

Reducing the Morphine Induced Conditioned Place Preference Acquisition by Inhibition of Glial Cells in the Hippocampus

Fatemeh Sadat Seyedaghamiri¹, Narges Hosseinmardi^{2*}, Mahyar Janahmadi³, Azadeh Elahi Mahani³

1- Department of Physiology, International Branch, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Neurophysiology Research Centre, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 19 May 2015, Accepted: 12 Aug 2015

Abstract

Background: Considering the increased activity of hippocampal glial cells due to chronic morphine administration and the involvement of hippocampus in restoration of the addictive drug-associated experience, the role of these cells on morphine induced conditioned place preference (CPP) was investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, four groups of animals were evaluated. After habituation to CPP apparatus on the first day, conditioning was done by injection of morphine (5 mg/kg) or its vehicle (saline) during three consecutive days. On the fifth day, the time spent in each compartment of CPP cage and locomotor activity was recorded for 20 min. To investigate the role of hippocampal glial cells in CPP, these cells were inhibited by bilaterally injecting fluorocitrate (1nmol/1µl), before each morphine injection. CPP testing in this group and animals received fluorocitrate vehicle (Phosphate buffer saline) was done before morphine injection.

Results: Fluorocitrate pretreatment reduced morphine induced conditioned place preference acquisition, so that a significant decrease was observed in conditioning score (unpaired t-test, $p < 0.01$) in this group ($n=8$) compared to animals received morphine ($n=9$). Neither morphine nor fluorocitrate pretreatment did not affect locomotor activity (ANOVA, $p > 0.05$).

Conclusion: The results suggest that glial cells in the hippocampus are involved in morphine induced conditioned place preference.

Keywords: Conditioned place preference, Glial cells, Hippocampus, Morphine.

*Corresponding Author:

Address: Department of Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: nhosseinmardi@sbmu.ac.ir

کاهش اکتساب ترجیح مکانی شرطی شده با مورفین در اثر مهار سلول‌های گلیای هیپوکمپ

فاطمه سادات سیدآقامیری^۱، نرگس حسین مردی^{۲*}، مهیار جان احمدی^۳، آزاده الهی ماهانی^۴

۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، شعبه بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- استادیار، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به افزایش فعالیت سلول‌های گلیای هیپوکمپ در اثر مصرف مزمن مورفین و نقش هیپوکمپ در به خاطر آوری تجربه استفاده از مواد اعتیاد آور، نقش این سلول‌ها را در ایجاد ترجیح مکان شرطی شده در اثر مورفین مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، حیوانات در ۴ گروه آزمایشی بررسی شدند. به منظور ایجاد ترجیح مکان شرطی، پس از سازگاری حیوانات با دستگاه ترجیح مکان شرطی شده (CPP) در روز اول، شرطی سازی با تزریق مورفین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و یا حلال آن (سالین) طی سه روز انجام شد. در روز پنجم، مدت زمان سپری شده در هر بخش قفس CPP و فعالیت حرکتی طی ۲۰ دقیقه ثبت گردید. به منظور بررسی نقش سلول‌های گلیای هیپوکمپ در روند ایجاد ترجیح مکانی، این سلول‌ها با تزریق ۱ میکرولیتر فلونوروسیترات ۱ نانومول قبل از هر تزریق مورفین، به صورت دو طرفه در داخل هیپوکمپ مهار شدند. آزمون ترجیح مکانی در این گروه و هم‌چنین در گروه دریافت کننده حلال فلونوروسیترات (بافر فسفات سالین)، قبل از تزریق مورفین انجام گردید.

یافته‌ها: پیش درمانی با فلونوروسیترات سبب کاهش اکتساب ترجیح مکان شرطی شده در اثر مورفین گردید. به طوری که کاهش معنی‌داری ($p < 0/01$)، آزمون تی تست غیر زوجی) در نمره شرطی شدن که این گروه ($n=8$) در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین ($n=9$) مشاهده شد. تزریق مورفین و نیز پیش درمانی با فلونوروسیترات بر فعالیت حرکتی حیوان تأثیری نداشت ($p > 0/05$ آزمون، آنووا).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سلول‌های گلیای هیپوکمپ در ایجاد ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین دخیل می‌باشند.

واژگان کلیدی: ترجیح مکانی شرطی شده، سلول‌های گلیا، هیپوکمپ، مورفین

*نویسنده مسئول: ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه فیزیولوژی

Email: nargeshosseinmardi@yahoo.com

مقدمه

اگرچه داروهای اپیوئیدی در درمان درد مؤثر هستند، اما به شدت اعتیادآور بوده و با تجویز مکرر آن‌ها، مکانیزم‌های سازشی شروع شده که سبب تغییرات کوتاه مدت و بلند مدت در عملکرد نورون‌ها، سلول‌های گلیا و در نتیجه شبکه‌های عصبی می‌شوند و در نهایت به تغییرات رفتاری نظیر تحمل، وابستگی و عود می‌انجامند (۱). این عوارض جانبی، استفاده از این دسته از ترکیبات را به عنوان داروی ضد درد محدود می‌نماید.

اظهارات حاکی است که اعتیاد دارویی یک شکل نابجا از یادگیری است که احتمالاً به وسیله سیستم‌های حافظه‌ای مغز نظیر هیپوکمپ وساطت می‌شود (۲). بر این اساس، به نظر می‌رسد که مصرف مواد اعتیادآور منجر به ایجاد نوعی حافظه می‌شود که تا سال‌ها بعد از قطع مصرف باقی مانده و عوامل مختلف نظیر استرس می‌تواند منجر به بازخوانی این حافظه و برگشت مجدد (عود) به مصرف دارو گردد (۳).

شواهد و قراین زیادی نشان می‌دهند که هیپوکمپ که ساختار مربوط به حافظه و یادگیری فضایی است (۴)، یک منطقه مهم دخیل در بازخوانی و توزیع اطلاعات مربوط به داروهای اعتیادآور در مغز نیز می‌باشد (۳، ۵). هیپوکمپ از طریق تغییرات در انتقال سیناپسی (شکل‌پذیری سیناپسی) در ایجاد حافظه و یادگیری دخیل می‌باشد (۶). اثبات شده است که مصرف مزمن داروهای اعتیادآور تغییراتی را در انتقال سیناپسی و یا شکل‌پذیری در هیپوکمپ القا می‌کند (۷).

سلول‌های گلیال هیپوکمپ که برخلاف نورون‌ها فاقد تحریک‌پذیری الکتریکی بوده و تعداد آن‌ها چندین برابر نورون‌هاست در انتقال سیناپسی، تنظیم غلظت میانجی‌های عصبی در شکاف سیناپسی، آزادسازی فاکتورهای مانند ATP که عملکرد پیش سیناپسی را تنظیم می‌کنند و حتی در آزادسازی میانجی‌های عصبی و شکل‌پذیری دخیل هستند (۸). مشخص شده است که مصرف مزمن مورفین علاوه بر تأثیر بر نورون‌ها، سلول‌های گلیال را

فعال می‌کند (۹). نقش این سلول‌ها در ویژگی‌های اعتیاد نظیر وابستگی به مورفین و تحمل مشخص شده است (۱۰). بنابراین با توجه به نقش هیپوکمپ در اعتیاد و تغییر شکل‌پذیری سیناپسی این ناحیه در اثر مورفین به عنوان ساز و کار ایجاد حافظه اعتیاد و با توجه به فعال شدن سلول‌های گلیا در اثر مصرف مزمن مواد اعتیادآور از جمله مورفین، در این مطالعه به این موضوع پرداختیم که آیا فعالیت سلول‌های گلیا در هیپوکمپ در ایجاد ترجیح مکانی شرطی شده توسط مورفین که ناشی از تشکیل حافظه مرتبط با اثرات مورفین است، دخیل است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم، تهیه شده از مرکز پرورش حیوان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) استفاده شد که به تعداد ۵ عدد در هر قفس با یک برنامه ۱۲ ساعته روشنایی-تاریکی نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام آزمایش‌ها با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (به شماره مجوز ۱۳۷۱/۰۴۰۰) انجام گردید.

به منظور اکتساب ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین، از دستگاه CPP استفاده گردید. در این روش از جعبه‌ای استفاده می‌شود که دارای سه چار دیواری می‌باشد. دو چار دیواری کناری هم اندازه بودند (۴۰ × ۳۰ × ۳۰ سانتی‌متر) و تنها از نظر نشانه‌های به کار رفته در آن‌ها تفاوت داشتند. یک چار دیواری مرکزی کوچک نیز به دو چار دیواری دیگر راه داشت. راه ارتباطی بین چار دیواری مرکزی و دو چار دیواری دیگر با استفاده از یک درب کشویی قابل باز و بسته شدن بود. یک دوربین فیلم‌برداری در بالای جعبه ترجیح مکانی قرار دارد که رفتار موش‌ها را به طور پیوسته پایش و در کامپیوتر ثبت می‌نماید. پس از پایان آزمون، رفتار ثبت شده از طریق دوربین با استفاده از نرم‌افزار اتوویژن مورد بررسی و واکاوی قرار می‌گیرد.

مورفین یا سالین مرتبط می‌شود و ترتیب دریافت مورفین یا سالین به میزانی برابر توزیع می‌گردد. به این ترتیب، هر موش یاد می‌گیرد که یکی از چارودیواری‌های کناری با مورفین (داروی پاداش آور) ارتباط دارد و چارودیواری کناری دیگر ارتباطی با پاداش ندارد.

در روز پنجم، آزمون ترجیح مکانی انجام می‌شود. ابتدا موش برای یک دقیقه در چارودیواری مرکزی گذاشته می‌شود و سپس درها باز شده و موش اجازه می‌یابد برای مدت بیست دقیقه آزادانه بین چارودیواری‌ها رفت و آمد کند. در این هنگام مدت زمانی که موش در هر چارودیواری سپری می‌کند و نیز میزان فعالیت حرکتی سنجیده و ثبت می‌شود. ترجیح مکانی به صورت اختلاف بین زمان سپری شده در چارودیواری مرتبط با دارو در روز آزمون و زمان سپری شده در چارودیواری غیر مرتبط با دارو تعریف می‌گردد و به صورت نمره ترجیح مکانی (بر حسب ثانیه) گزارش می‌شود (۱۱).

در این تحقیق به منظور بررسی نقش سلول‌های گلیای ناحیه CA1 هیپوکمپ در ایجاد ترجیح مکانی شرطی شده با مورفین، از تزریق داخل هیپوکمپی فلئوروسیترات به عنوان مهار کننده سلول‌های گلیا، استفاده گردید. به همین منظور، یک هفته قبل از شروع آزمایش‌ها، حیوان پس از بی‌هوشی با ترکیب کتامین (۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در دستگاه استریوتاکسی (استولتینگ، آمریکا) قرار گرفت. سپس پوست سر برداشته شد و نواحی برگما و لامبدا مشخص گردید و مختصات محل تزریق در ناحیه CA1 هیپوکمپ ($AP = -3.48$, $ML = \pm 2.2$, $DV = 2.5$) (از برگما) (۱۲) دو طرفه مطابق با اطلس پاکسینوس واتسون علامت گذاری شد و با مته سوراخ گردید و کانول راهنما با طول ۱۰ میلی‌متر و قطر خارجی ۰/۶۵ میلی‌متر، با استفاده از پیچ عینک و سیمان دندانپزشکی به میزان ۱ میلی‌متر بالاتر از ناحیه CA1 روی جمجمه ثابت شد. به منظور تزریق دارو به داخل ناحیه CA1 یک سوزن تزریق شماره ۲۷ به طول مشخصی بریده می‌شد تا هنگامی که در کانول گذاشته می‌شود نوک آن حدود

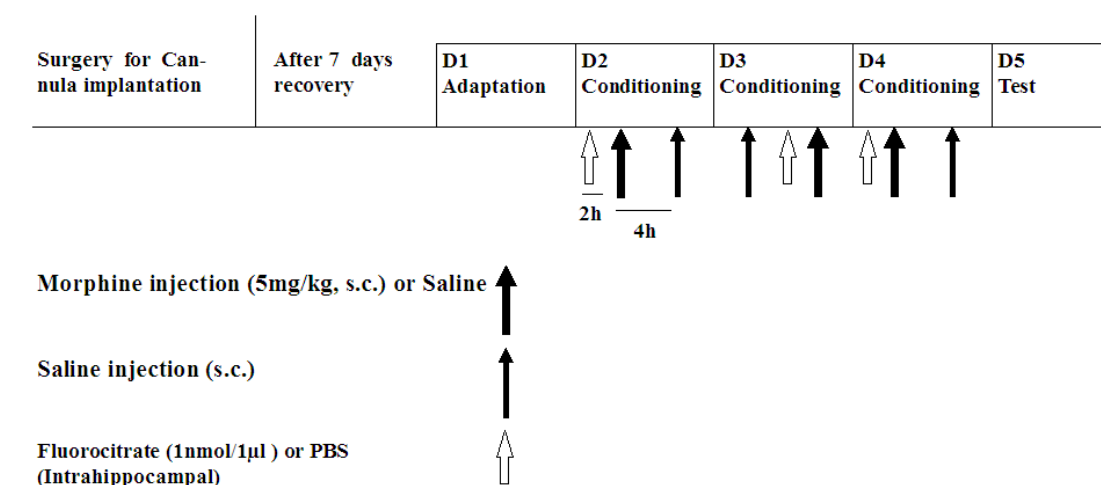
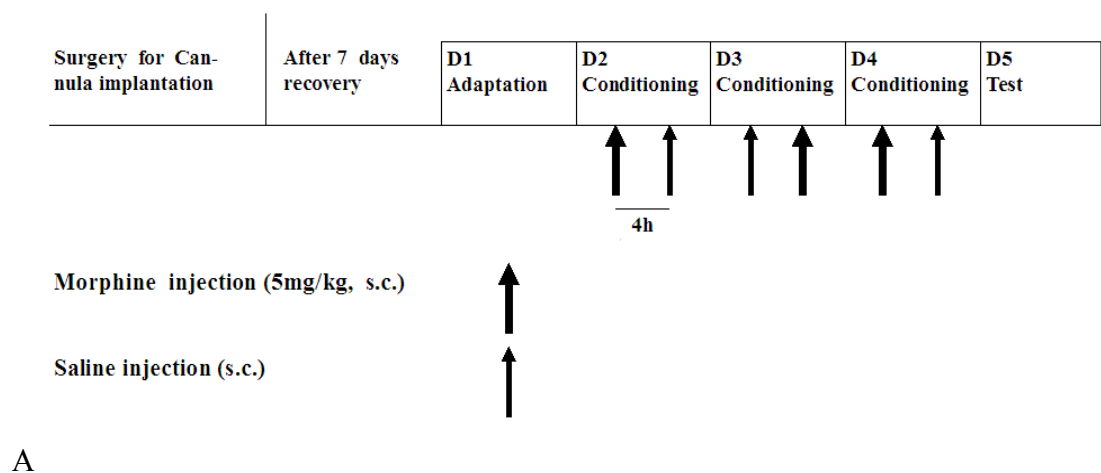
برای ایجاد ترجیح مکانی، مرحله پیش‌مواجهه در روز نخست انجام می‌گیرد. برای این کار، ابتدا موش برای مدت یک دقیقه در حالی که درهای کشویی بسته هستند در چارودیواری مرکزی قرار داده می‌شود تا با محیط آشنا شود. سپس هر دو در باز می‌شوند و برای مدت بیست دقیقه به موش اجازه رفت و آمد آزادانه درون هر سه چارودیواری داده می‌شود. مدت زمان گذرانده شده در هر چارودیواری و نیز میزان فعالیت حرکتی موش سنجیده می‌شود. سپس موش به قفس خود در حیوان‌خانه برده می‌شود. برای رد کردن هر گونه سوگیری ابتدایی موش نسبت به چارودیواری‌ها، هر موشی که بیش از نیمی از زمان ۱۰ دقیقه‌ای را در چارودیواری مرکزی سپری کند از مطالعه حذف می‌شود. برای موش‌های باقی‌مانده، زمان سپری شده در چارودیواری مرکزی از زمان ۱۰ دقیقه‌ای کل کم شده و باقیمانده به دو بخش تقسیم می‌شود. عدد به دست آمده برابر است با مدت زمان بهینه‌ای که هر موش بدون سوگیری برای یک چارودیواری خاص در هر چارودیواری سپری خواهد نمود. سپس این زمان بهینه در عدد ۰/۲ ضرب می‌گردد و مقدار به دست آمده، یک بار با زمان بهینه جمع و بار دیگر از آن کم می‌گردد. با این کار یک بازه زمانی به دست می‌آید که اگر موشی در روز اول مدت زمانی از خارج از در یک چارودیواری خاص بگذراند، دارای سوگیری برای آن چارودیواری فرض شده و از مطالعه خارج خواهد شد. موش‌های باقی‌مانده به طور تصادفی بین گروه‌های مورد مطالعه پخش می‌شوند. در روزهای دوم، سوم و چهارم آزمایش، مرحله شرطی‌سازی انجام می‌گیرد. در هر یک از این روزها، ابتدا مداخله پیش‌بینی شده مثلاً تزریق مورفین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) انجام می‌گیرد، سپس موش در حالی که درهای کشویی بسته هستند برای مدت ۴۵ دقیقه در یکی از چارودیواری‌های طرفی قرار داده می‌شود. پس از گذشت این زمان، موش به قفسش برده می‌شود و پس از ۴ ساعت، مداخله دیگر (تزریق سالین) انجام می‌شود و برای مدت ۴۵ دقیقه دیگر در چارودیواری طرف دیگر محدود می‌گردد. برای موش‌های درون هر گروه، چارودیواری با

گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه ۴ گروه می‌باشند که عبارت‌اند از:

۱- گروهی که مورفین سولفات (تماد، ایران) را به صورت زیر جلدی طی سه روز شرطی سازی به صورت مرتبط با یک محیط دریافت کردند. این آزمایش به منظور اکتساب ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین طراحی شده است. ابتدا حیوان در روز اول با محیط آزمایش سازش پیدا کرد و سپس طی ۳ روز طبق روش ذکر شده با استفاده از دستگاه CPP به محیطی که مورفین دریافت می‌نمود شرطی می‌گردید. سپس در روز پنجم مرحله آزمون صورت می‌گرفت (شکل ۱).

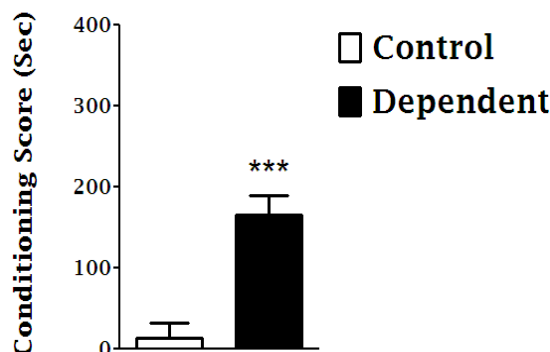
۰/۵ میلی‌متر از سر کانول بیرون آید. سپس سوزن به لوله پلی اتیلن که به سرنگ همیلتون یک میکرولیتری وصل بود، متصل می‌گردید.

۱ میکرولیتر از محلول فلونوروسیترات (۱ نانومول) محلول در بافر فسفات سالین به داخل سرنگ کشیده شد (۱۳) و بعد از خارج کردن درپوش کانول‌هایی که قبلاً در ناحیه CA1 هیپوکمپ کاشته شده بود، ۱۲۰ دقیقه قبل از تزریق مورفین به صورت دو طرفه تزریق گردید. تزریق به صورت آهسته و در مدت زمان ۵ دقیقه انجام می‌شد. جهت اطمینان از تزریق کامل دارو، سوزن تزریق به مدت ۱ دقیقه در محل باقی می‌ماند و بعد خارج می‌شد. سپس، درپوش کانول‌ها مجدداً گذاشته می‌شد. در گروه کنترل، ۱ میکرولیتر از حلال بافر فسفات سالین تزریق می‌شد. تعداد



شکل ۱. نمایش شماتیک برنامه استفاده شده برای القای ترجیح مکانی شرطی شده با مورفین (A) و مهار سلول‌های گلیای هیپوکمپ در حین القای ترجیح مکانی شرطی شده با مورفین (B).

معنی داری بالاتر بود ($p < 0.001$)، آزمون تی تست غیر زوجی، شکل ۲).



شکل ۲. ایجاد ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین. حیوانات دریافت کننده مورفین ($n=9$) با حیوانات دریافت کننده سالین مقایسه، ($n=9$) شدند. دریافت مورفین در یک محفظه سبب ترجیح حیوان برای گذراندن مدت زمان بیشتر در آن محفظه گردید. به عبارت دیگر مورفین سبب افزایش معنی دار نمره شرطی شدن در مقایسه با سالین شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. ($p < 0.001$ ، ***، آزمون تی تست غیر زوجی).

به منظور بررسی نقش سلول‌های گلایای هیپوکمپ در اکتساب ترجیح مکان شرطی شده در اثر مورفین، شرطی شدن در حیواناتی که قبل از هر بار تزریق مورفین، مهار کننده اختصاصی این سلول‌ها یعنی فلونوروسیترات را به صورت دوطرفه در هیپوکمپ دریافت کرده بودند بررسی گردید. پیش درمانی با فلونوروسیترات سبب کاهش اکتساب ترجیح مکان شرطی شده در اثر مورفین گردید، به طوری که کاهش معنی داری در نمره شرطی شدن این گروه ($n=8$) در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین ($p < 0.01$) آزمون تی تست غیر زوجی) مشاهده شد (شکل ۳).

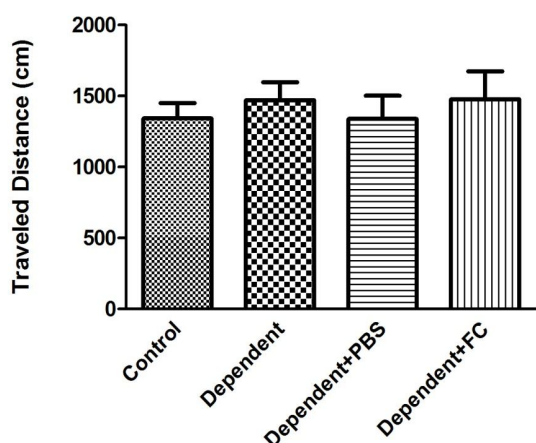
۲- گروه کنترل مربوط که با همان الگوی گروه اول، حلال مورفین یعنی سالین را به صورت زیر جلدی در هر دو بار تزریق در CPP دریافت کردند. به عبارت دیگر، در گروه کنترل، سالین در هر دو محیط به حیوان تزریق می‌شد.

۳- گروهی که به منظور مهار سلول‌های گلایای ناحیه CA1 هیپوکمپ، فلونوروسیترات را قبل از هر تزریق مورفین در داخل هیپوکمپ دریافت کردند. این آزمایش به منظور بررسی نقش سلول‌های گلایای ناحیه هیپوکمپ در اکتساب ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین طراحی شده است. ابتدا حیوان طی ۳ روز طبق روش ذکر شده با استفاده از دستگاه CPP شرطی می‌گردید. قبل از هر تزریق مورفین، به منظور جلوگیری از عملکرد سلول‌های گلایای هیپوکمپ، ۱ میکرولیتر فلونوروسیترات (۱ نانومول) از طریق کانول‌هایی که قبلاً در ناحیه GAI کاشته شده بودند، به صورت دوطرفه در این ناحیه تزریق می‌گردید و سپس در روز پنجم (مرحله آزمون) مورد بررسی قرار می‌گرفت (شکل ۱).

۴- گروه کنترل مربوط به گروه سه که حلال فلونوروسیترات یعنی بافر فسفات سالین را قبل از هر تزریق مورفین در داخل هیپوکمپ دریافت می‌کردند. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ تا ۹ سر می‌باشد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون‌های تی تست غیر زوجی و آنوای یک طرفه استفاده شد. در همه محاسبات آماری، $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

یافته‌ها

تجویز مورفین سبب افزایش زمان سپری شده در قسمت دریافت مورفین نسبت به زمان سپری شده در قسمت دریافت سالین شد. به عبارت دیگر ترجیح مکان شرطی شده در اثر مورفین القا گردید. به طوری که نمره شرطی شدن در این گروه در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین به طور

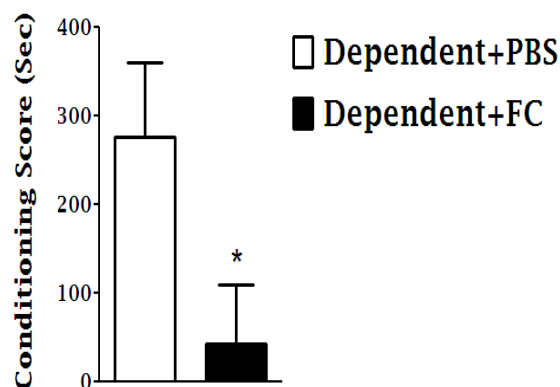


شکل ۴. مسافت طی شده توسط حیوان در گروه‌های مختلف. تفاوت معنی‌داری در کل مسافت طی شده در گروه‌های مختلف وجود ندارد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. ($p > 0.05$ ، آزمون آنوای یک طرفه)

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مهار سلول‌های گلایای ناحیه هیپوکمپ سبب کاهش ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین می‌گردد. در این پژوهش به منظور مهار سلول‌های گلایا از فلونوروسیترات استفاده گردید. شواهد نشان داده است که فلونوروسیترات با غلظت ۱ نانومول به طور انتخابی سلول‌های گلایا را به صورت برگشت‌پذیر مهار می‌کند. فلونوروسیترات ۴ ساعت بعد از تزریق به حداکثر خود می‌رسد و پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت از بین می‌رود. هم‌چنین نشان داده شده است که تجویز دوز بالاتری از فلونوروسیترات (۲ نانومول) باعث تغییر ساختار نورونی می‌شود (۱۳). به همین دلیل، در این پژوهش از غلظت ۱ نانومول فلونوروسیترات استفاده کردیم تا فقط سلول‌های گلایال به طور انتخابی تحت تاثیر قرار گرفته و مهار شوند. فلونوروسیترات ۲ ساعت قبل از تزریق مورفین به داخل هیپوکمپ تزریق شد تا اطمینان حاصل شود که این مهار کننده به صورت پروفیلاکسی اثر می‌کند.

به طور کلی، مواد مورد سوء مصرف می‌توانند تغییرات پیچیده‌ای در مدارهای عصبی پاداش القا نمایند. این تغییرات هم سلول‌های عصبی و هم غیر عصبی را شامل



شکل ۳. اثر تزریق دوطرفه فلونوروسیترات در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر ترجیح مکان شرطی شده القا شده در اثر مورفین. مهار سلول‌های گلایای هیپوکمپ توسط فلونوروسیترات قبل از هر تزریق مورفین (n=9) از اکتساب ترجیح مکان شرطی شده در اثر مورفین جلوگیری نمود. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. ($p < 0.05$ ، *، آزمون تی تست غیر زوجی).

لازم به ذکر است که تزریق حلال فلونوروسیترات بافر فسفات سالین به صورت دو طرفه در ناحیه هیپوکمپ قبل از تزریق مورفین، تأثیری بر اکتساب ترجیح مکان شرطی شده توسط مورفین نداشت، به طوری که تفاوت معنی‌داری بین نمره شرطی شدن در این گروه با گروه شرطی شده در اثر مورفین مشاهده نشد ($p > 0.05$ ، آزمون تی تست غیر زوجی).

هیچ یک از تیمارهای ذکر شده در بخش اکتساب ترجیح مکانی شرطی شده تأثیری بر فعالیت‌های حرکتی حیوانات نداشتند، به طوری که مسافت طی شده توسط حیوانات در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با هم نداشت ($p > 0.05$ ، آزمون آنوای یک طرفه، شکل ۴)

می‌شوند. گزارش‌ها نشان می‌دهند فعال شدن سلول‌های گلیال در رفتارهای جستجوگرانه دارو نقش دارد (۱۴). اگرچه هیپوکمپ جزء مدار پاداش نمی‌باشد و به عنوان مدار اصلی دخیل در حافظه و یادگیری شناخته شده است، هم‌چنین دارای نقش اساسی در به خاطر سپاری زمینه مواجهه با دارو و سندرم قطع مصرف است (۱۵). هیپوکمپ می‌تواند باعث تشکیل حافظه مربوط به اعتیاد حتی در نبود علائم و نشانه‌های محیطی شود (۱۶).

مشخص شده است تجویز مورفین سبب افزایش فعالیت سلول‌های گلیا و بیان پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال (GFAP) آنها در هیپوکمپ می‌شود. در مورد نحوه فعال شدن، نظریات مختلفی راجع به موارد ذیل وجود دارد، از جمله: باند شدن مستقیم به گیرنده‌های اپیوئیدی موجود در این سلول‌ها، فعال شدن از طریق گیرنده‌های غیر کلاسیک اپیوئیدها و فعال شدن غیر مستقیم از طریق رهایش سیگنال‌های نورون به گلیا که از طریق اپیوئیدها تحریک می‌شوند (۱۷، ۱۸).

با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد فعالیت سلول‌های گلیا در هیپوکمپ در ایجاد حافظه اعتیاد دخیل باشند. چراکه با از کار افتادن این سلول‌ها حیوان نتوانسته است بخشی از جعبه CPP را که با مورفین در ارتباط بوده است به خاطر بسپارد. مطالعات قبلی نیز موید این نتایج است. در مطالعه ناریتا و همکاران در سال ۲۰۰۶، تزریق فاکتورهای فعال کننده آستروسیت در هسته آکومبسنس و قشر سینگولیت، اثرات پاداشی اپیوئیدها را تشدید نمود و هم‌چنین، مهار سلول‌های گلیا به وسیله پروپنتوکسی فیلین، CPP القا شده یا مت‌آمفتامین را کاهش داد. این مطالعه نشان می‌دهد که اثرات پاداشی داروهای مورد سوء مصرف صرفاً به واسطه تغییر عملکرد نورون‌ها نبوده است، بلکه سلول‌های گلیا نیز در آن دخیل می‌باشند (۱۹). علاوه بر این، مشخص گردیده است که مهار سلول‌های گلیا از افزایش رهایش دوپامین در نوکلئوس آکومبسنس در اثر مصرف مورفین جلوگیری می‌نماید، همین امر می‌تواند سبب کاهش اثرات پاداشی مورفین گردد (۲۰).

شواهد حاکی است که شکل‌پذیری سیناپسی در اثر سوء مصرف مواد تغییر نموده و این فرایند در بروز ویژگی‌های رفتاری اعتیاد دخیل است. مصرف مورفین، آستروسیت‌ها و سلول‌های میکروگلیا را فعال نموده و بیان ژن سیتوکین‌های پیش التهابی را افزایش می‌دهد (۲۱). وقتی سلول‌های میکروگلیا فعال می‌شوند، می‌توانند سیتوکین‌ها، کموکین‌ها، ROS و پروتئین‌های کومپلمان تولید کنند که منجر به شروع فرآیند پیش‌رونده التهاب عصبی و در نهایت شکل‌پذیری سیناپسی می‌شود که در ایجاد CPP دخیل است (۲۲، ۲۳).

علاوه بر این، سیستم گلوتامترژیک که نقش مهمی در شکل‌پذیری سیناپسی و هم‌چنین اعتیاد ایفا می‌کند، تحت تأثیر فعالیت سلول‌های گلیا قرار دارد. یکی از مهم‌ترین اعمال آستروسیت‌ها در سیستم عصبی مرکزی، برداشت مجدد گلوامات خارج سلولی رها شده بوسیله نورون‌ها در طی فعالیت سیناپسی است (۲۴). بخش عمده این برداشت به کمک آستروسیت‌ها و از طریق ناقلین گلوتامات (GLT-1 و GLAST) انجام می‌شود (۲۵). سیستم گلوتامترژیک به شدت در فرآیندهای یادگیری که منجر به رفتارهای اعتیاد نظیر CPP می‌شود دخیل است (۲۶). ناکاگاوا و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که تجویز هم‌زمان فعال کننده ناقل گلوتامات، MS-153، با مورفین سبب تغییر فرایند شرطی شدن مکانی القا شده در اثر مورفین می‌شود (۲۷). احتمالاً یکی از مکانیسم‌هایی که در آن سلول‌های گلیای هیپوکمپ در ایجاد ترجیح مکانی نقش دارند، تنظیم گلوتامات سیناپسی می‌باشد.

هیپوکمپ، ورودی‌های دوپامینرژیک را به ویژه از VTA دریافت می‌کند که این ورودی‌ها هم در پردازش حافظه و هم در اثرات پاداش دخیل هستند. مشخص شده است NO به عنوان یک پیام آور رتروگرید، منجر به افزایش رهایش دوپامین می‌شود و این مولکول در

مطالعات قبلی نیز موید این نتایج است. در مطالعه ناریتا و همکاران در سال ۲۰۰۶، تزریق فاکتورهای فعال کننده آستروسیت در هسته آکومبسنس و قشر سینگولیت، اثرات پاداشی اپیوئیدها را تشدید نمود و هم‌چنین، مهار سلول‌های گلیا به وسیله پروپنتوکسی فیلین، CPP القا شده یا مت‌آمفتامین را کاهش داد. این مطالعه نشان می‌دهد که اثرات پاداشی داروهای مورد سوء مصرف صرفاً به واسطه تغییر عملکرد نورون‌ها نبوده است، بلکه سلول‌های گلیا نیز در آن دخیل می‌باشند (۱۹). علاوه بر این، مشخص گردیده است که مهار سلول‌های گلیا از افزایش رهایش دوپامین در نوکلئوس آکومبسنس در اثر مصرف مورفین جلوگیری

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده، سلول‌های گلپای هیپوکمپ در ایجاد ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین دخیل می‌باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ۱۳/۱۱۹۴ می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از مسئولان آن دانشگاه و هم‌چنین از سرکار خانم دکتر معتمدی که امکان انجام تحقیق در مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی را فراهم نمودند تشکر و سپاس‌گزاری می‌نمایند.

منابع

1. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiological reviews*. 2001; 81(1):299-343.
2. Robbins TW, Everitt BJ. Drug addiction: bad habits add up. *Nature*. 1999; 398(6728):567-70.
3. Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiology of learning and memory*. 2002; 78(3):637-47.
4. Morris RG, Moser E, Riedel G, Martin S, Sandin J, Day M, et al. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003; 358(1432):773-86.
5. Kelley AE. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*. 2004; 44(1):161-79.
6. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993; 361(6407):31-9.
7. Hosseinmardi N, Fathollahi Y, Naghdi N, Javan M. Theta pulse stimulation: a natural stimulus pattern can trigger long-term depression but fails to reverse long-term potentiation in morphine withdrawn

هیپوکمپ در ایجاد ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین دخیل می‌باشد (۲۸).

تولید NO از طریق سلول‌های گلپا به اثبات رسیده است و مشخص شده است که فلوئوروسیترات تولید NO را کاهش می‌دهد (۲۹). بنابراین به نظر می‌رسد مهار این سلول‌ها در هیپوکمپ و حذف تولید NO در اثر آن‌ها منجر به کاهش اثرات پاداشی مورفین و نیز اختلال در تشکیل حافظه اعتیاد می‌شود که در نهایت اکتساب ترجیح مکانی شرطی شده ناشی از مورفین کاهش می‌یابد.

مشخص شده است P38 که یک عضو خانواده MAP کیناز است، اعمال تنظیمی متعددی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارد. نقش سیگنالینگ P38 سلول‌های گلپا در هسته آکومبیس در ایجاد اثرات پاداشی مورفین به اثبات رسیده است. فلوئوروسیترات از طریق این مسیر سیگنالینگ و با مهار سلول‌های گلپای هیپوکمپ نقش خود را در جلوگیری از اثرات پاداشی مورفین و در نتیجه جلوگیری از ترجیح مکان شرطی شده ایفا می‌کند. شواهد حاکی است که فعال شدن P38 در سلول‌های میکروگلپا سبب رهايش سيتوكين‌ها و فاکتورهای نوروتروفیک می‌شود که این عوامل در سازگاری طولانی مدت مدارهای عصبی درگیر در اعتیاد نقش دارند. برای مثال BDNF که در شکل‌پذیری سیناپسی دخیل است، در صورت تزریق در هسته آکومبیس می‌تواند سبب افزایش اثرات پاداشی مواد مورد سوء مصرف گردد (۳۰). ایجاد ترجیح مکانی شرطی شده پدیده پیچیده‌ای است که به فعال شدن سیستم‌های حافظه‌ای نیاز دارد. سيتوكين‌ها و فاکتورهای نوروتروفیک رها شده از گلپای فعال شده با مورفین در شکل‌پذیری عصبی و شکل‌پذیری مجدد سیناپسی نقش دارند.

بنابراین به نظر می‌رسد سلول‌های گلپای هیپوکمپ با مکانیسم‌های متنوع می‌توانند در ایجاد تغییرات سیناپسی القا شده با مورفین و به دنبال آن اثرات رفتاری ناشی از مصرف مورفین نقش داشته باشند.

- hippocampus area CA1. *Brain research*. 2009; 1296:1-14.
8. Allen NJ, Barres BA. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*. 2005; 15(5):542-8.
9. Song P, Zhao Z-Q. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neuroscience research*. 2001; 39(3):281-6.
10. Hameed H, Hameed M, Christo PJ. The effect of morphine on glial cells as a potential therapeutic target for pharmacological development of analgesic drugs. *Current pain and headache reports*. 2010; 14(2):96-104.
11. Taslimi Z, Haghparast A, Hassanpour-Ezatti M, Safari M-S. Chemical stimulation of the lateral hypothalamus induces conditioned place preference in rats: involvement of OX1 and CB1 receptors in the ventral tegmental area. *Behavioural brain research*. 2011; 217(1):41-6.
12. Praxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press: San Diego; 2006.
13. Fonnum F, Johnsen A, Hassel B. Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia*. 1997; 21(1):106-13.
14. Cooper ZD, Jones JD, Comer SD. Glial modulators: a novel pharmacological approach to altering the behavioral effects of abused substances. *Expert opinion on investigational drugs*. 2012; 21(2):169-78.
15. Chao J, Nestler EJ. Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med*. 2004; 55: 113-32.
16. Liu F, Jiang H, Zhong W, Wu X, Luo J. Changes in ensemble activity of hippocampus CA1 neurons induced by chronic morphine administration in freely behaving mice. *Neuroscience*. 2010; 171(3):747-59.
17. Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *The Scientific World Journal*. 2007; 7: 98-111.
18. Johnston IN, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Frank MG, Zapata V, Campisi J, et al. A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *The Journal of neuroscience*. 2004; 24(33): 7353-65.
19. Narita M, Miyatake M, Narita M, Shibasaki M, Shindo K, Nakamura A, et al. Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31(11): 2476-88.
20. Bland ST, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR, Johnson KW. The glial activation inhibitor AV411 reduces morphine-induced nucleus accumbens dopamine release. *Brain, behavior, and immunity*. 2009; 23(4): 492-7.
21. Shen C-H, Tsai R-Y, Wong C-S. Role of neuroinflammation in morphine tolerance: Effect of tumor necrosis factor- α . *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*. 2012; 50(4):178-82.
22. Tai Y-H, Wang Y-H, Wang J-J, Tao P-L, Tung C-S, Wong C-S. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and up-regulates glutamate transporters in morphine-tolerant rats. *Pain*. 2006; 124(1):77-86.
23. Hao S, Liu S, Zheng X, Zheng W, Ouyang H, Mata M, et al. The role of TNF α in the periaqueductal gray during naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2011; 36(3): 664-76.
24. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends in neurosciences*. 2004; 27(12): 735-43.
25. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 1996; 16(3):675-86.
26. Kalivas PW. Glutamate systems in cocaine addiction. *Current opinion in pharmacology*. 2004;4(1):23-9.
27. Nakagawa T, Fujio M, Ozawa T, Minami M, Satoh M. Effect of MS-153, a glutamate transporter activator, on the conditioned rewarding effects of morphine, methamphetamine and cocaine in mice. *Behavioural brain research*. 2005; 156(2):233-9.
28. Karami M, Zarrindast MR, Sepehri H, Sahraei H. Role of nitric oxide in the rat

hippocampal CA1 area on morphine-induced conditioned place preference. *European journal of pharmacology*. 2002; 449(1): 113-9.

29. Sun X-C, Chen W-N, Li S-Q, Cai J-S, Li W-B, Xian X-H, et al. Fluorocitrate, an inhibitor of glial metabolism, inhibits the up-regulation of NOS expression, activity and NO production in the spinal cord induced by

formalin test in rats. *Neurochemical research*. 2009; 34(2):351-9.

30. Zhang X-Q, Cui Y, Cui Y, Chen Y, Na X-D, Chen F-Y, et al. Activation of p38 signaling in the microglia in the nucleus accumbens contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Brain, behavior, and immunity*. 2012; 26(2):318-25.