



Increased synaptic activity in magnocellular neurons of supraoptic nucleus and plasma vasopressin levels due to acute administration of morphine in male rats

Mitra Yousefpour^{1,2,3}, Nima Naderi¹, Mahyar Janahmadi^{1,2}, Amir-Mohammad Alizadeh¹, Fereshteh Motamedi^{1,2*}

1. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

2. Dept. Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

3. Dept. Physiology, Faculty of Medicine, Army University of Medical Science, Tehran, Iran

Received: 6 Sept 2010

Accepted: 23 Nov 2010

Abstract

Introduction: The magnocellular neurons (MCNs) of the supraoptic nucleus (SON) play a crucial role in control of physiological and pathophysiological condition due to two peptides that they synthesize, i.e. Oxytocin (OXT) and Vasopressin (AVP). The activity of MCNs is regulated by a variety of excitatory and inhibitory inputs. Opioid receptors are one of the important receptors in SON synapses. The aim of the present study is to evaluate the effect of acute morphine application on SON synapses and AVP release in rats.

Methods: In this study, whole cell patch clamp recording of neurons in rat (70-100 g, 3-4 weeks old) brain slice preparations consisting of SON was used to investigate the effect acute of lowest effective dose of morphine (25 μM) administration on spontaneous inhibitory and excitatory post synaptic currents (sIPSCs and sEPSCs) in MCNs. Also, AVP levels were measured in blood samples of rats using ELISA technique after the Morphine injection (30 mg/kg, ip).

Results: Bath application of morphine produced an increase in sEPSCs and a decrease in sIPSCs frequencies. Measurement of plasma AVP revealed an increase in hormone levels 45 min after systemic administration of morphine. P-values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Conclusion: It is suggested that acute administration of morphine stimulates the MCNs and AVP secretion.

Key words: Supraoptic nucleus, Morphine, synaptic transmission, AVP

* Corresponding author e-mail: motamedi@ams.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

افزایش فعالیت سیناپسی نورون های ماگنوسولار هسته سوپراپتیک و سطح پلاسمایی وازوپرسین در اثر تزریق حاد مورفین در رت های نر

میترا یوسف پور^{۱،۲،۳}، نیما نادری^۱، مهیار جان احمدی^۲، امیر محمد علیزاده^۱، فرشته معتمدی^۲*

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران

پذیرش: ۲ آذر ۸۹

دریافت: ۱۵ شهریور ۸۹

چکیده

مقدمه: نورون های ماگنوسولار هسته سوپراپتیک با تولید و ترشح دو پپتید اکسی توسین و وازوپرسین نقش مهمی را در تنظیم شرایط فیزیولوژیک و یا ایجاد شرایط پاتولوژیک بازی می نمایند. این نورون ها توسط ورودی های عصبی تحریکی و مهارتی مختلفی تنظیم می گردند. یکی از گیرنده های موجود در سیناپس های عصبی این هسته، گیرنده های ایپوبیدی می باشند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تجویز حاد مورفین بر فعالیت سیناپس های عصبی تحریکی و مهارتی این هسته و همچنین میزان ترشح هورمون وازوپرسین در خون بوده است.

روش ها: در این مطالعه تکنیک ثبت whole cell patch clamp برای بررسی اثرات تجویز حاد حداقل دوز موثر مورفین (۲۵ میکرو مولار) بر جریانات سریع سیناپسی تحریکی و مهارتی (sIPSC و sEPSC) در برشهای مغزی هسته سوپراپتیک رت های نر (۳-۴ هفته، ۷۰-۱۰۰ گرم) مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر آن با استفاده از تکنیک ELISA سطح پلاسمایی وازوپرسین در نمونه های خون رت های نر بعد از تجویز حاد مورفین (۳۰ میلی گرم / کیلوگرم، داخل صفاقی) اندازه گیری شد.

یافته ها: تجویز مورفین بر نورون های ماگنوسولار موجب افزایش فرکانس جریان های پس سیناپسی تحریکی خود به خودی (sEPSC) و کاهش فرکانس جریان های پس سیناپسی مهارتی خود به خودی (sIPSC) شد. همچنین تجویز داخل صفاقی مورفین موجب افزایش سطح پلاسمایی وازوپرسین گردید. نتایج با $p < 0.05$ معنی دار محسوب گردید.

نتیجه گیری: این نتایج پیشنهاد می کنند که تجویز حاد مورفین موجب تحریک نورونهای هسته سوپراپتیک و متعاقب آن افزایش ترشح وازوپرسین می گردد.

واژه های کلیدی: هسته سوپراپتیک، مورفین، انتقالات سیناپسی، وازوپرسین

مقدمه

ورودی های عصبی تحریکی و مهارتی مختلفی تنظیم می گردد. عمده ترین ورودی مهارتی و تحریکی بر این نورونها به ترتیب گابا آرژیک و گلوتاماترژیک هستند [۳، ۴، ۱۷، ۱۸]. از طرفی نوروترانسمیترهای متعددی کارایی این ورودی های تحریکی و مهارتی را تنظیم می نمایند [۹، ۱۲]. مطالعات نشان داده اند که ایپوبیدها در تنظیم فعالیت نورون های ماگنوسولار

فعالیت نورون های ماگنوسولار هسته سوپراپتیک توسط

motamedi@ams.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

و ترشح وازوپرسین نقش مهمی بازی می نمایند. تعداد قابل توجه رسپتورهای مو و کاپا در پایانه های عصبی نورون های هسته سوپراپتیک وجود دارد [۱۰، ۱۶]. مطالعات نشان داده اند که اپیوئیدها می توانند فعالیت نورون های ماگنو سلولار را تحت تاثیر قرار دهند. در یک مطالعه تجویز حاد آگونیست اختصاصی رسپتور کاپا موجب کاهش تخلیه (firing) خود به خودی نورون های SON شده است [۵]. گزارشی دیگر بیان نموده که تجویز حاد آگونیست اختصاصی رسپتورهای اپیوئیدی مو موجب کاهش sEPSC گشته اما اثری بر sIPSC نداشته است [۸]. در مورد اثرات تجویز مورفین بر فعالیت نورونهای SON گزارش هایی پیرامون تغییرات فعالیت و محتوای وازوپرسین در نورون های ماگنوسلولار موجود است [۲، ۱۱]. برخی گزارش ها بیان کننده افزایش مشخص در سطح پلاسمایی وازوپرسین می باشند، در حالیکه برخی هیچگونه افزایشی را نشان نداده اند [۶، ۷، ۱۴، ۱۵، ۲۰].

از آنجایی که تنظیم ترشح وازوپرسین ممکن است در کنترل شرایط فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک موثر باشد در این مطالعه سعی شده تا اثرات تجویز حاد مورفین بر جریانهای پس سیناپسی سریع تحریکی و مهاری خود به خودی (sIPSC و sEPSC) در نورون های ماگنو سلولار هسته سوپراپتیک و سطح پلاسمایی وازوپرسین در رت های نر بررسی گردد.

مواد و روشها

الکتروفیزیولوژی: Patch clamp در این مطالعه از موشهای صحرائی نر (۳-۴ هفته، ۷۰-۱۰۰ گرم) استفاده شده است. موشها در دمای ۲۴-۲۱ درجه سانتی گراد و شرایط استاندارد نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. حیوانات ابتدا توسط اثر بیهوش شده و سر آنها توسط گیوتین جدا شد. سپس مغز حیوان به سرعت خارج شده و به داخل محلول تهیه برش های مغزی که حاوی سدیم کلراید (۸۷ میلی مول)، پتاسیم کلراید (۲/۵ میلی مول)، سدیم هیدروژن فسفات (۱/۲۵ میلی مول)، منیزیم کلراید (۷ میلی مول)، کلسیم کلراید (۰/۵ میلی مول)، سدیم بیکربنات (۲۵ میلی مول)، گلوکز (۲۵ میلی مول) و سوکروز (۷۵ میلی مول) و دمای آن در حدود ۲ درجه سانتیگراد بود منتقل گردید. این محلول پیوسته

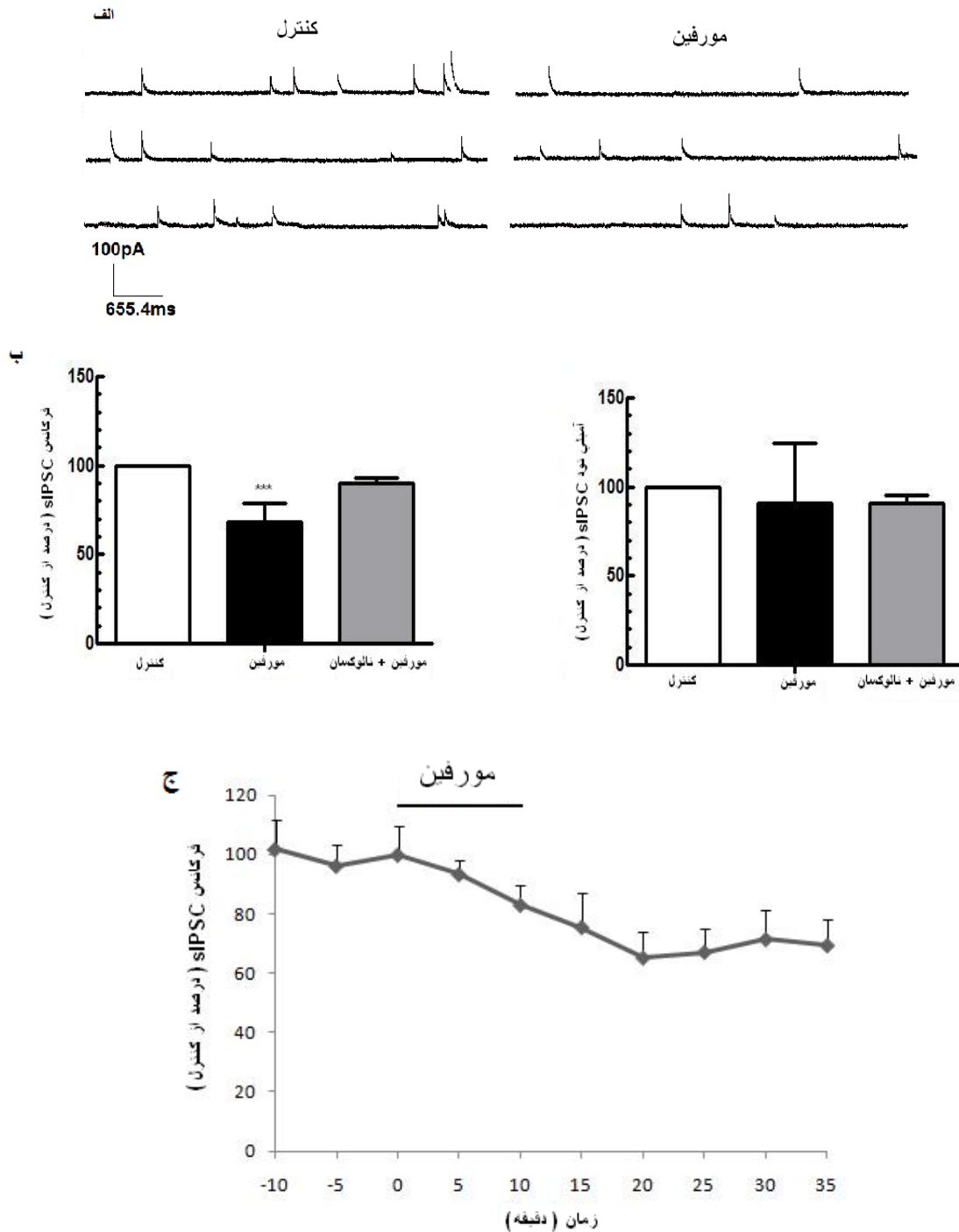
توسط مخلوط اکسیژن ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ اکسیژن رسانی می گردید. توسط دستگاه میکروتوم برشهای مغزی به قطر ۲۵۰ میکرون که حاوی ناحیه سوپراپتیک می باشد تهیه و حداقل به مدت ۱ ساعت در محلول ACSF که حاوی سدیم کلراید (۱۲۴ میلی مول)، پتاسیم کلراید (۳ میلی مول)، سدیم هیدروژن فسفات (۲ میلی مول)، منیزیم سولفات (۲ میلی مول)، کلسیم کلراید (۲ میلی مول)، سدیم بیکربنات (۲۶ میلی مول) و گلوکز (۱۰ میلی مول) بود در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده و سپس به یک محفظه ثبت در زیر میکروسکوپ منتقل شدند. نورون های سوپراپتیک توسط میکروسکوپ مجهز به عدسی شیئی water immersion که به یک دوربین مادون قرمز (IR) متصل شده است مشاهده می شدند. با استفاده از آمپلی فایر مدل B۲۰۰ AXOPATCH- پتانسیل سلول برای ثبت sEPSC و sIPSC به ترتیب در ۷۰- و صفر کلامپ شد. در این مطالعه تکنیک whole cell patch clamp به منظور بررسی فعالیت پس سیناپسی سریع نورون- های سوپراپتیک مورد استفاده قرار گرفت. بیست شیشه ای از محلولی با ترکیب کلسیم کلراید (۰/۱ میلی مول)، منیزیم کلراید (۲ میلی مول)، EGTA (۱/۱ میلی مول)، HEPES (۱۰ میلی مول)، Na2ATP (۲ میلی مول)، پتاسیم کلراید (۱۴۰ میلی مول) (برای sEPSC) و یا سزیم کلراید (۱۴۰ میلی مول) (برای sIPSC) پر می شد. فرکانس و دامنه (Amplitude) جریان های خود به خودی پس سیناپسی تحریکی و مهاری (sIPSC و sEPSC) اندازه گیری می شد. پس از دسترسی به نورون، از سلول به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه ثبت پایه گرفته شده، سپس نورون در معرض داروها قرار گرفت. در انتهای هر ثبت برای اطمینان از گابارژیک بودن جریان های سیناپسی مهاری از بی کوکولین ۲۰ میکرو مول (آنتاگونیست گاباA) و در مورد جریانهای سیناپسی تحریکی گلوتاماتی از AP-5 (۵۰ میکرومول) و CNQX (۱۰ میکرومول) که به ترتیب آنتاگونیست رسپتورهای NMDA و non-NMDA هستند استفاده شد. تمام داروهای مورد استفاده از طریق پرفیوژن ACSF به بافت مغز و نورون ها می رسید. مقاومت نوک پیت های مورد استفاده ۳-۷ مگا اهم بوده و برای ثبت از فیلتر ۱۰ کیلوهرتز استفاده شد. تحت این شرایط از ثبتهایی که در آنها دسترسی به سلول بیش از ۲۰٪ تغییر نکرده بود برای آنالیز

پاسخ استفاده شد.

۷۰ گرم) از روش زیر استفاده شد:

پس از ۳ تا ۴ ساعت ناشتایی (از مصرف آب جلوگیری نمی شد)، مورفین (۳۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی تزریق شده

سنجش هورمونی: به منظور سنجش هورمون آنتی دیورتیک در پلاسمای موش نر صحرایی (۳-۴ هفته، ۱۰۰-



شکل ۱- الف) نمونه های ثبت فرکانس sIPSC قبل و بعد از تجویز مورفین ، ب) تجویز مورفین ($25 \mu\text{m}$) موجب کاهش فرکانس sIPSC می شود اما بر آمپلی تود اثری ندارد، تجویز نالوکسان ($50 \mu\text{m}$) از تاثیر مورفین بر فرکانس جلوگیری می نماید، ج) تغییرات فرکانس sIPSC نورون های ماگنوسولولار در طی ثبت، ($n=7$ ، $p<0.001$ در مقایسه با گروه کنترل) هر ستون بیانگر میانگین \pm SEM می باشد. در تمامی شکل ها $p<0.001$ و $p<0.01$ به ترتیب با *** و ** نشان داده شده است.

سوپرا اپتیک متفاوت و گاه متضاد بوده است که می تواند به فاکتورهای متعددی وابسته باشد. یکی از فاکتورهای موثر در ایجاد این تفاوت ها نوع آگونیست مورد استفاده در تحقیقات است [۱]. مورفین یکی از ترکیبات اپیویدی است که مصرف آن در موارد پزشکی دارای اهمیت است. تحقیقات در زمینه اثرات مورفین نتایج متفاوتی را به همراه داشته است.

مطالعات نشان داده اند که اثرات تحریکی یا مهارتی مورفین بر نورون های ماگنوسولولار وابسته به روش تجویز مورفین (تجویز حاد یا مزمن) متفاوت می باشد. برخی گزارشات بیان نموده اند که تجویز حاد مورفین موجب افزایش بیان وازوپرسین در هسته سوپرا اپتیک می گردد [۲، ۱۱]. همچنین مطالعات الکتروفیزیولوژیک نشان داده اند که فعال سازی رسپتورهای اپیویدی (بسته به نوع رسپتور) موجب کاهش و یا افزایش تحریک پذیری نورون های ماگنوسولولار می شوند که این اثرات از طریق جریانات پتاسیمی وابسته به ولتاژ اعمال می گردند [۱۳]. علاوه بر این پیشنهاد شده است که اثرات مورفین بر نورون های ماگنوسولولار وابسته به نوع سلول ها و انتقالات سیناپسی متفاوت می باشند [۸، ۱۹].

در این مطالعه نتایج ثبت های الکتروفیزیولوژی نشان داد که تجویز مورفین (۲۵ μm) موجب کاهش فرکانس sIPSC و افزایش فرکانس sEPSC بدون تغییر در آمپلی تود می شود. این الگوی تغییرات در فرکانس جریانات سیناپسی سریع خود به خودی بدون تغییر در آمپلی تود ممکن است ناشی از اثرات پیش سیناپسی باشد [۸]، اگرچه بررسی های بیشتری نظیر اندازه گیری نسبت پالس های زوجی (paired pulse ratio) برای تایید این ایده لازم است. علاوه بر این، اثرات مورفین بر جریانات سریع سیناپسی تحریکی و مهارتی با تجویز نالوکسان (۵۰ μm)، به عنوان یک آنتاگونیست اپیویدی، مهار می گردد. بنابراین به نظر می رسد که اثرات مورفین در هسته سوپرا اپتیک از طریق رسپتورهای اپیویدی میانجی گری می شود.

تفاوت اثر مورفین بر انتها های پیش سیناپسی مهارتی یا تحریکی می تواند با نوع رسپتورهای اپیویدی بیان شده در انتها های سیناپسی و یا مسیرهای سیگنالینگ مختلف داخل سلولی مرتبط باشد. از یک طرف مورفین عمدتاً به عنوان آگونیست نسبی رسپتورهای مو در تحقیقات مورد استفاده قرار می گیرد و از طرف دیگر بررسی ها نشان داده اند که

و ۱۵ و ۴۵ دقیقه پس از تزریق مورفین سر حیوان جدا شده و به میزان حداقل نیم میلی لیتر خون تام در میکروتیوب اپندورف ۱/۵ میلی لیتری که حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و آنتی پروتئازهای آپروتینین و PMSF بودند جمع آوری شد. بلافاصله پس از مخلوط نمودن آهسته و کامل خون تام با مواد مذکور، پلاسما به کمک سانتری فیوژ (۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد) جدا شد. پلاسما مذکور پس از جداسازی در ۲ میکروتیوب ۲۵۰ میکرولیتری تقسیم گردید. نمونه های تقسیم شده در ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایشات ذخیره شدند. میزان هورمون پلاسما با استفاده از روش ELISA اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده ها: جهت بررسی اختلاف میان گروههای مختلف دارویی و کنترل از تستهای آماری t-test، آنالیز واریانس یکطرفه و تست تکمیلی دانت استفاده شد و با $p < 0.05$ معنی دار محسوب گردید.

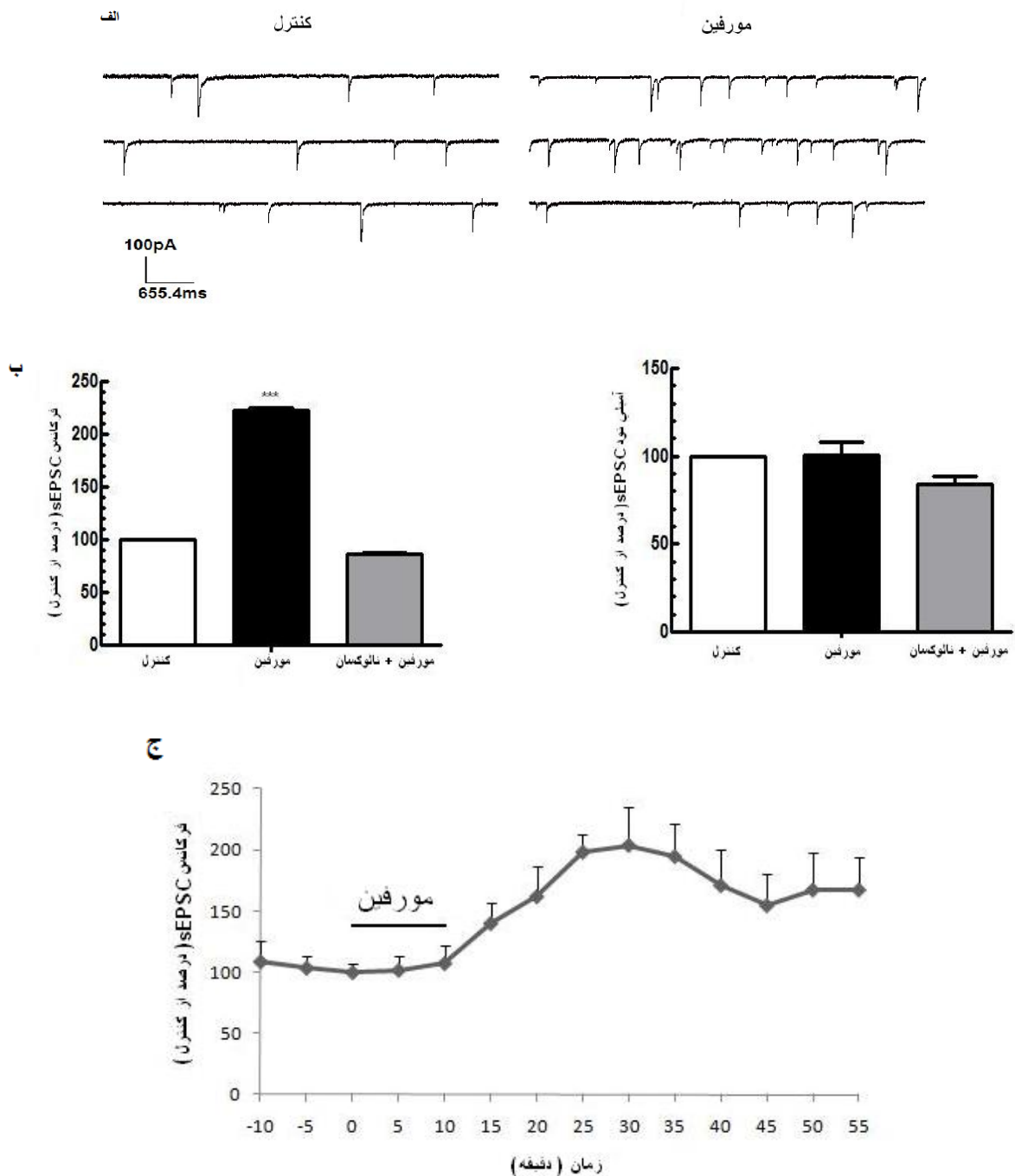
یافته ها

تجویز حداقل دوز موثر مورفین (۲۵ میکرومول) به مدت ۱۰ دقیقه موجب کاهش قابل ملاحظه ($10/55 \pm 32\%$) فرکانس sIPSC ($n = 7, p < 0.001$) و افزایش معنی دار ($2/18 \pm 120\%$) فرکانس sEPSC ($p < 0.001, n = 5$) شد اما اثری بر آمپلی تود sIPSC و sEPSC نداشت. تجویز آنتاگونیست گیرنده اپیویدی نالوکسان (۵۰ میکرومول) به مدت ۱۰ دقیقه قبل از تجویز مورفین از ایجاد اثرات مورفین جلوگیری نمود (شکل ۱ و ۲).

در مطالعه in vivo تجویز داخل صفاقی مورفین (۳۰ mg/kg) موجب افزایش سطح پلاسمایی وازوپرسین ۴۵ دقیقه پس از تزریق شد ($p < 0.001$)، شکل ۳).

بحث

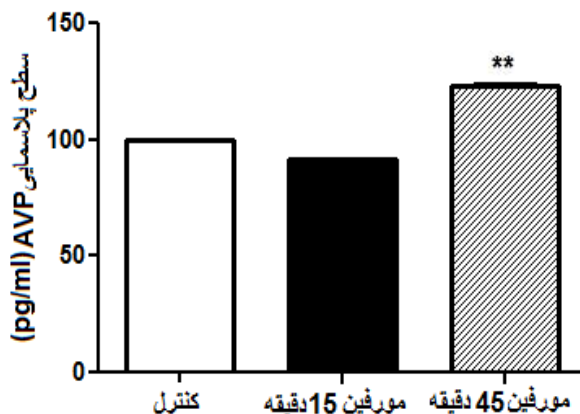
فعالیت نورون های ماگنوسولولار در هسته سوپرا اپتیک به صورت موثری وابسته به ورودی های سیناپسی است. یکی از مهمترین ورودی های سیناپسی به این هسته ورودی های اپیویدی است. اثرات ایجاد شده توسط اپیویدها در هسته



شکل ۲- الف) نمونه های ثبت فرکانس sEPSC قبل و بعد از تجویز مورفین ، ب) تجویز مورفین ($25 \mu\text{m}$) موجب افزایش فرکانس sEPSC می شود اما بر آمپلی تود اثری ندارد، تجویز نالوکسان ($50 \mu\text{m}$) از تاثیر مورفین بر فرکانس جلوگیری می نماید، ج) تغییرات فرکانس sEPSC نورون های ماگنوسولار در طی ثبت، ($n=5$ ، $p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل) هر ستون بیانگر میانگین \pm SEM می باشد.

ناشی از تفاوت در مسیرهای سیگنالینگ فعال شده باشد. از طرف دیگر در مطالعه حاضر یافته های *in vivo* نشان داده اند که تزریق حاد مورفین به صورت داخل صفاقی، ۴۵ دقیقه بعد از تزریق دارو، موجب افزایش سطح پلاسمایی

رستپور های مو بسته به نوع سلولی که در آن قرار دارند از طریق پروتیین های G متفاوت، مسیرهای سیگنالینگ متفاوتی را فعال می نمایند [۱]. به این ترتیب تفاوت مشاهده شده بین انتقالات سیناپسی تحریکی و مهارتی در این مطالعه می تواند



شکل ۳- سطح پلاسمایی وازوپرسین ۱۵ و ۴۵ دقیقه بعد از تزریق مورفین. ۴۵ دقیقه بعد از تزریق مورفین (۳۰ mg/kg) افزایش قابل ملاحظه در سطح پلاسمایی وازوپرسین مشاهده شد اما بر سطح پلاسمایی وازوپرسین ۱۵ دقیقه بعد از تزریق اثری نداشت، (n=۶، p<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل) هر ستون بیانگر میانگین \pm SEM می باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین وسیله تشکر و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که تحقیق حاضر را از نظر مالی حمایت کرده است ابراز می دارند.

واژوپرسین در مقایسه با گروه کنترل می شود. بنابراین به نظر می رسد که افزایش فرکانس sEPSC و کاهش فرکانس sIPSC ایجاد شده توسط تجویز حاد مورفین می تواند موجب افزایش فعالیت نورون های ماگنوسولولار هسته سوپرااپتیک و افزایش ترشح وازوپرسین گردد.

References

- [1] Bodnar, R.J., Endogenous opiates and behavior, *Peptides*, 28(12) (2007) 2435-2513.
- [2] Chang, S.L., Patel, N.A., Romero, A.A., Thompson, J. and Zadina, J.E., FOS expression induced by interleukin-1 or acute morphine treatment in the rat hypothalamus is attenuated by chronic exposure to morphine, *Brain Res*, 736(1-2) (1996) 227-36.
- [3] Decavel, C. and Van den Pol, A.N., GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus, *J Comp Neurol*, 302(4) (1990) 1019-37.
- [4] El Majdoubi, M., Poulain, D.A. and Theodosis, D.T., Lactation-induced plasticity in the supraoptic nucleus augments axodendritic and axosomatic GABAergic and glutamatergic synapses: an ultrastructural analysis using the disector method, *Neuroscience*, 80(4) (1997) 1137-47.
- [5] Inenaga, K., Nagatomo, T., Nakao, K., Yanaihara, N. and Yamashita H., Kappa-selective agonists decrease postsynaptic potentials and calcium components of action potentials in the supraoptic nucleus of rat hypothalamus in vitro, *Neuroscience*, 58(2) (1994) 331-40.
- [6] Korinek, A.M., Languille, M., Bonnet, F., Thibonnier, M., Sasano, P., Lienhart, A. and Viars, P., Effect of postoperative extradural morphine on AVP secretion, *Br J Anaesth*, 57(4) (1985) 407-11.
- [7] Koyuncuoğlu, H., Berkman, K., Hatipoğlu, I. and Sabuncu, H., Vasopressin release by D-aspartic acid, morphine and prolyl-leucyl-glycinamide (PLG) in DI Brattleboro rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 20(4) (1984) 519-25.
- [8] Liu, Q.S., Han, S., Jia, Y.S. and Ju, G., Selective modulation of excitatory transmission by mu-opioid receptor activation in rat supraoptic neurons, *J Neurophysiol*, 82 (1999) 3000-3005.
- [9] Ludwig, M. and Pittman, Q.J., Talking back: dendritic neurotransmitter release, *Trends Neurosci*, 26 (2003) 255-261.
- [10] Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H. and Watson, S.J., Anatomy of CNS opioid receptors,

- Trends Neurosci*, 11 (1988) 308–314.
- [11] Milanés, M.V., Laorden, M.L., Chapleur-Château, M. and Burlet, A., Differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin in discrete brain regions after morphine administration: correlations with hypothalamic noradrenergic activity and pituitary-adrenal response, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 356(5) (1997) 603-10.
- [12] Morris, J.F. and Ludwig, M., Magnocellular dendrites: prototypic receiver/transmitters *J Neuroendocrinol*, 16 (2004) 403–408.
- [13] Muller, W., Hallermann, S. and Swandulla, D., Opioidergic modulation of voltage-activated K⁺ currents in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus in rat, *J Neurophysiol*, 81(1999) 1617-1625.
- [14] Philbin, D.M., Wilson, N.E., Sokoloski, J. and Coggins, C., Radioimmunoassay of antidiuretic hormone during morphine anaesthesia, *Can Anaesth Soc J*, 23(3) (1976) 290-5.
- [15] Robertson, S.A., Hauptman, J.G., Nachreiner, R.F. and Richter, M.A., Effects of acetylpromazine or morphine on urine production in halothane-anesthetized dogs, *Am J Vet Res*, 62(12) (2001) 1922-7.
- [16] Sumner, B.E.H., Coombes, J.E., Pumford, K.M. and Russell, J.A., Opioid subtypes in the supraoptic nucleus and posterior pituitary gland of morphine-tolerant rats, *Neurosci*, 37 (1990) 635–645.
- [17] Van den Pol, A.N., Wuarin, J.P. and Dudek, F.E., Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation, *Science*, 250(1990) 1276–1278.
- [18] Van den Pol, A.N. and Trombley, P.Q., Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission, *J Neurosci*, 13(1993) 2829–2836.
- [19] Wakerley, J.B., Noble, R. and Clarke, G., Effects of morphine and D-Ala, D-Leu enkephalin on the electrical activity of supraoptic neurosecretory cells in vitro, *Neuroscience*, 10(1) (1983) 73-81.
- [20] Wilkens, E.P. and Yates, B.J., Pretreatment with ondansetron blunts plasma vasopressin increases associated with morphine administration in ferrets. *Anesth Analg*, 101(2005) 1029 –33.