předběžného ošetření kokainem nevyvolaly žádné významné změny účinku kokainu na distribuční objem (DV), v souladu s očekáváním. Průměrná procenta změn poměru DV pro zvířata ošetřená samotným kokainem ($n = 8$) proti ošetření GVG/kokainem ($n = 5$) jako skupiny 2 a 3 jsou ukázána na obrázku 1.

Protože je kompetitivní antagonist, je vazba [^{11}C]-raklopridu závislá na koncentraci DA v synaptické štěrbině. Tedy, jak klesá synaptická koncentrace DA, zvyšuje se vazba [^{11}C]-raklopridu. Naopak, když se zvyšuje koncentrace synaptického DA, snižuje se vazba [^{11}C]-raklopridu. Jak je ukázáno na obrázku 1, variabilita v testu/opakovaném testu při této zobrazovací metodě byla pro skupinu 1 menší než 7 %. Variabilita těchto PET měření je shodná s dřívějšími hodnotami získanými s [^{11}C]-raklopridem u primátů. Ve skupině 2 kokain vyvolal více než 30% redukci průměrného poměru DV ($p < 0,0002$, Studentův dvoustranný t-test, obrázek 1). Tato data jsou konzistentní se současnými PET a mikrodialyzačními studiemi, ve kterých amfetaminem jako stimul zvyšoval extracelulární DA a snižoval vazbu [^{11}C]-raklopridu v mozku primátů. Kromě toho jsou tato zjištění ve shodě s nedávnou publikací, která vyšetřovala účinky kokainu jako podnětu na vazbu značeného raklopridu u lidí. Konečně jsou tato data konzistentní s vlastními mikrodialyzačními studiemi původců (Morgan a Dewey, 1998), jakož i PET studiemi na primátech a člověku, které prováděli původci s amfetaminem, GBR 12909, tetrabenazinem, metylfenidátem a [^{11}C]-raklopridem (Dewey et al., 1993, Volkow et al., 1994). Předběžné ošetření GVG ale významně blokovalo kokainem vyvolanou redukci, jak je ukázáno u skupiny 2 na obrázku 1 u poměru DV (skupina 2, $p < 0,0002$, Studentův dvoustranný t-test). Tyto rozdíly jsou snadno zjevné v parametrových obrazech DV poměru, jak je ukázáno na obrázku 2. Hodnoty pro skupiny 1 a 3 nebyly statisticky odlišné ($p > 0,1$, Studentův dvoustranný t-test).

Příklad 2

Studie kokainem vyvolané podmíněné preference prostředí u hlodavců

V tomto příkladu byl následován postup ukázaný v části 2 Materiál a metody. Kokain vyvolával reakci CPP závislou na dávce, s nejspolehlivější a nejsilnější reakcí nastávající při dávce 20 mg/kg, jak uvedeno v tabulce 2 níže.

Tabulka 2

Podmíněná preference prostředí vyvolaná kokainem

Kokain (mg/kg)	Čas strávený v komorách (minuty)	
	Párovaná	Nepárovaná ¹
0	7,4 ± 0,3	7,6 ± 0,3
5,0	8,2 ± 0,4	6,8 ± 0,5
10,0	9,6 ± 0,5 ²	5,4 ± 0,3
20,0	11,8 ± 0,4 ³	3,2 ± 0,4 ⁴

¹Sledovaným zvířatům byly podávány injekce pouze s fyziologickým roztokem

²Významně vyšší než při dávkách 0 a 5 mg/kg kokainu, $p < 0,05$, analýza variance (ANOVA) a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

³Významně vyšší než při dávkách 0,5 a 10 mg/kg kokainu, $p < 0,05$, analýza variance (ANOVA) a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

⁴Významně menší než při dávkách 0,5 a 10 mg/kg kokainu, $p < 0,01$, analýza variance (ANOVA) a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

Původci tudíž vybrali dávku 20 mg/kg kokainu, se kterou byl zkoumán účinek podávání GVG na akviziční a expresní fáze

CPP vyvolané kokainem. Výsledky jasně ukazují, že dávky 112, 150 a 300 mg/kg GVG, ale ne dávka 75 mg/kg GVG, blokovaly získání a expresi CPP vyvolané kokainem. Viz specificky tabulky 3 až 10 níže.

Tabulka 3

Účinek GVG a fyziologického roztoku na získání podmíněné preference prostředí vyvolané kokainem

Párování ošetření ¹	Čas strávený v komorách (minuty)	
	Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	7,3 ± 0,5	7,7 ± 0,6
Fyziologický roztok/kokain	11,1 ± 0,3 ⁴	3,9 ± 0,4
75 mg/kg GVG ³ /fyziologický roztok	7,3 ± 0,5	7,7 ± 0,6
75 mg/kg GVG ³ /kokain	9,1 ± 1,1	5,9 ± 1,2

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře ± S.E.M. (n = 8 až 10)

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Zvířata dostala GVG nebo fyziologický roztok 2,5 hodiny před podáním fyziologického roztoku nebo kokainu (20 mg/kg).

⁴Významně vyšší než všechny ošetřené skupiny, $p < 0,05$, ANOVA a Newmanův-Keulsův test.

⁵Významně menší než všechny ošetřené skupiny, $p < 0,01$, ANOVA a Newmanův-Keulsův test.

Tabulka 4

Párování ošetření ¹	Čas strávený v komorách (minuty)	
	Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	7,2 ± 0,5	7,8 ± 0,4
Fyziologický roztok/kokain	11,8 ± 0,5 ⁴	3,2 ± 0,5
112 mg/kg GVG ³ /fyziologický roztok	7,6 ± 0,6	7,4 ± 0,6
112 mg/kg GVG ³ /kokain	8,2 ± 0,5	6,8 ± 0,5

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře ± S.E.M. (n = 8 až 10)

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Zvířata dostala GVG nebo fyziologický roztok 2,5 hodiny před podáním fyziologického roztoku nebo kokainu (20 mg/kg).

⁴Významně vyšší než všechny ošetřené skupiny, p < 0,05, ANOVA a Newmanův-Keulsův test.

⁵Významně menší než všechny ošetřené skupiny, p < 0,01, ANOVA a Newmanův-Keulsův test.

Tabulka 5

Párování ošetření ¹	Čas strávený v komorách (minuty)	
	Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	7,4 ± 0,3	7,6 ± 0,4
Fyziologický roztok/kokain	11,6 ± 0,5 ⁴	3,4 ± 0,4 ⁵
150 mg/kg GVG ³ /fyziologický roztok	7,8 ± 0,6	7,2 ± 0,6
150 mg/kg GVG ³ /kokain	7,9 ± 0,8	7,1 ± 0,8

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře $\pm$ S.E.M. (n = 8 až 10)

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Zvířata dostala GVG nebo fyziologický roztok 2,5 hodiny před podáním fyziologického roztoku nebo kokainu (20 mg/kg).

⁴Významně vyšší než všechny ošetřené skupiny, $p < 0,05$, ANOVA a Newmanův-Keulsův test.

⁵Významně menší než všechny ošetřené skupiny, $p < 0,01$, ANOVA a Newmanův-Keulsův test.

Tabulka 6

Párování ošetření ¹	Čas strávený v komorách (minuty)	
	Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	7,7 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,3
Fyziologický roztok/kokain	11,2 $\pm$ 0,6 ⁴	0,8 $\pm$ 0,5 ⁵
300 mg/kg GVG ³ /fyziologický roztok	7,2 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,4
300 mg/kg GVG ³ /kokain	7,6 $\pm$ 0,7	7,2 $\pm$ 0,7

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře $\pm$ S.E.M. (n = 8 až 10)

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Zvířata dostala GVG nebo fyziologický roztok 2,5 hodiny před podáním fyziologického roztoku nebo kokainu (20 mg/kg).

⁴Významně vyšší než všechny ošetřené skupiny, $p < 0,05$, ANOVA a Newmanův-Keulsův test.

⁵Významně menší než všechny ošetřené skupiny, $p < 0,01$, ANOVA a Newmanův-Keulsův test.

Tabulka 7

Účinek GVG a fyziologického roztoku na expresi podmíněné preference prostředí vyvolané kokainem

Párování ošetření ¹	Léčivo podané v testovací den	Čas strávený v komorách (minuty)	
		Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	Fyziologický roztok	7,5 ± 0,4 ¹	7,5 ± 0,4
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	GVG, 75 mg/kg	7,5 ± 0,3	7,5 ± 0,3
Fyziologický roztok/kokain	Fyziologický roztok	11,8 ± 0,5 ³	3,2 ± 0,5
Fyziologický roztok/kokain	GVG, 75 mg/kg	10,6 ± 0,6 ³	4,4 ± 0,9
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	Fyziologický roztok	7,8 ± 0,5 ¹	7,2 ± 0,6

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře ± S.E.M. (n = 10)

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Významně vyšší než všechna další pokusná párování, p < 0,01, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

Tabulka 8

Párování ošetření ¹	Léčivo podané v testovací den	Čas strávený v komorách (minuty)	
		Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	Fyziologický roztok	7,1 ± 0,5	7,9 ± 0,5
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	GVG, 112 mg/kg	7,2 ± 0,3	7,8 ± 0,3
Fyziologický roztok/kokain	Fyziologický roztok	12,2 ± 0,6 ³	2,8 ± 0,5
Fyziologický roztok/kokain	GVG, 112 mg/kg	8,1 ± 0,7	6,9 ± 0,6

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře ± S.E.M. (n = 10)

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Významně vyšší než všechna další pokusná párování, $p < 0,01$, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

Tabulka 9

Párování ošetření ¹	Léčivo podané v testovací den	Čas strávený v komorách (minuty)	
		Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	Fyziologický roztok	7,1 ± 0,2 ¹	7,8 ± 0,2
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	GVG, 150 mg/kg	7,7 ± 0,2	7,3 ± 1,1
Fyziologický roztok/kokain	Fyziologický roztok	11,1 ± 0,5 ³	3,9 ± 0,4 ⁴
Fyziologický roztok/kokain	GVG, 150 mg/kg	7,9 ± 0,3	7,1 ± 0,3

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře $\pm$ S.E.M. (n = 10)

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Významně vyšší než všechna další pokusná párování, $p < 0,01$, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

⁴Významně nižší než všechna další pokusná párování, $p < 0,01$, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

Tabulka 10

Párování ošetření ¹	Léčivo podané v testovací den	Čas strávený v komorách (minuty)	
		Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	Fyziologický roztok	$7,8 \pm 0,5^1$	$7,2 \pm 0,6$
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	GVG, 300 mg/kg	$7,3 \pm 0,4$	$7,7 \pm 0,3$
Fyziologický roztok/kokain	Fyziologický roztok	$12,5 \pm 0,8^3$	$2,5 \pm 0,6^4$
Fyziologický roztok/kokain	GVG, 300 mg/kg	$7,9 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,6$

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře $\pm$ S.E.M. (n = 10)

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Významně vyšší než všechna další pokusná párování, $p < 0,05$, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

⁴Významně nižší než všechna další pokusná párování, $p < 0,05$, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

Samotná GVG nevyvolala ani CPP ani podmíněnou averzivní reakci. Viz opět tabulky 3 až 10.

Příklad 3

Studie potravou vyvolané podmíněné preference prostředí u hlodavců

V tomto příkladu byl následován postup ukázaný v části 3 Materiál a metody. Výsledky uvedené v tabulce 11 níže ukazují, že potrava vyvolávala stimulující nebo odměňující působení. Například všechny párované hodnoty ukázaly, že hlodavci strávili více času v komoře, kde se vyskytovala potrava.

Tabulka 11

Účinek GVG (150, 300 mg/kg, i.p.) na podmíněnou preferenci prostředí vyvolané potravou

Párování ošetření	Čas strávený v komorách (minuty)	
	Párovaná	Nepárovaná ²
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	7,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6
GVG/fyziologický roztok	7,5 ± 0,7	7,5 ± 0,7
Fyziologický roztok/potrava	9,3 ± 0,7	5,7 ± 0,7
GVG (150 mg/kg)/potrava	9,4 ± 0,4	5,6 ± 0,5
GVG (300 mg/kg)/potrava	9,0 ± 0,5	6,0 ± 0,5

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře ± S.E.M.

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

Podávání 150 nebo 300 mg/kg GVG neměnilo reakci CPP vyvolanou potravou, jak je ukázáno v tabulce 11, navzdory oslabení stimulujících motivačních účinků kokainu ve výše uvedených CPP pokusech, jak ukázáno v tabulkách 3 až 10 výše.

Diskuse experimentálních výsledků získaných v příkladech 1, 2 a 3

V předchozích PET studiích původci prokázali, že GVG samotná redukuje extracelulární koncentrace DA, což mělo za následek zvýšení vazby [^{11}C]-raklopridu v mozku primátů (Dewey et al., 1992). V PET studiích předkládaného vynálezu GVG vyvolané snížení extracelulárních hladin DA před podáváním kokainu je zřetelně základem oslabení účinků kokainu pozorovaného u skupiny 3 z tabulky 1. Ale zdánlivě totožné hodnoty nalezené u skupin 1 a 3, ve spojení s předchozími zjištěními původců při použití samotné GVG (Dewey et al., 1992), ukazují, že kokain zvýšil extracelulární hladinu DA v předkládaném vynálezu navzdory podávání GVG, ale pouze k bazálním hodnotám.

Ale na základě CPP dat zde předkládaných byl tento kokainem vyvolaný návrat k bazálním hodnotám zjevně nepostačující pro vyvolání stimulujících motivačních účinků. Výsledky původců ukazují, že kokain vyvolal reflex CPP. Na rozdíl od toho, párování nosičů nevyvolala reflex CPP, což ukazuje, že zvířata neprojevovala preferenci komor, tj. zařízení je bezchybné. Kromě toho reflex CPP na kokain byl závislý na dávce, přičemž nejspolehlivější a nejsilnější odpověď se objevila při dávce 20 mg/kg kokainu.

Podávání 112, 150, 300 mg/kg GVG, na rozdíl od dávky 75 mg/kg GVG, blokovalo získání a expresi reflexu CPP vyvolaného kokainem. Na rozdíl od toho, když byla GVG párována

s fyziologickým roztokem, nevyvolala CPP nebo averzivní reakci. To ukazuje, že blokáda CPP vyvolané kokainem prostřednictvím GVG nebyla ve vztahu s averzivní nebo apetitivní reakcí vyvolanou samotnou GVG. Výsledky původců předložené v příkladu 2 ukázaly, že potrava vyvolala stimulující nebo odměňující účinky. Podávání 150 nebo 300 mg/kg GVG nezměnilo reakci CPP vyvolanou potravou, navzdory oslabení stimulujících účinků kokainu. Tato zjištění svědčí pro to, že GVG specificky oslabuje odměňující/stimulující účinky kokainu.

Příklad 4

Studie pohybové aktivity a katalepsie u laboratorních hlodavců

V tomto příkladu byly následovány postupy uvedené v částech 4 a 5 Materiálu a metod. Ačkoliv je obecně přijímáno, že paradigma CPP odlišuje stimulující motivační účinky od motorických účinků, původci nicméně stanovili vliv GVG na lokomoci a katalepsii u laboratorních potkanů. Původci našli, že předběžné ošetření GVG v dávkách 150 mg/kg nebo 300 mg/kg nezměnilo pohybovou aktivitu ve srovnání s kontrolami předběžně ošetřenými fyziologickým roztokem, jak je ukázáno na obrázcích 3a a 3b. Kromě toho předběžné ošetření GVG v dávkách 150 mg/kg nebo 300 mg/kg nevyvolalo u laboratorních potkanů katalepsii. Trvání katalepsie po dávce 300 mg/kg GVG bylo $1,1 \pm 0,4$ sekund ($n = 10$), což nebylo významně odlišné od $0,7 \pm 0,3$ sekund ($n = 10$) u laboratorních potkanů ošetřených fyziologickým roztokem. Písmeno n označuje počet hlodavců, kteří byli testováni.

Příklad 5

Hladiny ^{11}C -kokainu u hlodavců a primátů

V tomto příkladu byl následován postup uvedený v části 6 Materiálů a metod. Aby se vyhodnotila možnost, že GVG oslabuje působení kokainu změnou jeho penetrace do mozku, zkoumali původci účinek fyziologického roztoku a GVG na hladiny ^{11}C -kokainu v celém mozku laboratorních potkanů a primátů. U hlodavců byly hladiny ^{11}C -kokainu v mozku po intraperitoneálním podávání fyziologického roztoku a 300 mg/kg GVG $0,110 \pm 0,03$ a $0,091 \pm 0,02$, v daném pořadí, což nebylo statisticky odlišné. U primátů se farmakologický profil vazby značeného kokainu v neostriatu významně nelišil od výchozího skenu, jak co se týče absolutního vstřebávání, tak co se týče clearance.

Příklad 6

V tomto příkladu byly zjišťovány účinky GVG na nikotinem vyvolané změny koncentrace extracelulárního dopaminu u volně se pohybujících laboratorních potkanů. Byl sledován postup uvedený v části 7 Materiálů a metod.

Pro každé párování ošetření bylo celkem vyšetřeno 8 laboratorních potkanů. Zvířata dostala 4 párování v průběhu 8 dnů, jedno párování denně. Zvířata dostala 75 mg/kg GVG 2,5 hodiny před tím, než jim bylo podáno 0,4 mg/kg nikotinu. Zvířatům byla podána GVG, nikotin a byla umístěna v příslušné komoře v den 1. V den 2 byla zvířatům podána GVG, fyziologický roztok a byla umístěna do příslušné komory. Protokol ze dnů 1 a 2 se ještě třikrát opakoval. Dvacet čtyři hodin po podání posledního párování byl zvířatům ponechán volný přístup do

celého behaviorálního zařízení po dobu 15 minut a délka doby strávené v párovaných a nepárovaných komorách byla zaznamenávána s použitím automatizovaného přístroje. Účinky intraperitoneálně podávané dávky 75 mg/kg GVG na získání CPP vyvolané nikotinem u laboratorních potkanů zjištěné v tomto příkladu jsou uvedeny v tabulce 12 níže.

Tabulka 12

Účinek 75 mg/kg i.p. GVG na získání podmíněné preference prostředí vyvolané (-)-nikotinem

Párování ošetření	Čas strávený v komorách (minuty) ¹	
	Párovaná	Nepárovaná ²
Nikotin 0,4 mg/kg, s.c. /nosič ³	9,4 ± 0,5	5,6 ± 0,5
75 mg/kg GVG/nikotin 0,4 mg/kg, s.c.	6,4 ± 0,3 ⁴	8,6 ± 0,3 ⁵

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře ± S.E.M.

²Sledovaným zvířatům byly podány pouze injekce fyziologického roztoku.

³Nosič byl 1 ml/kg 0,9% NaCl nebo fyziologický roztok.

⁴Významně menší než párování nikotin/nosič, $p < 0,01$, ANOVA a Student-Newmanův-Keulsův test.

⁵Významně vyšší než párování nikotin/nosič, $p < 0,01$, ANOVA a Student-Newmanův-Keulsův test.

Výsledky podobného pokusu, jako je pokus shrnutý v tabulce 12, jsou ukázány na obrázku 4. Obrázek 4 ukazuje, že GVG (150 mg/kg) blokuje nikotinem vyvolané zvýšení koncentrace dopaminu u volně se pohybujících laboratorních potkanů.

Prázdné kroužky jsou kontrolní zvířata. Plné kroužky jsou zvířata ošetřená s GVG 2,5 hodiny před podáním nikotinu.

Srovnávací příklad

Účinky baklofenu na užívání kokainu

Výsledky původců získané v příkladech 1, 2 a 3 byly v soulase s předchozími studiemi uvádějícími, že augmentace GABA_Aerní funkce může oslabit odměňující/zesilující působení kokainu a jiných návykových látek. Například bylo ukázáno, že při použití paradigmatu progresivního poměru, vyvolal selektivní agonista GABA_B baklofen snížení závislé na dávce v bodech zlomu pro intravenózní (i.v.) podávání kokainu u samců laboratorních potkanů kmene Wistar, ačkoliv neovlivnil frekvenci příjmu návykové látky. Tyto výsledky svědčí pro to, že baklofen oslabil zesilující účinky kokainu, protože snížení v bodech zlomu představuje snížení motivace autoaplikace kokainu.

Vznikaly také hypotézy, že augmentace funkce GABA_A receptoru oslabuje autoaplikaci kokainu, protože chlórdiazepoxid a alprazolam, pozitivní alosterické modulátory GABA_A receptorového komplexu, snížily frekvenci autoaplikace kokainu. Ale tento účinek je pravděpodobně ve vztahu ke zvýšení zesilující hodnoty každé jednotkové dávky kokainu, protože chlórdiazepoxid zvyšuje zlomový bod pro autoaplikaci kokainu podle progresivního schématu.

Závěry s baklofenem byly posíleny nedávnou studií ze stejné laboratoře ukazující, že akutní předběžné ošetření laboratorních potkanů baklofenem (1,25 - 5 mg/kg i.p.) potlačilo autoaplikaci kokainu v paradigmatu oddělených pokusů po dobu alespoň 4 hodin bez významné změny reakce na

posilování potravou. Mikroinjekce baklofenu do ventrální tegmentální oblasti ipsilaterálně ke stimulační elektrodě v laterálním hypotalamu laboratorních potkanů vyvolala posun doprava křivky frekvence-intenzita proudu, což ukazuje, že baklofen oslabil odměňující hodnotu elektrické stimulace. Ale baklofen neovlivnil maximální frekvenci reakce pro odměnu elektrickou stimulací mozku nebo hladiny nezesilujícího konání, což svědčí pro to, že vliv baklofenu není ve vztahu k odchylkám provádění pohybů/obratnosti.

Nedávná studie prokázala, že GVG vyvolala na dávce závislé zvýšení mozkového stimulačního prahu odměny u samců laboratorních potkanů F344 (Kushner et al., 1997b), bez významných účinků na provádění pohybů. Snížení mozkového stimulačního prahu odměny vyvolané dávkou 2,5 a 5 mg/kg intraperitoneálně podávaného kokainu bylo významně antagonistováno dávkou 400 mg/kg GVG.

Konečně reflex CPP vyvolaný morfinem (8 mg/kg) byl významně oslaben mikroinjekcí baklofenu (0,1 - 1 nmol) do ventrální tegmentální oblasti a tento účinek byl antagonistován GABA_B antagonistou 2-hydroxysaklofenem. Tudiž navzdory použití odlišných paradigmat pro stanovení odměny/zesílení tyto studie ukazují, že aktivace GABA_B receptorů oslabila apetitivní hodnotu kokainu, morfinu a odměny elektrickou mozkovou stimulací.

Dříve bylo publikováno, že předběžné ošetření GABA-mimetickou sloučeninou progabidem (který zvyšuje hladiny GABA v mozku vlivem svého metabolismu na GABA), který samotný nevyvolává podmíněnou preferenci prostředí nebo averzi, nezměnilo CPP reflex na dávku 1,5 mg/kg i.p. amfetaminu. Ale je obtížné srovnat toto zjištění s předkládaným vynálezem, protože existují odlišnosti v kmenech laboratorních potkanů, GABAergních sloučeninách a látkách použitých pro vyvolání CPP. Je také nutné poznamenat, že progabid byl přítomný pouze 35

minut. Protože bylo ukázáno, že maximální zvýšení hladin GABA v mozku po systémovém progabidu nastává čtyři až šest hodin po injekci, hladiny GABA nebyly během určování CPP vyvolané amfetaminem na vrcholu.

Při daných důkazech svědčících pro to, že augmentace dopaminergní funkce v mezolimbickém systému má úlohu ve zprostředkování účinků odměny/zesílení kokainu, zrušení reflexu CPP vyvolaného kokainem prostřednictvím GVG může být ve vztahu ke změně dopaminergní aktivity/funkce. Tato hypotéza je podporována vlastní *in vivo* mikrodialyzační studií původců, která ukazuje, že akutní (300 a 500 mg/kg i.p.) nebo opakované podávání (100, 300 a 500 mg/kg i.p.) GVG vyvolalo významné na dávce závislé snížení elevace extracelulárních hladin DA v NACC a striatu vyvolané dávkou kokainu 20 mg/kg i.p. (Dewey et al., 1998). Současně je nepravděpodobné, že změna citlivosti DA receptorů po podávání GVG je zodpovědná za její oslabení vlivu kokainu, protože je známo, že opakované podávání GVG nemění citlivost D_1 nebo D_2 receptoru ve striatu laboratorního potkana. Ale neexistuje žádný důkaz, co se týče účinků GVG na jiné DA receptory (D_3 , D_4 a D_5). Alternativně je možné, že kokain může měnit funkci $GABA_B$ receptoru, a tím možná měnit uvolňování neurotransmiterů, jako je například DA, a toto může být antagonizováno GVG prostřednictvím elevace hladin GABA a následné stimulace $GABA_B$ receptorů.

Bylo také ukázáno, že opakované podávání kokainu zmenšuje účinnost presynaptických $GABA_B$ auto- a hetero-receptorů na neuronech laterálních septálních jader na řezech mozku laboratorního potkana. To může vést ke dysinhibičnímu působení a zvyšovat uvolňování neurotransmiteru. Je také možné, že baklofen může oslabovat účinek DA, a to může oslabovat účinek kokainu. To je nepřímo podporováno zjištěním Laceyho et al. (1988), který prokázal, že v intracelulárních záznamech z neuronů ze zona compacta substantia nigra laboratorního

potkana byly povrchové proudy vyvolané DA okludovány maximálními proudy vyvolanými baklofenem.

Předkládané výsledky je možné interpretovat několika způsoby. Zaprvé je možné, že GVG zvyšuje metabolismus kokainu, a tudíž snižuje množství, které zasahuje do mozku a následně snižuje jeho neurochemické účinky a nakonec jeho působení na chování. Ale toto je nepravděpodobné, protože hladiny ^{11}C -kokainu v mozku nebyly významně změněny u laboratorních potkanů nebo primátů předem ošetřených GVG (300 mg/kg). Navíc kokain je primárně metabolizován plazmatickými cholinesterázami, zatímco GVG je vylučován primárně nezměněný močí, což činí farmakokinetickou interakci nepravděpodobnou.

Bylo publikováno, že látky, které zesilují GABAergní funkci, mohou vyvolat sedaci a ataxii. V důsledku toho je rozumné předpokládat, že GVG, vyvoláním těchto nepříznivých behaviorálních účinků může nespecificky antagonizovat účinek kokainu. Ale výsledky předkládané studie ukazují, že GVG nevyvolává katalepsii ani významně nemění pohybovou aktivitu, což činí tuto hypotézu neudržitelnou. Kromě toho příklady diskutované výše ukazují, že GVG nevyvolává podmíněnou averzi prostředí, což naznačuje, že její antagonismus k účinku kokainu není výsledkem vyrovnávajícího averzivního působení. Navíc samotná GVG nevyvolává CPP, což ukazuje, že není posunuta preference zvířat z prostředí párovaného s kokainem k prostředí párovanému s GVG.

Bylo prokázáno, že podávání GVG může změnit konzumaci potravy u laboratorních potkanů. Na tomto základě je možné, že GVG může snížit nebo oslabit hedonickou hodnotu přirozené odměny, jakož i odměny vyvolané kokainem. Ale předkládaná studie prokázala, že ani 150 ani 300 mg/kg GVG nemění CPP vyvolané potravou.

Existují důkazy svědčící pro to, že chování v paradigmatu podmíněné preference prostředí (CPP) závisí jak na afektivních

vlastnostech, tak na schopnosti zlepšovat paměť objektů, se kterými se provádí zesilování, v průběhu testu. Bylo by tudíž možné namítat, že GVG způsobená blokáda exprese a akvizice CPP vyvolané kokainem je následek GVG interferující s asociací kokainem vyvolané pozitivní stimulující hodnoty příslušnými podněty prostřednictvím interference s pamětí. Je opravdu známo, že určité léky, které zesilují GABAergní funkci, mohou zhoršit paměť. Ale GVG neovlivňuje podmiňování prostředí vyvolané potravou, což svědčí pro to, že tato hypotéza nemůže vysvětlit antagonismus GVG na účinek kokainu v paradigmatu CPP.

Bylo zjištěno, že dávky GVG 112, 150 a 300 mg/kg antagonizují získání a expresi CPP vyvolané kokainem. Na rozdíl od toho GVG nevyvolává CPP nebo podmíněnou averzivní reakci na prostředí, což ukazuje, že GVG neantagonizuje účinek kokainu prostřednictvím vyvolání samotného reflexu CPP nebo prostřednictvím oslabení CPP tvorbou averzivního účinku. Navíc GVG nevyvolává katalepsii a nemění stimulující hodnotu potravy. Existují důkazy, že stimuly nebo narážky spojované s kokainem znovu navodí chování s vyžadováním návykové látky a bažení u detoxikovaných závislých uživatelů kokainu, a tím vede k relapsu. Expresi CPP vyvolaná kokainem, zjištěná při absenci kokainu, je antagonizována GVG. Tyto výsledky ukazují, že bažení prožívané uživateli závislými na kokainu může být oslabeno GVG.

Dopaminergní transmise v NACC specificky zasahuje do zesilovacích vlastností kokainu. V PET studiích diskutovaných výše byla prováděna měření spíše v corpus striatum než v NACC. Ačkoliv DA neurotransmise v corpus striatum nebyla zapojena do kokainové odměny a zesilování, účinky kokainu na extracelulární hladinu DA jsou kvalitativně podobné v obou oblastech. Kromě toho *in vivo* mikrodialyzační studie původců prokázaly schopnost GVG oslabovat kokainem vyvolané zvýšení

extracelulární hladiny DA do stejného stupně v obou oblastech (Dewey et al., 1997, Morgan a Dewey, 1998).

V předkládaném vynálezu byly použity dva odlišné živočišné druhy hlodavců a primátů pro provádění zobrazovacích a behaviorálních pokusů. Ale u obou druhů je mezokortikolimbický DA systém neuroanatomicky a neurofyzilogicky homologní. Kromě toho biochemické účinky kokainu na extracelulární DA, měřené in vivo mikrodialyzačními technikami, jsou u obou druhů stejné, a jak hlodavci, tak primáti si snadno sami aplikují kokain (Morgan et al., 1998).

Na základě experimentálních výsledků předkládaného vynálezu je konstatováno, že blokáda chování v paradigmatu CPP je způsobena oslabením účinků kokainu na mozkový DA sekundárně ke zvýšení GABAergní inhibice mezokortikolimbického DA systému vyvolané GVG.

GVG poskytuje koncepční výhodu blokování kokainových stimulujících motivačních a biochemických účinků na mozkový DA prostřednictvím ireverzibilní inhibice GABA-T, což činí de novo syntézu tohoto enzymu relativně pomalou v kroku určujícím rychlost obrácení inhibice účinků kokainu. Nedávná kasuistika osoby závislé na kokainu svědčí pro to, že gabapentin, antikonvulzivní lék, který také podporuje GABAergní transmissi prostřednictvím neznámého mechanismu, zmírnil odnětí kokainu a bažení. V souhrnu tato data ukazují, že léky selektivně cílící na GABAergní systém mohou být prospěšné pro léčbu závislosti na kokainu. Konkrétněji, GVG vyvolaná inhibice GABA-T, která vyvolává zvýšení extracelulární hladiny GABA v mozku, představuje účinnou lékovou a novou strategii léčení závislosti na kokainu.

Příklad 7

Jev senzibilizace je potenciálně pozorován u všech návykových látek. Má se za to, že senzibilizace hraje úlohu v etiologii závislosti. V tomto příkladu byl měřen účinek fyziologického roztoku a dávky 150 mg/kg i.p. GVG na expresi kokainem vyvolaného stereotypního chování po senzibilizačním režimu s kokainem u deseti volně se pohybujících laboratorních potkanů.

Zvířata dostávala 15 mg/kg i.p. kokainu a stereotypní chování se zjišťovalo ve standardních pohybových klecích. Po šest po sobě jdoucích dnů dostávala zvířata 15 mg/kg i.p. kokainu jednou denně ve svých domovských klecích. Osm dní později byl zvířatům podán opětový stimul 15 mg/kg i.p. kokainu a bylo zjišťováno stereotypní chování. Byla použita pětibodová stupnice pro stanovení stereotypního chování a hodnotící osobě nebylo známo ošetření, které každé zvíře dostalo. Bylo pozorováno, že GVG zrušila expresi kokainem vyvolané senzibilizace v dávce 150 mg/kg i.p., když byla podávána 2,5 hodiny před kokainovým podnětem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13 níže.

Tabulka 13

Účinek fyziologického roztoku a 150 mg/kg i.p. GVG na expresi kokainem vyvolaného stereotypního chování po senzibilizačním režimu s kokainem

Počet bodů stereotypního chování v den 1	Ošetření 2 hodiny před měřením počtu bodů stereotypního chování	Stereotypní chování v den 15
2,5 ± 0,4	1 ml/kg i.p. 0,9% NaCl	4,1 ± 0,5*
2,9 ± 0,4	150 mg/kg i.p. GVG	2,3 ± 0,6

* Významně vyšší než v den 1, $p < 0,05$, Studentův test

Další pokusy byly navrženy tak, aby byl zjištěn účinek GVG na nikotinem vyvolané zvýšení DA v NACC, jakož i na chování spojené s tímto biochemickým působením. Toto bylo konkrétně provedeno pomocí: 1) použití *in vivo* mikrodialýzy u volně se pohybujících naivních (nepodněcovaných) zvířat a zvířat chronicky exponovaných nikotinu pro měření působení GVG a nikotinu na extracelulární DA v NACC, 2) použití pozitronové emisní tomografie (PET) pro měření působení GVG na nikotinem vyvolané snížení vazby ^{11}C -raklopridu ve striatu samic paviánů v anestézii a 3) zjišťování účinku GVG na nikotinem vyvolanou CPP.

Příklad 8

Účinek GVG na nikotinem vyvolané zvýšení DA v NACC

1. Mikrodialyzační studie u hlodavců

V tomto příkladu byl jako návyková látka použit nikotin. Zvířatům (skupina 1) byl podáván nikotin (0,4 mg/kg, s.c.) 2,5 hodiny po podání GVG (75, 90, 100 nebo 150 mg/kg, i.p.). V oddělené řadě experimentů (skupina 2) byl zvířatům 21 dnů podáván nikotin (0,4 mg/kg, s.c., dvakrát denně). V den studie byla podávána GVG (100 mg/kg) buď 2,5, 12 nebo 24 hodin před expozicí nikotinu (0,4 mg/kg, s.c.). Ve všech studiích byla zvířata umístěna do mikrodialyzačních nádob noc před pokusem a mikrodialyzační sondy byly perfundovány umělým mozkomíšním mokem (ACSF) rychlostí průtoku 2,0 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na konci každé studie byla zvířata utracena, byly jim vyňaty mozky a nařezány pro verifikaci umístění sondy.

V 1. skupině zvířat nikotin zvýšil extracelulární koncentrace DA v NACC přibližně o 100 %, 80 minut po podání

(obrázek 5A). To znamená, že hladiny DA byly zvýšeny na přibližně 200 % bazálních hladin. DA se navrátil na bazální hladinu přibližně 160 minut po podávání látek. Toto zvýšení bylo inhibováno GVG způsobem závislým na dávce, jak je ukázáno na obrázku 5A. V dávce 75 mg/kg GVG neměla žádný účinek na nikotinem vyvolané zvýšení DA, zatímco v dávce 90 mg/kg GVG inhibovala zvýšení DA o přibližně 50 % a v dávce 100 mg/kg zcela zrušila jakékoliv zvýšení DA. Nejvyšší dávka 150 mg/kg také úplně zrušila účinek (data nejsou ukázána). Obzvláštní pozornost si zasluhuje zjištění, že ve třech vyšších dávkách (90, 100 nebo 150 mg/kg) GVG snížila bazální hladiny DA před podáním nikotinu. Nejnižší dávka (75 mg/kg) neměla žádný vliv na bazální hladiny DA a v důsledku toho neměla žádný vliv na schopnost nikotinu zvýšit extracelulární DA v NACC.

Ve 2. skupině zvířat nikotin zvýšil extracelulární hladiny DA v NACC ve stejném čase a do stejného stupně, jak bylo naměřeno v první skupině zvířat (přibližně 100 % nad bazální hladinu, obrázek 5B). Podobně výsledkům u první skupiny, když byla podávána 2,5 hodiny před podáním nikotinu, GVG (100 mg/kg) úplně zrušila nikotinem vyvolané zvýšení extracelulárního DA. Ale při podávání 12 hodin před expozicí, nikotin zvýšil extracelulární hladiny DA přibližně o 25 % nad bazální hodnoty (obrázek 5B). Ve 2. skupině zvířat, která dostala GVG 24 hodin před expozicí nikotinu, extracelulární hladiny DA se zvýšily na hodnoty stejné, jako byly hodnoty měřené u kontrolních zvířat (obrázek 5B). V souhlase s předchozími zjištěními původců (Dewey et al., 1997), GVG neměnila tělesnou pohybovou aktivitu během 2,5 hodinového intervalu předběžného ošetření. Ale nikotin zvýšil tělesnou pohybovou aktivitu u všech zvířat bez ohledu na dávku GVG, kterou dostala.

Příklad 9

2. Nikotinem vyvolaná CPP u hlodavců

Popis CPP zařízení

CPP zařízení bylo vyrobeno celé z plexiskla, kromě podlahy v jedné z párovaných komor, která byla vyrobena z desky z nerezavějící oceli s otvory (o průměru 0,5 mm) vzdálenými 0,5 mm od rohu k rohu. Dvě párované komory se lišily vizuálními a taktilními podněty. První komora byla celá světle modrá s podlahou z nerezavějící oceli a druhá komora byla světle modrá s horizontálními černými pruhy (širokými 2,5 cm) vzdálenými 3,8 cm a s hladkou podlahou z plexiskla. Tyto dvě párované komory byly odděleny třetím prostorem, neutrálním spojovacím tunelem (10 x 14 x 36 cm) se stěnami z průhledného plexiskla a podlahou z plexiskla. Vizuální a taktilní podněty byly v takové rovnováze, že zvířata neprojevovala žádnou významnou stranovou preferenci před podmiňováním.

Účinek GVG na expresi CPP u hlodavců

Podmiňovací postup se skládal ze 20 sezení prováděných postupně v průběhu 20 dnů. První tři sezení byla navykací sezení, během kterých byla zvířata držena v ruce 5 minut denně a vystavena světlu a zvukům testovací místnosti. Pak následovalo 16 sezení o 8 párováních, s 1 skupinou nosič/nosič (1 ml/kg i.p., 0,9% fyziologický roztok, $n = 10$ zvířat) nebo 7 skupinami fyziologický roztok/nikotin (0,4 mg/kg s.c.) s 10 zvířaty v každé skupině. Polovina zvířat v každé testované skupině dostala nikotin před expozicí v modré komoře a druhá polovina dostala fyziologický roztok před expozicí v komoře s modrými a černými pruhy. Zvířatům, která dostávala nosič nebo nikotin, byla podána injekce a zvířata byla uzavřena do příslušného prostoru na 30 minut pomocí dvířek z plexiskla

gilotinového typu, která blokovala přístup do ostatních částí. Konečné sezení (den 20) bylo testovací sezení, kdy zvířata dostala jedno z následujících ošetření 30 minut před pokusem: 1) fyziologický roztok nebo 2) GVG (18,75, 37,5, 75 nebo 150 mg/kg i.p.). Vchody do obou párovaných komor byly otevřeny a zvířatům byl ponechán volný pohyb mezi třemi prostory po dobu 15 minut. Délka času stráveného v každé komoře byla zaznamenávána s použitím automatizovaného infračerveného paprsku elektronicky spojeného se stopkami.

Účinek GVG na získání CPP

Zvířata byla navykána stejným způsobem, jak popsáno výše. Zvířatům byl podáván buď fyziologický roztok nebo GVG (37,5 a 75 mg/kg i.p.) 2,5 hodiny před tím, než zvířata dostala nikotin. Pak byla zvířata umístěna do příslušné komory na dobu 30 minut. To bylo opakováno v 8 párováních po dobu 16 dnů. V testovací den byla zvířata umístěna v zařízení CPP a byl jim ponechán volný přístup do všech prostorů CPP a délka doby strávená v komoře byla zaznamenávána.

Podávání fyziologického roztoku nevyvolalo preferenci komory. Ale nikotin (0,4 mg/kg s.c.) vyvolal statisticky významnou a spolehlivou reakci CPP, kdy zvířata strávila $9,6 \pm 0,6$ minut na párované (nikotin) straně ve srovnání s $5,4 \pm 0,6$ minutami na nepárované (fyziologický roztok) straně (tabulka 14 a 15). Statistická analýza expresních dat ukázala účinek ošetření ($F(5,50) = 21,6$, $p < 0,001$). Analýza *post hoc* odhalila, že GVG v dávkách 18,75, 37,5, 75,0 nebo 150 mg/kg zrušila expresní fázi nikotinem vyvolané CPP (tabulka 14), ale fyziologický roztok tak neučinil.

Analýza akvizičních dat prokázala účinek ošetření ($F(3,32) = 11,8$, $p < 0,05$). Analýza *post hoc* ukázala, že GVG (37,5 mg/kg) neblokovala významně získávání nikotinem vyvolané CPP

(tabulka 15). Na rozdíl od toho v dávce 75 mg/kg GVG významně blokovala akviziční fázi nikotinem vyvolané CPP (tabulka 15).

Tabulka 14

Účinek fyziologického roztoku a GVG na expresi reflexu podmíněné preference prostředí vyvolané (-)nikotinem 0,4 mg/kg s.c.

Párování ošetření	Léčivo podané v testovací den	Čas strávený v komorách (minuty)	
		Párovaná	Nepárovaná
Fyziologický roztok/fyziologický roztok	Fyziologický roztok ²	7,4 ± 0,3 ¹	7,6 ± 0,3
Fyziologický roztok/nikotin	Fyziologický roztok	9,6 ± 0,6	5,4 ± 0,6
Fyziologický roztok/nikotin	GVG, 18,75 mg/kg ³	7,5 ± 0,7*	7,5 ± 0,7
Fyziologický roztok/nikotin	GVG, 37,5 mg/kg	6,8 ± 1,0**	8,2 ± 1,0
Fyziologický roztok/nikotin	GVG, 75 mg/kg	6,4 ± 0,3**	8,6 ± 0,3
Fyziologický roztok/nikotin	GVG, 150 mg/kg	5,0 ± 0,9**	10,0 ± 0,9

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře ± S.E.M. Celkem 8 až 10 laboratorních potkanů bylo zkoumáno v každém pokusném párování. Všechna zvířata dostala 8 párování s nikotinem a fyziologickým roztokem před testovacím dnem. V testovací den zvířata dostala buď fyziologický roztok nebo GVG 2,5 hodiny před umístěním do zařízení CPP.

²Fyziologický roztok byl 1 ml/kg s.c. 0,9% solného roztoku.

*Významně nižší než párování fyziologický roztok/nikotin s fyziologickým roztokem v testovací den, $p < 0,05$, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

**Významně nižší než párování fyziologický roztok/nikotin s fyziologickým roztokem v testovací den, $p < 0,01$, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

Tabulka 15

Účinek fyziologického roztoku a GVG na získání reflexu podmíněné preference prostředí vyvolané (-)-nikotinem 0,4 mg/kg s.c.

Párování ošetření	Čas strávený v komorách (minuty)	
	Párovaná	Nepárovaná
Fyziologický roztok/fyziologický roztok ²	7,3 ± 0,3 ¹	7,7 ± 0,3
Fyziologický roztok/nikotin	9,6 ± 0,6 ¹	5,4 ± 0,6
Nikotin/GVG, 37,5 mg/kg, i.p.	8,8 ± 0,5	6,2 ± 0,5
Nikotin/GVG, 75 mg/kg, i.p.	6,9 ± 0,9*	8,1 ± 0,9

¹Každá hodnota představuje průměrný počet minut strávených v každé komoře ± S.E.M. Celkem 8 až 10 laboratorních potkanů bylo zkoumáno v každém pokusném párování. Zvířata byla předem ošetřena buď s fyziologickým roztokem, dávkou 37,5 nebo 75 mg/kg i.p. GVG a 2,5 hodiny později každé zvíře dostalo 0,4 mg/kg s.c. nikotinu, kromě jedné skupiny, která dostala fyziologický roztok následovaný fyziologickým roztokem (párování fyziologický roztok/fyziologický roztok). U každého zvířete bylo provedeno 8 párování.

²Fyziologický roztok byl 1 ml/kg s.c. 0,9% solného roztoku.

*Významně nižší než párování fyziologický roztok/nikotin s fyziologickým roztokem v testovací den, $p < 0,05$, ANOVA a Studentův-Newmanův-Keulsův test.

PET studie na primátech

Pro všechny zobrazovací studie byly použity dospělé samice paviána ($n = 16$) (*Papio anubis*, 13 až 18 kg) a rakloprid značený uhlíkem-11 (^{11}C -rakloprid). Zvířata byla rozmístěna do 5 skupin, jak je detailně uvedeno v tabulce 16. Kontrolní zvířata (skupina 1) dostala dvě injekce ^{11}C -raklopridu bez intervence jakéhokoliv léku, aby se zjistila variabilita testu/opakovaného testu při měření. Tato data byla publikována dříve (Dewey et al., 1998). Druhá skupina zvířat dostala samotnou GVG (300 mg/kg) 2,5 hodiny před druhou injekcí ^{11}C -raklopridu. Jako u první skupiny zvířat byla tato data publikována dříve (Dewey et al., 1992). Třetí skupina dostala samotný nikotin (0,3 mg celkem, přibližně 0,02 mg/kg) 30 minut před druhou injekcí ^{11}C -raklopridu. V kombinované studii GVG/nikotin byla GVG podávána intravenózně (i.v.) v dávkách 100 (skupina 4) nebo 300 mg/kg (skupina 5) 2,5 hodiny před podáváním nikotinu. Nikotin (0,3 mg celkem, i.v.) byl podáván 30 minut před druhou injekcí ^{11}C -raklopridu. V průběhu studie byly odebírány vzorky arteriální krve a vybrané vzorky plazmy byly analyzovány na výskyt nezměněného ^{11}C -raklopridu. Zvířata nebyla mezi injekcemi izotopu přesunuta z portálu. Analýza dat byla prováděna s použitím Loganovy metody, jak byla detailně popsána dříve (Logan et al., 1990).

Každý primát ($n = 16$) dostal dvě injekce ^{11}C -raklopridu. První sloužila jako bazální hodnota pro druhou injekci, která následovala po GVG, nikotinu nebo po obou látkách. Testování/opětně testování primátů ($n = 7$, skupina 1, tabulka 16) dostali placebo (0,9% fyziologický roztok, 1 ml/kg) 30 minut před druhou injekcí radioaktivního indikátoru, aby se určila variabilita testu/opakovaného testu metody. Všichni

zbývajících primátů ($n = 9$) dostali systémovou injekci GVG, nikotinu nebo obou před druhou injekcí ^{11}C -raklopridu.

Jak bylo publikováno dříve (Dewey et al., 1998), variabilita testu/opakovaného testu průměrného poměru distribučního objemu (DV) značeného raklopridu ve striatu primátů byla nepatrně vyšší než 7 % (tabulka 17). Podávání GVG (300 mg/kg, skupina 2) významně zvýšilo průměrný poměr DV o 18 % (tabulka 17). Tato data jsou konzistentní s mikrodialyzačními studiemi prokazujícími, že GVG na dávce závisle zvyšuje extracelulární DA u volně se pohybujících zvířat. Podávání nikotinu (skupina 3) ale vyvolalo opačný účinek GVG a významně snížilo průměrný poměr DV o 12 % (tabulka 17). To je opět konzistentní s mikrodialyzačními daty původců, která prokazují, že nikotin zvyšuje extracelulární DA u volně se pohybujících zvířat. Když je podávána následně, GVG (100 mg/kg, skupina 4) zrušila snížení průměrného poměru DV vyvolaného samotným nikotinem (skupina 3). Při této dávce GVG byl průměrný poměr DV podobný jako hodnota v testu/opakovaném testu získaná v první skupině zvířat (9 %, tabulka 17). Ale při podávání v dávce 300 mg/kg (skupina 5) byl průměrný poměr DV pro značený rakloprid významně vyšší (15 %) než hodnota v testu/opakovaném testu a byl ve skutečnosti obdobný hodnotám získaným ve druhé skupině zvířat, která dostala samotnou GVG (tabulka 17).

Bylo pozorováno, že GVG, nikotin nebo obě látky nezměnily rychlost systémového metabolismu značeného raklopridu ani regionální distribuci radioaktivního indikátoru. Regenerace v každé studii byla nevýznamná.

Tabulka 16

Skupiny pro PET studie na primátech

Skupina	Podmínky
1	Test/opakovaný test (žádná expozice)
2	GVG (300 mg/kg)
3	Nikotin (0,3 mg/kg)
4	GVG (100 mg/kg), nikotin (0,3 mg/kg)
5	GVG (300 mg/kg), nikotin (0,3 mg/kg)

Tabulka 17

Účinky expozice látek na průměrný poměr DV

Skupina	% změny průměrného poměru DV
1	7,16 ± 1,2
2	18,8 ± 3,2
3	-12,3 ± 2,6
4	9,45 ± 2,1
5	15,1 ± 2,8

Diskuse k experimentálním výsledkům získaným v příkladu 9

V tomto příkladu původci prokázali, že nikotin (0,4 mg/kg s.c.) zvýšil DA v NACC o přibližně 100 % (nebo 200 % nad bazální hodnotu) u volně se pohybujících zvířat přibližně 80 minut po podání. Předešlé mikrodialyzační studie popisovaly, že podávání nikotinu v dávkách 0,6 nebo 0,8 mg/kg (s.c.) vyvolalo 220% a 179% zvýšení extracelulárních hladin DA v NACC, v daném pořadí, (Di Chiara a Imperato, 1988, Imperato et al., 1986, Brazell et al., 1990). Ačkoliv nebyly výsledky původců přímo srovnatelné, jsou jasně v linii s těmito

dřívějšími závěry. Navíc u zvířat původců, která byla exponována chronicky nikotinu, vyvolala expozice nikotinu 90% zvýšení extracelulárních hladin DA v NACC. Tento nálezn je konzistentní s předešlými daty ukazujícími, že chronické podávání nikotinu nevyvolává toleranci nebo senzibilizaci na akutní expozici nikotinu (Damsma et al., 1989).

Co se týče zjištění původců při použití GVG, původci prokázali, že GVG inhibovala způsobem závislým na dávce nikotinem vyvolané zvýšení DA v NACC jak u naivních zvířat, tak u zvířat chronicky exponovaných nikotinu. Toto je první studie, která uvádí takový účinek GVG. V dávce 75 mg/kg GVG neměla žádný účinek, protože nikotin zvýšil extracelulární DA téměř na 200 %, zatímco dávka 90 mg/kg vyvolala inhibici téměř 50%. Ve dvou nejvyšších zkoumaných dávkách (100 a 150 mg/kg) GVG úplně zrušila nikotinem vyvolané zvýšení extracelulárních hladin DA v NACC. Původci dříve prokázali, že akutní injekce GVG (300 mg/kg i.p.) vyvolala 25% snížení kokainem vyvolaného zvýšení DA v NACC (Dewey et al., 1989). Ale chronické ošetření s GVG v podobné dávce vyvolalo větší inhibici (Morgan a Dewey, 1998). Dohromady tato data ukazují, že dávka GVG potřebná k významnému oslabení návykovou látkou vyvolaného zvýšení hladin DA v NACC je závislá nejenom na exponované použité droze (např. kokain, nikotin), ale také na dávce, ve které je stimulující návyková látka podávána.

Předkládaná data dále dokazují, že účinnost GVG je ve vztahu k její schopnosti závislé na dávce snížit bazální koncentrace DA před expozicí droze. Například dávka 75 mg/kg neměla žádný účinek na bazální DA a na nikotinem vyvolané zvýšení DA. Ale v dávce buď 90 nebo 100 mg/kg GVG snížila bazální hladiny DA a redukovala o 50 % nebo zrušila účinky nikotinu, v daném pořadí. Tudíž se zdá, že na dávce závislé oslabení buď nikotinem nebo kokainem vyvolaných zvýšení DA v NACC je způsobeno předchozím snížením bazálních koncentrací

DA, následně ke zvýšení endogenní GABA vyvolanému GVG. To je konzistentní s daty ukazujícími, že augmentace GABAergní funkce redukuje DA v NACC.

Pro rozšíření předešlé práce původců s GVG a kokainem zkoumali původci časový průběh GVG působení na nikotinem vyvolané zvýšení DA v NACC u zvířat chronicky exponovaných nikotinu 21 dnů. Když byla GVG podávána 2,5 hodiny před nikotinem v dávce 100 mg/kg, úplně zrušila návykovou látkou vyvolané zvýšení DA v NACC. Ale když byla podávána ve stejné dávce 12 hodin před expozicí, nikotin zvýšil extracelulární DA přibližně o 25 %.

GVG neměla žádný vliv na nikotinem vyvolané zvýšení DA v NACC, když byla podávána 24 hodin před expozicí nikotinu ve stejné dávce. Mikrodialyzační a behaviorální data původců jasně ukazují, že dokonce i malé změny GABA-T inhibice vyvolané zvýšením dávek GVG, mají silný účinek na inhibici nikotinem vyvolaných zvýšení DA v NACC a CPP.

Tato data jsou obzvláště zajímavá ve světle rychlosti syntézy GABA-T, poločasu GVG v mozku hlodavců, trvání působení na GABA a na strmé křivce závislosti na dávce uvedené zde detailně. Předešlé nálezy dokazují, že biologický poločas GABA-T v mozku hlodavců je 3,4 dne, zatímco poločas GVG v mozku je přibližně 16 hodin. Navíc celkové hladiny GABA v mozku nezačínají klesat až do 24 hodin po akutním podání GVG (Jung et al., 1977). Nepoměr mezi trvalými hladinami GABA v mozku měřenými 24 hodin po jedné dávce GVG a normální reakcí na expozici nikotinu pozorované ve stejnou dobu svědčí pro to, že GABAergní inhibice mezotelencefalické dráhy odměny nemusí být jednoduchým odrazem celkové hladiny GABA v mozku. Tudiž, zatímco celková hladina GABA v mozku je ještě významně zvýšena 24 hodin po akutní dávce GVG, mohou být malé funkční odlišnosti ve specifických drahách maskovány těmito celkovými měřeními. Konečně je možné, že GABA receptory přestaly být po

dobu těchto 24 hodin na GABA citlivé, ale původci si nejsou vědomi jakéhokoliv důkazu v GABA systému, který by podporoval takovou hypotézu.

V předkládané studii původci prokázali, že 8 párování fyziologický roztok-nikotin vyvolalo spolehlivý reflex CPP. Výsledky původců jsou v soulase s předchozími studiemi ukazujícími, že nikotin (0,1-1,2 mg/kg s.c.) vyvolává závislost na dávce u reflexu CPP u samců kmene Sprague-Dawley (Fudala et al., 1985, Fudala a Iwamoto, 1986). Původci také ukázali, že zvířata kmene Lewis, ale ne zvířata F344, vykazovali reflex CPP vyvolaný nikotinem po 10 párování (Horan et al., 1977). Ale dřívější publikace ukázala, že 4 párování nikotin-nosič nevyvolala reflex CPP u samců pokusných zvířat (Clarke a Fibiger, 1987). Tudíž se zdá, že nikotinem vyvolaná CPP může být závislá na živočišném druhu, ačkoliv toto může být mařeno faktem, že citované studie používaly odlišný počet párování. Nikotinem vyvolaný reflex CPP popisovaný v předkládané studii je konzistentní s teorií, že nikotin vyvolává pozitivní účinek na stimulující motivační chování.

Tato data poprvé dokazují, že GVG může blokovat biochemické a behaviorální účinky nikotinu při použití paradigmatu CPP. Data CPP jasně ukazují, že v dávce už tak nízké jako je 18,75 mg/kg, GVG zrušila expresi reflexu CPP vyvolanou nikotinem. Data původců také ukazují, že dávka 75 mg/kg, ale už ne dávka 37,5 mg/kg, blokovala získání reflexu CPP na nikotin. Na základě těchto zjištění o dávkách může být dávka GVG potřebná pro léčení ukončení kouření celkově 250 až 500 mg denně (ve srovnání s 2 až 4 gramy denně u epilepsie), rozmezí značně nižší než dávky podávané epileptikům.

Působení GVG na nikotinem vyvolanou CPP není pravděpodobně ve vztahu s GVG vyvoláním odměňujícího nebo averzivního účinku, protože původci dříve prokázali, že samotná GVG (75 až

300 mg/kg i.p.) nevyvolává CPP nebo averzi (Dewey et al., 1998). Dále je nepravděpodobné, že GVG ruší behaviorální působení nikotinu interferencí s pamětí nebo pohybovou aktivitou, protože GVG neblokuje potravní odměnu nebo pohybovou aktivitu v dávkách i tak vysokých, jako je 300 mg/kg (Dewey et al., 1998).

Konečně bylo ukázáno, že GVG není autoaplikována opicemi rhesus a zvířata odstavená z chronického ošetřování GVG neprojevují abstinenční známky nebo příznaky (Takada a Yanagita, 1997). Tudíž GVG na rozdíl od jiných léčiv používaných ve farmakoterapii určitých drogových závislostí (např. metadon, antabus) není sama o sobě návyková a nevyvolává významné averzivní účinky.

Oslabení získávání reflexu CPP na nikotin prostřednictvím GVG může být interpretováno jako snížení pozitivní stimulující hodnoty nikotinu. Tato data ukazují, že GVG snižuje pravděpodobnost, že zvíře získá asociaci pozitivního stimulujícího účinku po podávání nikotinu. Je zajímavé, že výsledky původců ukazují, že dávka GVG nutná pro blokádu expresní fáze reflexu CPP vyvolávané nikotinem byla 1/4 množství potřebného pro blokádu získávání reflexu CPP. Tento náález je souhlasný s předchozími daty původců, což naznačuje, že vyšší dávka GVG byla vyžadována pro blokádu akvizice, na rozdíl od exprese CPP na kokain (Dewey et al., 1998). Vysvětlení tohoto rozdílu je neznámé. Protože GVG oslabuje expresi reflexu CPP na nikotin, toto dokazuje, že GVG zmírňuje chování zvířete vyhledávající návykovou látku, protože zvíře již získalo pozitivní stimulující hodnotu návykové látky.

Tudíž data původců ukazují, že GVG může být účinnější při bloádě bažení po nikotinu, než je při blokování pozitivní stimulující hodnoty nebo odměňujícího účinku nikotinu. Konečně v nejvyšší testované dávce, 150 mg/kg, GVG vyvolala významnou averzivní reakci v testovací den (tabulka 15), kdy zvířata

strávila $5,0 + 0,9$ na párované (nikotin) straně a $10,0 + 0,9$ minut na nepárované (fyziologický roztok) straně. Tato data svědčí pro to, že zde může být horní hranice, při které se GVG ve vysokých dávkách stane averzivní u zvířat ošetřených nikotinem a testovaných ve stavu bez návykové látky. Tato data mohou mít důsledky při vývoji dávkových limitů při testování v lidských klinických zkouškách.

Na základě znalosti původců paradigmatu CPP, data původců podporují následující výsledky. V paradigmatu CPP jsou zvířata testována ve stavu bez návykové látky, aby se určilo zda preferují prostředí, ve kterém dříve dostávala nikotin, ve srovnání s prostředím, ve kterém dříve dostávala fyziologický roztok. Jestliže si zvíře ve stavu bez návykové látky konzistentně vybírá prostředí dříve spojované s nikotinem, je vyvozen závěr, že apetitivní hodnota nikotinu byla zakódována do mozku a je dostupná ve stavu bez návykové látky (Gardner, 1997). Opravdu v testovací den může být přístup a asociace zvířat se stranou párovanou s návykovou látkou považovány za chování vyhledávající návykovou látku. V podstatě stimuly z okolí a další stopy, které byly dříve neutrální nebo postrádaly význačnost, se staly během opakovaného párování s nikotinem charakteristickými. Pak když jsou zvířata znovu vystavena těmto podnětům, vyvolává se reflex CPP, tj. podněty mohou vyvolat účinek návykové látky. Tudíž podněty spojené s návykovou látkou vyvolávají Pavlovův podmíněný reflex.

To je kritické, protože je známo, že nefarmakologické faktory, kromě farmakologických faktorů, hrají roli ve zprostředkování stimulující hodnoty návykových látek (Jarvik a Henningfield, 1988). Opravdu bylo klinicky dokázáno, že u detoxikovaných závislých uživatelů může expozice stimulům, které byly dříve spojeny s užíváním návykové látky, vyvolat relaps (Childress et al., 1986a,b, Childress et al., 1988, Ehrman et al., 1992, O'Brien et al., 1992, Wikler, 1965). Tato

data tudíž ukazují, že protože GVG blokuje expresi nikotinem vyvolaného reflexu CPP, pak GVG blokuje bažení nebo vyhledávání nikotinu. Proto je GVG účinná v léčení jedinců, kteří si přejí skončit s kouřením cigaret. Tato data dále ukazují, že GVG je účinná ve zrušení exprese reflexu CPP na nikotin a může oslabit bažení navzdory podnětům prostředí dříve spojeným s kouřením.

PET data na primátech ve studii původců jsou konzistentní s předchozími nálezy při použití mnohonásobné farmakologické expozice, která prokazuje, že vazba ^{11}C -raklopridu je senzitivní jak na zvýšení, tak na snížení synaptického DA (Dewey et al., 1993, Seeman et al., 1989). Jak je dokázáno u třetí skupiny zvířat (tabulka 17), průměrný poměr DV byl konzistentně snížen relativně k bazálním hodnotám po podávání nikotinu. Toto snížení přesáhlo variabilitu testu/opakovaného testu značeného raklopridu a je menší než snížení měřené s GBR-12909 (Dewey et al., 1993) nebo skopolaminem (Dewey et al., 1993). Předběžné ošetření s GVG v dávce 100 mg/kg 2,5 hodiny před nikotinem vyvolalo průměrný poměr DV podobný první skupině zvířat (tabulka 17). Ale když dávka GVG byla zvýšena na 300 mg/kg, průměrný poměr DV byl zvýšen na hodnoty konzistentní s druhou skupinou zvířat. Tato data ukazují, že nižší dávka GVG vyvolala snížení synaptického DA zhruba rovnocenné ke zvýšení vyvolanému nikotinem, zatímco vyšší dávka GVG vyvolala snížení, které daleko přesáhlo schopnost nikotinu zvýšit DA. Mikrodialyzační studie původců podporují tato data, že vyšší dávky GVG vyvolávají vyšší snížení extracelulárního DA u volně se pohybujících zvířat.

Závěry mikrodialyzačních a PET studií spojených s daty CPP ukazují, že zvýšení DA v NACC samotné tvoří základ náchylnosti k závislosti na návykových látkách. Zaprvé tato data ve spojení s výše uvedenými daty pro kokain ukazují, že *in vivo* mikrodialyzační studie nebo PET měření samotného endogenního

DA nevypovídají nezbytně o účinnosti léčiv použitých pro léčení nemocí, o kterých je předpokládáno, že jsou specificky neurotransmitterového původu. Zadruhé jak mikrodialyzační data, tak data PET jasně prokazují, že v dávce 100 mg/kg GVG úplně blokovala nikotinem vyvolané zvýšení hladin DA v NACC, zatímco dávka 75 mg/kg nebyla účinná. Na rozdíl od toho, GVG, v dávce tak nízké, jako je 18,75 mg/kg, úplně zrušila expresní fázi nikotinem vyvolané CPP, zatímco pro zrušení akviziční fáze byla zapotřebí dávka 75 mg/kg.

Na základě křivky dávka-reakce získané z mikrodialyzačních dat nebylo očekáváno, že GVG v dávce 18,75 mg/kg má nějaký účinek na nikotinem vyvolané zvýšení DA v NACC. Navíc podobný účinek byl pozorován při použití kokainu, kdy dávka 300 mg/kg GVG redukovala kokainem vyvolané zvýšení hladin DA v NACC o 25 %, zatímco dávka 150 mg/kg úplně zrušila expresní a akviziční fázi kokainem vyvolané CPP (Dewey et al., 1997, 1998).

V souhrnu tato data naznačují alespoň dvě přijatelná a snad asociovaná vysvětlení. Zaprvé odlišné změny v DA po farmakologické expozici v jiných oblastech než v samotném NACC mohou být zodpovědné za náchylnost k návyku na konkrétní látku. Bylo opravdu publikováno, že různé návykové látky mohou měnit hladiny DA v oblastech mozku jiných než NACC, včetně amygdaly, corpus striatum a frontálního kortexu (Hurd, et al., 1997, Dewey et al., 1997, Di Chiara a Imperato, 1988, Marshall, et al., 1997). Zadruhé neurotransmitery jiné než DA mohou mít zásadně důležitou úlohu pro náchylnost k návyku na návykové látky. Například reflex CPP na kokain stále přetrvává u myší, které postrádají přenašeče DA a 5-HT (Sora et al., 1998, Rocha et al., 1998). Navíc je známo, že neurotransmitery, jako je například 5-MT, acetylcholin, enkefaliny a glutamát, mají úlohu ve zprostředkování účinků návykových látek, včetně nikotinu (Bardo, 1988, Gardner,

1997). V souhrnu tato data ukazují, že GVG inhibuje účinky kokainu a nikotinu prostřednictvím změn DA v oblastech jiných než NACC. Jako průvodní jev může GVG inhibovat další neurotransmitery, které buď modulují DA přímo nebo jsou sami zapojeny do zprostředkování účinků návykových látek. Další studie navržené tak, aby vyhodnotily mnohonásobné účinky GVG na další neurotransmitery, stále pokračují.

Původci dříve prokázali, že schopnost GVG snížit kokainem vyvolané zvýšení DA v NACC je úplně zrušena předběžným ošetřením zvířat selektivním antagonistou GABA_B receptoru SCH 50911 (Bolser et al., 1995), léčivem, které nemění významně hladiny DA, je-li podáváno samotné. Tudíž může být dokázáno, že GVG ruší působení nikotinu prostřednictvím zvýšení hladin GABA, které pak stimulují GABA_B receptory. To je konzistentní s daty ukazujícími, že podávání baklofenu, selektivního agonisty GABA_B (Bowery a Pratt, 1992, Kerr et al., 1990), do VTA významně oslabuje reflex CPP u zvířat, kde byl vyvolán systémovým podáním morfinu (Tsuiji et al., 1995). Navíc systémové podávání baklofenu oslabuje autoaplikaci kokainu progresivně a podle schématu odděleného pokusu (Roberts et al., 1996, 1997).

Lze namítat, že GVG oslabuje farmakologické a behaviorální působení nikotinu jednoduše změnou množství, které účinně vstupuje do mozku buď změnou permeability hematoencefalické bariéry nebo zvýšením rychlosti systémového metabolismu nikotinu. Tato možnost je nepravděpodobná z mnoha důvodů. Zaprvé GVG neměla žádný účinek na transport ¹¹C-kokainu, alkaloidu, o kterém bylo již dříve prokázáno, že zvyšuje DA v NACC, přes hematoencefalickou bariéru v mozku jak hlodavců, tak primátů. Zadruhé GVG je vyměšována primárně v nezměněné formě ledvinami (Grant a Heel, 1991, Porter a Meldrum, 1998), zatímco nikotin je metabolizován enzymy v játrech. Konečně GVG neinteraguje s jaterními mikrozomálními enzymy (Grant a Heel,

1991, Porter a Meldrum, 1998), a tudíž tyto enzymy neindukuje ani neinhibuje.

Velikost NACC je značně pod rezolucí tomografu původců, což řadí jeho specifickou analýzu mimo schopnosti této techniky. Analýza původců tudíž zahrnuje corpus striatum, bilaterálně, a cerebellum. Marshall et al. (1995) prokázali, že nikotin zvyšoval DA do stejné míry jak v NACC, tak v corpus striatum, zatímco mikrodialyzační data původců dokazují, že GVG koncentraci DA v obou oblastech také snižovala (Dewey et al., 1997). Tato data ze studie na primátech dále podporují použití této zobrazovací techniky pro vyhodnocení funkčních následků farmakologické expozice v intaktním živém mozku.

Navíc tato lékařská zobrazovací technika poskytuje unikátní okénko do interakcí, o kterých bylo prokázáno, že existují mezi funkčně spojenými neurotransmitery jak v mozku primátů, tak člověka.

Ve spojení s obsažnou literaturou podporující základní princip, že neurotransmitery interagují jak ve funkčně specifických, tak v regionálně specifických neuroanatomických ložiscích, se stává stále více jasné, že nové léčebné strategie pro mozkové poruchy (včetně závislosti na kokainu, nikotinu, heroinu, metamfetaminu a alkoholu) mohou být realizovány s komplexnějším vědomím tohoto základního a dobře doloženého principu. Zatímco změny v koncentraci jednotlivých neurotransmiterů mohou být skutečně základem etiologie specifické poruchy, je pravděpodobné, že progrese nemoci a rozvoj symptomů jsou spojeny s kompenzačními nebo nemocí vyvolanými změnami v dalších neurotransmiterech funkčně spojených s původním cílem. S touto znalostí původci vyvinuli novou léčebnou strategii specificky navrženou tak, aby změnila jednoho nebo více neurotransmiterů tak, že míří na jiný neurotransmitter. Výsledky původců s nikotinem, kokainem,

metamfetaminem, alkoholem a GVG mají velký užitek pro léčení savců závislých na návykových látkách.

Příklad 10

Účinek GVG na metamfetaminem vyvolané zvýšení DA v NACC

V tomto příkladu byly studovány účinky GVG na metamfetaminem vyvolané změny koncentrace dopaminu v NACC na 6 až 8 volně se pohybujících laboratorních potkanec. Zvířatům byl podáván metamfetamin v dávce 1,25 mg/kg i.p. a 2,5 mg/kg i.p. Bylo pozorováno, že metamfetamin zvýšil koncentrace extracelulárního DA v NACC o přibližně 2500 % nad bazální hodnoty, 100 minut po podání 2,5 mg/kg a přibližně o 1500 % nad bazální hodnoty po podání 1,25 mg/kg (obrázek 6). DA se vrátil na bazální hladinu přibližně 200 minut po podání látky.

Když byla podávána GVG před podáním metamfetaminu, inhibovala GVG závisle na dávce zvýšení DA, jak je ukázáno na obrázku 7. V dávce 300 mg/kg GVG inhibovala zvýšení DA o přibližně 38 % a v dávce 600 mg/kg inhibovala zvýšení DA o přibližně 58 %. Tato data dokazují, že GVG inhibuje metamfetaminem vyvolané zvýšení koncentrace extracelulárního dopaminu v NACC.

Tudíž z výše uvedených dat lze zaznamenat, že určené pořadí nikotinu, kokainu a metamfetaminu ve zvyšování hladin DA v NACC je metamfetamin (2500 %) > kokain (450 %) > nikotin (90 %), což je obdobné definovanému pořadí velikosti akutní dávky GVG potřebné k významnému snížení látkou vyvolaného zvýšení DA v NACC.

Příklad 11

Účinek GVG na etanolem vyvolané zvýšení DA v NACC

V tomto příkladu byly studovány účinky GVG na etanolem vyvolané změny koncentrace dopaminu v NACC na 6 až 8 volně se pohybujících laboratorních potkanech. Zvířatům byl podáván etanol v dávce 1,0 g/kg i.p. Etanol zvýšil koncentrace extracelulárního DA v NACC o přibližně 200 % nad bazální hodnoty přibližně 125 minut po podání etanolu.

Když byla podávána GVG v dávce 300 mg/kg, inhibovala zvýšení DA o přibližně 50 % (obrázek 8). Také v dávce 100 mg/kg GVG významně inhibovala, o přibližně 40 %, schopnost alkoholu zvýšit dopamin v nucleus accumbens u volně se pohybujících laboratorních potkanů (data nejsou ukázána). Tato data dokazují, že GVG inhibuje etanolem vyvolané zvýšení koncentrace extracelulárního dopaminu v NACC.

Příklad 12

Účinek GVG na kokainem/heroinem vyvolané zvýšení DA v NACC

V tomto příkladu původci vyšetřovali účinky GVG na synergické zvýšení DA v NACC po expozici kokainu/heroinu („speedball“). In vivo mikrodialyzační studie byly prováděny s použitím samců laboratorních potkanů kmene Sprague-Dawley (Taconic Farms), jak uvedeno detailně dříve (Morgan a Dewey, 1998). Kokain, inhibitor zpětného vstřebávání dopaminu, byl podáván (n = 6-8) v dávce 20 mg/kg (i.p.), zatímco heroin, nepřímě uvolňující dopamin, byl podáván (n = 6-8) v dávce 0,5 mg/kg (i.p.). Ve studiích navržených pro zkoumání synergického účinku kombinace kokain/heroin (n = 6-8) byly obě

návykové látky podávány v dávce stejné, jako byla použity ve studiích s jednotlivou návykovou látkou. Samotný kokain vyvolal výrazné zvýšení extracelulárního DA o přibližně 380 % nad bazální hodnoty, 60 minut po podání. DA se vrátil na bazální hodnoty během 120 minut. Na rozdíl od toho, heroin zvýšil DA v NACC pouze o 70 %, 60 minut po podání, s návratem na bazální hodnoty během 140 minut. Ale v kombinaci tyto dvě návykové látky vyvolaly zvýšení DA v NACC o přibližně 1000 %, 180 minut po podání, které se nevrátilo na bazální hodnoty do 200 minut po dosažení vrcholových hodnot (obrázek 9). Toto zvýšení bylo významně odlišné ($p > 0,001$) od samotného kokainu nebo heroinu.

Tato neurochemická synergie, ve srovnání s aditivním účinkem, byla zřejmá nejenom ve velikosti zvýšení DA v NACC, ale také v délce doby, ve které bylo dosaženo vrcholového zvýšení a návratu na bazální hodnoty. Jednotlivě každá návyková látka vyvolávala maximální zvýšení během 60 minut po expozici, ale když byly kombinovány, toto maximální zvýšení bylo dosaženo po téměř třikrát delší době, než u každé návykové látky samotné. Navíc návrat na bazální hodnoty trval značně déle při odděleném srovnání s každou návykovou látkou. Tato zjištění ukazují, že trvání euforie je mnohem delší, když jsou obě návykové látky užívány v kombinaci oproti oddělenému užívání.

S ohledem na absolutní velikost reakce, GVG úplně zrušila synergické účinky po expozici kombinaci návykových látek. U zvířat, která dostala GVG (300 mg/kg, i.p.) 2,5 hodiny před expozicí, DA v NACC se zvýšil o přibližně 500 %, 180 minut po expozici (obrázek 9). Toto zvýšení bylo významně odlišné jak od samotného kokainu, tak od samotného heroinu ($p > 0,05$ a $0,001$, v daném pořadí) a kombinace kokainu/heroinu ($p > 0,001$). Data získaná po předběžném ošetření s GVG jsou podobná

aditivnímu účinku jak kokainu (380 %) a heroinu (70 %) ve srovnání se synergickým účinkem.

I když GVG zrušila synergický účinek obou návykových látek na absolutní velikost zvýšení, neovlivnila časové aspekty reakce. Po podávání GVG a následné expozici kokainu/heroinu, DA v NACC dosáhl maximální koncentrace během 180 minut, což je totožné s reakcí měřenou u zvířat, která nedostala GVG před expozicí.

Výsledky tohoto příkladu ukazují, že GVG účinně oslabila synergické zvýšení DA v NACC vyvolané expozicí kokainu/heroinu. Ve spojení s předešlými studiemi původců tyto nálezy ukazují účinnost GVG pro léčení návyku na více návykových látkách.

Výše uvedené příklady prokazují, že léčiva, která selektivně cílí GABAergní systém, mohou být prospěšná pro léčbu návykových látek, jako jsou například psychostimulační látky, narkotická analgetika, alkoholy a nikotin nebo jejich kombinace. Konkrétněji GVG vyvolaná inhibice GABA-T, která vyvolává zvýšení extracelulárních hladin GABA v mozku, představuje účinnou lékovou a novou strategii pro léčbu závislosti na kokainu, nikotinu, heroinu, metamfetaminu a etanolu.

Tedy, zatímco zde byla popisována v současnosti výhodná provedení předkládaného vynálezu, odborníci si jsou vědomi toho, že mohou být učiněna jiná a další provedení bez odchýlení se od původní vynálezecké myšlenky, a všechny takové další modifikace a změny jsou zahrnuty do předmětu patentových nároků dále uvedených.

REFERENCES

- Bardo, M.T. (1998) Neuropharmacological mechanism of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 12: 37-67.
- Bolser, D.C., Blythin, D.J., Chapman, R.W., Egan, R.W., Hey, J.A., Rizzo, C., Kuo S.-C., Kreutner, W. (1995) The pharmacology of SCH 50911: A novel, orally-active GABA-B receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 274: 1393-1398.
- Bowery, N.G., Pratt, G.D. (1992) GABAB receptors as targets for drug action *Arzneim. Forsch.*, 42: 215-223.
- Brazell, M.P., Mitchell, S.N., Joseph, M.H., Gray, J.A. (1990) Acute administration of nicotine increases the in vivo extracellular levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and ascorbic acid preferentially in the nucleus accumbens of the rat: Comparison with caudateputamen. *Neuropharmacology*, 29: 1177-1185.
- Chesselet, M.-F. (1984) Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: Facts and hypothesis. *Neuroscience*, 12: 347-375.
- Childress, A.R., McLellan, A.T., O'Brien, C.P. (1988) The role of conditioning factors in the development of drug dependence. *Psychiatr. Clin. North Amer.*, 9: 413-426.
- Childress, A.R., McLellan, A.T., Ehrman, R.N., O'Brien, C.P. (1986a) Extinction of conditioned responses in abstinent cocaine or opioid users. *NIDA Res. Monogr.*, 76: 189-195.
- Childress, A.R., McLellan, A.T., Ehrman, R.N., O'Brien, C.P. (1986b) Classically conditioned responses in abstinent cocaine or opioid users. *NIDA Res. Monogr.*, 76: 24-43).

Clarke, P.B.S., Fibiger, H.C. (1987) Apparent absence of nicotine-induced conditioned place preference. *Psychopharmacology*, 92: 84-88.

Clarke, P.B.S., Fu, D.S., Jakubovic, A., Fibiger, H.C. (1988) Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246: 701-708.

Damsma, G., Day, J., Fibiger, H.C. (1989) Lack of tolerance to nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.*, 168: 363-368.

Dewey, S.L., Chaurasia, C.S., Chen, C., Volkow, N.D., Clarkson F.A., Porter, S.P., Straughter-Moore, R.M., Alexoff, D.L., Tedeschi, D., Russo, N.B., Fowler, J.S. and Brodie, J.D. GABAergic attenuation of cocaine-induced dopamine release and locomotor activity. *Synapse* 25: 393-398, 1997.

Dewey, S.L., Morgan, A.E., Ashby, Jr., C.R., Horan, B., Gardner, E.L., Logan, J., Volkow, N.D., Fowler, J.S., Kushner, S.A., Brodie, J.D. (1998) A novel strategy for the treatment of cocaine addiction. *Synapse*, 30: 119-129.

Dewey, S.L., Smith, G.S., Logan, J., Brodie, J.D., Yu, D-W., Ferrieri, R.A., King, P.T., MacGregor, R.R., Martin, T.P., Wolf, A.P., Volkow, N.D., Fowler, J.S. GABAergic inhibition of endogenous dopamine release measured in vivo with ¹¹C-raclopride and positron emission tomography. *J. Neuroscience* 12,3773-3780, 1992.

Dewey, S.L., Smith, G.S., Logan, J., Brodie, J.D., Fowler, J.S., Wolf, A.P. Striatal binding of the PET ligand ¹¹C-raclopride is altered by drugs that modify synaptic dopamine levels. *Synapse* 13, 350-356, (1993).

Dewey, S.L., Smith, G.S., Logan, J., Simkowitz, P., Brodie, J.D., Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wolf, A.P. (1993) Effects of central cholinergic blockade on striatal

dopamine release measured with positron emission tomography (PET) in normal human subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 11816-11820.

Di Chiara, G., Imperato, A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5274-5278.

Ehrman, R.N., Robbins, S.J., Childress, A.R., O'Brien, C.P. (1992) Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. *Psychopharmacology*, 107: 523-529.

Fudala, P.J., Iwamoto, E.T. (1986) Further studies on nicotine-induced conditioned place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 25: 1041-1049.

Fudala, P.J., Teoh, K.W., Iwamoto, E.T. (1985) Pharmacologic characterization of nicotine induced conditioned place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 22: 237-241.

Gardner, E.L. (1997) Brain reward mechanisms in Substance Abuse: A Comprehensive Textbook, 3rd ed., eds. Lowinson, J.H., Ruiz, P., Millman, R.B. & Langrod, J.G., 51-85 (Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1997).

Grant, S.M. and Heel, R.C. Vigabatrin: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in epilepsy and disorders of motor control. *Drugs*, 41:889-926, 1991.

Henningfield, J.E. (1995) Nicotine medications for smoking cessation. *New Eng. J. Med.*, 333: 1196-1203. 26

Henningfield, J.E., Goldberg, S.R. (1983) Control of behavior by intravenous nicotine injections in human subjects. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 19: 1021-1026.

Henningfield, J.E., London, E.D., Jaffe, J.H. (1987) nicotine reward: studies of abuse liability and physical dependence potential. In: Brain Reward Systems and Abuse, ed. By J. Engel and L. Orelan, New York, Raven Press, pp. 147-164.

Henningfield, J.E., Miyasato, K., D.R. Jasinski (1983) Cigarette smokers self-administer intravenous nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 19: 887-890.

Horan, P., Smith, M., Gardner, E. Lepore, M., Ashby, Jr. C.R. (1997) (-)-nicotine produces conditioned place preference in Lewis, but not Fischer 344 animals. *Synapse*, 26: 93-94.

Hurd, Y.L., McGregor, A., Ponten, M. (1997) In vivo amygdala dopamine levels modulate cocaine self-administration behavior in the rat: D1 dopamine receptor involvement. *Eur. J. Neuroscience*, 12: 2541-2548.

Hurt, R.D., Sachs, D.P., Glover, E.D., Offord, K.P., Johnston, J.A., Dale, L.C., Khayrallah, M.A., Schroeder, D.R., Glover, P.N., Sullivan, C.R., Croghan, I.T., Sullivan, P.M. (1997) A comparison of sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation. *N. Eng. J. Med.*, 237: 1195-1202.

Imperato, A., Mulas, A., Di Chiara, G. (1986) Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of the freely moving rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 132: 337-338.

Jarvik, M.E., Henningfield, J.E. (1988) Pharmacological treatment of tobacco dependence. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 30: 279-294.

Jung, M.J., Lippert, B., Metcalf, B.W., Bohlen, P., Schechter, P.J. (1977) Gamma-Vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice. *J. Neurochem.*, 29: 787-802.

Kerr, D.I.B., Ong, J., Prager, R.H. (1990) GABAB receptor agonists and antagonists. In: GABAB receptors in Mammalian Function, Bowery, N.G., Bittiger, H. and Olpe, H.-R. (eds.) John Wiley and Sons, New York, pp. 29-45.

Kushner, S.A., Dewey, S.L., Kornetsky, C. Comparison of the effects of vigabatrin on cocaine self-administration and food reinforcement. Soc. Neuro. Abstr. 23: 1942 (1997a).

Kushner, S.A., Dewey, S.L., Kornetsky, C. The effects of gamma-vinyl GABA on cocaine-induced lowering of brain-stimulation reward thresholds. Psychopharmacology, 133, 383-388, (1997b).

Lacey, M.G., Mercuri, N.B. and North, A.N. On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. J. Physiol. 401: 437-453, 1988.

Logan, J., Fowler, J.S., Volkow, N.D., Wolf, A.P., Dewey, S.L., Schlyer, D.J., MacGregor, R.R., Hitzemann, R., Bendriem, B., Gatley, S.J., Christman, D.R. (1990) Graphical analysis of reversible radioligand binding from time activity measurements applied to [N-¹¹C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. J. Cereb. Blood Flow and Metab., 10: 740-747.

Marshall, D.L., Redfern, P.H., Wonnacott, S. (1997) Presynaptic nicotinic modulation of dopamine release in the three ascending pathways studied by in vivo microdialysis: Comparison of naive and chronic nicotine-treated rats. J. Neurochem., 68: 1511 - 1519.

Morgan, A.E., Dewey, S.L. Effects of pharmacologic increases in brain GABA levels on cocaine-induced changes in extracellular dopamine. Synapse 28, 60-65 (1998).

Nisell, M., Nomikos, G.G., Svensson, T.H. (1994a) Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral segmental area. *Synapse*, 16: 36-44.

Nisell, M., Nomikos, G.G., Svensson, T.H. (1994b) Infusion of nicotine in the ventral segmental area or the nucleus accumbens differentially affects accumbal dopamine release. *Pharmacol. Toxicol.*, 75: 348-352.

Nisell, M., Nomikos, G.G., Svensson, T.H. (1995) Nicotine dependence, midbrain dopamine systems and psychiatric disorders. *Pharmacol. Toxicol.*, 76: 157-162.

N.R., Van der Kooy, G.F. & Wenger, J.R. Cholecystokinin produces conditioned place-aversion, not place-preferences, in food-deprived rats: evidence against involvement in satiety. *Life Sci.* 32, 2087-2093, (1989).

O'Brien, C.P., Childress, A.R., McLellan, A.T., Ehrman, R. (1992) A learning model of addiction,. In: *Addictive States*, O'Brien, C.P. and Jaffe, J.H., (eds), Raven Press, New York, pp. 157-177.

Pontieri, F.E., Tanda, G., Orzi, F., Di Chiara, G. (1997) Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature*, 382: 255-257.

Porter, R.J., Meldrum, B.S. (1998) Antiepileptic drugs. In: *Basic and Clinical Pharmacology*, ed. by Katzung, B.G., Appelton and Lange, Stamford, CT, pp. 386-408.

Roberts, D.C., Andrews, M.M. (1997) Baclofen suppression of cocaine self-administration: demonstration using a discrete trials procedure. *Psychopharmacology*, 131: 271 -277.

- Roberts, D.C., Andrews, M.M., Vickers, G.J. (1996) Baclofen attenuates the reinforcing effects of cocaine in animals. *Neuropsychopharmacology*, 15: 417-423.
- Rocha, B.A., Sceaux-Levie, K., Lucas, J.J., Hiroi, N., Castanon, N., Crabbe, J.C., Nestler, E.J., Hen, R. (1998) Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1B receptor. *Nature Neuroscience*, 393: 175-178.
- Seeman, P., Guan, H.C., Niznik, H.B. (1989) Endogenous dopamine lowers the dopamine D2 receptor density as measured by [³H]raclopride: implications for positron emission tomography of the human brain. *Synapse*, 3: 96-97.
- Sora, I., Wichems, S.I., Takahashi, C., Li, X.F., Zeng, Z., Revay, R., Lesch, K.P., Murphy, D.L., Uhl, D.R. (1998) cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 95: 7699-7704.
- Takada, K., Yanagita, T. (1997) Drug dependence study on vigabatrin in rhesus monkeys and animals. *Arzneim-Forsch Drug Res.* 47: 1087-1095.
- Tsuji M, Nakagawa Y, Ishibashi Y, Yoshii T, Takashima T, Shimada M, Suzuki T. (1995) Activation of ventral segmental GABA-B receptors inhibits morphine-induced place preference in animals. *Eur. J. Pharmacol.*, 313: 169- 173.
- Valentine, J.D., Hokanson, J.S., Matta, S.G., Sharp, B.M. (1997) Self-administration in animals allowed unlimited access to nicotine. *Psychopharmacology*, 133: 300-304.
- Van Der Kooy, K. (1987). In *Methods of Assessing the Properties of Abused Drugs*, M.A. Bozarth, Ed., Springer-Verlag, New York, pp. 229-241.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Schlyer, D., Hitzemann, R., Liberman, J., Angrist, B., Pappas, N., MacGregor, R., Burr, G., Cooper, T., Wolf,

A.P. Imaging endogenous dopamine competition with [^{11}C]raclopride in the human brain. *Synapse*, 16, 255-262 (1994).

Wikler, A. (1965) Conditioning factors in opiate addiction and relapse. In: *Narcotics*, Kassenbaum, G.G. and Wilner, D.I. (eds), McGraw-Hill, New York, pp. 85-100.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití gamavinyLGABA (GVG) pro přípravu léčiva užitečného pro změnu chování spojeného se závislostí primáta trpícího závislostí na návykových látkách podáváním léčiva primátovi v množství postačujícím ke zmírnění, utlumení nebo odstranění chování spojeného s bažením po návykových látkách.
2. Použití podle nároku 1, kde odstranění chování spojené s bažením po návykových látkách nastává bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na GVG.
3. Použití podle nároku 1, kde návyková látka je vybrána ze skupiny skládající se z kokainu, morfinu a nikotinu.
4. Použití podle nároku 1, kde léčivo obsahuje GVG v množství od přibližně 100 mg/kg do přibližně 300 mg/kg.
5. Použití podle nároku 1, kde léčivo obsahuje GVG v množství od přibližně 150 mg/kg do přibližně 300 mg/kg.
6. Použití podle nároku 1, kde chování spojené se závislostí na návykových látkách je podmíněná preference prostředí.
7. Použití gamavinyLGABA (GVG) pro přípravu léčiva užitečného pro změnu chování spojeného se závislostí primáta trpícího závislostí na návykových látkách podáváním léčiva primátovi v množství postačujícím k tomu, aby se oslabily odměňující/stimulující účinky návykových látek vybraných ze skupiny skládající se z kokainu, morfinu a nikotinu bez výskytu změny odměňujících/stimulujících účinků potravy u primáta.

8. Použití podle nároku 7, kde odměňující/stimulující účinky návykových látek jsou oslabeny bez výskytu změny pohybové funkce primáta.

9. Použití gamavinyLGABA (GVG) pro přípravu léčiva užitečného ke zmírnění účinků závislosti na nikotinu u primáta podáváním léčiva primátu v množství postačujícím k redukci charakteristických rysů závislosti na nikotinu.

10. Použití podle nároku 9, kde léčivo obsahuje GVG v množství od přibližně 75 mg/kg do přibližně 150 mg/kg.

11. Použití podle nároku 9, kde léčivo obsahuje GVG v množství od přibližně 18 mg/kg do přibližně 20 mg/kg.

12. Použití podle nároku 9, kde charakteristické rysy závislosti na nikotinu jsou redukovány bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na GVG.

13. Použití podle nároku 9, kde charakteristické rysy závislosti na nikotinu jsou redukovány bez výskytu změny pohybové funkce primáta.

14. Použití gamavinyLGABA (GVG) pro přípravu léčiva užitečného ke změně chování spojeného se závislostí savce trpícího závislostí na návykových látkách podáváním léčiva savci v množství postačujícím ke zmírnění, utlumení nebo odstranění chování spojeného s bažením po návykových látkách..

15. Použití podle nároku 14, kde odstranění chování spojené s bažením po návykových látkách nastává bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na GVG.

16. Použití podle nároku 14, kde návyková látka je vybrána ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů nebo nikotinu a jejich kombinací.

17. Použití podle nároku 14, kde návyková látka je vybrána ze skupiny skládající se z kokainu, nikotinu, metamfetaminu, etanolu, morfinu, heroinu a jejich kombinací.

18. Použití podle nároku 14, kde GVG je podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg.

19. Použití podle nároku 14, kde chování spojené se závislostí na návykových látkách je podmíněná preference prostředí.

20. Použití gamavinyLGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léčiva užitečného pro změnu chování spojeného se závislostí savce trpícího závislostí na návykových látkách podáváním účinného množství léčiva savci, kde účinné množství oslabuje odměňující/stimulující účinky návykových látek vybraných ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů, nikotinu a jejich kombinací bez výskytu změny odměňujících/stimulujících účinků potravy u savce.

21. Použití podle nároku 20, kde odměňující/stimulující účinky návykových látek jsou oslabeny bez výskytu změny pohybové funkce savce.

22. Použití gamavinyLGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léčiva užitečného pro zmírnění účinků závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu u savce podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství je

postačující k redukci charakteristických rysů závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu.

23. Použití podle nároku 22, kde GVG je podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg.

24. Použití podle nároku 22, kde charakteristické rysy závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu jsou redukovány bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na GVG.

25. Použití podle nároku 22, kde charakteristické rysy závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu jsou redukovány bez výskytu změny pohybové funkce savce.

26. Použití gamavinyLGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo jejího enantiomeru či racemické směsi pro přípravu léčiva užitečného pro změnu chování spojeného se závislostí savce trpícího závislostí na návykových látkách podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství je postačující ke zmírnění, utlumení nebo odstranění chování spojeného s bažením po návykových látkách.

27. Použití podle nároku 26, kde odstranění chování spojené s bažením po návykových látkách nastává bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na GVG.

28. Použití podle nároku 26, kde návyková látka je vybrána ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů nebo nikotinu a jejich kombinací.

29. Použití podle nároku 26, kde návyková látka je vybrána ze skupiny skládající se z kokainu, nikotinu, metamfetaminu, etanolu, morfinu, heroinu a jejich kombinací.

30. Použití podle nároku 26, kde GVG je podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg.

31. Použití podle nároku 26, kde chování spojené se závislostí na návykových látkách je podmíněná preference prostředí.

32. Použití gamavinyLGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo jejího enantiomeru či racemické směsi pro přípravu léčiva užitečného pro změnu chování spojeného se závislostí savce trpícího závislostí na návykových látkách podáváním účinného množství léčiva savci, kde účinné množství oslabuje odměňující/stimulující účinky návykových látek vybraných ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů, nikotinu a jejich kombinací bez výskytu změny odměňujících/stimulujících účinků potravy u savce.

33. Použití podle nároku 32, kde odměňující/stimulující účinky návykových látek jsou oslabeny bez výskytu změny pohybové funkce savce.

34. Použití gamavinyLGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo jejího enantiomeru či racemické směsi pro přípravu léčiva užitečného pro zmírnění účinků závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu u savce podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství je postačující k redukci charakteristických rysů závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu.

35. Použití podle nároku 34, kde GVG je podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg.

36. Použití podle nároku 34, kde charakteristické rysy závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu jsou redukovány bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na GVG.

37. Použití podle nároku 34, kde charakteristické rysy závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu jsou redukovány bez výskytu změny pohybové funkce savce.

38. Použití přípravku, který zvyšuje hladiny GABA v centrálním nervovém systému pro přípravu léčiva užitečného pro změnu chování spojeného se závislostí savce trpícího závislostí na návykových látkách podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství je postačující ke zmírnění, utlumení nebo odstranění chování spojeného s bažením po návykových látkách.

39. Použití podle nároku 38, kde léčivo obsahuje GVG, gabapentin, kyselinu valproovou, progabid, kyselinu gama-hydroxymáselnou, fengabin, cetylGABA, topiramát, tiagabin, akamprosát nebo jejich farmaceuticky přijatelnou sůl, nebo jejich enantiomer či racemickou směs.

40. Použití podle nároku 38, kde odstranění chování spojené s bažením po návykových látkách nastává bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na léčivo.

41. Použití podle nároku 38, kde návyková látka je vybrána ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů nebo nikotinu a jejich kombinací.

42. Použití podle nároku 38, kde návyková látka je vybrána ze skupiny skládající se z kokainu, nikotinu, metamfetaminu, etanolu, morfinu, heroinu a jejich kombinací.

43. Použití podle nároku 38, kde chování spojené s závislostí na návykových látkách je podmíněná preference prostředí.

44. Použití podle nároku 38, kde léčivo obsahuje gabapentin podávaný v množství od přibližně 500 mg do přibližně 2 g/den.

45. Použití podle nároku 38, kde léčivo obsahuje kyselinu valproovou podávanou v množství od přibližně 5 mg/kg do přibližně 100 mg/kg/den.

46. Použití podle nároku 38, kde léčivo obsahuje topiramát podávaný v množství od přibližně 50 mg do přibližně 1 g/den.

47. Použití podle nároku 38, kde léčivo obsahuje progabid podávaný v množství od přibližně 250 mg do přibližně 2 g/den.

48. Použití podle nároku 38, kde léčivo obsahuje fengabin podávaný v množství od přibližně 250 mg do přibližně 4 g/den.

49. Použití podle nároku 38, kde léčivo obsahuje kyselinu gama-hydroxymáselnou podávanou v množství od přibližně 5 mg/kg do přibližně 100 mg/kg/den.

50. Použití přípravku, který zvyšuje hladiny GABA v centrálním nervovém systému pro přípravu léčiva užitečného pro změnu

chování spojeného se závislostí savce trpícího závislostí na návykových látkách podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství oslabuje odměňující/stimulující účinky návykových látek vybraných ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů, nikotinu a jejich kombinací bez výskytu změny odměňujících/stimulujících účinků potravy u savce.

51. Použití podle nároku 50, kde léčivo obsahuje GVG, gabapentin, kyselinu valproovou, progabid, kyselinu gama-hydroxymáselnou, fengabin, cetylGABA, topiramát, tiagabin, akamprosát nebo jejich farmaceuticky přijatelnou sůl, nebo jejich enantiomer či racemickou směs.

52. Použití podle nároku 50, kde odměňující/stimulující účinky návykových látek jsou oslabeny bez výskytu změny pohybové funkce savce.

53. Použití přípravku, který zvyšuje hladiny GABA v centrálním nervovém systému pro přípravu léčiva užitečného pro zmírnění účinků závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu u savce podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství je postačující k redukci charakteristických rysů závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu.

54. Použití podle nároku 53, kde léčivo obsahuje GVG, gabapentin, kyselinu valproovou, progabid, kyselinu gama-hydroxymáselnou, fengabin, cetylGABA, topiramát, tiagabin, akamprosát nebo jejich farmaceuticky přijatelnou sůl, nebo jejich enantiomer či racemickou směs.

55. Použití podle nároku 53, kde léčivo obsahuje gabapentin podávaný v množství od přibližně 500 mg do přibližně 2 g/den.

56. Použití podle nároku 53, kde léčivo obsahuje kyselinu valproovou podávanou v množství od přibližně 5 mg/kg do přibližně 100 mg/kg/den.

57. Použití podle nároku 53, kde léčivo obsahuje topiramát podávaný v množství od přibližně 50 mg do přibližně 1 g/den.

58. Použití podle nároku 53, kde léčivo obsahuje progabid podávaný v množství od přibližně 250 mg do přibližně 2 g/den.

59. Použití podle nároku 53, kde léčivo obsahuje fengabin podávaný v množství od přibližně 250 mg do přibližně 4 g/den.

60. Použití podle nároku 53, kde léčivo obsahuje kyselinu gama-hydroxymáselnou podávanou v množství od přibližně 5 mg/kg do přibližně 100 mg/kg/den.

61. Použití podle nároku 53, kde charakteristické rysy závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu jsou redukovány bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na léčivo.

62. Použití podle nároku 53, kde charakteristické rysy závislosti na psychostimulačních látkách, narkotických analgetikách, alkoholu nebo nikotinu jsou redukovány bez výskytu změny pohybové funkce savce.

63. Použití gamavinyLGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo jejího enantiomeru či racemické směsi pro přípravu léčiva užitečného pro změnu chování spojeného se

závislostí savce trpícího závislostí na kombinaci návykových látek podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství je postačující ke zmírnění, utlumení nebo odstranění chování spojeného s bažením po kombinaci návykových látek.

64. Použití podle nároku 63, kde odstranění chování spojené s bažením po kombinaci návykových látek nastává bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na GVG.

65. Použití podle nároku 63, kde kombinace návykových látek je vybrána ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů a nikotinu.

66. Použití podle nároku 63, kde kombinace je vybrána ze skupiny skládající se z kokainu, nikotinu, metamfetaminu, etanolu, morfinu a heroinu.

67. Použití podle nároku 63, kde kombinace je kokain a heroin.

68. Použití podle nároku 63, kde GVG je podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg.

69. Použití podle nároku 63, kde chování spojené se závislostí na návykových látkách je podmíněná preference prostředí.

70. Použití gamavinyLGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo jejího enantiomeru či racemické směsi pro přípravu léčiva užitečného pro změnu chování spojeného se závislostí savce trpícího závislostí na kombinaci návykových látek vybraných ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů a nikotinu podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství oslabuje odměňující/stimulující účinky kombinace návykových

látek bez výskytu změny odměňujících/stimulujících účinků potravy u savce.

71. Použití podle nároku 70, kde kombinace je vybrána ze skupiny skládající se z kokainu, nikotinu, metamfetaminu, etanolu, morfinu a heroinu.

72. Použití podle nároku 70, kde kombinace je kokain a heroin.

73. Použití podle nároku 70, kde odměňující/stimulující účinky kombinace návykových látek jsou oslabeny bez výskytu změny pohybové funkce savce.

74. Použití gamavinyLGABA (GVG) nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo jejího enantiomeru či racemické směsi pro přípravu léčiva užitečného ke zmírnění účinků závislosti na kombinaci návykových látek vybraných ze skupiny skládající se z psychostimulačních látek, narkotických analgetik, alkoholů a nikotinu u savce podáváním účinného množství léčiva savci, přičemž účinné množství je postačující k redukci charakteristických rysů závislosti na kombinaci návykových látek.

75. Použití podle nároku 74, kde kombinace je vybrána ze skupiny skládající se z kokainu, nikotinu, metamfetaminu, etanolu, morfinu a heroinu.

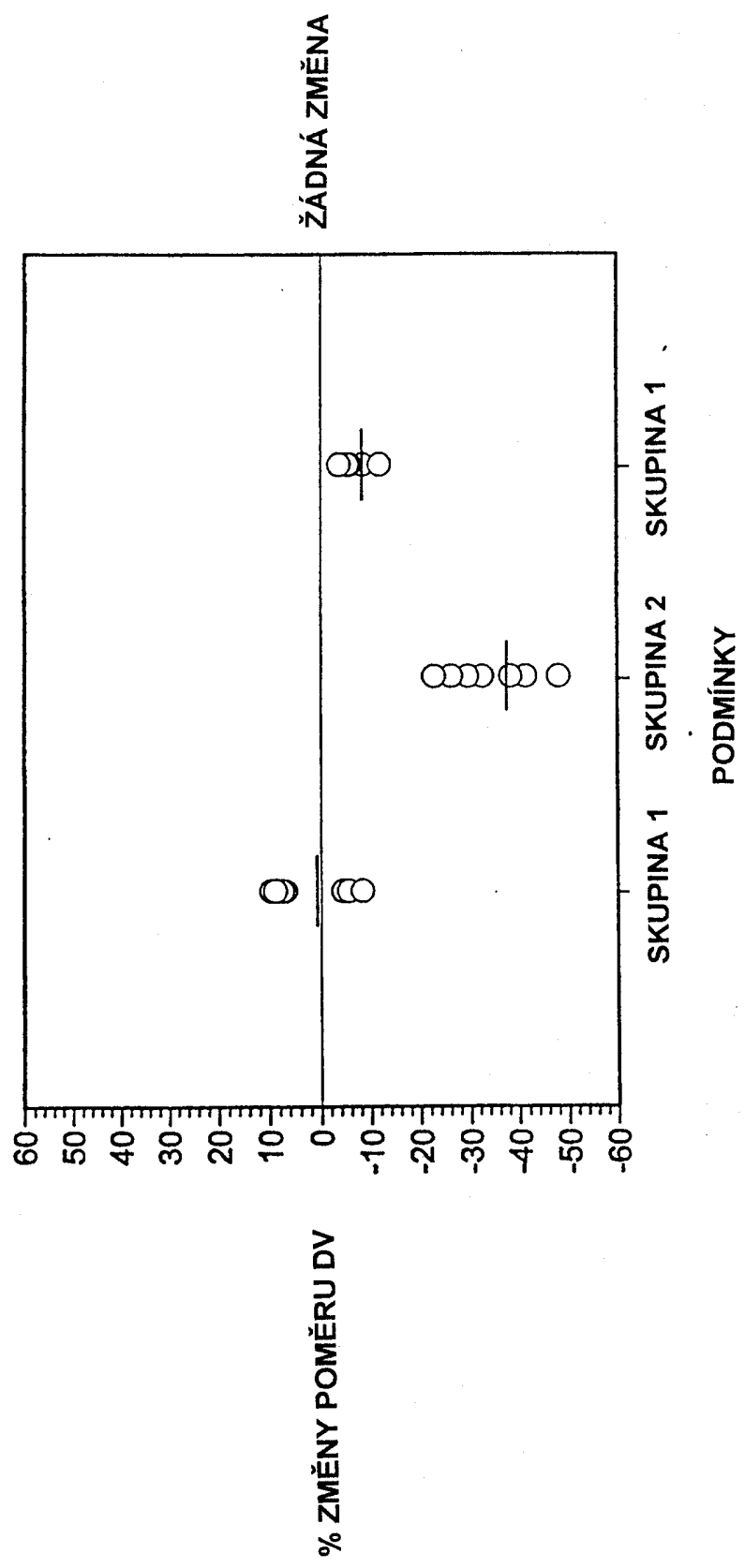
76. Použití podle nároku 74, kde kombinace je kokain a heroin.

77. Použití podle nároku 74, kde GVG je podávána v množství od přibližně 15 mg/kg do přibližně 600 mg/kg.

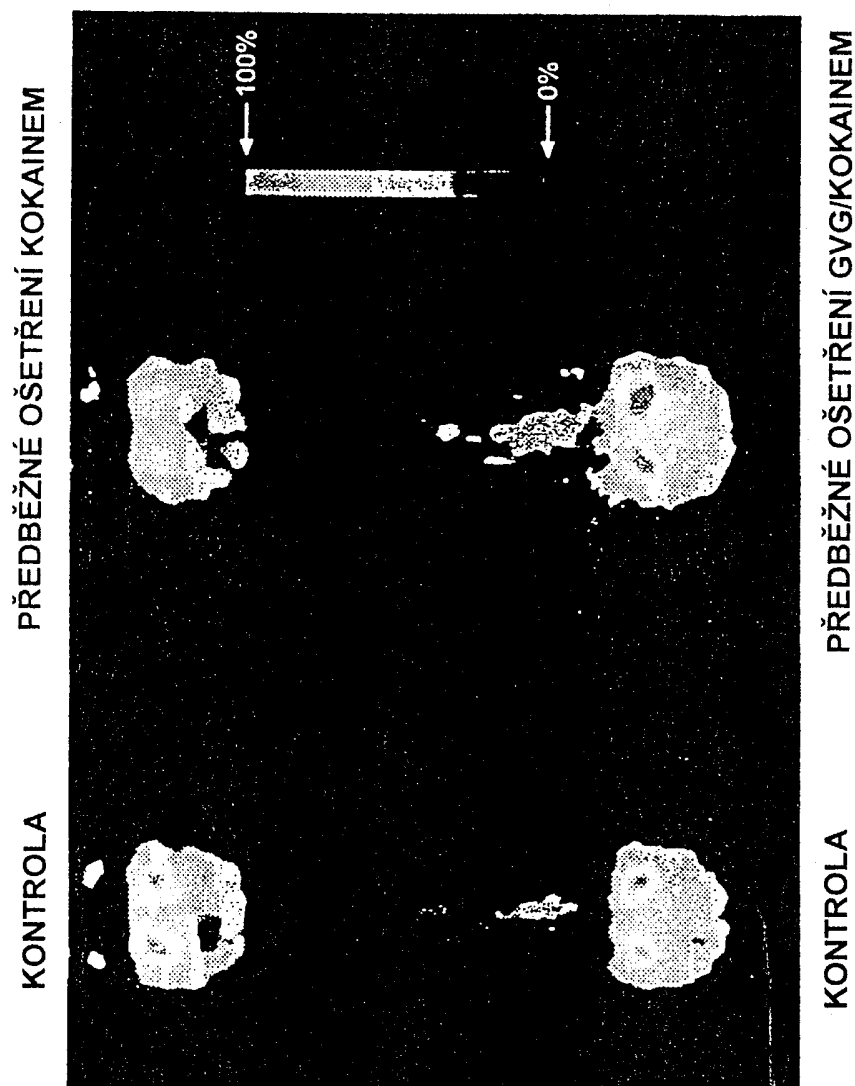
78. Použití podle nároku 74, kde charakteristické rysy závislosti jsou redukovány bez výskytu averzivní reakce nebo apetitivní reakce na GVG.

79. Použití podle nároku 74, kde charakteristické rysy závislosti jsou redukovány bez výskytu změny pohybové funkce savce.

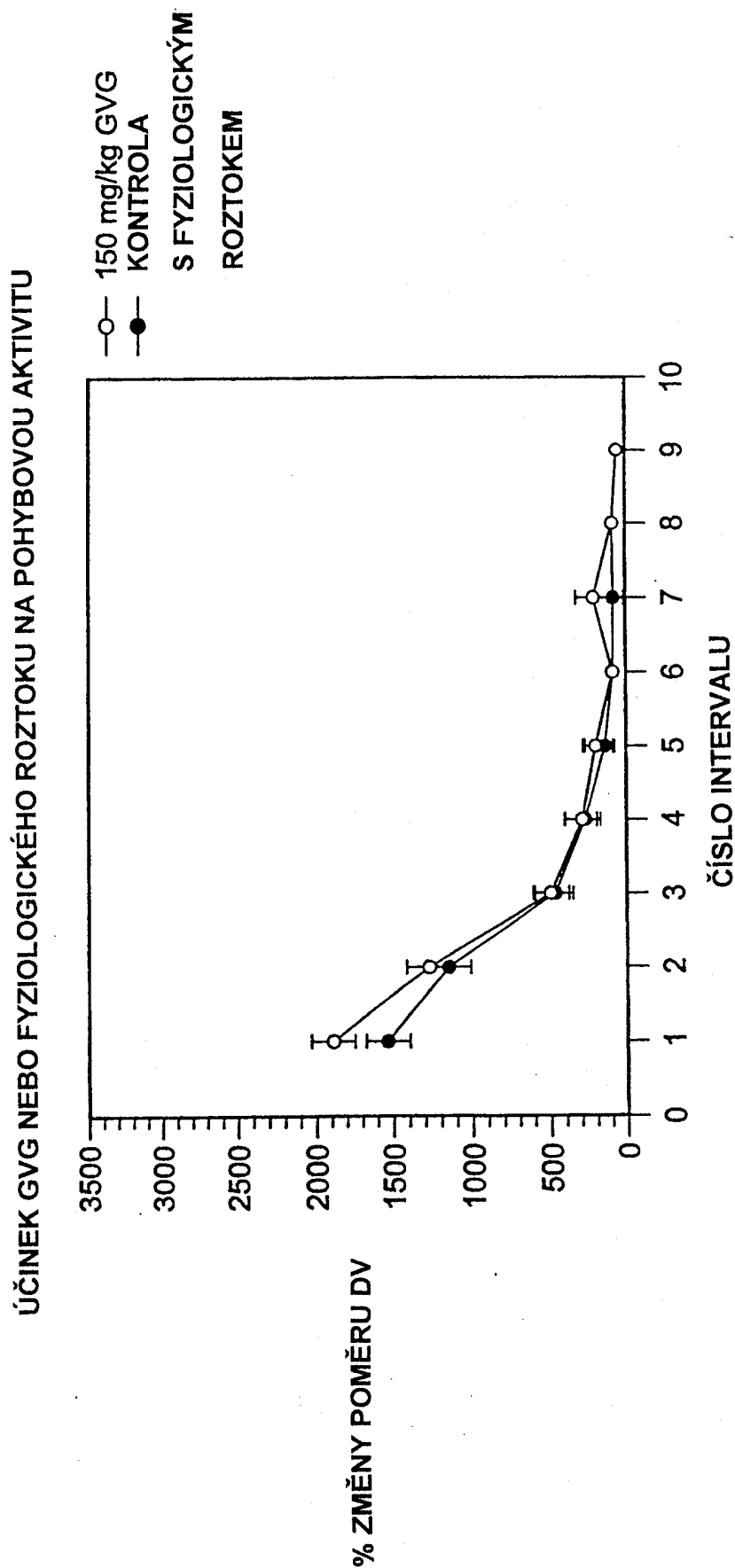
Obr. 1



Obr. 2
TRANSAXIÁLNÍ PARAMETRICKÉ SNÍMKY POMĚRU DV V MOZKU PRIMÁTA
(KROMĚ ČLOVĚKA) NA ÚROVNI CORPUS STRIATUM

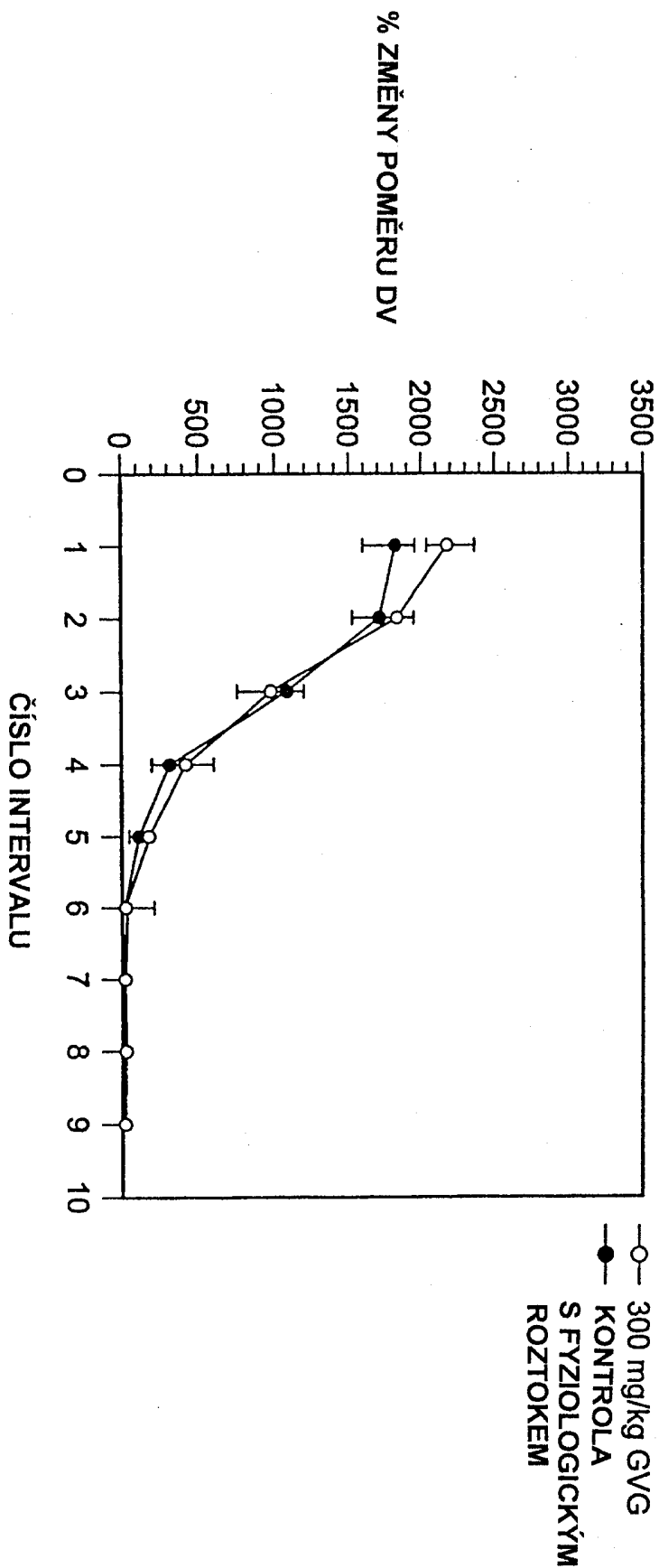


Obr. 3A

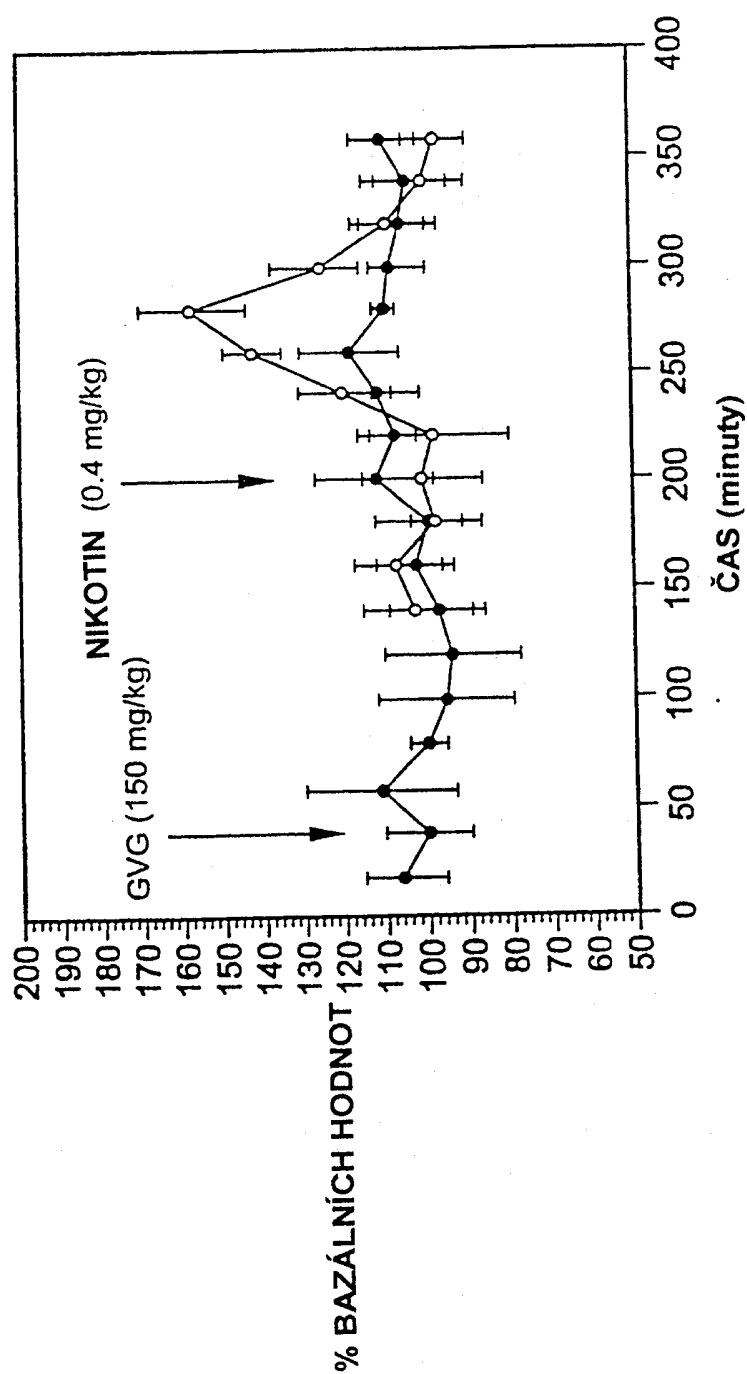


Obř. 3B

ÚČINEK GVG NEBO FYZIOLOGICKÉHO ROZTOKU NA POHYBOVOU AKTIVITU

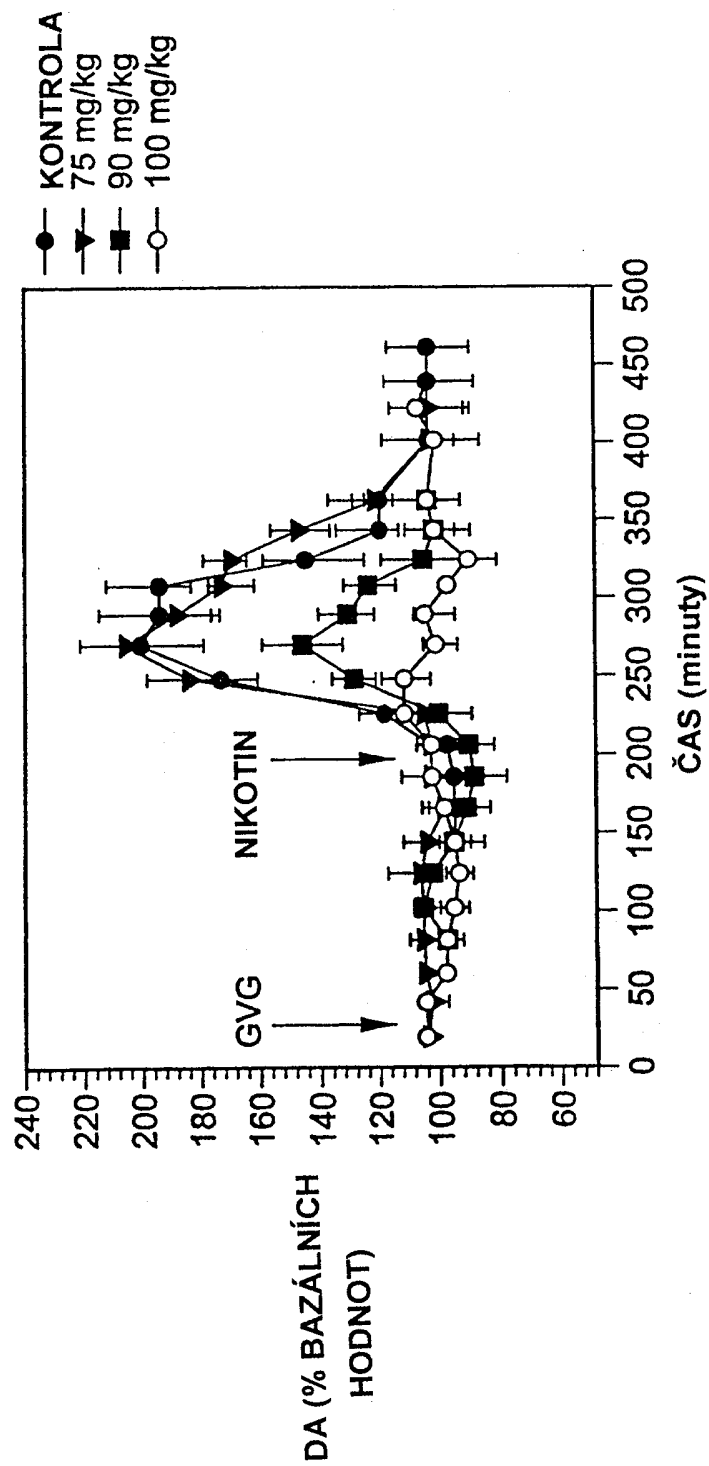


Obr. 4 ÚČINEK GVG NA EXTRACELULÁRNÍ DA VYVOLANÝ NIKOTINEM



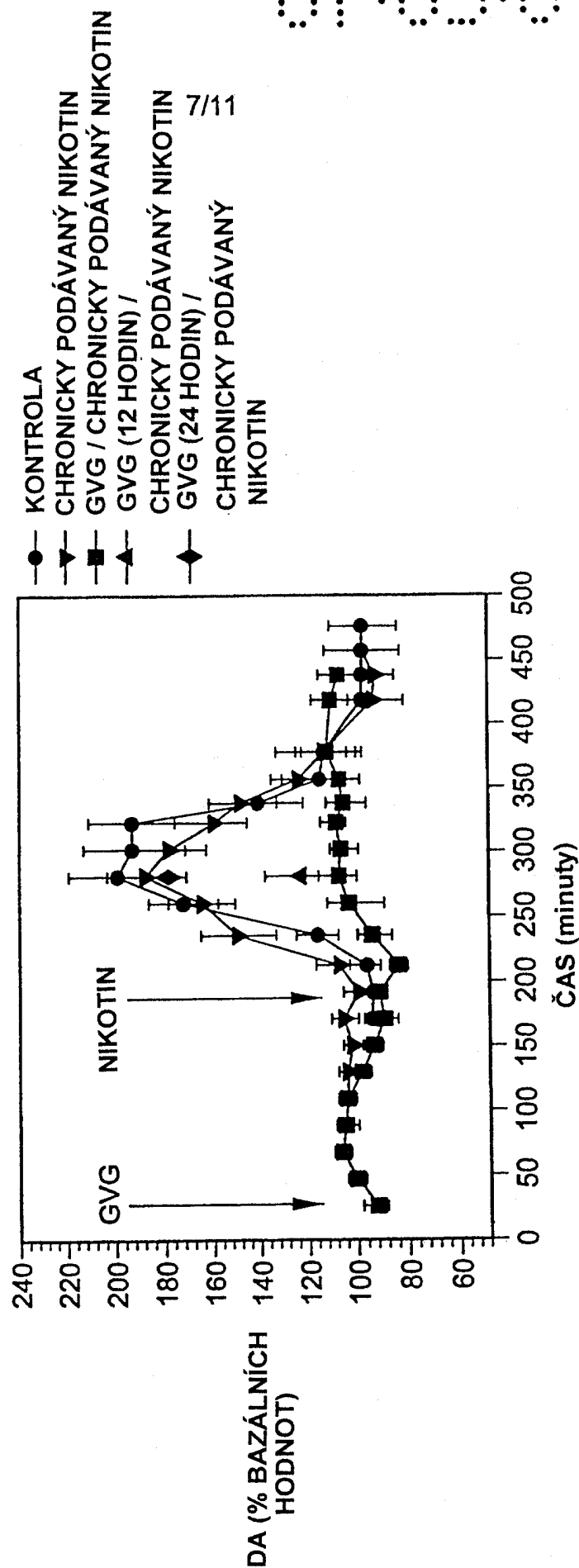
Obr. 5A

ÚČINEK (-)-NIKOTINU NA EXTRACELULÁRNÍ DA V NACC UVOLNĚ SE
POHYBUJÍCÍCH NAIVNÍCH LABORATORNÍCH POTKANŮ



Obr. 5B

ÚČINEK (-)-NIKOTINU NA EXTRACELULÁRNÍ DA V NACC U VOLNĚ SE POHYBUJÍCÍCH CHRONICKY EXPONOVANÝCH LABORATORNÍCH POTKANŮ

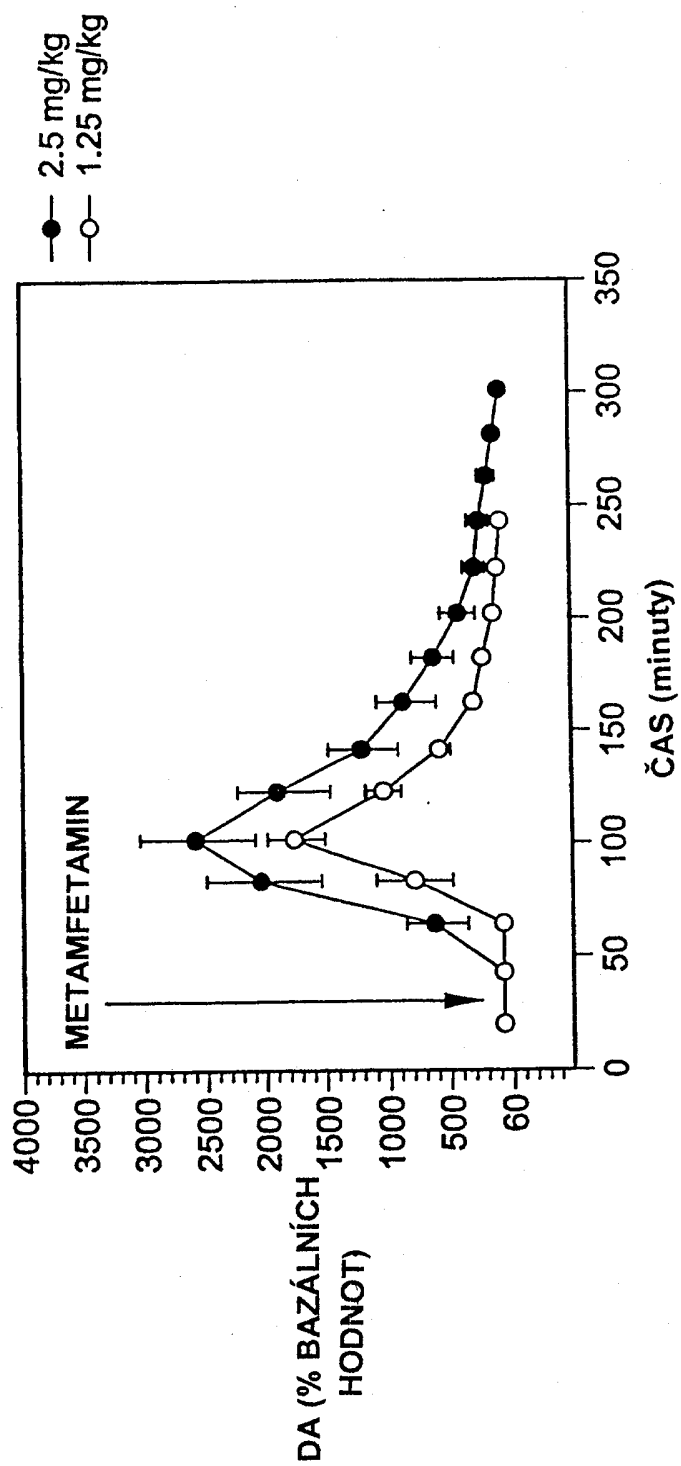


07.05.01

PV 2001-394

Obr. 6

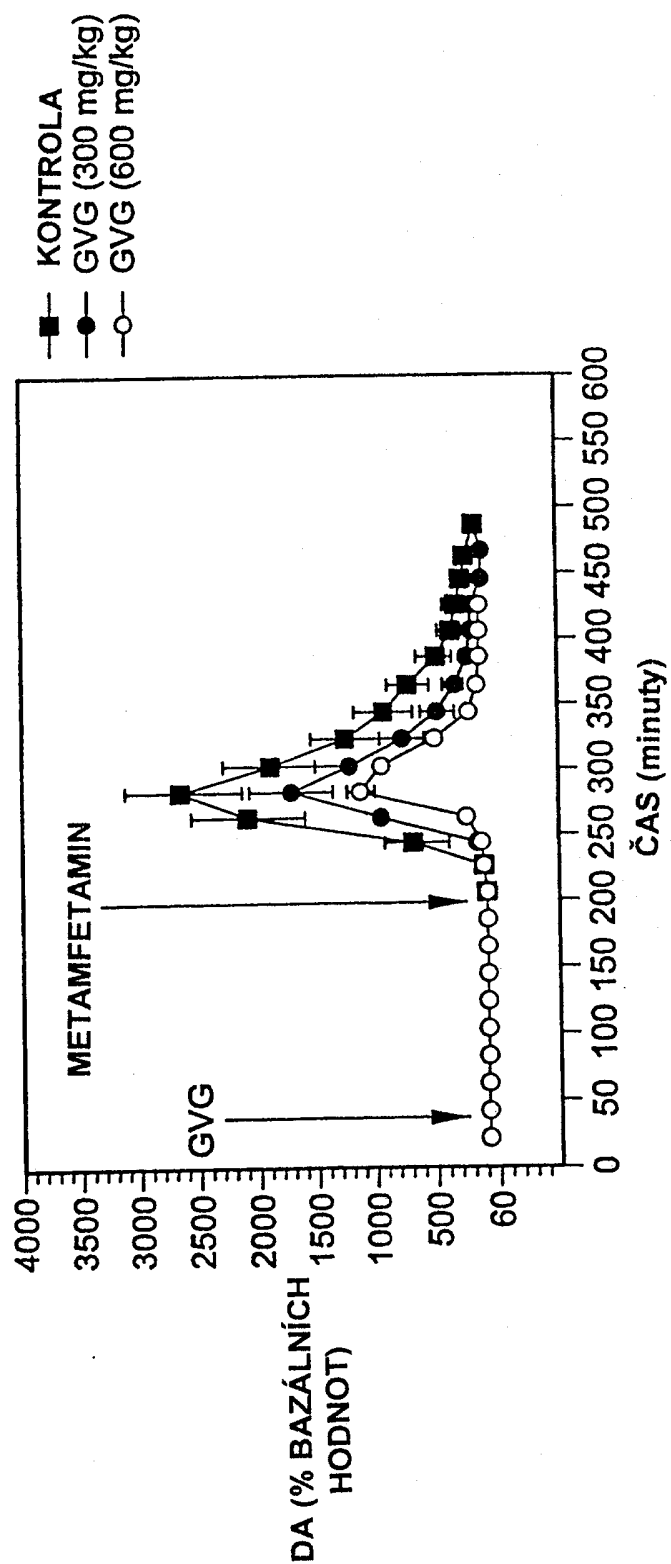
ÚČINEK METAMFETAMINU NA DA V NACC



9/11

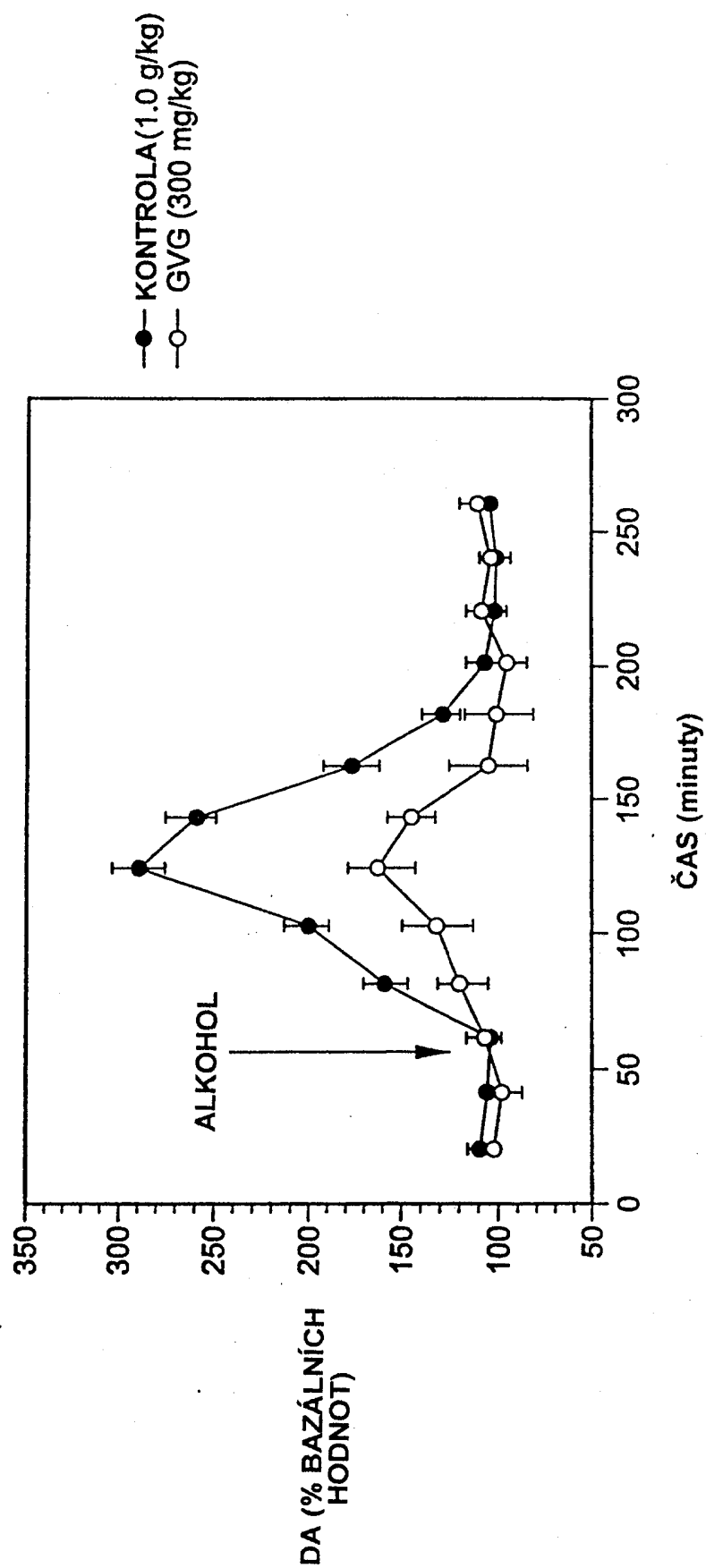
Obr. 7

ÚČINEK GVG NA METAMFETAMINEM VYVOLANÉ ZMĚNY DA V NACC



10/11

Obr. 8 ÚČINEK GVG NA ALKOHELEM VYVOLANÉ ZVÝŠENÍ DA V NACC



07.05.01

PV 2001-394

11/11

Obr. 9
IN VIVO MIKRODIALYZAČNÍ STUDIE U VOLNĚ SE POHYBUJÍCÍCH
LABORATORNÍCH POTKANŮ

