

26/08/04

Πτυχιακή εργασία με θέμα:

*ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
ΤΗΣ ΓΑΛΑΝΙΝΗΣ ΑΠΟ ΟΠΙΟΕΙΔΗ*

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Αθηνά Αρμενάκη

Επιστημονικά υπεύθυνη: Β. Ζαχαρίου

Ιατρική Κρήτης 2004

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΟΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΑΛΑΝΙΝΗΣ ΣΤΟ ΚΝΣ

Η γαλανίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο που αποτελείται από 29 αμινοξέα με αναλγητικές, ορεξιογόνες και νευρο-ενδοκρινολογικές δράσεις. Βρίσκεται σε εγκεφαλικές περιοχές που διαμεσολαβούν την ενίσχυση, όπως ο επικληνής πυρήνας, η κοιλιακή καλυπτρική περιοχή, καθώς επίσης και ο υπομέλαινας τόπος (V. Zachariou M. Picciotto., 1999). Το πεπτίδιο της γαλανίνης και οι υποδοχείς της γαλανίνης, όπως οι μ και οι δ υποδοχείς των οπιοειδών, βρίσκονται σε πολλές εγκεφαλικές περιοχές που συσχετίζονται με τον εθισμό. Επιπλέον το νευροπεπτίδιο γαλανίνη και οι θέσεις πρόσδεσης της γαλανίνης (Melander et al., 1986a; Skofitsch et al 1986) βρίσκονται σε αφθονία στους νορεπινεφρικούς νευρώνες του υπομέλαινος τόπου (LC), μια περιοχή που εμπλέκεται σημαντικά στην εξάρτηση από τα οπιοειδή και στην έκφραση των σωματικών συμπτωμάτων του συνδρόμου στέρησης.

Τρεις υπότυποι των γαλανινεργικών υποδοχέων έχουν κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα ο GalR1, GalR2 και ο GalR3 (Habert – Ortoli et al. 1994; Wang et al., 1997a). Όπως και οι οπιοειδείς υποδοχείς έτσι και οι υποδοχείς της γαλανίνης είναι συζευγμένοι με τις Gi, Gq και Go πρωτείνες και μέσω αυτών ασκούν τη δράση τους. Ο GalR1, και ο GalR2 ενεργοποιούν κάθε φορά διαφορετικούς 2^{ους} αγγελιοφόρους οι οποίοι συνδέονται αρνητικά με το ένζυμο αδενυλική κυκλάση (V. Zachariou et al. 2003).

Ο GalR1 υποδοχέας της γαλανίνης, εκφράζεται κυρίως στο μεσολιμβικό ντοπαμινεργικό σύστημα (περιοχή VTA και Nac), οδός η οποία είναι πολύ σημαντική για τις ενισχυτικές ιδιότητες των οπιοειδών καθώς επίσης και άλλων φαρμάκων με εθιστικές δράσεις. Επίσης στον κοιλιακό ιππόκαμπο, στην οσφρητική οδό, στον υποθάλαμο και στον υπομέλαινα τόπο, ο οποίος θεωρείται ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εξάρτηση και στην έκφραση του συνδρόμου στέρησης (V. Zachariou et al., 2000).

Ο GalR2 υποδοχέας της γαλανίνης ανιχνεύεται κυρίως στον οπίσθιο υποθάλαμο, στην οδοντωτή έλικα, στον ζωνωτό πυρήνα, στον

υπερχιασματικό και τοξοειδή πυρήνα, στους αμυγδαλοειδείς πυρήνες του ΚΝΣ, και στο ΠΝΣ (Kolakowski *et al.*, 1998).

Ο GalR3 εκφράζεται σε αφθονία στην περιφέρεια όπως, στην καρδιά, στον σπλήνα και στους όρχεις αλλά επίσης είναι παρών στον οσφρητικό φλοιό, στην CA1 περιοχή του ιππόκαμπου και στην οδοντωτή έλικα (Kolakowski *et al.* 1998., Wang *et al.* 1997b).

Η γαλανίνη επίσης αναστέλλει την μεσολιμβική ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση, μια δραστηριότητα η οποία είναι κρίσιμη για τις ενισχυτικές ιδιότητες των εθιστικών ουσιών. Επιπλέον, αναστέλλει την δραστηριότητα (πυροδότηση) των νευρώνων στον υπομέλαινα τόπο δια μέσου της διάνοιξης των καναλιών του K⁺, γεγονός το οποίο επηρεάζει την έκφραση του συνδρόμου στέρησης.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η γαλανίνη έχει μια ανασταλτική δράση στην διαβίβαση του πόνου στον νωτιαίο μυελό και μπορεί να ενισχύσει τις αναλγητικές δράσεις της μορφίνης.. Επίσης πολλές μελέτες αποδεικνύουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων της γαλανίνης και των μ-οπιοειδών υποδοχέων στο νωτιαίο μυελό. Ωστόσο λίγα είναι γνωστά για την αλληλεπίδραση μεταξύ των οπιοειδών υποδοχέων και των υποδοχέων της γαλανίνης στο ΚΝΣ (V. Zachariou *et al.*, 1999).

▪ **Οι δράσεις της γαλανίνης στον υπομέλαινα τόπο**

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στους μηχανισμούς που οδηγούν στην ανοχή, στον εθισμό και στην εξάρτηση από οπιοειδή. Αντιθέτως, έχει γίνει λίγη μελέτη για το νευροβιολογικό υπόστρωμα και τους μηχανισμούς των ενδογενών οδών που αντιτίθενται στην εξάρτηση και τον εθισμό. Εν τούτοις, μια τέτοια έρευνα θα προσέφερε σημαντική βοήθεια στην ανάπτυξη φαρμακολογικών μεθόδων παρέμβασης εναντίον της κατάστασης

του εθισμού και του συνδρόμου στέρησης από οπιοειδή (V. Zachariou *et al.*, 2003).(4)

Χρησιμοποιώντας φαρμακολογικά και γενετικά μοντέλα οι ερευνητές έχουν αποδείξει ότι το γαλανινεργικό σύστημα τροποποιεί τα στερητικά συμπτώματα μετά από χορήγηση μορφίνης στον υπομέλαινα τόπο. Μια αλληλεπίδραση μεταξύ της γαλανίνης και των μ-οπιοειδών υποδοχέων στον LC αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Sevcik *et al.* 1993.

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο της αυτοραδιογραφίας V. Zachariou PhD, and M R. Picciotto PhD απέδειξαν ότι το σύνδρομο στέρησης καταλήγει σε ένα up regulation των θέσεων πρόσδεσης της γαλανίνης στον υπομέλαινα τόπο. Επιπλέον το mRNA του υποδοχέα GalR1 είναι up-regulated στον LC τρεις ώρες μετά την πρόκληση του στερητικού συνδρόμου είτε γιατί υπάρχει αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι το σύνδρομο στέρησης ρυθμίζει τα επίπεδα του mRNA του GalR1 υποδοχέα, και έτσι οι αλλαγές που παρατηρούνται στην πρόσδεση της γαλανίνης σε αυτήν την εγκεφαλική περιοχή ίσως να αντανakλά τις αλλαγές που συμβαίνουν στην γονιδιακή έκφραση του υποδοχέα της γαλανίνης.

Επιπλέον το stress αυξάνει τα επίπεδα του mRNA του πεπτιδίου της γαλανίνης στον υπομέλαινα τόπο (V. Zachariou *et al.* 2003) και ο GalR1 υποδοχέας είναι up-regulated κατά τη διάρκεια του στερητικού συνδρόμου. Έτσι, η γαλανίνη ίσως να επηρεάζει το σύνδρομο στέρησης δια μέσου της επίδρασης που συμβαίνει στο νοραδρενεργικό σύστημα.

▪ **Οι δράσεις της γαλανίνης στον ιππόκαμπο**

Η γαλανίνη δρα σαν ένας ανασταλτικός νευροτροποποιητής στα νευρωνικά κυκλώματα που διαμεσολαβούν την μνήμη και τη μάθηση. Έχει βρεθεί ότι η γαλανίνη αναστέλλει με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την απελευθέρωση της

ακετυλοχολίνης στον κοιλιακό ιππόκαμπο (Gilberto Fisone and Tomas Hokfelt., 1989)

Η γαλανίνη και οι υποδοχείς της βρίσκονται σε εγκεφαλικές περιοχές, που ρυθμίζουν τις γνωστικές διεργασίες της μνήμης, όπως είναι ο πρόσθιος εγέφαλος, ο ιππόκαμπος και ο εγκεφαλικός φλοιός. Η γαλανίνη μειώνει την προκαλούμενη απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, όπως το γλουταμινικό, την ακετυλοχολίνη, την νορεπινεφρίνη και την ντοπαμίνη, αναστέλλει την δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης και μειώνει το ποσοστό δραστηριοποίησης (πυροδότησης) των σεροτονινεργικών και νοραδρενεργικών νευρώνων στους πυρήνες της ραφής και στον υπομέλαινα τόπο αντίστοιχα. Σε τομές από την περιοχή του ιπποκάμπου η γαλανίνη μειώνει την μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP) και προκαλούνται χολινεργικά μετασυναπτικά δυναμικά. Στους αρουραίους, η χορήγηση γαλανίνης μέσα στις πλάγιες κοιλίες στον ιππόκαμπο, και στο μέσο διάφραγμα καταστρέφει την ικανότητα των ζώων για μνημονικά έργα (Robert A. Steiner and Jacqueline N. Crawley, 2000).

Στην νόσο του Alzheimer (AD), σε αντίθεση με άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα που εκφυλίζονται και παρακμάζουν, η γαλανίνη αποτελεί εξαίρεση. Η έκφραση της γαλανίνης προοδευτικά αυξάνει στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο των ασθενών με AD και οι γαλανινεργικοί νευρώνες με τα τελικά τους κομβία σχηματίζουν ένα πυκνό πλέγμα περιβάλλοντας τα χολινεργικά κυτταρικά σώματα που βρίσκονται στον βασικό πυρήνα του Meynert σε ποσότητα 2πλάσια σε σχέση με του υγιείς. Επιπλέον υψηλές συγκεντρώσεις της γαλανίνης συνεχίζουν να υπάρχουν στους επιζώντες νευρώνες του υπομέλαινα τόπου σε ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer. Η υπερέκφραση της γαλανίνης λοιπόν, ίσως να συνεισφέρει στα γνωστικά ελλείμματα που χαρακτηρίζουν αυτή τη νόσο (Robert A. Steiner and Jacqueline N. Crawley, 2000).

Το νευροπεπτίδιο γαλανίνη συνυπάρχει μαζί με την choline acetyltransferase, το συνθετικό ένζυμο της ακετυλοχολίνης, μέσα σε ένα υποπληθυσμό των

χολινεργικών νευρώνων στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο των αρουραίων. Η χρόνια έγχυση αυξητικών παραγόντων ενδοκοιλιακά παράγει μια διπλάσια ή τριπλάσια αύξηση στην έκφραση του γονιδίου της γαλανίνης σε αυτούς τους νευρώνες. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι, όταν ο νευροτροφικός παράγοντας NGF, και η γαλανίνη δρουν μαζί, τότε διασφαλίζεται η επιβίωση των χολινεργικών νευρώνων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου, στην (septohippocampal) διαγγραματο-ιπποκάμπεια περιοχή (Gillian O'Meara and David Wynick., 2000).

Σε μετάλλαξη του γονιδίου της γαλανίνης (στην ίδια μελέτη) σε διαγονιδιακά ποντίκια μειώνεται ο αριθμός των χολινεργικών νευρώνων κατά 1/3 στο κατακόρυφο άκρο της διαγώνιας δεσμίδας (vertical limb diagonal band) του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου. Το έλλειμμα αυτό συσχετίστηκε με μια 2πλάσια αύξηση στον αριθμό των αποπτοτικών κυττάρων στην 7^η μεταγεννητική μέρα. Τα μη αναμενόμενα αυτά αποτελέσματα καθορίζουν πλέον ότι η γαλανίνη παίζει και ένα τροφικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας των χολινεργικών νευρώνων στην διαγγραματο-ιπποκάμπεια περιοχή (Gillian O'Meara and David Wynick., 2000).

ΟΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΚΝΣ

▪ Οι δράσεις των οπιοειδών στον υπομέλαινα τόπο

Τα οπιοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί από τα αρχαία χρόνια για τις αναλγητικές και ενισχυτικές τους ιδιότητες και δράσεις. Εν τούτοις η επαναλαμβανόμενη χορήγηση οπιοειδών οδηγεί στο φαινόμενο της εξάρτησης και του εθισμού, μια χρόνια υποτροπιάζουσα διαταραχή με σύνθετες ψυχολογικές και κοινωνικές συνέπειες που χαρακτηρίζεται από μια καταναγκαστική αναζήτηση και χρήση του φαρμάκου (Taco J. De Vries and T.S. Shippenberg).(1) Η έκθεση στα οπιοειδή προκαλεί προσαρμογές στους νευρώνες του εγκεφάλου μεταβάλλοντας τη δραστηριότητα τους, οι οποίοι στη συνέχεια μεταβάλλουν την δραστηριότητα των νευρωνικών κυκλωμάτων μέσα στα οποία οι νευρώνες αυτοί λειτουργούν. Αυτό τελικά οδηγεί στις σύνθετες συμπεριφορές που προαναφέρθηκαν για παράδειγμα, εξάρτηση, ανοχή ευαισθητοποίηση και στη σφοδρή επιθυμία αναζήτησης της ουσίας (E.J.Nestler and G. K.Aghajanian., 1997) . (2)

Τα οπιοειδή ασκούν τη δράση τους με την πρόσδεση τους σε τρεις τύπους οπιοειδών υποδοχέων (μ, δ, και κ) μιμούμενα τη δράση των ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων, της ενδορφίνης, της ενδομορφίνης, της εγκεφαλίνης και της δινορφίνης. Ο μ-οπιοειδής υποδοχέας (MOR) εμπλέκεται στις ενισχυτικές δράσεις της μορφίνης και της ηρωίνης. Το μπλοκάρισμα των MORς, αλλά όχι των άλλων οπιοειδών υποδοχέων μειώνει την αυτοχορήγηση οπιοειδών και η απαλοιφή του MORς μειώνει την εξαρτημένη προτίμηση θέσης που σχετίζεται με τη χορήγηση οπιοειδών (Negus *et al.*,1993; Mattles *et al.*, 1996). (3)

Ο υπομέλαινας τόπος (LC), ο μεγαλύτερος νοραδρενεργικός πυρήνας του εγκεφάλου, βρίσκεται κάτω από την 4^η κοιλία στο άνω μέρος της γέφυρας. Αυτή η μικρή συλλογή από νευρώνες προμηθεύει, κατ ουσίαν όλο τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, με μια εκτενή νοραδρενεργική εννεύρωση (Nestler *et al.*,1993). Ο υπομέλαινας τόπος εμφανίζεται να ρυθμίζει την κατάσταση της διέγερσης στα ζώα (π.χ, την προσοχή, την εγρήγορση, και τον

αυτόνομο τόνο) και ανταποκρίνεται σε καταστάσεις που σχετίζονται με το stress. Ο σημαντικός ρόλος του υπομέλαινος τόπου στην φυσική εξάρτηση από οπιοειδή και στο στερεητικό σύνδρομο έχει εδραιωθεί από μια πληθώρα φαρμακολογικών και συμπεριφορικών μελετών. Πρόσφατες, όμως, μελέτες έχουν αρχίσει να αποκαλύπτουν τους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ενδοκυττάρου cAMP pathway, οδός η οποία ευθύνεται για τα μακροχρόνια αποτελέσματα των οπιοειδών πάνω στους νευρώνες του υπομέλαινα τόπου.

✓ Άμεσες δράσεις από οξεία χορήγηση των οπιοειδών στον LC

Η οξεία χορήγηση των οπιοειδών αναστέλλει άμεσα τους νευρώνες στον LC με την δραστηριοποίηση ενός εσωτερικού καναλιού K⁺, δια μέσου σύζευξης του με τις G_i ή G_o πρωτεΐνες και με την ακολουθούμενη αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης. Τα μειωμένα επίπεδα του cAMP μειώνουν την δραστηριοποίηση της cAMP –εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης και την φωσφορυλίωση του καναλιού ή της αντλίας καθώς επίσης και πολλών άλλων πρωτεϊνών (Eric J. Nestler and George K. Aghajanian.,1997)

Επιπλέον μειώνεται η σύνθεση των κατεχολαμινών δια μέσου της μείωσης της φωσφορυλίωσης της τυροσινικής υδροξυλάσης (TH) σαν απάντηση στην μειωμένη δραστηριοποίηση των νευρώνων του LC. Έτσι ξεκινά μια μακροχρόνια επίδραση στη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης δια μέσου ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων μέσω μειωμένης πυρηνικής μετατόπισης, π.χ μειωμένη φωσφορυλίωση του CREB, η οποία σχετίζεται με μειωμένη πυρηνική μετατόπιση της καταλυτικής υπομονάδας της πρωτεϊνικής κινάσης. Οι μεταγραφικοί παράγοντες δεσμεύονται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA μέσα στον υποκινητή (promoter) του συγκεκριμένου γονιδίου προκειμένου συνεργατικά πλέον να ρυθμίσουν την μεταγραφή του γονιδίου. Οι μελέτες για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα οπιοειδή έχουν επικεντρωθεί στις οικογένειες των μεταγραφικών παραγόντων, όπως το

cAMP response element binding protein (CREB) και άλλες πρωτεΐνες καθώς επίσης στα πρωτο-ογκογονίδια c-fos και c-jun που ανήκουν στην οικογένεια των IEGs (immediate early genes).

Αντίθετα η αναστολή του καναλιού του Na⁺ εμφανίζεται να είναι έμμεση. Το ρεύμα του καναλιού του Na⁺ φυσιολογικά δραστηριοποιείται από την cAMP – εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, είτε δια μέσου άμεσης φωσφορυλίωσης του καναλιού Na⁺ ή μέσω φωσφορυλίωσης κάποιων συσχετιζόμενων πρωτεϊνών. Η αναστολή του καναλιού του Na⁺ από τα οπιοειδή, εμφανίζεται να οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα του cAMP και διαμεσολαβεί δια μέσου της δραστηριοποίησης της cAMP–εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης. Βιοχημικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι τα οπιοειδή αναστέλλουν την δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης στον υπομέλαινα τόπο, καθώς παρατηρείται και σε πολλές άλλες περιοχές, καθώς επίσης αναστέλλεται και η cAMP –εξαρτώμενη πρωτεϊνική φωσφορυλίωση.

✓ Χρόνιες δράσεις από την χορήγηση οπιοειδών στον LC

Στη χρόνια χορήγηση οπιοειδών οι νευρώνες του υπομέλαινα τόπου αναπτύσσουν ανοχή στις αρχικές οξείες ανασταλτικές δράσεις καθώς η νευρωνική δραστηριότητα επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Η νευρωνική δραστηριοποίηση εξαρτάται από την συνεχή παρουσία των οπιοειδών καθώς επανακαθορίζεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Η χορήγηση χρόνιας μορφίνης αυξάνει τα επίπεδα των Giα και Goα πρωτεϊνών, της αδενυλικής κυκλάσης, της cAMP –εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης και πολλών άλλων φωσφατοπρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένης της TH (τυροσινικής υδροξυλάσης). Αυτές οι αλλαγές συνεισφέρουν στον φαινότυπο της κατάστασης της εξάρτησης. Για παράδειγμα η αυξημένη δραστηριοποίηση των νευρώνων του LC επιτυγχάνεται δια μέσου της αυξημένης δραστηριότητας στην οδό του cAMP και του καναλιού του Na⁺, αλλαγές που συνεισφέρουν στην ανοχή, στην εξάρτηση και στο στερητικό σύνδρομο που

προέρχεται από την αλλαγή της κατάστασης αυτών των νευρώνων. Άλλο ένα παράδειγμα αποτελεί η ικανότητα αυτών των νευρώνων να συνθέτουν κατεχολαμίνες δια μέσου της αύξησης της TH (το ένζυμο που ευθύνεται για την βιοσύνθεση των κατεχολαμινών).

Αυτή η μεταβολή της φαινοτυπικής κατάστασης ίσως εν μέρει να σημαίνει τις αλλαγές που συμβαίνουν στο επίπεδο των μεταγραφικών παραγόντων.

Το up-regulation της αδενυλικής κυκλάσης και της cAMP –εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης μπορεί να θεωρηθεί σαν μια αντισταθμιστική ομοιοστατική απάντηση των νευρώνων του υπομέλανος τύπου στην σταθερή αναστολή των κυττάρων από τα οπιοειδή. Σύμφωνα με την θεωρία αυτή το up-regulation που παρατηρείται στην οδό του cAMP αυξάνει την δραστηριότητα των νευρώνων του υπομέλαινα τύπου, με την ταυτόχρονη δραστηριοποίηση των καναλιών του Na⁺, μηχανισμός που εν μέρει τουλάχιστον ευθύνεται για την αντοχή, την εξάρτηση και την εμφάνιση του συνδρόμου στέρησης.

▪ **Οι δράσεις των οπιοειδών στον ιππόκαμπο**

Ο ιππόκαμπος είναι μια εγκεφαλική δομή του πρόσθιου εγκεφάλου του μεταιχμιακού συστήματος, που βρίσκεται προς τη μέση της αριστερής και δεξιάς πλευράς των ημισφαιρίων, στο κάτω τοίχωμα του κροταφικού κέρατος της πλάγιας κοιλίας, μια περιοχή που καλείται μέσος κροταφικός λοβός.

Είναι γνωστό ότι η παρατεταμένη έκθεση σε μορφίνη ευθύνεται για μια διαδεδομένη επανοργάνωση των νευρώνων των εγκεφαλικών περιοχών που δια μεσολαβούν της γνωστικές λειτουργίες. Η χορήγηση οπιοειδών φαρμάκων, όπως η μορφίνη, προκαλεί μορφολογικές αλλαγές στη δομή των νευρώνων αλλά και στις δενδριτικές τους αποφύσεις. Όταν χορηγηθεί στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης μειώνεται η πολυπλοκότητα των δενδριτικών κυττάρων στο νεοφλοιό και στον ιππόκαμπο (Ricalde and Hammer, 1990). Τα οπιοειδή επίσης επιδρούν στην νευρωνική μορφολογία ακόμα και όταν

χορηγούνται στην ενήλικη ζωή. Όταν ενήλικα ποντίκια αυτοχορηγούν μορφίνη μειώνεται σημαντικά η πυκνότητα στις δενδριτικές άκανθες στα CA1 πυραμιδικά κύτταρα και στα κοκοειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας στην περιοχή του ιππόκαμπου (Terry E. Robinson and Bryan Kolb, 2002).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Ο σκοπός της έρευνας αυτής είναι να μελετήσουμε εάν η έκθεση στα οπιοειδή ρυθμίζει το γονίδιο της γαλανίνης. Έτσι προκαλέσαμε εξάρτηση με μορφίνη και έπειτα σύνδρομο στέρησης με την χορήγηση του ανταγωνιστή οπιοειδών ναλοξόνη, σε Gal-LacZ mice. Τα διαγονιδιακά αυτά ποντίκια έφεραν μια δομή στην οποία το γονίδιο αναφοράς LacZ (που κωδικοποιεί την β-gal) ήταν κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της γαλανίνης (promoter) Gal. Αυτό το μοντέλο χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως σε μια ποικιλία φυσιολογικών και φαρμακολογικών μελετών που σχετίζονται με την συναισθηματική μάθηση και την ανάπτυξη (Shaw-Lutchman et al Nestler., 2002). Σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήσαμε Gal-LacZ mice για να χαρτογραφήσουμε τις εγκεφαλικές περιοχές του υπομέλαινος τόπου, και του ιππόκαμπου για να μελετήσουμε τον τρόπο που η γαλανίνη ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια τη διάρκεια της εξάρτησης και στο σύνδρομο στέρησης, και να καθορίσουμε τα νευρικά κυκλώματα μέσα στα οποία συμβαίνουν αυτές οι αλλαγές.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

A. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Transgenic mouse line:

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα Gal-LacZ mice. Αυτά τα διαγονιδιακά ζώα έφεραν μια δομή μέσα στην οποία το reporter gene, LacZ (που κωδικοποιεί την β-gal) ήταν κάτω από τον έλεγχο του promoter Gal. Τα ζώα για όλα τα πειράματα ήταν αρσενικά αλληλουχία, μεταξύ των ηλικιών 8-12 εβδομάδων. Για κάθε πειραματικό ζώο, ένα ζώο από το ίδιο γένος, χρησιμοποιήθηκε ως control. Κάθε ζώο ζύγιζε περίπου 25 γρ

Drug administration: (χορήγηση φαρμάκων)

Τα ζώα στο σύνολο τους ήταν 24, τα οποία χωρίστηκαν σε 4 ομάδες:

Saline/ saline = 7

Saline/naloxone =5

Morphine/naloxone =6

Morphine/ saline =6

Στη χρόνια χορήγηση (chronic injection paradigm), τα διαγονιδιακά ζώα λάμβαναν, ανά 8h, ενδοπεριτοναϊκά ενέσεις με αυξανόμενες δόσεις μορφίνης σε σύνολο 5 ημερών (40, 60, 80, 100, 100,mg/kg) και 2h μετά την τελευταία έγχυση με μορφίνη ακολουθούσε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση με saline.

Στην πρόκληση στερητικού συνδρόμου (withdrwal), τα ζώα λάμβαναν και πάλι ανά 8h ενδοπεριτοναϊκά ενέσεις με αυξανόμενες δόσεις μορφίνης σε σύνολο 5 ημερών (40, 60 80, 100, 100, mg/kg) και 2h μετά την τελευταία έγχυση με μορφίνη ακολουθούσε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση με naloxone (μη ειδικός ανταγωνιστής των οπιοειδών υποδοχέων).

Στην ομάδα ελέγχου τα ζώα λάμβαναν μόνο φυσιολογικό ορό Saline-Saline ή Saline-Naloxone.

Perfusion Processing

Σε όλα τα πειραματικά ζώα έπειτα από 4 h ενέθηκε ενδοπεριτοναϊκά μια αναισθητική δόση pentobarbital και έπειτα χειρουργήθηκαν προκειμένου να αποκαλυφθεί η καρδιά. Στα ζώα έγινε perfusion με ειδική μονοκάναλη αντλία, όπου το ένα άκρο του καθετήρα ήταν συνδεδεμένο με μια βελόνη ινσουλίνης, η οποία εισχωρούσε στο δεξιό καρδιακό κόλπο και προμήθευε τα σπλάχνα με PBS 1x για 5 min, ταυτόχρονα τρυπούσαμε τον αριστερό κόλπο για να αρχίσει το αίμα να ρέει. Έπειτα από τα 5 λεπτά και για 12 λεπτά ακολουθούσε η μονιμοποίηση με paraformaldehyde 4% σε phosphate buffer. Στην συνέχεια εξαιρούνταν ο εγκέφαλος και φυλασσόταν σε paraformaldehyde 4% για 24 h στο ψυγείο στους 3° C. Την επομένη ημέρα ο εγκέφαλος τοποθετούνταν σε διάλυμα sucrose 3% και πάλι στους 3° C.

Οι τομές πάρθηκαν με κρυτόμο σε πάχος 35μm

Single-labeling immunohistochemistry

Την 1^η πειραματική μέρα γίνεται η επίστρωση των τομών πάνω στα πλακάκια (mounting). Τις αφήνουμε να στεγνώσουν και ακολουθεί το ξέπλυμα των τομών σε διάλυμα PBS. Για να μειώσουμε το background χρησιμοποιήσαμε blocking solution με Normal Donkey Serum. Το 1^ο αντίσωμα ακολουθούσε αμέσως μετά, το οποίο έμεινε για 16 ώρες. Την 2^η πειραματική μέρα ξέπλυμα των τομών 1x3 σε διάλυμα PBS και ακολουθούσε το 2^ο αντίσωμα. Την 3^η πειραματική μέρα ακολούθησε η αφυδάτωση των τομών (Dehydration) σε μπανάκι με αλκοόλες και στη συνέχεια ξέπλυμα των τομών.

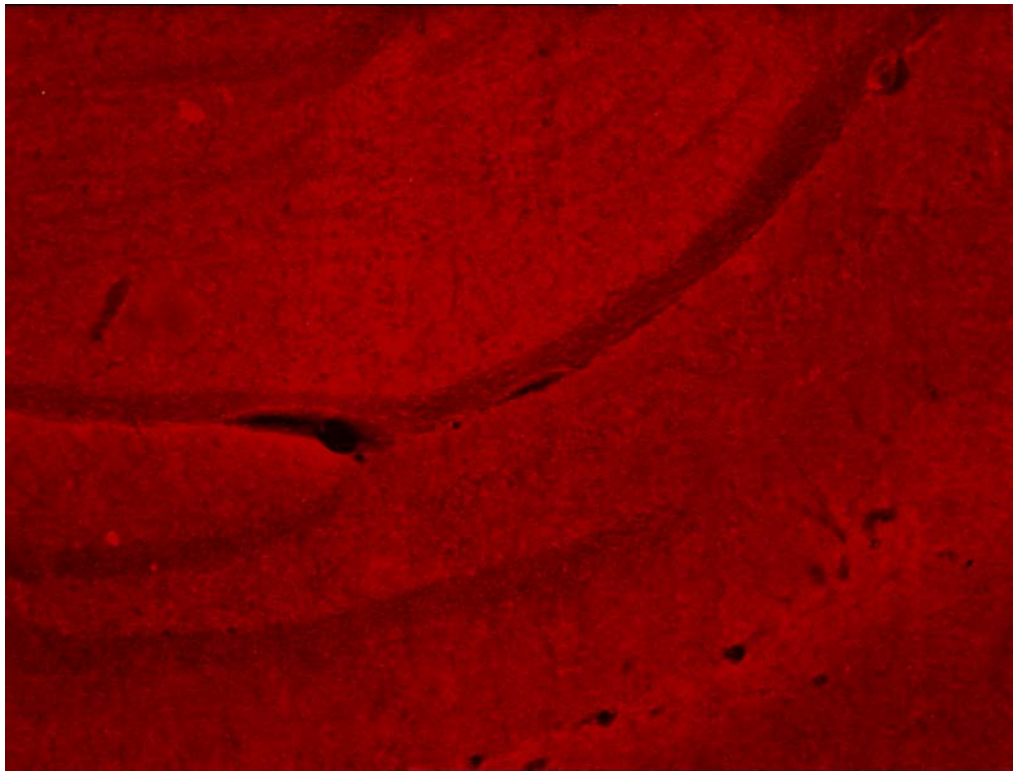
B. ΥΛΙΚΑ

Για την b-gal χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα:

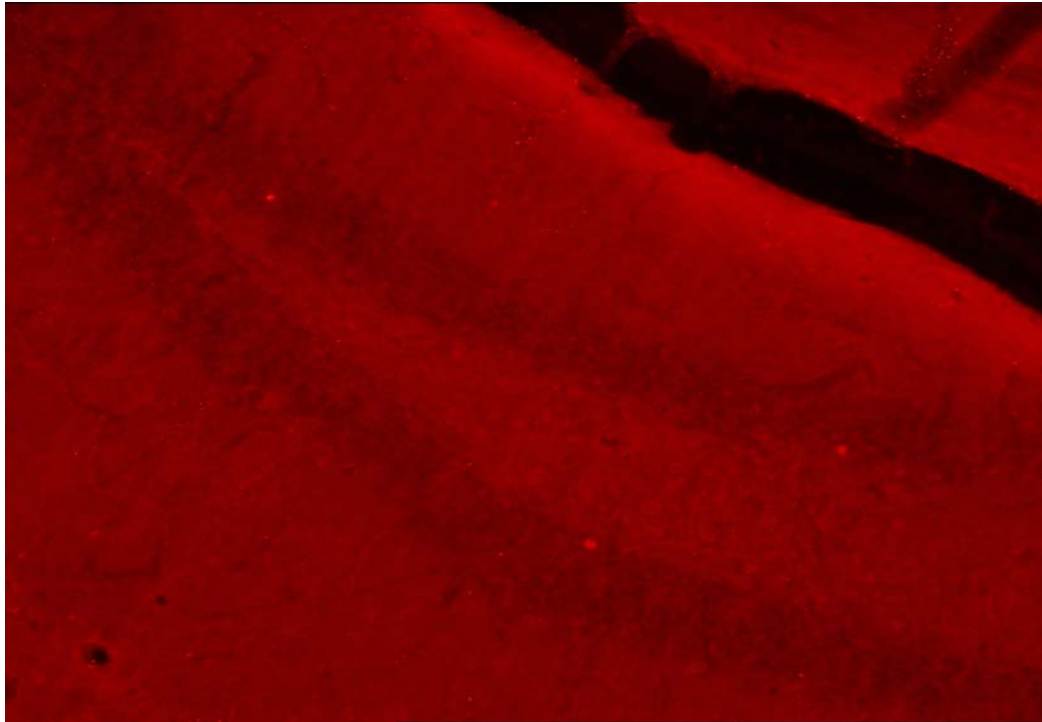
- Primary antibody: b-gal anti-mouse (1:400)
- Secondary antibody: Cy3 Donkey anti-goat (1:500)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

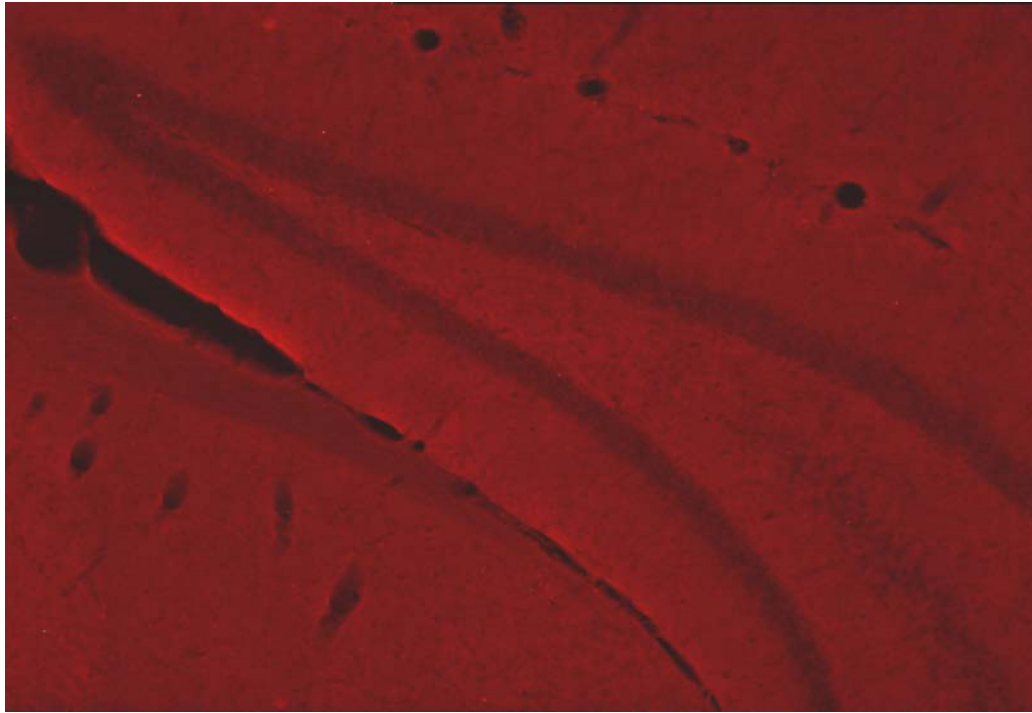
|



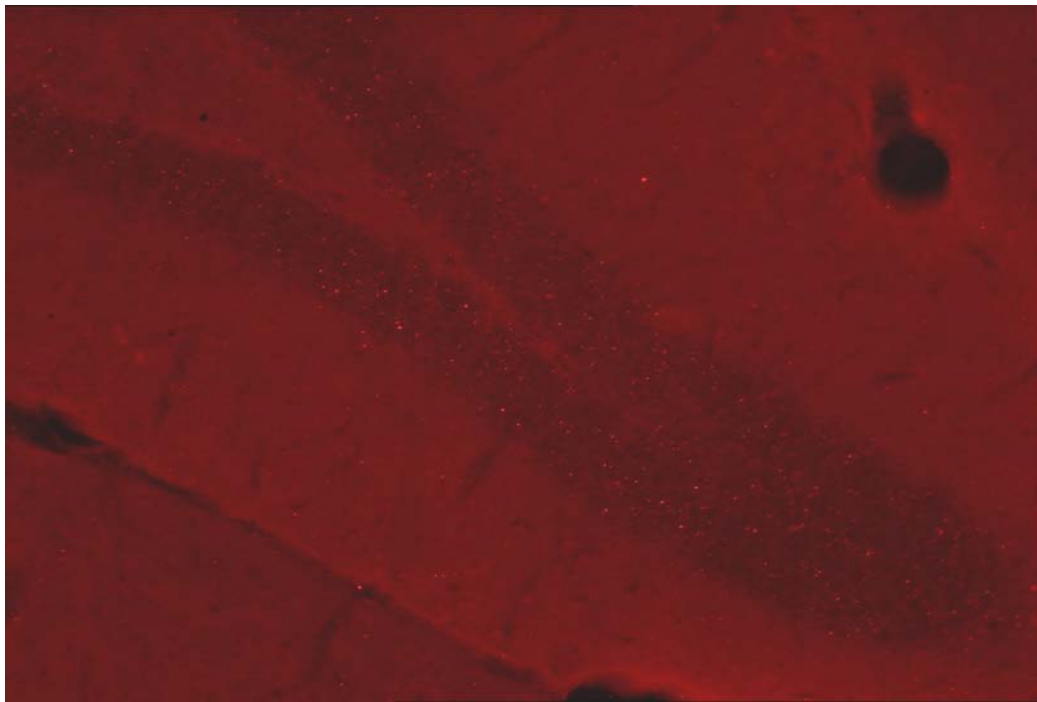
ΕΙΚΟΝΑ 1: Η έκφραση της γαλανίνης στην dentante gyrus περιοχή του ιππόκαμπου μετά από χορήγηση Saline-Saline



ΕΙΚΟΝΑ 2: Η έκφραση της γαλανίνης στην dentante gyrus περιοχή του ιππόκαμπου μετά από χορήγηση Saline-Naloxone

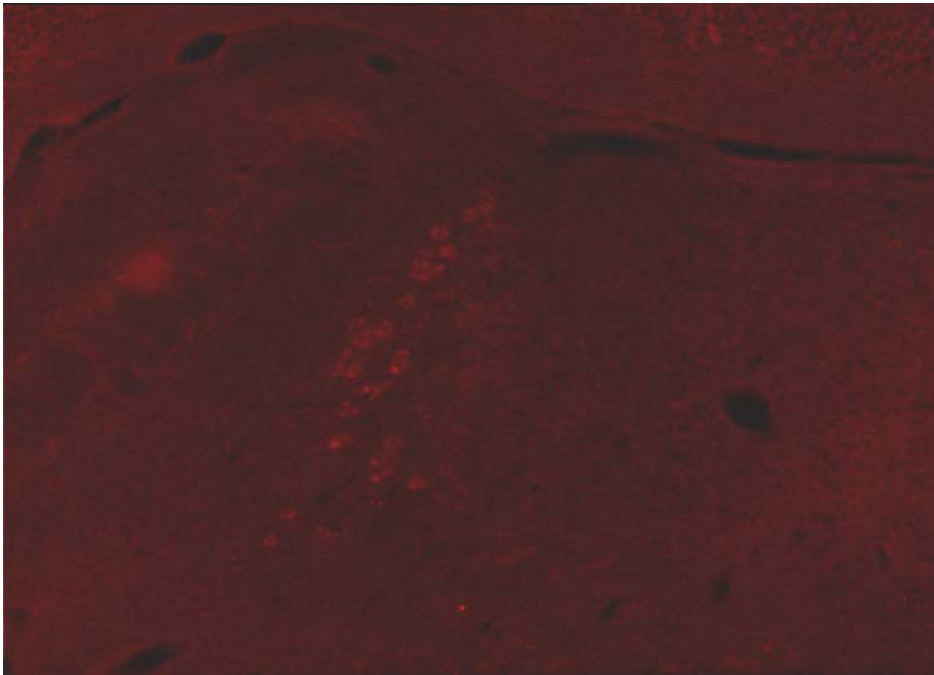


ΕΙΚΟΝΑ 3: Η έκφραση της γαλανίνης στην dentante gyrus περιοχή του ιππόκαμπου μετά από χορήγηση Morphine-Saline

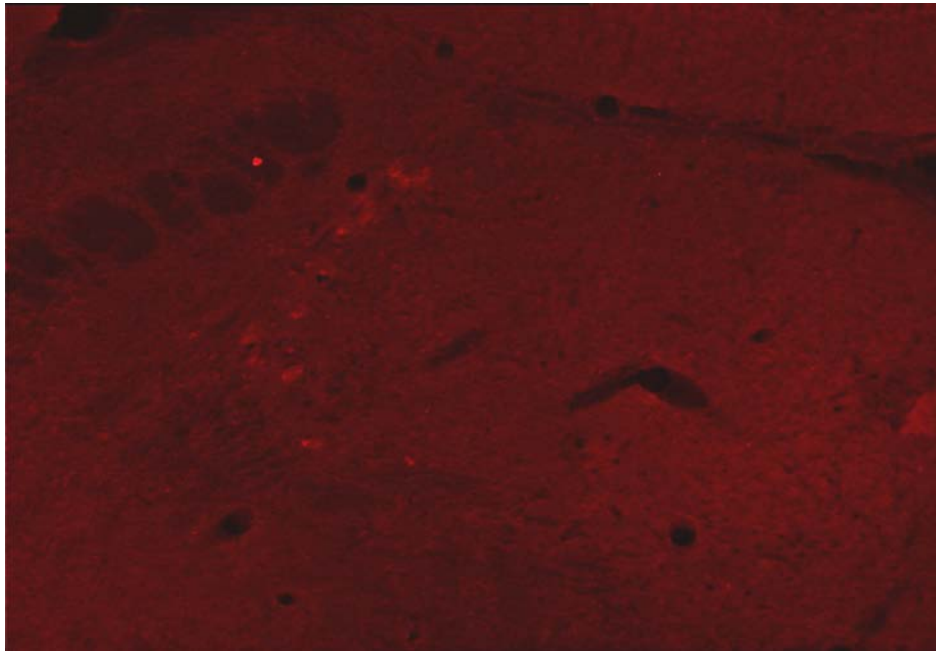


ΕΙΚΟΝΑ 4: Η έκφραση της γαλανίνης στην dentate gyrus περιοχή του ιππόκαμπου μετά από χορήγηση Morphine-Naloxone (withdrawal syndrome)

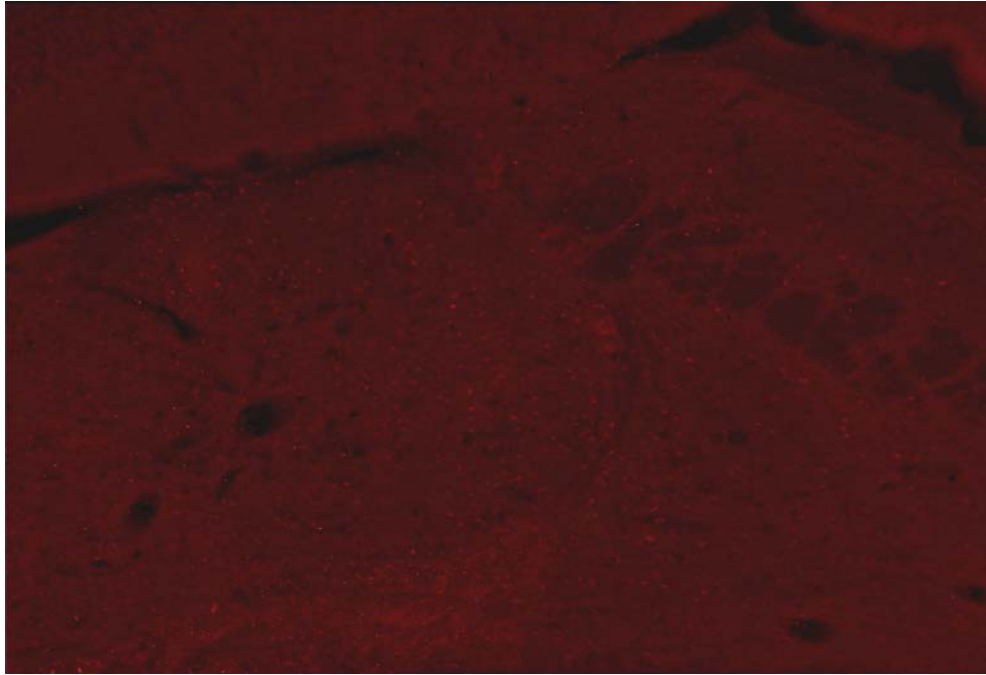
ΠΕΡΙΟΧΗ ΥΠΟΜΕΛΑΝΟΣ ΤΟΠΟΥ (LC)



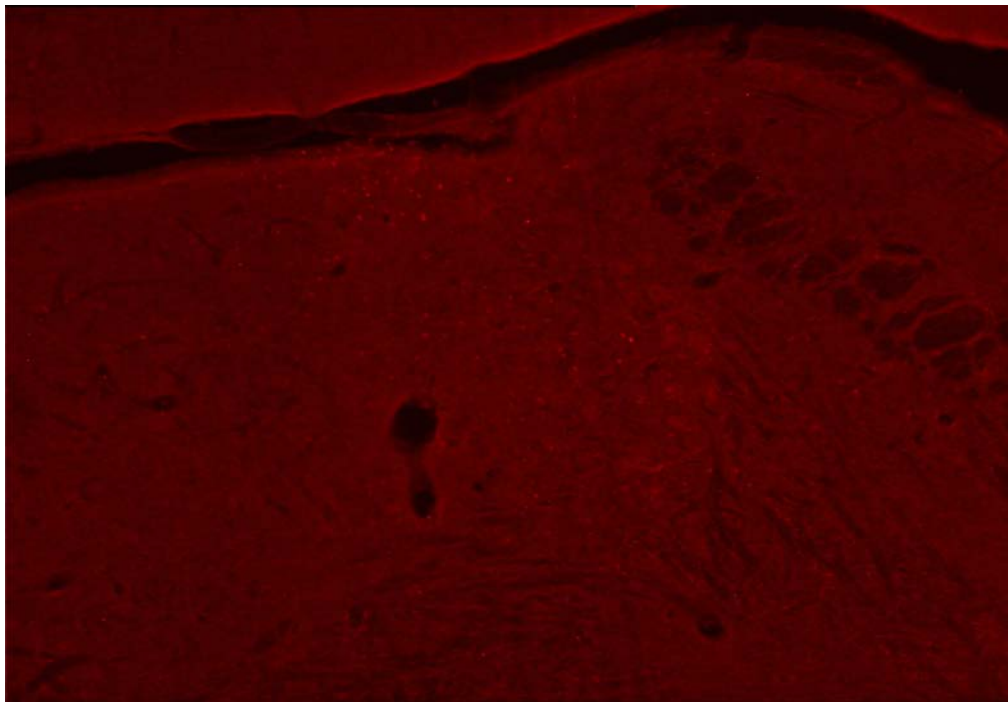
ΕΙΚΟΝΑ 5: Η έκφραση της γαλανίνης στην περιοχή του LC μετά από χορήγηση Morphine-Naloxone (withdrawal syndrome)



ΕΙΚΟΝΑ 6: Η έκφραση της γαλανίνης στην περιοχή του LC μετά από χρόνια χορήγηση Morphine-Saline.



ΕΙΚΟΝΑ 7: Η έκφραση της γαλανίνης στην περιοχή του LC μετά από χρόνια χορήγηση Saline-Naloxone.



ΕΙΚΟΝΑ 8: Η έκφραση της γαλανίνης στην περιοχή του LC μετά από χορήγηση Saline-Saline

ΠΕΡΙΟΧΗ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ

Η εικόνα 1 πάρθηκε από εγκέφαλο ενήλικου ποντικού σε κρουτόμο, με τομή πάχους 35μm στον ιπποκάμπειο σχηματισμό. Τα συγκεκριμένα ζώα ανήκαν στην ομάδα ελέγχου και ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με φυσιολογικό ορό. Στις συγκεκριμένες τομές απεικονίζεται ακριβώς η περιοχή της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας με μονή χρώση με 1^ο αντίσωμα το b-gal anti-mouse και 2^ο αντίσωμα το Cy3: donkey anti-goat IgG, που σε μικροσκόπιο φθορισμού δίνει κόκκινη χρώση (φθορισμό). Είναι ξεκάθαρο ότι στην περιοχή αυτή δεν διακρίνουμε φθορίζοντα κύτταρα.

Στην 2^η εικόνα η τεχνική είναι η ίδια. Η ομάδα των ενήλικων αυτών ποντικών ενέθηκαν με Saline-Naloxone ενδοπεριτοναϊκά. Απεικονίζεται και πάλι η περιοχή της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου, χωρίς απεικόνιση φθορίζόντων κυττάρων.

Στην 3^η εικόνα ακολουθείται η ίδια τεχνική. Η ομάδα αυτή των ζώων ενέθηκαν με Morphine-Saline ενδοπεριτοναϊκά. Απεικονίζεται και πάλι η περιοχή της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου. Δεν διακρίνουμε ωστόσο κανένα φθορίζων κύτταρο.

Στην ομάδα των ζώων της 4^{ης} εικόνας προκλήθηκε σύνδρομο στέρησης με χορήγηση Morphine-Naloxone ενδοπεριτοναϊκά. Απεικονίζεται και πάλι η περιοχή της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου και δεν διακρίνουμε κανένα φθορίζων κύτταρο γαλανίνης

ΠΕΡΙΟΧΗ ΥΠΟΜΕΛΑΙΝΟΣ ΤΟΠΟΥ (LC)

Η εικόνα 5, πάρθηκε από εγκέφαλο ενήλικου ποντικού σε κρουστόμο, με τομή πάχους 35μm στην περιοχή του υπομέλανος τόπου. Τα συγκεκριμένα ζώα ανήκαν στην ομάδα πρόκλησης στερεοτικού συνδρόμου και ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με αυξανόμενες δόσεις μορφίνης (40,60,80,100,100) ανά 8h και 2h μετά την τελευταία δόση μορφίνης ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με naloxone προκειμένου να προκληθούν τα συμπτώματα στέρησης τα οποία ήταν 10 σε αριθμό. Στις συγκεκριμένες τομές απεικονίζεται ακριβώς η περιοχή του υπομέλανος τόπου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας με μονή χρώση με 1^ο αντίσωμα το b-gal anti-mouse και 2^ο αντίσωμα το Cy3: donkey anti-goat IgG, που σε μικροσκόπιο φθορισμού δίνει κόκκινη χρώση (φθορισμό). Είναι πολύ εύκολο να διακρίνουμε τα φθορίζοντα κύτταρα, περίπου 25 σε αριθμό, που εκφράζουν το νευροπεπτιδίο της γαλανίνης στην συγκεκριμένη περιοχή.

Στην 6^η εικόνα η τεχνική είναι η ίδια. Η ομάδα των ενήλικων αυτών ποντικών ενέθηκαν με Morphine-Saline ενδοπεριτοναϊκά προκειμένου να επιτευχθεί η κατάσταση της εξάρτησης και του εθισμού με αυξανόμενες δόσεις μορφίνης (40,60,80,100,100) ανά 8h. Απεικονίζεται και πάλι η περιοχή του υπομέλανος τόπου όπου και πάλι διακρίνουμε μια έκφραση κυττάρων γαλανίνης λιγότερα σε αριθμό (περίπου 12) από ότι της έκφρασης που παρατηρείται στο σύνδρομο στέρησης

Στην 7η εικόνα η τεχνική είναι η ίδια. Η ομάδα των ενήλικων αυτών ποντικών ενέθηκαν με Saline-Naloxone ενδοπεριτοναϊκά. Απεικονίζεται και πάλι η περιοχή του υπομέλανος τόπου, χωρίς έκφραση κυττάρων γαλανίνης.

Η ομάδα των ζώων της 8^{ης} εικόνας αποτελεί την ομάδα ελέγχου και χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά Saline-Saline. Απεικονίζεται και πάλι η περιοχή του υπομέλανος τόπου και δεν διακρίνουμε φθορίζοντα κύτταρα γαλανίνης.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα νευρωνικά κυκλώματα που ευθύνονται για την ανάπτυξη του εθισμού έχουν ευρέως διερευνηθεί, αντιθέτως είναι δυσκολότερο να μελετηθούν οι ενδογενείς οδοί που παρεμβαίνουν και τροποποιούν την κατάσταση της εξάρτησης και του συνδρόμου στέρησης, Παρόλα αυτά η έρευνα αυτή παραμένει πολύ σημαντική για την ανάπτυξη φαρμακολογικών παρεμβάσεων προκειμένου να αντιμετωπισθεί η εξάρτηση από οπιοειδή και τα συμπτώματα στέρησης. Χρησιμοποιώντας φαρμακολογικά και γενετικά μοντέλα έχει αποδειχθεί ότι το γαλανινεργικό σύστημα τροποποιεί τα συμπτώματα του συνδρόμου στέρησης. Όταν η γαλανίνη δεν εκφράζεται όπως στα Gal-/- ποντίκια, τα στερητικά συμπτώματα είναι πιο σοβαρά. Αντίθετα, υπάρχει μείωση των συμπτωμάτων στέρησης όταν η γαλανίνη υπερεκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του promoter DβH σε διαγονιδιακά ζώα (V.Zachariou et al.,2003)

Στη συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου της γαλανίνης σε Gal-LacZ mice. Αυτά τα διαγονιδιακά ζώα έφεραν μια δομή μέσα στην οποία το γονίδιο αναφοράς (reporter gene), LacZ ,που κωδικοποιεί την β-gal, ήταν κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή Gal. Σε όλες τις ομάδες των ζώων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας με μονή χρώση αντισώματος, και μελετήθηκαν οι περιοχές του υπομέλαινος τόπου και του ιππόκαμπου.

Όπως παρατηρούμε στην περιοχή του υπομέλαινος τόπου, στην εικόνα 5, υπάρχει μια σημαντική αύξηση στην έκφραση των κυττάρων της γαλανίνης μετά από την πρόκληση στερητικού συνδρόμου στα ζώα αυτά. Επίσης αύξηση των γαλανινεργικών κυττάρων υπάρχει και στα ζώα με την χρόνια χορήγηση μορφίνης (κατάσταση εξάρτησης) όπως βλέπουμε να συμβαίνει στην εικόνα 6. Ωστόσο η αύξηση των κυττάρων της γαλανίνης που παρατηρείται κατά τη διάρκεια του συνδρόμου στέρησης είναι διπλάσια σε αριθμό από ότι στην κατάσταση του εθισμού. Η αυξημένη δραστηριοποίηση των νευρώνων του υπομέλαινος τόπου, ευθύνεται για πολλά από τα συμπτώματα που παρατηρούνται μετά το στερητικό σύνδρομο που ακολουθεί την διακοπή του φαρμάκου. Εν μέρει αυτή η αυξημένη δραστηριοποίηση οφείλεται σε δομικές αλλαγές που παρατηρούνται σε αυτούς τους νευρώνες

και ιδιαίτερα στις αλλαγές (up-regulation) στην οδό του cAMP και τις συνεπακόλουθες αλλαγές τις πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης και της γονιδιακής έκφρασης (Rasmussen et al., 1990; Guitar et al., 1992; Widnell et al., 1994; Shaw- Lutchman et al., 2002)

Αποδεικνύεται λοιπόν σε αυτή τη μελέτη ότι το γονίδιο της γαλανίνης ρυθμίζεται και κατά τη διάρκεια της κατάστασης του εθισμού αλλά και κατά την πρόκληση στερητικού συνδρόμου με ναλοξόνη. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με μελέτες της V. Zachariou *et al.*, 2004. που αφορούν την DNA microarray analysis του γονιδίου της γαλανίνης στον υπομέλαινα τόπο, όπου υπάρχει ρύθμιση του γονιδίου της γαλανίνης στην κατάσταση του εθισμού και κατά την πρόκληση στερητικού συνδρόμου. Στην μελέτη αυτή με microarray analysis βρέθηκε ότι πολλά γονίδια τα οποία συμπεριλαμβάνονται στην νευροδιαβίβαση που λαμβάνει χώρα στον υπομέλαινα τόπο, στην χρόνια χορήγηση μορφίνης και στο σύνδρομο στέρησης, είναι up-regulated. Μεταξύ αυτών ανήκει και το γονίδιο της γαλανίνης.

Αντίθετα δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στη έκφραση του γονιδίου της γαλανίνης στα ζώα που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου saline-saline και saline naloxone

Στην περιοχή του ιππόκαμπου, σε καμία από τις ομάδες των ζώων δεν παρατηρήθηκε αλλαγή της έκφρασης του γονιδίου της γαλανίνης, άρα στην περιοχή αυτή ίσως το γονίδιο της γαλανίνης δε ρυθμίζεται ούτε κατά τη διάρκεια του εθισμού ούτε κατά τη διάρκεια του συνδρόμου στέρησης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Branchek, T. A., Smith, K. E. Gerald, C., and Walker, M. W. (2000) Galanin receptor subtypes. *TiPS* Vol. 21: 109-116.
2. Bushell, T., Endoh, T., Simen, A. A., Ren, D., Bindokas, V. P., and Miller, R. J. (2002) Molecular Components of Tolerance to Opiates in Single Hippocampal Neurons. *Molecular Pharmacology* Vol. 61 (1): 55-64.
3. De Vries, T. J., and Shippenberg, T. S. (2002) Neural Systems Underlying Opiate Addiction. *J. Neuroscience* Vol. 22(9): 3321-2225.
4. Elliott-Hunt, C. R., Marsh, B., Bacon, A., Pope, R., Vanderplank, P., and Wynick, D. (2004) Galanin acts as a neuroprotective factor to the hippocampus. *PNAS* Vol. 101(14): 5105-5110.
5. Guitart, X., Thompson, M. A., Mirante, C. K., Greenberg, M. E., and Nestler, E. J. (1992) Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* Vol. 58: 1168-1171.
6. Harrison, J. M., Allen, R. G., Pellegrino, M. J., Williams, J. T., and Manzoni, O. J. (2002) Chronic Morphine Treatment Alters Endogenous Opioid Control of Hippocampal Mossy Fiber Synaptic Transmission. *J. Neurophysiol* Vol. 87: 2464-2470.
7. Kolakowski, L. F. Jr., O' Neill, G. P., Howard, A. D., Broussard, S. R., Sullivan, K. A., Feighner, S. D., Sawzdargo, M., Nguyen T., Kargman, S., Shiao, L. L., Hreniuk, D. L., Tan, C. P., Evans, J., Abramovitz, M., Chateauneuf, A., Coulombe, N., Ng, N., Johnson, M. P., Tharian, A., Khoshbouei, H., George, S. R., Smith, R. G., O' Dowd, B. F. (1998) Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem* Vol. 71: 2239-2251.
8. Lane-Ladd, S. B., Pineda, J., Boundy, V. A., Pfeuffer, T., Krupinski, J., Aghajanian, G. K., and Nestler, E. J. (1997) CREB in the Locus Coeruleus: Biochemical, Physiological, and Behavioral Evidence for a Role in Opiate Dependence. *J. Neuroscience* Vol. 17:7890-7901.

9. Melander, T., Hokfelt, T., Rokaeus, A., Cuello, C., Oertel, W. H., Verhofstad, A., and Goldstein, M. (1986) Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. *J Neurosci.* Vol. 6: 3640-3654.

10. Matthes, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B. P., and Kieffer, B. L. (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Nature* Vol. 383: 819-823.

11. Narita, M., Funada, M., and Suzuki, T. (2001) Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacology & Therapeutics* Vol. 89: 1-15.

12. Nestler, E. J., Hope, B. T., and Widnell, K. I. (1993). Drug Addiction: A model for the molecular Review basis of neuronal plasticity. *Neuron* Vol. 11: 995-1006.

13. Nestler, E. J., and Aghajanian, G., K. (1997) Molecular and Cellular Basis of Addiction. *Science* Vol. 278:58-63.

14. Nestler, E. J. (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol. 25(4): 210-218.

15. Negus, S. S., Burke, T. F., Medzihradsky, F., Woods, J. H. (1993). Effects of opioid agonists selective for mu, kappa and delta opioid receptors on schedule-controlled responding in rhesus monkeys: antagonism by quadazocine. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 267: 896-903.

16. O' Meara, G., Coumis, U., Ma, S. Y., Kehr, J., Mahoney, S., Bacon, A., Allen, S. J., Holmes, F., Kahl, U., Wang, F. H., Kearns, I. R. Ove-Ogren, S., Dawbarn, D., and Mufson, E. J. (2000). Galanin regulates the postnatal survival of a subset of basal forebrain cholinergic neurons. *PNAS* Vol. 97(21): 11569-11574.

17. Robinson, T. E., Corny, G., Savage, V., and Kolb, B. (2002) Widespread but regionally specific effects of experiment- versus self-administered morphine on dendritic spine density in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats. *Synapse* Vol 46: 271-279.

18. Rogers, R. D., and Robbins, T. W. (2001) Investigating the neurocognitive deficits associated with chronic drug misuse. *Current Opinion in Neurobiology* Vol. 11: 250-257.
19. Rasmussen, K., Beitner-Johnson, D. B., Krystal, J. H., Aghajanian, G. K., and Nestler, E. J. (1990) Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J Neurosci* Vol. 10: 2308-2317.
20. Steiner, R. A., Hohmann, J. G., Holmes, A., Wrenn, C. C., Cadd, G., Jureus, A., Clifton, D. K., Luo, M., Gutshall, M., Ma, S. Y., Mufson, E. J., and Crawley, J. N. (2001). Galanin transgenic mice display cognitive and neurochemical deficits characteristic of Alzheimer's disease. *PNAS* Vol. 98(7): 4184-4189.
21. Sevcik, J., Finta, P., and Illes, P. (1993). Galanin receptors inhibit the spontaneous firing of locus coeruleus neurones and interact with mu-opioid receptors. *Eur J Pharmacol* Vol. 230: 223-230.
22. Skofitsch, G., and Jacobowitz, D. M. (1986). Quantitative distribution of galanin-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Peptides* Vol. 7: 609-613.
23. Skofitsch, G., Sills, M. A., and Jacobowitz, D. M. (1986). Autoradiographic distribution of ¹²⁵I-galanin binding sites in the rat central nervous system. *Peptides* Vol. 7: 1029-1042.
24. Shaw-Lutchman, T. Z., Barrot, M., Wallace, T., Gilden, L., Zachariou, V. Imprey, S., Duman, R. S., Storm, D., and Nestler, E. J. (2002). Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during element morphine withdrawal. *J Neurosci* Vol. 22(9): 3663-3672
25. Widnell, K. L., Russell, D. S., and Nestler, E. J. (1994). Regulation of expression of cAMP response element-binding protein in the locus coeruleus in vivo and in a locus coeruleus-like cell line in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 91: 10947-1095

26. Wynick, D. and Bacon, A. (2002) Targeted disruption of galanin: new insights from knock-out studies. *Neuropeptides* Vol. 36 (2-3): 132-144.
27. Zachariou, V., Brunzell, D. H., Hawes, J., Stedman, D. R., Bartafai, T., Steiner, R. A., Wynick, D., Langel, U., and Picciotto, M. R. (2003). The neuropeptide galanin modulatew behavior and neurochemical signs of opiate withdrawal. *PNAS* Vol. 100: 9028-9033.
28. Zachariou, V., Ph.D., Thome, J., M.D., Ph.D., Parikh, K., and Picciotto, M. R., Ph.D.(2000). Up regulation of Galanin Binding Sites and GalR1 mRNA Levels in the Mouse Locus Coeruleus Following Chronic Morphine Treatments and Precipitated Morphine Withdrawal. (2000) *Neuropsychopharmacology* Vol. 23: 127-137.
29. Zachariou, V., Parikh, K. and Picciotto, M. R. (1999) Centrally administered galanin blocks morphine place preference in the mouse. *Brain Research* Vol. 831: 33-42.

