

## اثر استرادیول بر سندرم قطع مرفین در موش سفید کوچک اوارکتومی شده وابسته به مرفین

دکتر مهناز کسمتی، دکتر حمیدرضا نماینده

### چکیده

**مقدمه:** اثر استروژن‌ها بر سیستم عصبی توسط پژوهشگران مختلف بررسی شده است. از جمله اثراتی که برای استروژن شناخته شده افزایش انعطاف‌پذیری (پلاستیسیته) در بخش‌های مختلف سیستم عصبی و دخالت در پدیده‌هایی مانند تولید مثل، درد و حافظه است. برخی پژوهشگران برای استروژن نقش نورومدولاتوری را محتمل می‌دانند. در خصوص نقش استروژن‌ها بر پدیده‌های فیزیولوژیک، نتایج ضد و نقیضی گزارش شده است. این مطالعه با هدف تعیین نقش هورمون مذکور در پدیده‌ی وابستگی به مرفین و با ایجاد سندرم قطع مرفین با نالوکسان انجام شده است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از موش سفید آزمایشگاهی با میانگین وزن  $25 \pm 3$  گرم استفاده شد. حیوانات به گروه‌های کنترل (شم)، اوارکتومی شده، اوارکتومی شده‌ی شاهد تزریق (دریافت‌کننده‌ی روغن کنجد)، و گروه‌های اوارکتومی شده‌ی دریافت‌کننده‌ی استرادیول بنزوات به صورت حاد و مزمن تقسیم شدند. همه‌ی گروه‌ها با تزریق زیر جلدی مرفین روزی ۳ بار طی ۴ روز معتاد شدند. در روز چهارم با تزریق نالوکسان ( $20 \text{ mg/kg}$ ) سندرم قطع دارو ایجاد شد. در گروه دریافت‌کننده‌ی استرادیول بنزوات حاد، نیم ساعت قبل از تزریق نالوکسان، این هورمون با دوز ( $0/1 \text{ mg/kg}$ )، زیر جلد تزریق شد و در گروه تزریق مزمن در هر بار تزریق مرفین، حیوان استرادیول بنزوات نیز با دو مذکور دریافت می‌نمود. برای ارزیابی میزان وابستگی به مرفین و شدت سندرم ترک، تعداد پرش‌های حیوان مورد سنجش قرار گرفت. **یافته‌ها:** برداشت غدد جنسی باعث کاهش قابل ملاحظه‌ی وابستگی به مرفین و تجویز استرادیول بنزوات در حیوان فاقد تخمدان، به صورت حاد یا مزمن، باعث افزایش نسبی علامت پرش می‌شود اما این میزان افزایش بسیار کمتر از حالت کنترل می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** غیر از استرادیول احتمالاً عواملی وابسته به جنس در وابستگی فیزیکی به مرفین مؤثر می‌باشند.

**واژگان کلیدی:** استرادیول، مرفین، سندرم قطع دارو، موش سفید آزمایشگاهی، اوارکتومی  
دریافت مقاله: ۸۲/۱۱/۱۳ - دریافت اصلاحیه: ۸۴/۹/۵ - پذیرش مقاله: ۸۴/۹/۸

### مقدمه

شواهد زیادی مبنی بر اثر هورمون‌های جنسی مانند ۱۷ بتا استرادیول و تستوسترون بر بافت‌های عصبی<sup>۱-۳</sup> به ویژه میزان تراکم گیرنده‌های اپیوئیدی و تفاوت توزیع این گیرنده‌ها در دو جنس نر و ماده<sup>۴،۵</sup> وجود دارد.

همکاری سیستم عصبی و غدد درون‌ریز، نقش مهمی در فعالیت‌های فیزیولوژیک و هموستازی بدن ایفا می‌کنند.

تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذای آماده (به صورت پلت) نگهداری شدند.

حیوانات به دو گروه شاهد (شم) و اوارکتومی شده تقسیم شدند. گروه شاهد پس از بیهوشی توسط تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گزیلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، تحت جراحی قرار گرفتند ولی تخمدان‌های آنها برداشته نشد. حیوانات گروه اوارکتومی شد. پس از بیهوشی به کمک جراحی در ناحیه‌ی شکم هر دو تخمدانشان برداشته شد. گروه شم و گروه‌های اوارکتومی شده پس از گذراندن ۱۵ روز دوره‌ی بهبودی برای بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. گروه‌های اوارکتومی شده به زیر گروه‌های: (۱) اوارکتومی شده، (۲) اوارکتومی شاهد تزریق (روغن کنجد) (۳) دو گروه اوارکتومی دریافت کننده استرادیول بنزوات حاد و مزمن تقسیم شدند. همه‌ی گروه‌ها با تزریق مرفین روزی ۳ بار در روز طی ۳ روز معناد شدند. بدین ترتیب که روز اول ۲۵ روز دوم ۵۰ و روز سوم ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مرفین به هر حیوان به صورت زیر جلدی تزریق شد. در روز چهارم یک ساعت پس از دریافت ۷۵ میلی‌گرم هر کیلوگرم مرفین، با تزریق داخل صفاقی نالوکسان (۲۰ میلی‌گرم هر کیلوگرم) سندرم قطع دارو ایجاد شد.<sup>۲۰</sup> در گروه دریافت کننده‌ی استرادیول بنزوات به صورت حاد، نیم ساعت قبل از تزریق نالوکسان، استرادیول بنزوات که در روغن کنجد حل شده بود با دوز (۰/۱ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم)، به صورت زیر جلدی تزریق شد و در گروه تزریق مزمن، حیوان همزمان با مرفین، استرادیول بنزوات نیز دریافت کرد.<sup>۲۱</sup> روغن کنجد به عنوان شاهد تزریق برای گروه‌های دریافت کننده استرادیول بنزوات و با در نظر گرفتن حجم دارو، به صورت زیر جلدی استفاده شد. همه‌ی گروه‌ها از هفت سر موش تشکیل شده بود.

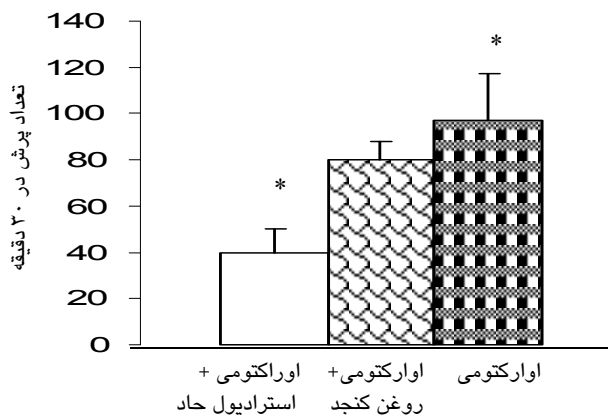
برای ارزیابی میزان وابستگی به مرفین، تعداد پرش‌های حیوان در سندرم قطع دارو پس از تزریق نالوکسان مورد سنجش قرار گرفت. برای شمارش تعداد پرش‌ها، حیوانات در استوانه‌های شیشه‌ای به طول ۳۰ سانتی‌متر و قطر ۱۵ سانتی‌متر در مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و تعداد پرش‌ها شمارش شد.<sup>۲۰</sup> جهت آنالیز داده‌ها از آزمون t و آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی برای مقایسه‌ی میانگین تعداد پرش‌ها و تعیین اختلاف در گروه‌های مختلف استفاده

هورمون‌های جنسی بر سیستم‌های مغزی و به خصوص سیستم‌های اپیوئیدی<sup>۲۶،۲۷</sup> مؤثرند. از آن جمله می‌توان اثر بر بیان ژن mRNA گیرنده‌های اپیوئیدی،<sup>۸،۹</sup> اثر بر میزان فعالیت و نوع تأثیرپذیری سیستم اپیوئیدی؛<sup>۱۰،۱۱</sup> اثر بر بیان ژن mRNA اپیوئیدی‌های درون‌زا<sup>۱۲،۱۳</sup> را نام برد و علاوه بر آن هورمون‌های جنسی با اثر بر نوروترنسمیترهای دخیل در تنظیم سیستم اپیوئیدی، می‌توانند در اعمال سیستم اپیوئیدی دخالت نمایند.<sup>۱۴</sup> همچنین گزارش شده است که استروئیدهای جنسی بر نحوه اثر اپیوئیدها از طریق سایر واسطه‌های شیمیایی مؤثرند.<sup>۲۱،۲۴</sup> بررسی‌های متعدد نشان داده‌اند که بین محل استقرار گیرنده‌های اپیوئیدی و استروئیدی در هسته‌های مختلف مغز همپوشانی وجود دارد.<sup>۱۲،۱۵</sup> تأثیر هورمون‌های جنسی و به ویژه استرادیول بر میزان بی‌دردی حاصل از مرفین مورد توجه بسیاری از پژوهشگران است.<sup>۱۶،۱۷</sup> نشان داده شده که استرادیول سبب کاهش بیدردی حاصل از مرفین می‌شود<sup>۱۸</sup> و همچنین استرادیول می‌تواند تحمل به مرفین را افزایش دهد.<sup>۱۹</sup> باوجود پژوهش‌های گسترده در خصوص نقش استروئیدهای جنسی در پدیده‌های گوناگون فیزیولوژیک، هنوز نقش این هورمون‌ها بر شدت وابستگی به مرفین و سندرم قطع دارو دارای ابهامات زیادی است و اثر هورمون‌های جنسی درون‌زا مانند استرادیول در جنس ماده بر سندرم قطع مرفین مشخص نیست. در این پژوهش تأثیر حذف غدد جنسی (الگوی مشابه زنان یائسه) به عنوان منبع اصلی استروئیدهای جنسی در جنس ماده و نیز تأثیر تجویز استرادیول بنزوات بر سندرم قطع مصرف مرفین مورد بررسی قرار گرفته است. تجویز حاد و مزمن استرادیول بنزوات به منظور بررسی اثر گذرا و یا ماندگار این هورمون جهت بررسی اهمیت درمانی هورمون مذکور و آنتاگونیست‌های آن به عنوان داروی کمکی برای درمان معتادان به ویژه زنان معتاد یائسه انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش سفید آزمایشگاهی نژاد NMRI که از مؤسسه سرم‌سازی رازی تهیه شده بود، استفاده شد. حیوانات وزنی در حدود  $25 \pm 3$  گرم و سنی در حدود ۲ ماه داشتند و در محیط اتاق با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت

علامت پرش در مقایسه با شاهد تزریق نمی‌شود، اما در مقایسه با گروه اوارکتومی که هیچ ماده‌ای دریافت نکرده‌اند اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد ( $p < 0.01$ ). این به دلیل اثر نسبی استرادیول بنزوات بر شدت وابستگی به مرفین می‌باشد. البته نقش روغن کنجد در این پدیده نیاز به بررسی بیشتری دارد.



نمودار ۲- اثر تزریق استرادیول بنزوات به صورت حاد ( $0.1 \text{ mg/kg}$ ) بر تعداد پرش‌های سندرم قطع مرفین در موش ماده‌ی فاقد تخمدان نسبت به حضور و غیاب شاهد تزریق، اختلاف معنی‌داری بین میانگین‌های گروه‌های اوارکتومی شده‌ی دریافت‌کننده‌ی استرادیول بنزوات به صورت حاد و گروه اوارکتومی شده فاقد شاهد تزریق وجود دارد.  $\text{Mean} \pm \text{S.E. } n=7, *P < 0.01$

۳- در نمودار ۳ میانگین تعداد پرش‌ها در موش‌های معتاد اوارکتومی شده‌ی دریافت‌کننده‌ی استرادیول بنزوات به صورت مزمن با موش‌های اوارکتومی شده‌ی شاهد تزریق و گروه اوارکتومی شده که هیچ ماده‌ای دریافت نکرده‌اند مقایسه شده است. نتایج آماری نشان می‌دهد که تزریق استرادیول بنزوات به صورت مزمن با دوز  $0.1$  میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب ایجاد تفاوت قابل ملاحظه‌ای بر علامت پرش نسبت به گروه شاهد تزریق نمی‌شود اما در مقایسه با گروه اوارکتومی شده که هیچ ماده‌ای دریافت نکرده‌اند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد ( $p < 0.01$ ). نقش روغن کنجد به عنوان حامل هورمون قابل بررسی است.

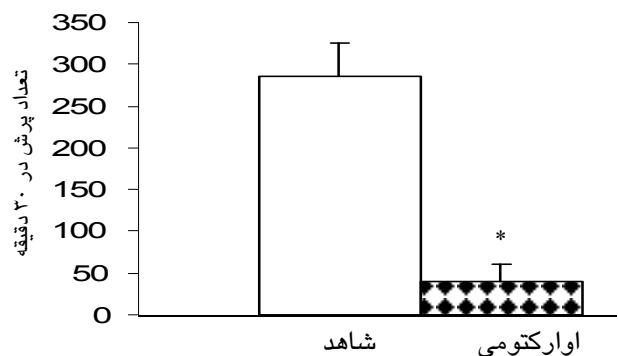
۴- در نمودار ۴ میانگین تعداد پرش‌ها در موش‌های معتاد شاهد (شم)، اوارکتومی شده و اوارکتومی شده‌ی دریافت‌کننده‌ی استرادیول بنزوات به صورت حاد و مزمن ( $0.1$

شد. میانگین‌ها به صورت (انحراف معیار  $\pm$  میانگین) بیان شده است و سطح معنی‌دار بودن  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

نتایج زیر میانگین تعداد پرش‌ها را به عنوان علامت شدت وابستگی به مرفین در گروه‌های مختلف موش‌ها به ترتیب نمودارها نشان می‌دهد.

۱- همچنان‌که در نمودار ۱ ملاحظه می‌شود، میانگین تعداد پرش‌ها در سندرم قطع مرفین در موش‌های سفید آزمایشگاهی معتاد گروه شاهد (شم) و گروه اوارکتومی شده مورد مقایسه قرار گرفته است. نتایج آماری اختلاف معنی‌داری با  $p < 0.0001$  نشان داد. بنا بر این حذف تخمدان یا برداشت هورمون‌های جنسی درون‌زا، سبب کاهش قابل ملاحظه‌ی علامت پرش سندرم قطع مرفین شد که این دلیل تأثیر هورمون‌های جنسی در افزایش شدت وابستگی به مرفین در موش ماده است.



نمودار ۱- اثر حذف تخمدان‌ها بر تعداد پرش‌های سندرم قطع مرفین در موش ماده‌ی وابسته به مرفین. اختلاف معنی‌داری میان میانگین‌های دو گروه وجود دارد.  $*P < 0.0001 \text{ n}=7 \text{ Mean} \pm \text{SE}$

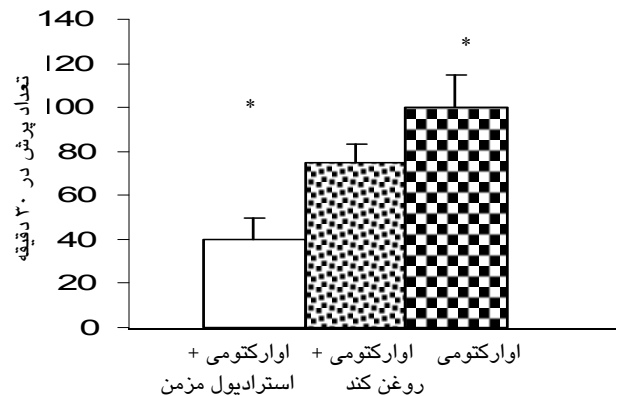
۲- در نمودار ۲ میانگین تعداد پرش‌ها در موش‌های معتاد اوارکتومی شده‌ی دریافت‌کننده‌ی استرادیول بنزوات حاد با گروه اوارکتومی شده‌ی شاهد تزریق و گروه اوارکتومی که هیچ ماده‌ای دریافت نکرده بودند مقایسه شده است. نتایج آماری نشان می‌دهد که استرادیول بنزوات حاد با دوز  $0.1$  میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم اختلاف قابل ملاحظه‌ای بر

**بحث**

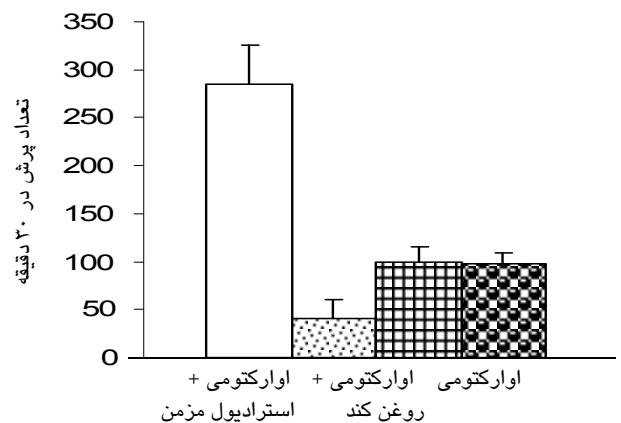
مطالعه‌ها نشان داده است که هورمون‌های جنسی می‌توانند بر اپیوئیدهای سیستم عصبی مؤثر باشند<sup>۲۰،۲۱</sup> و همچنین آثار ضد درد آنها را تحت تأثیر قرار دهند.<sup>۲۲-۲۴</sup> در این مطالعه نقش استرادیول بر وابستگی به مرفین مورد توجه بوده است. با توجه به نتایج، مشاهده شد که حذف غدد جنسی در موش سفید آزمایشگاهی ماده، تأثیر بسیار زیادی در کاهش علامت سندرم قطع مرفین ایجاد می‌نماید. گزارش‌هایی مبنی بر اثر استرادیول بر میزان اپیوئیدهای درون‌زا وجود دارد، به طوری که نشان داده شده است تجویز استرادیول سبب کاهش انکفالین‌های لو و مت در هیپوفیز قدامی موش صحرایی ماده می‌شود و نیز مشخص شده که برداشت تخمدان‌ها سبب افزایش انکفالین مت و لو در این حیوان می‌گردد.<sup>۲۰،۲۳</sup>

مدارکی وجود دارد که استروئیدهای جنسی عملکرد گیرنده‌های اپیوئیدی مغز را تقویت می‌کنند. از جمله اینکه تعداد گیرنده‌های مو در طی دوره‌های ماهیانه در هیپوتالاموس تغییر می‌کند. همچنین نشان داده شده تعداد گیرنده‌های مو اپیوئیدی در هیپوتالاموس و استریاتوم موش‌های صحرایی اوارکتومی شده هنگامی که به وسیله استرادیول و پروژسترون یک فید بک مثبت بر روی آزاد سازی LH ایجاد شود، کاهش می‌یابد. همچنین تجویز استرادیول به تنهایی سبب فیدبک منفی شده، میزان LH را کاهش می‌دهد، در نتیجه گیرنده‌های مو در هیپوتالاموس و هیپوکمپ افزایش می‌یابد.<sup>۲۱،۱۱</sup> به علاوه، معلوم گردید اوارکتومی باعث افزایش سطح دینورفین A و B می‌شود،<sup>۲۵،۱۱</sup> که نشان دهنده‌ی کاهش دینورفین در حضور استروژن می‌باشد. گزارش‌های دیگر حاکی از آن است که استروژن سبب کاهش تراکم گیرنده‌های اپیوئید در نقاط مختلف مغز می‌شود،<sup>۲۶</sup> ولی گزارش‌هایی موجود است که نشان می‌دهد برداشت تخمدان سبب افزایش جایگاه‌های اتصال نالوکسان در مقایسه با موش‌های صحرایی پرو استروس سالم در تمام نواحی هیپوتالاموس می‌شود. درمان با استروژن سبب کاهش جایگاه‌های اتصال نالوکسان می‌گردد،<sup>۲۷</sup> اما در مورد اثر استروژن بر بیان ژن انکفالین مو مشخص شده است که استروژن سبب افزایش بیان ژن انکفالین می‌شود و این عمل را به طور مستقیم و بدون واسطه‌ی سایر نوروترنسمیترها

میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) مورد مقایسه قرار گرفته است. نتایج آماری اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های دریافت کننده‌ی استرادیول به صورت حاد و مزمن نشان نداد. مشخص گردید تزریق استرادیول چه به صورت حاد و مزمن به تنهایی نمی‌تواند تعداد پرش‌ها را در سندرم قطع مرفین به حالت طبیعی برگرداند که این به دلیل دخالت سایر عوامل در وابستگی فیزیکی به مرفین می‌باشد.



**نمودار ۲- اثر تزریق استرادیول بنزوات به صورت مزمن (0.1 mg/kg) بر تعداد پرش‌های سندرم قطع مرفین در موش ماده‌ی فاقد تخمدان نسبت به حضور و غیاب شاهد تزریق، اختلاف معنی‌داری بین میانگین‌های گروه‌های اوارکتومی شده دریافت کننده‌ی استرادیول بنزوات به صورت مزمن و گروه اوارکتومی شده‌ی فاقد شاهد تزریق وجود دارد. \*p<0.01 n=7 Mean+S.E**



**نمودار ۴- مقایسه‌ی میانگین پرش‌های سندرم قطع مرفین بین گروه‌های کنترل، اوارکتومی شده و اوارکتومی شده‌ی دریافت کننده‌ی استرادیول بنزوات به صورت حاد و مزمن، n=7 Mean+S.E**

سبب آزادسازی اپیوئیدهای درونی می‌شود.<sup>۲۸</sup> به این ترتیب می‌توان گفت که هورمون استروژن می‌تواند در پدیده وابستگی به مرفین تا اندازه‌ای مؤثر باشد، اما همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، مصرف استرادیول به صورت حاد و مزمن تغییر اندکی در میزان پرش سندرم قطع مرفین ایجاد می‌کند و در دوز ذکر شده وابستگی به مرفین به حالت طبیعی بر نمی‌گردد. این می‌تواند مربوط به سایر عوامل هورمونی یا غیرهورمونی باشد. به این ترتیب ممکن است استروژن‌ها به تنهایی در پدیده وابستگی فیزیکی به مرفین نقش نداشته باشند و به کمک سایر هورمون‌های جنسی این نقش را ایفا کنند. جهت بررسی سایر عوامل پیشنهاد می‌شود سهم هورمون‌های دیگر به ویژه پروژسترون مورد توجه قرار گیرد.

انجام می‌دهد.<sup>۲۸</sup> گیرنده‌های اپیوئیدی مو به صورت گیرنده‌ی متصل به G پروتئین عمل می‌کنند و پس از اتصال اپیوئیدهای درون‌زا با آزاد کردن زیر واحدهای G پروتئین عمل خود را انجام می‌دهند و گیرنده‌ها نیز به دنبال این عمل وارد سلول می‌شود. به نظر می‌رسد استروژن وارد شدن گیرنده‌های اپیوئیدی را افزایش می‌دهد.<sup>۲۹</sup> این مطلب بیانگر اثر مثبت استروژن بر افزایش علائم سندرم قطع مرفین است. چرا که همانند خود اپیوئیدها سبب کاهش گیرنده‌های سطحی اپیوئیدی می‌شود و از این طریق می‌تواند وابستگی را بیشتر نماید. برخی مطالعه‌ها مشخص نموده‌اند که تجویز استروژن بعد از یک ساعت سبب افزایش رونویسی mRNA پروانکفالین می‌شود.<sup>۳۰</sup> تجویز استروژن در رت‌های اوارکتومی شده سبب درونی شدن گیرنده‌های اپیوئیدی می‌شود و نالوکسان از درونی شدن گیرنده‌های اپیوئید جلوگیری می‌کند. بیان این مسأله نشان می‌دهد که استروژن

## References

1. Yoshikawa K, Hong JS. Sex-related difference in substance P level in rat anterior pituitary: a model of neonatal imprinting by testosterone. *Brain Res* 1983; 273: 362-5.
2. Hong JS, Yoshikawa K, Lamartiniere CA. Sex-related difference in the rat pituitary [Met5]-enkephalin level-altered by gonadectomy. *Brain Res* 1982; 251: 380-3.
3. Yoshikawa K, Hong JS. The enkephalin system in the rat anterior pituitary: regulation by gonadal steroid hormones and psychotropic drugs. *Endocrinology* 1983; 113: 1218-27.
4. Hammer RP. Mu-opiate receptor binding in the medial preoptic area is cyclical and sexually dimorphic. *Brain Res* 1990; 515: 187-92.
5. Barrett C, Cook CD, Turner JM, Roach EL. Sex and rat strain determine sensitivity to opioid induced antinociception. *Psychopharmacology (Berl)* 2002; 160: 170-81.
6. Gear RW, Miaskowski C, Gordon NC, Paul SM, Heller PH, Levine JD. Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men. *Nat Med* 1996; 2: 1248-50.
7. Gear RW, Gordon NC, Heller PH, Paul S, Miaskowski C, Levine JD. Gender difference in analgesic response to the kappa-opioid pentazocine. *Neurosci Lett* 1996; 205: 207-9.
8. Balthazart J, Surlémont C, Harada N. Aromatase as a cellular marker of testosterone action in the preoptic area. *Physiol Behav* 1992; 51: 395-409.
9. Panzica G, Panzica V, Balthazart J, Montalcini RV. Sexual dimorphism in the neuronal circuits of the quail preoptic and limbic regions *Microsc Res Tech* 2001; 54: 364-374.
10. Gutierrez M, Menendez L, Hidalgo A, Baamonde A. Study of the density of opioid receptors in the male mouse brain at different stages of sexual maturation. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999; 21(7): 459-62.
11. Piva F, Limonta P, Dondi D, Pimpinelli F, Martini L, Maggi R. Effects of steroids on the brain opioid system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 343-8.
12. Schwarz S, Pohl P. Steroids and opioid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 48: 391-402.
13. Cicero TJ, Nock B, O'Connor L. Naloxone does not reverse the inhibitory effect of morphine on luteinizing hormone secretion in prepubescent male rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264: 47-53.
14. Diano S, Naftolin F, Horvath TL. Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study. *Endocrinology* 1997; 138: 778-89.
15. Maggi R, Limonta P, Dondi D, Piva F. Modulation of the binding characteristics of hypothalamic mu opioid receptors in rats by gonadal steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40: 113-21.
16. Lipa SM, Kavaliers M. Sex differences in the inhibitory effects of the NMDA antagonist MK-801, on morphine and stress-induced analgesia. *Brain Res Bull* 1990; 24: 627-30.
17. Kasson BG, George R. Endocrine influences on the actions of morphine, Effects of sex and strain. *Life Sci* 1984; 34: 1627-34.
18. Baragas B, ciaranello E. *Psychopharmacology from theory to practice. Active news Australia* 1997; 2-3.
19. Kest B, Brodsky CE, Sadowski B, Belknap JK, Mogil I. Mu and delta opioid receptor density in analgesia. *Brain Res* 1999; 816: 381-9.
20. Kest B, Palmese CA, Hopkins E, Adler M, Juni A. Assessment of acute and chronic morphine dependence

- in male and female mice. *Pharm Biochem and Behav* 2001; 70: 149-159
21. Sinchak K, Micevych PE. Progesterone Blockade of Estrogen Activation of  $\mu$ -Opioid Receptors Regulates Reproductive Behavior. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21: 5723-29.
  22. Kavaliers M, Choleris E. Sex differences in N-methyl- d -aspartate involvement in kappa opioid and non-opioid predator-induced analgesia in mice. *Brain Res* 1997; 768-30.
  23. Banarjee P, Chatterjee TK, Ghosh JJ. Ovarian steroids and modulation of morphine-induced analgesia and catalepsy in female rats. *Eur J Pharmacol* 1983; 96: 291-4.
  24. Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur J Pain* 2004; 8: 397-411.
  25. Martini L, Dondi D, Limonta P, Maggi R, Piva F. Modulation by sex steroids of brain opioid receptors: implications for the control of gonadotropins and prolactin secretion. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 673-81.
  26. Maggi R, Ma ZQ, Pimpinelli F, Maggi A, Martini L. Decrease of the number of opioid receptors and of the responsiveness to morphine during neuronal differentiation induced by 17beta-estradiol in estrogen receptor-transfected neuroblastoma cells (SK-ER3). *Neuroendocrinology* 1999; 69: 54-62.
  27. Weiland NG, Wise PM. Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain regions. *Endocrinology* 1999; 126: 804-808.
  28. Akesson TR, Micevych PE. Endogenous opioid immunoreactive neurons of the ventromedial hypothalamic nucleus concentrate estrogen in male and female rats. *J Neurosci Res* 1991; 28: 359-66.
  29. Sinchak K, Micevych PE. Progesterone blockade of estrogen activation of mu-opioid receptors regulates reproductive behavior. *J Neurosci* 2001; 21: 5723-9.
  30. Romano GJ, Mobbs CV, Howells RD, Pfaff DW. Estrogen regulation of proenkephalin gene expression in the ventromedial hypothalamus of the rat: temporal qualities and synergism with progesterone. *Brain Res Mol Brain Res* 1989; 5: 51-8.
  31. Sinchak K, Micevych PE. Progesterone Blockade of Estrogen Activation of  $\mu$ -Opioid Receptors Regulates Reproductive Behavior. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21: 5723-29.