

MARCIN GIERDAŁSKI, BEATA JABŁOŃSKA

*Zakład Neurofizjologii Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

DLUGOTRWAŁE PODAWANIE SUBSTANCJI CZYNNYCH W NEUROBIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ

WSTĘP

Metody długotrwałego podawania środków biologicznie czynnych od dawna znajdują się w polu zainteresowania biologii doświadczalnej. Wiele bowiem spośród badanych procesów fizjologicznych, ze względu na swą względnie wolną dynamikę, wymaga długo trwającej ingerencji farmakologicznej. Jednak wielokrotne wstrzyknięcia, nierzadko stosowane przez ponad miesiąc, są czynnikiem stresotwórczym, mogącym wносить istotne zakłócenia do modelu badawczego. Wzrost wymagań bioetycznych prowadzi do ograniczenia użycia procedur wywołujących u zwierzęcia ból czy silny dyskomfort. Potrzebne techniki zaczerpnięto więc z farmacji klinicznej i technologii postaci leku, bowiem lekarze zetknęli się z podobnymi problemami dużo wcześniej.

Terapia farmakologiczna niemal wszystkich schorzeń wymaga wielokrotnego podawania środka leczniczego. W ten sposób zapewnia się na tyle długi okres działania leku, by zdołał on zlikwidować czynnik etiologiczny lub utrzymać pożądaną stan czynnościowy chorego układu bądź narządu.

Pojedyncza dawka daje w większości przypadków szybki wzrost stężenia substancji czynnej w przedziałach organizmu. Po zakończeniu wchłaniania zaczynają przeważać mechanizmy biotransformacji (przede wszystkim metabolizm i wydalanie) i stężenie substancji czynnej maleje wykładniczo. Pozwala to na utrzymanie skutecznego stężenia tylko przez pewien (naj-

częściej krótki) okres. Podanie w odpowiednim czasie kolejnej dawki leku zapobiega spadkowi poziomu jego stężenia poniżej wartości skutecznej i umożliwia utrzymanie go przez dłuższy czas.

W przypadku leków o krótkim półokresie biologicznego rozpadu realizacja odpowiedniego schematu dawkowania staje się kłopotliwa zarówno dla pacjenta, jak i lekarza. Dlatego opracowano postaci leku o przedłużonym działaniu. Umożliwiają one utrzymanie skutecznego stężenia substancji leczniczej przez okres najczęściej 8-12 godzin, nie dłuższy jednak niż jedna doba. Nie likwiduje to wahań stężeń substancji w ustroju, co w przypadku leków o niskim indeksie terapeutycznym (stosunek dawki toksycznej do dawki skutecznej) wiąże się z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych.

Sytuacja uległa radykalnej zmianie w latach 70-tych, gdy wprowadzono do terapii systemy terapeutyczne czyli postaci leku o kontrolowanym uwalnianiu. Pozwalają one utrzymać stały poziom środka leczniczego przez długi czas (od kilku dni do kilku miesięcy). Systemy terapeutyczne są tak zaprojektowane, iż szybkość uwalniania jest zaprogramowana w ich konstrukcji, a nie zależy od warunków istniejących w miejscu podania (np. pH, ciśnienie osmotyczne) (LANGER 1990, JANICKI 1987a).

Systemy o kontrolowanym uwalnianiu mają wiele zalet, które stawiają je wyżej niż konwen-

SKRÓTY: 2-DG — 2-deoksyglukoza, APV — kwas α -aminofosfonowalerianowy, CPP — kwas 3-[($\pm$)-2-karbo-
ksypiperazyn-4-ylo]propylo-1-fosfonowy, DMSO — dimetylosulfotlenek, H-7 — jeden z inhibitorów kinazy
białkowej C, MK-801 — maleinian dizocylpiny, NMDA — N-metylo-D-asparaginan, PBS — buforowany
roztwór soli fizjologicznej, TRH — tyreotropina

W czasie przygotowywania artykułu (w roku 1996) Beata Jabłońska była stypendystką Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

cjonalne postaci leków o przedłużonym działaniu:

1. Pozwalają na utrzymywanie stałego poziomu substancji czynnej w ustroju, niwelując wahanie stężenia między wartością toksyczną a nieskuteczną.

2. Umożliwiają nieprzerwane i długotrwałe podawanie substancji łatwo ulegających rozpadowi lub inaktywacji w ustroju (np. białka).

3. Możliwość miejscowego podawania pozwala na utrzymywanie skutecznego stężenia w wybranym miejscu i zapobiega wystąpieniu niepożądanych efektów w innych narządach.

Długotrwałe podawanie związków czynnych biologicznie jest ważne w biologii i medycynie doświadczalnej nie mniej niż w klinice. Dobrego przykładu dostarcza historia badań mechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych. VETULANI i współpracownicy (1976) odkryli, że jedynie długotrwałe podawanie tych leków powodowało charakterystyczne zmiany w funkcji receptorów β -adrenergicznych w mózgu szczu-

ra. Obserwacja ta była zgodna z danymi klinicznymi, gdyż przeciwdepresyjne działanie leków ujawnia się dopiero po kilku tygodniach nieprzerwanej farmakoterapii. Pojedyncze dawki tych leków dają różne — zależnie od grupy terapeutycznej — bezpośrednie skutki neurochemiczne. Nie muszą one być wprost związane z właściwym mechanizmem działania leku, gdyż bardziej jednolity zespół efektów obserwowano po dłuższym czasie.

Także badanie mechanizmów długotrwałych zjawisk, takich jak zmiany rozwojowe (DENVER 1993, FACTOR i współaut. 1993), regeneracja (FREEMAN i współaut. 1994) lub procesy uczenia się i pamięci (MORRIS i współaut. 1986), może wymagać chronicznego podawania związków biologicznie czynnych.

W niniejszym artykule przedstawiono dwa podstawowe systemy kontrolowanego uwalniania substancji, mianowicie minipompki osmotyczne oraz systemy oparte na polimerach.

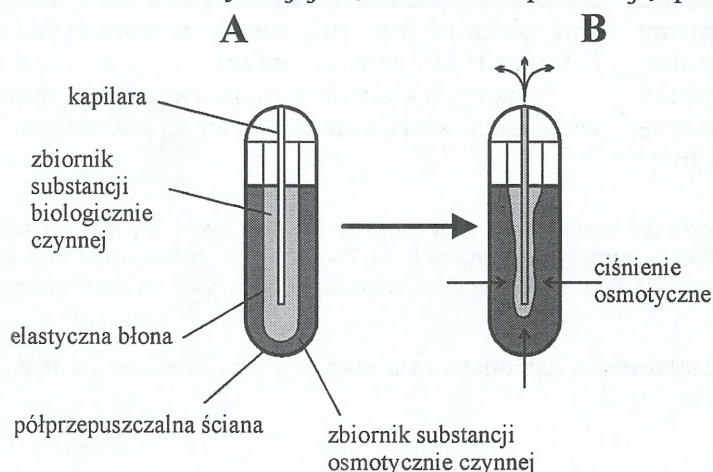
OSMOTYCZNE SYSTEMY TERAPEUTYCZNE

Osmotyczne systemy terapeutyczne działają na zasadzie aktywnego wypychania roztworu substancji czynnej ze zbiornika. Siły napędowej dla tego procesu dostarcza ciśnienie osmotyczne. Pompki tego typu są produkowane przez kilka firm, lecz najpowszechniej są używane modele Alzet® firmy ALZA Corp. (JANICKI 1987a).

BUDOWA I ZASADA DZIAŁANIA MINIPOMPKI ALZET

Budowa minipompek osmotycznych będzie omówiona na przykładzie produktów firmy ALZA. Osmotyczne pompki Alzet są miniaturowymi systemami, które uwalniają substancję do środowiska w sposób ciągły, z kontrolowaną szybkością. Ilość substancji uwolnionej w jednostce czasu zależy od jej stężenia w minipom-

pce. Pompki zaprojektowano dla środowiska płynu fizjologicznego o temp. 37°C i osmolarności 310 miliosmoli/l (ciśn. osmotyczne 7,5 atm). Producent podaje wzory pomocne w obliczeniu szybkości pompowania w zależności od aktualnych wartości temperatury i ciśnienia osmotycznego (Technical Information Manual 1995). Ze względu na różnorodność zwierząt laboratoryjnych (gryzonie, koty, psy) spotykamy obecnie duży wybór rozmiarów minipompek. Pompka Alzet jest zbudowana (ryc. 1.) z trzech koncentrycznych warstw: zbiornika substancji leczniczej, zbiornika substancji osmotycznie czynnej i elastycznej błony półprzepuszczalnej (JANICKI 1987a; Technical Information Manual 1995). Po zaimplantowaniu systemu do organizmu woda zawarta w płynie śródtkankowym, przenikając przez ścianę pompki, rozpuszcza substancję



Ryc. 1. Schemat budowy minipompki osmotycznej Alzet.

A) napelniona pompa gotowa do implantacji. B) wypychanie roztworu substancji czynnej pod wpływem ciśnienia atmosferycznego.

osmotycznie czynną, wzrasta ciśnienie pomiędzy dwoma wewnętrznymi zbiornikami i następuje odkształcenie elastomeru, co powoduje wypchnięcie substancji leczniczej przez kapilarę. Konstrukcja pompki pozwala na użycie szerokiej gamy rozpuszczalników (tab. 1). Minipompki są powszechnie używane do miejscowego podawania rozmaitych związków do organizmu zwierząt. Zestawione w tabeli 2. związki dają częściową orientację w różnorodności substancji stosowanych w badaniach.

PRZYGOTOWANIE I IMPLANTACJA MINIPOMPEK ALZET

W celu sprawdzenia prawidłowego działania minipompki, po złożeniu całego zestawu (tj. połączeniu pompki z kaniulą elastycznym wężykiem) i napełnieniu roztworem substancji aktywnej, można go zanurzyć w naczyniu z buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) i inkubować przez całą noc w temperaturze ciała zwierzęcia. Baczna uwagę należy zwrócić na wybór miejsca implantacji (badania włas-

Tabela 1. Niektóre rozpuszczalniki używane w minipompkach Alzet

woda destylowana
izotoniczny roztwór NaCl (i inne roztwory wodne soli)
roztwór Ringera (z lub bez kwasu mlekowego)
5% dekstroza (w wodzie lub NaCl)
etanol (do 10% w wodzie)
DMSO (do 50% w wodzie)
2% Tween w wodzie
glikol polietylenowy 300 (czysty lub w wodzie)
glikol propylenowy (czysty lub w wodzie)
glicerol
rozcieńczone zasady (pH < 14)
rozcieńczone kwasy (pH > 1,8)
podłoża hodowlane (zawierające 1% alkoholu benzylo- wego jako bakteriostatyk)

ne). Pompka nie może utrudniać ruchów ani prowokować zwierzęcia do usunięcia implantu. Istotnym problemem jest również długość i elastyczność wężyka łączącego pompkę z kaniulą

Tabela 2. Przykłady substancji czynnych podawanych w minipompkach Alzet

Substancja	Miejsce podania	Zwierzę	Literatura
Środki psychotropowe:			
przeciwdepresyjne	podskórnie	szczur	(TODD i współaut. 1995)
uzależniające	dordzeniowo	szczur	(LEVY i współaut. 1994)
	podskórnie	szczur	(MALIN i współaut. 1994, FACTOR i współaut. 1993, NIELSEN 1981)
	dokomorowo	szczur	(ROTHMAN i współaut. 1993)
	podskórnie	pies	(YOSHIMURA i współaut. 1993)
	rogówka	kot	(COLASANTI 1990)
	2-tyg. zarodek	kura domowa	(SERAN i SPARBER 1998)
benzodiazepiny	podskórnie	mysz	(TORCHIN i współaut. 1993)
Substancje peptydowe:			
opioidy	dokomorowo	szczur	(ROTHMAN i współaut. 1993)
czynniki wzrostowe	zakręt zębaty	szczur	(BARONE, Jr. i współaut. 1991)
enzymy i białka	dożylnie	pies	(ALBINO TEIXEIRA i współaut. 1990)
	zakręt zębaty	szczur	(BARONE, Jr. i współaut. 1991)
hormony	dokomorowo	szczur	(IKEGAMI i współaut. 1992)
	podskórnie	szczur	(MCDANIEL i współaut. 1989a,b)
neuromodulatory	dootrzewnowo	szczur	(CRAWLEY i BEINFELD 1983)
	dokomorowo		(CATZEFLIS i współaut. 1993)
Neuoprzekazniki i neuromodulatory niskocząsteczkowe	jądro nadskrzyżowaniowe	szczur	(ITOWI i współaut. 1998)
	ciało migdałowe	szczur	(BRADBURY i współaut. 1985)
	podskórnie	szczur	(JOHNSON i współaut. 1983)
	dożylnie	pies	(ALBINO TEIXEIRA i współaut. 1990)
	jądro półleżące	marmozeta	(BARNES i współaut. 1987)
Preparaty biologiczne	zakręt zębaty	szczur	(BARONE, Jr. i współaut. 1991)
Toksyny i neurotoksyny	ślimak	świnka morska	(BROWN i współaut. 1993)
	podskórnie	szczur	(BENNETT i ROSE 1992)
	prążkowie	szczur	(BAZZETT i współaut. 1993)
Steroidy	podskórnie	szczur	(VIJAYAN i COTMAN 1987)

umieszczoną wewnątrz lub w pobliżu docelowej struktury lub tkanki. Wężyk powinien być tak dobrany, by podczas ruchu zwierzęcia nie nastąpiło odłączenie od pompki lub wyrwanie kaniuli z miejsca podania.

Pompki osmotyczne mogą być wszczepiane podskórnie, a u większych zwierząt także dootrzewnowo. Tabela 3 przedstawia główne drogi podawania substancji czynnych.

WADY MINIPOMPEK

Pomimo licznych zalet minipompek można dostrzec również niekorzystne cechy tego systemu podawania. Wpływ płynu z kaniuli do kory mózgowej powoduje w tkance mózgowej znaczną nekrozę z utratą licznych neuronów i namnażaniem się komórek glejowych (BEAR i współaut. 1990, JABŁOŃSKA i współaut. 1993). Na obrazach autoradiograficznych, które otrzymano ze skrawków mózgów znakowanych

Tabela 3. Główne drogi podania minipompką Alzet

podskórnie
dootrzewnowo
do jam ciała (np. komory mózgu, rdzeń kręgowy, pęcherz moczowy, jelito)
miejscowa mikroperfuzja tkanki (np. mózg, płytka nerwowo-mięśniowa, nerwy obwodowe, kość, oko, mięśnie, jądra, jajnik, śledziona)

[^{14}C]deoksyglukoza, obserwowano spadek pobierania 2-DG w promieniu 3 mm wokół kaniuli, co sugerowało spadek aktywności metabolicznej tkanki w tej okolicy.

Poza tym, w przypadku podawania białek, fakt, że długi czas przebywają one w środowisku wodnym, może powodować zmniejszenie ich aktywności biologicznej. W wilgotnym środowisku i w temperaturze 37°C mogą one denaturować lub ulegać agregacji.

DYFUZYJNE SYSTEMY TERAPEUTYCZNE

Jedną z klas systemów dyfuzyjnych są postaci oparte na hydrofobowych, nie ulegających degradacji polimerach. Otrzymywane są one w wyniku inkorporacji substancji czynnej w nośniku opóźniającym uwalnianie (JANICKI 1987b).

Spośród licznych podłoży nierozpuszczalnych niektóre mają szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych. Obecnie dość powszechnie jest używana żywica syntetyczna Elvax® (DuPont Co., Wilmington, Delaware) — kopolimer octanu winylu z etylenem. Fakt użycia żywicy polimerycznej jako czynnika uwalniającego substancje aktywne, a tym samym wprowadzenie do organizmu dodatkowej substancji obcej, skłonił wielu badaczy do dokładnego przeanalizowania biologicznych właściwości nośnikowych polimerów. LANGER i FOLKMAN (1976) porównywali pod tym względem rozmaite substancje (poliakrylamid, poliwinylpirolidon, alkohol poliwinylowy, polimeryczny hydroksymetakrylan oraz kopolimer etylenu z octanem winylu). Próbkę polimeru wszczepiano w rogówkę królika i obserwowano w ciągu miesiąca ewentualne objawy reakcji zapalnej (obrzęk, naciek leukocytów, tworzenie naczyń). Spośród badanych substancji tylko prawidłowo przygotowany Elvax (patrz niżej) nie powodował takich reakcji.

Sporządzenie syntetycznych macierzy zawierających białka wymaga zmodyfikowania procesów przygotowania w celu zminimalizowania możliwości utraty ich aktywności. LANGER i FOLKMAN (1976) pokazali, że wyeliminowanie

wody z procedury przygotowywania implantów umożliwia długotrwałe podawanie substancji białkowych z zachowaniem ich pełnej aktywności. Wykazali też, że mimo tak długo trwającego wypłukiwania, białka w warunkach *in vitro* nie tracą swych biologicznych właściwości zachowując aktywność nawet przez 100 dni. Także tiofosforanowe analogi oligodeoksynukleotydów o długości 15 zasad nie wykazywały śladów degradacji w ciągu 3-tygodniowego uwalniania *in vitro* (SZKLARCZYK A. i KACZMAREK L., dane nie opublikowane).

Przykładem wykorzystania tej klasy systemów terapeutycznych w medycynie może być preparat Actisite zawierający antybiotyk — chlorowoderek tetracykliny, opracowany do zwalczania chorób okołozębnych. Są to włókna Elvaxu nasycone antybiotykiem. Umieszczenie ich w kieszonce dziąsłowej przy zębie umożliwia skuteczną terapię używając ponad 1000-krotnie mniejszej dawki substancji leczniczej niż w metodzie tradycyjnej (LANGER 1990, DONLEY i PEARLSTEIN 1993). W tabeli 4 zestawiono wszystkie dotychczasowe próby wykorzystania implantów Elvaxu w badaniach funkcjonowania układu nerwowego.

PRZYGOTOWANIE ŻYWICY ELVAX

SILBERSTEIN i DANIEL (1982) opracowali dokładną procedurę przygotowania żywicy Elvax. Procedura ta została wkrótce zmodyfikowana przez CLINE'A i współpracowników (1987). Od tej

Tabela 4. Substancje czynne podawane w implantach Elvax

Podawana substancja	Miejsce podania	Zwierzę	Literatura
APV, CPP	pokrywa wzrokowa	żaba	(SCHERER i UDIN 1989)
APV	kora somatosensoryczna	mysz	(JABŁOŃSKA i współaut. 1995)
APV, MK-801	wzgórek górny	tchórzofretka	(SCHNUPP i współaut. 1995)
NMDA, APV, MK-801	pokrywa wzrokowa	kijanka, młoda żaba	(CLINE i CONSTANTINE PATON 1990a)
jodek fosfoliny	kora wzrokowa	szczur	(LING i współaut. 1995)
tetrodotoksyna	nerw słuchowy	gerbil	(PASIC i RUBEL 1989)
tiofosforanowe analogi oligodeoksynukleotydów	kora czołowa	szczur	(SZKLARCZYK A. i KACZMAREK L., dane nie opublikowane)
s핑ozyna	pokrywa wzrokowa	kijanka	(CLINE i CONSTANTINE PATON 1990b)
H-7			
estry forbolu			
laminia	nerw kulszowy	szczur	(POLITIS 1989)
kolagen typu IV	nerw wzrokowy	szczur	
melina	nerw wzrokowy	szczur	(POLITIS 1988)
aksolemma			
homogenat całego mózgu			
wyciąg z wątroby			
wyciąg erytrocytów			
ekstrakt z siatkówki	nerw kulszowy	szczur	(POLITIS 1986)
homogenat z uszkodzonego nerwu	nerw wzrokowy	szczur	(POLITIS i MILLER 1985)

pory większość użytkowników tego systemu wykorzystuje ich metodykę.

Z uwagi na to, że granulki surowej żywicy zawierają substancje obce (np. przeciwutleniacz butylohydroksytoluen), istotne jest na wstępie dokładne wypłukanie żywicy polimeru w wodzie i alkoholu absolutnym. Mycie zapobiega wystąpieniu reakcji zapalnej w miejscu implantacji (LANGER i FOLKMAN 1976).

Przygotowanie właściwych implantów składa się z dwu etapów — mieszania i suszenia. Sposób przeprowadzenia obu z nich ma podstawowe znaczenie dla fizykochemicznych i farmakokinetycznych właściwości preparatu.

Wyjściowym surowcem jest 10% roztwór Elvaxu w chlorku metylenu. Substancję inkorporowaną dodaje się do niego bądź w formie stężonego roztworu (w wodzie lub DMSO) (SMITH i współaut. 1995) bądź w postaci suchego proszku (np. białka) (RHINE i współaut. 1980) otrzymując roztwór przygotowawczy. Następnie za pomocą wytrząsarki wytwarza się emulsję (lub odpowiednio — zawiesinę), którą natychmiast wylewa się na płytkę szklaną lub na dno małego naczynka w temperaturze suchego lodu. Zapobiega to rozwarstwianiu faz i sedymentacji zawieszonych cząstek. Taka preparatyka dawała także większą powtarzalność parametrów uwalniania *in vitro*.

Suszenie przeprowadza się również w niskiej temperaturze — preparat musi pozostać przez 2 dni w temperaturze -70°C (SMITH i

współaut. 1995) lub -20°C (RHINE i współaut. 1980). Następnie liofilizuje się go lub suszy w niskiej próżni w celu usunięcia resztek rozpuszczalników. W ten sposób otrzymuje się zestalony materiał zawierający rozproszone w polimerze ziarna substancji.

Gotowy produkt można następnie ciąć na mniejsze cząstki, a nawet na cienkie skrawki w kriostatowym mikrotomie, chłodząc dodatkowo polimer suchym lodem (badania własne).

KINETYKA UWALNIANIA SUBSTANCJI CZYNNEJ

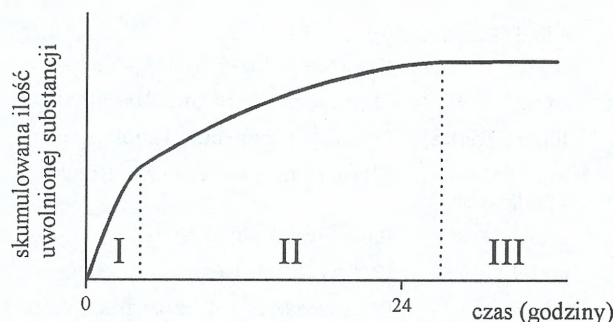
Mimo dużej liczby publikacji opisujących wykorzystanie implantów z żywicy Elvax, tylko kilka prac dotyczy fizykochemicznej i farmakokinetycznej strony zagadnienia. Na przełomie lat 70-tych i 80-tych zespół Langer'a zajmował się uwalnianiem białek (LANGER i FOLKMAN 1976, RHINE i współaut. 1980). Kilkanaście lat później uwalnianie związków niskocząsteczkowych opisali szczegółowo SMITH i współautorzy (1995).

Przebieg czasowy uwalniania makrocząstek z macierzy Elvax ma charakterystyczny profil (RHINE i współaut. 1980) i można wyróżnić w nim 3 fazy (ryc. 2.):

I — okres początkowy (gwałtowne uwalnianie);

II — okres pośredni (uwalnianie ze względnie stałą szybkością);

III — okres końcowy (uwalnianie wygasa).

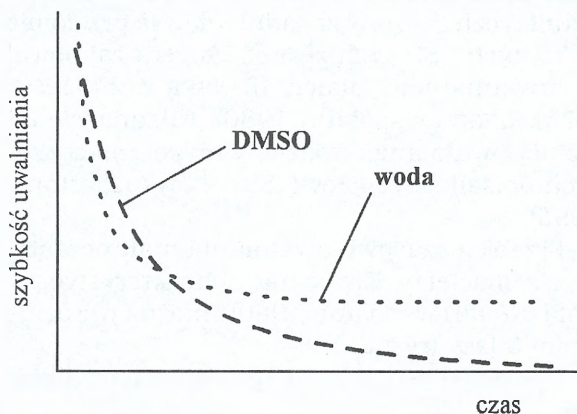


Ryc. 2. Przebieg uwalniania substancji z żywicy Elvax.

I — faza gwałtownego uwalniania, II — faza ustalonego wypłukiwania, III — faza zanikowa procesu.

Kinetyka uwalniania jest silnie uzależniona od postępowania na wszystkich etapach preparatyki. Wzrost stężenia wyjściowego roztworu Elvaxu w znaczny sposób obniża prędkość uwalniania się białka (którym był inhibitor trypsyny z soi o masie cząsteczkowej 21 kDa; LANGER i FOLKMAN 1976). Również rodzaj rozpuszczalnika stosowanego do zawieszania związków niskocząsteczkowych modyfikuje profil czasowy uwalniania (ryc. 3.; SMITH i współaut. 1995). Użycie DMSO w preparatyce powoduje, iż profil uwalniania ma w przybliżeniu charakter wykładniczego spadku, zaś zastosowanie roztworu wodnego daje początkowy silny wyrzut (ok. 2 dni) po czym, w ciągu jednego tygodnia, poziom uwalniania ustala się i trwa nie zmieniony przez 2 miesiące.

Wielkość zawieszonych ziaren białka i względna ich zawartość w roztworze przygotowawczym mają duży wpływ na uwalnianie. Wzrost względnej zawartości białka istotnie wzmacnia szybkość uwalniania, jak również jego sprawność (tj. procent substancji uwolnionej



Ryc. 3. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika użytego podczas preparatyki na przebieg procesu uwalniania substancji z macierzy Elvax.

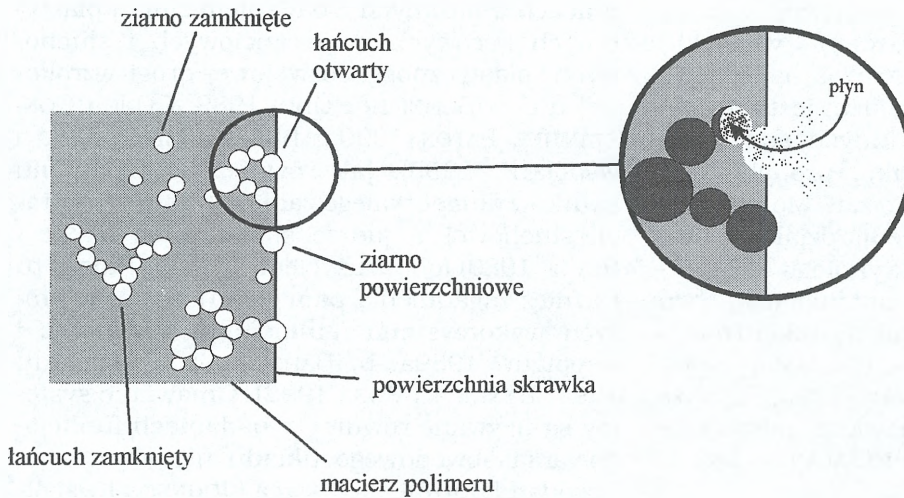
względem zawartości początkowej). Także im większe rozmiary ziaren substancji zawieszonych, tym silniejsze jej uwalnianie. Zależność ta jest najsilniej wyrażona w zakresie zawartości 25–37,5% (RHINE i współaut. 1980). Podobne obserwacje poczyniono dla związków niskocząsteczkowych, aczkolwiek zależność nie była tak znaczna (SMITH i współaut. 1995), przy czym silniej zaznaczona w przypadku macierzy suszonej w niskiej próżni.

Sposób dosuszania to kolejny punkt mający duże znaczenie dla stabilności i powtarzalności parametrów uwalniania. Macierz suszona w niskiej próżni uwalnia inkorporowaną substancję szybciej niż bardziej obkurczona macierz liofilizowana. Początkowy wyrzut substancji jest bardzo obfity i w tym okresie macierz traci większość zawartej w niej substancji. Z kolei uwalnianie z liofilizowanych skrawków w małym stopniu zależy od grubości skrawków (SMITH i współaut. 1995).

Pokrycie polimeru zawierającego substancję czynną przez warstwę czystej żywicy znacznie opóźniało proces uwalniania. Należy pamiętać, że szybkość uwalniania zależy silnie od rozpuszczalności substancji w płynie śródtkankowym (SMITH i współaut. 1995).

MECHANIZMY UWALNIANIA SUBSTANCJI Z ŻYWICY ELVAX — HIPOTEZY

Mechanizm uwalniania substancji z żywicy nie jest dostatecznie wyjaśniony. Istnieją przypuszczenia, że substancja uwalnia się na drodze dyfuzji. Wniknięcie cieczy (płynu śródtkankowego) do macierzy jest niezbędnym warunkiem procesu prawidłowego uwalniania substancji. Efekt początkowego wyrzutu substancji wynika prawdopodobnie z rozpuszczania się cząstek zagnieżdżonych na powierzchni skrawków. Trudno wyjaśnić kontrowersje co do wielkości rzędu kinetyki uwalniania w fazie pośredniej. Ten sam zespół badaczy podaje dla białek albo rząd 0 (LANGER i FOLKMAN 1976) albo rząd 1/2 (RHINE i współaut. 1980). Makrocząsteczki są zbyt duże, by mogły przenikać bezpośrednio przez błonę czystego polimeru (LANGER i FOLKMAN 1976), jest możliwe zatem, iż stałe uwalnianie zachodzi na drodze dyfuzji przez kanały w macierzy. Kanały te powstają prawdopodobnie podczas preparatyki i początkowo są wypełnione zawieszoną substancją tworzącą kręte łańcuchy stykających się ziaren (ryc. 4.). Po rozpuszczeniu ziaren znajdujących się na powierzchni następuje stopniowe rozpuszczanie ziaren tworzących owe łańcuchy i dyfuzja cząsteczek substancji na zewnątrz kanału. Teraz szybkość dyfuzji ustala się na pewnym charakterystycz-



Ryc. 4. Powstawanie łańcuchów złożonych z ziaren inkorporowanej substancji.

Uwalnia się ona jedynie z ziaren powierzchniowych oraz łańcuchów mających kontakt z powierzchnią skrawka. Ziarna i łańcuchy ziaren zamknięte całkowicie w macierzy polimeru nie ulegają rozpuszczaniu przez płyn śródkankowy.

nym poziomie. Substancja uwalnia się aż do wyczerpania. Z powodu znikomej przepuszczalności polimeru dla wody ziarna tkwiące samotnie w macierzy nie ulegają rozpuszczaniu.

Istotną rolę przypisuje się także zjawiskom kapilarnym oraz ciśnieniu osmotycznemu wypychającemu osadzone wewnątrz macierzy cząsteczki, ze względu na nikłą lecz istniejącą przepuszczalność dla wody (LANGER i FOLKMAN 1976).

Wzrost szybkości uwalniania substancji wraz ze wzrostem wielkości cząstek tłumaczy się większą średnicą kanałów oraz porów powstałych w macierzy polimeru. Podobnie większa zawartość zawieszanych cząstek prowadzi do wytworzenia większej liczby mniej krętych kanałów, a zatem większej porowatości macierzy, co poprawia migrację wody do wnętrza

macierzy i dyfuzję rozpuszczonych cząsteczek na zewnątrz.

Powlekanie macierzy warstwą czystego polimeru zmniejsza liczbę cząstek eksponowanych na powierzchni skrawka oraz zmniejsza dostępność porów.

Różnice w szybkości uwalniania substancji, zależne od metody dosuszania, tłumaczy się zróżnicowaną zwartością macierzy, która ściśnięta podczas liofilizacji dostatecznie izoluje ziarna inkorporowanej substancji od rozpuszczalnika (SMITH i współaut. 1995). Dzięki temu uwalnianie nieznacznie zależy od grubości skrawka. W przypadku suszenia w niskiej próżni luźniejsza macierz umożliwia względnie swobodną penetrację wodnego rozpuszczalnika i szybsze wymywanie substancji.

ZASTOSOWANIE W NEUROBIOLOGII

Opisane wyżej systemy kontrolowanego uwalniania zaczęto stosować w neurobiologii doświadczalnej na przełomie lat 70-tych i 80-tych. Jako pierwsze do użytku weszły minipompki osmotyczne, które zastosowano w badaniach nad uzależnieniem od psychostymulantów (NIELSEN 1981) oraz działaniem tych substancji na układ dopaminergiczny w zależności od fazy aktywności dobowej (BURGER i MARTIN IVERSON 1993). Zagadnienia związane z uzależnieniem, tolerancją i odstawieniem analizowano także później w odniesieniu do opiatów (SERAN i SPARBER 1988, YOSHIMURA i współaut. 1993, ROTHMAN i współaut. 1993, WELIN i współaut. 1994) oraz nikotyny (YANG i współaut. 1992, FUNG i LAU 1992, MALIN i współaut. 1993, MALIN i współaut. 1994). Badano także mechanizmy układu nagrody, który przypuszczalnie

jest związany ze zjawiskiem uzależnienia (BARNES i współaut. 1987). W celu określenia wpływu środków uzależniających na płód, na przykład kokainy na rozwój neurochemiczny jąder szwu (FACTOR i współaut. 1993) oraz metadonu na rozwój układu bólowego (ENTERS i współaut. 1991), pompki implantowano u ciężarnych samic szczurów. Inne zagadnienia neuro- i psychofarmakologii również wymagają tego sposobu podawania substancji czynnych. Po długotrwałym podawaniu substancji leczniczych za pomocą minipompek badano zmiany w poszczególnych układach neuroprzekaźnikowych (BARBER i współaut. 1989, COX i współaut. 1991, PAETSCH i GREENSHAW 1993, TODD i współaut. 1995) oraz lateralizację funkcji układu dopaminergicznego w ciele migdałowatym (BRADBURY i współaut. 1985). Minipompki po-

służyły jako dogodne narzędzie do przeanalizowania rozwoju tolerancji na przeciwdrgawkowe działania benzodiazepin (TORCHIN i współaut. 1993). Przy okazji stwierdzono, iż najlepszym do tego rodzaju badań nośnikiem jest tetraglikol, w przeciwieństwie do innych substancji nośnikowych (PEG400, glikol propylenowy, Tween, DMSO, sól fizjologiczna, Molecusol i metylceluloza), które wykazują działanie prokonwulsyjne. W neuroendokrynologii doświadczalnej pompki używano w badaniach wpływu TRH i jego metabolitów na funkcję układu dopaminergicznego w podwzgórzu (IKEGAMI i współaut. 1992, JIKIHARA i współaut. 1993), a także wpływu naltreksonu na unerwienie pośredniego pnia przysadki nerwowej (SALAND i współaut. 1990).

Długotrwałe podawanie substancji czynnych tą metodą stosowano w badaniach nad wpływem blokowania wychwytu zwrotnego monoamin na dobową rytmikę aktywności u rozwijających się szczurów (BARBER i współaut. 1989) oraz w badaniach nad fizjologią zachowań pokarmowych (HOSKINS i HO 1986, SCHICK i współaut. 1988, ITOWI i współaut. 1988, ECKEL i OSSENKOPP 1993, CATZEFLIS i współaut. 1993, VAN DER MEER i współaut. 1995) i seksualnych (YONEZAWA i współaut. 1992).

Pierwsze zastosowania implantów opartych na żywicy Elvax pojawiły się w neurobiologii w połowie lat 80-tych, początkowo w badaniach nad regeneracją w ośrodkowym (POLITIS 1986, 1989) i obwodowym (POLITIS i MILLER 1985, POLITIS 1988, 1989) układzie nerwowym. W badaniach tych stosowano w dalszym ciągu również minipompki osmotyczne (BORZEIX i współaut. 1988). Doświadczenia dotyczące szeroko rozumianej plastyczności układu nerwowego wymagają często długotrwałych podań. Zastosowanie implantów Elvaxu (JABŁOŃSKA i współaut. 1995, SCHNUPP i współaut. 1995) oraz mi-

nipompek (BROWN i współaut. 1993) opisano w pracach związanych z badaniem zmian plastycznych korowych map czuciowych i słuchowych, plastyczności rozwojowej drogi wzrokowej u żab (SCHERER i UDIN 1989, CLINE i CONSTANTINE PATON 1990a, b) i szczurów (LING i współaut. 1995), jak również przy badaniu skutków długotrwałego zablokowania aferencji słuchowej w jądrze ślimakowym (PASIC i RUBEL 1989) (oba z użyciem Elvaxu). Należą tu również zagadnienia pamięci i uczenia, w których wykorzystano minipompki (MCDANIEL i współaut. 1989a, b, BARONE, Jr. i współaut. 1991, BENNETT i ROSE 1992). Omawiane systemy są używane również w badaniach funkcjonowania obwodowego układu nerwowego, na przykład kontroli akcji serca (JOHNSON i współaut. 1983, ALBINO TEIXEIRA i współaut. 1990).

Podsumowując, systemy długotrwałego kontrolowanego podawania można stosować wszędzie tam, gdzie są badane skutki długotrwałego podawania substancji, między innymi w farmakoterapii doświadczalnej (patrz wyżej, oraz np. MCCALLUM i współaut. 1986, COLASANTI 1990) oraz tam, gdzie bada się mechanizmy zjawisk o wolnej dynamice przebiegu, na przykład rozwój lub plastyczność (patrz wyżej). Systemy te stosuje się również w celu stworzenia doświadczalnych modeli pewnych stanów patologicznych, na przykład choroby Huntingtona (RIEKE i współaut. 1989, BAZZETT i współaut. 1993), wewnątrzmoźgowego odczynu zapalnego (SALAND i współaut. 1984) oraz uzależnienia lekowego (NIELSEN 1981, MALIN i współaut. 1994, WELIN i współaut. 1994).

Autorzy dziękują. Profesor Jolancie Skan-giel-Kramskiej i Profesor Małgorzacie Kossut za cenne uwagi podczas przygotowywania artykułu.

METHODS OF SUSTAINED DRUG DELIVERY IN EXPERIMENTAL BIOLOGY

Summary

This review is an attempt to summarize the sustained delivery of drugs into animal tissues and organs. Two controlled release systems commonly used in experimental biology are described and discussed with respect to their

usefulness: the osmotic Alzet minipumps used so far, and new, implantable sustained-release polymer-based systems.

LITERATURA

- ALBINO TEIXEIRA A., AZEVEDO I., BRANCO D., OSSWALD W., 1990. Purine agonists prevent trophic changes caused by sympathetic denervation. *Eur. J. Pharmacol.* 179, 141-149.
- BARBER N. I., TEICHER M. H., BALDESSARINI R. J., 1989. Effects of selective monoaminergic reuptake blockade on activity rhythms in developing rats. *Psychopharmacology Berl.* 97, 343-348.
- BARNES N. J., COSTALL B., DOMENEY A. M., NAYLOR R. J., 1987. Behavioural consequences of the infusion of dopamine into the nucleus accumbens of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuropharmacology* 26, 1327-1335.
- BARONE S., Jr., TANDON P., MCGINTY J. F., TILSON H. A., 1991. The effects of NGF and fetal cell transplants on spatial

- learning after intradentate administration of colchicine. *Exp. Neurol.* 114, 351–363.
- BAZZETT T. J., BECKER J. B., KAAZT K. W., ALBIN R. L., 1993. Chronic intrastratial dialytic administration of quinolinic acid produces selective neural degeneration. *Exp. Neurol.* 120, 177–185.
- BEAR M. F., KLEINSCHMIDT A., GU Q. A., SINGER W., 1990. Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* 10, 909–925.
- BENNETT M. C., ROSE G. M., 1992. Chronic sodium azide treatment impairs learning of the Morris water maze task. *Behav. Neural Biol.* 58, 72–75.
- BORZEIX M. G., CAHN R., CAHN J., 1988. Effects of new chemically and metabolically stable prostacyclin analogues (iloprost and ZK 96480) on early consequences of a transient cerebral oligemia, in the rat. *Prostaglandins* 35, 653–664.
- BRADBURY A. J., COSTALL B., DOMENEY A. M., NAYLOR R. J., 1985. Laterality of dopamine function and neuroleptic action in the amygdala in the rat. *Neuropharmacology* 24, 1163–1170.
- BROWN J. N., MILLER J. M., ALTSCHULER R. A., NUTTALL A. L., 1993. Osmotic pump implant for chronic infusion of drugs into the inner ear. *Hear. Res.* 70, 167–172.
- BURGER L. Y. i MARTIN IVERSON M. T., 1993. Day/night differences in D1 but not D2 DA receptor protection from EEDQ denaturation in rats treated with continuous cocaine. *Synapse* 13, 20–29.
- CATZEFLIS C., PIERROZ D. D., ROHNER JEANERENAUD F., RIVIER J. E., SIZONENKO P. C., AUBERT M. L., 1993. Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and the somatotropic axis in intact adult female rats. *Endocrinology* 132, 224–234.
- CLINE H. T., DEBSKI E. A., CONSTANTINE PATON M., 1987. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 4342–4345.
- CLINE H. T., CONSTANTINE PATON M., 1990a. NMDA receptor agonist and antagonists alter retinal ganglion cell arbor structure in the developing frog retinotectal projection. *J. Neurosci.* 10, 1197–1216.
- CLINE H. T., CONSTANTINE PATON M., 1990b. The differential influence of protein kinase inhibitors on retinal arbor morphology and eye-specific stripes in the frog retinotectal system. *Neuron* 4, 899–908.
- COLASANTI B. K., 1990. A comparison of the ocular and central effects of delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabigerol. *J. Ocul. Pharmacol.* 6, 259–269.
- COX M., GARRICK N., REITE M., GENNARO M., 1991. Minipump clorgyline administration and CSF amine metabolites in unrestrained monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 677–679.
- CRAWLEY J. N., BEINFELD M. C., 1983. Rapid development of tolerance to the behavioural actions of cholecystokinin. *Nature* 302, 703–706.
- DENVER R. J., 1993. Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing hormone-like peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91, 38–51.
- DONLEY T. G., PEARLSTEIN M. E., 1993. Intrapocket tetracycline release in periodontal therapy. *Gen. Dent.* 41, 61–65.
- ECKEL L. A., OSSENKOPP K. P., 1993. Novel diet consumption and body weight gain are reduced in rats chronically infused with lithium chloride: Mediation by the chemosensitive area postrema. *Brain Res. Bull.* 31, 613–619.
- ENTERS E. K., GUO H. Z., PANDEY U., KO D. J., ROBINSON S. E., 1991. The effect of prenatal methadone exposure on development and nociception during the early postnatal period of the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 161–166.
- FACTOR E. M., HART R. P., JONAKAIT G. M., 1993. Neurochemical development of the raphe after continuous prenatal cocaine exposure. *Brain Res. Bull.* 31, 49–56.
- FREEMAN K., LUDINGTON J. R., JR., SVEC T. A., PINERO G. J., HOOVER J., 1994. Continuously infused calcium hydroxide: its influence on hard tissue repair. *J. Endod.* 20, 272–275.
- FUNG Y. K., LAU Y. S., 1992. Chronic effects of nicotine on mesolimbic dopaminergic system in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41, 57–63.
- HOSKINS B., HO I. K., 1986. Lack of effect of dynorphin on consummatory behaviors in obese and normal rats. *Life Sci.* 39, 589–593.
- IKEGAMI H., JIKIHARA H., KOIKE K., MORISHIGE K., KURACHI H., YAMAMOTO N., HIROTA K., MIYAKE A., TANIZAWA O., 1992. Intraventricular administration of thyrotrophin-releasing hormone (TRH) suppresses prolactin secretion and synthesis: A possible involvement of dopamine release by TRH from rat hypothalamus. *J. Endocrinol.* 133, 59–66.
- ITOWI N., NAGAI K., NAKAGAWA H., WATANABE T., WADA H., 1988. Changes in the feeding behavior of rats elicited by histamine infusion. *Physiol. Behav.* 44, 221–226.
- JABLOŃSKA B., GIERDAŁSKI M., KUBLIK A., SKANGIEL KRAMSKA J., KOSSUT M., 1993. Effects of implantation of Alzet 1007D osmotic minipumps upon 2-deoxyglucose uptake in the cerebral cortex of mice. *Acta Neurobiol. Exp.* 53, 577–580.
- JABLOŃSKA B., GIERDAŁSKI M., SIUCIŃSKA E., SKANGIEL KRAMSKA J., KOSSUT M., 1995. Partial blocking of NMDA receptors restricts plastic changes in adult mouse barrel cortex. *Behav. Brain Res.* 66, 207–216.
- JANICKI S., 1987a. Systemy terapeutyczne. [W:] FIEBIG A. (red.) *Farmacja stosowana*. PZWL Warszawa, 194–195.
- JANICKI S., 1987b. Tabletki. [W:] FIEBIG A. (red.) *Farmacja stosowana*. PZWL Warszawa, 164–166.
- JIKIHARA H., IKEGAMI H., KOIKE K., WADA K., MORISHIGE K., KURACHI H., HIROTA K., MIYAKE A., TANIZAWA O., 1993. Intraventricular administration of histidyl-proline-diketopiperazine [Cyclo(His-Pro)] suppresses prolactin secretion and synthesis: a possible role of Cyclo(His-Pro) as dopamine uptake blocker in rat hypothalamus. *Endocrinology* 132, 953–958.
- JOHNSON M. D., SMITH P. G., MILLS E., SCHANBERG S. M., 1983. Paradoxical elevation of sympathetic activity during catecholamine infusion in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227, 254–259.
- LANGER R., 1990. New methods of drug delivery. *Science* 249, 1527–1533.
- LANGER R., FOLKMAN J., 1976. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263, 797–800.
- LEVY R., LEIPHART J., DILLS C., 1994. Analgesic action of acute and chronic intraspinaly administered opiate and alpha 2-adrenergic agonists in chronic neuropathic pain. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 62, 279–289.
- LING J. J., YU J., ROBERTSON R. T., 1995. Sustained inhibition of acetylcholinesterase activity does not disrupt early geniculocortical ingrowth to developing rat visual cortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 86, 354–358.
- MALIN D. H., LAKE J. R., CARTER V. A., CUNNINGHAM J. S., WILSON O. B., 1993. Naloxone precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacology Berl.* 112, 339–342.
- MALIN D. H., LAKE J. R., CARTER V. A., CUNNINGHAM J. S., HEBERT K. M., CONRAD D. L., WILSON O. B., 1994. The nicotinic antagonist mecamylamine precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacology Berl.* 115, 180–184.
- MCCALLUM K. N., SHARMA A. K., BLANCHARD D. S., STRIBLING D., MIRRLEES D. J., DUGUID I. G., THOMAS P. K., 1986. The effect of continuous subcutaneous insulin infusion therapy on morphological and biochemical abnormalities of

- peripheral nerves in experimental diabetes. *J. Neurol. Sci.* 74, 55-67.
- McDANIEL W. F., DAVALL E. J., WALKER P. E., 1989a. ACTH 4-9 analog can retard spatial alternation learning in brain damaged and normal rats. *Behav. Neural Biol.* 52, 271-278.
- McDANIEL W. F., WATERS P. E., DAVALL E. J., 1989b. Arginine vasopressin 4-9 retards spatial alternation learning. *Neuropeptides* 14, 219-224.
- MORRIS R. G., ANDERSON E., LYNCH G. S., BAUDRY M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776.
- NIELSEN E. B., 1981. Rapid decline of stereotyped behavior in rats during constant one week administration of amphetamine via implanted ALZET osmotic minipumps. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15, 161-165.
- PAETSCH P. R., GREENSHAW A. J., 1993. Down-regulation of beta-adrenergic and dopaminergic receptors induced by 2-phenylethylamine. *Cell Mol. Neurobiol.* 13, 203-215.
- PASIC T. R., RUBEL E. W., 1989. Rapid changes in cochlear nucleus cell size following blockade of auditory nerve electrical activity in gerbils. *J. Comp. Neurol.* 283, 474-480.
- POLITIS M. J., 1986. Retina-derived growth-promoting extract supports axonal regeneration in vivo. *Brain Res.* 364, 369-371.
- POLITIS M. J., 1988. Inhibition of reactive gliosis in vivo by exogenous axolemma and myelin fractions. *Exp. Neurol.* 100, 288-296.
- POLITIS M. J., 1989. Exogenous laminin induces regenerative changes in traumatized sciatic and optic nerve. *Plast. Reconstr. Surg.* 83, 228-235.
- POLITIS M. J., MILLER J. E., 1985. The roles of reactive gliosis and mitosis on tropic factor production in traumatized nervous system tissue. *Brain Res.* 346, 186-189.
- RHINE W. D., HSIEH D. S., LANGER R., 1980. Polymers for sustained macromolecule release: procedures to fabricate reproducible delivery systems and control release kinetics. *J. Pharm. Sci.* 69, 265-270.
- RIEKE G. K., SMITH J., IDUSUYI O. B., SEMENYA J., HOWARD R., WILLIAMS S., 1989. Chronic intrastratial L-pyrogutamate: neuropathology and neuron sparing like Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 104, 147-154.
- ROTHMAN R. B., BRADY L. S., XU H., LONG J. B., 1993. Chronic intracerebroventricular infusion of the antioxioid peptide, Phe-Leu-Phe-Gln-Pro-Gln-Arg-Phe-NH₂ (NPFF), downregulates mu opiod binding sites in rat brain. *Peptides* 14, 1271-1277.
- SALAND L. C., ORTIZ E., SAMORA A., 1984. Chronic infusion of opiate peptides to rat cerebrospinal fluid with osmotic minipumps. *Anat. Rec.* 210, 115-123.
- SALAND L. C., REYES E., SAMORA A., GUTIERREZ L., 1990. Chronic naltrexone infusion: effects on innervation of rat neurointermediate lobe. *Brain Res. Bull.* 24, 779-786.
- SCHERER W. J., UDIN S. B., 1989. N-methyl-D-aspartate antagonists prevent interaction of binocular maps in *Xenopus tectum*. *J. Neurosci.* 9, 3837-3843.
- SCHICK R. R., STEVENS C. W., YAKSH T. L., GO V. L., 1988. Chronic intraventricular administration of cholecystokinin octapeptide (CCK-8) suppresses feeding in rats. *Brain Res.* 448, 294-298.
- SCHNUPP J. W., KING A. J., SMITH A. L., THOMPSON I. D., 1995. NMDA-receptor antagonists disrupt the formation of the auditory space map in the mammalian superior colliculus. *J. Neurosci.* 15, 1516-1531.
- SERAN G. F., SPARBER S. B., 1988. Metabolism of methadone by chicken embryos prevents induction of chronic opiod-type dependence after a single injection: use of osmotic pumps for continuous infusion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30, 357-363.
- SILBERSTEIN G. B., DANIEL C. W., 1982. Elvax 40P implants: sustained, local release of bioactive molecules influencing mammary ductal development. *Dev. Biol.* 93, 272-278.
- SMITH A. L., CORDERY P. M., THOMPSON I. D., 1995. Manufacture and release characteristics of Elvax polymers containing glutamate receptor antagonists. *J. Neurosci. Methods* 60, 211-217.
- Technical Information Manual. ALZA Corp. (1995)
- TODD K. G., McMANUS D. J., BAKER G. B., 1995. Chronic administration of the antidepressants phenelzine, desipramine, clomipramine, or maprotiline decreases binding to 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors without affecting benzodiazepine binding sites in rat brain. *Cell Mol. Neurobiol.* 15, 361-370.
- TORCHIN C. D., KAPETANOVIC I. M., KUPERBERG H. J., 1993. A system for testing the development and reversal of anticonvulsant tolerance to benzodiazepines in mice. *Epilepsy Res.* 16, 27-35.
- Van der MEER M. J., SWEEP C. G., PESMAN G. J., BORM G. F., HERMUS A. R., 1995. Synergism between IL-1 beta and TNF-alpha on the activity of the pituitary-adrenal axis and on food intake of rats. *Am. J. Physiol.* 268, E551-E557.
- VETULANI J., STAWARZ R. J., DINGELL J. V., SULSER F., 1976. A possible common mechanism of action of antidepressant treatments: Reduction in the sensitivity of the noradrenergic cyclic AMP generating system in the rat limbic forebrain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 293, 109-114.
- VIJAYAN V. K., COTMAN C. W., 1987. Hydrocortisone administration alters glial reaction to entorhinal lesion in the rat dentate gyrus. *Exp. Neurol.* 96, 307-320.
- WELIN M., HARRO J., YUKHANANOV R., NYBERG F., ORELAND L., 1994. Cholecystokinin receptor binding in morphine analgesia: tolerance, withdrawal and abstinence. *Neuropeptides* 26, 379-383.
- YANG C. Y., WU W. H., ZBUZEK V. K., 1992. Antinociceptive effect of chronic nicotine and nociceptive effect of its withdrawal measured by hot-plate and tail-flick in rats. *Psychopharmacology Berl.* 106, 417-420.
- YONEZAWA A., KAWAMURA S., ANDO R., TADANO T., KISARA K., KIMURA Y., 1992. Chronic clonidine treatment and its termination: effects on penile erection and ejaculation in the dog. *Life Sci.* 51, 1999-2007.
- YOSHIMURA K., HORIUCHI M., KONISHI M., YAMAMOTO K., 1993. Physical dependence on morphine induced in dogs via the use of miniosmotic pumps. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 30, 85-95.