

مقاله پژوهشی

اثر گیرنده‌های GABAB سیپتوم جانبی بر کسب حساسیت به مورفین در موش‌های صحرائی نر
نژاد ویستار به روش ترجیح مکان شرطی شده

فیروزه علویان، زهرا زارع*

گروه آموزش زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، صندوق پستی ۸۸۹-۱۴۶۶۵، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: zahrazarebio@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۶

DOI: 10.22034/ascij.2023.1983367.1480

چکیده

حساسیت رفتاری در پاسخ به تزریق مورفین، مدلی مناسب برای مطالعه بسترهای عصبی شکل‌پذیری رفتاری است که با پاداش و سوء مصرف مواد افیونی همراه است. سیپتوم جانبی (LS) در فرآیندهای پاداش و یادگیری نقش مهمی دارد. هسته LS حاوی نورون‌های GABAergic است و خروجی‌های این ناحیه به تگمنتوم شکمی (VTA) باعث تنظیم دقیق میزان دوپامین آزاد شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات تزریق آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های GABAB بر کسب حساسیت رفتاری به مورفین در مدل ترجیح مکان شرطی شده (CPP) است. در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار به ۱۷ گروه تقسیم شدند. دوزهای ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم مورفین به شکل زیرجلدی به حیوانات تزریق شد تا دوزهای موثر و بی‌اثر مورفین مشخص شود. به منظور القاء حساسیت، دوز موثر مورفین به مدت ۳ روز تزریق شد؛ پس از ۵ روز، CPP با دوز بی‌اثر مورفین انجام شد. دوزهای ۱/۵، ۶ و ۱۲ میکروگرم/رت از آگونیست (باکلوفن) و آنتاگونیست (CGP35348) در ۳ روز اول حساس سازی، ۱۰ دقیقه قبل از تزریق مورفین به درون LS تزریق شد. باکلوفن در دوز ۶ میکروگرم/رت ($p < 0/05$) و CGP35348 در دوز ۱۲ میکروگرم/رت ($p < 0/01$) باعث کاهش معنی دار کسب حساسیت به مورفین شدند. گیرنده‌های GABAB در ناحیه LS می‌توانند هدف مهم درمان سوء مصرف مواد مخدر باشند. سازوکار فوری برای این افزایش حساسیت مشخص نیست. با این حال، نتایج از این ایده که سیستم سیپتوهیپوکامپ عملکرد دوپامین مزولیمبیک را مهار می‌نماید، حمایت می‌کند.

کلمات کلیدی: GABAB، سیپتوم جانبی، حساسیت، مورفین

مقدمه

مورد نظر قرار می‌گیرند. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO)، در سطح جهانی سالانه، تقریباً ۲۷۵ میلیون نفر (۵/۶ درصد از جمعیت) از مواد مخدر استفاده می‌کنند، ۳۱ میلیون نفر به اختلال مصرف مواد مبتلا هستند و ۴۵۰۰۰۰ نفر در اثر سموم این مواد جان خود را از دست می‌دهند (۲۷، ۳۱).

اختلالات مرتبط با مواد افیونی و اعتیاد، الگوهای ناسازگار مصرف یا رفتاری هستند که با از دست دادن کنترل، اجبار و پیامدهای مضر مشخص می‌شوند. در حالی که این اختلالات دارای علائم اصلی مشترک هستند، ویژگی‌های گسترده‌ای وجود دارد که تحت تأثیر محیط، رفتار اعتیادآور و ویژگی‌های درونی فرد

عصب دهی می‌کند، از برخی مراکز تقویت و پاداشی پیام دریافت می‌کند و با برخی مراکز ارتباط دو طرفه دارد. تحقیقات قبلی اولدز و میلنر (۱۹۵۴) نشان داد LS از مراکز حمایت کننده خود تحریکی است که از نقش آن در سیستم پاداش حمایت می‌کند (۲۱). شواهد موجود نقش LS را در رفتارهای اعتیادآور را به طور کامل بررسی کرده‌اند (۲۷). همچنین، LS در کنترل فرآیندهای فیزیولوژیکی مربوط به عملکرد شناختی و پاسخ‌های خودمختار و هومورال نقش دارد. این ناحیه عمدتاً از سلول‌های عصبی در ابعاد کوچک و متوسط تشکیل شده است که انتقال دهنده عصبی مهاری اسید گاما آمینوبوتیریک (GABA) را تولید می‌کنند (۱۲). در ناحیه LS، GABA از طریق گیرنده‌های GABA_A و GABA_B بر فعالیت عصبی تأثیر می‌گذارد. فعال شدن گیرنده‌های GABA_B توسط آگونیست‌های آنها، خروج یون‌های پتاسیم را تسهیل می‌کند که به طور معمول نورون را بیش از حد قطبی می‌کند و فعالیت عصبی را کاهش می‌دهد (۲۵).^(۳۰) تحقیقات قبلی نشان داده تجویز سیستمیک مورفین از طریق مهار نورون‌های GABAergic در VTA باعث افزایش سطح خارج سلولی دوپامین در ناحیه LS است (۲۷). با توجه به شواهد فوق در درگیری LS در وابستگی دارویی و ارتباط با مراکز پاداش، هدف از مطالعه حاضر بررسی تحریک و مهار گیرنده‌های GABA_B سیستم جانبی بر روی کسب حساسیت (پاسخ‌دهی سریع و فوری) به مورفین با استفاده از الگوی CPP است. با توجه به این واقعیت که مورفین علاقه به پاداش‌های طبیعی را کاهش می‌دهد (۲۴)، امید ما این است با کاهش تمایل مصرف مواد مخدر، گامی اساسی در تعدیل رفتار ناشی از سوء مصرف مواد مخدر برداشته شود.

تحقیقات در چندین دهه اخیر نشان داده است که اختلالات مرتبط با مواد ناشی از تعامل پیچیده عصب‌شناسی، روان‌شناسی و عوامل اجتماعی است که با بحث اثرات پاداشی این مواد مرتبط هستند (۱۵)، (۲۶، ۲۸). مدل ترجیح مکان شرطی شده (CPP) روشی کاربردی است که به طور گسترده‌ای برای مطالعه اثرات پیچیده پاداشی مورفین در مدل‌های حیوانی استفاده شده است (۱، ۲، ۴). با مصرف مواد مخدر، برخی ساختارهای مغز مانند آمیگدال، هسته آکومبنس، هیپوکمپ، پیاز بویایی، قشر پیشانی و سیتوم از طریق تعدیل نورون‌های دوپامینرژیک منشا گرفته از تگماتوم شکمی (VTA) در روند پاداش دارویی و سرخوشی حاصل درگیر می‌شوند (۲). چنانچه تخلیه نورون‌های دوپامینرژیک توسط اینترنورون‌های مهاری گابائرژیک، مهار شود، آزاد شدن دوپامین کاهش یافته و اثرات سرخوشی ناشی از مصرف مواد مخدر کاهش می‌یابد (۱، ۳، ۱۲، ۱۵). سیتوم ناحیه زیر قشری مغز جلویی درگیر در مسیر پاداش مغز است و متشکل از ساختارهایی است که زیر جسم پینه‌ای و جلوی لمینا ترمینالیس قرار دارند. این ناحیه به ۳ گروه هسته جانبی، میانی و خلفی تقسیم می‌شود (۲۹). سیتوم جانبی (LS) با اثرات سوء مصرف مواد در ارتباط است، اما در تحقیقات مربوط به اعتیاد به مواد مخدر اغلب نادیده گرفته می‌شود. آزمایش‌های اولیه خود تحریکی داخل جمجمه ثابت کرده است که حیوانات به تحریک الکتریکی LS پاسخ می‌دهند (۲۲). همچنین، نشان داده شده است که ناحیه LS، سیستم دوپامینرژیک مزولمبیک (DA) را در هر دو هسته VTA و اکومبنس تنظیم می‌کند (۱۰، ۳۱). اخیراً نشان داده شده است که مهار گیرنده GABA_Aα1 نورون‌های گابائرژیک VTA برای جلوگیری از مهار نورون‌های دوپامینرژیک VTA ضروری است (۳۱). LS مناطق پاداشی متعددی را

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. در هر قفس ۴ موش و با چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته و دمای 22 ± 2 درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند. آزمایش‌ها در مرحله چرخه نور انجام شد. حیوانات داخل قفس‌های خود اجازه دسترسی آزاد به آب و غذا را داشتند و حداقل هفته قبل از جراحی مجاز به سازگاری با شرایط آزمایشگاهی بودند. از هر حیوان فقط یکبار استفاده شد. تمامی مراحل مطابق با دستورالعمل‌های مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مرکز آموزش عالی شهید رجایی اصفهان انجام شد. آزمایش‌ها بر روی ۱۱۲ موش که در ۱۶ گروه ۷ تایی تقسیم شده بودند، انجام شد. از این بین، ۶ گروه به منظور مشخص کردن دوزهای بدون اثر و موثر مورفین و رسم منحنی دوز-پاسخ، ۳ گروه برای مشخص کردن دوز مربوط به حساسیت، ۳ گروه دوزهای آگونیست، ۳ گروه دوزهای آنتاگونیست؛ و گروه شاهد مقایسه برای با گروه‌های آگونیست و آنتاگونیست.

داروها: داروهای مورد استفاده در مطالعه حاضر شامل مرفین سولفات (تماد، تهران، ایران)، CGP35348 به عنوان آنتاگونیست گیرنده GABAB و باکلوفن آگونیست این گیرنده (Sigma, Germany)؛ و مواد بی‌هوشی زایلازین و کتامین هیدرات (Rutex, medicine, Switzerland) بودند. قبل از آزمایش، همه داروها در سالیین ۹ درصد حل می‌شدند. CGP35348 و باکلوفن با حجم‌های ۱/۵، ۶ و ۱۲ میلی‌گرم/کیلوگرم به درون ناحیه SL تزریق شدند. مورفین با غلظت‌های ۱/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ mg/kg و گروه‌های شاهد، سالیین را به شکل زیر جلدی دریافت می‌کردند (۳، ۴).

دستگاه القاء مدل CPP: دستگاه بر اساس مدل وایت (۱۹۸۳) با تغییر جزئی طراحی شد (۷). این دستگاه شامل محفظه چوبی دو قسمتی A و B با ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰cm (ارتفاع، طول و عرض) بود. دو قسمت A و B علائم متفاوتی داشتند. این دو بخش به وسیله یک پارتیشن چوبی متحرک میانی می‌توانستند باهم ارتباط داشته باشند؛ به طوری که، وقتی پارتیشن برداشته می‌شد، حیوانات می‌توانستند آزادانه بین دو محفظه A و B حرکت کنند. مدل CPP به کار رفته در تحقیق حاضر بی طرف بود؛ به این صورت که موش‌ها گرایش خاصی به یکی از دو محفظه A یا B نشان نمی‌دادند. آزمایش‌های ترجیح مکان شرطی شده طی ۵ روز انجام می‌شود و شامل ۳ مرحله زیر است (۲۶، ۳۲). (شکل ۱): ۱- Pre-conditioning (پیش‌شرطی‌سازی): اولین روز القاء CPP، آشنایی با محیط است. پارتیشن بین دو قسمت A و B برداشته شده و هر حیوان اجازه داشت آزادانه به مدت ۲۰ دقیقه به هر دو بخش دستگاه دسترسی داشته باشد. مدت زمان طی شده در هر بخش دستگاه با کرونومتر اندازه‌گیری می‌شد. ۲- Conditioning (شرطی‌سازی): این مرحله از روز دوم تا چهارم را شامل می‌شد. در کل دوره شرطی‌سازی، ارتباط بین دو قسمت A و B دستگاه قطع می‌شد. تزریق زیرجلدی مورفین به حیوانات با غلظت‌های دوزهای ۱/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم در ساعت ۹ صبح روز دوم دوره (معادل روز اول شرطی‌سازی)، و مستقر شدن ۴۵ دقیقه‌ای در یکی از دو قسمت دستگاه صورت می‌گرفت. ۶ ساعت بعد (ساعت ۳ بعد از ظهر) به حیوانات سالیین تزریق می‌شد و دوباره ۴۵ دقیقه در سمت دیگر جعبه قرار می‌گرفتند. روز سوم دوره، زمان تزریق مورفین و سالیین جابه جا می‌شد (صبح سالیین و عصر مورفین) اما مکان دریافت تغییری نمی‌کرد. روز ۴ دوره، دقیقاً

شده و در آنجا حداقل ۳ روز برای بهبودی کامل باقی می‌ماندند.

تزریق داروهای آگونیست و آنتاگونیست: به دنبال بهبودی پس از جراحی، حیوانات به طور تصادفی در یکی از ۳ شرایط تزریق زیر قرار گرفتند: (۱) تزریق دو طرفه سالین؛ (۲) تزریق دو طرفه باکلوفن (آگونیست گیرنده GABAB) و (۳) تزریق دو طرفه CGP35348. برای تزریق درون هسته LS از یک کانول تزریق 33 که از طریق یک رابط پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون (Hamilton, USA) متصل بود، استفاده شد. کانول تزریق حدود یک دقیقه باقی می‌ماند تا از انتقال دارو درون ناحیه LS اطمینان حاصل شود (۱۷).

الفاء کسب حساسیت به مورفین: به منظور الفاء حساسیت به مورفین، دوز مؤثر مورفین (۷/۵ میکروگرم/رت) برای سه روز، هر روز یک‌مرتبه و در زمان معین به رت‌ها تزریق می‌شد. ۵ روز بعد از الفاء حساسیت، مراحل CPP آغاز می‌شد. در مرحله کسب، جانوران در ۳ روز شرطی سازی از مراحل CPP، سالین، داروی آگونیست یا آنتاگونیست را ۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین به صورت درون هسته‌ای (i-LS) به مدت یک دقیقه دریافت می‌کردند. سپس، تست انجام می‌شد (۴)(شکل ۲).

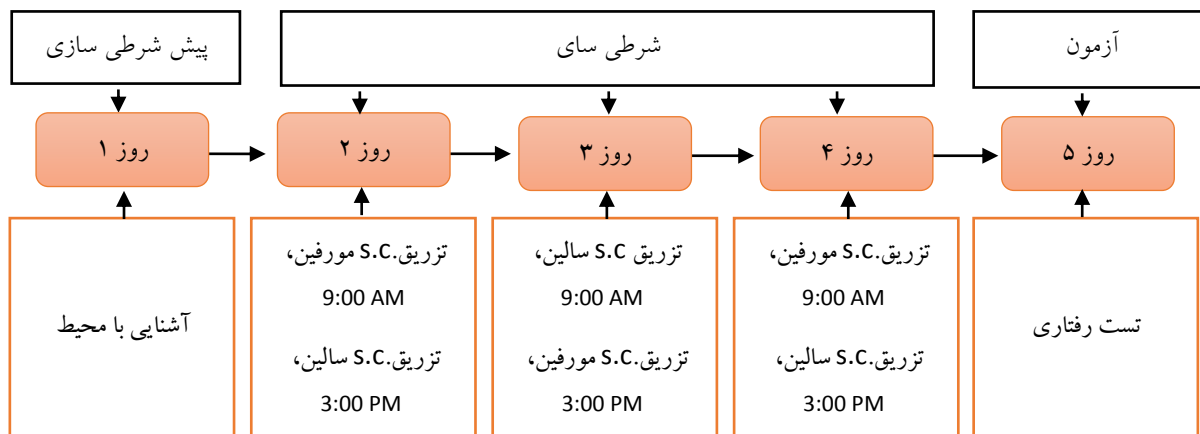
تأیید بافت شناسی: پس از اتمام آزمایشهای رفتاری، محل قرارگیری کانول از نظر بافت شناسی تأیید شد (۳) موش صحرایی با جایگذاری نادرست کانول از مراحل تجزیه و تحلیل حذف شدند. بدین منظور، ۰/۵ میکرولیتر محلول ۱٪ متیلن بلو درون هر کانول تزریق می‌شد. سپس، رت‌ها با مصرف دوز بالای کلروفورم کشته شده، مغز آنها از جمجمه خارج و داخل فرمالین ۱۰٪ ثابت می‌شد. بعد از تثبیت و برش مغزها، موقعیت تزریقها مشخص می‌شد و موقعیت

مانند روز دوم بود. ۳- Test (آزمون) در روز ۵ دوره، مجدداً ارتباط میان دو بخش A و B جعبه برقرار می‌شد. هر حیوان ۱۰ دقیقه آزادانه در دستگاه حرکت می‌کرد و مدت حضور حیوان در هر سمت دستگاه ثبت می‌شد. سپس، با کم کردن مدت توقف حیوان در ناحیه‌ای که مورفین دریافت کرده از مدت توقف در طرف دریافت سالین، نمره شرطی شدن محاسبه می‌شد.

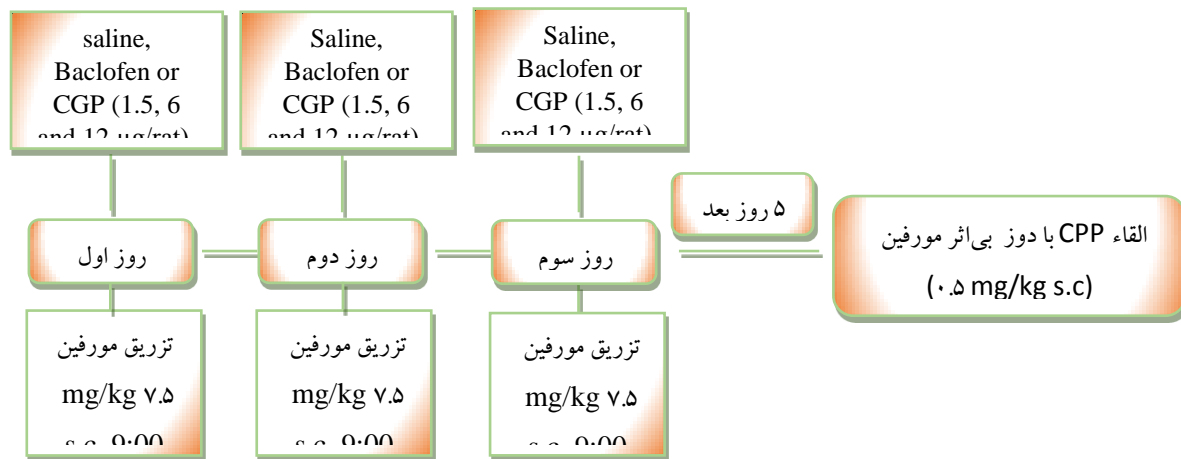
جراحی: حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی زایلازین (۴ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین هیدرو کلرید (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکسی (Inomed, Germany) مستقر می‌شدند. سپس، موهای پشت سر حیوانات را زدوده و حیوانات به دستگاه استریوتاکسی منتقل می‌شدند. به وسیله قیچی استریل، پوست جمجمه را شکافته تا دو ناحیه لامبدا و برگما مشخص شوند. جایگاه کانول راهنما به کمک اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۹۹۸) به مختصات ۰/۵ میلی‌متر خلفی-قدامی (AP)، ۱/۲ میلی‌متر جانبی میانی از خط وسط (ML)؛ و ۳/۲ پشتی-شکمی از سطح جمجمه (DV) از مبدا بریگما محاسبه می‌شود (۲۳)، پس از علامت‌گذاری نقاط به دست آمده به کمک مته، بر روی استخوان جمجمه دو سوراخ کوچک تا پرده منژ ایجاد شد؛ و سپس از طریق دستگاه استریوتاکس، کانول راهنمای تهیه شده از سر سرنگ شماره ۲۶ (از جنس فولاد ضد زنگ) را به شکل دوطرفه درون دو سوراخ قرار داده تا حدود یک میلی‌متر بالاتر از ناحیه LS قرار گیرد. این کانول-ها با استفاده از پیچهای کوچک عینک سازی و اکریلیک آمید دندانپزشکی بر روی سطح جمجمه محکم می‌شدند. در پایان عمل جراحی، یک سیم فولادی ضدزنگ در هر کانول قرار داده میشد تا از بسته شدن مجرای کانول جلوگیری شود. حیوانات پس از هوشیاری، از اتاق جراحی به اتاق ریکاوری منتقل

معنی‌دار تلقی می‌شد. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار آماری Prism - GraphPad Software, (Version 7, Inc., La Jolla, CA, USA, 2016) صورت گرفت و نمودارها به کمک نرم‌افزار اکسل رسم شدند.

نوک کانولها با جایگاه LS موجود در تصاویر اطلس پاکسینوس و واتسون مقایسه می‌شد (شکل ۳).
تحلیل آماری داده‌های رفتاری با استفاده از تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس یک طرفه و Kruskal-Wallis test ارزیابی شدند. نتایج به شکل $\text{Mean} \pm \text{SE}$ انجام شد. تفاوت بین میانگین‌ها در شرایط $p < 0/05$

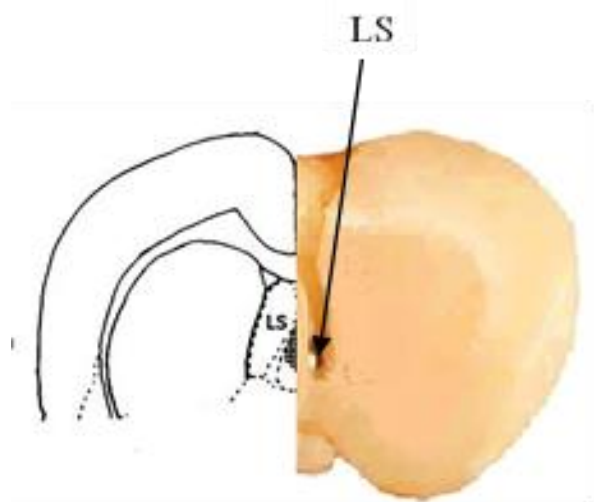


شکل ۱- دیاگرام ترجیح مکان شرطی شده (CPP). AM, Ante Meridiem; PM, Post Meridiem; s.c, Subcutaneous.



شکل ۲- دیاگرام مراحل زمانی کسب حساسیت به مورفین. $\mu\text{g/rat}$, Intra-SN; AM, Ante Meridiem; S.C, Subcutaneous.

mg/kg میلی گرم/کیلوگرم، $\mu\text{g/rat}$: میکروگرم/رت



شکل ۳- محل قرار گرفتن کانول تزریق در هسته جانبی سپتوم (i-LS)

نتایج

طبق پروتوکل شکل ۳ قبلاً دوز مؤثر مورفین (۷/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) را دریافت کرده و حساس شده بودند. به حیوانات گروه کنترل، در ۳ روز القای حساسیت به جای دوز مؤثر مورفین، سالین تزریق شد؛ این گروه در روزهای القاء CPP نسبت به دوز بی‌اثر مورفین، پاسخ ندادند؛ درحالی‌که در گروه آزمایش (حیوانات حساس شده) پاسخ افزایش یافته به دوز بی‌اثر مورفین مشاهده شد.

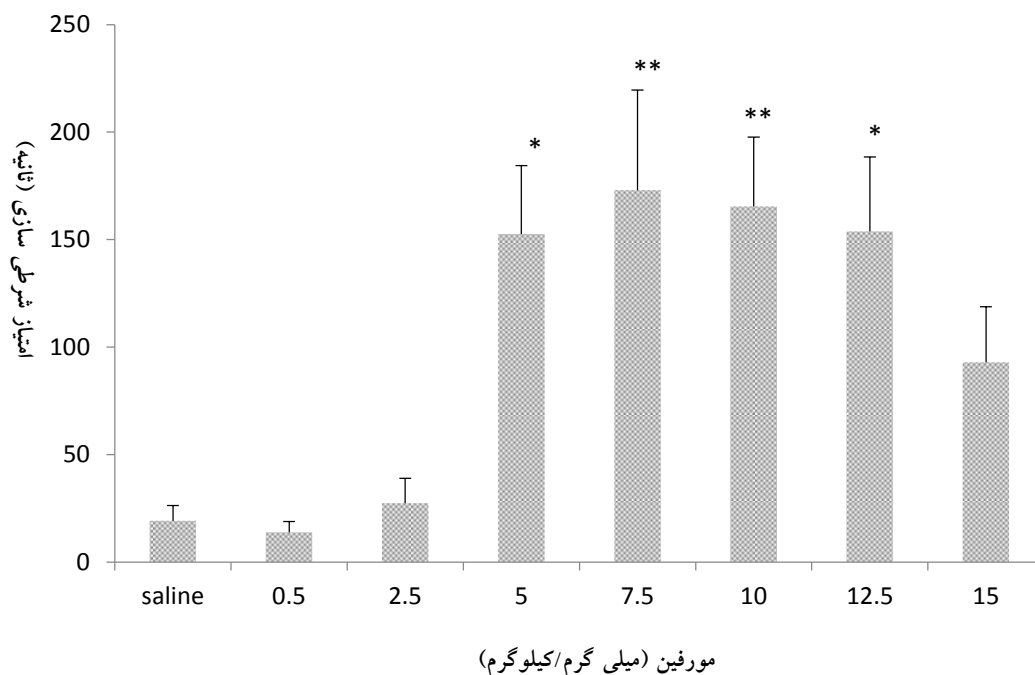
اثرات تزریق درون هسته‌ای باکلوفن در هسته جانبی سپتوم بر کسب CPP در موش‌های صحرائی حساس شده به مورفین: برای تعیین اثرات باکلوفن (آگونیست GABAB) بر روی کسب حساسیت به مورفین در روش CPP، دارو (۱۲ و ۶ و ۱/۵) ۵ دقیقه قبل از هر بار تزریق مورفین (۷/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) در ۳ روز القاء حساسیت، درون هسته LS تجویز شد. گروه شاهد به جای مورفین، سالین (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم و s.c) دریافت کرد. همانطور که در نمودار ۳ نشان داده شده است. نتایج بیانگر کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) کسب حساسیت به مورفین در دوز میکروگرم/رت ۶ بود.

تحلیل پاسخ به دوزهای مختلف مورفین؛ تعیین دوزهای مؤثر و بدون تاثیر مورفین: در این آزمایش، یک تابع دوز پاسخ برای تعیین ترجیح مکان شرطی شده نسبت به مورفین رسم شد. به این منظور، دوزهای مختلف مورفین (۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) یا سالین مطابق با پروتکل ترجیح مکان شرطی شده شکل ۲ به حیوانات تزریق شدند. هر دوز دارو فقط یک بار به ۷ حیوان هر گروه تزریق شد. نمودار ۱ معرف CPP حاصل از تزریق دوزهای مختلف مورفین است. حیوانات در دوزهای ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵ مورفین ترجیح مکان شرطی شده معنی‌داری را نشان دادند. دوزهای ۷/۵ و ۱۰ بیشترین پاسخ را داشتند که برای صرفه جویی در مصرف مورفین، دوز ۷/۵ به‌عنوان دوز مؤثر و دوز ۰/۵ به دلیل کم‌ترین میزان پاسخدهی، به‌عنوان دوز بدون اثر معرفی شدند.

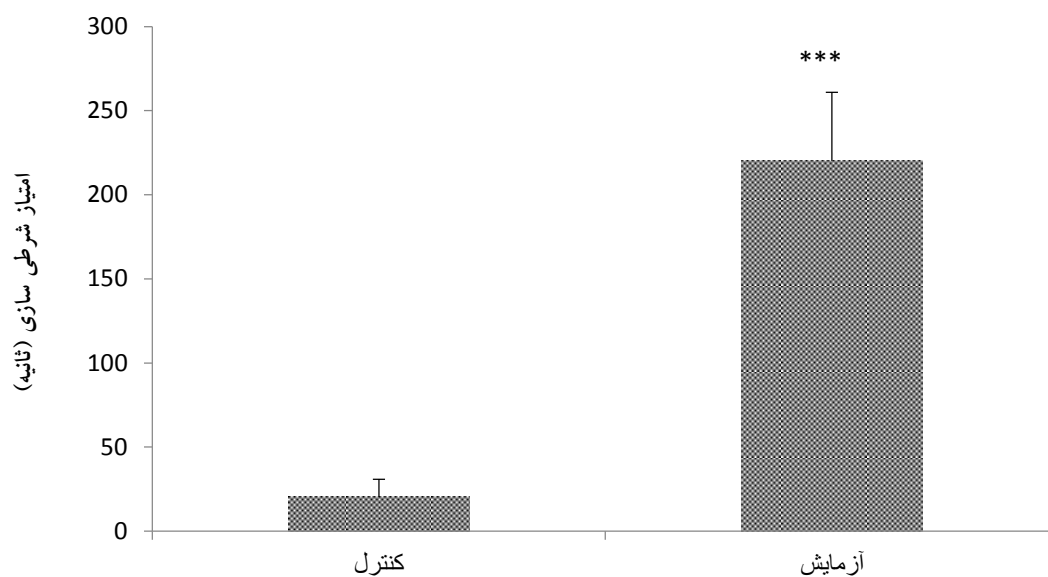
اثر تجویز مورفین بر روی ترجیح مکان شرطی شده در حیوانات حساس شده: نمودار ۲ ترجیح مکان شرطی شده ایجاد شده توسط دوز بی‌اثر مورفین (۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) در حیواناتی را نشان می‌دهد که

مورفین (۷/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) در ۳ روز القاء حساسیت، درون هسته LS تجویز شد. گروه شاهد به جای مورفین، سرم (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم تزریق زیرجلدی) دریافت کردند. نتایج نمودار ۴ بیانگر کاهش معنی‌دار کسب حساسیت به مورفین در دوز ۱۲ میکروگرم/رت است.

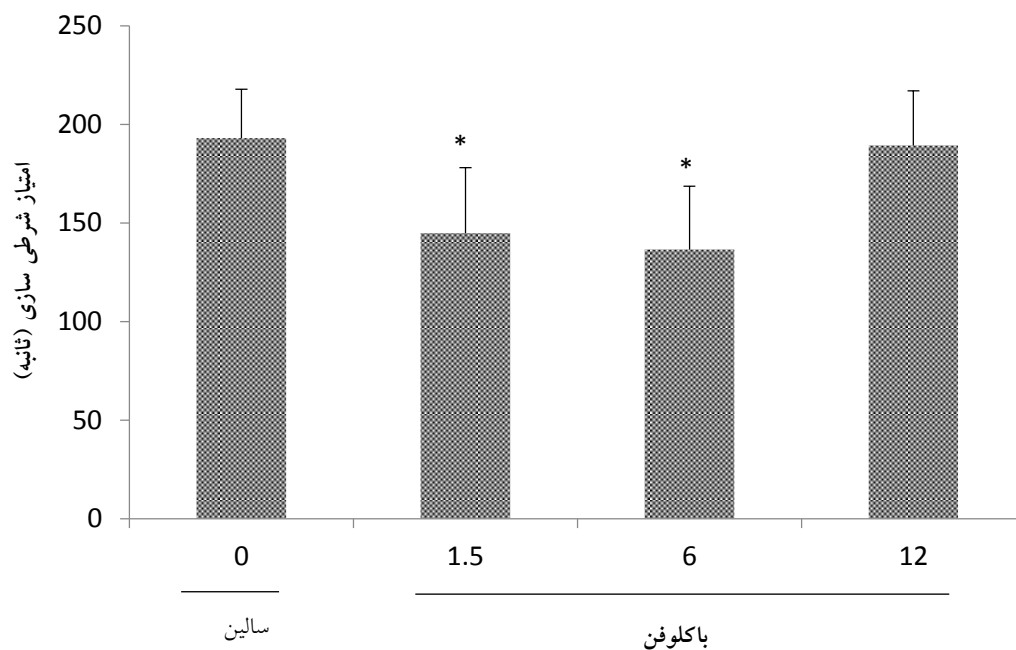
اثرات تزریق درون هسته‌ای CGP35348 در هسته جانبی سپتوم بر کسب CPP در موش‌های صحرایی حساس شده به مورفین: برای تعیین اثرات CGP35348 (آنتاگونیست GABAB) بر روی کسب حساسیت به مورفین در روش CPP، دارو (۱۲ و ۶ و ۱/۵ میکروگرم/رت) ۵ دقیقه قبل از هر بار تزریق



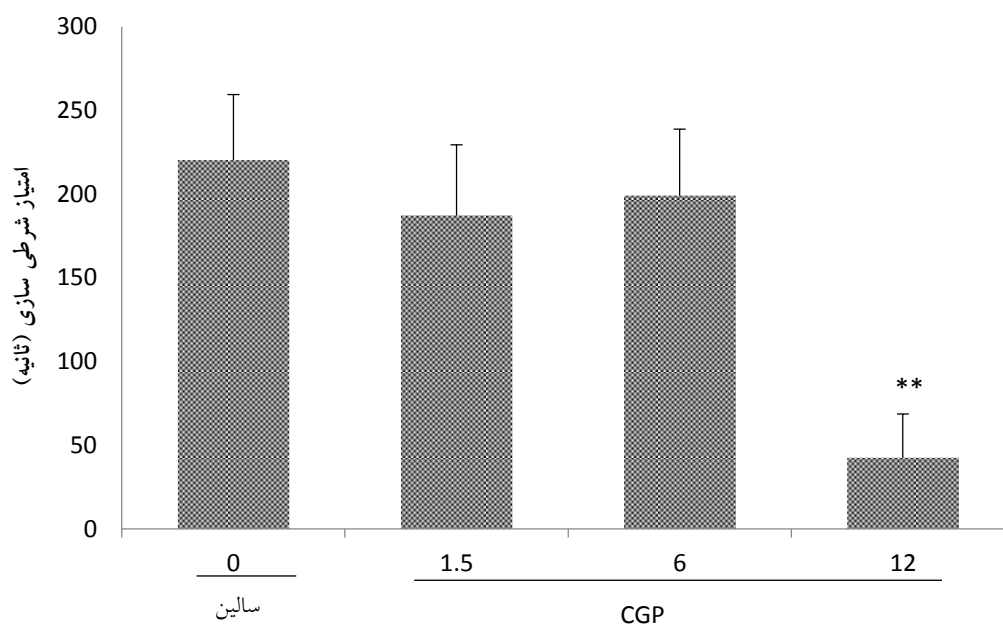
نمودار ۱- منحنی دوز-پاسخ ترجیح مکان شرطی شده توسط مورفین. دوزهای مختلف مورفین (۰/۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱/۵، ۱۲/۵ و ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و سالیین (۱ میلی‌لیتر در کیلوگرم) به صورت زیر جلدی طبق پروتوکول شکل یک تزریق شدند. (n = 7، داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM، $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ **نسب به گروه سالیین است).



نمودار ۲- اثر تجویز مورفین بر روی CPP در حیوانات حساس شده. حیوانات در سه روز متوالی دوز موثر مورفین (۷/۵ میلی- گرم/کیلوگرم) را دریافت کردند و پس از پنج روز استراحت، طی CPP دوز بی‌اثر مورفین (۰/۵ میلی گرم/کیلوگرم، تزریق زیرجلدی) را دریافت کردند (n = ۷). داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM، $p < 0.001$ نسبت به گروه کنترل سنجیده شده است).



نمودار ۳- اثرات تزریق باکلوفن درون هسته LS در کسب CPP با مورفین در موش‌های صحرایی حساس شده به مورفین. طبق پروتوکل شکل ۳، حیوانات ۵ دقیقه قبل از تزریق دوز موثر مورفین، باکلوفن را (۱۲، ۶ و ۱/۵ میکروگرم/رت) به صورت درون هسته LS دریافت کردند و پس از ۵ روز استراحت، CPP با دوز بی‌اثر مورفین انجام شد. دوزهای ۱/۵ و ۶ میکروگرم/رت باعث کاهش معنی‌دار کسب حساسیت به مورفین شده‌اند (n = ۷). داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM، $p < 0.05$ نسبت به گروه سالین).



نمودار ۴- اثرات تزریق CGP35348 به درون هسته LS در کسب حساسیت به مورفین در موش‌های حساس شده. طبق پروتکل شکل ۳، حیوانات CGP35348 (۱۲، ۶، و ۱/۵ میکروگرم/رت) را ۵ دقیقه قبل از تزریق دوز موثر مورفین، به صورت درون هسته‌ای دریافت کردند. پس از ۵ روز استراحت، CPP با دوز بی‌اثر مورفین انجام شد. دوز ۱۲ میکروگرم/رت باعث کاهش معنی‌دار کسب حساسیت به مورفین است ($n = 7$ ، داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM، $p < 0.01$ * نسبت به گروه سالین).

بحث

مطالعات قبلی گزارش کرده اند که LS منطقه مهمی در تحریک تمایل به کوکائین است، اما هنوز به طور دقیق مشخص نیست که این منطقه چگونه عمل می‌کند (۹،۳۰). همچنین، نشان داده شده است که یک مدار عملکردی از هیپوکامپ به تگمنتوم شکمی (VTA) با ارسال پیام در LS در ایجاد پاداش دارویی نقش مهمی دارد (۱۴). احتمال داده می‌شود، LS به-عنوان ایستگاه پخش اطلاعات انگیزشی وارد عمل شود؛ به طوری که، لو و همکارانش نشان دادند که LS یک ایستگاه مبادله پیام بین هیپوکامپ و VTA است (۱۴). غیرفعال‌سازی LS خودتجویزی را در کوکائین موش‌ها از بین می‌برد. افزایش استفاده از دوپامین در مسیر سپتوم آکومبسن ممکن است مکانیسمی باشد که در موش‌های با ضایعه سپتوم حساسیت به کوکائین را هم از نظر حرکتی و هم از

در تحقیق حاضر، اثرات تزریق دوطرفه آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های GABAB سپتوم جانبی بر روی کسب حساسیت به مورفین در مدل CPP بی-طرف بررسی شد تا فعالیت‌های اخیر در مورد نقش LS در اعتیاد گسترش داده‌شود و نشان دهیم که LS منطقه‌ای مهم در پاسخ به وابستگی به مواد مخدر است نتایج ما تایید کرد که مورفین قادر به ایجاد CPP قابل توجهی است که همسو با نتایج تحقیقات قبلی است و تایید کننده اثرات پاداشی مورفین است؛ خصوصاً این‌که تحقیقات اخیر نشان داده است که مورفین علاقه به پاداش‌های طبیعی را کاهش می‌دهد (۱،۴،۲۴). این موضوع نشان می‌دهد سیستم‌های پاداش مغز ممکن است نسبت به اثرات مضر سوء مصرف بیشتر حساس باشند تا پاداش‌های طبیعی (۸،۲۴).

پایانه‌های گابا منشا گرفته از هسته LS، ورود Ca^{2+} به درون سلول کاهش می‌یابد و خروج K^+ از سلول به مایع بین سلولی افزایش می‌یابد؛ نتیجه هیپرپلاریزه شدن این پایانه‌ها و کاهش رها شدن انتقال دهنده GABA از آن‌ها است که با اثر بر روی گیرنده‌های خود بر روی نورون‌های دوپامینرژیک VTA، آنها را مهار می‌کند؛ که نتیجه آن افزایش فعالیت نورون‌های دوپامینی است. داده‌های وابسته به الکتروفیزیولوژیک نیز نشان داده‌اند که اینترنورهای GABAergic نوعی مهار تونیک بر روی زیرمجموعه‌ای از نورون‌های دوپامینرژیک VTA اعمال می‌کنند (۱۰)

بنابراین، افزایش سطوح خارج سلولی دوپامین در VTA ناشی از تحریک LS با مهار نورون‌های VTA GABAergic سازگار است (در واقع مهار نورون‌های مهارتی). علاوه بر این، حضور intra-LS آگونیست‌های هر دو گیرنده GABA-A و GABA-B به طور قابل توجهی سطوح VTA GABA و نه میزان دوپامین VTA را کاهش می‌دهد (۳۱). نتایج تحقیق Vega و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان داد که کاهش تون بازدارنده اینترنورون‌های GABAergic ناشی از غیرفعال شدن LS، سطوح دوپامین خارج سلولی VTA را تغییر نمی‌دهد. البته، این محققان هیچ توضیحی برای مشاهدات خود نداشتند (۳۱). در تحقیق حاضر، باکلوفن (آگونیست گیرنده GABA_B) در دوز ۶ و آنتاگونیست این گیرنده یعنی CGP35348 در دوز ۱۲ میکروگرم/رت باعث کاهش معنی‌دار کسب مورفین در موش‌های حساس شده شدند که نکته مثبتی در جهت کاهش حساسیت و ولع اعتیاد در مراحل بعدی است. در توجیه نتایج حاصل، مسیرهای مکانیسمی مرتبط با گیرنده‌های GABA_B هسته LS در مرحله کسب حساسیت به مورفین ممکن است سبب تحریک یک مسیر مهارتی؛ و یا مهار یک مدار تحریکی شده باشند. با توجه به اینکه ۳ نوع

نظر پاداش افزایش می‌دهد (۱۴). اخیراً، نشان داده شده است که تحریک LS از طریق اتصال با اینترنورون‌های VTA GABA، مهار نورون‌های دوپامینرژیک VTA را از بین می‌برد (۳۱). مطالعه حاضر نیز شواهد جدیدی در رابطه با تأثیر فعال شدن LS بر VTA فراهم می‌کند. از سوی دیگر و در تایید مطالعات قبلی، داده‌های ما از این موضوع پشتیبانی می‌کنند که حساسیت‌سازی نوعی فرآیند سازگاری نوروپلاستیک است که می‌تواند توسط چالش‌های دارویی ایجاد شود. در واقع، تجویز مکرر و ناپیوسته مورفین سبب القای حساسیت به مورفین و پاسخ قوی‌تر حیوانات به دوزهای بعدی پایین‌تر مورفین است که تاییدکننده ولع دارویی افراد معتاد بعد از ترک و تمایل آنها به مصرف مجدد مواد مخدر است (۵، ۲۳، ۲۹).

نشان داده شده است که ورودی‌های LS به VTA اغلب GABAergic هستند (۱۸). برخی شواهد نشان می‌دهند که تحریک LS باعث فعال شدن نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه VTA می‌شود. دوپامین آزاد شده در VTA سبب القاء عملکرد حرکتی، پاداش، لذت است (۳۱). در تحقیقی دیگر، با مهار LS اثرات متضادی در مصرف کوکائین ایجاد شد و پیش‌درمانی با دیاپام جلوی مهار LS بر انگیزه مصرف کوکائین را مسدود کرد. مکانیسم احتمالی این اختلافات از طریق اثرات مختلف بر فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک VTA است (۲۲). VTA یک هسته ناهمگن متشکل از نورون‌های دوپامینرژیک و غیردوپامینرژیک است. نورون‌های غیردوپامینرژیک VTA عمدتاً GABAergic و درصد کمی گلوتامینرژیک هستند (۱۹). نورون‌های دوپامینرژیک و گابائرژیک VTA گیرنده‌های GABA_A و GABA_B را بیان می‌کنند. با مصرف مورفین و اتصال آن به گیرنده‌های اپیویدی VTA مستقر در اینترنورون‌های GABAergic یا

روی گیرنده‌های پس‌سیناپسی اثر کرده است. چنین نتایج متضادی ضمن تحریک یا مهار گیرنده‌های GABA_B در تحقیقات سایر محققان نیز ثبت شده است (۱۶، ۲۷). از سوی دیگر، ضمن تجویز منقطع مورفین در القای حساسیت، برخی تغییرات ساختاری در گیرنده‌ها اتفاق می‌افتد که بر روی نتیجه آزمایش‌ها اثر می‌گذارند (۵، ۱۱)؛ همچنین، ضمن حساسیت به مواد، به جز انتقال‌دهنده GABA سایر نوروپپتیدها مانند انکفالین، دوپامین، گلوتامیک اسید و دینورفین نیز درگیر می‌شوند (۱۳) که احتمال دارد در تحقیق حاضر، به دلیل تداخل بین عملکرد آنها، نتیجه نهایی تحریک یا مهار باشد (۲۰). علاوه بر این، سلول‌های عصبی LS GABAergic تحت تأثیر اثرات بازدارنده پایه‌ای سلول‌های عصبی GABAergic سپتوم داخلی و سایر اعصاب GABAergic محلی قرار دارند (۲۵). احتمال دارد که فعال‌سازی LS GABAergic سبب کاهش خروجی‌های GABAergic به سمت VTA می‌شود. بنابراین، اینترنورون‌های GABAergic VTA شلیک خود را افزایش می‌دهند و فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک این ناحیه مهار می‌شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی این مطالعه نشان داد که LS نقش مهمی در ایجاد انگیزه مصرف مورفین دارد. احتمالاً، اثرات آگونیست یا آنتاگونیست در LS-i، مهار گیرنده‌های پیش‌سیناپسی GABAergic موجود در VTA است که باعث افزایش فعالیت مهاری محلی در این هسته می‌شود و کاهش آزاد شدن دوپامین است. این مطالعات نشان می‌دهد که LS انگیزه مصرف مواد مخدر را تنظیم می‌کند و آن را به یک منطقه جذاب برای دست‌کاری در درمان اعتیاد تبدیل می‌کند.

گیرنده GABA_B وجود دارد که از نظر موقعیت و عملکرد متفاوت هستند، شاید بتوان دلیل اینکه چرا دوز ۱۲ آنتاگونیست گیرنده GABA_B، شبیه آگونیست عمل کرده و سبب کاهش حساسیت به مورفین شده را توجیه کرد. گیرنده GABA_B R1a پیش‌سیناپسی، گیرنده GABA_B R2 پیش و پس-سیناپسی و گیرنده GABA_B R1b پس‌سیناپسی است (۱، ۶).

ممانعت از ورود Ca^{2+} به درون سلول و جلوگیری از آزاد شدن انتقال‌دهنده عصبی GABA ضمن فعالیت گیرنده‌های پیش‌سیناپسی اتفاق می‌افتد. خروج K^{+} و هیپرپولاریزاسیون سلول نیز ضمن فعال شدن گیرنده‌های پس‌سیناپسی صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه آنتاگونیست گابا بیشتر اثرات پیش‌سیناپسی دارد، در تحقیق حاضر، کاهش حساسیت به مورفین در دوز ۱۲ از CGP35348، می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که آنتاگونیست با اثر بر روی گیرنده‌های پیش‌سیناپسی، سبب تحریک آزاد شدن GABA و افزایش اثرات مهاری شده است. همچنان که نتایج تحقیقات قبلی نیز تایید کننده این فرضیه است (۴، ۱۷). احتمالاً با کولون در دوز ۶ میکروگرم/رت با اثر بر روی گیرنده‌های پس‌سیناپسی، سبب مهار آزاد شدن دوپامین در VTA و کاهش حساسیت و ولع به مورفین است. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، ممکن است مکانیسم‌های مرتبط با گیرنده‌های GABA_B هسته جانبی سپتوم در مرحله کسب حساسیت به مورفین سبب تحریک مدار یا مدارهای مهاری؛ و یا مهار یک یا چند مدار تحریکی و در نهایت مهار حساسیت به مورفین شده است (۴). همچنین، ممکن است عدم اثر معنی‌دار بعضی از دوزهای آگونیست و آنتاگونیست بر روی کسب حساسیت به مورفین در هسته LS مربوط به این باشد که در بعضی از دوزها بر روی گیرنده‌های پیش‌سیناپسی و برخی دیگر بر

not intra-caudate amphetamine injections. *Life Sciences*, 33(25):2551-2557.

8. George B.E., Barth S.H., Kuiper L.B., Holleran K.M., Lacy R.T., Raab-Graham K.F. 2021. Enhanced heroin self-administration and distinct dopamine adaptations in female rats. *Neuropsychopharmacology*, 46(10):1724-1733.

9. Heikkinen A.E., Möykkynen T.P., Korpi E.R. 2009. Long-lasting modulation of glutamatergic transmission in VTA dopamine neurons after a single dose of benzodiazepine agonists. *Neuropsychopharmacology*, 34(2):290-298.

10. Jonsson S., Morud J., Stomberg R., Ericson M., Söderpalm B. 2017. Involvement of lateral septum in alcohol's dopamine-elevating effect in the rat. *Addiction biology*, 22(1):93-102.

11. Kobrin K.L., Moody O., Arena D.T., Moore C.F., Heinrichs S.C., Kaplan G.B. 2016. Acquisition of morphine conditioned place preference increases the dendritic complexity of nucleus accumbens core neurons. *Addiction Biology*, 21(6):1086-1096.

12. Kohler C., Chan-Palay V. 2014. Distribution of gamma aminobutyric acid containing neurons and terminals in the septal area. *Anatomy and Embryology*, 167(1):53-65.

13. Kudo T., Konno K., Uchigashima M., Yanagawa Y., Sora I., Minami M. 1796. GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin mediated inhibitory inputs from the bed nucleus of the stria terminalis. *European Journal of Neuroscience*, 39(11): 1796-1809.

14. Luo A.H., Tahsili-Fahadan P., Wise R.A., Lupica C.R., Aston-Jones G. 2011. Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*, 333(6040): 353-357.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله، نویسندگان از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فرهنگیان تقدیر و تشکر می‌کنند.

منابع

1. Alavian F., Sahraei H., Ghiasvand S. 2019. Effects of central amygdala GABA-B on expression of morphine-induced sensitivity in female rats. *Koomesh*, 21(2):365-373.
2. Alavian F., Ghiasvand S. 2018. The effect of GABAB receptors in CA1 region of hippocampus on morphine tolerance in female Wistar race rats by conditioned place preference. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 24(6):79-92.
3. Alavian F., Ghiasvand S. 2017. GABAB receptors within the central nucleus of amygdala may involve in the morphine-induced incentive tolerance in female rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(7):822-828.
4. Alavian F., Ghiasvand S., Sahraei H., Rafiei-Rad M. 2017. 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. *Addiction and Health*, 9(2):110-117.
5. Amantea D., Tessari M., Bowery NG. 2004. Reduced G-protein coupling to the GABA B receptor in the nucleus accumbens and the medial prefrontal cortex of the rat after chronic treatment with nicotine. *Neuroscience Letters*, 355(3):161-164.
6. Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J., Gassmann M. 2004. Molecular structure and physiological functions of GABA B receptors. *Physiological Reviews*, 84(3):835-867.
7. Carr G.D., White NM. 1983. Conditioned place preference from intra-accumbens but

23. Paxinos G., Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn, New York: Academic Press. NY.
24. Piccin A., Courtand G., Contarino A. 2022. Morphine reduces the interest for natural rewards. *Psychopharmacology*, 239(8):2407-2419.
25. Risold P., Swanson L. 1997. Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Research Reviews*. 24(2):91-113.
26. Salas-Wright C.P., Vaughn M.G., González J.M.R. 2017. Drug abuse and antisocial behavior: A biosocial life course approach, Springer, Part of the book series.
27. Sotomayor R., Forray MI, Gysling K. 2005. Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience Research*, 81(1):132-139.
28. Sussman S., Wright E. 2022. Approaching Addiction: A Brief History. *English Language Notes*, 60(1):164-182.
29. Swanson L., Cowan W. 1979. The connections of the septal region in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 186(4):621-655.
30. Tan K.R., Brown M., Labouèbe G., Yvon C., Creton C., Fritschy J-M. 2010. Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature*, 436(7282):769-774.
31. Vega-Quiroga I., Yarur H.E., Gysling K. 2018. Lateral septum stimulation disinhibits dopaminergic neurons in the antero-ventral region of the ventral tegmental area: Role of GABA-A alpha 1 receptors. *Neuropharmacology*, 128:76-85.
32. Zein M, Danovitch I. 2023. Substance-Related and Addictive Disorders. *Atlas of Psychiatry*, pp:437-467.
15. Lutz PE., Kieffer BL. 2013. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in neurosciences*. 36(3):195-206.
16. Macey DJ., Froestl W., Koob GF., Markou A. 2001. Both GABA B receptor agonist and antagonists decreased brain stimulation reward in the rat. *Neuropharmacology*, 40(5):676-685.
17. McDonald M.M., Markham C.M., Norvelle A., Albers H.E., Huhman K.L. 2012. GABAA receptor activation in the lateral septum reduces the expression of conditioned defeat and increases aggression in Syrian hamsters. *Brain Research*, 1439: 27-39.
18. Morales M., Margolis E.B. 2017. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2):73-85.
19. Nair-Roberts R.G., Chatelain-Badie S., Benson E., White-Cooper H., Bolam J., Ungless M. 2008. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*, 152(4):1024-1031.
20. Nuss P. 2015. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 17(11):165-175.
21. Olds J., Milner P. 2020. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of Septal area and other regions of rat brain. USA: University of California Press.
22. Olds J., Milner P. 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other brain regions in the rat. comp. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6):419-427.

The Effect of Lateral Septal GABAB Receptors on Morphine Sensitivity in Male Wistar Rats by Conditioned Place Preference

Firoozeh Alavian, Zahra Zare*

Department of Biology Education, Farhangian University, P.O. Box 14665-889, Tehran, Iran.

Abstract

Behavioral sensitivity in response to morphine injection is a suitable model for studying the neuronal substrates of behavioral plasticity that is associated with reward and opioid abuse. The lateral septum (SL) plays a vital role in the reward and learning processes. The LS nucleus contains GABAergic neurons, and the outputs of this region into the ventral tegmentum (VTA) precisely regulate the amount of released dopamine. In the present study, we investigated the effects of injection of GABAB receptor agonists and antagonists on behavioral sensitivity to morphine in the conditioned place preference (CPP) model. In this experimental study, male Wistar rats were divided into 17 groups. Doses of 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, and 15 mg/kg of morphine were injected subcutaneously (S.C) into animals to determine effective and ineffective doses of morphine. An adequate amount of morphine was injected for 3 days to induce sensitization; after 5 days, CPP was performed with an ineffective dose of morphine. Doses of 1.5, 6, and 12 / $\mu\text{g}/\text{rat}$ of agonist (baclofen) and antagonist (CGP35348) were injected into LS in the first 3 days of sensitization, 10 minutes before morphine injection. Baclofen at 6 $\mu\text{g}/\text{rat}$ ($p<0.05$) and CGP35348 at 12 $\mu\text{g}/\text{rat}$ ($p<0.01$) significantly reduced morphine sensitivity. GABAB receptors in the LS region can be an important target in the treatment of drug abuse.

Keywords: GABAB, Lateral Septum, Sensitivity, Morphine.