

# Hipokretyny (oreksyny) – rola w uzależnieniach od substancji psychoaktywnych

## Hypocretins (orexins) – a role in addiction to psychoactive compounds

Jolanta B. Zawilska, Kaja Biegańska, Małgorzata Milanowska, Agata Woldan-Tambor

Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Neuropsychiatria i Neuropsychologia 2010; 5, 1: 1–9

### Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska  
Zakład Farmakodynamiki  
Uniwersytet Medyczny  
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź  
tel. +48 42 677 92 94  
e-mail: jolanta.zawilska@umed.lodz.pl

### Streszczenie

Hipokretyny (oreksyny) to niedawno zidentyfikowane neuropeptydy produkowane w neuronach bocznego podwzgórza. Uczestniczą one w regulacji różnorodnych zachowań, m.in. poszukiwania i przyjmowania pokarmu, reakcji na stres, czuwania i snu. Zaburzenia w ośrodkowej transmisji hipokretynowej stanowią podłoże narcolepsji. Postuluje się istotną rolę hipokretyn w regulacji homeostazy energetycznej organizmu, osi podwzgórze–przysadka–nadnercza, procesach uczenia się i zapamiętywania bodźców wpływających na układ nagrody. W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań anatomicznych, neurofizjologicznych, farmakologicznych i behawioralnych wskazujących na udział hipokretyn w rozwoju uzależnień od substancji psychoaktywnych, w tym powrotach do używania substancji uzależniającej po okresie abstynencji.

**Słowa kluczowe:** hipokretyny, oreksyny, uzależnienie, abstynencja, morfina, amfetamina, kokaina, nikotyna, alkohol.

### Wstęp

Hipokretyny (oreksyny) zostały odkryte pod koniec lat 90. ubiegłego wieku przez dwa niezależne zespoły amerykańskie stosujące odmienne podejścia badawcze. Grupa kierowana przez J. Gregora Sutcliffe'a, prowadząc badania, których celem było zidentyfikowanie 38 różnych mRNA występujących w podwzgórzu szczura, wykazała, że jeden z nich koduje syntezę peptydu zbudowanego z 130 reszt aminokwasowych (aa). Okazało się, że peptyd ten jest prekursorem dwóch nieznanych wcześniej białek. Ze względu na występowanie tych białek w bocznej części podwzgórza (*hypothalamus*) i podobieństwo struk-

### Abstract

Hypocretins (orexins) are recently discovered neuropeptides synthesized by neurons in the lateral hypothalamus that have been implicated in a variety of behaviors, e.g. food-seeking and feeding, reaction to stress, arousal and sleep. Disturbances in the central hypocretin neurotransmission are believed to underlie narcolepsy. It has also been postulated that hypocretins play an important role in the regulation of HPA axis, energy homeostasis, acquisition and learning of reward system-stimulating signals. In this review we discuss anatomical, neurophysiological, pharmacological and behavioral data indicating an involvement of hypocretins in reward-seeking and addiction to psychoactive drugs, including relapse to drug-seeking behavior after periods of abstinence.

**Key words:** hypocretins, orexins, addiction, relapse, morphine, amphetamine, cocaine, nicotine, alcohol.

turalne do hormonu jelitowego sekretyny (*secretin*) nadano im nazwę hipokretyna 1 (Hcrt-1) i hipokretyna 2 (Hcrt-2) (*hypocretins*), a białko prekursorowe nazwano preprohipokretyną (de Lecea i wsp. 1998). W tym samym czasie zespół Masashi Yanagisawy, poszukując endogennych ligandów receptorów sprzężonych z białkami G, wyizolował z podwzgórza szczura dwa peptydy, które pobudzały receptor sierocy oznaczony symbolem HFGAN72: silnie działający peptyd 33-aa oraz peptyd 28-aa o znacznie mniejszej aktywności. Następnie badacze ci odkryli drugi receptor pobudzany w równym stopniu przez oba peptydy i sklonowali cDNA kodujący syntezę białka prekursorowego wyizolowanych peptydów. Nowo-

odkrytym peptydom nadano nazwę oreksyny (oreksyna A i oreksyna B), od greckiego słowa *orexis* oznaczającego apetyt, ponieważ ich wstrzyknięcie do komór bocznych mózgu szczura stymulowało pobieranie pokarmu (Sakurai i wsp. 1998). Po opublikowaniu struktury pierwszorzędowej hipokretyn i oreksyn okazało się, że oreksyna A (OX-A) jest identyczna z Hcrt-1, a oreksyna B (OX-B) z Hcrt-2 (Ohno i Sakurai 2008). Od tego czasu w piśmiennictwie równoważnie stosowane są obie nazwy peptydów.

Preprohipokretyna zawiera 33-aminokwasową sekwencję sygnałową i trzy miejsca, w których może być cięta przez enzymy proteolityczne. Dwa z czterech możliwych produktów cięcia peptydu – Hcrt-1 (aminokwasy 34–66) i Hcrt-2 (aminokwasy 69–97) – mają 14 identycznych reszt aminokwasowych (46% homologii strukturalnej), a ponadto 7 reszt aminokwasowych identycznych z sekretyną. Budowa pierwszorzędowa Hcrt-1 człowieka jest identyczna z Hcrt-1 myszy, szczura, świni, psa i bydła domowego. Ludzka Hcrt-2 różni się jedną resztą aminokwasową od peptydu świni i psa oraz dwoma resztami aminokwasowymi od peptydu myszy i szczura (Berezińska i Zawilska 2007; Ohno i Sakurai 2008). Hipokretyna 1 ma wyższą lipofilność i jest bardziej trwała w płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi niż Hcrt-2. Stężenia Hcrt-1 w mózgu są 2–5-krotnie mniejsze od stężeń Hcrt-2 (Berezińska i Zawilska 2007; Ohno i Sakurai 2008).

Ciała neuronów hipokretynowych występują przede wszystkim w podwzgórzu. Są one rozmieszczone w bocznych obszarach podwzgórza, głównie w części okołosklepieniowej, w jądrach: brzuszno-przyśrodkowym, grzbietowo-przyśrodkowym, łukowatym, i w wyniosłości pośrodkowej. Niewielkie skupiska neuronów zawierających Hcrt-2 zidentyfikowano w ciele migdałowatym, prążkowi i w obszarze brzusznie graniczącym z komorą boczną mózgu (Kukkonen i wsp. 2002; Berezińska i Zawilska 2007; Nishino 2007; Ohno i Sakurai 2008). Do neuronów hipokretynowych docierają projekcje z jąder podwzgórza, kory mózgowej, przedmurza, istoty szarej środkowej, grzbietowego jądra szwu i jądra okoloramieniowego. W neuronach hipokretynowych wykazano obecność (ko-ekspresję): dynorfiny, galaniny, glutaminianu, sekretynowego białka Narp (*neuronal activity-regulated pentraxin*) – regulatora procesu synaptogenezy; ekspresję receptorów: serotoninowych 5-HT<sub>1A</sub>, adozynowych A<sub>1</sub>, GABA<sub>Aα3</sub>, GABA<sub>Aε</sub>, GABA<sub>B</sub>, metabotropowych receptorów glutaminergicznych typu III, receptora 2

dla leptyny, oraz białek nośnikowych dla glutaminianu (vGlut1 i vGlut2) (Berezińska i Zawilska 2007; Ohno i Sakurai 2008; Carter i wsp. 2009). Aktywność neuronów hipokretynowych pobudzają glutaminian, adozynotrójfosforan (ATP), acetylocholina, peptydy: cholecystokinina, neurotensyna, wazopresyna, oksytocyna, czynnik uwalniający hormon kortykotropowy (*corticotropin-releasing factor* – CRF) i glukagonopodobny peptyd 1 (*glucagon-like peptide-1* – GLP-1), a hamują: GABA, serotonina, noradrenalina, dopamina, adozyna i neuropeptyd Y (NPY) (Ohno i Sakurai 2008; Carter i wsp. 2009). Badania elektrofizjologiczne wykazały ponadto, że w regulacji aktywności neuronów hipokretynowych ważną rolę odgrywają obwodowe czynniki humoralne związane z metabolizmem energetycznym i zachowaniami poszukiwania pokarmu (*feeding behavior*) – grelina (działanie stymulujące) oraz glukoza i leptyna (działanie hamujące) (Nishino 2007; Ohno i Sakurai 2008).

Pomimo stosunkowo małej liczby perikariotów neuronów hipokretynowych w podwzgórzu, ich aksony tworzą szeroką sieć obejmującą rozległe obszary ośrodkowego układu nerwowego. W obrębie podwzgórza aksony neuronów zawierających hipokretyny docierają niemal do wszystkich jego elementów strukturalnych. Ponadto unerwiają korę mózgową, korę zakrętu obręczy, opuszki węchowe, wzgórze, przegrodę, ciało migdałowate, pole brzuszne nakrywki, jądro półleżące przegrody, jądra migdałowate, istotę czarną, miejsce sinawe, jądra przykomorowe wzgórza, pień mózgu, rogi boczne i tylne rdzenia kręgowego (Kukkonen i wsp. 2002; Berezińska i Zawilska 2007; Ohno i Sakurai 2008; Carter i wsp. 2009).

Hipokretyny wywierają działania biologiczne poprzez aktywację specyficznych receptorów błonowych. Do tej pory sklonowano i scharakteryzowano dwa receptory dla hipokretyn: receptor typu 1 – Hcrtr-1 (OX<sub>1</sub>R), i receptor typu 2 – Hcrtr-2 (OX<sub>2</sub>R) (Sakurai i wsp. 1998; Kukkonen i wsp. 2002; Ohno i Sakurai 2008). Ludzkie i szczurze receptory są identyczne w 94% (Hcrtr-1) i 95% (Hcrtr-2) (Sakurai i wsp. 1998; Berezińska i Zawilska 2007). Hipokretyna 1 pobudza receptory Hcrtr-1 w stężeniach nanomolowych, natomiast Hcrt-2 ma do nich znacznie niższe powinowactwo. Obie hipokretyny wykazują zbliżone powinowactwo do receptorów Hcrtr-2. Uważa się zatem, że Hcrtr-1 jest selektywnym receptorem dla Hcrt-1, natomiast Hcrtr-2 jest nieselektywnym receptorem dla obu hipokretyn (Kuk-

konen i wsp. 2002; Berezińska i Zawilska 2007; Ohno i Sakurai 2008).

Receptory hipokretynowe należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G i mogą aktywować Gq, Go, Gs i Gi. Najczęściej opisywanym efektem pobudzenia receptorów hipokretynowych jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych ( $[Ca^{2+}]_i$ ), który może być wynikiem następujących procesów (Kukkonen i wsp. 2002; Gorojankina i wsp. 2008; Berezińska i Zawilska 2007; Tang i wsp. 2008):

- 1) napływu  $Ca^{2+}$  przez kanały wapniowe niezwiązane z potencjałem,
- 2) napływu  $Ca^{2+}$  przez kanały wapniowe zależne od potencjału błony komórkowej lub
- 3) pobudzenia szlaku  $PLC-\beta \rightarrow IP_3 \rightarrow [Ca^{2+}]_i$ .

Receptory Hcrt-1 i Hcrt-2 mogą, pobudzając różne białka G, hamować lub stymulować aktywność cyklazy adenylanowej (Kukkonen i wsp. 2002; Zhu i wsp. 2003; Holmqvist i wsp. 2005). Zaobserwowano, że hipokretyny, działając na komórki kory nadnerczy, silnie stymulują syntezę cAMP i aktywują kinazę białkową A, przyczyniając się w ten sposób do zwiększenia sekrecji glikokortykosteroidów (Mazzochi i wsp. 2001; Randeve i wsp. 2001). Opisano także pobudzenie przez receptory hipokretynowe szlaku kinaz MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) poprzez aktywację kinazy ERK (*extracellular regulated kinase*) (Gorojankina i wsp. 2007) i p38 (Tang i wsp. 2008; Ammoun i wsp. 2006a). Sądzi się, że fosforylacja p38 odgrywa istotną rolę podczas indukowanej hipokretynami śmierci komórek, podczas gdy stymulacja ERK wydaje się mieć działanie protekcyjne (Ammoun i wsp. 2006b).

Do obszaru o wysokiej gęstości receptorów hipokretynowych należy podwzgórze. Poza podwzgórzem dużą gęstość receptorów Hcrt-1 zaobserwowano w miejscu sinawym, grzbietowym jądrze szwu, przykomorowym jądrze wzgórze, obszarze CA1 i CA2 hipokampa, korze zakrętu obręczy, przegrodzie i przysadce mózgowej. Receptory Hcrt-2 występują przede wszystkim w guzkach węchowych, korze mózgowej, a także w jądrze połączeniowym przegrody, jądrach wzgórze: przykomorowym i środkowo-przyśrodkowym, przegrodzie, przednim jądrze przedpokrywowym, obszarze CA3 hipokampa, grzbietowym jądrze szwu, mózdzku i przysadce mózgowej (Kukkonen i wsp. 2002; Berezińska i Zawilska 2007; Ohno i Sakurai 2008).

Na podstawie wyników dotychczasowych badań, w tym neuroanatomicznych, elektrofizjologicznych i behawioralnych, oraz analizy

fenotypów myszy ze zmodyfikowanym genetycznie układem hipokretynowym uważa się, że główna rola hipokretyn polega na regulacji czuwania i snu. Pełnią one funkcję czynnika podtrzymującego oraz konsolidującego stan czuwania i umożliwiającego prawidłowe, kontrolowane przejścia pomiędzy stanem czuwania i snem, a także hamują fazę REM snu (Kukkonen i wsp. 2002; Berezińska i Zawilska 2007; Ohno i Sakurai 2008). U większości pacjentów cierpiących na narkolepsję stwierdzano bardzo małe lub niewykrywalne stężenia hipokretyn w płynie mózgowo-rdzeniowym, a w badaniach *post mortem* obserwowano zanik neuronów hipokretynowych w mózgu (Thannickal i wsp. 2003; Baumann i wsp. 2006). U zwierząt objawy narkolepsji występowały w wyniku uszkodzenia neuronów hipokretynowych w mózgu, wyłączenia genu kodującego syntezę preprohipokretyny, mutacji bądź wyłączenia genu *Hcrtr-2* (Chemelli i wsp. 1999; Hara i wsp. 2001; Fujiki i wsp. 2003). Na podstawie powyższych danych sądzi się, że narkolepsja jest wynikiem zaburzonej ośrodkowej transmisji hipokretynowej. Zdolność hipokretyn do podtrzymywania stanu czuwania sugeruje udział tych peptydów w nasileniu reakcji na stres. Udowodniono, że iniekcje Hcrt-1 do komór bocznych mózgu mogą, za pośrednictwem CRF i NPY, wywołać reakcje organizmu zależne od stresu. Postuluje się istotną rolę hipokretyn w regulacji osi podwzgórze–przysadka–nadnercza, a w szczególności sekrecji CRF i hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) (Kuru i wsp. 2000; Kukkonen i wsp. 2002; Ohno i Sakurai 2008). Hipokretyny uczestniczą w regulacji zachowań poszukiwania i przyjmowania pokarmu, kontroli homeostazy energetycznej organizmu, regulacji aktywności części współczulnej układu vegetatywnego (Berezińska i Zawilska 2007; Ohno i Sakurai 2008; Carter i wsp. 2009), modulacji ośrodkowej transmisji dopaminergicznej (Korotkova i wsp. 2003), noradrenergicznej (Hagan i wsp. 1999) i cholinergicznej (Burllet i wsp. 2002; Fadel i Frederick-Duus 2008). Ostatnie doniesienia mówią także o udziale neuronów hipokretynowych w procesach uczenia się i zapamiętywania bodźców wpływających na układ nagrody (Harris i Aston-Jones 2006). Sugeruje się, że hipokretyny są zaangażowane w złożony proces powstawania uzależnień od środków psychoaktywnych (plastyczność neuronalna związana z uzależnieniami, zachowania poszukiwania związku uzależniającego – *reward-seeking behavior*, utrwalanie „nagradzającego” działania substancji uzależ-



niającej, powrót do nałogu po okresie abstynencji) (Boutrel i de Lecea 2006; Carr i Kalivas 2006; Aston-Jones i wsp. 2009).

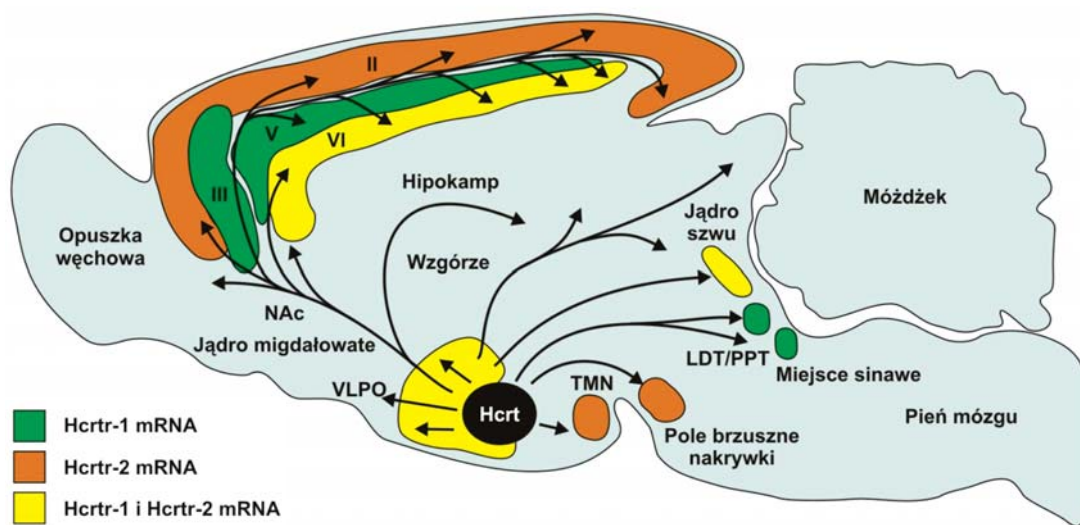
### Neuroanatomiczne podstawy udziału hipokretyn w powstawaniu uzależnień

Substancje uzależniające wywołują długotrwałe zmiany adaptacyjne w określonych sieciach neuronalnych mózgu. W rozwoju uzależnień kluczową rolę odgrywa układ nagrody, którego anatomicznym podłożem są struktury wchodzące w skład dopaminergicznego szlaku mezokorowo-limbicznego: pole brzuszne nakrywki (*ventral tegmental area* – VTA), brzuszne prążkowie, jądro półleżące przegrody (*nucleus accumbens* – NAc), jądra migdałowe oraz kora przedczołowa. W patomechanizmie uzależnień uczestniczą również neurony noradrenergiczne wychodzące z miejsca sinawego (*locus coeruleus* – LC). Wykazano, że neurony hipokretynowe, które biorą początek w bocznym podwzgórzu, docierają do ww. struktur mózgowych (ryc. 1.) (Peyron i wsp. 1998; Nakamura i wsp. 2000; Fadel i Deutch 2002; Baldo i wsp. 2003; DiLeone i wsp. 2003; Georgescu i wsp. 2003; Winsky-Sommerer i wsp. 2003). W VTA stwierdzono wysoki stopień ekspresji receptorów Hcrtr-1 i Hcrtr-2 (Lu i wsp. 2000; Korotkova i wsp. 2003; Narita i wsp. 2006). Oba typy receptorów hipokretynowych występują także w NAc (Hervieu i wsp. 2001; Cluderay i wsp. 2002; Martin i wsp. 2002), jednakże z uwagi na to, że stopień ekspresji Hcrtr-1 jest bardzo niski,

sądzi się, iż działania hipokretyn w NAc wynikają głównie z pobudzenia receptorów Hcrtr-2 (Martin i wsp. 2002). Hipokretyny nasilają wyładowania neuronów VTA (Nakamura i wsp. 2000; Korotkova i wsp. 2003). Wstrzyknięcie Hcrtr-1 bezpośrednio do VTA prowadziło do wzrostu ekspresji genu wczesnej odpowiedzi komórkowej *Fos* w tej strukturze (Vittoz i wsp. 2008) oraz nasilenia uwalniania dopaminy z NAc i kory przedczołowej (Narita i wsp. 2006; Vittoz i Berridge 2006). Ostatnie badania wykazały, że pobudzenie receptorów Hcrtr-2 wywołuje depolaryzację neuronów NAc (Mukai i wsp. 2009) i jąder migdałowych (Bisetti i wsp. 2006). W korze przedczołowej występują receptory Hcrtr-1 (Marcus i wsp. 2001), których pobudzenie powoduje aktywację neuronów (Xia i wsp. 2005). Receptory Hcrtr-1 odpowiadają także za pobudzenie przez hipokretyny neuronów noradrenergicznych w LC (Soffin i wsp. 2002).

### Wpływ związków uzależniających na neurony hipokretynowe w mózgu

Analizując potencjalny udział hipokretyn w rozwoju uzależnień od substancji psychoaktywnych, badano wpływ wybranych związków na neurony hipokretynowe. Jednorazowe podanie metamfetaminy (Estabrooke i wsp. 2001), amfetaminy (Fadel i Deutch 2002) czy nikotyny (Pasarathi i Fadel 2008) wywoływało wzrost ekspresji *Fos* w neuronach hipokretynowych bocznego podwzgórza. Podobny efekt obserwowano w wyniku długotrwałego stosowania amfetaminy (Morshedi i Meredith 2008). Wielokrotne



NAc – jądro półleżące przegrody, VLPO – brzuszno-boczne jądro przedwzrokowe, LDT/PPT – jądra grzbietowo-boczne nakrywki i konarowo-mostowe, TMN – jądra guzowo-suteczkowe, jądro szwu – grzbietowe jądro szwu

Ryc. 1. Neurony hipokretynowe unerwiają rozległe obszary mózgu (wg Carter i wsp. 2009, zmodyfikowano)

podania nikotyny zwiększały ekspresję preprohipokretyny w bocznym podwzgórzu (Kane i wsp. 2000). Długotrwałe wstrzykiwanie szczurom morfiny (Georgescu i wsp. 2003; Zhou i wsp. 2006; Sharf i wsp. 2008) i kokainy (Zhou i wsp. 2008) nie zmieniało ekspresji Fos w bocznym podwzgórzu. Dwutygodniowe podawanie szczurom Sprague-Dawley i Fischer 344 wzrastających dawek kokainy (45–90 mg/kg m.c./dzień) zmniejszało ekspresję preprohipokretyny w bocznym podwzgórzu. U szczurów F344, którym w celu wywołania zespołu odstawienia od kokainy wstrzyknięto pojedynczą dawkę naloksonu, obserwowano wzrost ekspresji preprohipokretyny w bocznym podwzgórzu; zmiany takie nie występowały u szczurów Sprague-Dawley (Zhou i wsp. 2008). Kokaina (20 mg/kg m.c., raz dziennie przez 5 dni) wywoływała długo utrzymujące się (do 60 dni) zwiększenie mRNA dla receptorów Hcrtr-2 w obszarze NAc. Nie obserwowano zmian w ekspresji Hcrtr-1 oraz w ekspresji Hcrtr-2 w innych strukturach układu mezo-koro-wo-limbicznego (Zhang i wsp. 2007). Badania prowadzone na liniach szczurów wysoko i nisko preferujących etanol wykazały, że podstawowy

stopień ekspresji preprohipokretyny w podwzgórzu obu grup zwierząt jest zbliżony (Lawrence i wsp. 2006). Picie przez 10 tygodni alkoholu zwiększało liczbę neuronów o dużej gęstości mRNA dla preprohipokretyny w bocznym podwzgórzu szczurów wysoko preferujących etanol. Efektu tego nie obserwowano u szczurów nisko preferujących etanol (Lawrence i wsp. 2006). Wstrzyknięcie Hcrtr-1 do bocznego podwzgórza lub jądra przykomorowego podwzgórza nasilało spożycie alkoholu u szczurów (Schneider i wsp. 2007). W teście wyboru roztworu do picia (*two-bottle choice*) dootrzewnowe podanie antagonisty receptorów Hcrtr-1, związku SB-334867, zmniejszało picie alkoholu przez szczury wysoko preferujące alkohol (Moorman i Aston-Jones 2009).

### Udział hipokretyn w patomechanizmie uzależnień – badania behawioralne

W tabeli 1. przedstawiono wyniki badań behawioralnych nad rolą hipokretyn w patomechanizmie rozwoju uzależnienia od substancji psychoaktywnych.

Tabela 1. Rola hipokretyn w patomechanizmie uzależnień od substancji psychoaktywnych – badania behawioralne

Związek	Zmiana	Piśmiennictwo
<b>Test warunkowej preferencji miejsca (<i>conditioned place preference – CPP</i>)</b>		
kokaina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ ekspresji Fos w neuronach hipokretynowych LH</li> <li>• ↓ ekspresji preprohipokretyny w LH</li> </ul>	Harris i wsp. (2005) Zhou i wsp. (2008)
morfina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ ekspresji Fos w neuronach hipokretynowych LH</li> <li>• SB-334867 zmniejsza CPP</li> </ul>	Harris i wsp. (2005) Harris i wsp. (2007)
<b>Sensytyzacja (<i>sensitization</i>)</b>		
kokaina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SB-334867 blokuje powstanie behawioralnej sensytyzacji</li> </ul>	Borgland i wsp. (2006)
amfetamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ ekspresji Fos w neuronach hipokretynowych</li> <li>• DORA-1 hamuje behawioralne objawy sensytyzacji</li> </ul>	McPherson i wsp. (2007) Winrow i wsp. (2009)
<b>Samopodawanie substancji uzależniającej (<i>self-administration</i>)</b>		
etanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SB-334867 osłabia zachowanie samopodawania</li> </ul>	Richards i wsp. (2008)
metamfetamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• brak wpływu SB-334867</li> </ul>	Boutrel i wsp. (2005)
kokaina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hipokretyna 1 podana do VTA przywraca samopodawanie</li> <li>• SB-334867 znosi przywrócenie samopodawania</li> <li>• <i>D</i>-Phe-CRF<sub>12-41</sub> i klonidyna osłabiają wpływ hipokretyny 1 na przywrócenie zachowania samopodawania</li> </ul>	Boutrel i wsp. (2005) Boutrel i wsp. (2005) Wang i wsp. (2009) Boutrel i wsp. (2005)
<b>Zespół odstawienia (<i>withdrawal</i>)</b>		
morfina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ ekspresji Fos w NAc</li> <li>• SB-334867 osłabia objawy zespołu odstawienia</li> <li>• ↓ ekspresji Fos w NAc po podaniu SB-334867</li> <li>• brak genu kodującego preprohipokretynę osłabia objawy zespołu odstawienia</li> </ul>	Sharf i wsp. (2008) Sharf i wsp. (2008) Georgescu i wsp. (2003)

Objaśnienie skrótów: ↑ – wzrost; ↓ – spadek; CPP – warunkowa preferencja miejsca; LH – boczne podwzgórze; VTA – pole brzuszne nakrywki; NAc – jądro półleżące przegrody; SB-334867 – antagonist receptorów Hcrtr-1; DORA-1 – antagonist receptorów Hcrtr-1 i Hcrtr-2; *D*-Phe-CRF<sub>12-41</sub> – antagonist receptorów dla kortykoliberyny

### Test warunkowej preferencji miejsca (*conditional place preference*)

Na udział hipokretyn w nagradzającym działaniu substancji psychoaktywnych wskazują wyniki badań z wykorzystaniem modelu warunkowej preferencji miejsca. U szczurów wybierających tę część klatki, którą kojarzyły z uprzednią dostępnością kokainy lub morfiny, obserwowano wzrost ekspresji Fos w neuronach hipokretynowych bocznego podwzgórza. Wzrost ten korelował z czasem, jaki zwierzę spędziło w preferowanej części klatki (Harris i wsp. 2005, 2007). Podawanie kokainy szczurom Sprague-Dawley w modelu warunkowej preferencji miejsca wywoływało spadek ekspresji preprohipokretyny w bocznym podwzgórzu (Zhou i wsp. 2008). Szczury z obustronnymi lezjami bocznego podwzgórza oraz zwierzęta z lezją jednostronną, którym do przeciwległego VTA wstrzyknięto SB-334867, nie nabywały warunkowej preferencji miejsca wywołanej morfiną (Harris i wsp. 2007). Mikroiniekcje Hcrt-1 do VTA przywracały zachowania poszukiwania morfiny w teście warunkowej preferencji miejsca (Harris i wsp. 2005), a SB-334867 hamowało rozwój tego zachowania (Narita i wsp. 2006).

### Sensytyzacja

Szereg substancji uzależniających wywołuje adaptacyjne zmiany neuronalne określane mianem sensytyzacji, które polegają na stopniowym nasilaniu efektów działania danego związku w trakcie jego wielokrotnego podawania. Rozwojowi sensytyzacji na amfetaminę towarzyszył wzrost ekspresji Fos w neuronach hipokretynowych (McPherson i wsp. 2007). U szczurów Sprague-Dawley podawanie dootrzewnowe lub stereotaktyczne do VTA antagonisty receptorów Hcrt-1 – SB-334867 (przez 5 dni, 15 min przed iniekcją kokainy) – znosiło powstawanie behawioralnego uwrażliwienia (sensytyzacji) na kokainę, ocenianego na podstawie stopnia aktywności ruchowej zwierząt. SB-334867 podany jednorazowo, tylko 6. dnia, nie zmniejszał aktywności lokomotorycznej zwierząt. Na podstawie powyższych obserwacji sugeruje się, że transmisja hipokretynowa jest potrzebna do rozwoju behawioralnej sensytyzacji, ale nie do jej ekspresji (Borgland i wsp. 2006). Antagonista receptorów Hcrt-1 i Hcrt-2, związek DORA-1, hamował behawioralne objawy sensytyzacji amfetaminowej (Winrow i wsp. 2009). Badania *microarray* DNA różnych obszarów mózgu szczura wykazały, że DORA-1 osłabiał

plastyczne zmiany transkrypcyjne (*up*-regulacja transkrypcji genów) leżące u podłoża behawioralnej sensytyzacji amfetaminowej (Winrow i wsp. 2010).

W mechanizmie indukcji behawioralnej sensytyzacji uczestniczą receptory glutaminergiczne typu NMDA. Pobudzenie receptorów NMDA w obszarze VTA prowadzi do serii wyładowań elektrycznych neuronów i – w następstwie – uwalniania z ich zakończeń dopaminy, głównie w obszarze NAc. Badania Borgland i wsp. (2006) wykazały, że Hcrt-1, indukując translokację receptorów NMDA do synaps, zwiększa transmisję synaptyczną w neuronach dopaminergicznych VTA.

### Samopodawanie (*self-administration*) substancji uzależniającej

Hipokretyna 1 wstrzyknięta do komórek bocznych mózgu nie zmieniała samopodawania kokainy u szczurów mających dostęp do związku przez 1 lub 6 godz. dziennie (Boutrel i wsp. 2005). Zablokowanie Hcrt-1 nie wpływało na samopodawanie metamfetaminy u szczurów (Boutrel 2008), a zmniejszało samopodawanie alkoholu (Richards i wsp. 2008). W modelu samodrażnienia prądem elektrycznym (*intracranial self-stimulation* – ICSS) dokomorowe podanie Hcrt-1 podnosiło próg samostymulacji, zmiana ta jest interpretowana jako zmniejszenie pobudliwości neuronów w układzie nagrody (Boutrel 2008).

Cechą charakterystyczną uzależnień od substancji psychoaktywnych jest podatność na powrót do nałogu, nawet po latach abstynencji (O'Brien 1997). U osób uzależnionych bodźce/sytuacje kojarzone z zażywaniem związku uzależniającego mogą spowodować poszukiwanie substancji psychoaktywnej i powrót do nałogu (Sinha i wsp. 2000). Podobnie u zwierząt doświadczalnych, bodźce kojarzone z poprzednim podawaniem lub dostępnością związku (np. dźwięk, światło, zapach, sektor klatki) mogą indukować zachowania jego poszukiwania (np. Meil i See 1996; Fuchs i wsp. 2005). Badania stopnia ekspresji Fos wskazują na to, że bodźce związane ze stosowaniem kokainy, morfiny i etanolu wywołują aktywację neuronów hipokretynowych (Harris i wsp. 2005; Harris i Aston-Jones 2006; Boutrel 2008; Dayas i wsp. 2008). Wstrzyknięcie Hcrt-1 do komórek bocznych mózgu lub VTA przywracało u szczurów samopodawanie kokainy indukowane przez bodźce sytuacyjne; działanie hipokretyny znosił SB-334867 (Boutrel i wsp. 2005; Wang



i wsp. 2009). Ponadto SB-334867 przeciwdziałał nawrotowi samopodawania kokainy pod wpływem bodźców sytuacyjnych (Smith i wsp. 2009). Powyższe obserwacje wskazują na udział receptorów Hcrtr-1 w tym procesie. Sugeruje się, że w zachowaniu poszukiwania kokainy prawdopodobnie dochodzi do interakcji pomiędzy układem hipokretynowym a szlakami odpowiedzialnymi za reakcję na stres, ponieważ *D*-Phe-CRF<sub>12-41</sub> (antagonista receptorów dla CFR) i klonidyna (agonista presynaptycznych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych) osłabiały stymulujący wpływ Hcrtr-1 na przywrócenie zachowania samopodawania kokainy, a SB-334867 zapobiegał nawrotowi samopodawania pod wpływem czynników stresogennych (Boutrel i wsp. 2005). Należy dodać, że Hcrtr-1 pobudza neurony zawierające CFR w jądrze okołokomorowym podwzgórza i jądrze migdałowatym, a CFR pobudza neurony hipokretynowe (Harris i Aston-Jones 2006).

### Zespół odstawienia

W celu wywołania objawów zespołu odstawienia zwierzętom, które długotrwale otrzymywały morfinę wstrzykiwano nalokson, antagonistę receptorów opioidowych. Stosując ww. model badawczy, wykazano, że podanie SB-334867 przed naloksonem osłabiało wzrost ekspresji Fos w NAc i zmniejszało behawioralne objawy zespołu odstawienia (Sharf i wsp. 2008). Znamienne słabsze objawy zespołu odstawienia od morfiny zaobserwowano u myszy pozbawionych genu kodującego preprohipokretynę (Georgescu i wsp. 2003). Powyższe wyniki sugerują udział neuronów hipokretynowych w awersyjnym (wzmocnienie negatywne) komponencie uzależnienia od morfiny.

### Podsumowanie

Coraz więcej danych doświadczalnych dowodzi, że neurony hipokretynowe bocznego podwzgórza unerwiają struktury układu mezo-korowo-limbicznego uczestnicząc w procesach związanych z rozwojem i utrwalaniem uzależnienia od substancji psychoaktywnych (m.in. w kompulsywnym poszukiwaniu substancji uzależniającej, wzmocnieniu pozytywnym, wzmocnieniu negatywnym czy sensytyzacji). Obserwacje udziału transmisji hipokretynowej w powrocie do poszukiwania i zażywania substancji psychoaktywnej po okresie abstynencji sugerują, że związki hamujące działania

hipokretyn (głównie antagoniści receptorów Hcrtr-1) mogą być wykorzystywane w leczeniu uzależnień.

*Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (503-3011-1; 502-13-770).*

### Piśmiennictwo

1. Ammoun S, Johansson L, Ekholm ME, et al. OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca<sup>2+</sup> influx in OX1 receptor signaling. *Mol Endocrinol* 2006a; 20: 80-99.
2. Ammoun S, Lindholm D, Wootz H, et al. G-protein-coupled OX1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and -independent cell death through p38 mitogen-/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2006b; 281: 834-842.
3. Aston-Jones G, Smith RJ, Moorman DE, et al. Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction. *Neuropharmacology* 2009; 56 Suppl 1: 112-121.
4. Baldo BA, Daniel RA, Berridge CW, et al. Overlapping distributions of orexin/hypocretin- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *J Comp Neurol* 2003; 464: 220-237.
5. Baumann CR, Khatami R, Werth E, et al. Hypocretin (orexin) deficiency predicts severe objective excessive daytime sleepiness in narcolepsy with cataplexy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 402-404.
6. Berezińska M, Zawilska JB. Hipokretyny – rola w regulacji rytmu sen-czuwanie i patogenezie narkolepsji. *Post Hig Med Dośw* 2007; 61: 1-12.
7. Bisetti A, Cvetkovic V, Serafin M, et al. Excitatory action of hypocretin/orexin on neurons of the central medial amygdala. *Neuroscience* 2006; 142: 999-1004.
8. Borgland SL, Taha SA, Sarti F, et al. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* 2006; 49: 589-601.
9. Boutrel B. A neuropeptide-centric view of psychostimulant addiction. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 343-357.
10. Boutrel B, de Lecea L. Addiction and arousal: the hypocretin connection. *Physiol Behav* 2008; 93: 947-951.
11. Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, et al. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 19168-19173.
12. Burt S, Tyler CJ, Leonard CS. Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by hypocretin/orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci* 2002; 22: 2862-2872.
13. Carr D, Kalivas PW. Orexin: a gatekeeper of addiction. *Nat Med* 2006; 12: 274-276.
14. Carter MC, Borg JS, de Lecea L. The brain hypocretins and their receptors: mediators of allostatic arousal. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 39-45.
15. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999; 98: 437-451.
16. Cluderay JE, Harrison DC, Hervieu GJ. Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regul Pept* 2002; 104: 131-144.
17. Dayas CV, McGranahan TM, Martin-Fardon R, et al. Stimuli linked to ethanol availability activate hypothalamic CART

- and orexin neurons in a reinstatement model of relapse. *Biol Psychiatry* 2008; 63: 152-157.
18. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 322-327.
  19. DiLeone RJ, Georgescu D, Nestler EJ. Lateral hypothalamic neuropeptides in reward and drug addiction. *Life Sci* 2003; 73: 759-768.
  20. Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, et al. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci* 2001; 21: 1656-1662.
  21. Fadel J, Frederick-Duus D. Orexin/hypocretin modulation of the basal forebrain cholinergic system: insights from in vivo microdialysis studies. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 156-162.
  22. Fadel J, Deutch AY. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2002; 111: 379-387.
  23. Fuchs RA, Evans KA, Ledford CC, et al. The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 296-309.
  24. Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, et al. Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog. *Sleep* 2003; 26: 953-959.
  25. Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, et al. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J Neurosci* 2003; 23: 3106-3111.
  26. Gorojankina T, Grébert D, Salesse R, et al. Study of orexins signal transduction pathways in rat olfactory mucosa and in olfactory sensory neurons-derived cell line Odora: Multiple orexin signaling pathways. *Reg Pep* 2007; 141: 73-85.
  27. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10911-10916.
  28. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 2001; 30: 345-354.
  29. Harris GC, Aston-Jones G. Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends Neurosci* 2006; 29: 571-577.
  30. Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 2005; 437: 556-559.
  31. Harris GC, Wimmer M, Randall-Thompson JF, et al. Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. *Behav Brain Res* 2007; 183: 43-51.
  32. Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, et al. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 2001; 103: 777-797.
  33. Holmqvist T, Johanson L, Östman M, et al. OX1 Orexin receptors couple to adenyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *J Biol Chem* 2005; 280: 6570-6579.
  34. Kane JK, Parker SL, Matta SG, et al. Nicotine up-regulates expression of orexin and its receptors in rat brain. *Endocrinology* 2000; 141: 3623-3629.
  35. Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, et al. Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci* 2003; 23: 7-11.
  36. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, et al. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C1567-1591.
  37. Kuru M, Ueta Y, Serino R, et al. Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 2000; 11: 1977-1980.
  38. Lawrence AJ, Cowen MS, Yang HJ, et al. The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 752-759.
  39. Lu XY, Bagnol D, Burke S, et al. Differential distribution and regulation of OX<sub>1</sub> and OX<sub>2</sub> orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav* 2000; 37: 335-344.
  40. Martin G, Fabre V, Siggins GR, et al. Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens. *Regul Pept* 2002; 104: 111-117.
  41. Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, et al. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001; 435: 6-25.
  42. Mazzochi G, Malendowicz LK, Gottardo L, et al. Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 778-782.
  43. McPherson CS, Featherby T, Krstew E, et al. Quantification of phosphorylated cAMP-response element-binding protein expression throughout the brain of amphetamine-sensitized rats: activation of hypothalamic orexin A-containing neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 805-812.
  44. Meil WM, See RE. Conditioned cue recovery of responding following prolonged withdrawal from self-administered cocaine in rats: an animal model of relapse. *Behav Pharmacol* 1996; 7: 754-763.
  45. Moorman DE, Aston-Jones G. Orexin-1 receptor antagonism decreases ethanol consumption and preference selectively in high-ethanol-preferring Sprague-Dawley rats. *Alcohol* 2009; 43: 379-386.
  46. Morshedi MM, Meredith GE. Repeated amphetamine administration induces Fos in prefrontal cortical neurons that project to the lateral hypothalamus but not the nucleus accumbens or basolateral amygdala. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 197: 179-189.
  47. Mukai K, Kim J, Nakajima K, et al. Electrophysiological effects of orexin/hypocretin on nucleus accumbens shell neurons in rats: an in vitro study. *Peptides* 2009; 30: 1487-1496.
  48. Nakamura T, Uramura K, Nambu T, et al. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res* 2000; 873: 181-187.
  49. Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, et al. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci* 2006; 26: 398-405.
  50. Nishino S. The hypothalamic peptidergic system, hypocretin/orexin and vigilance control. *Neuropeptides* 2007; 41: 117-133.
  51. O'Brien CP. A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science* 1997; 278: 66-70.
  52. Ohno K, Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29: 70-87.
  53. Pasumarthi RK, Fadel J. Activation of orexin/hypocretin projections to basal forebrain and paraventricular thalamus by acute nicotine. *Brain Res Bull* 2008; 77: 367-373.
  54. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998; 18: 9996-10015.
  55. Randeve HS, Karteris E, Grammatopoulos D, et al. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4808-4813.



56. Richards JK, Simms JA, Steensland P, et al. Inhibition of orexin-1/hypocretin-1 receptors inhibits yohimbine-induced reinstatement of ethanol and sucrose seeking in Long-Evans rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 199: 109-117.
57. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-585.
58. Schneider ER, Rada P, Darby RD, et al. Orexigenic peptides and alcohol intake: differential effects of orexin, galanin, and ghrelin. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: 1858-1865.
59. Sharf R, Sarhan M, DiLeone RJ. Orexin mediates the expression of precipitated morphine withdrawal and concurrent activation of the nucleus accumbens shell. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 175-183.
60. Sinha R, Fuse T, Aubin LR, et al. Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology (Berl)* 2000; 152: 140-148.
61. Smith RJ, See RE, Aston-Jones G. Orexin/hypocretin signaling at the orexin 1 receptor regulates cue-elicited cocaine-seeking. *Eur J Neurosci* 2009; 30: 493-503.
62. Smith RJ, Tahsili-Fahadan P, Aston-Jones G. Orexin/hypocretin is necessary for context-driven cocaine-seeking. *Neuropharmacology* 2010; 58: 179-184.
63. Soffin EM, Evans ML, Gill CH, et al. SB-334867-A antagonises orexin mediated excitation in the locus coeruleus. *Neuropharmacology* 2002; 42: 127-133.
64. Tang J, Chen J, Ramanjaneya M, et al. The signaling profile of recombinant human orexin-2 receptor. *Cell Sign* 2008; 20: 1651-1661.
65. Thannickal TC, Siegel JM, Nienhuis R, et al. Pattern of hypocretin (orexin) soma and axon loss, and gliosis in human narcolepsy. *Brain Pathol* 2003; 13: 340-351.
66. Stricker-Krongrad A, Beck B. Modulation of hypothalamic hypocretin/orexin mRNA expression by glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 129-133.
67. Vittoz NM, Berridge CW. Hypocretin/orexin selectively increases dopamine efflux within the prefrontal cortex: involvement of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 384-395.
68. Vittoz NM, Schmeichel B, Berridge CW. Hypocretin/orexin preferentially activates caudomedial ventral tegmental area dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 1629-1640.
69. Wang B, You ZB, Wise RA. Reinstatement of cocaine seeking by hypocretin (orexin) in the ventral tegmental area: independence from the local corticotropin-releasing factor network. *Biol Psychiatry* 2009; 65: 857-862.
70. Winrow CJ, Tanis KQ, Reiss DR, et al. Orexin receptor antagonism prevents transcriptional and behavioral plasticity resulting from stimulant exposure. *Neuropharmacology* 2010; 58: 185-194.
71. Winsky-Sommerer R, Boutrel B, de Lecea L. The role of the hypocretinergic system in the integration of networks that dictate the states of arousal. *Drug News Perspect* 2003; 16: 504-512.
72. Xia J, Chen X, Song C, et al. Postsynaptic excitation of prefrontal cortical pyramidal neurons by hypocretin-1/orexin A through the inhibition of potassium currents. *J Neurosci Res* 2005; 82: 729-736.
73. Zhang GC, Mao LM, Liu XY, et al. Long-lasting up-regulation of orexin receptor type 2 protein levels in the rat nucleus accumbens after chronic cocaine administration. *J Neurochem* 2007; 103: 400-407.
74. Zhou Y, Bendor J, Hofmann L, et al. Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. *J Endocrinol* 2006; 191: 137-145.
75. Zhou Y, Cui CL, Schlussman SD, et al. Effects of cocaine place conditioning, chronic escalating-dose "binge" pattern cocaine administration and acute withdrawal on orexin/hypocretin and preprodynorphin gene expressions in lateral hypothalamus of Fischer and Sprague-Dawley rats. *Neuroscience* 2008; 153: 1225-1234.
76. Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, et al. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-protein. *J Pharmacol Sci* 2003; 92: 259-266.