فصلنامه اعتیاد پژوهی سوء مصرف مواد، سال پنجم، شماره بیستم، زمستان ۱۳۹۰
Journal of Research on Addiction, Vol. 5, No. 20, Winter 2012

مقاله پژوهشی
Research Article

تزریق اورکسین A به داخل هسته لوکوس سرولئوس در موش‌های صحرایی غیر وابسته به مورفین

حسین عزیزی[۱]، عاطفه هادیان[۲]، سعید سمنانیان[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۱۰

چکیده:

مقدمه: نوروپپتید اورکسین که از هسته‌های هیپوتالاموسی منشأ می‌گیرد در رفتار محرومیت از اپیوئید نقش دارد. هیپوتالاموس فیبرهای فراوان اورکسینرژیک را به هسته لوکوس سرولئوس LC ارسال می‌کند. سندرم محرومیت از نظر زمانی با افزایش فعالیت نورون‌های هسته LC منطبق است. افزایش فعالیت القا شده به‌واسطه محرومیت در این نورون‌ها در محیط in vitro اتفاق نمی‌افتد. بنابراین ممکن است فاکتورهای خارجی سبب تشدید فعالیت این نورون‌ها طی سندرم محرومیت شوند. آیا تزریق اورکسین A به داخل هسته LC قادر است سبب بروز علایم سندرم محرومیت در موش‌های صحرایی شود؟ **روش:** در این پژوهش از موش‌های نر بالغ نژاد ویستار استفاده شده‌است. یک هفته پس از کانول‌گذاری در هسته لوکوس سرولئوس اورکسین A یا حلال آن به داخل هسته LC تزریق می‌شد. سپس علائم سندرم محرومیت به‌مدت ۲۵ دقیقه ارزیابی می‌شد. **نتیجه گیری:** اورکسین A سبب بروز چندین علامت از علائم سندرم محرومیت شد. بنابراین ممکن است اورکسین به‌عنوان یک فاکتور خارجی در هسته LC در ایجاد علائم رفتاری سندرم محرومیت نقش ایفا کند.

کلید واژه‌ها: اورکسین A، سندرم محرومیت از مورفین، لوکوس سرولئوس

۱. نویسنده مسئول: دانشجو فرا دکترا دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس. پست الکترونیک: azizihf@yahoo.com
۲. کارشناس آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. استاد گروه فیزیولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

در بسیاری از مدل‌های وابستگی به دارو، ترغیب مثبت و منفی دو جزء کلیدی هستند. تداوم استفاده از دارو، بخشی به دلیل ترغیب مثبت از آثار پاداش دریافت دارو است و بخشی به خاطر ترغیب منفی از سندرم محرومیت است که با قطع دارو ایجاد می‌شود. مطالعات متعددی دخالت هسته لوکوس سرولئوس[1] در وابستگی به اوپیات‌ها را نشان داده‌اند. این سلول‌ها دارای تراکم بالایی از گیرنده‌های اوپیاتی، بویژه انواع μ و K هستند (تمپل و زوکین[2]، ۱۹۸۷). تجویز موضعی یا سیستمیک اوپیات‌ها به موش‌های صحرایی سبب مهار ثبت تک واحدی نورون‌های هسته LC می‌شود (آقاجانیان، ۱۹۸۷). افزایش بارزی در شلیک نورون‌های هسته LC در موش‌های صحرایی وابسته به اوپیات‌ها طی محرومیت القایی با نالوکسان دیده می‌شود (آقاجانیان، ۱۹۹۰؛ راسموسن، بینتر، کریستال، آقاجانیان و نستلر[3] ۱۹۹۰؛ آکوکا و آستون-جونز[4]، ۱۹۹۱). افزایش فعالیت نورون‌های هسته LC به دلایل متعددی نقش مهمی در بروز علائم محرومیت ایفا می‌کند؛ اول، افزایش شلیک نورونی هسته LC از نظر زمانی با رفتارهای محرومیت مطابقت دارد (راسموسن و همکاران، ۱۹۹۰). دوم، تزریق سیستمیک یا موضعی کلونیدین (آگونیست گیرنده α_2 آدرنرژیک) به داخل هسته لوکوس سرولئوس سبب سرکوب شلیک افزایش یافته نورون‌های این هسته (ساکوری و همکاران، ۱۹۹۸) و بسیاری از علائم رفتاری ناشی از محرومیت اوپیاتی می‌شود (تایلور و همکاران، ۱۹۹۸). سوم، تخریب هسته LC علائم فیزیکی محرومیت از اوپیات را کاهش می‌دهد (مالدونادو و کوب[5]، ۱۹۹۳) و چهارم، هسته LC حساس‌ترین محل برای القای علائم محرومیت توسط تزریق موضعی آنتاگونیست اوپیاتی می‌باشد (مالدونادو، استینوس، گولد و کوب، ۱۹۹۲). عوامل خارجی نقش مهمی در افزایش فعالیت ناشی از محرومیت اوپیاتی در نورون‌های هسته LC ایفا

1. Locus Coeruleus
2. Tempel & Zukin
3. Rasmussen, Beinter, Krystal, Aghajanian & Nestler
4. Akaoka & Aston
5. Maldonadoe, Stinus, Gold & Koob

می‌کنند (راسموسن، ۱۹۹۵). تخریب هسته PGi (شکمی جانبی بصل‌النخاع) که منبع اصلی آوران‌های گلوتاماترژیک به هسته LC است، سبب کاهش فعالیت افزایش یافته ناشی از محرومیت در این نورون‌ها می‌شود (راسموسن و آقاجانیان، ۱۹۸۹). همچنین میزان گلوتامات خارج سلولی در طی محرومیت القایی با نالوکسان، در این هسته افزایش می‌یابد (آقاجانیان، کوگان[1] و مقدم ۱۹۹۴؛ زانگ، فنگ، روکهود و هو[2] ۱۹۹۴) و این افزایش رهایش گلوتامات حدود ۳۰ دقیقه ماندگار است (توکویاما، زو، اوه، هو و یاماموتو[3] ۲۰۰۱). تزریق نالوکسان یا گلوتامات به داخل هسته LC در موش‌های وابسته به مورفین سبب ایجاد علائم فیزیکی محرومیت می‌شود (توکویاما و همکاران، ۲۰۰۱).

پپتید اورکسین یا هیپوکرتین که در دهه اخیر کشف شده است، در وابستگی به مواد مخدر نقش مهمی بازی می‌کند (کار و کالیواس[4]، ۲۰۰۶). پپتیدهای اورکسینی شامل اورکسین A و اورکسین B که در ابتدا نقش تحریکی آن‌ها بر غذا خوردن معرفی شده بود (ساکوری و همکاران، ۱۹۹۸) از طریق دو گیرنده متصل به پروتئین G عمل می‌کنند، گیرنده نوع ۱ (OXR_1) و گیرنده نوع ۲ اورکسین (OXR_2) (ساکوری و همکاران، ۱۹۹۸؛ مارکوس و همکاران، ۲۰۰۱). نورون‌های حاوی اورکسین در ناحیه هیپوتالاموس جانبی (LH) محدود هستند (ساکوری و همکاران، ۱۹۹۸؛ پیرون[5] و همکاران، ۱۹۹۸). علی‌رغم تعداد کم این نورون‌ها، توزیع وسیع استطاله‌های آنها در مغز نمایانگر اهمیت و عملکرد گسترده آن‌ها است (پیرون و همکاران، ۱۹۹۸). هسته لوکوس‌سرولئوس حاوی متراکم‌ترین استطاله‌های اورکسینرژیک می‌باشد (پیرون و همکاران، ۱۹۹۸). شواهد متعددی نشان می‌دهند که اورکسین به‌عنوان بازیکنی مهم در وابستگی فیزیکی به مورفین و بروز علائم محرومیت به این شرح نقش ایفا می‌کند؛ الف: کاهش چشمگیر علائم فیزیکی سندرم

سال پنجم، شماره ۲۰، زمستان ۱۳۹۰
Vol. 5, No. 20, Winter 2012

1. Kogan
2. Zhang, Feng, Rockhold & Ho
3. Tokuyama, Zhu, Oh & Yamamoto
4. Carr & Kalivas
5. Peyron

محرومیت در موش‌های فاقد اورکسین (راسموسن، ۱۹۹۵). ب: کاهش بارز علائم فیزیکی محرومیت از مورفین با تزریق داخل صفاقی آنتاگونیست گیرنده نوع ۱ اورکسین قبل از تزریق نالوکسان (شارف، سارهان و دیلون[1]، ۲۰۰۸). ج: افزایش بیان cFos در نورون‌های اورکسینرژیک با القاء سندرم محرومیت از مورفین توسط نالوکسان (شارف و همکاران، ۲۰۰۸).

سندرم محرومیت از مورفین با افزایش فعالیت نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس مرتبط است. این افزایش فعالیت با محرومیت از مورفین در شرایط *in vitro* اتفاق نمی‌افتد. از آنجا که فعالیت نورون‌های اورکسینرژیک هنگام القاء سندرم محرومیت افزایش می‌یابد این سؤال مطرح می‌شود که آیا این افزایش فعالیت فیبرهای اورکسینرژیک به هسته LC می‌تواند سبب تشدید فعالیت نورون‌های این هسته و سپس بروز رفتارهای محرومیت در موش‌های صحرایی غیر وابسته به مورفین شود؟ به عبارت دیگر آیا افزایش فعالیت در نورون‌های هسته LC در حیوانات غیر وابسته به مورفین نیز می‌تواند علائم سندرم محرومیت را شبیه‌سازی کند؟ برای پاسخ به این پرسش نوروپپتید اورکسین A به هسته LC حیوانات غیر وابسته به مورفین تزریق شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش موش های صحرائی نر بالغ نژاد ویستار (۳۰۰-۲۵۰ گرمی) تهیه شده از مؤسسه رازی کرج مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات در شرایط ۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگه‌داری شدند و کار با حیوانات بر اساس مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

برای تزریق داروها، ابتدا کانول‌گذاری بر اساس اطلس پاکسینوس انجام شد. حیوان با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (100 mg/kg) و زایلوزین (10 mg/kg) بیهوش و موهای سر حیوان تراشیده و در دستگاه استریوتاکسی (Narishige، مدل SR-6N) قرار

سال پنجم، شماره ۲۰، زمستان ۱۳۹۰
Vol. 5, No. 20, Winter 2012

1. Sharf, Sarhan & Dileone

می‌گرفت. پوست ناحیه سر در خط وسط بعد از ثابت کردن سر حیوان با تیغ جراحی به حداقل میزان برش داده می‌شد و براساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس ناحیه مربوط به هسته LC در سطح جمجمه مشخص (۹/۸- میلی‌متر از برگما و ۱/۳ میلی‌متر از خط وسط) می‌شد. بعد از علامت‌گذاری ناحیه مذکور، با استفاده از مته‌های دندانپزشکی در محل مشخص شده منفذی به اندازه قطر کانول راهنما، ایجاد شده و کانول راهنما که از سر سوزن نمره ۲۳ دندانپزشکی ساخته شده بود، یک میلی‌متر بالاتر از عمق ذکر شده در اطلس برای هسته LC (۷/۲ میلی‌متر شکمی نسبت به سطح جمجمه) درون مغز مستقر می‌گردید و به‌وسیله سیمان دندانپزشکی روی جمجمه ثابت می‌گردید. منفذ کانول راهنما در بیرون جمجمه توسط درپوشی از سر سوزن نمره ۳۰ دندانپزشکی که طول آن برابر طول کانول راهنما بود، مسدود می‌گردید.

اورکسین A (100 μM, 200 nl) و یا حلال اورکسین A (200 nl) پس از طی یک هفته دوره بهبودی به داخل هسته LC تزریق می‌شد. علایم فیزیکی سندرم محرومیت هر یک از موش‌ها در گروه‌های مورد مطالعه بعد از انجام تیمارها، در یک دوره زمانی ۲۵ دقیقه‌ای در یک استوانه شفاف از جنس پلکسی‌گلاس با ابعاد ۳۰ سانتی‌متر قطر و ۵۰ سانتی‌متر ارتفاع و بستری از براده‌های چوب شمارش می‌شدند. حیوان به مدت یک ساعت قبل از شروع ثبت علائم رفتاری، به منظور عادت کردن به شرایط محیط، در محفظه آزمایش قرار می‌گرفت. علائم مورد بررسی شامل جویدن[1]، خاراندن[2]، فین کردن[3]، روی دو پا ایستادن[4]، لرزش سر[5] و سگ‌لرزه[6] بود.

اورکسین A با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در ACSF حل می‌شد. تزریق داخل هسته‌ای LC به حیوان هوشیار و در حال حرکت در قفس، انجام می‌شد. تزریق توسط یک سر سوزن

1. chewing
2. scratching
3. sniffing
4. rearing
5. head tremor
6. wet-dog shake

سال پنجم، شماره ۲۰، زمستان ۱۳۹۰
Vol. 5, No. 20, Winter 2012

نمره ۳۰ که یک میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما بوده و متصل به یک لوله نازک پلی‌اتیلن (PE-20) بود انجام می‌گردید. انتهای دیگر لوله پلی‌اتیلن به سرنگ هامیلتون ۱ میکرولیتری وصل بود. تزریق‌ها به داخل هسته LC با مقدار ۲۰۰ نانولیتر در مدت زمان ۶۰ ثانیه انجام می‌گرفت. برای اطمینان از حجم تزریق شده، حرکت حباب هوایی که حین کشیدن دارو در لوله پلی‌اتیلن (PE-20) ایجاد می‌شد مد نظر قرار می‌گرفت. برای جلوگیری از جریان معکوس داروها به سمت کانول راهنما، کانول تزریق ۶۰ ثانیه بعد از پایان تزریق در محل خود باقی می‌ماند. پس از انجام هر آزمایش، مغز خارج می‌شد و با کمک اطلس پاکسینوس درستی محل تزریق بررسی می‌گردید. در صورت تزریق دارو در محدوده هسته LC نتایج حاصل از آن حیوان مورد ارزیابی واقع می‌شد.

گروه‌های مورد مطالعه شامل:

گروه ۱: اورکسین A (100 μM, 200 nl) به درون هسته LC موش‌های غیر وابسته به مورفین تزریق می‌شد (n=7).

گروه ۲: حلال اورکسین A (200 nl) به درون هسته LC موش‌های غیر وابسته به مورفین تزریق می‌شد (n=7).

تجزیه و تحلیل داده‌ها برای وجود یا عدم وجود یک علامت توسط آزمون Chi-square انجام شد. آزمون آماری Mann-Whitney U test برای مقایسه دو گروه استفاده گردید. ملاک معنی‌دار بودن اختلاف، $P<0.05$ بین گروه‌های آزمایش بود.

یافته‌ها

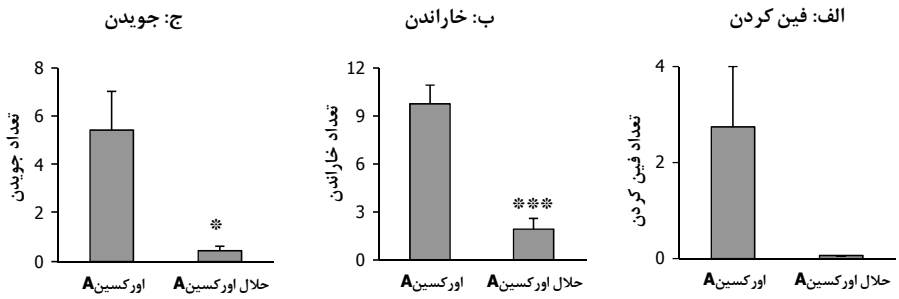
مطالعه حاضر نشان‌داد که تزریق داخل هسته‌ای اورکسین A در حیوانات غیر وابسته به مورفین سبب بروز رفتارهای جویدن، خاراندن، فین کردن، روی دو پا ایستادن، لرزش سر و سگ‌لرزه می‌شود. در گروه حلال اورکسین A علایم سندرم محرومیت از مورفین مشابه گروه قبل مشاهده نشد.

جدول ۱: القاء علائم سندرم محرومیت در موش‌های غیر وابسته به مورفین با تزریق اورکسین A به هسته LC

علائم محرومیت	اورکسین A	حلال اورکسین A
جویدن	۶/۷*	۲/۷
خاراندن	۷/۷*	۳/۷
فین کردن	۶/۷	۳/۷
روی دو پا ایستادن	۵/۷**	۰/۷
لرزش سر	۵/۷**	۰/۷
سگ لرزه	۵/۷**	۰/۷

تزریق داخل هسته‌ای اورکسین A (100 µM, 200 nl) و یا حلال اورکسین A در موش‌های صحرایی غیر وابسته به مورفین سبب القاء علائم سندرم محرومیت شد. مخرج کسرها تعداد کل حیوانات در هر گروه و صورت تعداد حیوانات پاسخگو را نشان می‌دهند (Chi-square test, *P<0.05, **P<0.01 n=7).

بروز علامت فین کردن در این گروه از نظر آماری معنی‌دار نیست (P>0.05). شکل ۱ و ۲ نیز میزان بروز این علائم را در حیوانات مورد مطالعه نمایش می‌دهند.



شکل ۱: القاء علائم فین کردن (الف)، خاراندن (ب) و جویدن (ج) به‌دنبال تزریق اورکسین A به داخل هسته LC در موش‌های غیر وابسته به مورفین

تزریق اورکسین A (100 µM, 200 nl) و حلال اورکسین A (200 nl) به داخل هسته LC انجام گرفت. گروه‌های تزریق داخل هسته‌ای اورکسین A (OXA) و حلال اورکسین A (OXA Vehicle) با هم مقایسه شدند. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده‌اند (*P<0.05, ***P<0.001, n=7).

شکل ۲: القاء علائم سگ‌لرزه (الف)، لرزش سر (ب) و روی دو پا ایستادن با تزریق اورکسین A به داخل هسته LC در موش‌های غیر وابسته به مورفین

تزریق اورکسین A (100 µM, 200 nl) و حلال اورکسین A (200 nl) به داخل هسته LC انجام گرفت. گروه‌های تزریق داخل هسته‌ای اورکسین A (OXA) و حلال اورکسین A (OXA Vehicle) با هم مقایسه شدند. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده‌اند (*P<0.05, n=7).

بحث و نتیجه گیری

میزان قابل توجهی از گیرنده‌های نوع ۱ اورکسین در هسته LC بیان می‌شود (تریودی، یو، مک نیل، واندرپلوگ و گان[1]، ۱۹۹۸). از آنجا که میل اتصالی اورکسین A برای این گیرنده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از اورکسین B است؛ به همین دلیل برای مطالعه اثر اورکسین در هسته LC از اورکسین A استفاده شد. غلظت اورکسین A بر اساس مطالعاتی که این دارو را به‌صورت تزریق به داخل هسته LC استفاده کرده بودند انتخاب شد (کیاشنکو، میلیکوسکی، لای و سیگل[2]، ۲۰۰۱؛ عزیزی، میر نجفی زاده، روحام پور و سمنانیان، ۲۰۱۰).

یافته‌های این قسمت از مطالعه رفتاری ما نشان داد که با تزریق اورکسین A به داخل هسته LC می‌توان علائم رفتاری محرومیت از مورفین را به‌وجود آورد. در حیوانات غیر وابسته به مورفین تزریق داخل هسته‌ای اورکسین A سبب بروز رفتارهای جویدن، خاراندن، فین کردن، روی دو پا ایستادن، لرزش سر و سگ‌لرزه شد. چون تزریق حلال اورکسین A به داخل هسته LC سبب بروز چنین علائمی نشد، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً اثرات مشاهده شده به‌دلیل اثر اورکسین A بود و ناشی از دست‌کاری هسته LC نبوده‌است.

یافته‌های ما برای اولین بار است که گزارش می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که تزریق اورکسین A به هسته LC در حیوانات غیر وابسته به مورفین، سبب بروز رفتارهای سندرم محرومیت می‌شود، این دستاورد ممکن است بتواند در مسیر شناخت دقیق نقش هسته LC در وابستگی به مورفین کمک بزرگی نماید. مطالعات قبلی بیشتر بر روی سیستم گلوتاماترژیک در هسته LC متمرکز بود و در همین زمینه بیش از ده‌ها گزارش علمی در مجله‌های معتبر به چاپ رسیده است. افزایش بارزی در شلیک نورونی هسته LC در هنگام

سال پنجم، شماره ۲۰، زمستان ۱۳۹۰
Vol. 5, No. 20, Winter 2012

1. Trivedi, Ya, MacNeil, Ploeg & Guon
2. Kiyashchenko, Mileykovskiy, Lai & Siegel

بروز سندرم محرومیت دیده می‌شود (ردموند و هانگ[1]، ۱۹۸۲؛ تریودی و همکاران، ۱۹۹۸) که از نظر زمانی، افزایش شلیک نورونی آن با رفتارهای محرومیت مطابقت دارند (تریودی و همکاران، ۱۹۹۸). هسته LC حاوی متراکم‌ترین فیبرهای اورکسینرژیک در بسیاری از گونه‌ها به‌ویژه موش صحرایی است (نیکسون و اسمال[2]، ۲۰۰۷). اورکسین A با اثر مستقیم بر نورون‌های هسته LC سبب افزایش شلیک خودبخودی آن‌ها می‌شود (راسموسن و همکاران، ۱۹۹۰). یافته‌های ما نیز با این داده‌ها مطابقت دارد. مکانیسم‌های بروز علائم رفتاری محرومیت از مورفین در موش‌های صحرایی غیر وابسته به مورفین توسط اورکسین A مشخص نیست. هر چند که تغییر در فعالیت گیرنده‌های گلوتامات ممکن است در این روند نقش ایفا کنند. گلوتامات که گیرنده‌های NMDA را فعال می‌کند، ورودی تحریکی اصلی نورون‌های هسته LC را تشکیل می‌دهد (راسموسن، ۱۹۹۵).

شواهد متعدد دیگری نشان می‌دهند که افزایش رهایش گلوتامات القا کننده بروز سندرم محرومیت اوپیاتی است (آقاجانیان و همکاران، ۱۹۹۴). همچنین اورکسین A سبب تقویت افزایش کلسیم داخل سلولی ناشی از NMDA و نیز افزایش گیرنده‌های NMDA می‌شود (چن و همکاران، ۲۰۰۸). اورکسین A حتی در غلظتی که اثر قابل اندازه‌گیری ایجاد نمی‌کند، سبب افزایش ۴۳٪-۳۰ اثر NMDA می‌شود. همچنین تجویز اورکسین A به برش‌های مغزی حاوی هیپوتالاموس، باعث افزایش رهایش گلوتامات از این برش‌ها می‌شود (والینگ، نات، لالیس و هارلی[3]، ۲۰۰۴). لذا با توجه به داده‌های ما در این بخش شاید بتوان گفت که احتمالاً اورکسین A علاوه بر اثر مستقیم خود بر نورون‌های هسته LC، به‌صورت غیر مستقیم با تقویت اثر گلوتامات در این هسته سبب افزایش شلیک نورون‌های هسته LC می‌شود و احتمالاً این افزایش شلیک است که با بروز رفتارهای سندرم محرومیت ارتباط پیدا می‌کند. شایان ذکر است که برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر در این زمینه نیاز به

سال پنجم، شماره ۲۰، زمستان ۱۳۹۰
Vol. 5, No. 20, Winter 2012

1. Redmond & Huang
2. Nixon & Smale
3. Walling, Nutt, Lalies & Harley

پژوهش‌های بیشتری است. پژوهشگران در مطالعه دیگری که اخیراً انجام شده نشان داده‌اند که تزریق آنتاگونیست انتخابی گیرنده اورکسین نوع یک (SB) به داخل هسته LC قبل از تزریق نالوکسان در موش‌های وابسته به مورفین سبب کاهش علائم رفتاری محرومیت القایی با نالوکسان می‌شود (عزیزی و همکاران، ۲۰۱۰). این یافته با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد و نشان می‌دهد که اورکسین ممکن است یکی از فاکتورهای خارج از هسته LC باشد که در افزایش فعالیت نورون‌های این هسته و ایجاد علائم رفتاری سندرم محرومیت نقش ایفا کند.

سپاسگزاری: این تحقیق با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران انجام شده‌است. نویسندگان این مقاله از دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران که حمایت مالی این طرح را به عهده داشتند سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

Aghajanian, G. K., Kogan, J. H. & Moghaddam, B. (1994). Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, 636, 126-130.

Aghajanian, G. K. (1978). Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. **Nature**, 276, 186-188.

Akaoka, H. & Aston-Jones, G. (1991). Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. **Journal of Neuroscience**, 11, 3830-3839.

Azizi, H., Mirnajafi-Zadeh, J., Rohampour, K. & Semnanian, S. (2010). Antagonism of orexin type 1 receptors in the locus coeruleus attenuates signs of naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. **Neuroscience Letters**, 482, 255-9.

Carr, D. & Kalivas, P. W. (2006). Orexin: a gatekeeper of addiction. **Nature Medicine**, 12, 274-276.

Chen, X. W., Mu, Y., Huang, H. P., Guo, N., Zhang, B., Fan, S.Y., Xiong, J.X., Wang, S.R., Xiong, W., Huang, W., Liu, T., Zheng, L.H., Zhang, C.X., Li, L.H., Yu, Z.P., Hu, Z.A., Zhou, Z. (2008). Hypocretin-1 potentiates NMDA receptor-mediated somatodendritic secretion from locus ceruleus neurons. **Journal of Neuroscience**, 28, 3202-3208.

Fan, G. H., Wang, L. Z., Qiu, H. C., Ma, L. & Pei, G. (1999). Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. **Molecular Pharmacology**, 56, 39-45.

Georgescu, D., Zachariou, V., Barrot, M., Mieda, M., Willie, J. T., Eisch, A. J., Yanagisawa, M., Nestler, E. J., DiLeone, R. J. (2003). Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. **Journal of Neuroscience**, 23, 3106-3111.

Hagan, J., Leslie, R. A., Patel, S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Holmes, S., Benham, C. D., Taylor, S. G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R. P., Ashmeade, T. E., Shah, A. S., Hatcher, J. P., Hatcher, P. D., Jones, D. N., Smith, M. I., Piper, D. C., Hunter, A. J., Porter, R. A., Upton, N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. **PNAS**, 96, 10911-10916.

Kiyashchenko, L. I., Mileykovskiy, B. Y., Lai, Y., Siegel, J. M. (2001). Increased and decreased muscle tone with orexin (hypocretin) microinjections in the locus coeruleus and pontine inhibitory area. **Journal of Neurophysiology**, 85, 2008-16.

Maldonado, R., Koob, G. F. (1993). Destruction of the locus coeruleus decreases physical signs of opiate withdrawal. **Brain Research**, 605, 128-138.

Maldonado, R., Stinus, L., Gold, L. H., Koob, G. F. (1992). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 26, 669-677

Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M., Elmquist, J. K. (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, 6, 425-435.

Nixon, J. P. & Smale, L. (2007). A comparative analysis of the distribution of immunoreactive orexin A and B in the brains of nocturnal and diurnal rodents. **Behavioral and Brain Functions**, 3, 28.

Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., Kilduff T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **Journal of Neuroscience**, 18, 9996-10015.

Rasmussen, K. & Aghajanian, G. K. (1989). Withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons in opiate-dependent rats: attenuation by lesions of the nucleus paragigantocellularis. **Brain Research**, 505, 346-350.

Rasmussen, K., Beitner-Johnson, D. B., Krystal, J. H., Aghajanian, J. K., Nestler, E. J. (1990). Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. **Journal of Neuroscience**, 10, 2308-2317.

Rasmussen, K. (1995). The role of the locus coeruleus and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. **Neuropsychopharmacology**, 13, 295-300.

Redmond Jr, D. E., Huang, Y. H. (1982). The primate locus coeruleus and effects of clonidine on opiate withdrawal. **Journal of Clinical Psychiatry**, 43, 25-29.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii. M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, J.P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D.J., Yanagisawa, M.

(1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, 92, 573-585.

Sharf, R., Sarhan, M. & DiLeone, R. J. (2008). Orexin mediates the expression of precipitated morphine withdrawal and concurrent activation of the nucleus accumbens shell. **Biological Psychiatry**, 64, 175-183.

Taylor, J.R., Elsworth, J. D., Garcia, E. J., Grant, S. J., Roth, R. H., Redmond Jr, D.E. (1998). Clonidine infusions into the locus coeruleus attenuate behavioral and neurochemical changes associated with naloxone-precipitated withdrawal. **Psychopharmacology**, 96, 121-134.

Taylor, J. R., Punch, L. J., Elsworth, J. D. (1998). A comparison of the effects of clonidine and CNQX infusion into the locus coeruleus and the amygdala on naloxone-precipitated opiate withdrawal in the rat. **Psychopharmacology**, 138, 133-142.

Tempel, A., Zukin, R. S. (1987). Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 84, 4308-4312.

Tokuyama, S., Zhu H, Oh, S., Ho, IK & Yamamoto, T. (2001). Further evidence for a role of NMDA receptors in the locus coeruleus in the expression of withdrawal syndrome from opioids. **Neurochemistry International**, 39, 103-109.

Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H., Guan, X. M. (1998). Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. **FEBS Letters**, 438, 71-75.

Walling, S. G., Nutt, D. J., Lalies, M. D., Harley, C. W. (2004). Orexin-A infusion in the locus ceruleus triggers norepinephrine (NE) release and NE-induced long-term potentiation in the dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, 24, 7421-7426.

Zhang, T., Feng, Y., Rockhold, R. W., Ho, I. K. (1994). Naloxone-precipitated morphine withdrawal increases pontine glutamate levels in the rat. **Life Science**, 55, PL25-PL31.