

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie se zaměřením na vzdělávání



Helena Nesvačilová

Vliv neuroimunitního systému na závislost na opioidech
The influence of the neuroimmune system on opioid addiction

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Lucie Hejnová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Vliv neuroimunitního systému na drogovou závislost vypracovala pod vedením vedoucí bakalářské práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 30.4.2024

.....
Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D. za čas, trpělivost a odbornou pomoc, kterou mi věnovala při sepisování bakalářské práce. Taktéž bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia na vysoké škole.

Abstrakt

Tato bakalářská práce zkoumá vztah mezi neuroimunitním systémem a závislostí na opioidech. Zaměřuje se zejména na úlohu astrocytů a mikroglíí, jejichž aktivace hraje důležitou roli v modulaci neurobiologických procesů spojených s užíváním drog a vývojem drogové závislosti. Opioidy mohou gliové buňky přímo aktivovat vazbou na opioidní receptory anebo TLR4. Aktivace glií vede k tvorbě prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF α a IL-1 β . Bakalářská práce dále analyzuje mechanismy, skrze které tyto buňky ovlivňují účinky opioidů, a zapojení zánětlivých procesů do rozvoje a udržování závislosti. Důkladné porozumění těmto procesům může poskytnout důležité informace pro vývoj nových terapeutických strategií pro léčbu drogové závislosti.

Klíčová slova: mikroglie, astrocyty, opioidní receptory, TLR4, TNF α , IL-1 β , BDNF

Abstract

This bachelor thesis examines the relationship between the neuroimmune system and opioid dependence. In particular, it focuses on the role of astrocytes and microglia, whose activation plays an important role in modulating the neurobiological processes associated with drug use and the development of drug dependence. Opioids can directly activate glial cells by binding to opioid receptors and/or TLR4. Glial activation leads to the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF α and IL-1 β . The thesis further analyses the mechanisms, through which these cells influence the effects of opioids, and the involvement of inflammatory processes in the development and maintenance of addiction. A thorough understanding of these processes may provide important information for the development of new therapeutic strategies for the treatment of drug addiction.

Key words: microglia, astrocytes, opioid receptors, TLR4, TNF α , IL-1 β , BDNF

Seznam zkratek

AMPAR	Receptor kyseliny α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové
AQP4	aquaporin 4
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
CD11b	integrin α M
CNS	centrální nervová soustava
CPP	podmíněná preference místa
GABAA	receptor kyseliny γ -aminomáselné typu A
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein
GLT-1	glutamátový transportér 1
GR	glukokortikoidní receptor
Iba1	kalcium vázající adaptorová molekula 1
IFN- γ	interferon gama
IL-10	interleukin 10
IL-13	interleukin 13
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-4	interleukin 4
IL-6	interleukin-6
KCC2	K ⁻ Cl ⁻ kotransportér 2
LPS	lipopolysacharid
M3G	morfin-3-glukuronid
M6G	morfin-6-glukuronid
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza

MD2	myeloidní diferenační protein 2
MOR	μ opioidní receptory
MyD88	myeloidní diferenační faktor 88
NAc	nucleus accumbens
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NMDA	N-metyl-D-aspartátový receptor
siRNA	krátké interferující RNA
TLR	Toll-like receptor
TLR4	Toll-like receptor 4
TNFR1	receptor 1 tumor nekrotizujícího faktoru
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
VTA	ventrální tegmentální oblast
WHO	světová zdravotnická organizace

Obsah

Úvod.....	8
1 Drogová závislost.....	9
1.1 Historie opia.....	10
2 Neuroimunitní systém a jeho složky	12
2.1 Mikroglie	12
2.2 Astrocyty.....	13
3 Endogenní opioidní systém	14
3.1 Systém odměny.....	14
4 Systém odměny a glie.....	16
4.1 Aktivace glií opioidy	17
4.2 Mikroglie a opioidy	20
4.2.1 Prozánětlivé cytokiny a mozkový neurotrofický faktor	22
4.3 Astrocyty a opioidy.....	25
4.3.1 Glukokortikoidní receptory.....	26
4.3.2 Mitochondrie.....	26
4.3.3 Aquaporiny	27
Závěr	29
Použité zdroje	30

Úvod

Opioidy jsou skupina látek, které jsou schopné se vázat na opioidní receptory. Jejich původ může být endogenní (endogenní opioidní peptidy) nebo jde o látky exogenní izolované z opia (morfin, kodein), připravené polosynteticky (heroin) či zcela synteticky (metadon).

V oblasti neurověd provádějí vědci studie, které zkoumají účinky opioidů také na jiné buňky v mozku, než jsou jen neurony, na tzv. gliové buňky. Gliové buňky nejsou tradičně považovány za tak důležité jako neurony, ale nedávný výzkum zdůraznil jejich roli ve funkci mozku a reakci na drogy. Konkrétně bylo zjištěno, že dva typy gliových buněk, astrocyty a mikroglie, hrají klíčovou roli v zánětlivé reakci mozku na opioidy (Toloff & Woodcock, 2022).

Při podávání opioidů, jako je například běžně užívaný morfin, mohou tyto látky aktivovat gliové buňky v mozku. Tato aktivace vede k procesu zvanému neurozánět, který zahrnuje uvolňování molekul podporujících zánět, známých jako cytokiny. Tyto cytokiny mohou způsobit změny v aktivitě a struktuře gliových buněk, čímž se dostanou do prozánětlivého stavu. Mikroglie a astrocyty produkují cytokiny jako jsou interleukin 1 β (IL-1 β) a faktor nádorové nekrózy α (TNF α) a tím se mohou podílet na vzniku hyperalgie a alodynie. Studie na zvířatech navíc prokázaly, že podávání opioidů může vést k zvýšení hladiny těchto cytokinů v určitých oblastech mozku, jako je prefrontální kůra, hipokampus a *nucleus accumbens* (NAc). O těchto oblastech mozku je známo, že se podílejí na vzniku závislosti a zpracování odměny.

Mechanismy účastníci se procesů spojených s drogovou závislostí, jako je například vznik závislosti, vysazení drogy, abstinence, nejsou ještě zcela popsány. Poslední studie ukazují, že právě aktivace gliových buněk opioidy hraje důležitou roli v těchto mechanismech.

Cílem bakalářské práce je tedy shrnout dosavadní poznatky o vlivu neuroimunitních buněk na drogovou závislost. Práce bude zaměřena zejména na závislost vyvolanou podáváním morfinu, který je v současnosti standardně používán k tlumení pooperačních, silných chronických a nádorových bolestí.

1 Drogová závislost

Drogová závislost je termín, který se používá k popisu stavu, kdy osoba vykazuje závislost na návykových látkách. Tento stav může být označován také jako toxikomanie nebo závislost na drogách. Pojem droga zahrnuje látky s psychotropními účinky, které mohou vyvolat stav silné touhy po jejich užívání (Fišerová, 2000). Podle expertů Světové zdravotnické organizace (WHO) lze drogovou závislost definovat jako psychický nebo i fyzický stav, charakterizovaný změnami chování a dalšími reakcemi, které vždy zahrnují nutkání užívat drogu opakovaně pro její psychické účinky a dále také proto, aby se zabránilo vzniku nepříjemných stavů vznikajících při nepřítomnosti drogy v organismu. Stav drogové závislosti je již řadu let řazen mezi chronická onemocnění centrální nervové soustavy (CNS). Některé závislosti mají přesné označení v Mezinárodní klasifikaci nemocí (například závislost na opiátech (heroinu) má označení MKN – 10, F 11.2.). Lidé se k opioidům nejčastěji uchylují, pokud se nachází v těžké životní situaci, protože vyvolávají euforii a pocit blaženosti, či vyhledávají jejich primární účinek, kterým je úleva od bolesti. Pokud jedinec užívá opioidy dlouhodobě, dochází k vývoji tolerance k opioidům a stavu závislosti, s následnými abstinenčními příznaky (Lejčko & Gabrhelík, 2017).

Posilování závislosti je založeno na dvou typech posílení. Pozitivní posílení se vyskytuje, když droga obvykle vyvolává příjemné pocity, a to zvyšuje pravděpodobnost opakovaného užívání. Tento druh posílení se vyskytuje spíše v počáteční fázi závislosti a je spojen s pocitem euforie. Negativní posílení se projevuje zvýšením pravděpodobnosti, že jedinec užije drogu, aby zmírnil nepříjemné stavy spojené s vyloučením dávky drogy z organismu. Vyskytuje se během abstinenční fáze, kdy se odvykání od drogy může projevit jako hyperkatifeie a zvýšený stres. Obě formy posílení mohou současně existovat a být udržovány dlouhotrvající abstinencí a stresem, který je vyvolán návratem do fáze touhy a očekávání v cyklu závislosti (Koob, 2021).

Můžeme rozlišovat dva druhy závislosti, a to fyzickou a psychickou. Fyzická závislost je tělesná adaptace na pravidelnou přítomnost specifické látky v organismu. Užívání opioidů může vést k vývoji specifického abstinenčního syndromu, který se projevuje po snížení dávky léku nebo náhlém přerušení užívání. Může být také způsoben podáním opioidů s antagonistickou aktivitou na receptory. Symptomy abstinenčního syndromu u jedinců užívající opioidy zahrnují nervozitu, podrážděnost, neklid, zívání, zvýšenou

citlivost na bolest, svalovou bolest, zimomřivost, poruchy spánku, úzkost a deprese. Tyto příznaky se nejčastěji projevují na konci dávkovacího intervalu. Existuje i dlouhodobá forma abstinčního syndromu, která přetrvává po vysazení opioidů po řadu měsíců, projevující se celkovým nepohodlím, ztrátou schopnosti prožívat potěšení, zvýšenou citlivostí na bolest, poruchami koncentrace, spánkovými problémy a depresí. Psychická závislost na opioidy je komplexní jev, který zahrnuje nutkavý pocit a touhu užívat látku navzdory negativním důsledkům. Typickým znakem je ztráta kontroly nad užíváním a touha po specifickém euforizujícím efektu látky. K vzniku psychické závislosti může dojít u jedinců s určitou genetickou a psychickou predispozicí a za určitých sociálních podmínek (Lejko & Gabrhelik, 2017). V současnosti se porucha užívání opioidů stala epidemií ve Spojených státech amerických (Toloff & Woodcock, 2022).

1.1 Historie opia

Opium má dlouhou a bohatou historii, která trvá již tisíce let. Zanechalo v lidské civilizaci nesmazatelnou stopu od svého raného používání jako silné léčivé látky až po roli v mezinárodním obchodu a závislosti (Nesmerak, 2016). Zatímco jeho použití k úlevě od bolesti je doloženo již po staletí, jeho použití při léčbě pooperační bolesti bylo popsáno později, především koncem 18. století. Od té doby se v posledních dvou stoletích opium a alkaloidy z něj izolované, staly nejúčinnějšími analgetiky pro zmírnění bolesti (Hamilton & BAskett, 2000).

Během 19. století se odehrály dvě klíčové události v historii opioidů, které pravděpodobně přispěly k problémům, jimž čelíme v současnosti. První událostí byla identifikace morfinu, zatímco druhou událostí bylo vyvinutí možnosti nitrožilní aplikace léků.

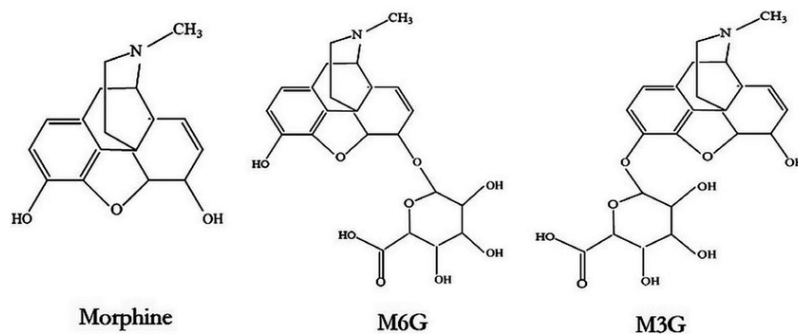
V roce 1806 izoloval Friedrich Sertürner aktivní složku opia – morfin (obr. 1) a pojmenoval jej podle boha snů Morfea (Brownstein, 1993). Tento objev umožnil lépe porozumět účinkům opia a zahájil další výzkum a vývoj opioidních léků.

V roce 1853 objevil doktor Alexander Wood z Edinburgu nový způsob aplikace morfinu pomocí injekčních stříkaček (Hamilton & BAskett, 2000). Tato inovace umožnila efektivnější podání morfinu přímo do těla. Díky tomu se stal morfin lépe dostupným a účinným lékem pro řízení bolesti a další lékařské procedury.

Jak vyplývá z předchozího textu, morfin se již dlouho využívá v lékařské praxi pro své pozoruhodné vlastnosti tlumící bolest. Díky své účinnosti při zvládnání silné bolesti se stal nepostradatelným v oborech, jako je anestezie a paliativní péče. Používání morfinu je však spojeno se značnými problémy, včetně rizika zneužití, závislosti a různých nežádoucích vedlejších účinků (Le Merrer et al., 2009).

Pro hlubší pochopení toho, jak opioidy ovlivňují reaktivitu organismu, je zásadní si uvědomit, že opioidy, jako je morfin, podléhají metabolismu v těle i v CNS, což vede ke vzniku různých aktivních metabolitů, které mají různé účinky na nervovou aktivitu. V případě morfinu dochází k jeho metabolizaci na dvě hlavní formy: morfin-3-glukuronid (M3G) a morfin-6-glukuronid (M6G) (obr. 1) (Christrup, 1997).

M6G je aktivní metabolit s pomalejším nástupem a delším trváním účinku ve srovnání s morfinem, zatímco M3G nemá žádnou afinitu k opioidním receptorům, ale může být zodpovědný za některé excitační účinky, pozorované po vysokých dávkách morfinu, jako jsou křeče a hyperalgezie (Murphy, 2002).



Obr. 1 – Morfin a jeho metabolity

Morfin-3-glukuronid (M3G) a morfin-6-glukuronid (M6G). Převzato Z. Yang et al., 2016

2 Neuroimunitní systém a jeho složky

Neuroimunitní systém se skládá ze struktur a procesů, které zahrnují biochemické a elektrofyziologické interakce mezi nervovým systémem a imunitním systémem. Je spojen s gliovými buňkami, jako jsou mikroglie a astrocyty, ale je známo, že imunitní reakce v mozku ovlivňuje neurony, což může zahrnovat změny v neurotransmisi, tvorbě synapsí a celkově i funkci mozku (Toloff & Woodcock, 2022). Jeho hlavní funkcí je ochrana neuronů před patogeny. Neuroimunitní systém se od periferního imunitního systému liší svou strukturou. Na buněčné úrovni jsou zánětlivé mediátory produkovány a propagovány v CNS mikroglie a astrocyty, endotelovými buňkami, které lemují hematoencefalitickou bariéru, periferními imunitními buňkami a dokonce neurony a oligodendrocyty (Carlson et al., 2023).

2.1 Mikroglie

Mikroglie tvoří 10 – 15 % všech gliových buněk v CNS a jsou často označovány jako tkáňové rezidentní makrofágy CNS (Sofroniew & Vinters, 2010). Ginhoux a kol. prokázali, že mikroglie jsou odvozeny z primitivních makrofágů z embryonálního žloutkového vaku během vývoje (Ginhoux et al., 2010). Jsou jedinečné, protože jsou jediným typem buněk CNS, které mají schopnost fagocytózy. Chrání CNS před infekcemi, poškozením a podílí se na udržení fungování CNS. Dále se podílejí na řadě procesů, jako jsou neurogenní diferenciace, apoptóza, imunitní regulace, zánětlivé reakce a regenerace. Mohou také proliferovat a migrovat do míst zánětu (Nayak et al., 2014). Ve zdravé a zralé CNS mají mikroglie výrazně rozvětvenou morfolonii a aktivně prozkoumávají okolní prostředí pomocí jemných buněčných výběžků. Pokud jsou rozpoznány nebezpečné signály, jako bakterie, viry nebo poškození, mikroglie mění svou morfolonii snížením složitosti buněčných výběžků a přechodem do améboidního stavu (Kettenmann et al., 2011).

Aktivace mikroglíí způsobuje zvýšenou produkci zánětlivých molekul, jako jsou například IL-1 β , interleukin-6 (IL-6), TNF- α , monocytární chemotaktický protein a inducibilní syntáza oxidu dusnatého (Mika, 2008).

2.2 Astrocyty

Astrocyty, nejběžnější typ gliových buněk v CNS, pocházející z ektodermálního neuroepitelu. Tyto buňky vykazují značnou rozmanitost tvaru, funkce a jejich adaptivní plasticita je klíčová pro funkční udržení CNS během vývoje a stárnutí. Astrocyty podporují a dodávají živiny nervové tkáni a také endoteliálním buňkám, které tvoří hematoencefalickou bariéru, jsou zapojeny v neurotransmisi, udržují iontovou rovnováhu v prostředí mimo buňku a účastní se na procesech hojení mozku a míchy po traumatech. Jejich zásadní funkce spočívá v udržování homeostázy a ochrany CNS. Homeostázu CNS řídí pomocí transportu iontů a protonů, odstraněním a rozkladem neurotransmiterů a uvolňováním prekurzorů neurotransmiterů a lapačů reaktivních forem kyslíku (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

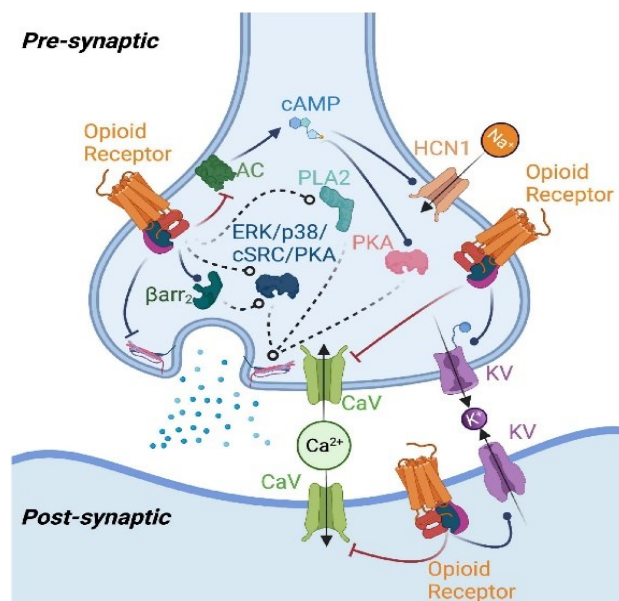
Jedná se též o regulátory lokálních imunitních a zánětlivých reakcí (Sofroniew & Vinters, 2010). Poruchy astrocytů a neuroimunitního systému jsou spojeny s mnoha neurologickými onemocněními, jako je roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a další. Astrocyty přispívají k zánětu v CNS tím, že přebírají některé funkce imunitních buněk, uvolňují cytokiny a chemokiny, které ovlivňují efektorové buňky, modulují hematoencefalickou bariéru a tvoří gliové jizvy (Heneka et al., 2010). Aktivace gliových buněk způsobuje zvýšenou expresi specifických markerů na jejich povrchu, jako je gliový fibrilární kyselý protein. Tento marker je často využíván jako ukazatel aktivace gliových buněk v laboratorních studiích (Abdelhak et al., 2019).

3 Endogenní opioidní systém

Analgetické účinky opioidních léků jsou důsledkem jejich interakce s opioidními receptory (obr. 2). Tyto receptory jsou citlivé na přirozené opioidní látky, které se aktivují až po jejich proteolytickém štěpení z neaktivních polypeptidových hormonů. Endogenní opioidy jsou produkovány v periferních i centrálních nervových systémech a mají vliv na širokou škálu funkcí v těle (Bagley & Ingram, 2020). Opioidní systém tvoří tři hlavní podtypy receptorů – μ , δ a κ , které reagují na endogenní opioidní peptidy získané z tří proteinových prekurzorů: proopiomelanokortinu, proenkefalinu a prodynorfinu. Tyto peptidy a receptory jsou exprimované v periferních a centrálních nervových soustavách a jsou dlouhodobým objektem výzkumu. Opioidní systém má klíčovou úlohu v procesech nocicepce a analgezie, a v poslední době se výzkumy zaměřily na mechanismy bolesti regulované opioidy. Také reguluje různé fyziologické funkce včetně reakcí na stres, dýchání, funkci trávicího systému a endokrinní a imunitní systém. Podstatné je, že tento systém hraje klíčovou roli nejenom při modulaci nálady a pohody, ale také při vzniku návykového chování (Le Merrer et al., 2009).

3.1 Systém odměny

Hlavní roli v systému odměny hraje neurotransmitter dopamin a dvě struktury mozku – ventrální tegmentální oblast (VTA) a NAc. Ve VTA dochází ke zpracování informace z prostředí a určení, zda je podnět odměňující nebo averzivní. Aktivita dopaminerních neuronů ve VTA ovlivňuje jeho výlev v NAc, které zprostředkovává odměňující účinky podnětů. Tato signalizace je rozhodující pro motivaci a udržování posíleného chování. Dopaminerní neurony z VTA také pronikají do amygdaly a hipokampu, kde ovlivňují emoce a paměť. Další oblastí je prefrontální kortex, ve kterém dochází ke kontrole a seberegulaci chování vzhledem k odměně. Důležitou roli v signalizaci systému odměny hrají opioidy, které aktivací μ opioidních receptorů (MOR) tlumí aktivitu GABAergních interneuronů, a tak zvyšují výlev dopaminu. Dlouhodobé užívání drog způsobuje neuroadaptace, které zahrnují změny v glutamátergních a dopaminerních obvodech, což může narušit schopnost sebekontroly a zvýšit citlivost na podněty související s drogami (H. Zhang et al., 2020).



Obr. 2 –Vliv opioidů na přenos signálu mezi neurony

Komplexní přehled možných mechanismů, které moduluji synaptický přenos zprostředkovaný opioidními receptory. Aktivace opioidních receptorů má různé účinky na neurochemickou signalizaci. Zahrnuje zvýšení aktivity draslíkových kanálů (KV) a současně snížení funkce vápníkových kanálů (CaV), což může vést ke změnám v uvolňování neurotransmiterů a postsynaptické excitabilitě. Tyto receptory mohou také ovlivnit činnost adenylycyklázy (AC), kdy dochází ke snížení hladiny cAMP a následně pak ke snížení aktivity proteinkinázy A (PKA) a hyperpolarizaci aktivovaného cyklickými nukleotidy regulovaného kanálu typu 1 (HCN1). Dále jsou zapojeny různé proteiny a kinázy, jako je β -arrestin2 (β arr2), fosfolipáza A2 (PLA2), extracelulárním signálem regulovaná kináza (ERK), p38, cSRC a proteinkináza C (PKC), které přispívají k účinkům opioidních receptorů na neurotransmisi. Signalizace prostřednictvím G proteinů spojených s opioidními receptory může tak přímo ovlivnit proces uvolňování neurotransmiterů. Převzato z Reeves et al., 2022.

4 Systém odměny a glie

Závislost na opioidech představuje závažný zdravotní problém, který je často spojován s přímými účinky opioidů na neurony. Nicméně rostoucí počet důkazů naznačuje, že také ne-neuronální buňky, zejména astrocyty a mikroglie, hrají významnou roli v mechanismu odměny opioidů.

Bylo prokázáno, že užívání opioidů může aktivovat gliální buňky, což je sledováno zvýšenou expresí markerů astrocytů, jako je gliální fibrilární kyselý protein (GFAP), nebo markerů mikroglíí, jako je integrin α M (CD11b) a kalcium vázající adaptorová molekula 1 (Iba1), a také produkcí prozánětlivých cytokinů. Neurozánět vyvolaný opioidy byl detailně studován na molekulární i buněčné úrovni. Studie provedené *in vitro* ukázaly, že aplikace morfinu zvyšuje expresi chemokinů, chemokinového ligandu 2 s C-C motivem, chemokinového ligandu 5 s C-C motivem a interferonu γ (IFN γ) v mozku. Experimenty provedené *in vivo* na myších ukázaly, že podávání opioidů zvyšuje expresi prozánětlivých cytokinů jako je IL-1 β , TNF- α a IL-6 v prefrontálním kortexu a hipokampu, což jsou oblasti spojené s procesy závislosti. Další výzkum prokázal, že subkutánní implantace morfinových pelet po dobu několika dnů zvyšuje produkci TNF- α , IL-1 β a IL-6 v NAc, což je oblast spojená s odměnou za užívání drog (Liang et al., 2008). Na buněčné úrovni bylo také zjištěno, že opioidy zvyšují hustotu mikroglíí v mozku a indukují morfologické změny mikroglíí směřující k aktivaci, což je charakterizováno změnami ve tvaru a fenotypu mikroglíí (Davis et al., 2017). Celkově lze říci, že užívání opioidů zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů v mozku, vyvolává morfologické změny v mikroglíích a zvyšuje hustotu gliových buněk, což jsou charakteristické znaky prozánětlivého stavu v neuroimunitním systému.

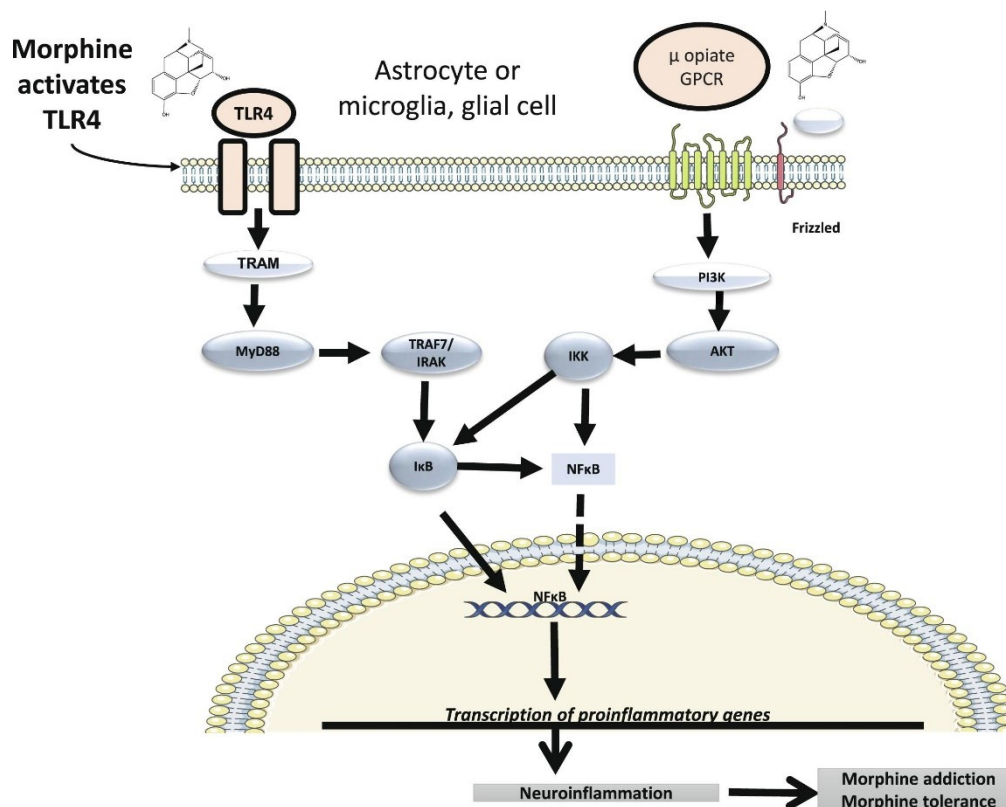
Vliv zneužívání opioidů na transkripční profil neuronů a glií zkoumala studie zaměřená na ventrální střední mozek včetně *substantia nigra* a VTA, které hrají klíčovou roli při mediaci odměňovacího a návykového chování. Výzkum zahrnoval zkoumání genové exprese u 212 713 jader z ventrálního středního mozku 95 jednotlivců, s historií zneužívání opioidů a jednotlivců bez drogové expozice. Byla analyzována data dvou nezávislých kohort lidí z různých geografických oblastí USA, což zvyšuje důvěryhodnost a robustnost zjištění. Studie zjistila, že chronická expozice opioidům neměla vliv na podíl neuronálních a gliových subtypů mezi jednotlivci vystavenými drogové expozici a kontrolními skupinami. Nicméně ukázala, že gliální transkriptom byl opioidy široce

změněn. Jednalo se zejména o zvýšení exprese genů spojených s aktivací imunitní odpovědi včetně interferonu, signalizace nukleárního faktoru κ B (NF- κ B) a dráhy buněčné motility, a naopak byla detekována snížená exprese genů synaptické signalizace a plasticity v nedopaminergních neuronech ventrálního středního mozku. Závěry studie zdůrazňují důležitost zkoumání gliových buněk a jejich role v mechanismu závislosti na opioidech, což otevírá nové možnosti pro budoucí výzkum a klinické aplikace (Wei et al., 2023).

Role aktivace glií v závislosti na morfinu byla prokázána v behaviorálních pokusech s potkany. Principem bylo použití média od primárních gliálních kultur (kokultura astrocytů, mikroglií a oligodendrocytů) ovlivněných morfinem. Takto kondicionované médium bylo následně injikováno do NAc. K hodnocení chování spojeného s vyhledáváním morfinu byla použita behaviorální metoda podmíněné preference místa (CPP). Po indukci CPP bylo zvířatům podáváno kondicionované médium během fáze vyhasínání, a poté byli potkani testováni na znovu vyvolání CPP po podání dávky morfinu. Podání kondicionovaného média významně prodloužilo fázi vyhasínání o tři dny a významně zvýšilo velikost znovuvyvolání CPP po podání dávky morfinu. Studie naznačuje, že aktivace gliových buněk hraje významnou roli v udržování a znovuvyvolání chování spojeného s vyhledáváním morfinu. Aktivované glie uvolňují různé faktory, které mohou ovlivňovat neuronální plasticitu a behaviorální odpovědi na drogy (Arezoomandan et al., 2016).

4.1 Aktivace glií opioidy

Opioidy stimulují gliové buňky tím, že se váží na povrchové receptory buněk, tím spustí signalizační kaskádu, a tak je aktivují (obr. 3). Mezi tyto receptory patří opioidní receptory a Toll-like receptory (TLR).



Obr. 3 – Molekulární mechanismus aktivace glií morfinem

Morfin vyvolává aktivaci Toll-like receptoru 4 (TLR4) v mozkových buňkách, jako jsou mikroglie, astrocyty a neurony. Tento proces zahrnuje aktivaci několika downstream proteinů včetně translokačního proteinu asociujícího membrány (TRAM) a myeloidního diferenačního faktoru 88 (MyD88), které následně spustí aktivaci receptoru nádorového nekrotického faktoru (TRAF7) nebo IRAK, což vede k aktivaci nukleárního transkripčního faktoru kappa B (NF-κB). Současně morfin stimuluje opioidní receptory asociované s G-proteiny, což spouští kaskádu signálů přes fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) a proteinkinázu B (Akt), aktivující inhibiční kappa B kinázu (IKK), která následně fosforyluje inhibitor nukleárního faktoru kappa B (IκB). Tím dojde k uvolnění jeho vazby s NF-κB a translokaci NF-κB do jádra. Obě tyto signální cesty společně podporují transkripční aktivaci prozánětlivých genů. Tyto procesy jsou klíčové pro indukci neurozánětu, který přispívá k rozvoji tolerance a závislosti na morfinu. Převzato z Malik & Agrewala, 2024.

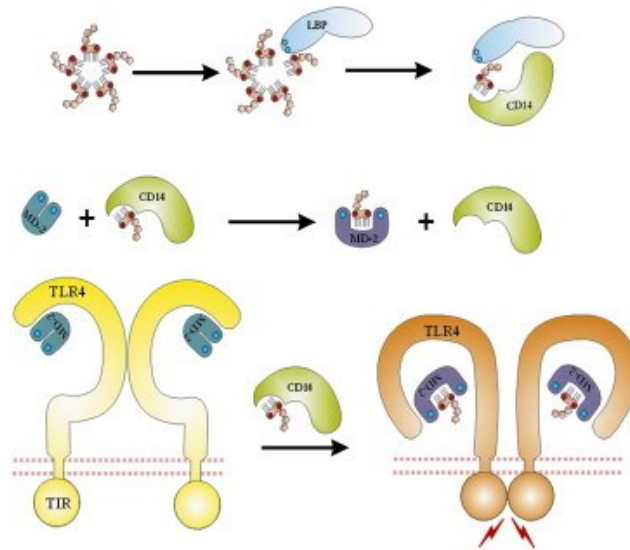
Klasickou drahou, kterou opioidy ovlivňují činnost buněk, je jejich vazba na opioidní receptory. Rozeznáváme tři hlavní podtypy opioidních receptorů – μ , δ a κ opioidní receptory. Aktivované receptory přenášejí signál do buňky interakcí s G_i rodinou heterotrimerních G-proteinů. Po aktivaci se G-protein rozdělí na G_α a $G_\beta\gamma$ části, které následně aktivují celou řadu efektorových proteinů. Druhou možností signalizace opioidních receptorů je signalizace pomocí β -arrestinu (Bohn et al., 2000). Hlavním

opioidním receptorem pro zprostředkování účinků morfinu je MOR (Zhuang et al., 2022). Opioidní receptory byly prokázány jak u mikroglíí, tak i u astrocytů. Nicméně výsledky studií jsou nejednotné a zdá se, že u astrocytů záleží, z jaké části mozku byly odebrány. U mikroglíí existuje ještě větší kontroverze (Kadhim et al., 2018).

Druhou drahou, kterou mohou opioidy aktivovat, je signalizace TLR a zejména Toll-like receptor 4 (TLR4). TLR4 má schopnost selektivně rozpoznávat a reagovat na bakteriální lipopolysacharid (LPS) (obr. 4), který tvoří vnější membránu gramnegativních bakterií. Jedná se o receptor pro rozpoznávání vzorů, který je aktivován vazbou různých molekulárních vzorů spojených s patogeny, jako jsou lipidy, lipoproteiny, proteiny a nukleové kyseliny, které se běžně vyskytují na povrchových membránách mnoha různých mikrobů (H. Zhang et al., 2020). Díky své klíčové úloze ve vrozené imunitě je TLR4 široce rozšířen v buňkách imunitního systému, včetně mikroglíí a astrocytů (Bsibsi et al., 2002). Na buněčné membráně tvoří TLR4 spolu s myeloidním diferenciacním proteinem 2 (MD2) komplex, který slouží jako hlavní místo pro vazbu LPS (Shimazu et al., 1999). Po navázání LPS na tento komplex TLR4-MD2 se spustí signální kaskáda závislá na myeloidním diferenciacním faktoru 88 (MyD88), což vede ke zvýšení aktivace mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK) uvnitř buňky. Tyto MAPK následně ovlivňují genovou expresi mikroglíí, což má za následek zvýšenou produkci a uvolňování zánětlivých cytokinů (TNF α a IL-1 β), určitých neurotrofických faktorů (například mozkového neurotrofického faktoru (BDNF)) a markerů aktivity gliových buněk. Tyto látky mohou následně ovlivnit plasticitu synapsí a neurotransmisi (Rizzo et al., 2018).

Na počátku 21. století bylo zjištěno, že opioidy patří mezi další látky, které mohou interagovat s TLR4 a aktivovat ho. V *in vivo* pokusech s použitím myši s deletovaným TLR4 nebo inhibitorů signalizace TLR4 došlo ke změnám v odpovědi na morfin. Jednalo se o ovlivnění cití bolesti, projevů hyperalgie a tolerance a také k potlačení produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Hutchinson, Lewis, et al., 2010; Hutchinson, Zhang, et al., 2010; X. Wang et al., 2012). Počítačová simulace ukázala, že morfin se může vázat do vazebného místa pro LPS na MD2 molekule (Hutchinson, Zhang, et al., 2010). I z pohledu závislosti byl prokázán efekt morfinu přes TLR4. Farmakologická blokáda nebo knockout MyD88-TLR4 signalizace u myši potlačily morfinem vyvolanou CPP. Také došlo ke snížení koncentrace extracelulárního dopaminu v NAc (Hutchinson et al., 2012). Aplikace inhibitorů dráhy TLR4/STAT3 do VTA prokázala důležitost

stimulace této dráhy morfinem při vzniku a udržování CPP vyvolané morfinem u potkanů (J.-X. Chen et al., 2017).



Obr. 4 – Schematické znázornění rozpoznání LPS TLR4

Na schématu je graficky znázorněno, jak je lipopolysacharid (LPS) rozpoznáván pomocí signálního komplexu TLR4. Lipopolysacharid vázající protein (LBP) se váže na LPS a přenáší ho na MD-2 nebo na dimer MD-2 a TLR4. Tento proces je zprostředkován pomocí CD14. Po vytvoření dimeru ze dvou komplexů LPS, MD-2 a TLR4, dochází ke konformační změně, která se přenáší k cytoplazmatickým doménám a vede k aktivaci receptoru. Převzato z Jerala 2007.

4.2 Mikroglie a opioidy

Mikroglie, jako rezidentní imunitní buňky CNS, hrají klíčovou roli v neurozánětlivých procesech a reakci na opioidy.

Vědci zjistili, že chronické podávání morfinu aktivuje TLR4 a jeho signalizační dráhu přes adaptorový protein MyD88, což vede ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ a IL-6 v NAc. Tyto změny přispívají k neurozánětlivým procesům, které mohou ovlivňovat dopaminergní systémy v mozku a podporovat rozvoj tolerance a závislosti na morfinu (H. Zhang et al., 2020). Myši byly chronicky vystaveny morfinu, aby vědci simulovali podmínky dlouhodobého užívání opioidů. Hladiny $\text{TNF}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ v NAc byly měřeny pomocí biochemických metod. Aktivace TLR4 a jeho signalizace přes MyD88 byla zkoumána pomocí genetických a farmakologických nástrojů. Byly provedeny behaviorální testy k vyhodnocení změn v nociceptivní citlivosti a závislostním chování. MyD88 hraje klíčovou roli v indukci neurozánětlivých procesů a rozvoji

závislosti na morfinu. Zacílení na tyto signalizační dráhy může nabídnout nové terapeutické strategie pro léčbu závislosti na opioidech (Rivera et al., 2019).

Na buněčné úrovni v *in vitro* pokusech s mikroglialní buněčnou linií BV-2 a endoteliálními buňkami CNS, které exprimují TLR4, podání morfinu vedlo k aktivaci p38 a extracelulárním signálem aktivované kinázy (ERK) drah a produkci IL-1 β . Použití krátké siRNA kablokování exprese TLR4 nebo knockout tohoto receptoru zabránilo tomuto efektu. Výsledky této studie naznačují, že aktivace TLR4 a následná signalizace hrají klíčovou roli při zprostředkování morfinem indukovaného neurozánětu. Inhibice těchto signálních drah představuje potenciální terapeutickou strategii pro snížení rizika rozvoje závislosti (X. Wang et al., 2012).

Bylo zjištěno, že chronické podávání morfinu vedlo k aktivaci mikroglíí a signalizační dráhy p38 v nich v NAc. Chronické podávání morfinu vyvolalo signifikantní CPP. Podávání inhibitoru aktivace mikroglíí minocyclinu před podáváním morfinu snížilo aktivaci p38 dráhy a zhoršila vytvoření CPP. Příméablokování p38 inhibitorem SB203580 mělo obdobný výsledek na tvorbu CPP. Na základě těchto výsledků autoři došli k závěru, že aktivace p38 signalizační dráhy v mikroglíích v NAc hraje klíčovou roli při získávání a udržování CPP vyvolané morfinem. To přispívá k rozvoji závislosti na opioidech. Inhibice této dráhy může představovat potenciální terapeutický přístup k prevenci a léčbě drogové závislosti na opioidech (X.-Q. Zhang et al., 2012).

Pozoruhodným zjištěním je, že neporušená mikroglialní signalizace MyD88 při podávání nízkých dávek morfinu podporuje běžný vývoj CPP, urychluje vymizení paměti odměny a může potenciálně bránit návratu k užívání morfinu. Naopak chování podobné závislosti je ještě výraznější u myši s mikroglialním deficitem MyD88. Celkově tato zjištění naznačují, že snížená mikroglialní neuroimunitní signalizace MyD88 vede ke zvýšení objemu mikroglialních lysozomů obsahujících úlomky proteinu doublecortinu z *gyrus dentatus*, což koreluje s prodlouženým vyhasínáním a lepším obnovením paměti odměny. Výzkum ukázal, že selektivní odstranění MyD88 u mikroglíí neovlivňuje získávání CPP pro morfin, ale prodlužuje vymizení paměti odměny a usnadňuje její obnovení u myši. Tyto výsledky naznačují, že MyD88 může hrát odlišné role v mikroglíích a jiných typech buněk. Také zdůrazňují, jak je důležité zkoumat specifický efekt jednotlivých typů buněk, aby bylo možné pochopit skutečné dopady aktivace TLR4 a jeho signalizace v opioidní odměně (Rivera et al., 2019).

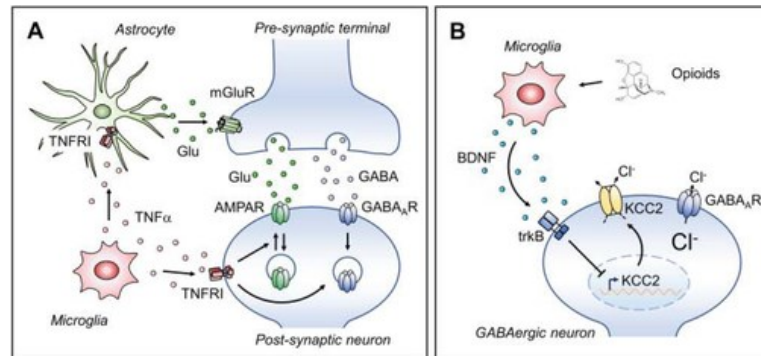
Kromě efektů vyvolaných aktivací TLR4 receptory mohou mikroglie být ovlivněny i aktivací MOR. I přes kontroverzní výsledky detekce opioidních receptorů u mikroglíí, přítomnost MOR byla prokázána pomocí transkriptomiky v různých oblastech myšního i posmrtného lidského mozku (Maduna et al., 2019).

Mikroglie mají schopnost polarizovat se do dvou hlavních fenotypů nazývaných M1 a M2, které představují prozánětlivou a protizánětlivou odpověď imunitního systému v mozku. Fenotyp M1 je aktivován stimuly jako LPS nebo lipoteichová kyselina a je charakterizován zvýšenou expresí prozánětlivých markerů, jako jsou IL-1 β , IL-6, CD 86 a inducibilní syntáza oxidu dusnatého. Na druhé straně fenotyp M2 je indukován faktory jako interleukin-4 (IL-4) a kyselina betulinová a je spojen s vyšší expresí protizánětlivých cytokinů, jako jsou IL-4, IL-10, IL-13 a CD206 (Lee et al., 2002). Regulace mezi těmito dvěma fenotypy hraje klíčovou roli v neurozánětlivých procesech (Ferrante & Leibovich, 2012). Studie Mali a Novotný popsala, že opioidní agonisté, jako je DAMGO, DADLE a U-50488, mohou ovlivňovat polarizaci mikroglíí směrem k fenotypu M2, což může vést k protizánětlivému a neuroprotektivnímu efektu (Mali & Novotny, 2022). Tyto výsledky naznačují, že aktivace mikroglíí opioidními receptory by mohlo naopak vést ke snížení neurozánětu. Z tohoto pohledu by cílení na molekulární mechanismy, které regulují polarizaci mikroglíálních buněk, mohlo představovat zajímavou terapeutickou strategii pro léčbu závislosti na opioidech.

4.2.1 Prozánětlivé cytokiny a mozkový neurotrofický faktor

Významným prozánětlivým cytokinem je TNF α . TNF α produkovaný jako výsledek aktivace dráhy TLR4 je klíčovým hráčem v neurozánětu vyvolaného expozicí morfinu. Chronické podávání morfinu potkanům stimulovalo neurozánět měřený expresí IL-1 β a narušilo zpětné vychytávání glutamátu. Podání anti-TNF α peptidu tento efekt vyrušilo (Eidson et al., 2017). Z dalších pozorování se zdá, že TNF α může ovlivňovat synaptický přenos. TNF α , který působí na receptor 1 tumor nekrotizujícího faktoru (TNFR1), zvyšuje povrchovou expozici receptoru kyseliny α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové (AMPA) prostřednictvím dráhy závislé na fosfatidylinositol-3-kináze (PI3K). Mnoho z nově exprimovaných AMPAR nemělo nebo obsahovalo nižší množství GluR2 podjednotky AMPAR. Tato změna ve složení synaptických AMPA receptorů pravděpodobně činí alespoň část receptorů propustných pro vápník. Zjistili, že TNF α zároveň snižuje povrchovou expozici receptoru kyseliny γ -aminomáselné typu A

(GABAA), což vede ke snížení inhibičního synaptického přenosu. Jedním z účinků TNF α je tedy změna rovnováhy excitace a inhibice (obr. 5) (Stellwagen et al., 2005). Kromě toho TNF α řídí synaptický přenos na presynaptické úrovni tím, že podněcuje astroglální uvolňování glutamátu přes stimulaci TNFR1, a tím aktivuje metabotropní glutamátové receptory na presynaptických neuronech (obr. 5) (Bezzi et al., 2001).



Obr. 5 – Modulace synaptického přenosu a plasticity gliemi

- A. TNF α vylučovaný mikroglie reguluje sílu synapse. TNF α z mikroglíí aktivuje TNFR1 na neuronech, což ovlivňuje exprese AMPA receptorů a GABAA receptorů na povrchu neuronů. Také podporuje uvolňování glutamátu z astrocytů, který dále ovlivňuje synaptický přenos aktivací metabotropních glutamátových receptorů před synapsí.
- B. Mikroglie mohou regulovat aktivitu GABAergních neuronů pomocí BDNF. Při aktivaci opioidy mohou mikroglie uvolňovat BDNF, což snižuje expresi KCC2, což vede k posunu inhibiční signálové dráhy k excitaci tím, že zvyšuje koncentraci chloridových iontů v cytoplazmě. Převzato Zhang et al., 2020.

Studie naznačují, že TNF α může hrát roli v nastavení velikosti odměny na opioidy, protože bylo zjištěno, že může ovlivňovat citlivost na opioidy u lidí, což naznačuje genetická asociační studie (Reyes-Gibby et al., 2008). Dále bylo prokázáno, že TNF α ovlivňuje chování vyvolané opioidy, konkrétně hyperlokomoci a senzibilizaci. Senzibilizace je zesílení reakcí na zneužívání drog, které se objevuje po opakovaném podávání a přetrvává dlouho po skončení užívání drog. Podávání morfinu zvýšilo hyperlokomoci. Opakované podávání morfinu po dobu několika dnů vedlo ke zvýšení lokomotorického stimulačního účinku. Kombinované podání TNF α s morfinem inhibovalo vývoj hyperlokomoce a senzibilizace způsobené morfinem. Tyto výsledky ukazují, že TNF α potlačuje rozvoj nadměrné pohybové aktivity a senzibilizace vyvolané morfinem při opakovaném podávání, ale ne po jediném podání. Podávání TNF α před nebo po podávání morfinu výrazně potlačilo morfinovou CPP (Niwa et al., 2007).

Konkrétní příčiny těchto výsledků nejsou zcela jasné. Existuje zde možnost, že $\text{TNF}\alpha$ může ovlivňovat obvody odměny odlišným způsobem než ostatní prozánětlivé cytokiny a chemokiny, avšak k potvrzení této hypotézy jsou zapotřebí další studie.

Dalším důležitým cytokinem je IL-1 β . Přímý efekt IL-1 β na signalizaci neuronů byl studován na modelu primárních neuronů izolovaných z hipokampu potkanů. IL-1 β zvyšoval aktivitu N-metyl-D-aspartát receptorů (NMDA) prostřednictvím fosforylace tyrosinových zbytků na podjednotkách NR2A/B aktivací Src kináz. Toto zvýšení vede k vyššímu vtoku Ca^{2+} iontů, což zvyšuje neuronální excitabilitu a potenciální neurotoxicitu. Inhibice Src kináz blokovala IL-1 β -indukovanou fosforylaci NR2A/B a následný vtok Ca^{2+} , čímž snižuje neuronální smrt zprostředkovanou NMDA receptory (Viviani et al., 2003). Závislost na opioidech je spojena s neurozánětlivými procesy modulovanými cytokiny jako IL-1 β . Aktivace NMDA receptorů a influx Ca^{2+} ovlivňují synaptickou plasticitu a neuronální komunikaci, což jsou klíčové procesy závislosti. IL-1 β tak může přispívat ke zvýšené neuronální excitabilitě a neurotoxicitě, spojené s chronickým užíváním opioidů. Inhibice Src kináz a modulace IL-1 β signalizace představují potenciální terapeutické cíle pro léčbu závislosti na opioidech a snížení jejich neurodegenerativních účinků.

BDNF je důležitý člen rodiny nervových růstových faktorů, který má klíčovou roli v regulaci synaptické plasticity v CNS. Hlavním zdrojem BDNF jsou neurony, ale bylo prokázáno, že také mikroglie produkují BDNF (Trang et al., 2009). Vliv BDNF na chování související s odměnou byl sledován na myším modelu závislosti vyvolané dlouhodobým podáváním morfinu. Chronické podávání morfinu vedlo k aktivaci mikroglíí ve VTA a významnému zvýšení exprese BDNF. Zvýšené hladiny BDNF následně snížily expresi a funkci K^+Cl^- kotransportéru 2 (KCC2) na GABAergních neuronech ve VTA. KCC2 je klíčový pro udržení chloridového gradientu, který umožňuje inhibiční funkci GABAA receptorů. Snížení KCC2 vede k narušení tohoto gradientu, což snižuje jejich inhibiční schopnost, a následně sníženou inhibici dopaminergních neuronů ve VTA. To vedlo k narušení dopaminergní signalizace a snížení odměňovacího chování, což je klíčový faktor při rozvoji závislosti na opioidech. Studie rovněž ukázala, že inhibice aktivace mikroglíí nebo blokování BDNF signalizace normalizuje inhibiční potenciál GABAA receptorů, což vede k obnovení normálního odměňovacího chování u zvířat závislých na opioidech (Taylor et al., 2016). Injekce BDNF do VTA zvyšují několik behaviorálních efektů drog, včetně senzibilizace psychomotoriky a zvýšeného hledání

drog podnětem. Autoři zjistili, že jediná aplikace BDNF do VTA podporuje přechod u opioidů od dopaminově nezávislého k dopaminově závislému systému odměny (Vargas-Perez et al., 2009).

4.3 Astrocyty a opioidy

Astrocyty, klíčové glie v mozku, hrají významnou roli v neuroimunitní signalizaci, což ovlivňuje synaptický přenos a plasticitu. Opioidy mohou aktivovat astrocyty, což vede k sérii buněčných a molekulárních změn. Tyto změny jsou zásadní pro pochopení mechanismů, kterými opioidy přispívají k odměňování a potenciální závislosti.

Modulátor glií propentofyllin snížil aktivaci astrocytů indukovanou morfinem v *in vitro* primární kultuře neuronů a glií. V *in vivo* myším modelu podání propentofyllinu vedlo ke snížení CPP vyvolaného morfinem. Tyto výsledky naznačují, že propentofyllin může být potenciální terapeutický prostředek v léčbě závislosti na opioidech, který cílí na modulaci astrocytické aktivity. Vliv aktivace astrocytů morfinem na závislost byl také prokázána aplikací kondicionovaného média astrocytů do NAc nebo cingulárního kortexu. Primární astrocyty byly nejprve inkubovány s morfinem, a následně bylo inkubační médium odebráno a aplikováno do mozkových částí. V CPP testu myši s aplikovaným kondicionovaným médiem vykazovaly vyšší odměňující účinky morfinu, což ukazuje, že faktory produkované astrocyty mohou zesilovat účinky morfinu na odměňující chování (Narita et al., 2006).

Aktivované astrocyty v hippocampu a NAc ovlivňují neuronální aktivity prostřednictvím uvolňování gliotransmiterů, jako je glutamát. Tímto způsobem mohou modifikovat synaptickou přenosovou účinnost a přispět k dlouhodobým změnám v neuronálních sítích, které jsou spojené s odměňováním a závislostí na opioidech. Aktivace astrocytů může podporovat indukci a udržení dlouhodobé potence v mozkových oblastech, jako je NAc, což je kritická oblast pro zpracování odměn. Tento mechanismus je důležitý pro pochopení, jak opioidy mění neuronální síť vedoucí k závislosti. Porozumění roli astrocytů v opioidní aktivaci vede k vývoji nových terapeutických strategií zaměřených na modulaci gliie jako potenciální léčby závislosti na opioidech. V souhrnu, astrocyty hrají klíčovou roli v mechanismu, kterým opioidy ovlivňují mozkové funkce (Corkrum et al., 2019)

4.3.1 Glukokortikoidní receptory

Glukokortikoidní receptory (GRs) jsou jaderné receptory, které po navázání glukokortikoidů mohou regulovat expresi genů. GRs hrají významnou roli v regulaci mozkových funkcí včetně závislosti. Podíl aktivace GRs v astrocytech na závislost na opioidech byl prokázán. Aktivace GRs vede ke změnám v genové expresi, které ovlivňují chování související se závislostí na opioidech. Selektivní knockdown GRs v astrocytech v NAc zvýšil citlivost k závislosti na opioidech. Bylo prokázáno posílení CPP u myši a podpoření inhibice nervové excitability a neuroplasticity v NAc vyvolané morfinem. Tento efekt se zdá být závislý na regulaci metabolismu GRs. Výzkum odhalil, že odstranění GRs výrazně snížilo dexametazonem vyvolanou absorpci glukózy a uvolňování laktátu astrocytech, a naopak systémové podání laktátu pozorované zvýšené CPP vyvolané morfinem u myši s deletovaným GRs v astrocytech v NAc normalizovalo (Skupio et al., 2020). Podle studie, která byla provedena Yang et al., laktát může zvyšovat excitabilitu neuronů. Laktát v neuronech stimuloval expresi genů souvisejících se synaptickou plasticitou. Tento efekt je pravděpodobně způsoben modulací aktivity NMDA receptoru (Yang et al., 2014). To naznačuje, že modulace uvolňování laktátu z astrocytů může mít vliv na signalizaci neuronů, a tedy na odměnu spojenou s užíváním morfinu. Studie tedy naznačují, že signální cesty závislé na glukokortikoidních receptorech v astrocytech mohou modulovat zpracování opioidní odměny prostřednictvím regulace astrocytárního metabolismu.

4.3.2 Mitochondrie

Studie Rao et al. zjistila, že morfin způsobil upregulaci glykolýzy v astrocytech, což vedlo k nadměrné fragmentaci mitochondrií v těchto buňkách. Tento proces byl doprovázen zvýšenou produkcí reaktivních kyslíkových radikálů. Fragmentované, dysfunkční mitochondrie byly následně uvolněny do extracelulárního prostředí, což vedlo k aktivaci mikroglií a uvolňování zánětlivých cytokinů. Použití specifického inhibitoru nikotinamid fosforibosyltransferázy FK866 inhibovalo glykolýzu v astrocytech, obnovilo mitochondriální homeostázu a účinně zmírnilo neuroinflamační odpovědi. FK866 také zvrátil morfinem indukované CPP u myši, což naznačuje potenciální terapeutické přístupy k léčbě závislosti na opioidech (Rao et al., 2023).

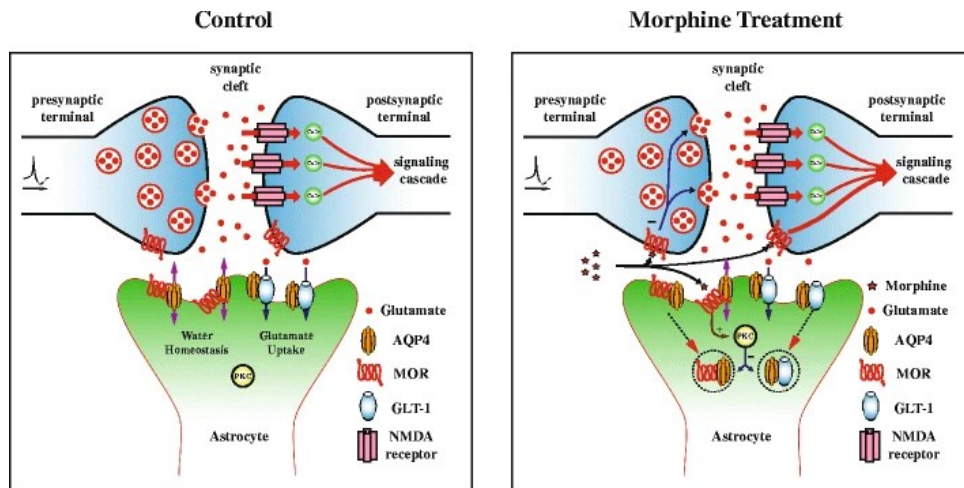
Další studie se zaměřila vliv oxidativní fosforylace u astrocytálních mitochondrií na chování a kognitivní funkce u myši. Pro účely této studie byly použity geneticky

modifikované myši, u kterých byl selektivně odstraněn gen Cox10 specificky v astrocytech. Gen Cox10 kóduje důležitou složku komplexu IV dýchacího řetězce mitochondrií. Delece tohoto genu vedla k významnému snížení exprese cytochrom c oxidázy, což narušilo oxidační fosforylaci, ale neovlivnilo glykolýzu. Behaviorální testy zahrnovaly hodnocení lokomotorické aktivity, úzkostného chování, rozpoznávání nových objektů, podmíněného strachu a také odpovědí na morfin a naloxon. Myši s deletovaným Cox10 nevykazovaly změny v CPP, což naznačuje, že jejich reakce na odměňující účinky morfinu nebyly ovlivněny. Bylo však pozorováno zvýšené averzivní chování při naloxonem vyvolaném odvykání po chronické expozici morfinu, což se projevilo skákáním a vyhýbavým chováním v testu podmíněné averze místa. Zvýšené averzivní chování při odvykání na morfin u myši bez Cox10 naznačuje, že mitochondrie v astrocytech mají významný vliv na neurobiologické procesy spojené se závislostí. Tyto poznatky mohou mít významné klinické implikace pro léčbu závislostí a dalších neuropsychiatrických poruch (Murlanova et al., 2022).

4.3.3 Aquaporiny

Aquaporin 4 (AQP4) je významný vodní kanál vysoce exprimovaný v astrocytech, kde reguluje permeabilitu plazmatické membrány vůči vodě. Bylo prokázáno, že tento kanál hraje roli v závislosti na morfinu. Chronické podávání morfinu u myši vedlo ke snížení exprese tohoto kanálu. Naopak myši, kterým byl proveden knockout tohoto kanálu, vykazovaly nižší expresi μ opioidního kanálu a také glutamátového transportéru 1 (GLT-1) než u kontrolní myši a podávání morfinu myším s vyřazeným AQP4 nemělo na jejich expresi žádný efekt (M.-L. Chen et al., 2010). U myši závislých na morfinu s deletovaným AQP4 bylo také pozorováno snížení naloxonem vyvolaného abstinčního chování v porovnání s kontrolou. To naznačuje, že nedostatek AQP4 brání rozvoji fyzické závislosti na morfinu (M.-L. Chen et al., 2012, s. 4; Wu et al., 2008). Studie Wang et al. se zaměřila právě na interakce mezi AQP4, GLT-1 a MOR v astrocytech a jejich roli v závislosti na morfinu. Autoři prokázali, že AQP4 tvoří makromolekulární komplex s GLT-1 a/nebo MOR jak v mozkové tkáni, tak v primárních astrocytech (obr. 6). Bylo zjištěno, že C-terminus AQP4 obsahuje klíčové aminokyselinové zbytky nezbytné pro interakci s GLT-1. Aktivace protein kinázy C morfiem významně ovlivňuje expresi těchto proteinů, což naznačuje roli protein kinázy C v regulaci jejich funkce. Výsledky ukázaly, že interakce mezi AQP4 a GLT-1 jsou nezbytné pro udržení homeostázy glutamátu v mozku, což je klíčové pro synaptickou aktivitu a neurotransmisi. Dále naznačují, že

nedostatek AQP4 může ovlivnit závislost na morfiu ovlivněním exprese GLT-1 a udržováním homeostázy glutamátu. Výsledky taktéž zdůrazňují důležitost astrocytů a jejich role v mechanismu závislosti na opioidech, což otevírá nové možnosti pro vývoj terapeutických intervencí zaměřených na zlepšení léčby závislosti na opioidech (H. Wang et al., 2017).



Obr. 6 Schematické znázornění rolí komplexů AQP4/GLT-1 a AQP4/MOR v kontextu závislosti na morfinu.

AQP4, kromě své funkce v propustnosti vody, interaguje s MOR, což je klíčové pro internalizaci opioidních receptorů, a s GLT-1, který reguluje hladiny glutamátu v extracelulárním prostoru. Mikrodomény těchto proteinových komplexů lze považovat za funkční jednotky v plazmatických membránách astrocytů při závislosti na morfinu. Převzato z Wang et al. 2017

Závěr

Hlavním zjištěním je, že opioidy ovlivňují nejen neurony, ale také významně aktivují gliové buňky, což vede k neurozánětlivým reakcím a změnám v neuronální plasticitě.

Mikroglie, rezidentní imunitní buňky CNS, mohou být aktivovány opioidy, což vede k produkci prozánětlivých cytokinů jako $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ a IL-6 . Tyto cytokiny hrají klíčovou roli v neurozánětlivých procesech a podporují rozvoj závislosti na opioidech. Inhibice signalizace přes TLR4 nebo modulace aktivace mikroglie může snížit neurozáněť a představuje potenciální terapeutický cíl.

Aktivace astrocytů opioidy také vede k uvolňování prozánětlivých cytokinů a chemokinů, což přispívá k neurozánětu. Nicméně bylo prokázáno, že v astrocytech dochází k mnoha dalším regulacím, které mohou regulovat závislost na opioidech jako je například zapojení GRs, ovlivnění glykolýzy, oxidativní fosforylace, a tedy ovlivnění činnosti mitochondrií, a expresi AQP4 a GLT-1.

Budoucí výzkum by se, podle mého názoru, měl zaměřit na molekulární mechanismy a signalizační kaskády aktivace gliových buněk opioidy a identifikovat klíčové proteiny a receptory zapojené do tohoto procesu. Specifické zaměření na signalizaci přes TLR4, MOR a případně dalších receptorů v astrocytech a mikroglíích může přinést nové terapeutické cíle. Vývoj léčiv zaměřených na modulaci aktivity glií, například inhibice přímo TLR4 nebo na úrovni signalizačních drah, by mohl vést k účinnému snížení neurozánětlivé reakce a tím potlačit vznik či udržování závislosti na opioidech. Dále je třeba zkoumat genetické predispozice a environmentální faktory, které přispívají k rozvoji závislosti, aby bylo možné vyvinout personalizované preventivní strategie.

Léčba závislosti na opioidech by se tedy měla zaměřit na kombinaci farmakologických a nefarmakologických přístupů, které modulují aktivitu glií a obnovují neuronální funkce. Inhibitory TLR4, modulátory glutamátové homeostázy a látky zaměřené na mitochondriální funkce mohou představovat nové možnosti léčby. Personalizovaný přístup k léčbě, založený na genetických predispozicích a individuálních rizikových faktorech, může zvýšit úspěšnost terapeutických intervencí a snížit riziko relapsu. Tyto poznatky mají potenciál přinést významné klinické implikace pro léčbu závislostí a dalších neuropsychiatrických poruch.

Použité zdroje

- Abdelhak, A., Hottenrott, T., Morenas-Rodríguez, E., Suárez-Calvet, M., Zettl, U. K., Haass, C., Meuth, S. G., Rauer, S., Otto, M., Tumani, H., & Huss, A. (2019). Glial Activation Markers in CSF and Serum From Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis: Potential of Serum GFAP as Disease Severity Marker? *Frontiers in Neurology*, *10*, 280. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00280>
- Arezoomandan, R., Khodagholi, F., & Haghparast, A. (2016). Administration of the Glial Condition Medium in the Nucleus Accumbens Prolong Maintenance and Intensify Reinstatement of Morphine-Seeking Behavior. *Neurochemical research*, *41*. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1762-3>
- Bagley, E. E., & Ingram, S. L. (2020). Endogenous opioid peptides in the descending pain modulatory circuit. *Neuropharmacology*, *173*, 108131. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108131>
- *Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., & Volterra, A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : Amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nature Neuroscience*, *4*(7), 702–710. <https://doi.org/10.1038/89490>
- Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R., Lin, F.-T., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2000). μ -Opioid receptor desensitization by β -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, *408*(6813), 720–723. <https://doi.org/10.1038/35047086>
- Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(12), 5391–5393. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5391>
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & van Noort, J. M. (2002). Broad Expression of Toll-Like Receptors in the Human Central Nervous System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *61*(11), 1013–1021. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>
- *Carlson, E. R., Guerin, S. P., Nixon, K., & Fonken, L. K. (2023). The neuroimmune system – Where aging and excess alcohol intersect. *Alcohol*, *107*, 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2022.08.009>
- *Corkrum, M., Rothwell, P. E., Thomas, M. J., Kofuji, P., & Araque, A. (2019). Opioid-Mediated Astrocyte–Neuron Signaling in the Nucleus Accumbens. *Cells*, *8*(6), 586. <https://doi.org/10.3390/cells8060586>
- Davis, B. M., Salinas-Navarro, M., Cordeiro, M. F., Moons, L., & De Groef, L. (2017). Characterizing microglia activation: A spatial statistics approach to maximize information extraction. *Scientific Reports*, *7*(1), 1576. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01747-8>
- Eidson, L. N., Inoue, K., Young, L. J., Tansey, M. G., & Murphy, A. Z. (2017). Toll-like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacology*, *42*(3), 661–670. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.131>

- *Ferrante, C. J., & Leibovich, S. J. (2012). Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 1(1), 10–16. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0307>
- *Fišerová, M. (2000). Historie, příčiny a léčení drogových závislostí. *Postgraduální medicína*, 2(3), 288–298.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- *Hamilton, G. R., & BASKETT, T. F. (2000). In the arms of morpheus: The development of morphine for postoperative pain relief. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien d'anesthésie*, 47(4), 367–374. <https://doi.org/10.1007/BF03020955>
- *Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 919–947. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0438-z>
- Hutchinson, M. R., Lewis, S. S., Coats, B. D., Rezvani, N., Zhang, Y., Wieseler, J. L., Somogyi, A. A., Yin, H., Maier, S. F., Rice, K. C., & Watkins, L. R. (2010). Possible involvement of toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 activity of opioid inactive isomers causes spinal proinflammation and related behavioral consequences. *Neuroscience*, 167(3), 880–893. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.011>
- Hutchinson, M. R., Northcutt, A. L., Hiranita, T., Wang, X., Lewis, S. S., Thomas, J., Van Steeg, K., Kopajtic, T. A., Loram, L. C., Sfregola, C., Galer, E., Miles, N. E., Bland, S. T., Amat, J., Rozeske, R. R., Maslanik, T., Chapman, T. R., Strand, K. A., Fleshner, M., ... Watkins, L. R. (2012). Opioid Activation of Toll-Like Receptor 4 Contributes to Drug Reinforcement. *The Journal of Neuroscience*, 32(33), 11187–11200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0684-12.2012>
- Hutchinson, M. R., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J. H., Buchanan, M. M., Zhao, T. X., Slivka, P. F., Coats, B. D., Rezvani, N., Wieseler, J., Hughes, T. S., Landgraf, K. E., Chan, S., Fong, S., Phipps, S., Falke, J. J., Leinwand, L. A., Maier, S. F., Yin, H., ... Watkins, L. R. (2010). Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(1), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.08.004>
- Chen, J.-X., Huang, K.-M., Liu, M., Jiang, J.-X., Liu, J.-P., Zhang, Y.-X., Yang, C., Xin, W.-J., & Zhang, X.-Q. (2017). Activation of TLR4/STAT3 signaling in VTA contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Behavioural Brain Research*, 335, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.022>
- Chen, M.-L., Bao, F., Zhang, Y.-Q., & Zhao, Z.-Q. (2010). Effects of Aquaporin 4 Deficiency on Morphine Analgesia and Chronic Tolerance: A Study at Spinal Level. *Journal of Molecular Neuroscience*, 42(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9356-7>
- Chen, M.-L., Bao, F., Zhang, Y.-Q., & Zhao, Z.-Q. (2012). Effects of aquaporin 4 deficiency on the expression of spinal PKC α , PKC γ and c-Fos in naloxone-precipitated morphine withdrawal mice. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 64(4), 365–371.

- *Christrup, L. L. (1997). Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 41(1), 116–122. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1997.tb04625.x>
- *Kadhim, S., McDonald, J., & Lambert, D. G. (2018). Opioids, gliosis and central immunomodulation. *Journal of Anesthesia*, 32(5), 756–767. <https://doi.org/10.1007/s00540-018-2534-4>
- *Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- *Koob, G. F. (2021). Drug Addiction: Hyperkatifeia/Negative Reinforcement as a Framework for Medications Development. *Pharmacological Reviews*, 73(1), 163–201. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000083>
- *Le Merrer, J., Becker, J. A. J., Befort, K., & Kieffer, B. L. (2009). Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Reviews*, 89(4), 1379–1412. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2009>
- Lee, Y. B., Nagai, A., & Kim, S. U. (2002). Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 69(1), 94–103. <https://doi.org/10.1002/jnr.10253>
- *Lejcko, J., & Gabrhelik, T. (2017). Dlouhodobá léčba opioidy a závislost. *Anesteziologie a intenzivní medicína*, 28(2), 106–113.
- Liang, D., Shi, X., Qiao, Y., Angst, M. S., Yeomans, D. C., & Clark, J. D. (2008). Chronic Morphine Administration Enhances Nociceptive Sensitivity and Local Cytokine Production after Incision. *Molecular Pain*, 4, 1744-8069-4–7. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-7>
- Maduna, T., Audouard, E., Dembélé, D., Mouzaoui, N., Reiss, D., Massotte, D., & Gaveriaux-Ruff, C. (2019). Microglia Express Mu Opioid Receptor: Insights From Transcriptomics and Fluorescent Reporter Mice. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 726. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00726>
- Mali, A. S., & Novotny, J. (2022). Opioid receptor activation suppresses the neuroinflammatory response by promoting microglial M2 polarization. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 121, 103744. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103744>
- Malik, J. A., & Agrewala, J. N. (2024). Morphine acts via TLR4 resulting in neuroinflammation and immunosuppression. *Medical Hypotheses*, 186, 111335. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2024.111335>
- Mika, J. (2008). Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacological Reports: PR*, 60(3), 297–307.
- Murlanova, K., Jouroukhin, Y., Huseynov, S., Pletnikova, O., Morales, M. J., Guan, Y., Baraban, J. M., Bergles, D. E., & Pletnikov, M. V. (2022). Deficient mitochondrial respiration in astrocytes impairs trace fear conditioning and increases naloxone-precipitated aversion in morphine-dependent mice. *Glia*, 70(7), 1289–1300. <https://doi.org/10.1002/glia.24169>
- *Murphy, D. (2002). Applied Clinical Pharmacology of Opioids. In *Postoperative Pain Management* (s. 127–136). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-2454-5.50019-9>

- Narita, M., Miyatake, M., Narita, M., Shibasaki, M., Shindo, K., Nakamura, A., Kuzumaki, N., Nagumo, Y., & Suzuki, T. (2006). Direct Evidence of Astrocytic Modulation in the Development of Rewarding Effects Induced by Drugs of Abuse. *Neuropsychopharmacology*, *31*(11), 2476–2488. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301007>
- *Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia Development and Function. *Annual Review of Immunology*, *32*(1), 367–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>
- *Nesmerak, K. (2016). Historie analgetik [History of analgesics]. *Bolest*, *19*, 103–112.
- Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Noda, Y., & Nabeshima, T. (2007). Tumor Necrosis Factor- α and Its Inducer Inhibit Morphine-Induced Rewarding Effects and Sensitization. *Biological Psychiatry*, *62*(6), 658–668. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.10.009>
- Rao, J., Sun, W., Wang, X., Li, J., Zhang, Z., & Zhou, F. (2023). A novel role for astrocytic fragmented mitochondria in regulating morphine addiction. *Brain, Behavior, and Immunity*, *113*, 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.07.030>
- Reeves, K. C., Shah, N., Muñoz, B., & Atwood, B. K. (2022). Opioid Receptor-Mediated Regulation of Neurotransmission in the Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*, 919773. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.919773>
- Reyes-Gibby, C. C., El Osta, B., Spitz, M. R., Parsons, H., Kurzrock, R., Wu, X., Shete, S., & Bruera, E. (2008). The Influence of Tumor Necrosis Factor- α -308 G/A and IL-6 -174 G/C on Pain and Analgesia Response in Lung Cancer Patients Receiving Supportive Care. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *17*(11), 3262–3267. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0125>
- Rivera, P. D., Hanamsagar, R., Kan, M. J., Tran, P. K., Stewart, D., Jo, Y. C., Gunn, M., & Bilbo, S. D. (2019). Removal of microglial-specific MyD88 signaling alters dentate gyrus doublecortin and enhances opioid addiction-like behaviors. *Brain, Behavior, and Immunity*, *76*, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.010>
- *Rizzo, F. R., Musella, A., De Vito, F., Fresegna, D., Bullitta, S., Vanni, V., Guadalupi, L., Stampanoni Bassi, M., Buttari, F., Mandolesi, G., Centonze, D., & Gentile, A. (2018). Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 β Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. *Neural Plasticity*, *2018*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/8430123>
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., & Kimoto, M. (1999). MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, *189*(11), 1777–1782. <https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1777>
- Skupio, U., Tertilt, M., Bilecki, W., Barut, J., Korostynski, M., Golda, S., Kudla, L., Wiktorowska, L., Sowa, J. E., Siwiec, M., Bobula, B., Pels, K., Tokarski, K., Hess, G., Ruszczycycki, B., Wilczynski, G., & Przewlocki, R. (2020). Astrocytes determine conditioned response to morphine via glucocorticoid receptor-dependent regulation of lactate release. *Neuropsychopharmacology*, *45*(2), 404–415. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0450-4>
- *Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>

Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., & Malenka, R. C. (2005). Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor- α . *The Journal of Neuroscience*, *25*(12), 3219–3228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005>

Taylor, A. M. W., Castonguay, A., Ghogha, A., Vayssiere, P., Pradhan, A. A. A., Xue, L., Mehrabani, S., Wu, J., Levitt, P., Olmstead, M. C., De Koninck, Y., Evans, C. J., & Cahill, C. M. (2016). Neuroimmune Regulation of GABAergic Neurons Within the Ventral Tegmental Area During Withdrawal from Chronic Morphine. *Neuropsychopharmacology*, *41*(4), 949–959. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.221>

*Toloff, K., & Woodcock, E. (2022). Is the Neuroimmune System a Therapeutic Target for Opioid Use Disorder? A Systematic Review. *Medical Research Archives*, *10*(8). <https://doi.org/10.18103/mra.v10i8.2955>

Trang, T., Beggs, S., Wan, X., & Salter, M. W. (2009). P2X4-Receptor-Mediated Synthesis and Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Microglia Is Dependent on Calcium and p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *The Journal of Neuroscience*, *29*(11), 3518–3528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5714-08.2009>

Vargas-Perez, H., Ting-A-Kee, R., Walton, C. H., Hansen, D. M., Razavi, R., Clarke, L., Bufalino, M. R., Allison, D. W., Steffensen, S. C., & Van Der Kooy, D. (2009). Ventral Tegmental Area BDNF Induces an Opiate-Dependent-Like Reward State in Naïve Rats. *Science*, *324*(5935), 1732–1734. <https://doi.org/10.1126/science.1168501>

*Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, *98*(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

Viviani, B., Bartsaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1 β Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases. *The Journal of Neuroscience*, *23*(25), 8692–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>

Wang, H., Wang, S., Zhang, K., Wang, H., Lan, L., Ma, X., Liu, X., Zhang, S., Zheng, J., Wei, X., & Yan, H. (2017). Aquaporin 4 Forms a Macromolecular Complex with Glutamate Transporter 1 and Mu Opioid Receptor in Astrocytes and Participates in Morphine Dependence. *Journal of Molecular Neuroscience*, *62*(1), 17–27. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0905-1>

Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., De Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A. A., Hutchinson, M. R., Watkins, L. R., & Yin, H. (2012). Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6325–6330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200130109>

Wei, J., Lambert, T. Y., Valada, A., Patel, N., Walker, K., Lenders, J., Schmidt, C. J., Iskhakova, M., Alazizi, A., Mair-Meijers, H., Mash, D. C., Luca, F., Pique-Regi, R., Bannon, M. J., & Akbarian, S. (2023). Single nucleus transcriptomics of ventral midbrain identifies glial activation associated with chronic opioid use disorder. *Nature Communications*, *14*(1), 5610. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41455-8>

Wu, N., Lu, X.-Q., Yan, H.-T., Su, R.-B., Wang, J.-F., Liu, Y., Hu, G., & Li, J. (2008). Aquaporin 4 deficiency modulates morphine pharmacological actions. *Neuroscience Letters*, *448*(2), 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.065>

Yang, J., Ruchti, E., Petit, J.-M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2014). Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(33), 12228–12233. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322912111>

*Zhang, H., Largent-Milnes, T. M., & Vanderah, T. W. (2020). Glial neuroimmune signaling in opioid reward. *Brain Research Bulletin*, *155*, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.11.012>

Zhang, X.-Q., Cui, Y., Cui, Y., Chen, Y., Na, X.-D., Chen, F.-Y., Wei, X.-H., Li, Y.-Y., Liu, X.-G., & Xin, W.-J. (2012). Activation of p38 signaling in the microglia in the nucleus accumbens contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.09.017>

*Zhuang, Y., Wang, Y., He, B., He, X., Zhou, X. E., Guo, S., Rao, Q., Yang, J., Liu, J., Zhou, Q., Wang, X., Liu, M., Liu, W., Jiang, X., Yang, D., Jiang, H., Shen, J., Melcher, K., Chen, H., ... Xu, H. E. (2022). Molecular recognition of morphine and fentanyl by the human μ -opioid receptor. *Cell*, *185*(23), 4361–4375.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.041>