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

Firoozeh Alavian [1], 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 GABAB 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 شرطی‌شده

فیروزه علویان[۱]، **سعیده قیاسوند**[۲]

۱. استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران. (مولف مسئول) پست الکترونیک: F.alavian@cfu.ac.ir تلفن ثابت: ۳۴۶۱۶۱۶۵-۰۳۱ کد ارکید: ۸۹۸۸-۶۸۶۶-۰۰۰۱-۰۰۰۰

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

چکیده

زمینه و هدف: هیپوکمپ ناحیه‌ای از مغز است که نقش مهمی در فعالیت‌های یادگیری؛ ازجمله ترجیح مکان شرطی‌شده دارد. این ناحیه به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان هدف مطالعات اثرات تقویت‌کننده داروها و مواد مخدر مورداستفاده 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 (mg/kg ۱۰ و ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۰/۵) به صورت زیرجلدی برای تعیین دوز مؤثر مورفین استفاده شدند. به‌منظور القای تحمل به مورفین، دوز mg/kg ۱۲/۵، ۳ روز قبل از القاء ترجیح مکان شرطی‌شده 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 mg/kg ۵ از مورفین با سطح معنی‌داری P< ۰/۰۰۱ به‌عنوان دوز مؤثر در نظر گرفته شد. باکلوفن در دوز mg/kg ۶ (P< ۰/۰۱) و mg/kg ۱/۵ (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 گابائرژیک واسطه چندین ویژگی کلیدی در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی هستند. آن‌ها برای برقراری تعادل بین ورودی‌های تحریکی و مهاری ضروری هستند(۱). اگرچه اینترنورون‌های گابائرژیک درصد کمی از نورون‌های مغز را به خود اختصاص می‌دهند، اختلال در شبکه گابائرژیک به‌سرعت منجر به عواقب مضر مانند بیماری‌های عصبی و اعتیاد می‌شود(۴-۲). چندین زیر گروه از اینترنورون‌های GABAergic وجود دارند که برخی از آن‌ها در مسیر لیمبیک حضور دارند(۶ و ۵). 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(۹ و ۸ و ۴). مهم‌ترین مسیر عصبی پاداش دارویی شامل نورون‌های دوپامینرژیکی است که از ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) منشأ گرفته و سپس از طریق دسته پیشین مغزمیانی (MFP) به هسته آکومبنس، پیاز بویایی، قشر پیشانی، هیپوکمپ، آمیگدالا و سپتوم ختم می‌شوند. ثابت‌شده، شلیک نورون‌های دوپامینرژیک در این مسیر تحت اثر مهار تونیک اینترنورون‌های گابائرژیک که در VTA قرار دارند، موجب کاهش رهایش دوپامین در هسته آکومبنس و کاهش میزان پاداش در آنجا می‌گردد(۱۲-۱۰). کارایی نهایی تنظیم پاداش دارویی، به دلیل تعامل سیناپسی هایپرپلاریزاسیون گیرنده‌های GABA با مکانیسم‌های نوسانی ذاتی تنظیم‌شده در سلول‌های هرمی هیپوکمپ است(۱۳). به‌طور کلی، هیپوکمپ، به‌ویژه مدار نئوکرتکس-هیپوکمپ-نئوکرتکس، به‌طور گسترده‌ای در حافظه مربوط به پاداش نقش دارد و تعدیل جریان اطلاعات در این مدار به‌شدت تحت تأثیر عناصر مهاری مانند نورون‌های گابائرژیک است(۱۴). در بحث اعتیاد و وابستگی و با در نظر گرفتن مسیرهای تحریکی یا مهاری 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 طولانی‌مدت است(۴ و۳).

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 سوءمصرف و تحمل به داروهایی همچون مرفین باشد؛ به‌طوری‌که محققان متعددی در مطالعات خود به بررسی ارتباط وابستگی دارویی مرتبط با گیرنده‌های GABA موجود در این ناحیه با CPP پرداخته‌اند(۱۸و۱۶)؛ 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 و۲۰)، 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 آزمایشگاهی، اعتیاد

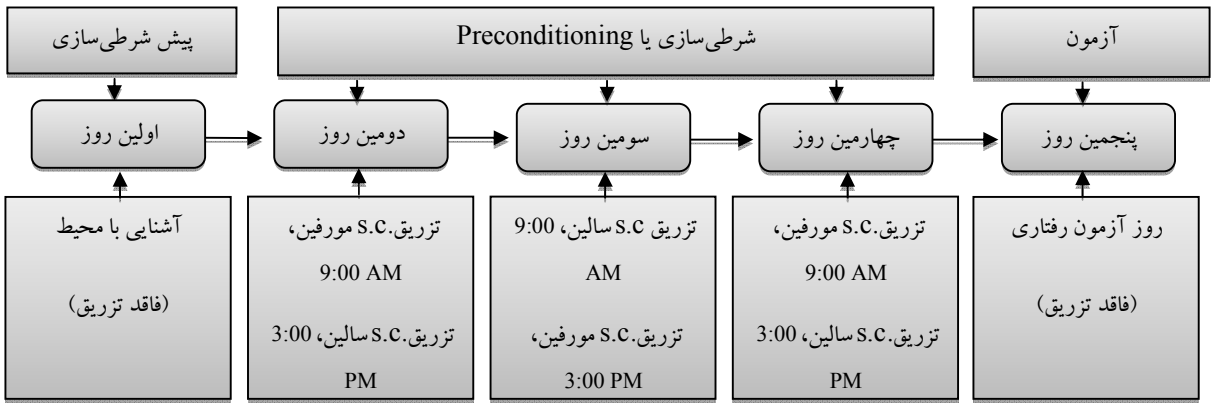
روانی را در حیوانات ماده تجربه نماییم و با مهار و تحریک گیرنده‌های $GABA_B$ ناحیه CA1 هیپوکمپ، به بررسی نقش این گیرنده‌ها در روند کسب تحمل به مورفین و رفتارهای مشاهده‌شده بپردازیم.

روش بررسی

حیوانات آزمایشگاهی: در این مطالعه تجربی، از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ماده نژاد ویستار (۲۷۰ -۲۲۰ گرم، انستیتو پاستور) استفاده شد و از هر حیوان در طول آزمایش‌ها فقط یک‌بار استفاده گردید. حیوانات شامل ۱۷ گروه بودند (۶ گروه برای تعیین منحنی دوز-پاسخ (دست آوردن دوزهای مؤثر و بی‌اثر 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 گروه‌های آگونیست و آنتاگونیست. تعداد اعضای هر گروه ۷ عدد در نظر گرفته شد. حیوانات در قفس‌های مخصوص؛ و دسترسی به آب و غذا کافی نگهداری شدند. محل نگهداری حیوانات دارای دوره روشنایی ـ تاریکی ۱۲/۱۲ ساعته و دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد؛ بدون هرگونه آلودگی صوتی بود. تمامی آزمایش‌ها 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 حجم‌های ۱/۵، ۶ و ۱۲ mg/kg به درون ناحیه CA1 هیپوکمپ (i-CA1) تزریق شدند(۴). مورفین به‌صورت زیر جلدی (s.c.) تزریق شد (با غلظت‌های ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ mg/kg). گروه‌های کنترل، سالین دریافت می‌کردند(۲۳ و ۴).

روش جراحی و تزریق دارو: موش‌های صحرایی از طریق تزریق داخل صفاقی کتامین هیدرو کلرید (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۴ mg/kg) بی‌هوش شدند. پس از بیهوشی کامل، موهای پشت سر حیوانات را زدوده و حیوانات به دستگاه استریوتاکسی (Inomed, Germany) منتقل می‌شدند. به‌وسیله قیچی استریل، پوست جمجمه را از زیر چشم‌ها تا نزدیکی گوش‌ها به‌طور طولی برش داده و توسط گیره‌هایی به طرفین کشیده می‌شد. 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- میلی‌متر (بسته به وزن حیوان) از برگما (خلفی – قدامی)؛ ۱/۸ ± ۲ میلی‌متر از خط وسط (میانی – جانبی)؛ و ۲/۸- تا ۳- از سطح جمجمه (خلفی – شکمی) محاسبه می‌شد، نقاط به‌دست‌آمده را علامت‌گذاری کرده و سپس با استفاده از مته، دو سوراخ روی استخوان جمجمه تا پرده منتژ ایجاد شد. در مرحله بعد، به کمک دستگاه استریوتاکس، کانول راهنما (تهیه‌شده از سر سرنگ شماره ۲۲ و از جنس فولاد ضد زنگ) را به صورت دوطرفه درون محل‌های سوراخ شده قرار داده تا یک میلی‌متر بالاتر از ناحیه CA1 قرار گیرد. سپس کانول تعبیه‌شده، با آکریل‌آمید دندانپزشکی محکم شد. به‌منظور جلوگیری از بسته شدن مجرای کانول، این مجرا توسط سیم فولادی ضدزنگ تا زمان تزریق دارو مسدود می‌گردید. بعد از پایان جراحی، به همه حیوانات اجازه داده می‌شد که برای بهبود از عمل جراحی و حذف ماده بی‌هوشی، به مدت یک هفته استراحت داشته باشند(۱۶).



شکل۱. دوره زمانی مربوط به ترجیح مکان شرطی‌شده (CPP). AM, Ante Meridiem; PM, Post Meridiem; s.c, Subcutaneous

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

آزمون رفتاری CPP: برای القاء CPP از جعبه‌ای چوبی دوقسمتی با ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰cm (طول، عرض و ارتفاع) که توسط یک دریچه گیوتینی میانی می‌توانستند باهم در ارتباط باشند، استفاده شد. پس‌زمینه دیواره‌های هر دو طرف سفید؛ ولی هر طرف دارای علائم و تزئینات متفاوت از طرف دیگر بود. روش CPP استفاده‌شده در این تحقیق از نوع غیر طرفدار بود؛ به‌طوری‌که حیوانات تمایل خاصی به هیچ‌یک از دو قسمت نشان نمی‌دادند. دوره آزمایش‌های CPP با برنامه پنج روزه و ۳ مرحله مشخص می‌شود (شکل ۱) که عبارت‌اند از(۲۳ و ۱۶ و ۳):

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

زمان سپری‌شده در هر قسمت دستگاه در این روز به کمک کرونومتر اندازه‌گیری و ثبت می‌شد.

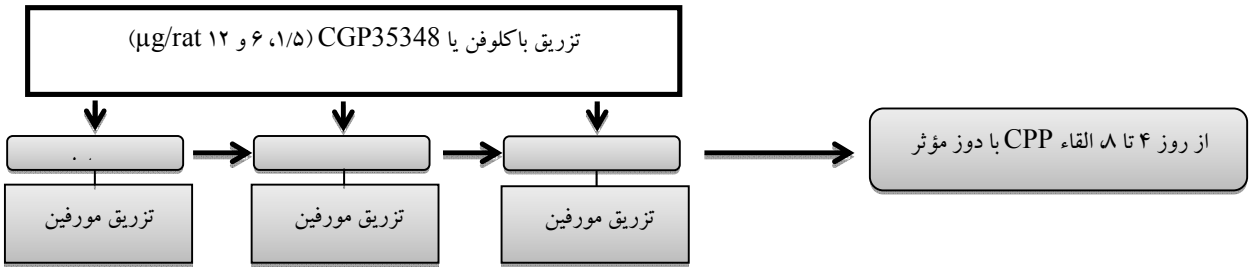
ب- مرحله شرطی‌سازی یا Preconditioning: این مرحله، فردای روز پیش شرطی‌سازی شروع می‌شد و ۳ روز ادامه داشت. ابتدا، درب گیوتینی دستگاه گذاشته می‌شد تا ارتباط بین دو قسمت دستگاه قطع شود. حیوانات ساعت ۹ صبح روز دوم (روز اول شرطی‌سازی)، مورفین را به‌صورت زیرجلدی دریافت می‌کردند (با غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۲/۵، ۵،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

ج- مرحله پس شرطی‌سازی یا آزمون: در روز پنجم، دریچه گیوتینی برداشته می‌شد، هر حیوان جداگانه داخل جعبه گذاشته می‌شد و به مدت ۱۰ دقیقه آزادانه در دستگاه حرکت می‌کرد. مدت‌زمان توقف حیوان در هر طرف دستگاه اندازه‌گیری می‌شد و زمان طی شده توسط حیوان در قسمت دریافت مورفین از زمان توقف در طرف دریافت

سالین کم شده و به‌عنوان نمره شرطی‌شدن در نظر گرفته می‌شد.

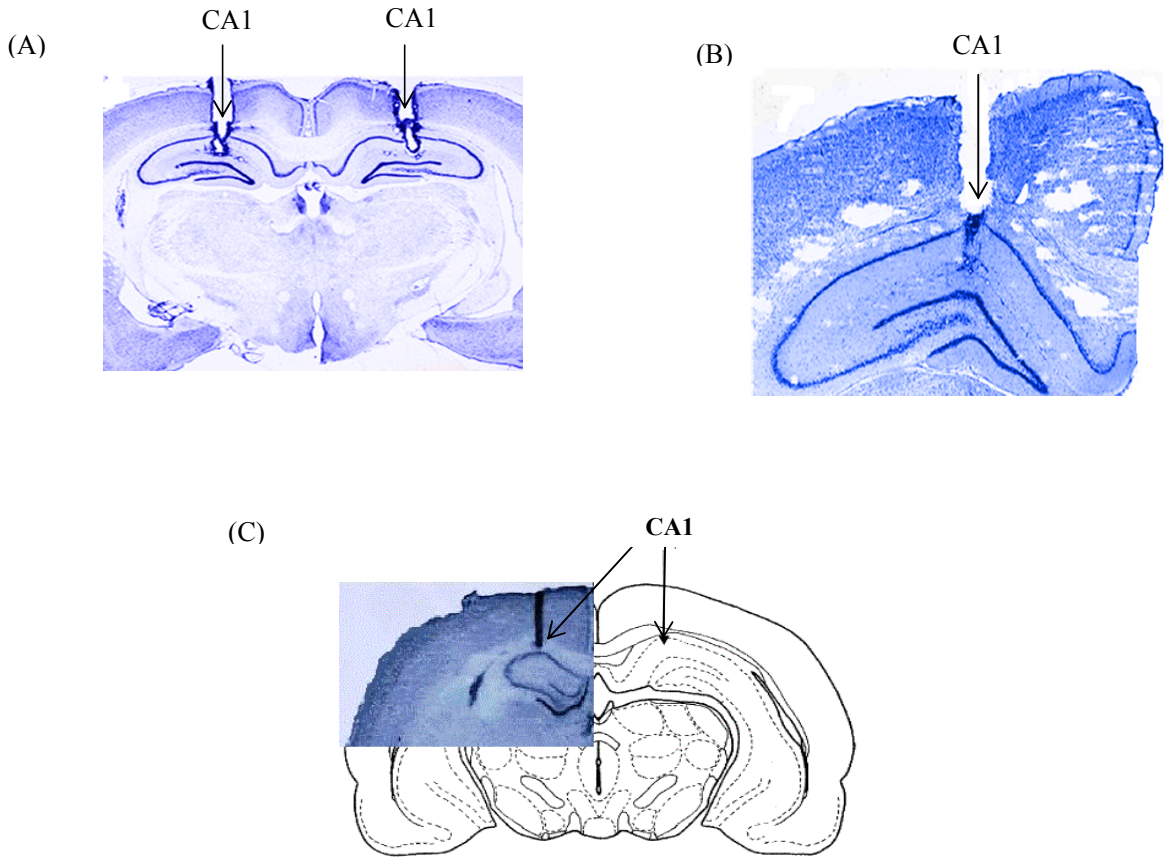
القاء تحمل به مورفین: اساس اعمال تحمل به مورفین بر اساس کارهای قبلی ما بود(۴). حیوانات به مدت ۳ روز و یک‌بار در روز (۹:۰۰ صبح)، تحت تیمار با دوزهای بالای مورفین (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ mg/kg)، قرار می‌گرفتند .از روز چهارم، CPP با دوز مؤثر مورفین (s.c، ۵ mg/kg) اعمال شد. دوزهای ۲۵ و ۵۰ mg/kg منجر به مرگ تعداد 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: به‌منظور 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) (شکل۲).



شکل۲. دیاگرام مراحل زمانی مربوط به کسب تحمل به مورفین. iCA1, Intra-CA1; AM, Ante Meridiem; s.c, Subcutaneous

تأیید بافت‌شناسی: پس از کامل‌شدن آزمون رفتاری، داخل هر کانول ۰/۵ میکرولیتر از محلول یک درصد متیلن بلو تزریق می‌شد. سپس، هر حیوان با مصرف دوز بالای کلروفورم کشته‌شده 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 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 (شکل۳).

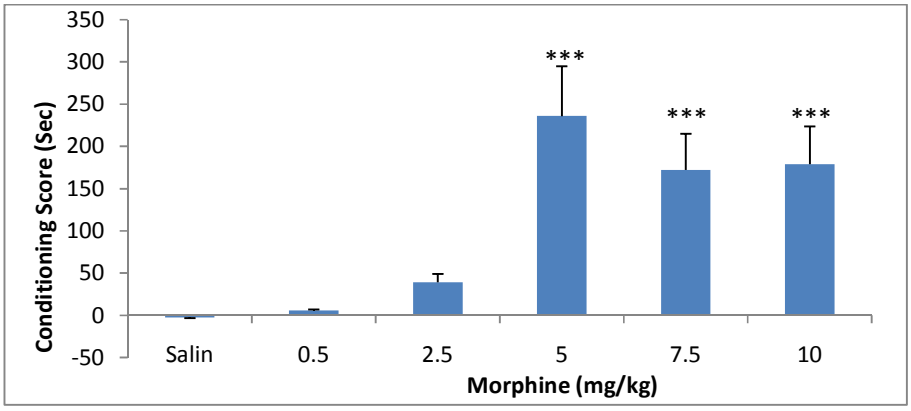


شکل۳. موقعیت کانول راهنما در ناحیه CA1 هیپوکمپ در بزرگنمایی‌های مختلف (A, B , C) از برش بافتی مغز موش صحرایی جراحی‌شده و مقایسه آن با اطلس پاکسینوس و واتسون.

یافته‌ها

محاسبات آماری: نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین مقادیر متغیر تعیین شد. نتایج به‌وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه؛ و پس‌آزمون بن فرونی ارزیابی شدند و اختلاف $P< ۰/۰۵$ به‌عنوان 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.

منحنی دوز-پاسخ برای CPP مورفین در تعیین دوز مؤثر و بی‌اثر مورفین: نمودار۱، CPP حاصل از تزریق دوزهای مختلف مورفین (s.c. , mg/kg ۱۰ و ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۰/۵) انجام شد. نتایج نشان داد که در دوزهای s.c. mg/kg ۱۰ و ۷/۵ و ۵ در حیوانات ترجیح مکان شرطی‌شده معنی‌داری را نشان می‌دهند؛ دوز mg/kg ۵ با بهترین پاسخ، به‌عنوان دوز مؤثر و دوز mg/kg ۰/۵ با کم‌ترین پاسخ، به‌عنوان دوز بی‌اثر در نظر گرفته شدند (نمودار۱).



نمودار ۱. منحنی دوز-پاسخ مربوط به القاء ترجیح مکان شرطی شده توسط مورفین. حیوانات در ۳ روز شرطی‌سازی، دوزهای مختلف مورفین را دریافت نمودند. در روز آخر، حیوانات بدون هیچ گونه تزریقی تست شدند (N = ۷، داده‌ها به‌صورت Mean ± SEM و ***P< ۰/۰۰۱ نسب به گروه سالین سنجیده شده است).

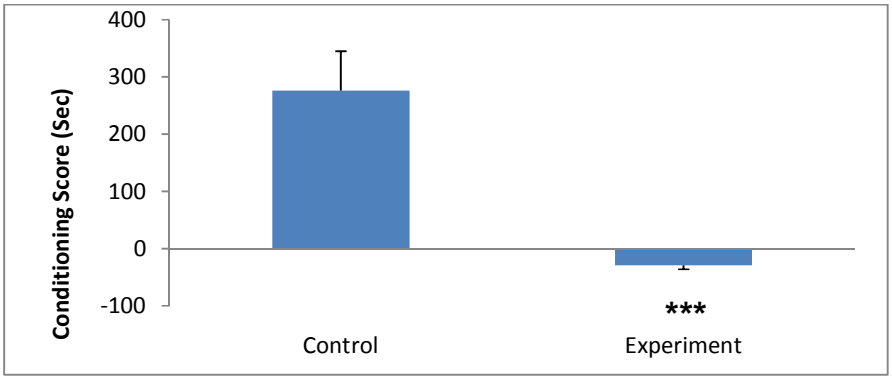
اثر مورفین ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر روی مهار CPP در حیوانات تحمل یافته: حیوانات در سه روز اول مورفین s.c.، ۱۲/۵ mg/kg دریافت کردند و طی مراحل CPP با دوز مؤثر s.c.، ۵ mg/kg نسبت به مورفین شرطی شدند.

حیوانات گروه کنترل، در سه روز اول به‌جای مورفین، سالین دریافت کردند. این گروه در روزهای شرطی‌سازی، نسبت به مورفین شرطی‌شده و در روز تست تمایل زیادی به محل دریافت مورفین از خود نشان دادند. در حالی که موش‌های گروه آزمایش که در روزهای القاء تحمل (۳ روز قبل از CPP) دوز بالای مورفین را (۱۲/۵mg/kg) دریافت کرده بودند، در روزهای شرطی‌سازی نسبت به دوز کمتر مورفین، شرطی نشده و در روز آزمون تمایل زیادی به محل دریافت مورفین نشان ندادند (نمودار۲).

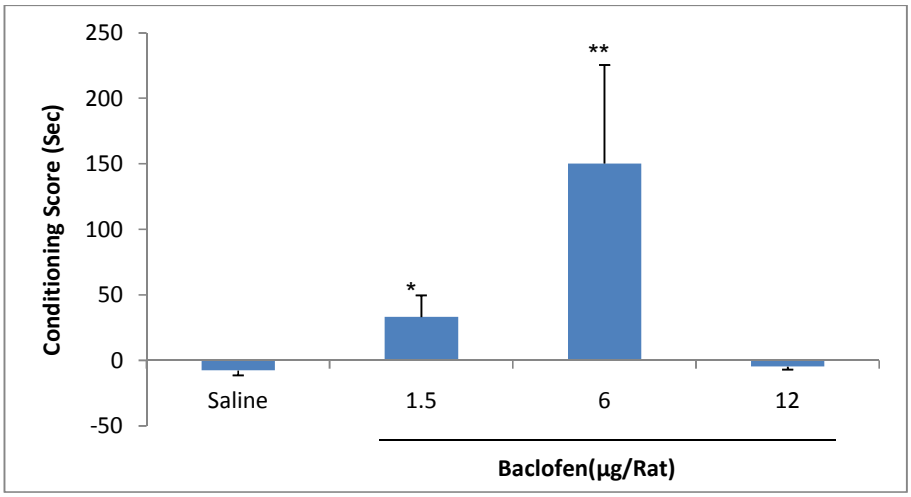
اثرات تزریق آگونیست گیرنده $GABA_B$ (باکلوفن) به i-CA1 بر کسب تحمل به مورفین: ۳ روز قبل از CPP و ۵ دقیقه بعد از تزریق مورفین (s.c.، ۱۲/۵ mg/kg)، باکلوفن با دوزهای ۱۲ mg/kg و ۶ و ۱/۵ به i-CA1 تزریق گردید. سپس، CPP با دوز مؤثر مورفین (s.c.، mg/kg ۵) انجام شد.

نتایج نشان داد که باکلوفن با دوزهای۱/۵ (* P< ۰/۰۵) و ۶mg/kg (** P< ۰/۰۱) باعث کاهش معنی‌دار کسب تحمل به مورفین می‌شود (نمودار ۳).

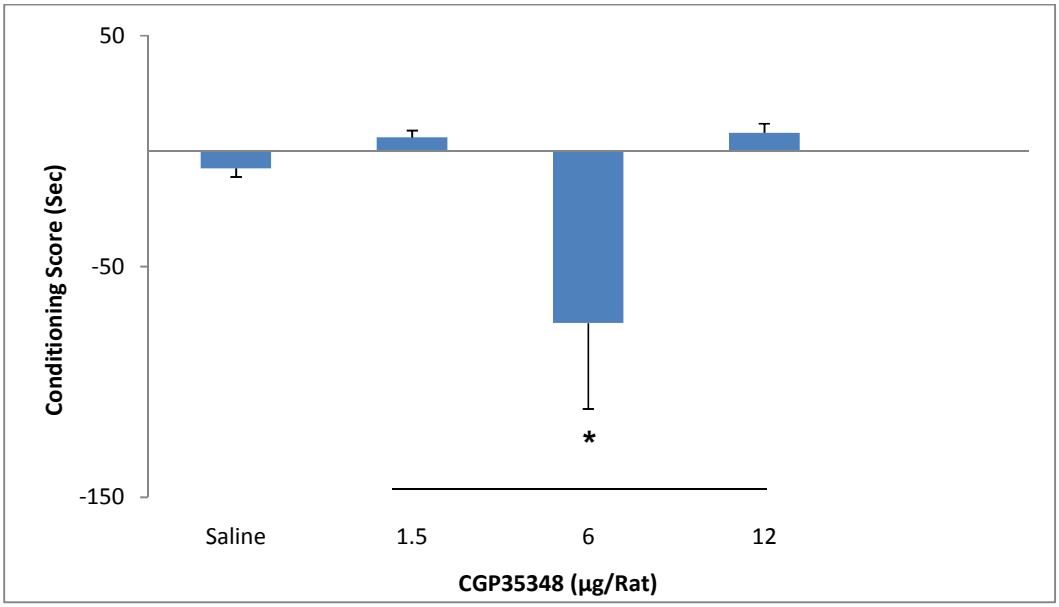
اثرات تزریق آنتاگونیست گیرنده GABAB (CGP35348) به i-CA1 بر کسب تحمل به مورفین: در سه روز اول قبل از CPP، ۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین (s.c.، ۱۲/۵ mg/kg)، CGP35348 با دوزهای mg/kg ۱۲ و ۶ و ۱/۵ به i-CA1 تزریق گردید. مراحل شرطی‌سازی با مورفین (s.c.، mg/kg ۵) انجام گردید. نتایج نشان داد که دوز mg/rat ۶ باعث کاهش معنی‌دار کسب تحمل به مورفین شد (* P< ۰/۰۵) (نمودار ۴).



نمودار۲. اثر مورفین (s.c و ۵ mg/kg) 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 به‌صورت Mean ± SEM است. $P<۰/۰۰۱^{***}$ نسبت به گروه کنترل سنجیده شده است).



نمودار۳. اثرات تزریق باکلوفن (آگونیست گیرنده $GABA_B$) به i-CA1 بر کسب تحمل به مورفین (N = ۷ و داده‌ها به‌صورت Mean ± SEM است. $P<۰/۰۱^{**}$ و $P<۰/۰۵^{*}$ نسبت به سالین سنجیده شده است).



نمودار۴. اثرات تزریق CGP35348 (آنتاگونیست گیرنده $GABA_B$) به i-CA1 بر روی کسب تحمل به مورفین (N = ۷ و داده‌ها به‌صورت Mean±SEM است و $^*P<$ ۰/۰۵ 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 انجام‌شده 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 تأکیددارند(۲۵و۱۶و۴و۳). شواهد متعددی نشان داده‌اند که مورفین اثر تقویت‌کننده مثبت خود را از طریق فعال شدن گیرنده‌های µ-opioid واقع در VTA اعمال می‌کند(۲۷و۲۶و۴) 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 و۲۰). گیرنده‌های $GABA_{BR1a}$ پیش‌سیناپسی، گیرنده‌های $GABA_{BR1b}$ پس‌سیناپسی و گیرنده‌های $GABA_{BR2}$ به هر دو شکل پیش و پس سیناپسی وجود دارند. فعال‌شدن گیرنده‌های پیش سیناپسی

$GABA_B$ از آزادشدن انتقال‌دهنده‌های عصبی گابا جلوگیری می‌کنند و با توجه به مهاری‌بودن انتقال دهنده گابا، تحریک گیرنده‌های $GABA_{BR1}$، اثر تحریکی و مهار آن‌ها اثر مهاری 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 و۴).

باوجود مطالعات متعدد در مورد نقش گیرنده‌های $GABA_B$ بر روی تحمل به مرفین و خواص تقویت‌کننده مثبت آن(۳۶ و ۳۵ و ۴)، در مورد نقش این گیرنده‌ها در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر روی CPP ناشی از مرفین در موش‌های تحمل یافته به مرفین اطلاعاتی وجود دارند. در مطالعه حاضر، تزریق باکلوفن (آگونیست گیرنده $GABA_B$)، همچنین آنتاگونیست گیرنده$GABA_B$؛ CGP35348 به i-CA1 پاسخ‌های جالبی در کسب CPP ناشی از مورفین در موش‌های صحرایی ماده تحمل یافته به مرفین 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 مهاری 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 مهاری CGP۳۵۳۴۸ مخالف با یافته‌های قبلی در هسته CeA آمیگدال و پوسته هسته آکومبنس است(۳۷ و۴). مطالعات متعددی تأیید کرده‌اند که تحمل به مورفین مشکل اصلی درمان به اعتیاد است(۳۹ و۳۸). برخی از داده‌ها نشان داده‌اند که مهار گیرنده‌های $GABA_B$ پیش سیناپسی منجر به انتشار بیشتر GABA از نورون‌های GABAergic و افزایش پاسخ‌های مهاری GABA است(۴۰). در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که اثر تحریکی باکلوفن در افزایش تحمل به مورفین، همچنین، اثر مهاری CGP35348 در کاهش تحمل به مورفین؛ با توجه به نقش مهاری 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 مرفین شده باشد. همچنین، پاسخ باکلوفن وابسته به دوز بود؛ به‌طوری‌که بهترین پاسخ در دوز mg/rat ۶ 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 و۳۳ و ۴). در مورد اثر تقویتی

CGP35348 در کاهش تحمل به مورفین و تقویت پاسخ به مورفین نیز بهترین پاسخ در دوز mg/rat ۶ مشاهده شد. ممکن است عدم پاسخ به دوز mg/rat ۱۲ در کاربرد آگونیست و آنتاگونیست، مربوط به فعال‌شدن انواع متفاوتی از زیرگروه‌های خاص و یا مدارهای مهاری 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. درهرصورت، این واقعیت انکارناپذیر است که نوسانات هورمونی چرخه جنسی موش‌های صحرایی ماده می‌توانند اثرات متفاوتی در زمان‌های مختلف داشته باشند(۴۱). همچنین، سیناپس‌های متعدد بین نورون‌های GABAergic در هیپوکمپ وجود دارد که خروجی نهایی آن‌ها ممکن است مهاری یا تحریکی باشد(۴۲). این 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.

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 CA ۱regions 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 D ۲and 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 ۷regulates 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-AP ۵in 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 acidB 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, Görcs T, Freund T. Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. Neuroscience. 1990;37(1): 31-44.