

## اثر پدیده ترجیح مکان شرطی شده (CPP) ناشی از مورفین بر آستروسیت‌های شکنج دندانه‌ای موش صحرایی نر

روناک شعبانی<sup>۱</sup>، دکتر مهرداد جهانشاهی\*<sup>۲</sup>، دکتر محسن نوروزیان<sup>۳</sup>، دکتر یوسف صادقی<sup>۴</sup>، دکتر نسرين سادات اعظمی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۲- دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی گلستان. ۳- استادیار گروه علوم تشریحی و سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۴- استادیار گروه علوم تشریحی و سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. ۵- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان.

### چکیده

**زمینه و هدف:** تغییرات مورفولوژیک در نقاط مختلف مغز از جمله هیپوکامپ و شکنج دندانه‌ای که دارای تغییرات شکل‌پذیر (پلاستیستی) زیادی هستند؛ به دنبال تزریق داروهای اعتیادآور در مطالعات انسانی و حیوانی مشاهده شده است. ازسوی دیگر، شواهد نشان داده‌اند که آستروسیت‌ها به طور فعال در شکل‌پذیری سیناپسی شرکت دارند. این مطالعه به منظور تعیین اثر پدیده ترجیح مکانی شرطی شده (CPP) بر ساختار سلولی (تعداد آستروسیت‌های) شکنج دندانه‌ای موش صحرایی نر و استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی برای ردیابی آستروسیت‌ها انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی از ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. برای آزمایشات رفتاری، موش‌ها به ۸ گروه کنترل، کنترل - سالین، شم ۱، شم ۲ و شم ۳ (به ترتیب مورفین ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، آزمایشی CPP1، آزمایشی CPP2 و آزمایشی CPP3 (به ترتیب مورفین ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن + CPP) تقسیم‌بندی شدند. گروه‌های آزمایشی روزانه به مدت سه روز تزریق‌های زیرجلدی مورفین با دوزهای مختلف (۲/۵، ۵ و ۷/۵) و گروه‌های شم سالین با دوز ۱ mg/kg دریافت کردند و آزمایش ترجیح مکان شرطی شده در آنها مورد بررسی قرار گرفت. ۴۸ ساعت بعد از تست رفتاری، حیوانات با کلروفرم بیهوش شدند و مغز آنها فیکس شد. پس از انجام پردازش بافتی، برش‌های ۱۰ میکرونی تهیه شده با روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. به منظور بررسی مورفومتریک آستروسیت‌های شکنج دندانه‌ای، از رنگ‌آمیزی اختصاصی آستروسیت‌ها (PTAH) و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی GFAP استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS16 و آزمون آماری One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** بیشترین پاسخ مورفین در دوز ۷/۵ mg/kg مشاهده شد. تعداد آستروسیت‌ها در گروه کنترل با میانگین ۲۰/۶۲۷±۶/۱۲۹ با تعداد آن در گروه کنترل - سالین با میانگین ۱۷/۳۳۹±۴/۷۱ تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. در حالی که تفاوت تعداد آستروسیت‌های گروه کنترل با سایر گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که پدیده ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین می‌تواند موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد آستروسیت‌های گروه‌های شم و گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل شود.

**کلید واژه‌ها:** ترجیح مکان شرطی شده، مورفین، ایمونوهیستوشیمی، آستروسیت، شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ، موش صحرایی

\* نویسنده مسؤول: دکتر مهرداد جهانشاهی، پست الکترونیکی mejahanshahi@yahoo.com

نشانی: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان (بنیاد فلسفی)، گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، تلفن و نمابر ۰۱۷۱-۴۴۲۰۵۱۵

وصول مقاله: ۱۳۸۹/۹/۲، اصلاح نهایی: ۱۳۹۰/۱/۲۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱/۲۲

مطالعات پیشین آستروسیت‌ها را تنها به عنوان حمایت کننده نورون‌ها در دستگاه عصبی مرکزی بیان می‌داشتند؛ اما اخیراً مطالعات صورت گرفته نقش بیشتر آستروسیت‌ها را حتی در پردازش اطلاعات بیان می‌دارند. تا جایی که آستروسیت‌ها نه تنها اطلاعات ورودی را دریافت می‌دارند؛ بلکه سیگنال‌ها را به نورون‌ها انتقال می‌دهند (۱۴). همچنین نقش آستروسیت‌ها در فرایندهای یادگیری بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۶ و ۱۵). این مطالعه به منظور تعیین اثر پدیده ترجیح مکانی شرطی شده (CPP) بر ساختار سلولی (تعداد آستروسیت‌های) شکنج دندان‌های موش صحرایی نر و استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی برای ردیابی آستروسیت‌ها انجام شد.

### روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد.

پروتکل اخلاقی کار با حیوانات رعایت گردید. حیوانات در قفس‌های سه‌تایی با سیکل تاریکی - روشنایی ۱۲ ساعته و در دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد در حیوانخانه گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی گلستان نگهداری شدند. در طول آزمایشات آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار داشت.

برای آزمایشات رفتاری پس از یک هفته تطابق حیوانات با محیط، موش‌ها به ۸ گروه کنترل، کنترل - سالین، شم ۱ (مورفین ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، شم ۲ (مورفین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، شم ۳ (مورفین ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، آزمایشی CPP1 (مورفین ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن + CPP)، آزمایشی CPP2 (مورفین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن + CPP) و آزمایشی CPP3 (مورفین ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن + CPP) تقسیم‌بندی شدند.

در مطالعات CPP (ترجیح مکان شرطی شده) از انواع دستگاه‌های دو یا سه قسمتی استفاده می‌شود (۱۷). دستگاه ترجیح مکان شرطی شده که براساس مدل carr و white می‌باشد؛ از سه قسمت درست شده است. دو قسمت A و B

تحقیقاتی که طی چند دهه گذشته روی اصول زیستی وابستگی به مواد شیمیایی انجام گرفته؛ حاکی از آن است که برخی از نواحی مغزی و سیستم‌های نوروترانسمیتری در پدیده پاداش دارویی دخالت دارند. به ویژه آن که وابستگی به الکل، اوپوئید و کوکائین بر مسیر مشترکی از مکانیسم‌های بیوشیمیایی تکیه دارند (۲ و ۱).

بین رفتار جستجوگرانه برای دارو و فعالیت‌های حرکتی، پاداش و یادگیری و مصرف دارو رابطه مستقیمی وجود دارد. در نتیجه با مصرف دارو به میزان کم، تحمل یا حساسیت به وجود می‌آید و استفاده مکرر از دارو نیز یادگیری را تسهیل می‌کند (۳).

داروهای اعتیادآور تحریک فعالیت حرکتی، پاداش، انگیزه و حالات تاثیرگذار و سرخوشی را ایجاد می‌کند. تصور می‌شود که فعالیت مسیر مزو کورتیکولیمبیک نقش مهمی در کسب رفتار دارد که توسط تحریک پاداش طبیعی و داروهای اعتیادآور تقویت می‌شود (۴).

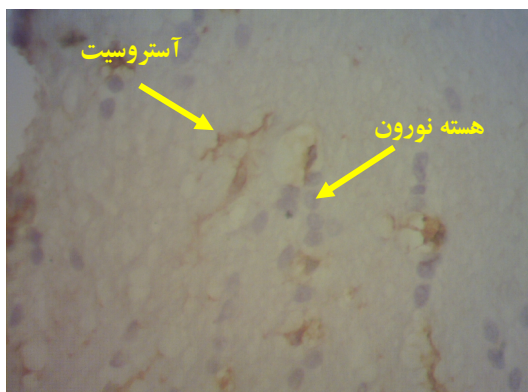
داروهای اعتیادآور پروسه‌هایی دارند که تغییرات شکل‌پذیری سیناپسی (Synaptic plasticity) را در شبکه‌های عصبی ویژه‌ای القاء می‌کنند و شامل مسیرهای دوپامینی مزولیمبیک می‌باشند (۵).

آستروسیت‌ها نقش مهمی را در متابولیسم انرژی نورون‌ها به عهده دارند و مهم‌ترین نوروگلیاهای بافت عصبی به‌شمار می‌روند که جایگاه آنها بین نورون‌ها و مویرگ‌های خونی است (۷ و ۶). بیشترین گلیکوژن موجود در بافت مغزی در آستروسیت‌ها ذخیره شده است (۹ و ۸). همچنین آستروسیت‌ها و میکروگلیاها نقش حساسی را در پاسخ و بهبودی زخم‌ها به عهده دارند (۱۲-۱۰). یکی دیگر از وظایف آستروسیت‌ها تامین تغذیه، دفع مواد زائد و هدایت آکسونی نورون‌ها است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که آستروسیت‌ها نقش مهمی را در فعالیت‌های نورونی از قبیل رهاسازی نوروترانسمیترها و تولید سیناپس دارند (۱۲ و ۳). یکی از ویژگی‌های آستروسیت‌ها این است که حاوی رشته‌های حدواسط به قطر ۹ نانومتر هستند که از یک پروتئین واحد به نام GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ساخته شده‌اند (۱۳).

موش در خانه‌ها اندازه‌گیری شد. *Archive of SID*

۲۴ ساعت پس از آخرین آزمایشات، حیوانات توسط کلروفورم بیهوش شدند. قفسه‌سینه را باز کرده و کانولی در بطن چپ قرار دادیم. هم‌زمان جداره دهلیز راست را باز کرده و از طریق بطن چپ ابتدا نرمال سالین و سپس ترکیبی از پارافرمالدئید ۴ درصد در ۰/۱ مول فسفات بافر تجویز شد. این کار به عنوان فیکس شدن اولیه انجام یافت. بعد از این مرحله مغزها بدون آسیب از جمجمه خارج شدند و به درون ظرفی مجزا که حاوی محلول پارافرمالدئید ۴ درصد بود؛ انتقال یافتند. پس از فیکساسیون، مغزها مراحل آماده‌سازی بافتی را طی کردند. در نهایت بلوک‌های پارافینی از آنها تهیه گردید. سپس توسط دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۱۰ میکرون به صورت سریال (از قدام به خلف تشکیلات هیپوکامپ) تهیه شد و توسط رنگ آمیزی اختصاصی PTAH و روش اختصاصی ایمونوهیستوشیمی GFAP (Rabbit anti GFAP-abcam- ساخت امریکا) رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی مختص سلول‌های آستروسیت بوده و آنها را به رنگ قهوه‌ای درمی‌آورد. در حالی که نورون‌ها توسط رنگ بستر یعنی همتاکسیلین، آبی تا بنفش می‌شوند (تصویر یک).

برای شمارش مورفومتریک آستروسیت‌ها از یک میکروسکوپ پیشرفته (Olympus مدل Bx51) مجهز به دوربین دیجیتال (مدل DP12) استفاده گردید. تصاویر از نواحی مختلف هیپوکامپ انتخاب و بر صفحه مانیتور یک دستگاه کامپیوتر آورده شد و پس از درجه‌بندی توسط نرم‌افزار مورفومتری Bioreporter شمارش صورت گرفت.



تصویر ۱: رنگ‌آمیزی IHC از لایه هر می هیپوکامپ درشت‌نمایی ۴۰× (آستروسیت‌ها به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند).

دارای ابعاد ۳۰×۳۰×۴۰ سانتی متر هستند؛ با این تفاوت که قسمت A دارای کف سفید با دیواره‌های راه‌راه سفید و سیاه افقی است و قسمت B دارای کف سیاه همراه با نوارهای سیاه و سفید به‌طور عمودی بر روی دیواره خود است. قسمت C یک تونل قرمز رنگ است که ابعاد آن با خانه‌های A و B متفاوت است. حد فاصل قسمت C و قسمت‌های دیگر یک دریچه چوبی متحرک قرار دارد که سه قسمت را به‌طور کامل از هم مجزا می‌کند. CPP دارای یک الگوی ۵ روزه است که شامل سه دوره جدا از هم به نام‌های دوره‌های آشنایی، شرطی سازی و آزمون است.

**دوره آشنایی یا تعیین ترجیح:** در روز اول هر حیوان به مدت ۱۵ دقیقه در قسمت C دستگاه گذاشته شد و در این مدت دریچه گیوتینی باز بود و حیوان آزادانه در دستگاه حرکت می‌کرد. هم‌زمان با این عمل زمان سپری شده در خانه‌های A و B توسط کورنومتر اندازه‌گیری شد.

**دوره شرطی سازی:** از روز دوم تا چهارم حیوانات دو بار در روز تحت تجویز مورفین و سالین، طبق الگوی ذیل قرار گرفتند:

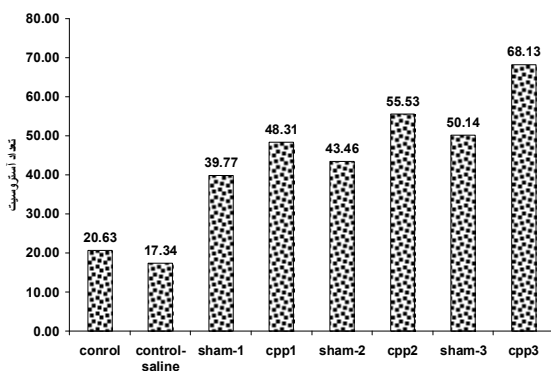
راس ساعت ۹ صبح اولین روز مورفین به صورت زیرجلدی به آنها تزریق شد و در خانه‌ای از CPP که در مرحله قبل، ترجیح کمتری داشت؛ به مدت ۴۵ دقیقه در حالت بسته بودن درب گیوتینی قرار گرفت. ۶ ساعت بعد، سالین به صورت زیرجلدی به موش‌ها تزریق شد و صبح به مدت ۴۵ دقیقه در خانه مخالف قرار گرفت. در روز دوم، تزریقات عکس روز اول انجام شد. یعنی موش‌ها صبح سالین و عصر مورفین دریافت کردند و تزریقات روز سوم مثل روز اول انجام گرفت. در دوره شرطی‌سازی هر موش در مجموع ۶ تزریق زیرجلدی (۳ تزریق سالین و ۳ تزریق مورفین) دریافت کرد. تزریقات در دو نوبت صبح و عصر به این دلیل انجام شد که از تغییرات شبانه‌روزی در طول شرطی‌سازی جلوگیری گردد.

**دوره آزمون:** در روز پنجم در حالی که درب گیوتینی باز بود؛ حیوان در قسمت C دستگاه گذاشته شد و به آن اجازه داده شد که آزادانه به مدت ۱۵ دقیقه بین قسمت‌های مختلف حرکت کند. هم‌زمان با این عمل مدت زمان سپری شده

آزمایشی نسبت به گروه شام نیز به لحاظ آماری معنی دار بود ( $P < 0.001$ ).

جدول ۱: میانگین تعداد آستروسیت‌ها در شکنج دندانه‌ای گروه‌های کنترل، کنترل - سالین، شام ۱، شام ۲ و شام ۳ (به ترتیب مورفین ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، آزمایشی CPP1، آزمایشی CPP2 و آزمایشی CPP3 (به ترتیب مورفین ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن + CPP)

گروه‌ها	میانگین ± انحراف معیار	p-value
کنترل	۲۰/۶۲۷ ± ۶/۱۲۹	
کنترل - سالین	۱۷/۳۳۹ ± ۴/۷۱۰	۰/۸۸۳
شام ۱	۳۹/۷۷۴ ± ۱۱/۶۷۷	۰/۰۰۱
شام ۲	۴۳/۴۵۸ ± ۱۰/۴۴۳	۰/۰۰۱
شام ۳	۵۰/۱۳۷ ± ۱۰/۵۶۹	۰/۰۰۱
آزمایشی ۱	۴۸/۳۱۲ ± ۱۰/۷۶۰	۰/۰۰۱
آزمایشی ۲	۵۵/۵۳۳ ± ۱۳/۶۹۰	۰/۰۰۱
آزمایشی ۳	۶۸/۱۳۴ ± ۱۹/۲۸۰	۰/۰۰۱



نمودار ۲: مقایسه میانگین تعداد آستروسیت‌ها در شکنج دندانه‌ای گروه‌های کنترل، کنترل - سالین، شام ۱، شام ۲ و شام ۳ (به ترتیب مورفین ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، آزمایشی CPP1، آزمایشی CPP2 و آزمایشی CPP3 (به ترتیب مورفین ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن + CPP)

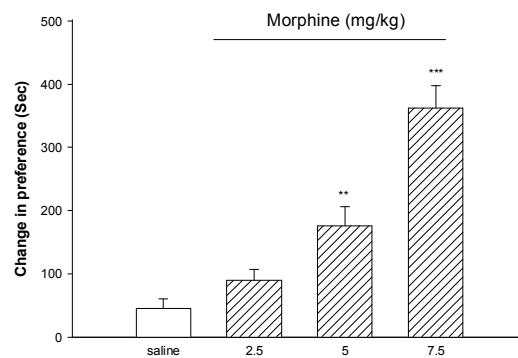
### بحث

نتایج نشان داد که پدیده شرطی شدن وابسته به دوز بود و دوز ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین بیشترین اثر را داشت. همچنین در خصوص تعداد آستروسیت‌های شکنج دندانه‌ای، در گروه کنترل - سالین که فقط تزریق زیرجلدی نرمال سالین را دریافت نمودند؛ نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری در تعداد آستروسیت‌ها دیده نشد. حال آن که در گروه‌های شام که مورفین را بدون انجام CPP دریافت نمودند؛ افزایش تعداد آستروسیت‌ها به نسبت دوزهای تزریقی مورفین مشاهده شد. این نسبت افزایش تعداد در گروه‌های آزمایشی CPP نیز بسته

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون آماری One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نرمالیتی داده‌ها توسط آزمون کولموگروف - اسمیرنوف ارزیابی گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

نتایج نشان داد که بیشترین پاسخ مورفین در دوز ۷/۵ mg/kg با میانگین ۳۶۱/۸۳ ثانیه تاخیر بود. اختلاف گروه‌های مورد با گروه سالین به لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) (نمودار یک). همچنین نتایج وابسته به دوز بودن پدیده شرطی شدن را نشان داد.



نمودار ۱: میانگین زمانی در تغییر ترجیح مکانی بر حسب ثانیه در سه گروه آزمایشی دریافت‌کننده مورفین + CPP با دوزهای ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن

میانگین و انحراف معیار تعداد آستروسیت‌ها در سطح ۷۵۰۰۰ میکرومتر مربع در گروه‌های کنترل و شام و آزمایشی در جدول یک آمده است. یافته‌ها حاکی از آن است که تعداد آستروسیت‌ها در گروه کنترل با میانگین ۲۰/۶۲۷ ± ۶/۱۲۹ با تعداد آن در گروه کنترل - سالین با میانگین ۱۷/۳۳۹ ± ۴/۷۱۰ تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. در حالی که تفاوت تعداد آستروسیت‌های گروه کنترل با سایر گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.001$ ). به عبارت دیگر افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد آستروسیت‌های گروه‌های شام با سه دوز متفاوت مورفین (۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه‌های آزمایشی (CPP) با سه دوز متفاوت مورفین نسبت به گروه کنترل دیده می‌شود (جدول یک و نمودار ۲). همچنین تفاوت تعداد آستروسیت‌های شکنج دندانه‌ای در گروه‌های

۲۰۰۲ به بررسی آستروسیت‌های شکنج دندانهای موش

صحرایی تحت تاثیر کوکائین پرداخته شد؛ مشخص گردید که بیان GFAP در گروه تحت تاثیر کوکائین نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و همچنین از لحاظ آنالیز مورفومتریک و مورفولوژی، تغییرات چشمگیری در اندازه و تعداد آستروسیت‌ها مشاهده شد (۲۰). در مطالعه حاضر به دنبال تجویز مورفین در گروه‌های مختلف، تعداد آستروسیت‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که مؤید نتایج تحقیقات قبلی است.

همچنین مطالعات قبلی در خصوص تغییرات ایجاد شده در نورون‌های پیرامیدی کورتکس به دنبال ۱۵ روز تجویز مورفین، به خص وص تاثیر مورفین بر روی ساختار، اندازه و شاخه‌های انتهایی دندریت‌ها و خارهای دندریتی در لایه سوم نورون‌های پیرامیدی در کورتکس حرکتی و ناحیه پری‌لیمبیک، نشان داده است که تجویز مورفین منجر به کاهش اندازه شاخه‌های انتهایی نورون‌های پیرامیدی در کورتکس حرکتی شده است. در مقابل دندریت‌های نورون‌های پیرامیدی ناحیه پری‌لیمبیک در اثر تجویز مورفین بلندتر و بزرگ‌تر شدند. البته در هر دو ناحیه تراکم خارهای دندریتی افزایش یافته بود. این نتایج نشان می‌دهد که تجویز مورفین می‌تواند منجر به تغییراتی در ساختار سلول‌های پیرامیدی شود (۲۱).

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که پدیده ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین می‌تواند موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد آستروسیت‌های گروه‌های شم و گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل شود. همچنین یافته‌ها نشان‌دهنده اثر تزریق مورفین به تنهایی بر افزایش سلول‌هاست.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان و پایان‌نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد خانم روناک شعبانی در رشته علوم تشریحی بود. نویسندگان مقاله از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر انجام آزمایشات رفتاری و آزمایشات بافتی و همچنین از معاونت

به مورفین دریافتی قابل مشاهده است.

در این خصوص می‌توان به برخی یافته‌ها اشاره نمود. به عنوان مثال در مطالعه مؤدب و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیرات غیرفعال برگشت ناحیه تکمتموم قدامی در کسب و بیان شرطی شدن ناشی از مورفین بررسی شد. به طوری که در روز اول (آشنایی)، حیوانات آزادانه به مدت ۱۰ دقیقه درون CPP گذاشته شدند و زمان سپری شده در خانه‌ها ثبت گردید. در مرحله شرطی‌سازی، در طی سه روز، هر موش ۶ تزریق شامل ۳ تزریق مورفین با دوزهای (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ mg/kg) و ۳ تزریق سالین را به صورت زیرجلدی در صبح و بعدازظهر با فاصله ۶ ساعت دریافت کردند و در خانه‌های مورد نظر CPP، به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته شدند و در روز آزمون، تست رفتاری صورت گرفت. بیشترین پاسخ مورفین در مقدار ۵ mg/kg مشاهده شد و نتیجه‌گیری شد که سیستم دوپامینرژیک مزولیمبیک در نواحی تکمتموم قدامی از اساسی‌ترین مکان‌های آغازین برای اثرات پاداشی ناشی از داروهاست (۱۸). در مطالعه حاضر از همان الگوی شرطی‌سازی سه روزه با دوزهای ۷/۵، ۵، ۲/۵ mg/kg مورفین استفاده شد؛ ولی بیشترین پاسخ در دوز ۷/۵ mg/kg مشاهده گردید.

Miyatake و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی مکان شرطی شده ناشی از متآمفتامین و نقش پروتئین کیناز C در ارتباطات نورون-نوروگلیایی پرداختند. تجویز متآمفتامین و الگوی شرطی‌سازی منجر به فسفریله شدن پروتئین کیناز C در آستروسیت‌ها و نورون‌ها گردید و در نتیجه منجر به فعال شدن آستروسیت‌ها در کورتکس گشت. در واقع بعد از تجویز دارو، حساسیت آستروسیت‌ها به گلوتامات و دوپامین افزایش پیدا می‌کند و آستروسیت‌های فعال شده اتصالات سیناپسی را از طریق رهایی گلوتامات و یا جذب گلوتامات از فضای سیناپسی تنظیم می‌کنند. این نتایج نشان می‌دهد که آستروسیت‌ها نقش مهمی را در وابستگی دارویی ایفا می‌کنند (۱۹).

همچنین تغییرات کمی ایجاد شده در بیان GFAP که مشخصه آستروسیت‌هاست؛ در تجویز مورفین، آمفتامین و سایر مشتقات مشاهده شده است. در مطالعه‌ای که در سال

## References

- Geller A. Common addictions. *Clinical Symposia*. 1996;48:1-32.
- Koob GF, Maldonado R, Stinus L. Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends Neurosci*. 1992 May;15(5):186-91.
- Mitchell JB, Stewart J. Facilitation of sexual behaviors in the male rat in the presence of stimuli previously paired with systemic injections of morphine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1990 Feb;35(2):367-72.
- Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci*. 1999 Nov;22(11):521-7.
- Martin-Soelch C, Leenders KL, Chevalley AF, Missimer J, Küning G, Magyar S, et al. Reward mechanisms in the brain and their role in dependence: evidence from neurophysiological and neuroimaging studies. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Oct;36(2-3):139-49.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Food for thought: challenging the dogmas. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Nov;23(11):1282-6.
- Forsyth R, Fray A, Boutelle M, Fillenz M, Middleditch C, Burchell A. A role for astrocytes in glucose delivery to neurons? *Dev Neurosci*. 1996;18(5-6):360-70.
- Gruetter R. Glycogen: the forgotten cerebral energy store. *J Neurosci Res*. 2003 Oct 15;74(2):179-83.
- Boksha IS. Coupling between neuronal and glial cells via glutamate metabolism in brain of healthy persons and patients with mental disorders. *Biochemistry (Mosc)*. 2004 Jul;69(7):705-19.
- Rabchevsky AG. Influences of activated microglia/brain macrophages on spinal cord injury and regeneration. In: Streit WJ. *Microglia in the regenerating and degenerating central nervous system*. 1<sup>st</sup>. New York: Springer. 2002; pp:209-26.
- Bechmann I, Nitsch R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia*. 1997 Jun;20(2):145-54.
- Teter B, Ashford JW. Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2002 Nov 1;70(3):402-37.
- Giménez Y, Ribotta M, Langa F, Menet V, Privat A. Comparative anatomy of the cerebellar cortex in mice lacking vimentin, GFAP, and both vimentin and GFAP. *Glia*. 2000 Jul;31(1):69-83.
- Caudle RM. Memory in astrocytes: a hypothesis. *Theor Biol Med Model*. 2006 Jan 18;3:2.
- Jahanshahi M ; Sadeghi Y ; Hosseini A ; Naghdi N. The effect of spatial learning on the number of astrocytes in rat dentate gyrus. *Neuroanatomy*. 2007; 6(1): 51-3.
- Jahanshahi M, Sadeghi Y, Hosseini A, Naghdi N, Marjani A. The effect of spatial learning on the number of astrocytes in the CA3 subfield of the rat hippocampus. *Singapore Med J*. 2008 May;49(5):388-91.
- Calabresi P, Lacey MG, North RA. Nicotinic excitation of rat ventral tegmental neurones in vitro studied by intracellular recording. *Br J Pharmacol*. 1989 Sep;98(1):135-40.
- Moaddab M, Haghparast A, Hassanpour-Ezatti M. Effects of reversible inactivation of the ventral tegmental area on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in the rat. *Behav Brain Res*. 2009 Mar 17;198(2):466-71.
- Miyatake M, Narita M, Shibasaki M, Nakamura A, Suzuki T. Glutamatergic neurotransmission and protein kinase C play a role in neuron-glia communication during the development of methamphetamine-induced psychological dependence. *Eur J Neurosci*. 2005 Sep;22(6):1476-88.
- Fattore L, Puddu MC, Picciau S, Cappai A, Fratta W, Serra GP, et al. Astroglial in vivo response to cocaine in mouse dentate gyrus: a quantitative and qualitative analysis by confocal microscopy. *Neuroscience*. 2002;110(1):1-6.
- Ballesteros-Yáñez I, Benavides-Piccione R, Elston GN, Yuste R, DeFelipe J. Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience*. 2006;138(2):403-9.

## **The evaluation of morphine based CPP on the astrocytes of male Rat's dentate gyrus**

**Shabani R (MSc)<sup>1</sup>, Jahanshahi M (PhD)<sup>\*2</sup>, Noroozian M (PhD)<sup>3</sup>  
Sadeghi Y (PhD)<sup>4</sup>, Azami NS (PhD)<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>MSc in Anatomy, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>2</sup>Associate Professor, Department of Anatomy, Golestan Neuroscience Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. <sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>4</sup>Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>5</sup>Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran.

---

### **Abstract**

**Background and Objective:** Morphological alterations of hippocampus and dentate gyrus due to opium were reported in humans and animals. Also other evidences have shown that astrocytes actively participate in synaptic plasticity. This study was done to determine the conditioning place preference (CPP) on astrocytes number of Rat dentate gyrus by immunohistochemical technique.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 48 male Wistar Rat weighted average 220-250 g were used. For behavioural tests, Rats divided into eight experimental groups. The Rats were received morphine at different doses (2.5, 5, 7.5 mg/kg) for three days by subcutaneous injection and sham groups, received saline dose (1 mg/kg) and then CPP test in them were investigated. 48 hours after behavioural testing animals were decapitated under chloroform anesthesia and their brains fixed and after tissue processing, slices stained with immunohistochemistry techniques. For morphometric study PTAH staining of astrocytes was used.

**Results:** The most dose responses of morphine was observed in 7.5mg/kg. The number of astrocytes in the controls (20.627±6.129) was similar to control-saline group (17.339±4.71). This difference was not significant, while the difference in the number of astrocytes in control group with morphine-treated experimental groups was significant (P<0.05).

**Conclusion:** We concluded that the phenomenon of conditioned place preference induced by morphine can cause a significant increase in the number of astrocytes of sham and experimental groups compared to controls.

**Keywords:** Conditioning place preference, Morphine, Immunohistochemistry, Astrocytes, Dentate gyrus, Rats

---

**\* Corresponding Author: Jahanshahi M (PhD), E-mail: mejahanshahi@yahoo.com**

Received 23 November 2010

Revised 9 April 2011

Accepted 11 April 2011