

2.6.4 Legame tra i recettori oppioidi mu e delta in soggetti sani e alcolisti: studio di PET

Elise M. Weerts¹, Gary S. Wand^{1,2}, Hiroto Kuwabara³, Cynthia A. Munro¹, Robert F. Dannals³, John Hilton³, J. James Frost^{3,4}, Mary E. McCaul^{1,2}

¹ Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

² Department of Medicine, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

³ Department of Radiology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

⁴ Department of Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

Abstract

Il sistema oppioide endogeno svolge un ruolo di primo piano nella dipendenza da alcol. Lo studio si propone di analizzare mediante metodologia PET (tomografia a emissione di positroni) la disponibilità regionale del recettore Mu-oppioide (MOR) e Delta-oppioide (DOR) in soggetti alcolodipendenti di entrambi i sessi con recente astinenza, e in soggetti sani di controllo di entrambi i sessi e di età comparabile.

Metodi: I soggetti alcolodipendenti hanno completato un protocollo residenziale comprendente l'interruzione dell'assunzione di alcol sotto controllo medico e l'acquisizione di immagini PET al quinto giorno di astinenza. I soggetti di controllo sono stati sottoposti a PET a seguito di una notte di ricovero ospedaliero. Le scansioni, realizzate utilizzando un ligando selettivo MOR, [¹¹C]carfentanil (CFN), sono state effettuate su 25 soggetti alcolodipendenti e 30 soggetti di controllo sani. La maggior parte degli stessi soggetti (20 soggetti alcolodipendenti e 18 controlli) sono stati sottoposti anche a scansioni PET con il ligando selettivo DOR [¹¹C]metilnatriindolo (MeNTL).

I volumi di interesse e le mappe statistiche parametriche indicano che i soggetti alcolodipendenti presentano potenziali di legame (BPND) per [¹¹C] carfentanil significativamente superiori rispetto ai soggetti di controllo, in diverse regioni cerebrali, tra cui lo striato ventrale, una volta effettuata la correzione per età, genere e status di fumatore. Una correlazione inversa è stata osservata tra [¹¹C]CFN BPND e il craving per alcol in diverse aree cerebrali nei soggetti alcolodipendenti. I due gruppi di soggetti non differivano in merito al potenziale di legame per [¹¹C]MeNTL, ma il livello di [¹¹C]MeNTL BPND nel caudato è risultato correlato positivamente con il consumo recente di alcol nei soggetti alcolisti.

Le nostre osservazioni in merito al livello più elevato di [¹¹C]CFN BPND nei soggetti alcolodipendenti possono rappresentare il risultato di una sovra-regolazione dei recettori MOR e/o di una riduzione dei peptidi oppioidi endogeni, conseguente a un consumo alcolico di lunga durata, alla dipendenza e/o all'astinenza. In alternativa, il livello più elevato di [¹¹C]CFN BPND nei soggetti alcolodipendenti può costituire una differenza eziologica che predispone questi soggetti alla dipendenza da alcol, o potrebbe essersi sviluppata come conseguenza di una maggiore esposizione a fattori di rischio come infanzia difficile, stress e altri fattori ambientali noti per avere un effetto incrementale su MOR. Sebbene la direzione di queste differenze di gruppo nel livello di [¹¹C]MeNTL BPND fosse simile in numerose aree cerebrali, tali differenze non assumevano significatività statistica, forse a causa delle dimensioni limitate del campione analizzato. Soltanto ulteriori studi potranno fare maggiore chiarezza su tali correlazioni. Il riscontro di un maggior livello di [¹¹C]CFN BPND nei soggetti alcolodipendenti è coerente con l'ipotesi di un ruolo fondamentale del recettore MOR nella dipendenza da alcol.

1. Introduzione

E' opinione comune che il sistema limbico mesocorticale svolga un ruolo di mediatore nei confronti dell'effetto gratificante prodotto dall'uso di numerose sostanze, tra cui l'alcol (Herz 1998). All'interno di quest'area fondamentale del cervello, gli effetti di rinforzo prodotti dall'alcol vengono in parte modulati da un aumento della neurotrasmissione dei peptidi oppioidi e della dopamina (per un esame approfondito della questione, si rimanda a Oswald 2004). I peptidi oppioidi endogeni (β -endorfine, encefaline e dinorfine) si legano ai diversi sottotipi di recettori oppioidi (OR). Più specificamente, le β -endorfine si legano con pari affinità ai sottotipi del recettore oppioide Mu (MOR) e Delta (DOR). Anche le encefaline si legano ai sottotipi MOR e DOR, ma presentano un'affinità venti volte maggiore per il sottotipo DOR. I peptidi oppioidi delle β -endorfine e delle encefaline aumentano il livello di neurotrasmissione della dopamina all'interno del nucleo accumbens, tramite l'interazione con i MOR e i DOR (Koob 1998).

Esistono numerosi dati che confermano l'associazione tra il sistema oppioide endogeno, il consumo di alcol e il meccanismo di gratificazione nell'uomo e negli animali di laboratorio (Gianoulakis 2004). Negli animali di laboratorio, gli antagonisti dei recettori oppioidi diminuiscono il consumo di alcol (Franck 1998, Froehlich 1995; Froehlich 1991; June 1999; Krishnan-Sarin 1995a, 1995b, 1998) e bloccano l'attivazione del sistema dopaminergico indotta dall'alcol (Benjamin 1993; Job 2007). I topi geneticamente modificati per il MOR mostrano una minore tendenza ad autosomministrarsi alcol (Becker 2002; Halle 2001; Roberts 2000). In due studi di laboratorio sull'uomo collegati tra loro (McCaul 2001, 2002), il naltrexone ha attenuato in maniera significativa l'aumento alcol-indotto del livello di gradimento, del ritmo cardiaco, della pressione diastolica e delle risposte neuroendocrine. I medesimi risultati sono stati ottenuti da Peterson e colleghi (2006). Nel loro insieme, gli studi citati sottolineano l'importanza del sistema oppioide nel meccanismo di gratificazione legato al consumo di alcol, confermando così la validità dell'impiego degli OR-antagonisti per il trattamento dell'alcolismo. In realtà, le meta-analisi degli studi clinici randomizzati hanno dimostrato che, tra tali antagonisti, il naltrexone produce in linea generale effetti di entità modesta o moderata nel ridurre il consumo di alcol e le relative ricadute nei soggetti alcolodipendenti (Anton 2003; Srisurapanont 2005).

Alla luce delle numerose evidenze che confermano il ruolo funzionale del sistema delle endorfine e delle encefaline nell'alcolismo, è molto probabile che nei soggetti alcol-dipendenti il sistema oppioide sia alterato. La PET (tomografia a emissione di positroni) rappresenta l'unica metodologia diagnostica che consente di valutare le caratteristiche dei recettori cerebrali in soggetti umani viventi. I tre studi PET sin qui condotti hanno però fornito risultati contrastanti sui recettori oppioidi, in soggetti alcolisti. Nel primo di questi studi (Bencherif 2004) i recettori MOR risultavano meno numerosi nella corteccia prefrontale dorso-laterale destra, nella corteccia frontale anteriore destra e nella corteccia parietale destra, in 8 soggetti alcolodipendenti da poco disintossicati, confrontati a 8 soggetti sani. Il secondo studio (Heinz 2005) registrava, al contrario, un aumento dei MOR a livello dello striato ventrale in 25 soggetti alcolodipendenti in astinenza (1/3 settimane), comparati con 10 controlli sani. Un terzo studio PET (Williams 2009), ha invece esaminato i recettori oppioidi (OR) in 11 soggetti alcolodipendenti e in 13 soggetti sani mediante [^{11}C]diprenorfina, che si lega in maniera non selettiva a tutti e tre i sottotipi di recettori oppioidi. Le scansioni tomografiche sono state effettuate nel corso di un trattamento di disintossicazione ambulatoriale con clordiazepossido, dopo 2 o 4 settimane di astinenza autodichiarata. In questo studio, i volumi di distribuzione globale e regionale della [^{11}C]diprenorfina risultavano

più elevati nei pazienti alcolodipendenti rispetto ai controlli, sebbene non si trattasse di un effetto statisticamente significativo.

Lo studio qui presentato ha consentito di valutare mediante PET le caratteristiche di legame dei MOR e dei DOR, impiegando un ligando dei recettori oppioidi Mu [^{11}C]carfentanil (CFN) e un ligando dei recettori oppioidi Delta [^{11}C]metilnatriindolo, in soggetti alcolodipendenti con recente astinenza e soggetti sani di controllo, di età confrontabile. I soggetti alcolodipendenti sono stati ricoverati in un'unità di ricerca clinica (CRU), dove hanno portato a termine un programma di astensione dall'alcol sotto monitoraggio medico, per essere poi sottoposti a PET una volta superati i sintomi astinenziali. I soggetti di controllo sono stati sottoposti a PET dopo una notte di ricovero in CRU. Sono stati effettuati due tipi di analisi, quella dei volumi di interesse (VOI) e quella della mappatura statistica parametrica (SPM).

2. Materiali e metodi

Soggetti con grave dipendenza da alcol e soggetti di controllo sani, di età compresa tra i 21 e i 60 anni, reclutati tramite inserzione e previo consenso informato su modulo autorizzato dall'Institutional Review Board. I soggetti sono stati intervistati da un assistente ricercatore di livello master, mediante una batteria di strumenti psico-diagnostici standardizzati. Per essere inclusi nello studio, i soggetti alcolodipendenti dovevano rispondere ai criteri del DSM-IV per la dipendenza da alcol, in base alla valutazione SSAGA (Semi-Structured Assessment of the Genetics of Alcoholism, Bucholz 1994) e essere classificati come consumatori attivi di alcol nei livelli di rischio definiti dal NNIAAA, al completamento di un questionario TLFB (Time Limit Follow Back) riferito ai 90 giorni precedenti (Sobell 1992). I soggetti sani utilizzati per il controllo non presentavano livelli di consumo di alcol eccedenti quelli previsti dalle linee guida NIAAA (<8 drink/settimana per le donne e <15 drink/settimana per gli uomini) e non avevano mai soddisfatto i criteri del DSM-IV per l'abuso o la dipendenza da alcol. I soggetti di controllo erano di età comparabile con quella dei soggetti alcolodipendenti. I soggetti di entrambi i gruppi venivano esclusi dallo studio qualora in possesso di anche uno solo dei seguenti requisiti: (i) presenza (attuale o cronica) di un altro disturbo di Asse I, in base ai criteri diagnostici DSM-IV, come ad esempio uso o dipendenza da altre sostanze (ad esclusione della nicotina); (ii) positività all'esame tossicologico delle urine, al momento dello screening o del ricovero in ospedale; (iii) presenza di altri problemi di salute, o (iv) se la madre aveva fatto consumo di alcol durante la gravidanza. I soggetti alcolodipendenti venivano esclusi dallo studio qualora riferissero di convulsioni legate al consumo di alcol o di avere avuto bisogno di assumere farmaci nel corso di precedenti periodi di disintossicazione. In seguito all'applicazione dei criteri di inclusione e di esclusione, il protocollo è stato portato a termine in totale da 25 soggetti alcolodipendenti e da 30 soggetti sani di controllo. Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche demografiche di entrambi i gruppi.

Per valutare il livello di consumo alcolico e i problemi associati è stata somministrata la scala ADS (Alcohol Dependence Scale, Skinner 1982). Lo status di dipendenza dalla nicotina dei soggetti fumatori è stato valutato mediante test FNDT (Fagerstrom Nicotine Dependence Test). La Tabella 1 riporta i punteggi relativi a entrambe le valutazioni. Il numero di familiari di primo e secondo grado con sintomi di alcolismo o uso/dipendenza da altre sostanze è stato valutato mediante somministrazione del modulo Family History Assessment (Rice 1995). L'anamnesi familiare veniva classificata come positiva (FHP) se erano presenti almeno tre criteri diagnostici di alcolismo in uno dei genitori (padre o madre) oppure in 3 o

Soggetti analizzati

più dei familiari di primo o secondo grado. Se la madre aveva fatto consumo di alcol durante la gravidanza, veniva interrotta la partecipazione allo studio. L'anamnesi familiare veniva classificata negativa (FHN) se il soggetto riferiva: (i) assenza di congiunti di primo grado che soddisfacessero i criteri diagnostici per l'alcolismo e (ii) nessuno o un solo congiunto di secondo grado risultato positivo ai criteri diagnostici per l'alcolismo. L'anamnesi familiare veniva classificata come indeterminata (FHU) qualora mancassero i criteri per la positività o per la negatività ma fosse presente più di un congiunto con problemi di droga ma senza alcolismo, o qualora non fosse stato possibile ottenere informazioni sufficienti per valutare lo status familiare di alcolismo.

Procedure successive al ricovero in CRU

I soggetti di controllo sono stati valutati mediante PET dopo avere trascorso una notte in ospedale o dopo avere seguito un protocollo di ricovero. I soggetti alcolodipendenti hanno portato a termine lo studio in base a un protocollo che prevedeva il ricovero ospedaliero e l'astensione dal consumo di alcol sotto controllo medico, prima di eseguire le tomografie al quinto giorno di astinenza. I soggetti alcolisti rimanevano in CRU per il successivo trattamento con naltrexone (50 mg/di) e relativa indagine PET, per verificare il blocco dei recettori mu e delta da parte del naltrexone. La metodologia e i risultati ottenuti per quanto concerne la determinazione del potenziale di legame (BPND) del [¹¹C]CFN durante il trattamento con naltrexone su 21 dei 25 soggetti alcolodipendenti sono stati descritti in un altro articolo (Weerts 2008). L'analisi dei valori basali nei soggetti di controllo e il confronto con i corrispondenti dati dei soggetti alcolodipendenti è invece riportata esclusivamente nel presente articolo.

Dopo il ricovero in CRU, e ad intervalli regolari durante tutta la permanenza in ospedale, i soggetti di entrambi i gruppi hanno completato una seconda batteria di test per la valutazione psicologica, comprendenti la scala VAS (Visual Analog Scale) del craving per l'alcol, la Penn Craving Scale (Flannery 1999), l'OCDS (Obsessive Compulsive Drinking Scale)(Anton 1996), il BAI (Beck Anxiety Inventory)(Beck 1988) e il BSI (Brief Symptom Inventory)(Derogatis e Melisaratos, 1983).

Per il monitoraggio della gravità dei sintomi astinenziali, lo staff infermieristico della CRU ha compilato con i soggetti alcolodipendenti il CIWA-Ar (Clinical Institute Withdrawal Assessment-Alcohol Revised)(Sullivan 1989) tre volte al giorno per i primi cinque giorni. Il punteggio assegnato a ciascun item teneva conto del periodo trascorso dall'ultima misurazione. Nessuno dei soggetti ha necessitato di farmaci contro i sintomi dell'astinenza, in base al punteggio del CIWA, ai segni vitali, e all'esame obiettivo.

Il fumo era proibito durante la permanenza in ospedale e per tutta la durata delle procedure previste dallo studio. Ai fumatori risultati dipendenti dalla nicotina in base ad un valore FNNT pari o superiore a 3 veniva fornito un cerotto transdermico (21 mg nicotina) al momento del ricovero, al mattino di ciascun giorno di permanenza in CRU e 3 ore prima dell'esecuzione della PET. La scelta di questo tipo di gestione standardizzata dei soggetti fumatori era finalizzata a ridurre al minimo l'impatto dell'astinenza da nicotina nel giorno della PET. A tutti i soggetti è stata servita una prima colazione con contenuto calorico calibrato 3 ore prima della prima scansione.

Tabella 1 - Dati demografici dei soggetti alcolodipendenti (AD) e dei soggetti di controllo sani (HC).

	AD (N=25)	HC (N=30)
Età Media	43,8 (7,4)	43,5 (9,4)
Genere (n)		
Maschi	18	20
Femmine	7	10
Razza (n)		
Caucasici	15	16
Afroamericani	10	14
Anamnesi familiare di alcolismo (n)		
FHP	14	9
FHN	10	16
FHU	1	5
Status di fumatore (n)		
Non fumatori	5	21
Fumatori	20	9
Dipendenza da nicotina (DSM-IV)	13	5
Assenza di dipendenza da nicotina (DSM-IV)	7	4
Livello di tabagismo nei fumatori: valore medio (DS)		
Numero massimo di sigarette/giorno	17,7 (10,3)*	15,1 (5,5)
Anni di tabagismo	18,3 (11,3)	19,3 (9,0)
Indice di Fagerstrom	4,4 (2,5)	4,4 (2,3)
Età prima sigaretta	15,4 (5,6)	16,6 (9,2)
Consumo di alcol: valore medio (DS)		
Età alcol dipendenza	28,7 (7,1)	N/A
Anni di alcol dipendenza	15,3 (9,2)	N/A
ADS score	19,6 (6,7)*	0,3 (0,7)
Numero di drink consumati al giorno	12,4 (6,5)*	1,6 (1,6)
Numero di drink per giorno/settimana	5,5 (1,4)*	0,7 (1,3)
Picco Penn Alcohol Craving - VAS giorni1-5	20,1 (6,9)	N/A
Picco Craving da alcol	23,4 (7,9)	N/A
Picco CIWA giorni 1-5	5,0 (2,6)	N/A
Picco OCDS giorni 1-5	28,1 (10,1)	N/A
Penn Alcohol Craving Pre-PET	7,8 (7,3)*	0,2 (0,6)
Craving per alcol secondo VAS Pre-PET	9,2 (10,6)*	0,1 (0,4)
CIWA Pre-PET0	6 (1,5)	0,2 (0,7)
OCDS Pre-PET	15,6 (13,1)*	1,1 (2,0)
Valutazione psicologica al ricovero: valore medio (DS)		
BDI-II	12,8 (9,6)*	1,0 (1,4)
BAI	9,6 (8,1)*	1,1 (2,1)
BSI	0,5 (0,6)*	0,1 (0,1)

I dati indicati rappresentano i valori medi per il gruppo (DS) o il numero (n) di soggetti.

* Confronto tra gruppi AD e HC - t-test significativo ($p \leq 0.0001$).

AD, soggetti alcolodipendenti; HC, soggetti di controllo sani; FHP anamnesi familiare positiva; FHN, anamnesi familiare negativa; FHU, anamnesi familiare indeterminata; DSM, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; ADS, Alcohol Dependence Scale; VAS, Visual Analog Scale; CIWA, Clinical Institute Withdrawal Assessment; OCDS, Obsessive Compulsive Drinking Scale; BDI-II, Beck Depression Inventory; BAI, Beck Anxiety Inventory; BSI, Brief Symptom Inventory.

Prima dell'esame PET e con cadenza randomizzata durante il ricovero, sono stati effettuati esami tossicologici delle urine e test etilometrici su tutti i soggetti, per verificarne l'astinenza da alcol e droghe.

Metodica PET

I soggetti sono stati sottoposti nella stessa giornata a 2 esami PET ad orari prestabiliti: le scansioni per il [^{11}C]MeNTL, un antagonista specifico dei DOR (Lever 1992; Madar 1996) sono state eseguite alle 08.30, quelle per il [^{11}C]CFN, un agonista specifico dei MOR (Frost 1985; Titeler 1989), alle 10.45. In totale, 25 soggetti alcoldipendenti e 24 soggetti sani hanno effettuato simultaneamente gli esami per il [^{11}C]CFN, tra luglio 2001 e luglio 2008. Di essi, 20 soggetti alcolisti e 18 soggetti sani hanno effettuato anche l'esame per il [^{11}C]MeNTL. Più precisamente, alcuni esami per il [^{11}C]MeNTL sono falliti a causa di problemi relativi alle linee arteriose e al prelievo ematico (N = 4 soggetti sani e N = 3 soggetti alcoldipendenti) e in seguito alla mancata sintesi del radioligando (N = 2 soggetti alcolisti e N = 2 soggetti sani). Altri sei controlli sani, fumatori ma senza problemi di consumo di alcol, sono stati reclutati allo scopo specifico di verificare i possibili effetti del fumo sul potenziale di legame (BPND) del [^{11}C]CFN e sono stati sottoposti a PET tra aprile 2009 e febbraio 2010. Anche questi soggetti non hanno portato a termine l'esame per il [^{11}C]MeNTL. Il numero ridotto di soggetti sottoposti al [^{11}C]MeNTL non ha modificato la distribuzione demografica presentata in Tabella 1. I soggetti alcoldipendenti avevano circa 44 anni, erano prevalentemente di sesso maschile (n=15) e di razza caucasica (n=12), e il 55% di essi (n=11) aveva una anamnesi familiare positiva per l'alcolismo. I controlli (età media 44 anni) erano prevalentemente di sesso maschile (n=11) e di razza caucasica (n=10), e il 28% (n=5) con un'anamnesi familiare di alcolismo.

Le immagini PET erano state acquisite in modalità 3D su tomografo PET Advance della GE (GE Medical System, Milwaukee, WI). A ciascun soggetto è stata fornita una maschera facciale termoplastica individuale per garantire la corretta posizione e l'immobilità durante l'esame. Sono state effettuate scansioni trasmissive di 10 minuti mediante barre rotanti di GE-68, prima di iniettare il radiotracciante. Dopo somministrazione di un bolo di radiotracciante per via endovenosa, è stata acquisita una serie di 25 immagini con periodo temporale variabile (6x30, 5x60, 5x120, 9x480 secondi) nel corso di 90 minuti per ciascun esame. La Tabella 2 indica la dose iniettata, l'attività specifica, e la massa per i soggetti alcoldipendenti e per i controlli. Durante le scansioni per il [^{11}C]MeNTL, sono stati prelevati piccoli quantitativi di sangue, inizialmente ogni 5 secondi e successivamente a intervalli crescenti (es. 1, 2, 5, 10 e 15 minuti), per la conta della radioattività. Alcuni campioni ematici sono stati poi sottoposti a esame cromatografico HPLC (High Performance Liquid Chromatography) per la ricerca dei metaboliti (Hilton 2000). Le immagini PET sono state ricostruite mediante algoritmo di retroproiezione filtrata, utilizzando il software fornito dal produttore per la correzione dell'attenuazione, della radiazione diffusa e dei tempi morti (Kinaham 1989). La radioattività è stata corretta in base al decadimento fisico rispetto al tempo di iniezione. Ogni frame era composto da una matrice 128x128x35 con dimensioni del voxel 2x2x4,25mm, in risoluzione spaziale FWHM 5,5 e 6,1mm in senso radiale e tangenziale, rispettivamente, a 10 cm di raggio dal centro del campo visivo (Lewellen 1996). Circa una settimana prima del ricovero in CRU, i soggetti sono stati sottoposti a risonanza magnetica per determinare la localizzazione anatomica e l'allineamento dei piani delle immagini PET individuali (Meltzer 1990).

Tabella 2 - Valori medi e deviazioni standard (SD) per sostanza, Attività Specifica (Injected Specific Activity), Peso corporeo (BW), e Massa di (a) [¹¹C]CFN e (b) [¹¹C]MeNTL in gruppi di soggetti alcolodipendenti (AD) e soggetti sani di controllo (HC).

(a) [¹¹ C]CFN	AD (N = 25)		HC (N = 30)	
	Media	DS	Media	DS
lg CFN	0,82	0,70	0,63	0,47
Inj. Activity (mCi)	19,30	2,23	19,99	3,09
mCi/mole	18.444,1	14.248,0	24.955,5	24.467,2
BW (kg)	74,7	13,4	79,3	13,8
Dose (lg/kg)	0,011	0,009	0,008	0,006
(b) [¹¹ C]MeNTL	AD (N = 20)		HC (N = 18)	
	Media	DS	Media	DS
lg MeNTL	2,48	1,29	2,40	1,76
Inj. Activity (mCi)	18,87	3,07	17,52	2,19
mCi/mole	4.719,6	3.054,8	5.050,4	3.981,3
BW (kg)	73,9	13,4	76,3	13,1
Dose (lg/kg)	0,033	0,030	0,035	0,019

La comparazione al t-Test tra gruppi AD e HC non ha rilevato differenze significative (per tutti $p > 0,15$).

In questo studio i volumi di interesse (VOI) riguardavano lo striato ventrale, la corteccia cingolata, il nucleo caudato, il putamen, l'insula, il globo pallido, il talamo e l'amigdala. I VOI erano stati definiti manualmente con sequenze tridimensionali MRI spoiled gradient-recalled echo per il putamen, il nucleo caudato e il talamo, mediante strumento di definizione sviluppato in loco. Lo striato ventrale è stato definito con le modalità già descritte (Baumann 1999; Martinez 2003; Oswald 2005). Per i restanti VOI, è stato effettuato un trasferimento spaziale di un template VOI standard (Hammers 2003; Mazziotta 1995; disponibile su <http://www.loni.ucla.edu>), sulle immagini MRI dei singoli soggetti, mediante parametri di normalizzazione spaziale da MRI-to-MRI, ottenuti con il modulo di normalizzazione spaziale (SPM) (Ashburner 2004), modificato per adattarlo ai profili delle strutture ricavati dalla MRI. I VOI sono stati poi trasferiti sullo spazio PET in base ai parametri di coregistrazione MRI-PET ottenuti con il modulo di coregistrazione SPM2 e applicati ai singoli frame PET per ottenere le curve tempo-radioattività dei VOI.

La variabile di interesse che costituiva l'outcome primario per i recettori MOR e DOR era il potenziale di legame BPND (Innis 2007) di [¹¹C]CFN e di [¹¹C]MeNTL, rispettivamente. Per [¹¹C]CFN è stato utilizzato il metodo Reference Tissue Graphical Analysis (RTGA, Logan 1996), con il lobo occipitale come regione di riferimento e ponendo a 0,104/minuto la costante del tasso di clearance cervello-sangue della regione di riferimento (k_2R) (Endres 2003; Forst 1990). Le stime dei valori BPND mediante RTGA erano fortemente correlati con quelli ottenuti dal modello cinetico basato su funzioni di input arterioso (Endres 2003). L'analisi per il [¹¹C]MeNTL differiva da quella utilizzata per [¹¹C]CFN. In primo luogo, abbiamo analizzato i dati servendoci di un modello bi-compartimentale tissutale (TTCM). È stato così stabilito che, malgrado il buon adattamento dei dati ottenuti con il TTCM, erano presenti valori anomali occasionali (<10% delle regioni). A questo punto abbiamo esaminato i

Analisi dei Volumi di Interesse (VOI)

Modellazione farmacocinetica



dati mediante PRGA (Plasma Reference Graphical Analysis, Logan 1990) per ottenere i volumi distributivi (VT); il BPND^{[11C]MeNTL} è stato ottenuto come coefficiente di riferimento VT meno 1. I valori regionali del BPND^{[11C]MeNTL} della PRGA si correlano bene con quelli del TCM (TCM = 0,94 PRGA + 0,15; R² = 0,601) senza produrre anomalie apparenti. Per questo motivo si è deciso di utilizzare la metodica PRGA per il BPND^{[11C]MeNTL}. Le curve di Logan per il ^{[11C]CFN} si avvicinavano alla linearità, a partire dai 10 minuti successivi all'iniezione, come descritto in precedenza (Zubieta 2001). Le curve di Logan plasmatiche per il ^{[11C]MeNTL} si avvicinavano alla linearità in tutte le regioni esaminate, nel giro di 20 minuti, in tutti i soggetti t* è stato posto a 20 minuti per entrambi i ligandi.

Analisi Statistica dei Volumi di Interesse

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando la versione SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Le possibili differenze nei legami regionali di ^{[11C]MeNTL} e di ^{[11C]CFN} tra i due gruppi di soggetti (alcol dipendenti e controlli) sono state individuate mediante analisi indipendenti di covarianza (ANCOVA) per ciascuno degli 8 volumi cerebrali. Nel modello sono state incluse come covariate l'età e il genere, in quanto è risultato che entrambi influenzavano BPND^{[11C]MeNTL} (Zubieta 1999). Lo status di fumatore è stato aggiunto come covariata solo in un'analisi secondaria, in base ai risultati descritti nel paragrafo successivo. Analisi indipendenti di covarianza sono state eseguite per ciascun volume cerebrale su un modello comprendente i VOI come variabile indipendente, a causa della varianza non omogenea tra i VOI. Per la correzione dei confronti multipli è stata adottata la tecnica adattativa step-down di Bonferroni (Hochberg e Benjamin, 1990) che si basa sul metodo Bonferroni-Holm (Holm, 1979). Vengono riportati i valori p non corretti e quelli corretti (indicati con Q). L'associazione tra il legame regionale di ^{[11C]CFN} e quello di ^{[11C]MeNTL} e l'anamnesi familiare di alcolismo, i problemi psicologici (punteggi BDI, BAI, BSI), il craving (punteggi OCDS, VAS e Penn Craving Scale), il consumo recente di alcol (numero di drink per ciascun episodio, numero di episodi per settimana, numero totale di drink) e la gravità dei sintomi astinenziali (punteggio CIWA) è stata analizzata caso per caso come covarianze indipendenti. Per la correzione dei confronti multipli per tutti e 8 i VOI è stato applicato il metodo Bonferroni (Hochberg e Benjamin, 1990) e sono stati riportati i valori di p corretti (indicati come Q).

Analisi della Mappatura Statistica Parametrica

Le SPM sono state effettuate al fine di confermare i risultati relativi ai VOI, e determinare se gli incrementi regionali di (BPND) ^{[11C]CFN} nei soggetti alcol dipendenti erano più generalizzati ed estesi ad altre regioni non prese in esame. I volumi funzionali (mappe voxel per voxel) del (BPND) sono stati normalizzati in riferimento ad un cervello standard mediante normalizzazione spaziale MRI-to-MRI e parametri di coregistrazione PET-to-MRI utilizzando moduli SPM5, applicando poi un filtro di smoothing gaussiano di 12mm FWHM. Per ciascun voxel sono stati assunti modelli statistici parametrici, utilizzando il modello lineare generale. Ulteriori analisi sono state effettuate per il controllo dello status di fumatore come variabile di disturbo. Per ridurre l'eventualità di falsi positivi, il volume di ricerca è stato limitato ai voxel della sostanza grigia, per eliminare i cluster di sostanza bianca. Test statistici voxel-wise sono stati effettuati per valutare le differenze di potenziale di legame BPND tra i soggetti alcol dipendenti e i controlli. Per le differenze di gruppo (t > 4,6) è stato adottato un livello di significatività di p < 0,05, corretto per errore family-wise.

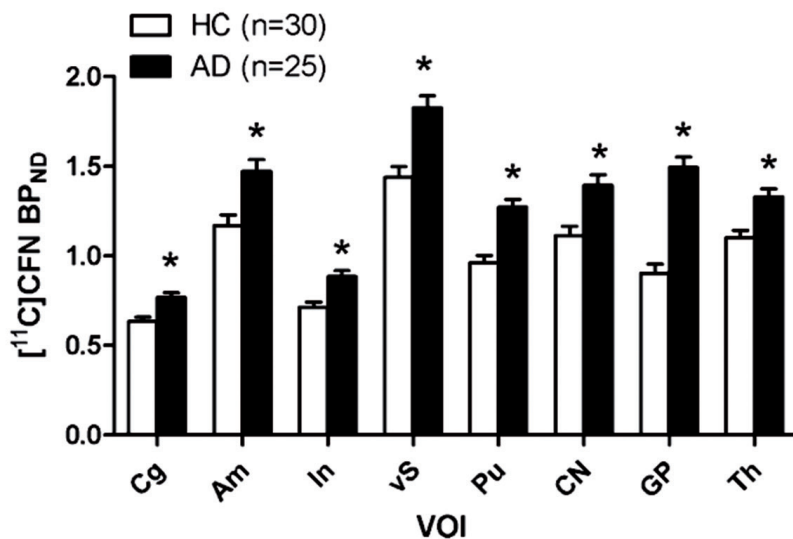
3. Risultati

Al controllo per età e per sesso, i soggetti alcolodipendenti presentavano un valore più elevato di [^{11}C]CFN BP_{ND} rispetto ai controlli sani, per tutti i VOI. L'effetto risultava altamente significativo in tutte le regioni esaminate: amigdala (p e Q=0,002), insula, striato ventrale, caudato, globo pallido, putamen e talamo (tutti p e Q=0,001). Viceversa, il valore di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} non differiva tra i due gruppi di soggetti, in nessuna delle regioni esaminate. Il valore medio (\pm SD) VT del cervelletto non differiva tra i soggetti alcolodipendenti ($7,75 \pm 1,57$ ml/ml) e i controlli ($8,0 \pm 1,53$ ml/ml; $t=0,47$; $df=36$; $p=0,638$).

Anche l'analisi di covarianza (ANCOVA) confermava l'effetto complessivo su [^{11}C]CFN BP_{ND}. Rispetto agli uomini, le donne presentavano un valore mediamente inferiore di [^{11}C]CFN BP_{ND} nella corteccia cingolata ($0,74 \pm 0,02$ contro $0,65 \pm 0,3$, p e Q=0,01) e nello striato ventrale ($1,76 \pm 0,06$ contro $1,47 \pm 0,08$, p e Q=0,005). Le donne evidenziavano anche una tendenza a registrare valori più elevati per [^{11}C]MeNTL BP_{ND} nell'amigdala, rispetto agli uomini ($0,91 \pm 0,08$ contro $0,64 \pm 0,06$, p =0,009, Q=0,07).

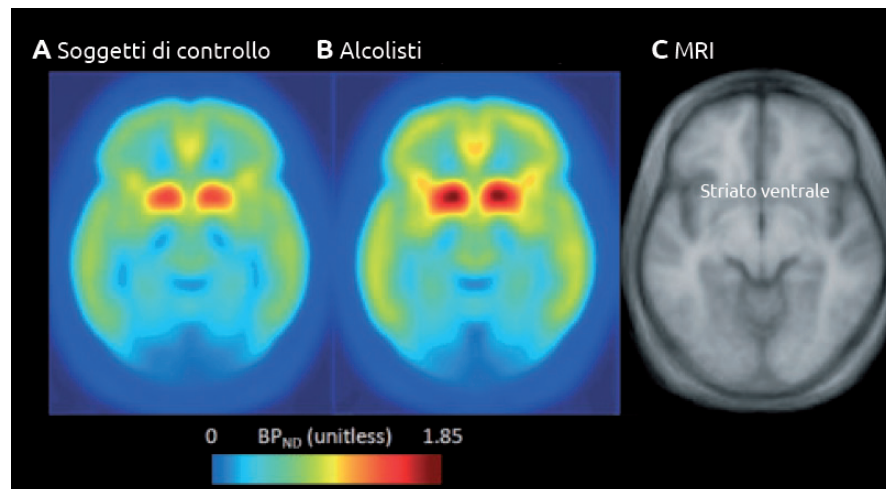
Analisi di
Covarianza dei
Volumi di Interesse
di soggetti
alcolodipendenti e
controlli

Figura 1 - Livello di [^{11}C]CFN BP_{ND} in soggetti alcolodipendenti (AD) vs soggetti sani di controllo (HC). Le barre rappresentano il valore medio \pm SEM di [^{11}C]CFN BP_{ND} corretto per età, sesso e status di fumatore per il cingolo, (Cg), l'amigdala (Am), l'insula (In), lo striato ventrale (vS), il putamen (Pu), il nucleo caudato (CN), il globus pallidus (GP), e il talamo (Th). L'asterisco al di sopra dei Volumi di Interesse (VOI) indica la differenza nel livello di [^{11}C]CFN BP_{ND} tra soggetti AD e HC risultata significativa in base ai test post-hoc di Bonferroni-Holm (per tutti i VOI indicati, $p \leq 0,004$).



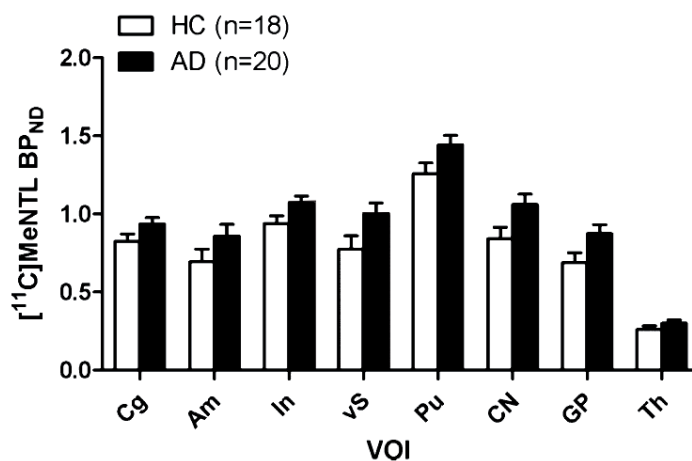
Aggiungendo il fumo come covariata non si modificavano gli incrementi di [^{11}C]CFN BP_{ND} nei soggetti alcolodipendenti rispetto ai controlli. I primi presentavano, infatti, valori significativamente più elevati di [^{11}C]CFN BP_{ND} nell'amigdala (p e Q = 0,002), nella corteccia cingolata, nell'insula, nello striato ventrale, nel caudato, nel globo pallido, nel putamen e nel talamo (in tutti p e Q < 0,001). La Figura 1 indica i valori medi di [^{11}C]CFN BP_{ND} corretti per età, genere e status di fumatore. Come si evince dalla figura, la differenza media tra i gruppi risulta più accentuata nel globo pallido e nello striato ventrale. Il valore più elevato di [^{11}C]CFN BP_{ND} nei soggetti alcolodipendenti rispetto ai controlli è evidente nelle immagini relative allo striato ventrale della Figura 2.

Figura 2 - Immagini dei valori medi di [^{11}C]CFN BP_{ND} nei soggetti di controllo (a) e nei soggetti alcolidipendenti (b). La legenda cromatica rappresenta i livelli di [^{11}C]CFN BP_{ND} da 0 (celeste) a 1,85 (rosso). Viene riportata anche l'immagine media alla risonanza magnetica di tutti i soggetti (c). Le immagini sono state acquisite a livello dello striato ventrale.



Come evidenziato nella successiva Figura 3, per quanto la direzione degli effetti registrati in diverse regioni cerebrali fosse simile a quella osservata per [^{11}C]CFN BP_{ND}, il [^{11}C]MeNTL BP_{ND} non risultava significativamente diverso nei soggetti alcolisti rispetto ai controlli, una volta corretto per età, genere e status di fumatore. Una volta corretto per età, genere e gruppo di appartenenza (alcolidipendenti o controlli), il [^{11}C]CFN BP_{ND} non presentava differenze tra i fumatori (n=29) e i non fumatori (n=26), se non per il fatto che i fumatori presentavano un valore di [^{11}C]CFN BP_{ND} inferiore nel globo pallido (Tabella 3). Dopo la correzione per età e genere, [^{11}C]MeNTL BP_{ND} non mostrava differenze tra i fumatori (n=18) e i non fumatori (n=20) in nessuno dei VOI (dati non riportati). Le Tabelle 4a e 4b indicano, rispettivamente, il valore medio di [^{11}C]CFN BP_{ND} e di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} negli 8 VOI, nei soggetti alcolidipendenti e nei controlli, dopo la correzione per età, genere e status di fumatore.

Figura 3 - [^{11}C]MeNTL BP_{ND} nei soggetti alcolidipendenti (AD) versus i controlli sani (HC). Le barre rappresentano il valore medio \pm SEM di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} corretto per età, sesso e status di fumatore per il cingolo (Cg), l'amigdala (Am), l'insula (In), lo striato ventrale (vS), il putamen (Pu), il nucleo caudato (CN), il globus pallidus (GP), e il talamo (Th). Non sono state evidenziate differenze significative nei livelli di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} tra soggetti AD e soggetti HC in nessuno dei volumi di interesse (VOI) raffigurati.



La mappatura statistica parametrica di $[^{11}\text{C}]\text{CNF BP}_{\text{ND}}$ nei soggetti alcolisti e nei soggetti di controllo ha confermato che i primi presentavano livelli superiori. Lo status di fumatore, aggiunto come variabile di disturbo nell'analisi di contrasto dei due gruppi, non modificava il risultato. Più precisamente, le differenze di gruppo venivano identificate sotto forma di due ampi volumi simmetrici di 218 ml (a sinistra) e 222 ml (a destra), con il picco in corrispondenza del talamo (Figura 4). Le coordinate x, y, z erano 20, -12, 4 (Picco T=7,5) e -22, 12, 6 (Picco T=7,49) rispettivamente per il volume sinistro e per il volume destro (Figura 4). Non si osservavano differenze per $[^{11}\text{C}]\text{CFN BP}_{\text{ND}}$ tra i soggetti alcolodipendenti e i controlli nelle aree parasagittali. Viceversa, coerentemente con l'analisi dei VOI, la mappatura parametrica di BP_{ND} non rivelava alcuna differenza significativa nel livello di $[^{11}\text{C}]\text{MeNTL}$ tra i due gruppi di soggetti.

Analisi SPM:
confronto
tra soggetti
alcolodipendenti e
controlli sani

Tabella 3 - Effetti dello status di fumatore sul valore medio di $[^{11}\text{C}]\text{CFN BP}_{\text{ND}}$. I dati indicati sono valori medi di gruppo e SEM con p-values per i soggetti fumatori e non fumatori, corretti per età, sesso e gruppo di appartenenza (alcolodipendenti vs controlli) per ciascun volume di interesse (VOI). I valori di Q indicano i valori di p corretti secondo metodica step-down di Bonferroni-Holm (Hochberg and Benjamini, 1990) per la correzioni dei confronti multipli. I volumi di interesse significativi con il valore di p corretto sono stati evidenziati in blu.

VOI	Fumatori		Non fumatori		p	Q(Holm)
	Media	SEM	Media	SEM		
Cingolo	0,670	0,025	0,732	0,025	0,099	0,099
Amigdala	1,261	0,063	1,382	0,064	0,204	0,204
Insula	0,781	0,030	0,817	0,031	0,432	0,432
Striato ventrale	1,590	0,065	1,673	0,066	0,396	0,396
Putamen	1,066	0,042	1,169	0,043	0,107	0,107
Caudato	1,206	0,055	1,302	0,056	0,243	0,243
Globus pallidus	1,016	0,056	1,380	0,058	<0,001	<0,001
Talamo	1,189	0,043	1,243	0,044	0,400	0,400

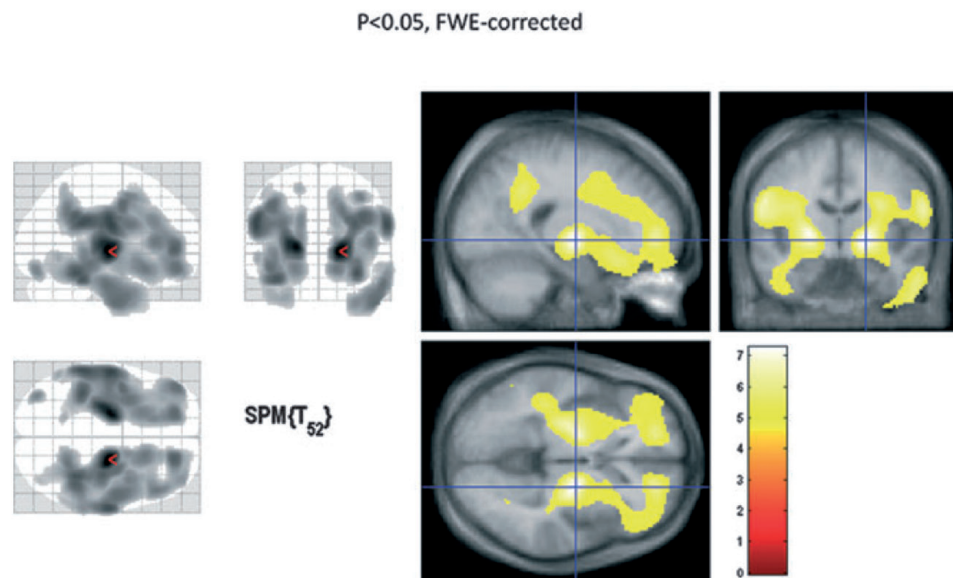
Come indicato in Tabella 1, i soggetti alcolodipendenti hanno ottenuto punteggi significativamente superiori relativamente al livello di dipendenza dall'alcol (ADS) e al recente consumo di alcol, registrato mediante TLFB (consumo di bevande alcoliche giornaliero, settimanale, complessivo negli ultimi 90 giorni; per tutti $p < 0,0001$, t-test). Si è osservata un'associazione positiva significativa tra il consumo alcolico recente e $[^{11}\text{C}]\text{MeNTL BP}_{\text{ND}}$ nel caudato (consumo medio di bevande alcoliche giornaliero, coefficiente 20,4, $p=0,001$, $Q=0,003$), settimanale (coefficiente 15,5, $p=0,002$, $Q=0,01$), e consumo totale (coefficiente 15,8, $p=0,001$, $Q=0,01$). Al contrario, non sono state rilevate associazioni tra il consumo alcolico registrato dal TLFB nei 90 giorni precedenti e il livello di $[^{11}\text{C}]\text{CFN BP}_{\text{ND}}$ in nessuno dei VOI. $[^{11}\text{C}]\text{CFN BP}_{\text{ND}}$ e $[^{11}\text{C}]\text{MeNTL BP}_{\text{ND}}$ non presentavano neanche alcuna associazione significativa con la scala ADSI, l'età di insorgenza della dipendenza, o gli anni di consumo pesante di alcol nei soggetti alcolodipendenti.

Nell'ambito del protocollo di ricovero, era stata osservata una modesta sintomatologia astinenziale, evidenziata dai picchi delle misure CIWA-AR durante tutto il periodo, dal giorno 1 fino al giorno 5 di degenza (picco medio = $5 \pm 2,6$ SD). I sintomi astinenziali regredivano in quinta giornata (punteggio medio CIWA al giorno 5 = $0,44 \pm 1,1$ SD), giorno in cui venivano eseguite le tomografie PET. Il CIWA registrato nel giorno della PET non eviden-

L'impatto del grado
di dipendenza
da alcol e
dell'anamnesi
alcolica: analisi
secondarie

ziava differenze tra gli alcolisti e il gruppo di controllo (Tabella 1). Alla verifica dello status di fumatore, dell'età e del genere, nessuno dei due punteggi CIWA (valori medi per tutto il periodo di degenza e valori registrati prima della PET) risultava predittivo ai fini dei valori di $[C]CFN BP_{ND}$ o di $[^{11}C]MeNTL BP_{ND}$.

Figura 4 - Immagini cerebrali di $[^{11}C]CFN BP_{ND}$ mostrate sotto forma di cluster biemisferici di SPM (Mappatura Statistica Parametrica) in vista laterale, frontale e superiore. L'intersezione delle linee azzurre individua il picco talamico. Lo status di fumatore è stato aggiunto come variabile di disturbo nell'analisi di contrasto dei soggetti alcolisti e controlli. La legenda cromatica raffigura i valori di picco di t, nell'intervallo tra 0 (rosso) e 7,5 (giallo/bianco). Le differenze significative tra i due gruppi di soggetti sono evidenziate in giallo (t-values >4,6, $p < 0,05$ family-wise error [FWE]).



Tenuto conto che l'anamnesi familiare costituisce un noto fattore di rischio per l'alcolismo, ne è stato valutato il valore predittivo, correggendo in fase di analisi per età, sesso, status di fumatore e gruppo di appartenenza. I soggetti con anamnesi familiare positiva per l'alcolismo (FHP, $n=23$) non presentavano livelli differenti di $[^{11}C]CFN BP_{ND}$ ($p>0,09$, $Q>0,8$) rispetto ai soggetti con anamnesi familiare negativa (FHN) ($n=26$) in nessuno dei VOI. Stratificando per gruppi, i soggetti FHP alcolodipendenti ($n=14$) non differivano dai soggetti FHN ($n=10$) relativamente a $[^{11}C]CFN BP_{ND}$ in nessuno dei VOI (tutti $p>0,1$ $Q>0,2$). Analogamente, i controlli con anamnesi familiare positiva per alcolismo ($n=9$) non differivano dai soggetti con anamnesi familiare negativa ($n=16$) relativamente al livello di $[^{11}C]CFN BP_{ND}$ in nessuno dei VOI ($p>0,2$, $Q=1,0$). Confrontati con i soggetti FHN ($n=19$), i soggetti FHP ($n=16$) evidenziavano una tendenza a registrare un valore medio più basso di $[^{11}C]MeNTL BP_{ND}$ nell'insula (FHN: $0,95\pm 0,04$ contro FHP: $1,07\pm 0,04$, $p=0,04$, $Q=0,073$). Alla luce dei valori medi e delle deviazioni standard osservate per i due gruppi, è stata effettuata un'analisi delle dimensioni del campione per individuare un effetto con forza 0,90%. È stata così stimata una dimensione del campione pari a 70 (ovvero 35 per ciascun gruppo) per $p=0,05$ nell'insula. Dopo la stratificazione per gruppi, i soggetti alcolodipendenti e con anamnesi familiare positiva ($n=11$) non differivano dai soggetti con anamnesi familiare negativa ($n=8$) in nessuno dei VOI ($p>0,1$, $Q=1,0$), e i soggetti sani con anamnesi familiare positiva ($n=5$) non differivano da quelli con anamnesi familiare negativa ($n=11$) in nessuno dei VOI ($p>0,08$, $Q>0,3$).

Come indicato in Tabella 1, i soggetti alcolodipendenti riferivano con maggiore frequenza sintomi di ansia (BAI), depressione (BDI), e problemi di natura psicologica (BSI) rispetto ai controlli sani (tutti $p < 0,0001$, t-test). L'ANCOVA per questi dati evidenziava l'assenza di una relazione diretta tra ansia, depressione e misure globali dei problemi psicologici ottenute con i metodi BAI, BDI-II e BSI, e i livelli di [^{11}C]CFN BP_{ND} o [^{11}C]MeNTL BP_{ND}.

I soggetti alcolodipendenti registravano un livello superiore di craving alla Penn Craving Scale, VAS, e OCDS, rispetto ai controlli (Tabella 1, tutti $p < 0,0001$, t-test). È emersa una correlazione negativa tra i punteggi massimi di craving registrati alla VAS nel periodo successivo al ricovero e il livello di [^{11}C]CFN BP_{ND}, nell'amigdala ($F=5,0$ p e $Q=0,04$), nello striato ventrale ($F=10,6$ p e $Q=0,004$) e nel talamo ($F=4,5$ p e $Q=0,055$). Non si evidenziava invece alcuna relazione tra i punteggi ottenuti con gli altri strumenti di misurazione del craving (OCDS o Penn Craving Scale) per il livello di [^{11}C]CFN BP_{ND} o di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} nei soggetti alcolodipendenti.

4. Discussione

Dallo studio presentato sono emersi 5 risultati principali. In primo luogo, i soggetti (uomini e donne) alcolodipendenti che si erano astenuti per cinque giorni dal consumo di bevande alcoliche presentavano livelli di [^{11}C]CFN BP_{ND} più elevati rispetto ai controlli di entrambi i sessi, in corrispondenza di alcune regioni cerebrali e più precisamente dello striato ventrale, dell'amigdala, del caudato, del pallidus, dell'insula, del putamen e del talamo. L'osservazione è stata confermata anche dopo la correzione per età, genere e status di fumatore. L'analisi statistica parametrica (SPM) ha suffragato tali risultati, evidenziando che l'effetto dell'alcol risulta ancora più globale di quanto suggeriscano le analisi dei VOI. In secondo luogo, malgrado la direzione degli effetti in diverse aree cerebrali fosse simile a quella osservata per [^{11}C]CFN BP_{ND}, i volumi di interesse e le mappe SPM non hanno evidenziato differenze significative nei livelli di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} tra i soggetti alcolodipendenti e i controlli sani. In terzo luogo, il livello di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} nel caudato si correlava positivamente con il consumo recente di alcol nei soggetti con dipendenza. In quarto luogo, è stata individuata una correlazione negativa significativa tra il livello di [^{11}C]CFN BP_{ND} e il picco massimo di craving alla VAS, in diversi VOI. Infine, le altre misure di dipendenza da alcol e di gravità della sindrome astinenziale, dell'umore, e degli altri sintomi psicologici, sono risultate non associate ai livelli di [^{11}C]CFN BP_{ND} o di [^{11}C]MeNTL BP_{ND}. Ciascuno di questi risultati viene analizzato in dettaglio nei paragrafi seguenti.

I risultati da noi ottenuti in merito alla comparazione tra livelli di [^{11}C]CFN BP_{ND} in 25 soggetti alcolodipendenti e 30 soggetti di controllo, sono in linea con i livelli più elevati di [^{11}C]CFN BP_{ND} nello striato ventrale riscontrati in 25 soggetti alcolodipendenti di sesso maschile rispetto a 10 controlli sani nello studio di Heinz e colleghi (2005). Oltre a ciò, i soggetti alcolodipendenti presentavano livelli superiori di [^{11}C]CFN BP_{ND} in corrispondenza di amigdala, caudato, pallidus, insula, putamen e talamo. La conclusione cui è giunto il nostro studio in merito alla possibile maggiore pervasività dell'aumento di [^{11}C]CFN BP_{ND} è in linea con la registrazione di una tendenza all'incremento dei volumi di distribuzione di [^{11}C]diprenorfina a livello regionale e globale, nei soggetti alcolodipendenti ($n=11$) rispetto ai controlli ($n=13$), sebbene non si tratti di un effetto statisticamente significativo (Williams 2009). Gli autori fanno notare che lo studio potrebbe essere sottodimensionato sotto il profilo del potere statistico e che si è registrato un notevole livello di variabilità, forse dovuto al legame tra

[¹¹C]diprenorfina e tutte e 3 le sotto unità (μ , δ e κ) del recettore oppioide.

Tabella 4 - (a) Valore medio di [¹¹C]CFN BP_{ND} e (b) Valore medio di [¹¹C]MeNTL BP_{ND} nei soggetti alcol-dipendenti (AD) e nei controlli sani (HC). I dati indicati rappresentano valori medi di gruppo e valori SEM, F p corretti per età, sesso e status di fumatore per ciascun volume di interesse (VOI). I valori Q(Holm) indicano i valori di p corretti con il metodo step-down Bonferroni-Holm (Hochberge Benjamini, 1990) per la correzione dei confronti multipli. I VOI significativi con valore di p corretto p < 0,05 sono evidenziati in grassetto.

(a) [¹¹ C]CFN BP _{ND}		AD (N = 25)		HC (N = 30)		F	p	Q(Holm)
VOI	Media	SEM	Media	SEM				
Cingolo	0,768	0,026	0,634	0,023	13,787	0,001	0,001	
Amigdala	1,472	0,066	1,170	0,060	10,897	0,002	0,002	
Insula	0,885	0,032	0,713	0,029	15,379	<0,001	<0,001	
Striato ventrale	1,826	0,068	1,438	0,061	17,106	<0,001	<0,001	
Putamen	1,272	0,044	0,962	0,040	25,716	<0,001	<0,001	
Caudato	1,395	0,057	1,113	0,052	12,677	0,001	0,001	
Globus pallidus	1,494	0,059	0,902	0,053	52,052	<0,001	<0,001	
Talamo	1,329	0,045	1,102	0,041	13,201	0,001	0,001	
(b) [¹¹ C]MeNTL BP _{ND}		AD (N = 25)		HC (N = 30)		F	p	Q(Holm)
VOI	Media	SEM	Media	SEM				
Cingolo	0,935	0,042	0,826	0,046	2,389	0,132	0,132	
Amigdala	0,859	0,075	0,694	0,082	1,738	0,196	0,196	
Insula	1,070	0,045	0,939	0,050	3,038	0,091	0,091	
Striato ventrale	0,993	0,078	0,776	0,085	2,835	0,102	0,102	
Putamen	1,442	0,063	1,258	0,069	3,103	0,087	0,087	
Caudato	1,061	0,067	0,843	0,073	3,846	0,058	0,058	
Globus pallidus	0,874	0,059	0,687	0,065	3,677	0,064	0,064	
Talamo	0,300	0,022	0,261	0,024	1,108	0,300	0,300	

La metodologia adottata per questo studio differisce da quella adottata dagli studi precedenti per numerosi aspetti di rilievo. In primo luogo, nello studio sono stati arruolati soggetti alcol-dipendenti di entrambi i sessi e soggetti sani di pari età, utilizzando procedure di psicodiagnostica rigorose per escludere il consumo di droga in corso, o altri disturbi legati al consumo di droga, e altri disturbi psichiatrici di Asse 1 in corso. Età, genere, consumo di sostanze e problemi psichiatrici costituiscono tutti fattori confondenti di rilievo che notoriamente influiscono sul sistema oppioide endogeno. In secondo luogo, tutti i soggetti sono stati ospitati nella medesima unità di ricerca residenziale, dove il controllo sull'alimentazione, il divieto di fumo e i test tossicologici sulle urine avevano lo scopo di escludere l'utilizzo di altre sostanze prima dell'acquisizione delle immagini PET. Per i soggetti alcol-dipendenti, tutte le scansioni sono state effettuate nell'ambito di un protocollo di disintossicazione che prevedeva l'astensione da alcolici sotto monitoraggio medico, e con tempistica prefissata per l'acquisizione delle immagini e per l'inizio del periodo di astinenza. I soggetti alcol-dipendenti sono stati arruolati nello studio con un consumo alcolico ancora attivo, interrompendo l'assunzione di alcol all'atto del ricovero. In terzo luogo, i recettori MOR e DOR sono stati esaminati con PET eseguita con [¹¹C]CFN, un radioligando selettivo per i MOR, e con [¹¹C]MeNTL, un radioligando selettivo per i DOR, in condizioni validate di astinenza dal consumo di alcol e tutti nel medesimo giorno del periodo di astinenza (giorno 5). L'interruzione nell'assunzione di alcolici induce un processo di modifica dinamica del

sistema oppioide endogeno, ed è probabile che tale processo risulti più accentuato nel corso dei primi giorni di astinenza. In tal modo, programmando l'acquisizione delle immagini PET in uno dei primi giorni di astinenza si riesce a ridurre al minimo la varianza dei dati, tipicamente ottenuta quando la tempistica delle scansioni può oscillare di giorni o persino di intere settimane. In quarto luogo, durante il periodo di astinenza non sono stati utilizzati quei farmaci (come le benzodiazepine) che potrebbero alterare la funzione recettoriale (Cox 2001). In quinto luogo, sono stati esaminati 8 VOI cerebrali, localizzati nelle aree mesolimbiche ricche di recettori oppioidi, come lo striato ventrale e l'amigdala, associate al potenziamento degli effetti dell'alcol, alla dipendenza e al craving. Infine, dato che molti dei soggetti alcolodipendenti erano anche fumatori, si è deciso di reclutare soggetti sani con un elevato consumo di tabacco ma non di alcol e senza problemi legati all'alcol, al fine di compensare e controllare anche il ruolo del tabagismo. Quest'ultimo punto è di particolare rilievo, in quanto circa l'80% dei soggetti alcolodipendenti si definisce anche un consumatore regolare di tabacco (Batel 1995; DiFranza 1990) dichiarando di fumarne notevoli quantità (Dawson, 2000), in confronto a chi ne fa solo un uso ricreativo. Nessuno dei precedenti studi alla PET prevedeva il confronto con soggetti fumatori senza problemi di alcol. Il design dello studio qui presentato ha al contrario consentito di controllare in maniera rigorosa anche l'uso di altre sostanze, la presenza di disturbi psichiatrici, la durata del periodo di astinenza e il consumo di sigarette. E' probabile che il livello di significatività sia stato raggiunto grazie alle maggiori dimensioni del campione analizzato e al controllo rigoroso di questi potenziali fattori confondenti.

Precedenti studi su volontari sani hanno indicato, utilizzando le immagini PET per [^{11}C]MeNTL, che le aree ricche di recettori DOR comprendono le regioni neocorticali (insulare, parietale, frontale, cingolata e occipitale), il nucleo caudato, il putamen e l'amigdala (Madar 1996). Inoltre le immagini PET di [^{11}C]MeNTL sono state utilizzate con successo anche per esaminare le differenze di gruppo per altre patologie, come l'epilessia (Madar 1997) e il carcinoma (Madar 2007). Il nostro è il primo studio che confronta la disponibilità dei DOR in soggetti alcolodipendenti in astinenza recente e in controlli sani. I dati raccolti suggeriscono che il recettore delta possa essere sensibile al comportamento alcolico più recente, e testimoniano del ruolo svolto da recettori nell'alcolodipendenza, in modo particolare se esaminati nel quadro del nostro precedente studio, in cui si indicava che la dose clinica di naltrexone (50 mg) non produceva che una inibizione parziale (21%), per di più caratterizzata da un'elevata variabilità intersoggettiva, del legame [^{11}C]MeNTL, nei soggetti con dipendenza da alcol (Weerts 2008). Considerato che la stessa dose di naltrexone produce una inibizione quasi completa (95%) del legame [^{11}C]CFN, è lecito supporre che l'utilizzo del naltrexone per bloccare i recettori DOR potrebbe contribuire alla variabilità degli esiti del trattamento, e potrebbe essere influenzato dai diversi livelli di disponibilità del recettore DOR presenti prima dell'inizio del trattamento. Dal presente studio non sono emerse significative differenze nei livelli di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} tra i due gruppi di soggetti partecipanti. Queste conclusioni sono in contrasto con gli studi preclinici effettuati su ceppi di roditori con e senza predilizione per l'alcol, che indicavano incrementi e decrementi della densità dei DOR nelle regioni mesolimbiche (de Waele 1995; Marinelli 2000; McBride 1998; Soini 1998). Considerato che le variazioni intersoggettive (misurate sotto forma di coefficiente di variazione) risultavano simili tra [^{11}C]CFN e [^{11}C]MeNTL per le regioni esaminate, l'assenza di differenze di gruppo per il [^{11}C]MeNTL non può essere attribuita alla maggiore variabilità del legame. Una possibile obiezione è che le stime regionali di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} erano più basse rispetto alle stime di [^{11}C]CFN BP_{ND}. Di conseguenza, si potrebbe sostenere che il valore inferiore del segnale-rumore (SNR), ovvero il legame specific - to-non speci-

fic di [^{11}C]MeNTL, potrebbe mascherare le potenziali differenze di gruppo. In alternativa, il mancato riscontro di differenze tra i due gruppi potrebbe essere collegato alle minori dimensioni del campione utilizzato per la scansione di [^{11}C]MeNTL. E' ipotizzabile che campioni di dimensioni maggiori potrebbero rivelare aumenti significativi di [^{11}C]MeNTL BP_{ND} . Il valore più elevato di [^{11}C]CFN BP_{ND} nei soggetti alcolodipendenti può avere diverse spiegazioni. Potrebbe essere dovuto a una maggiore disponibilità di MOR, causata dal minore tasso di occupazione dei recettori da parte degli oppioidi endogeni. In alternativa, l'incremento potrebbe essere l'effetto di una maggiore densità dei MOR (ad esempio a causa di una sovra-regolazione del recettore Mu). Tale elevazione del livello di [^{11}C]CFN BP_{ND} nei soggetti alcolodipendenti, in confronto ai controlli, potrebbe essere una conseguenza (i) dell'astinenza; (ii) di una dipendenza o di un consumo rischioso di alcol di lungo periodo; (iii) di differenze ereditarie nel funzionamento del sistema oppioide; e/o (iv) di differenze acquisite a causa di fattori ambientali (infanzia difficile, stress cronico) che potrebbero alterare il livello di [^{11}C]CFN BP_{ND} . Alcune di queste ipotesi non mancano di fondamento. Gli studi sui roditori hanno indicato la presenza di un maggiore livello di legame dei MOR in alcune aree limbiche, tra cui il nucleo accumbens, in corrispondenza di un consumo prolungato di alcol (5 settimane, Cowen 1998, 1999; Djouma 2002) e nel corso di un periodo di astinenza (da 1 a 10 giorni, Djouma 2002). Alcuni studi sulle variazioni genetiche dell'attività degli oppioidi hanno anche indicato una maggiore densità dei MOR nelle strutture limbiche, come l'accumbens e l'amigdala, nelle linee di roditori con preferenza per l'alcol, rispetto alle linee senza preferenza (de Waele 1995; Marinelli 2000; McBride 1998), sebbene non tutti gli studi concordino con tale indicazione (Fadda 1999). Per quanto il nostro studio non abbia trovato alcuna correlazione diretta tra [^{11}C]CFN BP_{ND} e misure dell'ansia, della depressione e dei problemi psicologici, i soggetti con dipendenza da alcol riferivano sintomi significativamente più gravi per tutte queste misure, anche dopo l'esclusione dei soggetti con anamnesi di altri disturbi di Asse I.

Nello studio qui presentato, è stata raccolta un'anamnesi familiare dettagliata per tutti i partecipanti, classificando i soggetti in base alla presenza di alcolismo tra i membri della famiglia. L'aumento di [^{11}C]CFN BP_{ND} non appare direttamente correlato con l'anamnesi familiare di alcolismo. I soggetti con anamnesi familiare positiva non presentavano differenze di [^{11}C]CFN BP_{ND} rispetto ai soggetti con anamnesi negativa, in nessuno dei VOI. Anche Heinz e colleghi (2005) non hanno riscontrato alcun effetto dell'alcolismo familiare su [^{11}C]CFN BP_{ND} . Analogamente, gli autori del presente studio hanno già riferito in precedenza dell'assenza di differenze significative nella produzione di dopamina mesolimbica indotta dall'anfetamina, nelle risposte soggettive, o nelle misure dell'ormone dello stress, in funzione di un'anamnesi familiare di alcolismo (Munro 2006). Sembra dunque poco plausibile che l'osservato aumento di [^{11}C]CFN BP_{ND} possa essere attribuito unicamente ad astinenza acuta, né è stata da noi rilevata la presenza di correlazioni tra BP_{ND} e la gravità della crisi astinenziale, misurata in base alla scala CIWA-Ar nel corso del nostro studio. La decisione di fare partecipare allo studio solo i soggetti alcolodipendenti con sintomi di astinenza relativamente lievi potrebbe tuttavia avere diminuito la probabilità di osservare un tale effetto. Nello studio condotto da Heinz e colleghi (2005), è stata osservata una maggiore disponibilità di MOR nello striato ventrale dopo 1-3 settimane di astinenza dall'alcol, e i valori sono rimasti elevati e stabili per le 5 settimane successive, quando venivano ripetute le scansioni PET per [^{11}C]CFN in un sottogruppo di soggetti alcolodipendenti. Analogamente, i volumi di distribuzione della [^{11}C]diprenorfina si rivelavano stabili se esaminati a 2 settimane, e successivamente a 2 mesi di distanza dal periodo di astinenza (Williams 2009). Né il nostro studio né quello di Heinz e colleghi (2005) indicavano alcuna correlazione tra

la disponibilità di MOR e l'anamnesi alcolica o il grado di alcoldipendenza. Anche Williams e colleghi (2009) non riscontravano correlazioni tra l'abitudine al consumo di alcol o la gravità dell'alcoldipendenza e i volumi distributivi del tracciante non selettivo [^{11}C]diprenorfina. Una correlazione positiva, al contrario, veniva da noi osservata tra consumo recente di alcol e [^{11}C]MeNTL BPND nel nucleo caudato. Va tuttavia sottolineato che la capacità di osservare una relazione tra misure del consumo alcolico e [^{11}C]CFN BP_{ND} nei soggetti alcoldipendenti può essere compromessa dall'omogeneità e dalla cronicità del campione, ovvero tutti i soggetti erano forti bevitori di lungo periodo. Il maggior livello di binding dei MOR veniva osservato dopo solo 5 settimane di assunzione di alcol. Se il consumo cronico produce una sovra-regolazione dei MOR, è probabile che ciò avvenga in un fase precedente alla progressione da consumo regolare a stato di dipendenza, e che non sia rilevabile all'interno del nostro campione relativamente omogeneo di soggetti alcoldipendenti da lungo tempo.

Una correlazione inversa è stata da noi riscontrata tra le misure del craving alla VAS e [^{11}C]CFN BP_{ND} in diverse regioni del cervello, tra cui lo striato ventrale, il talamo, e il cingolo. È da sottolineare che i soggetti alcoldipendenti mostrano una maggiore attivazione di queste aree cerebrali in risposta allo stimolo alcolico (un sorso di alcol e immagini di bevande alcoliche) rispetto agli stimoli di controllo utilizzati negli studi di MRI funzionale (George 2001; Myrick 2004). L'attivazione dell'accumbens risultava correlata con un aumento del craving negli alcolisti e non nei consumatori sociali di alcol (Myrick 2004). La correlazione inversa con il craving individuata dal nostro studio è stata un risultato inatteso, in quanto i soggetti alcoldipendenti avevano riportato un craving superiore e livelli più elevati di [^{11}C]CFN BP_{ND} rispetto ai controlli. Inoltre, i nostri dati contrastano con le correlazioni positive tra craving autoriferito e la disponibilità recettoriale per [^{11}C]CFN [^{11}C]diprenorfina indicata in precedenza (Heinz 2005; Williams 2009). I punteggi OCD ottenuti il giorno della PET nel nostro studio erano comparabili a quelli riportati da Heinz e colleghi nello studio del 2005. Una correlazione inversa è stata riportata tra craving e il ligando per i recettori dopaminergici D2 [^{18}F]desmethoxyfallypride BP_{ND} nello striato ventrale nei soggetti alcoldipendenti (Heinz 2004). Sebbene sembra che i recettori D2 e MOR si comportino in maniera opposta nell'alcoldipendenza, potrebbe verificarsi un'analoga correlazione inversa. Ad esempio, nell'ipotesi che i peptidi oppioidi vengano ridotti da un consumo cronico di alcol che induca una sovra-regolazione dei MOR, un effetto analogo ma ancora più accentuato potrebbe portare ad una maggiore trasmissione degli oppioidi e a una diminuzione del craving rispetto ai soggetti con un minore livello di sovra-regolazione. Qualora il consumo di alcol inducesse un minor rilascio di oppioidi endogeni, la sovra-regolazione dei recettori dovrebbe risultare proporzionalmente maggiore della riduzione degli oppioidi affinché si possa avere un aumento netto della neurotrasmissione degli oppioidi. Ciò renderebbe il livello di craving più prossimo a quello dei soggetti normali, ma non lo normalizzerebbe del tutto. Si tratta con tutta evidenza di un'ipotesi puramente speculativa, la cui fondatezza dovrà essere confermata da ulteriori indagini.

Lo studio sin qui descritto presenta alcuni limiti che riducono la possibilità di generalizzarne i risultati. I soggetti da noi selezionati erano alcoldipendenti senza una storia precedente di grave sintomatologia astinenziale e dallo studio sono stati esclusi i soggetti che avevano in precedenza necessitato di trattamento con benzodiazepine per crisi di astinenza. Di conseguenza sono stati esclusi dalla partecipazione allo studio quei soggetti che avevano sofferto di crisi gravi di astinenza da alcol. Eppure, a dispetto di queste modalità conservative di selezione dei partecipanti, in base alle quali sono stati reclutati soltanto i soggetti con sintomi astinenziali modesti, le differenze riscontrate nei livelli di [^{11}C]CFN BP_{ND} tra i

soggetti alcolodipendenti e i controlli sono risultate altamente significative per numerosi volumi cerebrali. Un'ulteriore considerazione va fatta a proposito del carattere di lunga durata che caratterizzava i soggetti alcolodipendenti partecipanti al nostro studio (in media 15 anni di consumo dipendente). Per questo campione omogeneo, un'esposizione all'alcol di così lunga durata potrebbe avere limitato la capacità di evidenziare correlazioni tra $[^{11}\text{C}]\text{CFN BP}_{\text{ND}}$ e comportamento/misure cliniche. Si rendono pertanto necessari ulteriori studi su soggetti che presentino livelli di consumo alcolico più variati, con e senza diagnosi di disturbi da consumo di alcol, per comprendere meglio le fasi di transizione del sistema oppioide, durante la progressione da consumo sociale a consumo intenso e infine a dipendenza da alcol.

In sintesi, le nostre osservazioni riguardo all'associazione esistente tra $[^{11}\text{C}]\text{MeNTL BP}_{\text{ND}}$ e consumo recente di alcol, unitamente al riscontro di una medesima direzione tra le differenze di gruppo per $[^{11}\text{C}]\text{MeNTL BP}_{\text{ND}}$ e per $[^{11}\text{C}]\text{CFN BP}_{\text{ND}}$ indicano un possibile ruolo dei DOR nell'alcolodipendenza, meritevole di ulteriori approfondimenti. Analizzati congiuntamente con i dati dello studio pubblicato in precedenza, secondo cui una dose clinica di naltrexone (50 mg) otteneva un blocco soltanto parziale del legame con $[^{11}\text{C}]\text{MeNTL}$, i nostri dati suggeriscono un probabile contributo dei DOR nel causare la variabilità dei risultati ottenuti dal trattamento con naltrexone, così come della dipendenza da alcol. Il livello più elevato di $[^{11}\text{C}]\text{CFN BP}_{\text{ND}}$ nei soggetti alcolodipendenti potrebbe rappresentare un fattore predisponente per l'instaurarsi della dipendenza o potrebbe essere il risultato di un consumo di alcol di lunga durata, dell'alcolodipendenza stessa, o dell'astinenza. Il riscontro di un livello più elevato di $[^{11}\text{C}]\text{CFN BP}_{\text{ND}}$ negli alcolisti costituisce un'evidenza di un ruolo fondamentale dei MOR nella dipendenza da alcol.

Tradotto e riprodotto ad opera della redazione dall'originale versione in inglese pubblicata in *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 Dec;35(12):2162-73, con il permesso dell'Editore. Titolo originale: Positron emission tomography imaging of mu- and delta-opioid receptor binding in alcohol-dependent and healthy control subjects.

Bibliografia

1. Anton RF, Moak DH, Latham PK (1996) The obsessive compulsive drinking scale: a new method of assessing outcome in alcoholism treatment studies [published erratum appears in *Arch Gen Psychiatry* 1996 Jul;53(7):576]. *Arch Gen Psychiatry* 53:225-231.
2. Anton RF, Swift RM (2003) Current pharmacotherapies of alcoholism: a U.S. perspective. *Am J Addict* 12(Suppl 1):S53-S68.
3. Ashburner JT, Friston KJ (2004) High-dimensional image warping, in *Human Brain Function*, 2nd ed (Frackowiak RSJ, Friston KJ, Frith CD, Dolan RJ, Price CJ, Zeki S, Ashburner JT, Penny WD eds), pp 673-694. Academic Press, San Diego, CA.
4. Batel P, Pessione F, Maitre C, Rueff B (1995) Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction* 90:977-980.
5. Baumann B, Danos P, Krell D, Diekmann S, Leschinger A, Stauch R, Wurthmann C, Bernstein HG, Bogerts B (1999) Reduced volume of limbic system-affiliated basal ganglia in mood disorders: preliminary data from a postmortem study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 11:71-78.
6. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA (1988) An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J Consult Clin Psychol* 56:893-897.
7. Beck AT, Steer RA, Brown GK (1996) *Manual for the Beck Depression Inventory-II*. Psychological Corporation, San Antonio, TX.
8. Becker A, Grecksch G, Kraus J, Loh HH, Schroeder H, Holtt V (2002) Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365:296-302.
9. Bencherif B, Wand GS, McCaul ME, Kim YK, Ilgin N, Dannals RF, Frost JJ (2004) Mu-opioid receptor binding measured by $[^{11}\text{C}]\text{carfentanil}$ positron emission tomography is related to craving and mood in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 55:255-262.
10. Benjamin D, Grant ER, Pohorecky LA (1993) Naltrexone reverses ethanol induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res* 621:137-140.
11. Buchholz KK, Cadoret R, Cloninger CR, Dinwiddie SH, Hesselbrock VM, Nurnberger JI Jr, Reich T, Schmidt I, Schuckit MA (1994) A new, semistructured psychiatric interview for use in genetic linkage studies: a report on the reliability of the SSAGA. *J Stud Alcohol* 55:149-158.
12. Cowen MS, Rezvani A, Jarrott B, Lawrence AJ (1998) Distribution of opioid peptide gene expression in the

- limbic system of Fawn-Hooded (alcoholpreferring) and Wistar-Kyoto (alcohol-non-preferring) rats. *Brain Res* 796:323–326.
13. Cowen MS, Rezvani AH, Jarrott B, Lawrence AJ (1999) Ethanol consumption by Fawn-Hooded rats following abstinence: effect of naltrexone and changes in mu-opioid receptor density. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1008–1014.
 14. Cox RF, Collins MA (2001) The effects of benzodiazepines on human opioid receptor binding and function. *Anesth Analg* 93:354–358.
 15. Djouma E, Lawrence AJ (2002) The effect of chronic ethanol consumption and withdrawal on mu-opioid and dopamine D(1) and D(2) receptor density in Fawn-Hooded rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 302:551–559.
 16. Endres CJ, Bencherif B, Hilton J, Madar I, Frost JJ (2003) Quantification of brain mu-opioid receptors with [¹¹C]carfentanil: reference-tissue methods. *Nucl Med Biol* 30:177–186.
 17. Fadda P, Tronci S, Colombo G, Fratta W (1999) Differences in the opioid system in selected brain regions of alcohol-preferring and alcohol non preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1296–1305.
 18. Flannery BA, Volpicelli JR, Pettinati HM (1999) Psychometric properties of the Penn Alcohol Craving Scale [In Process Citation]. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1289–1295.
 19. Franck J, Lindholm S, Raaschou P (1998) Modulation of volitional ethanol intake in the rat by central delta-opioid receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 22:1185–1189.
 20. Froehlich JC (1995) Genetic factors in alcohol self-administration. *J Clin Psychiatry* 56(Suppl 7):15–23.
 21. Froehlich JC, Zweifel M, Harts J, Lumeng L, Li TK (1991) Importance of delta opioid receptors in maintaining high alcohol drinking. *Psychopharmacology* 103:467–472.
 22. Frost JJ, Mayberg HS, Sadzot B, Dannals RF, Lever JR, Ravert HT, Wilson AA, Wagner HN Jr, Links JM (1990) Comparison of [¹¹C]diprenorphine and [¹¹C]carfentanil binding to opiate receptors in humans by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:484–492.
 23. Frost JJ, Wagner HN Jr, Dannals RF, Ravert HT, Links JM, Wilson AA, Burns HD, Wong DF, McPherson RW, Rosenbaum AE, Kuhar MJ, Snyder SH (1985) Imaging opiate receptors in the human brain by positron tomography. *J Comput Assist Tomogr* 9:231–236.
 24. George MS, Anton RF, Bloomer C, Teneback C, Drobos DJ, Lorberbaum JP, Nahas Z, Vincent DJ (2001) Activation of prefrontal cortex and anterior thalamus in alcoholic subjects on exposure to alcohol-specific cues. *Arch Gen Psychiatry* 58:345–352.
 25. Gianoulakis C (2004) Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. *Curr TopMed Chem* 4:39–50.
 26. Hall FS, Sora I, Uhl GR (2001) Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* 154:43–49.
 27. Hammers A, Allom R, Koeppe MJ, Free SL, Myers R, Lemieux L, Mitchell TN, Brooks DJ, Duncan JS (2003) Three-dimensional maximum probability atlas of the human brain, with particular reference to the temporal lobe. *Hum Brain Mapp* 19:224–247.
 28. Heinz A, Reimold M, Wrase J, Hermann D, Croissant B, Mundle G, Dohmen BM, Braus DF, Schumann G, Machulla HJ, Bares R, Mann K (2005) Correlation of stable elevations in striatal mu-opioid receptor availability in detoxified alcoholic patients with alcohol craving: a positron emission tomography study using carbon 11-labeled carfentanil. *Arch Gen Psychiatry* 62:57–64.
 29. Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Hermann D, Klein S, Grusser SM, Flor H, Braus DF, Buchholz HG, Grunder G, Schreckenberger M, Smolka MN, Rosch F, Mann K, Bartenstein P (2004) Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. *Am J Psychiatry* 161:1783–1789.
 30. Herz A (1998) Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? *Can J Physiol Pharmacol* 76:252–258.
 31. Hilton J, Yokoi F, Dannals RF, Ravert HT, Szabo Z, Wong DF (2000) Column-switching HPLC for the analysis of plasma in PET imaging studies. *Nucl Med Biol* 27:627–630.
 32. Hochberg Y, Benjamini Y (1990) More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 9:811–818.
 33. Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* 6:65–70.
 34. Innis RB, Cunningham VJ, Delforge J, Fujita M, Gjedde A, Gunn RN, Holden J, Houle S, Huang SC, Ichise M, Iida H, Ito H, Kimura Y, Koeppe RA, Knudsen GM, Knuuti J, Lammertsma AA, Laruelle M, Logan J, Maguire RP, Mintun MA, Morris ED, Parsey R, Price JC, Slifstein M, Sossi V, Suhara T, Votaw JR, Wong DF, Carson RE (2007) Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1533–1539.
 35. Job MO, Tang A, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Bergeson SE, Gonzales RA (2007) Mu (mu) opioid receptor regulation of ethanol-induced dopamine response in the ventral striatum: evidence of genotype specific sexual dimorphic epistasis. *Biol Psychiatry* 62:627–634.
 36. June HL, McCane SR, Zink RW, Portoghese PS, Li TK, Froehlich JC (1999) The delta 2-opioid receptor antagonist naltriben reduces motivated responding for ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 147:81–89.
 37. Kinahan PE, Rogers JG (1989) Analytic 3D image reconstruction using all detected events. *IEEE Trans Nucl Sci* 36:964–968.
 38. Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parsons LH, Heyser CJ, Hyytia P, Merlo-Pich E, Weiss F (1998) Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 22:3–9.
 39. Krishnan-Sarin S, Jing SL, Kurtz DL, Zweifel M, Portoghese PS, Li TK, Froehlich JC (1995a) The delta opioid receptor antagonist naltrindole attenuates both alcohol and saccharin intake in rats selectively bred for alcohol preference. *Psychopharmacology (Berl)* 120:177–185.
 40. Krishnan-Sarin S, Portoghese PS, Li TK, Froehlich JC (1995b) The delta 2- opioid receptor antagonist naltriben selectively attenuates alcohol intake in rats bred for alcohol preference. *Pharmacol Biochem Behav* 52:153–159.
 41. Krishnan-Sarin S, Wand GS, Li XW, Portoghese PS, Froehlich JC (1998) Effect of mu opioid receptor blockade on alcohol intake in rats bred for high alcohol drinking. *Pharmacol Biochem Behav* 59:627–635.
 42. Lever JR, Scheffel U, Kinter CM, Ravert HT, Dannals RF, Wagner HN Jr, Frost JJ (1992) In vivo binding of N1 μ -[¹¹C]methyl)naltrindole to deltaopioid receptors in mouse brain. *Eur J Pharmacol* 216:459–460.



43. Lewellen TK, Kohlmyer SG, Miyaoka RS, Kaplan MS, Stearns CW, Schubert SF (1996) Investigation of the performance of the General Electric ADVANCE positron emission tomograph in 3D mode. *IEEE Trans Nucl Sci* 43:2199–2206.
44. Logan J, Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Ding YS, Alexoff DL (1996) Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:834–840.
45. Logan J, Fowler JS, Volkow ND, Wolf AP, Dewey SL, Schlyer DJ, MacGregor RR, Hitzemann R, Bendriem B, Gatley SJ, Christman DR (1990) Graphical analysis of reversible radioligand binding from timeactivity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:740–747.
46. Madar I, Bencherif B, Lever J, Heitmiller RF, Yang SC, Brock M, Brahmer J, Ravert H, Dannals R, Frost JJ (2007) Imaging delta- and mu-opioid receptors by PET in lung carcinoma patients. *J Nucl Med* 48(2):207–213.
47. Madar I, Lesser RP, Krauss G, Zubieta JK, Lever JR, Kinter CM, Ravert HT, Musachio JL, Mathews WB, Dannals RF, Frost JJ (1997) Imaging of delta- and mu-opioid receptors in temporal lobe epilepsy by positron emission tomography. *Ann Neurol* 41(3):358–367.
48. Madar I, Lever JR, Kinter CM, Scheffel U, Ravert HT, Musachio JL, Mathews WB, Dannals RF, Frost JJ (1996) Imaging of delta opioid receptors in human brain by N11-([11C]methyl)naltrindole and PET. *Synapse* 24:19–28.
49. Marinelli PW, Kiianmaa K, Gianoulakis C (2000) Opioid propeptide mRNA content and receptor density in the brains of AA and ANA rats. *Life Sci* 66:1915–1927.
50. Martinez D, Slifstein M, Broft A, Mawlawi O, Hwang DR, Huang Y, Cooper T, Kegeles L, Zarahn E, Abi-Dargham A, Haber SN, Laruelle M (2003) Imaging human mesolimbic dopamine transmission with positron emission tomography. Part II: amphetamine-induced dopamine release in the functional subdivisions of the striatum. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:285–300.
51. Mazziotta JC, Toga AW, Evans A, Fox P, Lancaster J (1995) A probabilistic atlas of the human brain: theory and rationale for its development. The International Consortium for Brain Mapping (ICBM). *Neuroimage* 2:89–101.
52. McBride WJ, Chernet E, McKinzie DL, Lumeng L, Li TK (1998) Quantitative autoradiography of mu-opioid receptors in the CNS of alcohol-naïve alcohol-preferring P and -nonpreferring NP rats. *Alcohol* 16:317–323.
53. McCaul ME, Wand GS, Eissenberg T, Rohde CA, Cheskin LJ (2000) Naltrexone alters subjective and psychomotor responses to alcohol in heavy drinking subjects. *Neuropsychopharmacology* 22:480–492.
54. McCaul ME, Wand GS, Stauffer R, Lee SM, Rohde CA (2001) Naltrexone dampens ethanol-induced cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Neuropsychopharmacology* 25:537–547.
55. Meltzer CC, Bryan RN, Holcomb HH, Kimball AW, Mayberg HS, Sadzot B, Leal JP, Wagner HN Jr, Frost JJ (1990) Anatomical localization for PET using MR imaging. *J Comput Assist Tomogr* 14:418–426.
56. Munro CA, McCaul ME, Oswald LM, Wong DF, Zhou Y, Brasic J, Kuwabara H, Kumar A, Alexander M, Ye W, Wand GS (2006) Striatal dopamine release and family history of alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1143–1151.
57. Myrick H, Anton RF, Li X, Henderson S, Drobos D, Voronin K, George MS (2004) Differential brain activity in alcoholics and social drinkers to alcohol cues: relationship to craving. *Neuropsychopharmacology* 29:393–402.
58. Oswald LM, Wand GS (2004) Opioids and alcoholism. *Physiol Behav* 81:339–358.
59. Oswald LM, Wong DF, McCaul M, Zhou Y, Kuwabara H, Choi L, Brasic J, Wand GS (2005) Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 30:821–832.
60. Peterson JB, Conrod P, Vassileva J, Gianoulakis C, Pihl RO (2006) Differential effects of naltrexone on cardiac, subjective and behavioural reactions to acute ethanol intoxication. *J Psychiatry Neurosci* 31:386–393.
61. Rice JP, Reich T, Bucholz KK, Neuman RJ, Fishman R, Rochberg N, Hesselbrock VM, Nurnberger JI Jr, Schuckit MA, Begleiter H (1995) Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 19:1018–1023.
62. Roberts AJ, McDonald JS, Heyser CJ, Kieffer BL, Matthes HW, Koob GF, Gold LH (2000) mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* 293:1002–1008.
63. Skinner HA, Allen BA (1982) Alcohol dependence syndrome: measurement and validation. *J Abnorm Psychol* 91:199–209.
64. Sobell LC, Sobell MB (1992) Timeline followback: a technique for assessing self-reported alcohol consumption, in *Measuring Alcohol Consumption: Psychosocial and Biological Methods* (Litten RZ, Allen J eds), pp 41–72. Humana Press, Totowa, NJ. Soini SL, Ovaska T, Honkanen A, Hyytia P, Korpi ER (1998) Brain opioid receptor binding of [3H]CTOP and [3H]naltrindole in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol* 15:227–232.
65. Srisurapanont M, Jarusuraisin N (2005) Naltrexone for the treatment of alcoholism: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:267–280.
66. Sullivan JT, Sykora K, Schneiderman J, Naranjo CA, Sellers EM (1989) Assessment of alcohol withdrawal: the revised clinical institute withdrawal assessment for alcohol scale (CIWA-Ar). *Br J Addict* 84:1353–1357.
67. Titeler M, Lyon RA, Kuhar MJ, Frost JF, Dannals RF, Leonhardt S, Bullock A, Rydelek LT, Price DL, Struble RG (1989) Mu opiate receptors are selectively labelled by [3H]carfentanil in human and rat brain. *Eur J Pharmacol* 167:221–228.
68. Weerts EM, Kim YK, Wand GS, Dannals RF, Lee JS, Frost JJ, McCaul ME (2008) Differences in delta- and mu-opioid receptor blockade measured by positron emission tomography in naltrexone-treated recently abstinent alcohol-dependent subjects. *Neuropsychopharmacology* 33:653–665.
69. Williams TM, Davies SJ, Taylor LG, Daghli MR, Hammers A, Brooks DJ, Nutt DJ, Lingford-Hughes A (2009) Brain opioid receptor binding in early abstinence from alcohol dependence and relationship to craving: an [11C]diprenorphine PET study. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:740–748.
70. Zubieta JK, Dannals RF, Frost JJ (1999) Gender and age influences on human brain mu-opioid receptor binding measured by PET. *Am J Psychiatry* 156:842–848.
71. Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, Meyer CR, Koeppe RA, Stohler CS (2001) Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science* 293:311–315.