نقش گیرنده‌های $GABA_A$ نواحی CA_1 هیپوکامپ در اکتساب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین

دکتر محمدرضا زرین‌دست[1]
دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی
سمیرا رضوی موحد
دانشگاه تهران، دانشکده علوم زیست شناسی
آمنه رضایوف
دانشگاه تهران، دانشکده علوم زیست شناسی
علی حائری روحانی
دانشگاه تهران، دانشکده علوم زیست شناسی
هنگامه ذات‌علی
دانشگاه تهران، دانشکده علوم زیست شناسی

هدف: هیپوکامپ از مراکز اصلی یادگیری وابسته به پاداش است و با در نظر گرفتن توزیع وسیع گیرنده‌های $GABA_A$ در ناحیه CA_1 هیپوکامپ پشتی، احتمال می‌رود این گیرنده‌ها در یادگیری وابسته به پاداش نقش داشته باشند. در مطالعه حاضر، اثرات تزریق دو طرفه درون هیپوکامپی آگونیست یا آنتاگونیست گیرنده‌های $GABA_A$ بر اکتساب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین، در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفته است. **روش:** در این مطالعهٔ تجربی- مداخله‌ای، از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ، نژاد ویستار، با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۴۰ گرم استفاده شد. کلیه حیوانات با دستگاه استرئوتاکس در نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی به صورت دوطرفه کانول‌گذاری و پس از طی دورهٔ بهبود، وارد آموزش‌های شرطی‌سازی و القای «ترجیح مکان شرطی‌شده» (CPP) شدند. روش مورد استفاده برای CPP شامل یک دورهٔ پنج روزه با سه مرحلهٔ مجزای زیر بود: ۱- مرحلهٔ پیش شرطی‌سازی؛ ۲- مرحلهٔ شرطی سازی؛ ۳- مرحلهٔ آزمون یا بیان پاداش. **یافته‌ها:** تزریق زیر جلدی مقادیر مختلف مرفین در یک روش وابسته به تعداد، ترجیح یک مکان شرطی شده (CCP) را القا نمود. تزریق موسیمول، به عنوان آگونیست گیرنده $GABA_A$ داخل CA_1، توانست CPP القا شده به وسیله مرفین را به طور معنی‌دار مهار کند. تزریق دوطرفه مقادیر مختلف بیکوکولین داخل نواحی CA_1 هیپوکامپ، همراه با یک مقدار بی‌اثر مرفین سبب القای معنی‌دار CPP گردید. موسیمول یا بیکوکولین به تنهایی بر شرطی‌سازی مکانی اثری نداشتند. همچنین نتایج نشان دادند که واکنش القا شده به وسیله تزریق دو طرفه موسیمول به CA_1، با پیش‌تیمار به وسیله بیکوکولین برگشت‌پذیر است. از سوی دیگر، تزریق دو طرفه موسیمول یا بیکوکولین داخل CA_1، بیان CPP مرفین را به طور معنی‌دار کاهش داد، در حالی که بر فعالیت حرکتی در مرحله آزمون اثری نداشت. **نتیجه‌گیری:** نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که گیرنده‌های $GABA_A$ نواحی CA_1 هیپوکامپ، در اکتساب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین نقش مهمی به عهده دارند.

مقدمه

«ترجیح مکان شرطی شده» (CPP)[2]، یک روش حساس برای ارزیابی پاداش دارویی است که بر اساس آن میزان گرایش حیوانات آزمایشگاهی به محرکی که قبلا با یک حالت خوشایند (القا شده به وسیله دارویی مانند مرفین) همراه شده بود، تعیین می‌شود (هافمن[3]، ۱۹۸۹؛ بلزانگ[4] و باریو[5]، ۲۰۰۰؛ ناریتا[6]، اوکی[7]، ازاکی[8]، یاجیما[9] و سوزوکی[10]، ۲۰۰۱). الگوی CPP نیازمند نمودارگیری ارتباط میان پاداش و مکان خاص است (پیپونن[11]،

2- Conditioned Place Preference
3 - Hoffman
4- Belzung
5 - Barreau
6- Narita
7- Aoki
8- Ozaki
9 - Yajima
10- Suzuki
11 - Piepponen

۱ - نشانی تماس: تهران، دانشگاه تهران، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی.
E-mail: Zarinmr@ams.ac.ir

کیواستیک[1]، کاتاجاماکی[2]، زارکوفسکی[3] و آتی[4]، ۱۹۹۷؛ فربین‌تانو[5] و مک‌دونالد[6]، ۲۰۰۱). وایت[7] (۱۹۹۶) معتقد است که سیستم هیپوکامپی در CPP نقش دارد و مطالعات نیز نشان داده‌اند که تخریب هیپوکامپ، موجب تضعیف CPP می‌شود (فربین‌تانو و مک‌دونالد، ۲۰۰۱).

مطالعات قبلی ما نشان می‌دهند که بین مراکز حافظه‌ای از جمله هیپوکامپ (کرمی، زرین‌دست، سپهری و صحرایی، ۲۰۰۲؛ رضایوف[8]، زرین‌دست، صحرایی و حائری‌روحانی، ۲۰۰۳) یا آمیگدال (رضایوف، زرین‌دست، صحرایی و حائری‌روحانی، ۲۰۰۲؛ زرین‌دست، رضایوف، صحرایی، حائری‌روحانی و رسولی ۲۰۰۳) و یادگیری وابسته به پاداش در CPP، ارتباط وجود دارد. به نظر می‌رسد انتقالات دوپامینرژیک مزولیمبیک از منطقه تگمنتوم شکمی به هسته اکومبنس، نقش مهمی در اثرات وابسته به پاداش مرفین ایفا می‌کند (مک‌برایدِ[9]، مورفی[10] و ایکموتو[11]، ۱۹۹۹؛ ناریتا و همکاران، ۲۰۰۱؛ کلی[12] و بریج[13]، ۲۰۰۲). نورون‌های GABA جزیی از سیستم دوپامینی مزولیمبیک هستند که از طریق گیرنده‌های GABA، فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک را تنظیم می‌کنند (گانگ[14]، نیل و جاستیس، ۱۹۹۸؛ پاناگیس[15] و کاستلاکیس[16]، ۲۰۰۲). به علاوه، نورون‌های گابائرژیک تگمنتوم شکمی، انشعاباتی به سایر مراکز مغزی درگیر در فرآیندهای پاداشی رفتار می‌فرستند (سمبا[17] وفیگر[18]، ۱۹۹۲؛ وان بوکستل[19] و پیکل[20]، ۱۹۹۵). GABA مهمترین ناقل عصبی یا نوروترانسمیتر مهاری در سیستم عصبی است که روی دو گروه گیرنده اصلی تأثیر می‌گذارد. این گیرنده‌ها به دو گروه عمده یونوتروپیک (گیرنده‌های $GABA_A$/GABAc) و متابوتروپیک (گیرنده $GABA_B$) تقسیم می‌شوند (بورمن[21]، ۲۰۰۰؛ سمیانو[22] و کولمن[23]، ۲۰۰۲). مشخص شده است که تزریق مزمن مرفین ممکن است گیرنده‌های $GABA_A$ مرکزی را تنظیم کند (تیکو[24] و هافمن[25]، ۱۹۸۰). همچنین پیشنهاد شده است که مهار گیرنده‌های $GABA_A$ متمرکز بر نورون‌های دوپامینی ناحیه تگمنتوم شکمی، نقش مهمی در تنظیم آزادسازی دوپامین در هسته اکومبنس ایفا می‌کند (زی[26] و اشتاین[27]، ۲۰۰۲). GABA در ایجاد تعادل بین حالت‌های تحریکی و مهاری کورتکس و هیپوکامپ و نورون‌های رابط (که نقش فعالی در فرآیندهای اطلاعاتی دارند) نقش کنترلی دارد (پائولسن[28] و موزر[29]، ۱۹۹۸). مشخص شده است که آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده $GABA_A$، به ترتیب موجب تضعیف و تقویت حافظه و یادگیری می‌شوند (فار[30]، فلود[31] و مورلی[32]، ۲۰۰۰؛ چاپوتیر[33]، ۲۰۰۴). به علاوه، مطالعات نشان داده‌اند که CPP یک الگوی یادگیری است (پیپونن و همکاران، ۱۹۹۷؛ فربینتانو و مک‌دونالد، ۲۰۰۱) و یادگیری نیز نقش مهمی در توسعه پاداش اپیاتی دارد (وایت، ۱۹۹۶؛ لو[34]، زنگ[35]، لیو[36] و شنگ[37]، ۲۰۰۰). بنابراین در مطالعه حاضر، تأثیر گیرنده‌های $GABA_A$ نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی بر اکتساب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین بررسی شده است.

روش

در این مطالعهٔ تجربی- مداخله‌ای از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی[38] نر بالغ نژاد ویستار[39] با میانگین وزنی ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتوپاستور ایران تهیه و در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. آب و غذای مخصوص به میزان کافی (به جز هنگام آزمایش) در دسترس آنها قرار داده می‌شد. محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته (روشنایی طی هفت صبح تا هفت شب) و دمای آن 22 ± 2 °C بود. برای اینکه استرس و ترس ناشی از جابه‌جایی حیوانات از بین برود و به مکان جدید عادت کنند، حیوانات یک هفته قبل از آزمایش به آزمایشگاه منتقل شدند. در

1- Kivastic
2 - Katajamaki
3- Zharkovsky
4 - Ahtee
5- Ferbinteanu
6 - McDonald
7- White
8- Rezayof
9- McBride
10 - Murphy
11- Ikemoto
12 - Kelley
13- Berridge
14 - Gong
15- Panagis
16 - Kastellakis
17- Semba
18 - Fibiger
19- Van Bockstaele
20 - Piekel
21- Bormann
22 - Semyanov
23- Kullmann
24 - Tieku
25- Huffman
26 - Xi
27- Stein
28- Paulsen
29- Moser
30 - Farr
31- Flood
32 - Morley
33- Chapouthier
34 - Lu
35- Zeng
36 - Liu
37- Ceng
38- Rat
39- Wistar

طول مدت سازش با محیط، هر حیوان فقط به مدت پنج دقیقه در دست قرار می‌گرفت تا کمتر دچار استرس شود و از هر حیوان در تمامی آزمایش‌ها، فقط یک بار استفاده شد.

داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: سولفات مرفین[1] (شرکت تماد، تهران، ایران)، موسیمول (شرکت توکریس انگلستان) و بیکوکولین (شرکت سیگمای آمریکا). کلیه داروها، به جز بیکوکولین، درست قبل از آزمایش در محلول سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل حل شدند.

ابتدا بیکوکولین در یک تا دو قطره اسید استیک گلاسیال (با کمک سرنگ هامیلتون) حل و سپس به وسیله سرم فیزیولوژیک تا حجم پنج میلی‌متر رقیق گردید. موسیمول و بیکوکولین در نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی و مرفین به صورت زیرجلدی[2] (SC) تزریق شدند. گروه‌های کنترل، سالین یا حامل[3] دریافت می‌کردند.

روش جراحی حیوان و تزریق دارو

قبل از عمل جراحی و کانول‌گذاری، ابتدا حیوان با کتامین هیدروکلراید[4] و زایلزین[5] (با نسبت ۱۰۰ mg/kg کتامین به mg/kg ۴ زایلزین) بی‌هوش شد. برای تهیه کانول راهنما، سر سرنگ شماره ۲۲، از جنس فولاد ضدزنگ به کار رفت. این کانول‌ها به صورت دو طرفه، با تعیین مختصات نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی از روی اطلس پاکسینوس[6] و واتسون[7] (۱۹۸۶) به اندازه یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق کار گذاشته شدند. مختصات اطلس برای ناحیه هیپوکامپ پشتی عبارت است از: قدامی - خلفی: ۳/۵- تا ۳- میلی‌متر از برگما؛ میانی- جانبی: ۱/۸ ± ۲ میلی‌متر از خط وسط؛ شکمی - پشتی: ۳- تا ۲/۸- میلی‌متر از سطح جمجمه.

کانول تعبیه شده، با سیمان دندانپزشکی محکم شد. برای جلوگیری از بسته شدن مجرای کانول تا زمان تزریق دارو، این مجرا با یک سیم فولادی ضد زنگ هم اندازه با کانول راهنما که از سر سرنگ شماره ۲۷ تهیه شده بود، مسدود گردید. بعد از پایان جراحی، برای بهبود حیوانات و رفع استرس جراحی، یک هفته به آنها استراحت داده شد و بعد از پایان این مدت مورد آزمایش قرار گرفتند. داروهای گابائرژیک مورد نظر، از طریق کانول‌ها، به صورت دوطرفه، داخل نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی تزریق شدند.

برای تزریق، حیوان به آرامی با دست نگه داشته شد تا دچار استرس و ترس نشود. بعد سیم‌های فولادی از داخل کانول راهنما برداشته و کانول تزریق شماره ۲۷ به آرامی وارد یکی از کانول‌ها شد (کانول تزریق، ۰/۵ میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما بود). داروها به وسیله کانول تزریق شماره ۲۷ که با یک رابط پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون وصل بود، تزریق شدند؛ بدین‌ترتیب که ۰/۵ میکرولیتر از داروی موردنظر، به آرامی، به هر یک از دو ناحیه CA_1 (راست و چپ) هیپوکامپ پشتی حیوان تزریق شدند. زمان تزریق ۶۰ ثانیه بود و ۶۰ ثانیه هم کانول تزریق را داخل کانول راهنما نگه داشتند تا دارو کاملاً در ناحیه مغزی مورد نظر جذب شود.

دستگاه ترجیح مکان شرطی شده (CPP)

دستگاه سه قسمتی ترجیح مکان شرطی شده، چوبی و بر اساس طرح کار[8] و وایت (۱۹۸۳) ساخته شده است. دو قسمت اصلی A و B دستگاه، مساوی و دارای ابعاد ۳۰ × ۳۰ × ۴۰ سانتی‌متر می‌باشند، ولی تفاوت‌هایی دارند که آنها را از هم مشخص می‌کند. دیواره قسمت A دستگاه، سفید رنگ است و نوارهای سیاه افقی به عرض دو سانتی‌متر و کف توری دارد و قسمت B دستگاه، سیاه رنگ است و دارای نوارهای عمودی سفید به عرض دو سانتی‌متر و یک کف صاف می‌باشد. قسمت سوم دستگاه، یعنی قسمت C، یک تونل قرمز رنگ در ابعاد ۳۰×۱۵×۴۰ سانتی‌متر دارد که دو قسمت بزرگ A و B را به یکدیگر مرتبط می‌کند. دستگاه به وسیله یک در گیوتینی به سه بخش کاملاً مجزا تقسیم می‌شود. با برداشتن این در، حیوان می‌تواند از طریق تونل C، آزادانه درقسمت‌های A و B حرکت کند.

آزمون رفتاری

روش ترجیح مکان شرطی شده، بر اساس طرح بدون سوگیری[9] و طبق روش دفونسکا[10] و همکارانش (۱۹۹۵) پایه‌ریزی شده است. در این طرح، حیوان به هیچ قسمت دستگاه تمایل خاصی نشان نمی‌دهد. روش ترجیح مکان شرطی شده، شامل یک

1- morphine sulphate
2 - subcutaneously
3- vehicle
4 - ketamine hidrocholoride
5- Xylazine
6 - Paxinos
7- Watson
8 - Carr
9- unbiased
10 - De fonseca

برنامه پنج روزه و سه مرحله مشخص است: پیش‌شرطی‌سازی[1]، شرطی‌سازی و آزمون (پس شرطی‌سازی[2]).

الف- مرحله پیش‌شرطی‌سازی. در اولین روز دوره که آن را روز آشنایی حیوان با محیط داخل دستگاه می‌خوانند، در گیوتینی برداشته و هر حیوان در قسمت C دستگاه گذاشته شد تا مدت ۱۵ دقیقه آزادانه در محیط دستگاه گردش کند و با محیط داخل قفس آشنا شود. زمان سپری شده هر حیوان در قسمت‌های A و B با کرونومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. در این روش، حیوانات به هیچ قسمت دستگاه تمایل خاصی نشان ندادند. تحلیل آماری نشان داد که زمان سپری شده برای گروه‌های هشت‌تایی موش‌ها در قسمت‌های A و B، اختلاف معنی‌داری نداشت. سپس برای شرطی شدن مکانی، حیوانات به طور تصادفی در نظر گرفته شدند.

ب- مرحله شرطی‌سازی. مرحله شرطی‌سازی، یک روز بعد از مرحله پیش‌شرطی‌سازی شروع شد. در گیوتینی در داخل دستگاه نصب و ارتباط قسمت‌ها قطع شد. این مرحله سه روز طول کشید و شامل روزی دو نوبت تزریق (هشت صبح و دو بعد از ظهر) بود.

صبح اولین روز این مرحله، حیوانات بلافاصله بعد از تزریق زیرجلدی مرفین سولفات، به مدت ۴۵ دقیقه، در قسمت سفید دستگاه (A) قرار داده شدند. بعد از شش ساعت (عصر همان‌روز)، حیوانات به جای دارو، سالین دریافت کردند و به مدت ۴۵ دقیقه در قسمت سیاه دستگاه (B) قرار گرفتند. در طول مدت قرارگیری در هر قسمت، درهای گیوتینی بسته بودند. در دومین روز، با حفظ شرایط زمانی روز قبل، حیوانات صبح سالین دریافت کردند و در قسمت سیاه قرار داده شدند و عصر دارو گرفتند و به مدت ۴۵ دقیقه در قسمت سفید حبس گردیدند. در سومین روز شرطی‌سازی، حیوانات مراحل تزریق را همانند روز اول طی کردند.

ج- مرحله آزمون (پس‌شرطی‌سازی). آزمون در روز پنجم، یعنی یک روز بعد از آخرین مرحله شرطی‌سازی اجرا شد. همانند روز قبل، در گیوتینی برداشته شد و هر حیوان به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه CPP آزادانه جست‌وجو و گردش کرد. در این مدت، زمان سپری شده در قسمت A و B دستگاه برای وی ثبت و تغییر ترجیح[3] به صورت تفاوت برحسب ثانیه محاسبه شد. در واقع این متغیر عبارت است از تفاضل زمان سپری شده در قسمتی که شرطی‌سازی با مرفین صورت گرفته در روز آزمون و روز پیش‌شرطی‌سازی. هر حیوان فقط یک بار وارد مرحله آزمون شد.

برای مطالعه اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ بر اکتساب ترجیح مکان شرطی شده، این داروها در مرحله شرطی‌سازی، در جلساتی که مرفین زیرجلدی تزریق می‌شد، قبل از مرفین و به صورت داخل مغزی تزریق شدند و در جلساتی که سالین زیرجلدی تزریق می‌شد، سالین یا حامل به صورت داخل مغزی تزریق گردید.

در مورد مطالعه اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ بر بیان[4] ترجیح مکان شرطی شده، در مرحله شرطی‌سازی هیچ‌گونه تزریق داخل مغزی صورت نگرفت و فقط در روز آزمون، پنج دقیقه قبل از اجرای آزمون، هر حیوان به صورت داخل مغزی داروها را دریافت کرد و بعد در دستگاه CPP قرار داده شد.

اندازه‌گیری فعالیت حرکتی حیوان

به منظور بررسی فعالیت حرکتی حیوان، کف هر یک از خانه‌های دستگاه CPP (A و B) با کشیدن دو خط عمود بر هم به چهار قسمت مساوی تقسیم شد. در روز آزمون هر بار که حیوان هر یک از این خطوط را قطع و از آن عبور می‌کرد، این عبور به عنوان یک فعالیت حرکتی ثبت شد.

مراحل آزمایش‌ها در نواحی CA1 هیپوکامپ پشتی

آزمایش‌ها روی گروه‌های آزمایشی که شامل هشت حیوان در هر گروه بود، انجام شد.

آزمایش اول

منحنی دوز - پاسخ برای CPP مرفین

از تزریق زیر جلدی مقادیر متفاوت مرفین (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ mg/kg)، برای بررسی توانایی آن در شرطی‌سازی مکانی استفاده شد. چهار گروه از حیوانات، در مرحله شرطی‌سازی، به تناوب مرفین و سالین دریافت کردند. در طول مرحله شرطی‌سازی، یک

1- preconditioning phase
2- post conditioning or testing phase
3- change of preference
4- expression

گروه مجزا فقط سالین دریافت کرد که به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. در مرحله آزمون، تغییر ترجیح و فعالیت حرکتی سنجیده شد.

آزمایش دوم

اثر آگونیست گیرنده $GABA_A$، همراه یا بدون مرفین بر اکتساب CPP

الف - اثر موسیمول بر اکتساب CPP. در طی مرحله شرطی‌سازی، درون هیپوکامپ (CA_1) سه گروه از حیوانات مقادیر مختلف موسیمول (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) و بلافاصله سالین (۱ml/kg) تزریق شد. به علاوه، یک گروه کنترل در طی مرحله شرطی‌سازی، ابتدا سالین را به صورت داخل هیپوکامپ (CA_1) (۱µg/rat) و سپس یک تزریق زیرجلدی سالین (۱ml/kg) دریافت کرد. همه گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق داخل مغزی، شرطی سازی شدند و بدون هیچ‌گونه تزریقی، آزمایش و فعالیت حرکتی آنها نیز در طی مرحله آزمون ارزیابی گردید.

ب- اثر موسیمول بر اکتساب CPP مرفین. در طی مرحله شرطی‌سازی، داخل CA_1 هیپوکامپ پشتی چهار گروه از حیوانات موسیمول (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) یا سالین (۱µl/rat) تزریق شد و بلافاصله بعد از آن، تزریق زیرجلدی مرفین (۵mg/kg) صورت گرفت. تمامی گروه‌ها، ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق دارو، بدون هیچ‌گونه تزریقی آزمایش شدند. فعالیت حرکتی آنها در مرحله آزمون نیز سنجیده شد.

آزمایش سوم

اثر آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$، همراه یا بدون مرفین بر اکتساب CPP

الف- اثر بیکوکولین بر اکتساب CPP. در طی مرحله شرطی‌سازی، داخل CA_1 هیپوکامپ سه گروه از حیوانات مقادیر مختلف بیکوکولین (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) و بلافاصله بعد آن، سالین (۱mg/kg) به صورت زیرجلدی تزریق شد. در مرحله شرطی‌سازی، گروه کنترل همراه با تزریق حامل (۱µl/rat) داخل CA_1 هیپوکامپ، تزریق زیرجلدی سالین (۱ml/kg) دریافت کرد. در طی اجرای مرحله آزمون، فعالیت حرکتی میزان ترجیح سنجیده شد.

ب- اثر بیکوکولین بر اکتساب CPP مرفین. مقادیر متفاوت بیکوکولین (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) یا حامل (۱µl/rat) به ناحیه CA_1 هیپوکامپ پشتی چهار گروه از حیوانات تزریق شد و بلافاصله بعد از آن، در طی مرحله شرطی‌سازی، تزریق زیرجلدی مرفین (۰/۵mg/kg) صورت گرفت. کلیه گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق دارو، بدون هیچ‌گونه تزریقی، آزمایش شدند. در روز اجرای آزمون، فعالیت حرکتی نیز سنجیده شد.

آزمایش چهارم

اثر آنتاگونیست گیرنده GABAA بر واکنش آگونیست این گیرنده در طی CPP مرفین

در طی مرحله شرطی‌سازی، تزریق مقادیر مختلف موسیمول (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) در ناحیه CA_1 هیپوکامپ، همراه با تزریق زیر جلدی آن (۵mg/kg) صورت گرفت. هشت گروه هشت‌تایی حیوانات در مرحله شرطی‌سازی، ابتدا به صورت داخل مغزی حامل (۱µl/rat) یا بیکوکولین (۱µl/rat) دریافت کردند و پنج دقیقه بعد از آن، در این گروه‌ها، تزریق‌های درون هیپوکامپ سالین (۱ml/rat) یا موسیمول (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) و بلافاصله تزریق زیرجلدی مرفین (۵mg/kg) انجام شد. در روز آزمون، فعالیت حرکتی و میزان ترجیح بدون هیچ‌گونه تزریقی ارزیابی گردید.

آزمایش پنجم

اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده GABAA بر بیان CPP مرفین

در طی مرحله شرطی‌سازی، تزریق زیر جلدی مرفین (۵mg/kg) به هشت گروه آزمایشی، CPP مرفین ایجاد کرد. در طول مرحله شرطی‌سازی، هیچ‌گونه تزریق داخل مغزی صورت نگرفت. در روز آزمون و قبل از اجرای آزمون، به CA_1 هیپوکامپ شش گروه حیوان موسیمول (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) یا بیکوکولین (۰/۵، ۱ و ۲ µg/rat) تزریق شد و در پایان به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه CPP قرار داده شدند و فعالیت حرکتی و میزان ترجیح آنها در طی این مدت ارزیابی گردید.

بافت‌شناسی

در پایان آزمایش‌های CPP، داخل هر کانول ۰/۵ میکرولیتر رنگ متیلن بلو یکدرصد تزریق شد. سپس حیوانات به وسیله کلروفورم کشته شدند و نهایتاً مغز آنها از جمجمه خارج گردید و به مدت ۱۰ روز در ظروف خاصی حاوی فرمالین ۱۰درصد نگهداری شد تا بافت مغزی کاملاً تثبیت شود. سپس از مغزهای تثبیت شده، مقاطع مغزی تهیه شد و محل تزریق (که به وسیله متیلن بلو رنگی شده بود)، به کمک میکروسکوپ تشریح و بررسی و اطلاعات مربوط به موقعیت تزریق هر حیوان در دفتر ثبت گردید. موش‌هایی که کانول تزریق آنها در داخل هیپوکامپ پشتی (CA_1) قرار داشت، در تجزیه و تحلیل آماری دخالت داده شدند و موش‌های فاقد کانول تزریق در نواحی CA_1 هیپوکامپ، از این تجزیه و تحلیل حذف گردیدند. در تجزیه و تحلیل‌های آماری، ۹۵ درصد از حیوانات جراحی شده مورد استفاده قرار گرفتند و ۵ درصد باقی مانده، به دلیل کانول‌گذاری نادرست حذف شدند.

تحلیل آماری

در این مطالعه، تغییر در ترجیح، شاخص ارزیابی ترجیح مکان در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین مقادیر متغیر ارائه گردید.

به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی، از روش تحلیل واریانس (ANOVA) یک طرفه و دوطرفه و به دنبال آن از آزمون آماری توکی استفاده شد و اختلاف $p<0/05$ تفاوت معنی‌دار تلقی گردید. برای انجام محاسبات آماری، از نرم‌افزارهای آماری INSTAT و SPSS و برای رسم نمودار S از نرم‌افزار سیگماپلات استفاده شد.

یافته‌ها

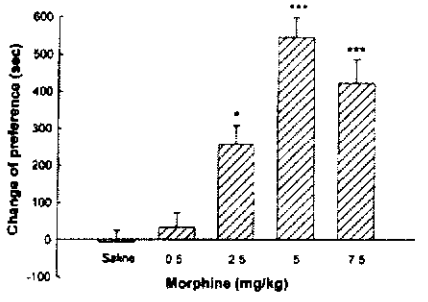
آزمایش اول

منحنی دوز - پاسخ برای CPP مرفین. در نمودار ۱، CPP تولید شده به وسیله تزریق زیرجلدی مقادیر مختلف مرفین به حیواناتی که در نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی کانول‌گذاری شده‌اند، نشان داده شده است. آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه مشخص کرد که مرفین به صورت وابسته به مقدار، موجب افزایش معنی‌دار ترجیح مکان شرطی شده در حیوانات تحت آزمایش (نسبت به گروه کنترل) شده است [$F(۴و۳۵) = ۱۹/۱۲$، $p<۰/۰۰۰۱$]. در مقادیر مختلف مرفین (۲/۵، ۵ و ۷/۵ mg/kg) CPP معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین واکنش با تزریق مقدار ۵mg/kg مرفین به دست آمد.

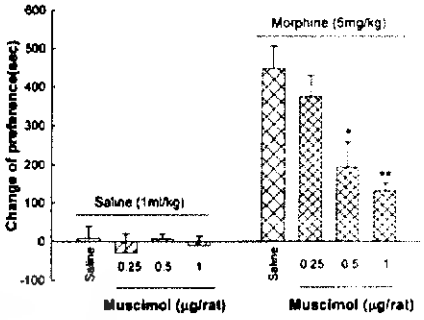
آزمایش دوم

اثر آگونیست گیرنده $GABA_A$ همراه یا بدون مرفین بر اکتساب CPP. نمودار ۲ تأثیر تزریق دوطرفه داخل مغزی مقادیر مختلف موسیمول (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) یا سالین (µl/rat) را بر اکتساب CPP در غیاب یا حضور مرفین (۵mg/kg) نشان می‌دهد. تحلیل واریانس دو طرفه، تداخل معنی‌دار موسیمول و مرفین را در اکتساب ترجیح مکان نشان داد [مقایسه درون گروهی: اثر تیمار: $F(۳و۵۶) = ۵/۳$، $p<۰/۰۱$؛ اثر مقدار: $F(۱و۵۶) = ۹۰/۹$، $p<۰/۰۱$؛ تداخل تیمار × مقدار: $F(۳و۵۶) = ۶/۳۰$، $p<۰/۰۰۱$].

به علاوه، تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق موسیمول (۰/۲۵ و ۰/۵ µg/rat) به CA_1 هیپوکامپ به تنهایی قادر به القای ترجیح مکان شرطی شده نمی‌باشد. در ضمن، موسیمول توانست ترجیح مکان القا شده به وسیله تزریق زیرجلدی مرفین (۵mg/kg) را در یک روش وابسته به مقدار به طور معنی‌دار مهار کند [$F(۳و۲۸) = ۷/۸$، $p<۰/۰۰۱$].



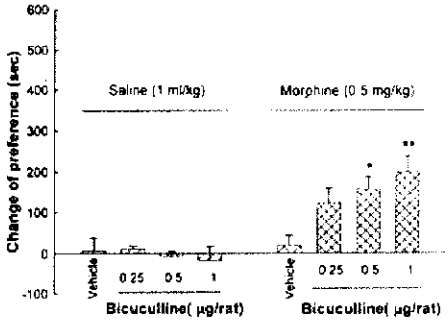
نمودار ۱ - ترجیح مکان شرطی شده ناشی از تزریق مرفین در حیواناتی که در ناحیهٔ CA_1 هیپوکامپ آن‌ها کانول‌گذاری شده است؛ $p<۰/۰۵$ * و $p<۰/۰۰۱$ ** در مقایسه با گروه کنترل (سالین).



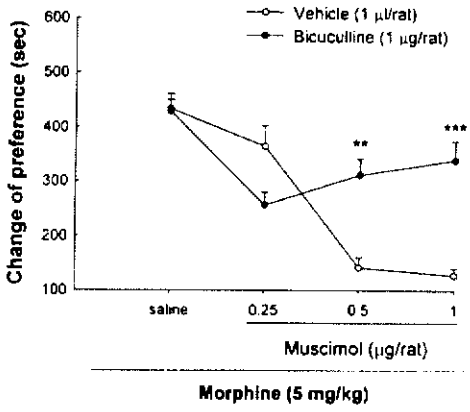
نمودار ۲- اثرات تزریق دو طرفهٔ موسیمول در ناحیه CA_1 هیپوکامپ به تنهایی یا همراه با مرفین بر اکتساب ترجیح مکان شرطی شده؛ $p<0/05$ * و $p<0/001$ ** در مقایسه با گروه کنترل (سالین).

آزمایش سوم

اثر آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ همراه یا بدون مرفین بر اکتساب CPP. نمودار ۳ تأثیر تزریق دو طرفه داخل مغزی مقادیر متفاوت بیکوکولین (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) یا حامل (۱µl/rat) را بر اکتساب CPP، در حضور یا غیاب تزریق زیر جلدی مرفین (۰/۵mg/kg) نشان می‌دهد.



نمودار ۳- اثرات تزریق دو طرفهٔ بیکوکولین در CA_1 هیپوکامپ پشتی به تنهایی یا همراه با مرفین بر اکتساب CPP؛ $p<0/05$ * و $p<0/001$ ** در مقایسه با گروه کنترل (سالین).



نمودار ۴- اثرات تزریق دو طرفهٔ بیکوکولین در CA_1 هیپوکامپ بر واکنش موسیمول در طی CPP مرفین؛ $p<0/05$ * و $p<0/001$ ** در مقایسه با گروه کنترل (سالین).

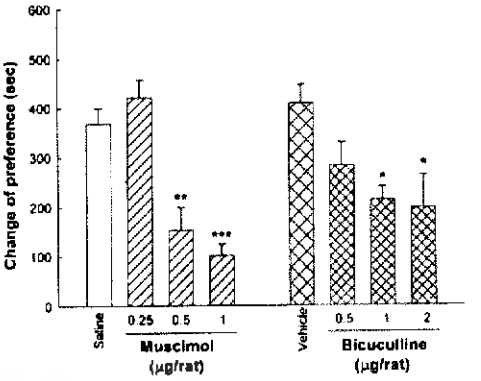
تحلیل واریانس دو طرفه، تأثیر تداخل معنی‌دار بیکوکولین و مرفین را بر اکتساب ترجیح مکان نشان داد. [مقایسه درون گروهی: اثر تیمار: $p<0/001$، $F(3,56)=34/7$؛ اثر مقدار: $p<0/05$، $F(3,56)=3/5$؛ اثر تداخل تیمار × مقدار: $p<0/01$، $F(3,56)=1/4$].

به علاوه، تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که صرف تزریق بیکوکولین (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ mg/rat) داخل CA_1 هیپوکامپ نتوانسته است ترجیح مکان معنی‌داری را القا کند [$p>0/05$، $F(4,35)=0/2$]. همچنین، بیکوکولین ترجیح مکان القا شده به وسیله مرفین (۰/۵mg/kg) را تقویت کرد [$p<0/01$، $F(3,28)=5/1$].

آزمایش چهارم

اثر آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ بر واکنش آگونیست آن در طی CPP مرفین. نمودار ۴ اثر تزریق‌های درون هیپوکامپی (CA_1) بیکوکولین (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) را بر تغییرات القا شده به وسیله تزریق زیرجلدی مرفین (۵mg/kg) همراه با تزریق درون هیپوکامپی (CA_1) (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) نشان می‌دهد.

تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که بیکوکولین، اثر مهاری موسیمول را بر پاسخ مرفین معکوس می‌کند [مقایسه درون گروهی: اثر تیمار: $p<0/0001$، $F(3,56)=13$؛ اثر مقدار: $p<0/001$، $F(3,56)=25/6$؛ تداخل تیمار × مقدار: $p<0/0001$، $F(3,56)=16$]. نتایج نشان داد که بیکوکولین قادر است اثر موسیمول را متوقف و اثرات CPP مرفین را تقویت کند.



نمودار ۵- اثرات تزریق دو طرفهٔ موسیمول یا بیکوکولین داخل CA_1 هیپوکامپ بر بیان ترجیح مکان شرطی شده (CPP) ناشی از مرفین؛ $p<0.05$ * و $p<0.001$ ** در مقایسه با گروه کنترل (سالین).

آزمایش پنجم

اثر آگونیست یا آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ بر بیان ناشی از مرفین. نمودار ۵ اثرات تزریق دو طرفه CA_1 موسیمول یا بیکوکولین را بر بیان CPP ناشی از مرفین (5mg/kg) نشان می‌دهد. تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تیمار با موسیمول (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) [$F(۳ و ۲۸)=۱۰/۲$، $p<۰/۰۰۰۱$] یا بیکوکولین (۰/۵ و ۲ µg/rat) [$F(۳ و ۲۸)=۳/۴$، $p<۰/۰۱$]، بیان CPP مرفین (5mg/kg) را به طور معنادار کاهش داده است.

اثر داروها بر فعالیت حرکتی

تحلیل آماری نشان داد که تزریق مقادیر مختلف مرفین (۰/۵-۷/5mg/kg) یا موسیمول (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat) و یا بیکوکولین (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ µg/rat)، به تنهایی، در طول مرحله آزمون، بر فعالیت حرکتی آزمودنی تأثیر نداشته است. تزریق دو طرفه داخل CA_1 موسیمول یا بیکوکولین همراه با تزریق زیرجلدی مرفین نیز نتوانست هیچ تأثیری بر فعالیت حرکتی گروه آزمایشی بگذارد.

بحث

در مطالعه حاضر، دخالت گیرنده‌های $GABA_A$ نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی بر ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین CPP بررسی شد. همانند مطالعات قبلی (سوزوکی[1]، تسودا[2]، فونادا[3] و میساوا[4]، ۱۹۹۵؛ شیپنبرگ[5]، هایدبردر[6] و لفوور[7]، ۱۹۹۶؛ کیواستیک[8]، وریکالاس[9]، پیپونن، زارکوفسکی[10] و آتی[11]، ۱۹۹۶)، آزمایش ما نیز نشان داد که تزریق زیر جلدی مرفین به صورت وابسته به مقدار، ترجیح مکان شرطی شده را آشکار می‌نماید. این یافته مطالعات قبلی را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که اثرات پاداشی آگونیست گیرنده اوپیوئیدی می‌تواند به وسیله محرک‌های محیطی که قبلا حیوان در آن محیط پاداش گرفته است، شرطی شود.

انتقال دوپامینرژیکی مزولیمبیک از ناحیه تگمنتوم شکمی به هسته آکومبنس و سایر نواحی لیمبیک مغز پیشین، نقش مهمی در اثرات وابسته به پاداش مرفین ایفا می‌کند (کوب[12]، ۱۹۹۲؛ ماتس[13]، برادلی[14]، سالوگتر[15] و براون[16]، ۱۹۹۶؛ مالدوناندو[17] و همکاران، ۱۹۹۷؛ مک‌برد[18] و همکاران، ۱۹۹۹). همچنین بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که آزادسازی دوپامین مزولیمبیک و شلیک سلول‌های دوپامینی، به وسیله انتقالات GABA و نورون‌های رابط گابائرژیک درون ناحیه تگمنتوم شکمی مهار می‌شوند (استفنسن[19]، اسوینگاس[20]، پیکل[21] و هنریکسون[22]، ۱۹۹۸؛ وسترنیک[23]، انریکو[24]، فیمن[25]، دی‌ورایس[26]، ۱۹۹۸؛ انریکو، بوما[27]، دی‌ورایس و وسترمیک، ۱۹۹۸) . اگرچه سیستم دوپامینی مزولیمبیک در اثرات پاداشی مرفین نقش اصلی را بازی می‌کند، اما مطالعات به طور قوی پیشنهاد می‌کنند که سلول‌های گابائرژیک، گلوتاماترژیک و سرتونرژیک در ناحیه تگمنتوم شکمی و نیز لیمبیک مغز جلویی مهم هستند (لشنر[28]، ۱۹۹۷). تحقیقات نشان داده‌اند که فعالیت GABA در پاداش اوپیوئیدی، به طور ویژه، به وسیله گیرنده‌های $GABA_A$ تنظیم می‌شود (لاویولت[29] و وندرکوی[30]، ۲۰۰۱). به علاوه، شواهد اخیر پیشنهاد می‌کند که

1- Suzuki
2- Tsuda
3 - Funada
4 - Misawa
5 - Shippenberg
6 - Heidbreder
7 - Lefevour
8 - Kivastik
9- Vuroikallas
10 - Zhakovsky
11- Ahtee
12- Koob
13 - Mattes
14- Bradly
15 - Salughter
16- Browne
17 - Maldonado
18- McBride
19- Steffensen
20- Svingos
21 - Pickell1
22- Henriksen
23 - Westerink
24- Enrico
25 - Feimann
26- De vries
27 -Bouma
28- Leshner
29- Laviolette
30 - Van der Kooy

اثرات درون‌زای نورون‌های رابط گابائرژیک، بر سلول‌های دوپامینی تگمنتوم شکمی از طریق گیرنده‌های $GABA_A$ تنظیم می‌شود (سوجیتا[1]، جانسون[2] و نورت[3]، ۱۹۹۲؛ کالیواس[4]، چرچیل[5] و کلیتنیک[6]، ۱۹۹۳). گیرنده‌های $GABA_A$ با مهار کردن آزادسازی دوپامین از تگمنتوم شکمی و لیمبیک مغز جلویی، اثرات تقویتی را تنظیم می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که گیرنده‌های $GABA_A$ در وابستگی دارویی نقش پیچیده‌ای دارند (مالکولم[7]، ۲۰۰۳).

با در نظر گرفتن این مطلب که هیپوکامپ در وابستگی روانی و دارویی (نستلر[8] و آقاجانیان[9]، ۱۹۹۷؛ نستلر، ۲۰۰۱) و نیز رفتار جست‌وجوی دارویی (ورل[10]، لیو[11]، هایس[12]، اسپکتور[13] و گاردنر[14]، ۲۰۰۱) نقش دارد، به نظر می‌رسد که تحریک و مهار گیرنده‌های $GABA_A$ ناحیه CA_1 هیپوکامپ پشتی بتواند اکتساب و بیان ترجیح مکان ناشی از مرفین را تغییر دهد.

مطالعه حاضر نشان داد که تزریق آگونیست (موسیمول) یا آنتاگونیست (بیکوکولین) گیرنده $GABA_A$، در نواحی CA_1، به تنهایی نمی‌تواند ترجیح مکان شرطی شده یا اجتناب مکانی شرطی شده معنی‌داری را به وجود آورد. به هر حال، نشان داده شده است که تزریق داخل تگمنتوم شکمی موسیمول، اثرات پاداشی خود تحریکی پالیدوم شکمی را کاهش می‌دهد (پاناگایس و کاستلاکیس، ۲۰۰۲). همچنین گزارش شده است که تزریق دو طرفه موسیمول یا بیکوکولین داخل تگمنتوم شکمی، در روش اندازه‌گیری به وسیله CPP، اثر پاداشی مشخص و برجسته‌ای دارد (لاوبولت و وندرکوی، ۲۰۰۱). یک مطالعه میکرودیالیز داخل مغزی نشان داد که تزریق بیکوکولین، یک افزایش معنی‌دار و وابسته به مقدار را در دوپامین خارج سلولی هسته آکومبنس ایجاد می‌کند (یان[15]، ۱۹۹۹). از آنجا که تزریق درون هیپوکامپی آگونیست و آنتاگونیست $GABA_A$ نتوانسته است CPP را القاء نماید، می‌توان چنین نتیجه گرفت که هیپوکامپ به تنهایی در سازوکارهای پاداشی دخالت ندارد که مطالعات قبلی ما نیز این مطلب را تأیید می‌کند (رضایوف و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین به نظر می‌رسد که گیرنده‌های $GABA_A$ نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی، خودشان در شروع پاسخ پاداشی دخالتی ندارند.

نتایج حاضر نشان می‌دهند که تزریق دو طرفه داخل مغزی موسیمول در CA_1، CPP مرفین را در یک روش وابسته به مقدار به طور معنی‌دار مهار می‌کند. به نظر می‌رسد که احتمالا آگونیست گیرنده‌های $GABA_A$، اکتساب CPP مرفین را از طریق کاهش پاداش مرفین کاهش داده‌اند که این با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد. برای مثال، نشان داده شده است که تزریق موسیمول، خودتحریکی نیکوتین را در موش‌های آموزش دیده کاهش می‌دهد (کوریگال[16]، کوئن[17]، آدامسون[18]، چو[19] و زانگ[20]، ۲۰۰۰). به علاوه، پیشنهاد شده است که افزایش تراکم GABA مزولیمبیک، اکتساب خود تزریقی هروئین را مسدود می‌کند (زی و استین، ۲۰۰۰). از سوی دیگر، با توجه به اینکه نورون‌های گابائرژیک هیپوکامپ ممکن است در فرآیند یادگیری و حافظه دخالت داشته باشند (ورتس[21] و کوکسیس[22]، ۱۹۹۷؛ پائولسن و موزر، ۱۹۹۸) و همچنین هیپوکامپ پشتی خود در یادگیری وابسته به پاداش دخالت دارد (رضایوف و همکاران، ۲۰۰۳)، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تزریق موسیمول داخل CA_1، این نوع یادگیری را کاهش می‌دهد. همچنین نتایج حاضر مؤید آن است که ممکن است تغییرات CPP مرفین، به وسیله فعالیت گیرنده‌های $GABA_A$، با حافظه ارتباطی رابطه داشته باشد و آن را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین، نتایج حاضر می‌تواند مشابه نتایج تحقیقات سایر محققان (که تزریق موسیمول را عامل فراموشی پاداش می‌دانند) باشد (سالیناس[23] و مک‌گاف[24]، ۱۹۹۵).

بررسی‌های ما نشان می‌دهند که مقدار کم مرفین (۰/۵mg/kg) که نتوانسته است CPP را القا کند، همراه با بیکوکولین، موجب القای CPP می‌شود. یک گزارش نشان می‌دهد که مسدود شدن گیرنده‌های $GABA_A$ در تگمنتوم شکمی قدامی، آزادسازی دوپامین را در هسته آکومبنس تقویت می‌کند (مالکولم، ۲۰۰۳). با

1- Sugita
2- Johnson
3- North
4- Kalivas
5 - Churchill
6- Klitenick
7 - Malcolm
8- Nestler
9- Aghajanian
10- Vorel
11- Liu
12- Hayes
13- Spector
14- Gardner
15- Yan
16- Corrigall
17- Coen
18- Adamson
19- Chow
20- Zhang
21- Vertes
22- Kocsis
23- Salinas
24- McGaugh

توجه به اینکه، امکان ورودی‌های دوپامینرژیکی از هیپوکامپ به هسته آکومبنس وجود دارد (فلورسکو[1]، بلاها[2]، یانگ[3] و فیلیپس[4]، ۲۰۰۱)، ممکن است بیکوکولین در نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی، ویژگی‌های دوپامینی مرفین را در هسته آکومبنس تقویت کند.

از سوی دیگر، گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند که گیرنده‌های $GABA_A$ تثبیت حافظه را تنظیم می‌کنند (بریونی[5]، دکر[6]، گامبوا[7]، ایزکوئردو[8] و مک‌گاف، ۱۹۹۰؛ ایزکوئردو و مدینا[9]، ۱۹۹۱؛ ناگاهارا[10] و مک گاف، ۱۹۹۲). تزریق داخل CA_1 بیکوکولین، نگهداری حافظه را افزایش می‌دهد (لوفت[11]، پریرا[12]، کاماروتا[13] و ایزکوئردو، ۲۰۰۴). گزارش شده است که تزریق دو طرفه بیکوکولین داخل آمیگدال، حافظه را برای افزایش پاداش تقویت می‌کند (سالیناس و مک‌گاف، ۱۹۹۶) و از آنجا که CPP یک روش یادگیری وابسته به پاداش است (پیپونن وهمکاران، ۱۹۹۷؛ فرین‌تانو و مک‌دونالد، ۲۰۰۱)، احتمالا بیکوکولین همراه با پایین‌ترین مقدار مرفین، یادگیری را افزایش می‌دهد و در حقیقت ترجیح مکان شرطی شده را تقویت می‌کند.

نتایج همچنین نشان دادند که تزریق دوطرفه داخل CA_1 بیکوکولین، در طول مرحله شرطی‌سازی، اثرات کاهشی CPP القا شده به وسیله موسیمول را معکوس می‌کند. در حمایت از نتایج حاضر، بررسی‌های سایر محققان نشان داده است که تزریق داخل تگمنتوم شکمی بیکوکولین اثرات موسیمول را بر فعالیت حرکتی معکوس می‌کند (کالیواس، دافی[14] و ابرهارد[15]، ۱۹۹۰). تزریق دو طرفه بیکوکولین در قاعده مغز جلویی نیز، اثرات موسیمول را در روش‌های رفتاری معکوس کرده است (مویر[16]، رایینز[17] و اوریت[18]، ۱۹۹۲). بنابراین، نتایج حاضر ثابت می‌کند که کاهش پاداش مرفین به وسیله موسیمول، از طریق گیرنده‌های $GABA_A$ تنظیم می‌شود.

از سوی دیگر، پژوهش حاضر اثرات تزریق داخل CA_1 آگونیست گیرنده $GABA_A$ یا آنتاگونیست آن بر بیان CPP مرفین را نیز مطالعه کرده است که نتایج آن نشان می‌دهند تزریق دوطرفه داخل CA_1 مقادیر مختلف موسیمول یا بیکوکولین، بلافاصله قبل از مرحله آزمون، به طور معنی‌داری از بیان CPP مرفین (5mg/kg) ممانعت می‌کند. اگرچه مهار گیرنده $GABA_A$ در طول اکتساب، CPP مرفین را تقویت کرد، بیان CPP مرفین به وسیله بیکوکولین مهار شد. مشابه آن، تزریق داخل CA_1 موسیمول، از بیان CPP مرفین ممانعت کرد. بنابراین، آگونیست و آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$، بر بیان CPP مرفین اثر مشابه دارند. لذا به نظر می‌رسد که فعالیت یا مهار گیرنده‌های $GABA_A$ هیپوکامپ پشتی، نقش مهمی در بیان CPP مرفین بازی کند.

از آنجا که هم آگونیست و هم آنتاگونیست، القا کنندهٔ یک اثر هستند، مطالعه بیشتر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. با در نظر گرفتن تمامی یافته‌ها، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که گیرنده‌های $GABA_A$ نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی، در القای پاداش ناشی از مرفین و ایجاد ترجیح مکان شرطی شده نقش مهمی بازی می‌کنند.

1- Floresco
2- Blaha
3- Yang
4- Phillips
5- Brioni
6- Decker
7- Gamboa
8- Izquierdo
9- Medina
10- Nagahara
11- Luft
12- Pereira
13- Cammurota
14- Duffy
15- Eberhardt
16- Muir
17 -Robbins
18- Everitt

منابع

Belzung, C., & Barreau, S. (2000). Differences in drug-induced place conditioning between BALB/c and C57Bl/6 mice. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 65, 419-423.

Bormann, J. (2000). The "ABC" of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences, 21,* 16-19.

Brioni, J. D., Decker, M. W., Gamboa, L. P., Izquierdo, I., & McGaugh, J. L. (1990). Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning. *Brain Research*, 522, 227-234.

Carr, G. D., & White, N. M. (1983). Conditioned place preference from intraaccumbens but not intra-caudate amphetamine injections. *Life Sciences*, 33, 2551-2557.

Chapouthier, G. (2004). From the search for a molecular code of memory to the role of neurotransmitters: a historical perspective. *Neural Plasticity*, 11, 151-158.

Corrigall, W. A., Coen, K. M., Adamson, K. L., Chow, B. L., & Zhang, J. (2000). Response of nicotine self-administration in the

rat to manipulations of mu-opioid and gamma-aminobutyric acid receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology, 149,* 107-114.

De fonseca, F. R., Rubio, P., Martin-Calderon, J. L., Caine, S. B., Koob, G. F., & Navarro, M. (1995). The dopamine receptor agonist 7-OH-DPAT modulates the acquisition and expression of morphine – induced place preference. *European Journal of Pharmacology, 274,* 47-55.

Enrico, P., Bourna, M., de Vries, J. B., Westerink, BH. (1998). The role of afferents to the ventral tegmental area in the handling stress-induced increase in the release of dopamine in the medial prefrontal cortex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. *Brain Research, 779,* 205-213.

Farr, S. A., Flood, J. F., & Morley, J. E. (2000). The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic, and glutamatergic receptor modulation on posttrial memory processing in the hippocampus. *Neurobiology of learning and memory, 73,* 150-167.

Ferbinteanu, J. & McDonald, R. J.(2001). Dorsal/ventral hippocampus, fornix, an conditioned place preference. *Hippocampus, 11,* 187-200.

Floresco, S. B., Blaha, C. D., Yang, C. R., & Phillips, A. G. (2001). Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: cellular mechanisms of input selection. *The Journal of neuroscience, 21,* 2851-2860.

Gong, W., Neill, D. B., Justice, JB., J. B. Jr. (1998). GABAergic modulation of ventral pallidal dopamine release studied by in vivo microdialysis in the freely moving rat. *Synapse, 29,* 406-412.

Hoffman, D. C. (1989). The use of place conditioning in studying the neuropharmacology of drug reinforcement. *Brain Research, 23,* 373-387.

Izquierdo, I., & Medina, J. H., (1991). $GABA_A$ receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends in Pharmacological Sciences, 12,* 260-265.

Kalivas, P. W., Duffy, P., & Eberhardt, H. (1990). Modulation of A10 dopamine neurons by gamma-aminobutyric acid agonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 25,* 858-866.

Kalivas, P. W., Churchill, L., & Klitenick, M. A. (1993). GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience, 57,* 1047-1060.

Karami, M., Zarrindast, M. R., Sepehri, H., & Sahraei, H. (2002). Role of nitric oxide in the rat hippocampal CA1 area on morphine-induced conditioned place preference. *European Journal of Pharmacology, 449,* 113-119.

Kelley, A. E., & Berridge, K. C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *Journal of Neuroscience, 22,* 3306-3311.

Kivastik, T., Vuorikallas, K., Piepponen, T. P., Zharkovsky, A., & Ahtee, L. (1996). Morphine – and cocaine – induced conditioned place preference: effects of quinpirole and preclamol. *Pharmacology Biochemistry & Behavior, 54,* 371-375.

Koob, G. F. (1992) . Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward phathway. *Trends in Pharmacological Sciences, 13,* 177-184.

Laviolette, S., R., & van der Kooy, D. (2001). GABA (A) receptors in the ventral tegmental area control bidirectional reward signalling between dopaminergic and non-dopaminergic neural motivational systems. *European Journal of Neuroscience, 13,* 1009-1015.

Leshner, A. I. (1997). Addiction is a brain disese, and it matters. *Science, 278,* 45-47.

Luft, T., Pereira, G. S., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2004). Different time course for the memory facilitating effect of bicuculline in hippocampus, entorhinal cortex, and posterior parietal cortex of rats. *Neurobiology of learning and memory, 82,* 5652-5656.

Lu, L., Zeng, S., Liu, D., & Ceng, X. (2000). Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II attenuates the dependent protein kinase II attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats. *Neuroscience letters, 291,* 191-195.

Malcolm, R. J. (2003). GABA systems, benzodiazepines, and substance dependence. *Journal of Clinical Psychiatry, 3,* 36-40.

Maldonado, R., Saiardi, A., Valverde, O., Samad, T. A., Roques B. P., & Borrelli, E. (1997). Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature, 388,* 586-589.

Mattes, C., Bradley, R., Salughter, E., & Browne, S. (1996). Cocaine and butyrylcholinesterase (BChE): determination of enzymatic parameters. *Life Sciences, 58,* 257-261.

McBride, W. J., Murphy, J. M., & Ikemoto, S. (1999). Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behavioural Brain Research, 101,* 129-152.

Muir, J. L., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (1992). Disruptive effects of muscimol infused into the basal forebrain on conditional discrimination and visual attention: differential interactions with cholinergic mechanisms. *Psychopharmacology, 107,* 541-550.

Nagahara, A. H., & McGaugh, J. L. (1992). Muscimol infused into the medial septal area imparis long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks. *Brain Research, 54,* 591-561.

Narita, M., Aoki, T., Ozaki, S., Yajima, Y., & Suzuki, T. (2001). Involvement of protein kinase Cgamma isoform in morphine-induced reinforcing effects. *Neuroscience, 103,* 309-314.

Nestler, E. J., & Aghajanian, G. K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science, 278,* 58-63.

Nestler, E. J. (2001). Neurobiology. Total recall – the memory of addiction. *Science, 292,* 2266-2267.

Panagis, G., & Kastellakis, A. (2002). The effects of ventral tegmental administrationfo GABA (A), NMDA and AMPA receptor agonists on ventral pallidum self-stimulation. *Behavioural Brain Research, 131,* 115-123.

Paulsen, O., & Moser, E. I. (1998). A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences, 21,* 273-278.

Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, Sydney.

Piepponen, T. P., Kivastik, T., Katajamaki, J., Zharkovsky, A., & Ahtee, L. (1997). Involvement of opioid mu I receptors in morphine-induced conditioned place preference in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior, 58,* 275-279.

Rezayof, A., Zarrindast, M. R., Sahraei, H., & Haeri-Rohani, A. (2002). Involvement of dopamine D2 recdptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Pharmacology Biochemistry & Behavior, 74,* 187-197.

Rezayof, A., Zarrindast, M. R., Sahraei, H., & Haeri-Rohani, A. (2003). Involvement of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. *Journal of Psychopharmacology, 17,* 415-423.

Salinas, J. A., & McGaugh, J. L. (1995). Muscimol induces retrograde amnesia for changes in reward magnitude. *Neurobiology of learning and memory, 63,* 277-285.

Salinas, J. A., & McGaugh, J. L. (1996). The amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: involvement of the amygdaloid GABAergic system. Behavioral. *Brain Research, 80,* 87-98.

Semba, K., & Fibiger, H. C. (1992). Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. The *Journal of comparative neurology, 323,* 387-410.

Semyanov, A., & Kullmann, D. M. (2002). Relative picrotoxin insensitivity distinguishes ionotropic GABA receptor-mediated IPSCs in hippocampal interneurons. *Neuropharmacology, 43,* 726-736.

Shippenberg, T. S., Heidbreder, C., & Lefevour, A. (1996). Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics. *European Journal of Pharmacology, 299,* 33-39.

Steffensen, S. C., Svingos, A. L., Pickel, V. M., & Henriksen, S. J. (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience, 18,* 8003-8015.

Sugita, S., Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Synaptic inputs to GABAA and GABAB receptors originate from discrete afferent neurons. *Neuroscience letters, 134,* 207-211.

Suzuki, T., Tsuda, M., Funada, M., & Misawa, M. (1995). Blockade of morphine-induced place preference by diazepam in mice. *European Journal of Pharmacology, 280,* 327-330.

Ticku, M. K., & Huffman, R. D. (1980). The effects of acute and chronic morphine administration on GABA receptor binding. *European Journal of Pharmacology, 68,* 97-106.

Van Bockstaele, E. J., &., Pickel, V. M. (1995). GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Research, 68,* 215-221.

Vertes, R. P., & Kocsis, B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience, 81,* 893-926.

Vorel, S. R., Liu, X., Hayes, R. J., Spector, J. A., & Gardner, E. L. (2001). Relapse to cocaine-seeking after hippocampal theta burst stimulation. *Science, 292,* 1175-1178.

Westerink, B. H., Enrico, P., Feimann, J., & De Vries, J. B. (1998). The pharmacology of mesocortical dopamine neurons: a dual – probemicrodialysis study in the ventral tegmental area and prefrontal cortex of the rat brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 285,* 143-154.

White, N. M. (1996). Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. *Addiction, 91,* 921-949.

Xi, Z. X., & Stein, E. A. (2002). GABAergic mechanisms of opiate reinforcement. *Alcohol Alcohol, 37,* 484-494.

Yan, Q. (1999). Focal bicuculline increases extracellular dopamine concentration in the nucleus accumbens of freely moving rats as measured by in vivo microdialysis. *European Journal of Pharmacology, 385,* 7-13.

Zarrindast, M. R., Rezayof, A., Sahraei, H., Haeri-Rohani, A., Rassouli, Y. (2003). Involvement of dopamine D1 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Brain Research, 965,* 212-221.