

The effect of GABA_B receptors in CA1 region of hippocampus on morphine tolerance in female Wistar race rats by conditioned place preference

Firoozeh Alavian¹, **Saeedeh Ghiasvand**²

1. Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran, (Corresponding Author), Tel: 031-34616165, Email: f.alavian@cfu.ac.ir. ORCID ID: 0000-0001-6866-8988

2. Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Malayer University, Malayer, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5589-4545

ABSTRACT

Background and Aim: The hippocampus is a region of the brain that plays an important role in learning activities, including conditioned place preference (CPP). This area is widely used as the target of the studies on the reinforcing effects of the drugs and narcotics. Considering the wide distribution of GABA_B receptors in the hippocampus CA1 region, these receptors are likely to play an important role in drug reward learning.

Materials and Methods: Wistar female rats were divided into 17 groups (N=7). Different amounts of morphine (0.5, 2.5, 5, 7.5, and 10 mg/kg) were injected subcutaneously to determine the effective dose of morphine. 3 days before induction of conditioned place preference, the animals received morphine injection (12.5 mg/kg) in order to induce tolerance. Then, baclofen as a stimulant (agonist) of GABA_B receptors; and also, CGP35348 as an inhibitor of these receptors (antagonists) were injected into the CA1 region of the hippocampus.

Results: 5 mg/kg of morphine was considered as the effective dose at the significance level of $P < 0.001$. Baclofen at the doses of 6 mg/kg and 1/5 mg/kg increased tolerance to morphine ($P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively). CGP35348 at a dose of 6 mg/kg significantly reduced morphine tolerance ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of this study confirmed the importance of GABA_B receptors in the CA1 region of the hippocampus in morphine tolerance in female rats.

Keywords: Rat, GABA_B, Morphine, Tolerance

Received: Apr 7,2019

Accepted: Nov 9,2019

How to cite the article: Firoozeh Alavian, Saeedeh Ghiasvand. The effect of GABA_B receptors in CA1 region of hippocampus on morphine tolerance in Wistar rats by conditioned place preference. SJKU 2020; 24 (6): 79-92

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثر گیرنده‌های GABA_B موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر کسب تحمل به مورفین در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار به روش ترجیح مکان شرطی شده

فیروزه علویان^۱، سعبده قیاسوند^۲

۱. استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران. (مولف مسئول) پست الکترونیک: F.alavian@cfu.ac.ir تلفن ثابت: ۰۳۱-۳۴۶۱۶۱۶۵ کد ارکید: ۸۹۸۸-

۰۰۰۰-۰۰۰۱-۶۸۶۶

۲. استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۵۸۹-۴۵۴۵

چکیده

زمینه و هدف: هیپوکمپ ناحیه‌ای از مغز است که نقش مهمی در فعالیت‌های یادگیری؛ از جمله ترجیح مکان شرطی شده دارد. این ناحیه به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان هدف مطالعات اثرات تقویت‌کننده داروها و مواد مخدر مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف مطالعه حاضر تعیین اثر گیرنده‌های GABAB موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر کسب تحمل به مورفین در موش‌های صحرایی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی (Rats) ماده نژاد ویستار به ۱۷ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. مقادیر مختلف مورفین (۱۰ mg/kg و ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۰/۵) به صورت زیرجلدی برای تعیین دوز مؤثر مورفین استفاده شدند. به‌منظور القای تحمل به مورفین، دوز ۱۲/۵ mg/kg، ۳ روز قبل از القاء ترجیح مکان شرطی شده به حیوانات تزریق شد. سپس، باکلوفن به عنوان محرک (آگونیست) گیرنده‌های GABAB؛ همچنین، CGP35348 به عنوان مهارکننده این گیرنده‌ها (آنتاگونیست)، به درون ناحیه CA1 هیپوکمپ تزریق شدند.

یافته‌ها: دوز ۵ mg/kg از مورفین با سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۰۱$ به‌عنوان دوز مؤثر در نظر گرفته شد. باکلوفن در دوز mg/kg ۶ ($P < ۰/۰۵$) باعث کاهش تحمل به مورفین شد و ۱/۵ mg/kg ($P < ۰/۰۵$) باعث افزایش تحمل به مورفین و CGP35348 در دوز mg/kg ۶ ($P < ۰/۰۵$) باعث کاهش تحمل به مورفین شدند.

نتیجه‌گیری: این نتایج اهمیت گیرنده‌های GABA_B ناحیه CA1 هیپوکمپ در تحمل به مورفین در موش‌های صحرایی ماده را تأیید کرد.

کلمات کلیدی: موش صحرایی، GABA_B، مورفین، تحمل

وصول مقاله: ۹۸/۱/۱۸ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۸/۲ پذیرش: ۹۸/۸/۱۸

مقدمه

اینترنورون‌های گابائریک واسطه چندین ویژگی کلیدی در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی هستند. آن‌ها برای برقراری تعادل بین ورودی‌های تحریکی و مهارتی ضروری هستند (۱). اگرچه اینترنورون‌های گابائریک درصد کمی از نورون‌های مغز را به خود اختصاص می‌دهند، اختلال در شبکه گابائریک به سرعت منجر به عواقب مضر مانند بیماری‌های عصبی و اعتیاد می‌شود (۲-۴). چندین زیر گروه از اینترنورون‌های GABAergic وجود دارند که برخی از آن‌ها در مسیر لیمبیک حضور دارند (۵ و ۶). نوروترانسمیتر گابا آمینو بوتیریک اسید (GABA) با اثر بروی ۳ نوع گیرنده گابا A، گابا B و گابا C، بر روی این اینترنورون‌ها عمل می‌کند (۷).

تحقیقات نشان داده برخی ساختمان‌های لیمبیک مانند آمیگدالا، قشر پیشانی و هیپوکمپ می‌توانند از طریق تعدیل فعالیت هسته آکومبنس در پاداش دارویی نقش داشته باشند (۸ و ۹). مهم‌ترین مسیر عصبی پاداش دارویی شامل نورون‌های دوپامینرژیک است که از ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) منشأ گرفته و سپس از طریق دسته پیشین مغزیانی (MFP) به هسته آکومبنس، پیاز بویایی، قشر پیشانی، هیپوکمپ، آمیگدالا و سیتوم ختم می‌شوند. ثابت شده، شلیک نورون‌های دوپامینرژیک در این مسیر تحت اثر مهار تونیک اینترنورون‌های گابائریک که در VTA قرار دارند، موجب کاهش رهایش دوپامین در هسته آکومبنس و کاهش میزان پاداش در آنجا می‌گردد (۱۰-۱۲). کارایی نهایی تنظیم پاداش دارویی، به دلیل تعامل سیناپسی هایپرپلاریزاسیون گیرنده‌های GABA با مکانیسم‌های نوسانی ذاتی تنظیم شده در سلول‌های هر می هیپوکمپ است (۱۳). به طور کلی، هیپوکمپ، به‌ویژه مدار نوکرتکس-هیپوکمپ-نووکرتکس، به‌طور گسترده‌ای در حافظه مربوط به پاداش نقش دارد و تعدیل جریان اطلاعات در این مدار به شدت تحت تأثیر عناصر مهارتی مانند نورون‌های گابائریک است (۱۴). در بحث اعتیاد و

وابستگی و با در نظر گرفتن مسیرهای تحریکی یا مهارتی پاداش مغزی، دو موضوع تحمل و حساسیت مطرح است؛ تحمل به معنای کاهش اثربخشی با دوز ثابتی از یک دارو و یا نیاز به دوز افزایشی برای نگه‌داشتن همان اثرات دارو است. تحمل دارویی به دو مرحله کسب و بیان تقسیم می‌شود: کسب وقایع عصبی سریع و فوری است؛ و بیان، پاسخ‌های رفتاری طولانی مدت است (۳ و ۴).

با توجه به اینکه، ناحیه CA1 هیپوکمپ در وابستگی روانی و دارویی نقش مهمی دارد (۱۷-۱۵)، به نظر می‌رسد این ناحیه یکی از مراکز مهم وابستگی روانی سوء مصرف و تحمل به داروهایی همچون مورفین باشد؛ به‌طوری‌که محققان متعددی در مطالعات خود به بررسی ارتباط وابستگی دارویی مرتبط با گیرنده‌های GABA موجود در این ناحیه با CPP پرداخته‌اند (۱۸ و ۱۶)؛ اما تاکنون بر روی نقش گیرنده‌های GABAB در کسب تحمل به مورفین در ناحیه CA1 هیپوکمپ در جنس ماده، مطالعه‌ای صورت نگرفته است. با توجه به اینکه اعتیاد به خودی خود بیماری پیچیده و مزمنی است که به عوامل مختلفی بستگی دارد؛ همچنین، نقش بسیار مهم زنان در خانواده؛ و در نظر گرفتن این مهم که آسیب‌های ناشی از اعتیاد زنان علاوه بر آسیب‌های فردی، جامعه و خانواده را نیز به شدت تحت‌الشعاع خود قرار می‌دهند، مصرف مواد مخدر توسط زنان، اغلب ناهنجارتر از مردان است (۱۹). از سوی دیگر، شواهد زیادی در تایید تفاوت بین حیوانات نر و ماده در پاسخ به مورفین (۲۱ و ۲۰)، وجود دارد. بر این اساس، بدین منظور، روش ترجیح مکان شرطی شده (conditioned place preference; CPP) را که امروزه به‌عنوان مدلی استاندارد جهت ارزیابی پاداش دارویی و اعتیاد روانی در حیوانات به کار می‌رود را انتخاب نمودیم (۲۲). احتمالاً، کشف اساس عصبی شرطی سازی ناشی از مواد مخدر، گامی مهم در تعدیل رفتار ناشی از سوء مصرف دارویی خواهد بود تا بر اساس نتایج حاصل، بتوان تدابیری در کاهش تمایل به اعتیاد زنان اندیشید. هدف از این تحقیق استفاده از یک مدل آزمایشیگاهی، اعتیاد

روانی را در حیوانات ماده تجربه نماییم و با مهار و تحریک گیرنده های $GABA_B$ ناحیه CA1 هیپوکمپ، به بررسی نقش این گیرنده ها در روند کسب تحمل به مورفین و رفتارهای مشاهده شده بپردازیم.

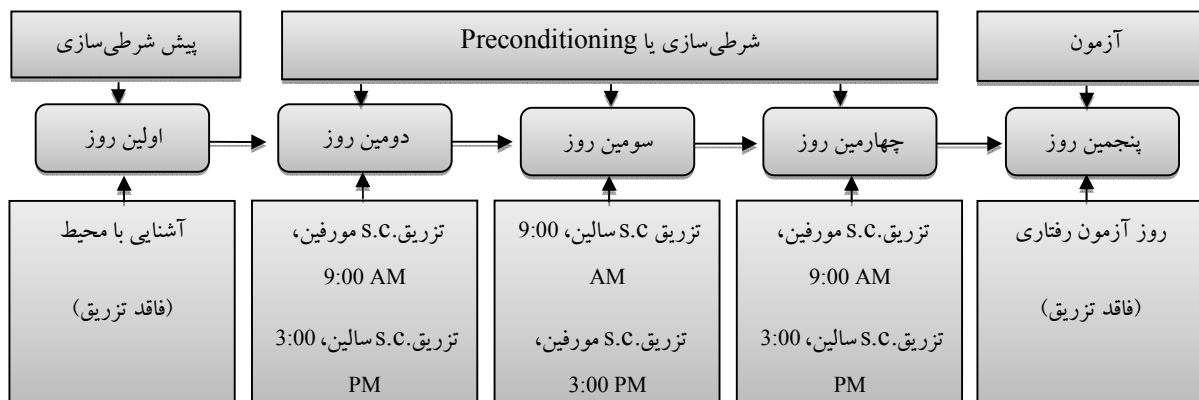
روش بررسی

حیوانات آزمایشگاهی: در این مطالعه تجربی، از موش های بزرگ آزمایشگاهی ماده نژاد ویستار (۲۷۰-۲۲۰ گرم، انستیتو پاستور) استفاده شد و از هر حیوان در طول آزمایش ها فقط یک بار استفاده گردید. حیوانات شامل ۱۷ گروه بودند (۶ گروه برای تعیین منحنی دوز-پاسخ (دست آوردن دوزهای مؤثر و بی اثر مورفین)، ۳ گروه برای تعیین دوز مربوط به تحمل، یک گروه کنترل تحمل، ۶ گروه از دوزهای مختلف آگونیست و آنتاگونیست در مرحله کسب حساسیت به مورفین و یک گروه سالین برای مقایسه با گروه های آگونیست و آنتاگونیست. تعداد اعضای هر گروه ۷ عدد در نظر گرفته شد. حیوانات در قفس های مخصوص؛ و دسترسی به آب و غذا کافی نگهداری شدند. محل نگهداری حیوانات دارای دوره روشنایی - تاریکی ۱۲/۱۲ ساعته و دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد؛ بدون هرگونه آلودگی صوتی بود. تمامی آزمایش ها بر اساس اصول رفتار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد (۲۳ و ۴ و ۳).

داروها: شامل مورفین سولفات (شرکت بهان سار، ایران)، باکلوفن و CGP35348 (Sigma, Germany)، کتامین هیدرات و زایلازین (Rutex medicine, Switzerland) بودند. باکلوفن، CGP35348 و مورفین قبل از استفاده در سالین ۹٪ حل شدند. باکلوفن و CGP35348 با حجم های ۱/۵، ۶ و ۱۲ mg/kg به درون ناحیه CA1 هیپوکمپ (i-CA1) تزریق شدند (۴). مورفین به صورت زیر جلدی (s.c.) تزریق شد (با غلظت های ۱،

۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ mg/kg). گروه های کنترل، سالین دریافت می کردند (۲۳ و ۴).

روش جراحی و تزریق دارو: موش های صحرایی از طریق تزریق داخل صفاقی کتامین هیدرو کلرید (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۴ mg/kg) بی هوش شدند. پس از بیهوشی کامل، موهای پشت سر حیوانات را زدوده و حیوانات به دستگاه استریوتاکسی (Inomed, Germany) منتقل می شدند. به وسیله قیچی استریل، پوست جمجمه را از زیر چشم ها تا نزدیکی گوش ها به طور طولی برش داده و توسط گیره هایی به طرفین کشیده می شد. سپس، سطح استخوان را توسط پنبه استریل کاملاً تمیز کرده تا دو ناحیه برگما و لامبدا مشخص شوند. در مرحله بعد، موقعیت قرارگیری کانول راهنما را با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۹۸۶) به مختصات (۲۴): ۳- تا ۳/۵- میلی متر (بسته به وزن حیوان) از برگما (خلفی - قدامی)؛ $1/8 \pm 2$ میلی متر از خط وسط (میانی - جانبی)؛ و ۲/۸- تا ۳- از سطح جمجمه (خلفی - شکمی) محاسبه می شد، نقاط به دست آمده را علامت گذاری کرده و سپس با استفاده از مته، دو سوراخ روی استخوان جمجمه تا پرده منتر ایجاد شد. در مرحله بعد، به کمک دستگاه استریوتاکس، کانول راهنما (تهیه شده از سر سرنگ شماره ۲۲ و از جنس فولاد ضد زنگ) را به صورت دوطرفه درون محل های سوراخ شده قرار داده تا یک میلی متر بالاتر از ناحیه CA1 قرار گیرد. سپس کانول تعبیه شده، با آکریل آمید دندان پزشکی محکم شد. به منظور جلوگیری از بسته شدن مجرای کانول، این مجرا توسط سیم فولادی ضد زنگ تا زمان تزریق دارو مسدود می گردید. بعد از پایان جراحی، به همه حیوانات اجازه داده می شد که برای بهبود از عمل جراحی و حذف ماده بی هوشی، به مدت یک هفته استراحت داشته باشند (۱۶).



شکل ۱. دوره زمانی مربوط به ترجیح مکان شرطی شده (CPP). AM, Ante Meridiem; PM, Post Meridiem; s.c., Subcutaneous

زمان سپری شده در هر قسمت دستگاه در این روز به کمک کرونومتر اندازه گیری و ثبت می شد.

ب- مرحله شرطی سازی یا Preconditioning: این مرحله، فردای روز پیش شرطی سازی شروع می شد و ۳ روز ادامه داشت. ابتدا، درب گیوتینی دستگاه گذاشته می شد تا ارتباط بین دو قسمت دستگاه قطع شود. حیوانات ساعت ۹ صبح روز دوم (روز اول شرطی سازی)، مورفین را به صورت زیرجلدی دریافت می کردند (با غلظت های ۰/۵، ۲، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ mg/kg) و به مدت ۴۵ دقیقه در یکی از دو قسمت دستگاه قرار می گرفتند. شش ساعت بعد (ساعت ۳ بعدازظهر)، به موش های صحرایی سالین تزریق می شد و مجدداً به مدت ۴۵ دقیقه در قسمت دیگر جعبه قرار می گرفتند. روز سوم زمان تزریق مورفین و سالین برعکس می شد (صبح سالین و عصر مورفین). در روز چهارم، شرایط و تزریقات مانند روز دوم بود.

ج- مرحله پس شرطی سازی یا آزمون: در روز پنجم، دریچه گیوتینی برداشته می شد، هر حیوان جداگانه داخل جعبه گذاشته می شد و به مدت ۱۰ دقیقه آزادانه در دستگاه حرکت می کرد. مدت زمان توقف حیوان در هر طرف دستگاه اندازه گیری می شد و زمان طی شده توسط حیوان در قسمت دریافت مورفین از زمان توقف در طرف دریافت

برای تزریق داروهای آگونیست (باکلوپن) و CGP35348 به i-CA1 از یک کانول تزریق که از سرنگ شماره ۲۷ تهیه شده و توسط رابطی پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون (Hamilton, USA) متصل بود، استفاده شد. این کانول حدود یک دقیقه در محل خود باقی می ماند تا از انتقال داروهای آگونیست و آنتاگونیست به درون ناحیه CA1 اطمینان حاصل شود.

آزمون رفتاری CPP: برای القاء CPP از جعبه ای چوبی دوقسمتی با ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ cm (طول، عرض و ارتفاع) که توسط یک دریچه گیوتینی میانی می توانستند باهم در ارتباط باشند، استفاده شد. پس زمینه دیوارهای هر دو طرف سفید؛ ولی هر طرف دارای علائم و تزئینات متفاوت از طرف دیگر بود. روش CPP استفاده شده در این تحقیق از نوع غیر طرفدار بود؛ به طوری که حیوانات تمایل خاصی به هیچ یک از دو قسمت نشان نمی دادند. دوره آزمایش های CPP با برنامه پنج روزه و ۳ مرحله مشخص می شود (شکل ۱) که عبارت اند از (۲۳ و ۱۶ و ۳):

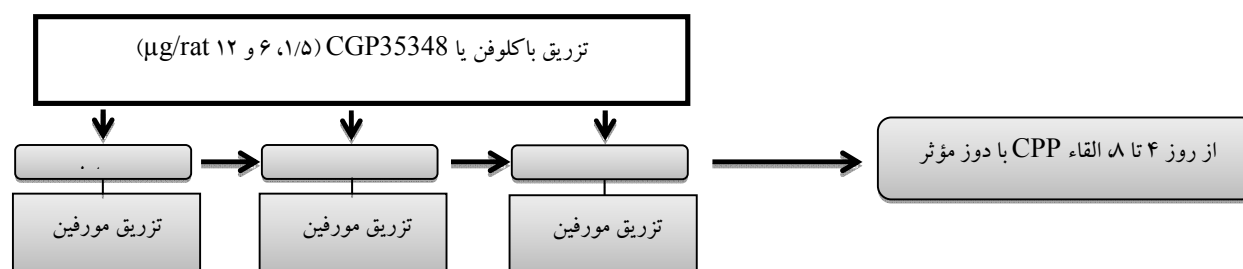
الف- آشنایی با محیط یا پیش شرطی سازی: در اولین روز القاء CPP، با برداشتن دریچه گیوتینی، هر حیوان به مدت ۲۵ دقیقه داخل دستگاه قرار می گرفت تا به هر دو طرف دستگاه دسترسی داشته باشد و با محیط داخلی آن آشنا شود.

زیادی از موش‌های صحرایی شدند. بر این اساس، در آزمایش‌های بعدی از دوز ۱۲/۵ mg/kg مورفین برای ایجاد تحمل استفاده شد.

القاء کسب تحمل به مورفین: به منظور بررسی اثر داروهای آگونیست و آنتاگونیست بر روی کسب CPP، این داروها در مرحله شرطی‌سازی از CPP، ۵ دقیقه قبل از تزریق دوز بالای مورفین (هر ۳ روز) به i-CA1 تزریق می‌شدند (۴) (شکل ۲).

سالمین کم شده و به عنوان نمره شرطی‌شدن در نظر گرفته می‌شد.

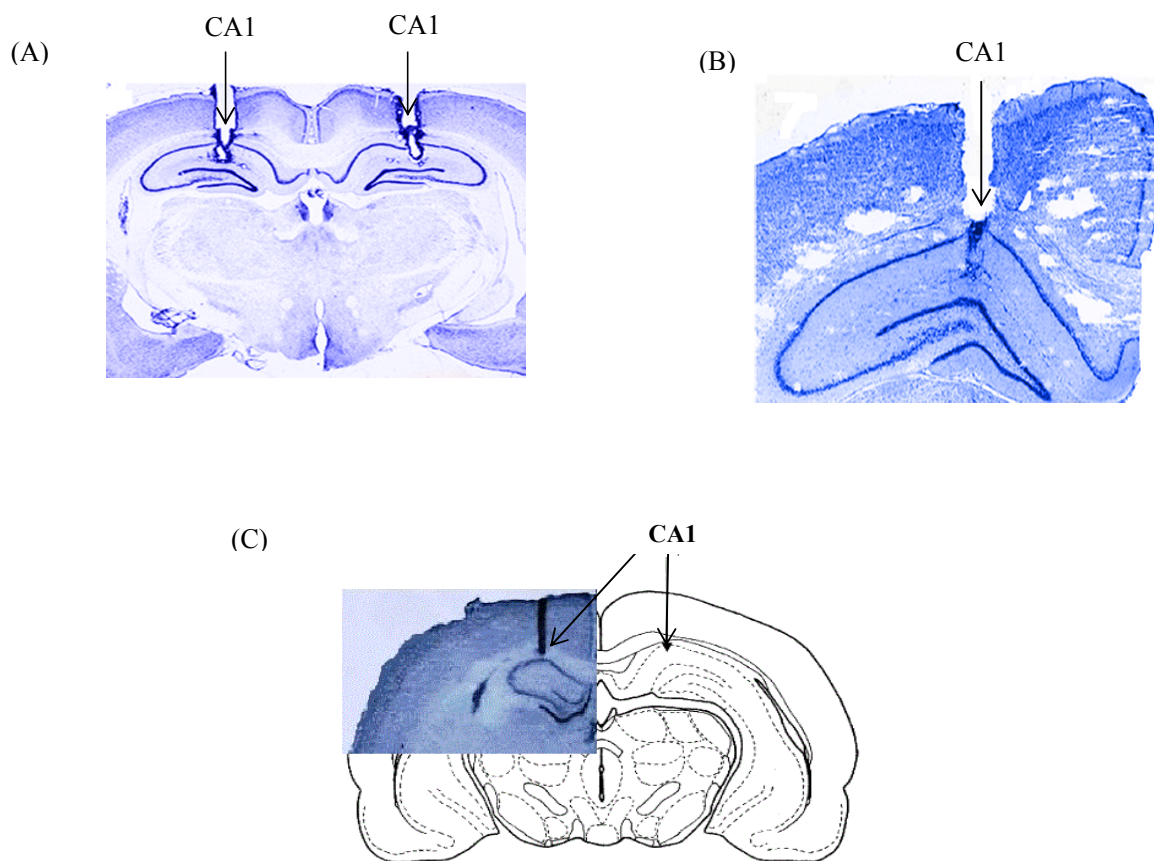
القاء تحمل به مورفین: اساس اعمال تحمل به مورفین بر اساس کارهای قبلی ما بود (۴). حیوانات به مدت ۳ روز و یک‌بار در روز (۹:۰۰ صبح)، تحت تیمار با دوزهای بالای مورفین (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ mg/kg)، قرار می‌گرفتند. از روز چهارم، CPP با دوز مؤثر مورفین (۵ mg/kg، s.c.) اعمال شد. دوزهای ۲۵ و ۵۰ mg/kg منجر به مرگ تعداد



شکل ۲. دیاگرام مراحل زمانی مربوط به کسب تحمل به مورفین. iCA1, Intra-CA1; AM, Ante Meridiem; s.c, Subcutaneous.

متیلن‌بلو مشخص می‌شد. در نهایت، صحت موقعیت کانول با تصویر موقعیت CA1 موجود در اطلس پاکسینوس و واتسون مقایسه می‌شد و موش‌های صحرایی فاقد رنگ در ناحیه CA1 از تجزیه و تحلیل آماری حذف می‌شدند (شکل ۳).

تأیید بافت‌شناسی: پس از کامل‌شدن آزمون رفتاری، داخل هر کانول ۰/۵ میکرولیتر از محلول یک درصد متیلن‌بلو تزریق می‌شد. سپس، هر حیوان با مصرف دوز بالای کلروفورم کشته شده و مغز حیوان پس از خروج از جمجمه، درون فرمالین ۱۰٪ تثبیت می‌گردید. پس از تثبیت مغزها، از آن‌ها مقاطع مغزی تهیه شد و موقعیت تزریق به کمک رنگ

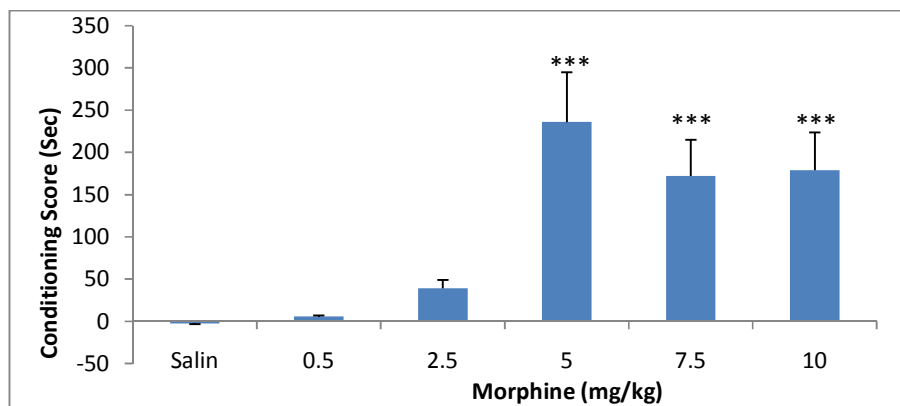


شکل ۳. موقعیت کانول راهنما در ناحیه CA1 هیپوکمپ در بزرگنمایی‌های مختلف (A, B, C) از برش بافتی مغز موش صحرایی جراحی شده و مقایسه آن با اطلس پاکینوس و واتسون.

یافته‌ها

منحنی دوز-پاسخ برای CPP مورفین در تعیین دوز مؤثر و بی‌اثر مورفین: نمودار ۱، CPP حاصل از تزریق دوزهای مختلف مورفین (۰/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ mg/kg, s.c.) انجام شد. نتایج نشان داد که در دوزهای ۱۰ mg/kg s.c. و ۷/۵ و ۵ در حیوانات ترجیح مکان شرطی شده معنی‌داری را نشان می‌دهند؛ دوز ۵ mg/kg با بهترین پاسخ، به عنوان دوز مؤثر و دوز ۰/۵ mg/kg با کم‌ترین پاسخ، به عنوان دوز بی‌اثر در نظر گرفته شدند (نمودار ۱).

محاسبات آماری: نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین مقادیر متغیر تعیین شد. نتایج به وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه؛ و پس‌آزمون بن فرونی ارزیابی شدند و اختلاف $P < 0/05$ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار آماری Prism (Version 5, San Diego, USA, 1994) انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.



نمودار ۱. منحنی دوز-پاسخ مربوط به القاء ترجیح مکان شرطی شده توسط مورفین. حیوانات در ۳ روز شرطی سازی، دوزهای مختلف مورفین را دریافت نمودند. در روز آخر، حیوانات بدون هیچ گونه تزریقی تست شدند ($N=7$ ، داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ و $P < 0.001$ *** نسبت به گروه سالین سنجیده شده است).

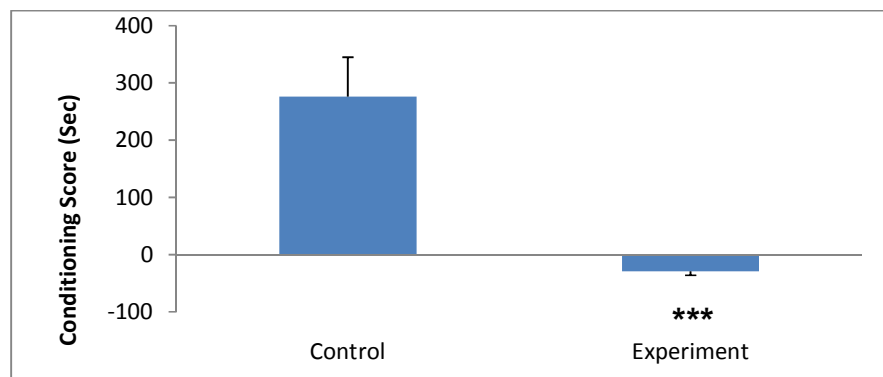
دقیقه بعد از تزریق مورفین (۱۲/۵ mg/kg, s.c.)، باکلوفن با دوزهای ۱۲ mg/kg و ۶ و ۱/۵ به i-CA1 تزریق گردید. سپس، CPP با دوز مؤثر مورفین (۱۲/۵ mg/kg, s.c.) انجام شد.

نتایج نشان داد که باکلوفن با دوزهای ۱/۵ ($P < 0.05$ *) و ۶ mg/kg ($P < 0.01$ **) باعث کاهش معنی دار کسب تحمل به مورفین می شود (نمودار ۳).

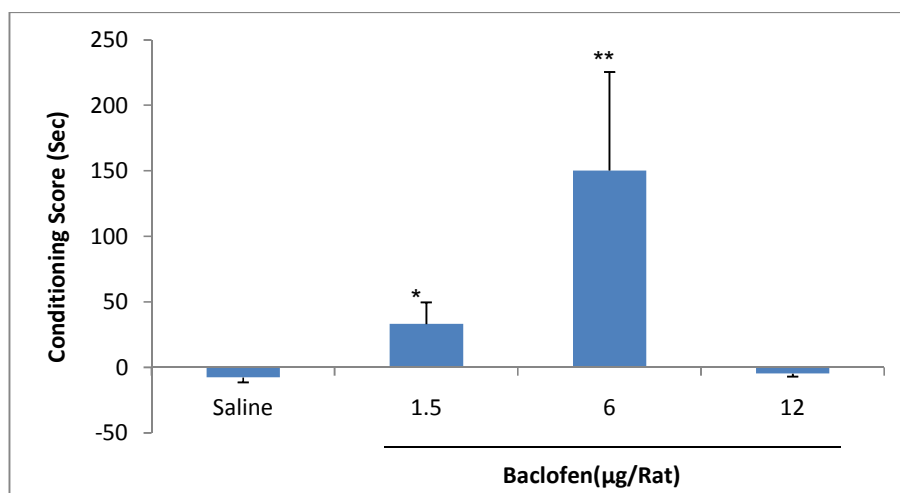
اثرات تزریق آنتاگونیست گیرنده GABAB (CGP35348) به i-CA1 بر کسب تحمل به مورفین: در سه روز اول قبل از CPP، ۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین (۱۲/۵ mg/kg, s.c.)، CGP35348 با دوزهای ۱۲ و ۶ و ۱/۵ به i-CA1 تزریق گردید. مراحل شرطی سازی با مورفین (۵ mg/kg, s.c.) انجام گردید. نتایج نشان داد که دوز ۶ mg/kg باعث کاهش معنی دار کسب تحمل به مورفین شد ($P < 0.05$ *) (نمودار ۴).

اثر مورفین ۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم بر روی مهار CPP در حیوانات تحمل یافته: حیوانات در سه روز اول مورفین ۱۲/۵ mg/kg, s.c. دریافت کردند و طی مراحل CPP با دوز مؤثر ۵ mg/kg, s.c. نسبت به مورفین شرطی شدند. حیوانات گروه کنترل، در سه روز اول به جای مورفین، سالین دریافت کردند. این گروه در روزهای شرطی سازی، نسبت به مورفین شرطی شده و در روز تست تمایل زیادی به محل دریافت مورفین از خود نشان دادند. در حالی که موش های گروه آزمایش که در روزهای القاء تحمل (۳ روز قبل از CPP) دوز بالای مورفین را (۱۲/۵ mg/kg) دریافت کرده بودند، در روزهای شرطی سازی نسبت به دوز کمتر مورفین، شرطی نشده و در روز آزمون تمایل زیادی به محل دریافت مورفین نشان ندادند (نمودار ۲).

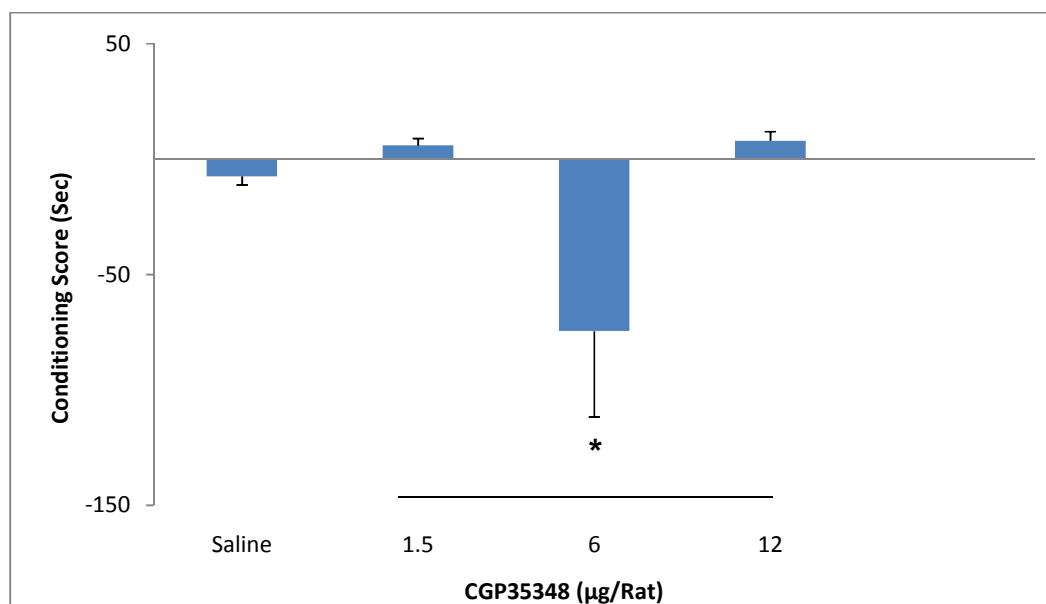
اثرات تزریق آگونیست گیرنده GABA_B (باکلوفن) به i-CA1 بر کسب تحمل به مورفین: ۳ روز قبل از CPP و ۵



نمودار ۲. اثر مورفین (۵ mg/kg و S.C) در ایجاد ترجیح مکان شرطی شده در موش‌های تحمل یافته به مورفین. در مقایسه با گروه کنترل، دوز ۱۲/۵ mg/kg مورفین می‌تواند باعث تحمل در حیوانات شود و بنابراین CPP مهار می‌شود (N=۷) و داده‌ها به صورت Mean ± SEM است. $P < 0.001$ *** نسبت به گروه کنترل سنجیده شده است).



نمودار ۳. اثرات تزریق باکلوفن (آگونیست گیرنده $GABA_B$) به i-CA1 بر کسب تحمل به مورفین (N=۷) و داده‌ها به صورت Mean ± SEM است. $P < 0.05$ * و $P < 0.01$ ** نسبت به سالیन سنجیده شده است).



نمودار ۴. اثرات تزریق CGP35348 (آنتاگونیست گیرنده $GABA_B$) به $i-CA1$ بر روی کسب تحمل به مورفین ($N=7$ و داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ است و $P < 0.05$ * نسبت به سالین سنجیده شده است).

بحث

آزمایش‌های ما نشان داد که تجویز مورفین، قادر به القاء CPP در حیوانات ماده است که با نتایج حاصل از تحقیقات قبلی که بر روی موش‌های نر و ماده انجام شده است، همخوانی دارد؛ هرچند، تغییراتی در دوز مورفین در تحقیقات مختلف به چشم می‌خورد، با این وجود، این تحقیقات بر توانایی مورفین در القاء اثرات پاداشی مثبت تأکید دارند (۲۵ و ۱۶ و ۴ و ۳). شواهد متعددی نشان داده‌اند که مورفین اثر تقویت‌کننده مثبت خود را از طریق فعال شدن گیرنده‌های μ -opioid واقع در VTA اعمال می‌کند (۲۷ و ۲۶ و ۴) در هیپوکمپ، افزایش رها شدن دوپامین باعث بهبود یادگیری و تسریع تثبیت حافظه می‌گردد. در واقع، هیپوکامپ و نورون‌های دوپامینرژیک VTA یک حلقه عملکردی تشکیل می‌دهند که فعال‌سازی این حلقه باعث تقویت یادگیری بلندمدت می‌شود (۲۸). شاید به همین دلیل باشد که جزء یادگیری ترجیح مکان شرطی شده می‌تواند تحت تأثیر تخریب هیپوکمپ و یا تجویز

آنتاگونیست‌های گیرنده دوپامینی $CA1$ هیپوکمپ از بین برود و در نتیجه مورفین قادر به القاء ترجیح مکان شرطی شده نباشد (۲۹). با توجه به اینکه برخی مطالعات آزمایشگاهی روی حیوانات نشان داده‌اند که آگونیست‌های گیرنده $GABA_B$ در حافظه بلند مدت اختلال ایجاد می‌کنند (۳۰ و ۱۹)؛ ممکن است تزریق باکلوفن به $CA1$ باعث کاهش یادگیری شود که به نوبه خود ترجیح مکان ناشی از مورفین را کاهش می‌دهد.

با این وجود، پیچیدگی سیناپس‌ها در این ناحیه و تنوع موقعیت گیرنده‌های $GABA_B$ باعث شده‌اند که نتایج مطالعات قابل پیش‌بینی نباشند. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که انواع متعددی از گیرنده‌های $GABA_B$ در غشاء نورون‌ها وجود دارند که برخی پیش‌سیناپسی و برخی دیگر پس‌سیناپسی هستند (۳۱ و ۲۰). گیرنده‌های $GABA_{BR1a}$ پیش‌سیناپسی، گیرنده‌های $GABA_{BR1b}$ پس‌سیناپسی و گیرنده‌های $GABA_{BR2}$ به هر دو شکل پیش و پس سیناپسی وجود دارند. فعال‌شدن گیرنده‌های پیش‌سیناپسی

CGP35348 به i-CA1 پاسخ‌های جالبی در کسب CPP ناشی از مورفین در موش‌های صحرایی ماده تحمل یافته به مورفین ایجاد کرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ممکن است زیرگروه‌هایی از گیرنده‌های GABA_B در CA1 وجود داشته باشند که در کسب CPP مورفین در موش‌های صحرایی تحمل یافته نقش داشته باشند. برخی از این گیرنده‌ها تحریکی و برخی دیگر مهار هستند؛ به‌طوری‌که تحریک آن‌ها سبب افزایش تحمل و مهار این گیرنده‌ها، پاسخ حیوانات به مورفین را کاهش داد.

در مطالعه ما، اثر تحریکی باکلوفن در افزایش تحمل به مورفین، موافق با پژوهش‌های انجام‌شده قبلی در هسته CeA آمیگدال (۴) و اثر مهار CGP35348 مخالف با یافته‌های قبلی در هسته CeA آمیگدال و پوسته هسته آکومبیس است (۳۷ و ۴). مطالعات متعددی تأیید کرده‌اند که تحمل به مورفین مشکل اصلی درمان به اعتیاد است (۳۹ و ۳۸). برخی از داده‌ها نشان داده‌اند که مهار گیرنده‌های GABA_B پیش‌سیناپسی منجر به انتشار بیشتر GABA نورون‌های GABAergic و افزایش پاسخ‌های مهار GABA است (۴۰). در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که اثر تحریکی باکلوفن در افزایش تحمل به مورفین، همچنین، اثر مهار CGP35348 در کاهش تحمل به مورفین؛ با توجه به نقش مهار گیرنده‌های گابا، دور از انتظار باشد؛ اما با توجه به تنوع گیرنده GABA_B این احتمال وجود دارد که گیرنده‌های BAGA_B پیش و پس‌سیناپسی ناحیه CA1 هیپوکمپ در کسب تحمل به مورفین دخیل باشند؛ به‌طوری‌که تحریک برخی باعث تضعیف و مهار برخی دیگر از این گیرنده‌ها منجر به تقویت پاسخ حیوان به مورفین شده باشد. همچنین، پاسخ باکلوفن وابسته به دوز بود؛ به‌طوری‌که بهترین پاسخ در دوز ۶ mg/rat مشاهده شد؛ بنابراین، امکان دارد باکلوفن یک گزینه درمانی مفید در درمان تحمل به مورفین باشد. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که باکلوفن باعث افزایش تحمل به مورفین در موش‌های صحرایی است (۳۴ و ۳۳ و ۴). در مورد اثر تقویتی

GABA_B از آزادشدن انتقال‌دهنده‌های عصبی گابا جلوگیری می‌کنند و با توجه به مهار بودن انتقال دهنده گابا، تحریک گیرنده‌های GABA_{BR1}، اثر تحریکی و مهار آن‌ها، اثر مهار را به دنبال دارد (۳۳-۳۱). در حالی که، تحریک گیرنده‌های پس‌سیناپسی باعث طولانی‌تر شدن هایپرپولاریزاسیون می‌شود؛ بنابراین تحریک گیرنده‌های GABA_{BR1b} باعث بروز مهار و مهار آن‌ها سبب تحریک سلول هدف می‌گردد (۳۲). با توجه به تنوع این گیرنده‌ها، احتمال دارد که در مطالعات مختلف، انواع متفاوتی از زیرگروه‌های گیرنده‌های GABA_B فعال شوند و نتایج متفاوتی مشاهده شود (۳۲ و ۳۱ و ۱۳). علاوه بر این، ممکن است نوسانات هورمونی سیکل‌های جنسی نیز، نتایج را تحت تأثیر خود قرار دهند (۳۳).

محققان تأکید کرده‌اند که موش ماده در مقایسه با موش‌های نر، حساسیت بیشتری نسبت به ترجیح مکان شرطی‌شده به مورفین دارند (۲۳ و ۱۶). در مطالعه حاضر نیز، حیوانات ماده پاسخ‌گویی خوبی به مورفین را از خود نشان دادند؛ که علت آن را تأثیر تستوسترون برافزایش متابولیسم مورفین ذکر کرده‌اند. به علاوه به نظر می‌رسد یک حالت همکاری بین استرادیول (استروژن‌ها به‌طور کل) و مورفین در مهار نورون‌های GABA_{erg} مغز وجود داشته باشد (۳۴). تزریق دوز بالایی از مورفین باعث ایجاد تحمل در موش‌های صحرایی است. این حیوانات نسبت به موش‌های تحمل نیافته، حساسیت کمتری به مورفین نشان دادند. این نتیجه با مطالعات قبلی موافق است که نشان دادند موش‌های تحمل یافته به مورفین، میل کمتری به مورفین دارند (۳۴ و ۴).

باوجود مطالعات متعدد در مورد نقش گیرنده‌های GABA_B بر روی تحمل به مورفین و خواص تقویت‌کننده مثبت آن (۳۶ و ۳۵ و ۴)، در مورد نقش این گیرنده‌ها در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر روی CPP ناشی از مورفین در موش‌های تحمل یافته به مورفین اطلاعاتی وجود دارند. در مطالعه حاضر، تزریق باکلوفن (آگونیست گیرنده GABA_B)، همچنین آنتاگونیست گیرنده GABA_B

ارتباطات پیچیده و تعامل پیچیده بین سلول‌ها ممکن است دلیل نتایج پیچیده ما و نتایج مختلف مربوط به مطالعات محققان دیگر باشد. با این حال، قضاوت نهایی در این مورد، مستلزم تحقیقات گسترده‌تر است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که گیرنده‌های GABA_B ناحیه CA1 هیپوکمپ ممکن است نقش مهمی در ترجیح مکان شرطی شده به مورفین در موش‌های تحمل یافته به مورفین داشته باشد و ممکن است این گیرنده‌ها اهداف مناسبی برای درمان تحمل به مواد مخدر باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله، نویسندگان مقاله، نهایت سپاس و تشکر خود از خانم مژگان حبیبی در بهبود کیفیت تصاویر مقاله را اعلام می‌دارند. همچنین، از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه فرهنگیان و معاونت پژوهشی دانشگاه ملایر تقدیر و تشکر می‌نمایند.

CGP35348 در کاهش تحمل به مورفین و تقویت پاسخ به مورفین نیز بهترین پاسخ در دوز ۶ mg/rat مشاهده شد. ممکن است عدم پاسخ به دوز ۱۲ mg/rat در کاربرد آگونیست و آنتاگونیست، مربوط به فعال‌شدن انواع متفاوتی از زیرگروه‌های خاص و یا مدارهای مهاري واسطه‌ای دیگری باشد که نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

مکانیزم‌های سلولی و مولکولی که اثرات باکلوفن یا CGP35348 را تحت تأثیر قرار می‌دهند به‌خوبی شناخته نشده‌اند. ثابت‌شده که با کلوفن غلظت Adenosine-mono-phosphate cyclic (cAMP) را طی تحمل به مورفین کاهش می‌دهد (۳۲).

در تحقیق حاضر، دوره جنسی حیوانات در نظر گرفته نشد. در هر صورت، این واقعیت انکارناپذیر است که نوسانات هورمونی چرخه جنسی موش‌های صحرایی ماده می‌تواند اثرات متفاوتی در زمان‌های مختلف داشته باشند (۴۱). همچنین، سیناپس‌های متعدد بین نورون‌های GABAergic در هیپوکمپ وجود دارد که خروجی نهایی آن‌ها ممکن است مهاري یا تحریکی باشد (۴۲). این

References

1. Marín O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *NAT*. 2012;13(2):107.
2. Kullmann DM, Moreau AW, Bakiri Y, Nicholson E. Plasticity of inhibition. *Neuron*. 2012;75(6): 951-62.
3. alavian f, sahraei H, Ghiasvand S. Effects of central amygdala GABA-B on expression of morphine-induced sensitivity in female rats. *koomesh*. 2019;21(2): 365-73.
4. Alavian F, Ghiasvand S. GABAB receptors within the central nucleus of amygdala may involve in the morphine-induced incentive tolerance in female rats. *IJBMS*. 2017;20(7):822-8.
5. Avoli M, de Curtis M. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *PROG NEUROBIOL*. 2011;95(2):104-23.
6. Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *PROG NEUROBIOL*. 2005;75(2):143-60.
7. Hirano T. GABA Pathways and Receptors. *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*: Springer; 2016. p. 225-9
8. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):217.
9. Kutlu MG, Gould TJ. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learn Mem*. 2016;23(10):515-33.
10. Volkow ND, Wise RA, Baler R. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *NAT*. 2017;18(12):741.

11. Nestler EJ, Carlezon Jr WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*. 2006;59(12):1151-9.
12. Van Zessen R, Phillips JL, Budygin EA, Stuber GD. Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *NEURON*. 2012;73(6):1184-94.
13. Cobb S, Buhl E, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*. 1995;378(6552):75.
14. Freund TF, Antal M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*. 1988;336(6195):170.
15. Elahi-Mahani A, Heysieattalab S, Hosseinmardi N, Janahmadi M, Seyedaghamiri F, Khoshbouei H. Glial cells modulate hippocampal synaptic plasticity in morphine dependent rats. *Brain Res. Bull*. 2018;97:106-140.
16. Rezayof A, Razavi S, Haeri-Rohani A, Rassouli Y, Zarrindast M-R. GABAA receptors of hippocampal CA1 regions are involved in the acquisition and expression of morphine-induced place preference. *EUR NEUROPSYCHOPHARM*. 2007;17(1):24-31.
17. Nasehi M, Piri M, Pournaghshband M, Aghazadeh Amiri M, Ramazankhani O. Interaction between dopamine D1 and NMDA receptors in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2010;15(3):29-39.
18. Zarrindast M-R, Massoudi R, Sepehri H, Rezayof A. Involvement of GABAB receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. *PHYSIOL BEHAV*. 2006;87(1):31-8.
19. Modaberi S, Heysieattalab S, Shahbazi M, Naghdi N. Combination Effects of Forced Mild Exercise and GABAB Receptor Agonist on Spatial Learning, Memory, and Motor Activity in Striatum Lesion Rats. *J. Mot. Behav*. 2019;51(4):438-50.
21. Koulen P, Malitschek B, Kuhn R, Bettler B, Wässle H, Brandstätter JH. Presynaptic and postsynaptic localization of GABAB receptors in neurons of the rat retina. *EJN*. 1998;10(4):1446-56.
21. Benarroch EE. GABAB receptors: structure, functions, and clinical implications. *J. Neurol*. 2012;78(8):578-84.
22. Huston JP, de Souza Silva MA, Topic B, Müller CP. What's conditioned in conditioned place preference? *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(3):162-6.
23. Alavian F, Ghiasvand S, Sahraei H, Rafiei-Rad M. Intervention of the Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptors of the Amygdala Central Nucleus on the Sensitivity of the Morphine-Induced Conditionally Preferred Location in Wistar Female Rats. *AHJ*. 2017;9(2):110.
24. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Academic Press, Orlando, FL. 1986.
25. Karami M, Zarrindast MR, Sepehri H, Sahraei H. Role of nitric oxide in the rat hippocampal CA1 area on morphine-induced conditioned place preference. *Eur*. 2002;449(1-2):113-9.
26. Wasserman DI, Tan JM, Kim JC, Yeomans JS. Muscarinic control of rostromedial tegmental nucleus GABA neurons and morphine-induced locomotion. *EJN*. 2016;44(1):1761-70.
27. Sutton LP, Ostrovskaya O, Dao M, Xie K, Orlandi C, Smith R, et al. Regulator of G-protein signaling 1 regulates reward behavior by controlling opioid signaling in the striatum. *Biol Psychiatry*. 2016;80(3):235-45.
28. Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *NEURON*. 2005;46(5):703-133.
29. Richtand NM, Woods SC, Berger SP, Strakowski SM. D3 dopamine receptor, behavioral sensitization, and psychosis. *NEUROSCI BIOBEHAV R*. 2001;25(5):427-43.
30. Ebrahimi-Ghiri M, Rostampour M, Jamshidi-Mehr M, Nasehi M, Zarrindast M-R. Role of CA1 GABAA and GABAB receptors on learning deficit induced by D-AP5 in passive avoidance step-through task. *Brain Res*. 2018;1678:164-73.
31. Bowery N, Bettler B, Froestl W, Gallagher J, Marshall F, Raiteri M, et al. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -aminobutyric acid B receptors: structure and function. *Pharmacological reviews*. 2002;54(2):247-64.

32. Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors. *Physiol. Rev.* 2004;84(3):835-67.
33. López-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Paulsen O, Fairen A, Lujan R. Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. *EJN.* 2002;15(11):1766-78.
34. Carroll ME, Lynch WJ, Roth ME, Morgan AD, Cosgrove KP. Sex and estrogen influence drug abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 2004;25(5):273-9.
35. Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine-induced place preference: interactions with neurotransmitter systems. *IJPR.* 2007;3-15.
36. Macey DJ, Froestl W, Koob GF, Markou A. Both GABAB receptor agonist and antagonists decreased brain stimulation reward in the rat. *Neuropharmacology.* 2001;40(5):676-85.
37. Rafieirad M, SAHRAEI H, HAERI RSA, SEPEHRI H, ALAVIAN DS, Ghoshouni H, et al. The modulatory role of gaba-b receptors of the shell part of nucleus accumbens in the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in morphine-sensitized rats. 2007;11(3):181-191.
38. Eidson LN, Murphy AZ. Inflammatory Mediators of Opioid Tolerance: Implications for Dependency and Addiction. *Peptides.* 2019.
39. Seyedaghamiri F, Heysieattalab S, Hosseinmardi N, Janahmadi M, Elahi-Mahani A, Salari F, et al. Hippocampal glial cells modulate morphine-induced behavioral responses. *PHYSIOL BEHAV.* 2018;191:37-46.
40. Bernard C, Cossart R, Hirsch J, Esclapez M, Ben-Ari Y. What is GABAergic inhibition? How is it modified in epilepsy? *Epilepsia.* 2000;41:S90-S5.
41. Craft R, Stratmann J, Bartok R, Walpole T, King S. Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 1999;143(1):1-7.
42. Gulyás A, Görös T, Freund T. Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience.* 1990;37(1): 31-44.