

## **The role of hippocampal orexin-1 receptors (OX1R) in mediating the effect of morphine on CA1 baseline synaptic response and short term synaptic plasticity**

Hooshmandi M<sup>1</sup>, Hosseinmardi N<sup>2\*</sup>, Janahmadi M<sup>3</sup>, Motamedi F<sup>3</sup>, Elahi Mahani A<sup>1</sup>, Fatemeh Sadat Aghamiri F<sup>1</sup>

1- Department of Physiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

3- Neuroscience Research Centre, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 8 Jun 2014, Accepted: 2 Jul 2014

### **Abstract**

**Background:** Considering the increased activity of hypothalamic orexinergic neurons due to morphine administration, and its extensive projections to the hippocampus, it is probable that morphine effect on CA1 neuronal function is mediated by orexinergic system. So the effect of hippocampal orexin-1 receptors (OX1R) blockade on CA1 baseline synaptic response and short term synaptic plasticity was investigated.

**Materials and Methods:** In this experimental study, animals received morphine 10 mg/kg/12h/(SC) for 10 days. SB-334867-A, OX1R antagonist (0.5µg/0.5 µl), was microinjected intrahippocampally for OX1R inhibition before each morphine injection. Baseline synaptic response and short term synaptic plasticity were evaluated by field potential recording. fEPSP was recorded from CA1 following Schaffer collaterals stimulation. After Input/Output construction, short term synaptic plasticity was induced by paired pulse stimulations.

**Results:** Chronic use of morphine did not affect the baseline synaptic response ( $p>0.05$ ). SB-334867-A microinjection in CA1 did not have any effect on baseline synaptic response in morphine dependent rats. Morphine increased paired pulse index (PPI) at 80 ms inter pulse interval (IPI,  $p<0.05$ ). SB-334867-A pretreatment did not affect this morphine induced PPI change.

**Conclusion:** The results suggest that orexin-1 receptors (OX1R) do not mediate the effect of morphine on baseline synaptic response and short term synaptic plasticity in CA1 area of the hippocampus.

**Keywords:** Hippocampus, Morphine, Orexine, Short term synaptic plasticity.

\*Corresponding Author:

Address: Department of Physiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Velenjak Street, Shahid Chamran Highway, Tehran, Iran  
Email: nargeshosseinmardi@yahoo.com

## نقش گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ هیپوکمپ در وساطت کردن اثر مورفین بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت در ناحیه CA1 هیپوکمپ

مهدی هوشمندی<sup>۱</sup>، نرگس حسین مردی<sup>۲\*</sup>، مهیار جان احمدی<sup>۳</sup>، فرشته معتمدی<sup>۴</sup>، آزاده الهی ماهانی<sup>۴</sup>، فاطمه السادات آقامیری<sup>۴</sup>

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

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

۳- استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

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

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** با توجه به افزایش فعالیت نورون‌های اورکسینرژیک هیپوتالاموس در اثر مصرف مورفین و ورودی‌های فراوان آنها به هیپوکمپ، احتمال می‌رود که مورفین از طریق سیستم اورکسینرژیک سبب تغییر عملکرد نورون‌های CA1 گردد. بنابراین تأثیر مهار گیرنده اورکسینی نوع ۱ هیپوکمپ بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش‌های وابسته به مورفین بررسی گردید.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. حیوانات مورفین را به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هر ۱۲ ساعت به مدت ۱۰ روز دریافت کردند. جهت مهار گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱، SB-334867-A آنتاگونیست این گیرنده‌ها (۰/۵ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر) قبل از هر تزریق مورفین در داخل هیپوکمپ تزریق شد. پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت با تکنیک ثبت پتانسیل میدانی بررسی گردید. مسیر Schaffer Collateral تحریک و fEPSP از CA1 ثبت شد. پس از تهیه نمودار Input/output، از تحریکات زوج پالس برای القای شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت استفاده شد.

**یافته‌ها:** مصرف مزمن مورفین تأثیری بر پاسخ سیناپسی پایه نداشت ( $p > 0.05$ ). تزریق SB-334867-A در ناحیه CA1 نیز پاسخ سیناپسی پایه در گروه وابسته به مورفین را متأثر نکرد. مورفین سبب افزایش معنی‌دار شاخص زوج پالس در فاصله بین پالسی ۸۰ میلی‌ثانیه گردید ( $p < 0.05$ ). پیش‌درمانی با SB-334867-A تأثیری بر افزایش شاخص ناشی از مورفین نداشت ( $p > 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج پیشنهاد می‌کند، گیرنده‌های اورکسینی نوع ۱ در وساطت کردن اثر مورفین بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت در ناحیه CA1 هیپوکمپ نقشی ندارند.

**واژگان کلیدی:** هیپوکمپ، مورفین، اورکسین، شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت

\*نویسنده مسئول: تهران، خیابان ولنجک، خیابان کودکیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی  
Email: nargeshosseinmardi@yahoo.com

## مقدمه

مصرف مواد اعتیاد آور سبب تغییرات پایدار در مغز می شود که در نهایت منجر به ویژگی های رفتاری اعتیاد نظیر تحمل و وابستگی می گردد (۱). گرچه داروهای اپیوئیدی به صورت بالینی به عنوان عوامل ضد درد استفاده می شوند اما به شدت اعتیاد آور می باشند و مصرف مکرر آنها فعالیت شبکه های نورونی و ظرفیت شکل پذیری آنها در نواحی مختلف سیستم عصبی از جمله هیپوکمپ را تغییر می دهد (۲). هیپوکمپ که ساختار مغزی مربوط به حافظه و یادگیری فضایی است (۳) یک منطقه مهم دخیل در بازخوانی و توزیع اطلاعات مربوط به داروهای اعتیاد آور در مغز نیز می باشد (۲). از طرف دیگر مشخص شده است که یکی از سیستم های نوروترانسمیتری که در اعتیاد نقش دارد، سیستم اورکسینرژیک می باشد که به هیپوکمپ ورودی می فرستد (۴). نشان داده شده است mRNA مربوط به اورکسین، در هیپوتالاموس جانبی در موش های وابسته به مورفین افزایش می یابد (۵). اورکسین - A و اورکسین - B پپتیدهای هیپوتالاموسی اند که از طریق دو نوع گیرنده OX1R (Orexin -1 Receptor) و OX2R (Orexin -2 Receptor) اثر می گذارند (۶، ۷). گیرنده های اورکسینی در ناحیه CA1 و CA3 هیپوکمپ در موش صحرائی بیان می شوند. وجود تراکم بالای mRNA مربوط به OX1R در تشکیلات هیپوکمپ گزارش شده است (۸). اورکسین به طور مستقیم در نواحی مختلف هیپوکمپ از طریق اثر بر روی گیرنده های پس سیناپسی خود موجب تعدیل فعالیت نورونی می شود (۹، ۱۰). هم چنین شواهد نشان دهنده نقش سیستم اورکسینی در وابستگی به مورفین است. وابستگی به مورفین و سندرم قطع در موش هایی که ژن سنتز کننده گیرنده اورکسین آنها حذف شده بود، کاهش پیدا کرد (۱۱). هریس و همکاران مشاهده کردند که مورفین موجب افزایش بیان Fos در نورون های اورکسینی می شود (۱۲). هم چنین SB-334867-A آنتاگونیست گیرنده های اورکسینی نوع ۱ موجب کاهش ترجیح مکان شرطی (CPP: Conditioned Place Preference) در

حیوان می شود (۱۳). عزیزی و همکاران نشان دادند که آنتاگونیزه کردن گیرنده های اورکسینی نوع ۱ در لوکوس سرلئوس موش آزمایشگاهی بزرگ منجر به کاهش علایم و نشانه های سندرم قطع القایی با نالوکسان در موش های وابسته به مورفین می شود (۱۴). با توجه به حضور پروژکشن های اورکسینرژیک فراوان به هیپوکمپ و تغییر فعالیت هیپوکمپ در اثر مصرف مورفین این احتمال مطرح است که مورفین با تغییر سیستم اورکسینرژیک در هیپوکمپ سبب تغییر فعالیت نورون های این ناحیه می شود. بنابراین در این تحقیق به بررسی تأثیر مهار گیرنده های اورکسینی نوع ۱ هیپوکمپ بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش های وابسته به مورفین پرداختیم تا بتوان به شناخت بیشتری از پایه های بیولوژیک اعتیاد برسیم.

## مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی می باشد که از موش های صحرائی نر نژاد ویستار (۲۰۰-۲۵۰ 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 ساعت روشنایی - تاریکی نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام آزمایش ها با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. جهت القای وابستگی به مورفین در حیوانات، مورفین سولفات (تماد، ایران) حل شده در نرمال سالین به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم هر ۱۲ ساعت یک بار به مدت ۹ روز و یک تک دوز در روز دهم به صورت زیر پوستی (SC) تزریق شد (۱۴) و بعد از اتمام تزریق به منظور اطمینان از وابسته شدن و القای سندرم قطع مصرف (withdrawal syndrome) نالوکسان هیدروکلراید (سیگما، آمریکا) ۱ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی ۴ ساعت پس از دریافت مورفین به حیوان تزریق شد.

۱- گروهی که مورفین به صورت زیر جلدی به مدت ده روز دریافت کردند.

۲- گروه کنترل مربوط که با همان الگوی گروه اول و حلال مورفین، سالین، را به صورت زیر جلدی دریافت کردند.

۳- گروهی که به منظور مهار گیرنده های اورکسینی نوع ۱ هیپوکمپ، SB-334867-A را قبل از هر تزریق مورفین در داخل هیپوکمپ دریافت کردند.

۴- گروهی که مشابه الگوی گروه سه ولی حلال SB-334867-A یعنی DMSO قبل از هر تزریق مورفین در داخل هیپوکمپ دریافت کردند.

در این مطالعه از تکنیک ثبت پتانسیل میدانی درون تنی (in vivo field potential recording) برای بررسی پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت استفاده شد. مسیر Schaffer Collateral تحریک و از stratum radiatum ناحیه CA1 ثبت گردید. پس از بی هوش کردن با یورتان داخل صفاقی (۱/۵ گرم بر کیلوگرم)، حیوان به داخل استریوتاگس منتقل شد. بر اساس اطلس پاکسینوس نقطه تحریک در مسیر جانبی شافر با مختصات (  $DV= 3-3.5$ ,  $ML= 3.1$ ,  $AP= -3.1$  از برگما) و نقطه ثبت در ناحیه دندریتی ( stratum radiatum) CA1 با مختصات (  $ML= 1.8$ ,  $AP= -2.8$ ,  $DV= 2.5-3.5$  از برگما) علامت گذاری شد (۱۵). پس از سوراخ کردن، الکترودهای ثبت و تحریک در ناحیه مورد نظر کاشته شد. با تحریک مسیر انشعابات جانبی شافر، پتانسیل های برانگیخته میدانی از ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 ثبت گردید. دستور تحریک پالس آزمون ( Test Pulse، موج مربعی مونوفازیک با مدت زمان ۲۰۰ میکروثانیه و تواتر ۰/۱ هرتز) بعد از تعریف در نرم افزار، به قسمت Data Acquisition (پرتو دانش، ایران) ارسال و بعد از گذشتن از ایزولاتور (WPI، آمریکا)، توسط الکترودهای دو قطبی از جنس فولاد زنگ نزن به مسیر شافر کولترال اعمال گردید. برای رسیدن به ثبت مطلوب و پایدار از ناحیه CA1، گاهی ضرورت داشت جای الکترودهای تحریکی و

به منظور تزریق داروی SB-334867-A (آتاگونست گیرنده اورکسینی نوع-۱، تاکریس، انگلیس) در ناحیه CA1 هیپوکمپ یک هفته قبل از شروع آزمایش ها، پس از بی هوشی با ترکیب کتامین (۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) حیوان در دستگاه استریوتاگسی (استولتینگ، آمریکا) قرار گرفت. سپس پوست سر برداشته شده و نواحی برگما و لامبدا مشخص و سپس مطابق با اطلس پاکسینوس واتسون مختصات محل تزریق در ناحیه CA1 هیپوکمپ (  $AP= -$   $ML= \pm 2.2$ ,  $DV= 2.5$  از برگما) (۱۵) دو طرفه علامت گذاری شده و با مته سوراخ گردید و کانول راهنما با طول ۱۰ میلی متر و قطر خارجی ۰/۶۵ میلی متر، یک میلی متر بالاتر از ناحیه CA1 با استفاده از پیچ عینک و سیمان دندان پزشکی روی جمجمه ثابت شد. به منظور تزریق دارو به داخل ناحیه CA1 یک سوزن تزریق شماره ۲۷ به طول مشخصی بریده شد تا هنگامی که در کانول گذاشته می شود نوک آن حدود ۰/۵ میلی متر از سر کانول بیرون بیاید. سپس سوزن به لوله پلی اتیلن که به سرنگ همیلتون ۰/۵ میکرولیتری وصل بود متصل گردید.

۰/۵ میکرولیتر از محلول SB-334867-A حل شده در DMSO (۰/۵ میکروگرم در ۰/۵ میلی لیتر) به داخل سرنگ کشیده شده (۱۴) و بعد از خارج کردن در پوش کانول هایی که قبلا در ناحیه CA1 هیپوکمپ کاشته شده بود به صورت دوطرفه، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق زیر جلدی مورفین تزریق گردید. تزریق به صورت آهسته و در مدت زمان ۵ دقیقه انجام شد. جهت اطمینان از تزریق کامل دارو سوزن تزریق به مدت ۱ دقیقه در محل باقی ماند و بعد خارج شد. سپس مجددا در پوش کانول ها گذاشته شد و حیوان به قفس بازگردانده شد و این تزریق ها به مدت ۹ روز ادامه یافت. در گروه کنترل ۰/۵ میکرولیتر از حلال (DMSO) هفت درصد رقیق شده با مایع مغزی نخاعی مصنوعی، سیگما، آمریکا) تزریق شد. در روز دهم آزمون های الکتروفیزیولوژیک انجام گردید. تعداد گروه های مورد بررسی در این مطالعه ۴ گروه بود که شامل:

درصد شیب fEPSP دوم به شیب fEPSP اول  
( $fEPSP2/fEPSP1$ %) محاسبه شد.

برای مقایسه میانگین ها از آزمون Two-way ANOVA و Unpaired t-test استفاده شد. سطح معنی داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است.

#### یافته ها

اثر وابستگی به مورفین و همچنین تزریق SB-334867-A در ناحیه CA1 قبل از هر تزریق زیر جلدی مورفین بر پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ تحریک شاخه های جانبی شافر، پتانسیل های پس سیناپسی دسته جمعی (fEPSP) را در ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 بر می انگیزد. با تحریکات ۰/۱ هرتز هیچ تقویتی ناشی از فرکانس تحریک صورت نگرفت. برای رسم منحنی Input/output، شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی در پنج شدت تحریک مختلف اندازه گیری شد. کمترین شدتی که پاسخ را ایجاد کرد، شدت آستانه (T:Threshold) و شدتی که سبب تولید حداکثر پاسخ شد، 5T نامیده شد. سه شدت 2T، 3T، 4T به گونه ای بین شدت حداقل و حداکثر تعریف شدند که پاسخ به ترتیب دو، سه و چهار برابر پاسخ آستانه گردد. مقایسه میانگین شدت تحریک T، 2T، 3T، 4T و 5T برای گروه دریافت کننده مورفین سولفات، SB-334867-A و گروه های کنترل مربوطه تفاوت معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ، جدول ۱). پاسخ های برانگیخته در شدت های بالای 5T اشباع نشان دادند. بنابراین تعریف شدت تحریک به صورت درصدی از پاسخ حداکثر ممکن بود و شدت تحریکی که می توانست ۴۰-۵۰ درصد پاسخ حداکثر را ایجاد کند، به عنوان پالس آزمون به کار رفت. مورفین سولفات اگرچه موجب افزایش پاسخ سیناپسی پایه نسبت به گروه کنترل شده است اما این افزایش معنی دار نبود ( $p > 0/05$ ، نمودار ۱A).

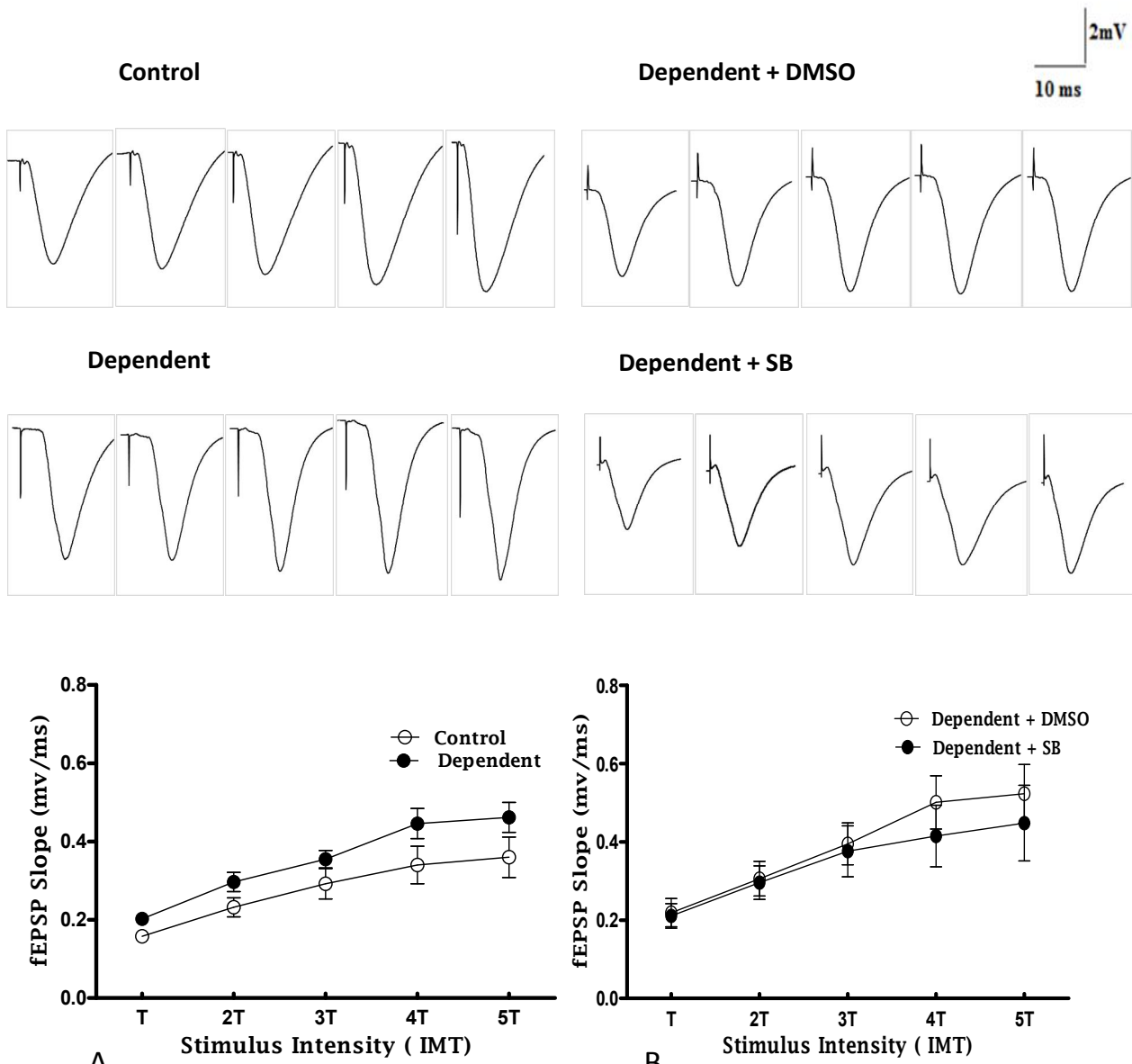
ثبات چندین بار عوض شود تا بهترین نقاط تحریک و ثبت حاصل گردد. پس از پیدا کردن جای مناسب و تعیین دقیق محل تحریک و ثبت، تحریکات حداقل به مدت ۲۰ دقیقه تا زمانی که پاسخ پایدار شود اعمال می شد. منظور از پایدار بودن پاسخ یعنی میزان تغییر شیب fEPSP کمتر از ۱۰ درصد باشد. پس از پایدار شدن پاسخ سیناپسی، جهت محاسبه شدت جریان پالس آزمون، ابتدا رابطه Input/Output (I/O) برای هر حیوان به دست آمد. به این ترتیب که مسیر انشعابات جانبی شافر با شدت های ۱۰۰ تا ۱۲۰۰ میکروآمپر، تحریک و پاسخ بر انگیزته میدانی ثبت گردید. به عبارت دیگر تحریک از حداقل شدتی که باعث برانگیختن پاسخ گردید تا زمانی که پاسخ به حداکثر میزان خود برسد به مسیر اعمال گردید. شدتی که حداکثر دامنه fEPSP را بر می انگیزد، به عنوان شدت حداکثر در نظر گرفته شد. پس از رسم منحنی I/O از شدت تحریکی که باعث تولید ۴۰-۵۰ درصد پاسخ حداکثر می شد به عنوان شدت پالس آزمون برای اعمال تحریک های زوج پالس استفاده شد. به منظور بررسی شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت از تحریکات زوج پالس متشکل از دو پالس مربعی با فواصل زمانی (IPI: Inter Pulse Interval) ۲۰، ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه که با تواتر ۰/۱ هرتز اعمال می شد، به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پاسخ ها بعد از تقویت (Gain=1000) توسط پره آمپلی فایر و آمپلی فایر (WPI، آمریکا) و فیلتر شدن (باند عبور ۱ هرتز تا ده کیلوهرتز) با فرکانس ۱۰ کیلو هرتز نمونه برداری شده و در کامپیوتر ذخیره شد. تجزیه و تحلیل به صورت off-line بر روی پاسخ های ذخیره شده صورت گرفت.

متوسط ۶ پاسخ برای آنالیز بعدی مورد استفاده قرار گرفت و شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی (fEPSP) از متوسط پتانسیل های میدانی ثبت شده از ناحیه stratum radiatum تعیین گردید. با کمک برنامه کامپیوتری آنالیز داده ها، شیب fEPSP تعیین و شاخص زوج پالس (PPI: Paired Pulse Index) به صورت

جدول ۱. شدت تحریک اعمال شده به شاخه های جانبی شافر برای برانگیختن پاسخ های سیناپسی در لایه استراتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ

گروه ها	$I_T$ ( $\mu A$ )	$I_{2T}$ ( $\mu A$ )	$I_{3T}$ ( $\mu A$ )	$I_{4T}$ ( $\mu A$ )	$I_{5T}$ ( $\mu A$ )
کنترل	$8/28 \pm 168$	$4/38 \pm 252$	$2/52 \pm 379$	$6/77 \pm 527$	$5/87 \pm 655$
وابسته	$6/29 \pm 160$	$8/42 \pm 232$	$1/57 \pm 316$	$7/74 \pm 429$	$8/81 \pm 541$
وابسته+DMSO	$7/21 \pm 195$	$5/36 \pm 297$	$6/60 \pm 428$	$3/87 \pm 575$	$2/102 \pm 680$
وابسته+SB	$5/20 \pm 153$	$3/33 \pm 253$	$7/63 \pm 365$	$7/50 \pm 375$	$7/76 \pm 610$

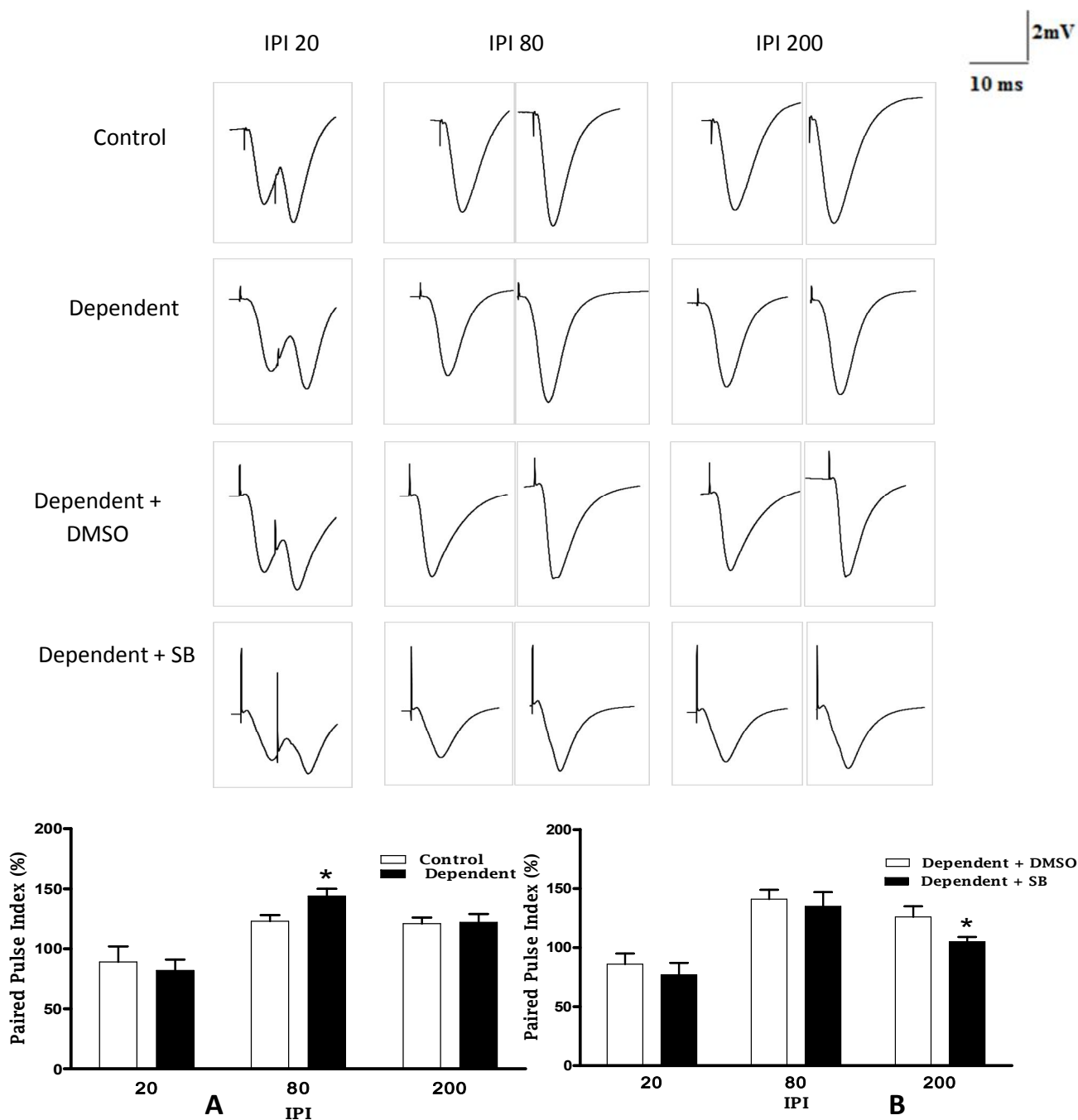
شدت تحریک استفاده شده جهت برانگیختن پاسخ سیناپسی پایه در لایه استراتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ به دنبال تحریک شاخه های جانبی شافر در گروه دریافت کننده مورفین سولفات، گروه دریافت کننده سالین به عنوان گروه کنترل و همچنین در گروهی که SB-334867-A را قبل از مورفین در ناحیه CA1 دریافت می کردند و گروه کنترل مربوط به آن که حلال SB-334867-A یعنی DMSO را قبل از مورفین در ناحیه CA1 دریافت می کردند. در هیچ یک از گروه ها تفاوت معنی داری دیده نشد  $P > 0.05$ . شدت تحریک لازم برای برانگیختن پاسخ آستانه.  $I_T, I_{2T}, I_{3T}, I_{4T}, I_{5T}$ : شدت تحریک لازم برای برانگیختن پاسخ به میزان ۲، ۳، ۴ و ۵ برابر آستانه. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است.



نمودار ۱. پاسخ های سیناپسی پایه در ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ به دنبال تحریک شاخه های جانبی شافر در گروه (A) وابسته به مورفین سولفات و (B) گروهی که SB-334867-A در ناحیه CA1 قبل از هر بار تزریق مورفین دریافت کردند. در منحنی Input/output شیب fEPSP در حیوانات دریافت کننده سالین (Control,  $n=10$ ) و مورفین سولفات (Dependent,  $n=12$ ) و همچنین در حیوانات دریافت کننده SB-334867-A قبل از مورفین سولفات (Dependent+SB,  $n=10$ ) و گروه کنترل مربوط (Dependent+DMSO,  $n=10$ ) نشان داده شده است. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. آزمون آماری آنووا تفاوت معنی داری در پاسخ سیناپسی پایه بین هیچ یک از گروه ها نسبت به گروه کنترل نشان نداد. Trace ها نمونه ای از ثبت می باشد. مقیاس اندازه گیری: ۲ mV، ۱۰ ms، ANOVA،  $P > 0.05$ .

از الگوی زوج پالس با فاصله بین پالسی (IPI) ۲۰۰ میلی ثانیه‌ای بررسی گردید. برای بررسی پاسخ های تسهیلی از IPI بین این دو حد یعنی ۸۰ میلی ثانیه استفاده شد. در تمام گروه‌ها (وابسته به مورفین و دریافت کننده سالین به عنوان گروه کنترل مربوط به آن و هم‌چنین در گروهی که SB-334867-A در ناحیه CA1 قبل از هر تزریق زیر جلدی مورفین دریافت کردند و کنترل مربوط که DMSO داخل CA1 دریافت نمودند) متوسط PPI در فاصله ۲۰ میلی ثانیه کمتر از یک (PPD: Paired Pulse Depression) بود و برای فواصل ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه بزرگتر از یک (PPF: Paired Pulse Facilitation) بود. اما در IPI ۸۰ میلی ثانیه افزایش معنی‌داری در گروه وابسته به مورفین ( $n=12$ ,  $144 \pm 5.86\%$ ) نسبت به گروه کنترل ( $n=5$ ,  $123.2 \pm 5.07\%$ ) مشاهده گردید. ( $p < 0.05$ )، نمودار ۲A). پیش درمانی با SB-334867-A تأثیری بر این افزایش PPI در IPI ۸۰ میلی ثانیه ناشی از مورفین نداشت ( $p > 0.05$ )، نمودار ۲B) و سبب کاهش معنی‌دار شاخص زوج پالس در IPI ۲۰۰ میلی ثانیه ( $n=10$ ,  $104.7 \pm 3.67$ ) درصد) نسبت به گروه وابسته ( $n=11$ ,  $126.2 \pm 8.83$ ) درصد) شد ( $p < 0.05$ )، نمودار ۲B).

تزریق SB-334867-A در ناحیه CA1 نیز پاسخ سیناپسی پایه در گروه وابسته به مورفین را متأثر نکرد به طوری که تفاوت معنی‌داری در پاسخ سیناپسی پایه بین گروه دریافت کننده SB-334867-A قبل از تزریق مورفین با کنترل مربوطه (گروه دریافت کننده DMSO قبل از تزریق مورفین) وجود نداشت ( $p > 0.05$ )، نمودار ۱B). لازم به ذکر است که پاسخ سیناپسی پایه در گروه وابسته به مورفین و گروهی که قبل از هر تزریق مورفین حلال دارو یعنی DMSO را به صورت ریزتزریق دریافت کرده بودند نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. اثر وابستگی به مورفین و هم‌چنین تزریق SB-334867-A در ناحیه CA1 قبل از هر تزریق زیر جلدی مورفین بر شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت به منظور بررسی اثر مورفین سولفات و هم‌چنین تزریق SB-334867-A در ناحیه CA1 هیپوکمپ قبل از هر تزریق زیر جلدی مورفین بر شکل‌پذیری کوتاه مدت از مدل تحریک زوج پالس استفاده کردیم، که راه مناسبی برای ارزیابی تحریک‌پذیری مدار هیپوکمپی است. میزان مهار GABAergic با واسطه گیرنده GABAA بر روی جسم سلولی نورون‌های هر می ناحیه CA1 با استفاده از الگوی زوج پالس با فواصل بین پالسی (IPI) ۲۰ میلی ثانیه و میزان مهار GABAergic با واسطه گیرنده GABAB با استفاده



نمودار ۲. شاخص زوج پالس (PPI) در گروه (A) وابسته به مورفین سولفات و (B) گروهی که SB-334867-A در ناحیه CA1 قبل از هر بار تزریق مورفین دریافت کردند در فواصل بین دو پالس (IPI) ۲۰، ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه. وابستگی به مورفین سبب افزایش معنی داری در شاخص زوج پالس (PPI) در IPI ۸۰ میلی ثانیه شده است. پیش درمانی با SB-334867-A تأثیری بر این پدیده نداشت ولی باعث کاهش معنی دار شاخص زوج پالس (PPI) در IPI ۲۰۰ میلی ثانیه شده است. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده اند. Trace ها نمونه ای از ثبت می باشد. مقیاس اندازه گیری: ۱۰ ms، ۲ mV، \*P < 0.05، Unpaired t-test.

اما سبب افزایش شاخص زوج پالس در IPI ۸۰ میلی ثانیه می شود که به عنوان ساده ترین نوع شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت در نظر گرفته می شود. علاوه بر این مشخص

## بحث

نتایج این مطالعه نشان می دهد که مورفین اگر چه پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه CA1 هیپوکمپ را تغییر نداد



بر آیند دپلاریزاسیون‌های موضعی ایجاد شده در نورون‌ها را آشکار می‌کند و نمادی از کارایی سیناپس‌های تحریکی مسیره‌های آوران می‌باشد. با وجودی که مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که اپیوئیدها دارای اثرات تحریکی بر سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ هستند و این اثرات تحریکی اپیوئیدها بر روی نورون‌های هیپوکمپی عمدتاً حاصل کاهش انتقال سیناپس‌های مهاری گابا نرژیک می‌باشد (۱۷)، اما در مطالعه ما مورفین شاخص EPSP را تحت تأثیر قرار نداده بود. شاید بتوان گفت این اثر مورفین با افزایش تحریک‌پذیری نورون پس سیناپسی اتفاق افتاده باشد. به عبارتی شبکه نورون‌های CA1 در پاسخ به EPSP، پاسخ بزرگ‌تری را تولید خواهد کرد.

همسو با نتایج ما سلمان زاده و همکاران نیز نشان دادند که مصرف مزمن مورفین بر پاسخ سیناپسی پایه اثری ندارد (۱۸) و هم‌چنین نتایج حسین مردی و همکاران نیز مبنی بر عدم تأثیرپذیری انتقال سیناپسی تحریکی پایه در اثر مصرف مزمن مورفین می‌باشد (۱۹).

اما این نتیجه، افزایش رهایش اورکسین در هیپوکمپ در اثر مصرف مورفین را رد نمی‌کند. چرا که لو و همکاران (۲۰) گزارش کردند که اورکسین A- به مقادیر مختلف ۱۰۰ و ۳۰۰ نانومول اثری بر انتقال سیناپسی پایه ندارد و در این راستا او و همکاران (۲۱) نتایج مشابهی را در مقاطع زنده هیپوکمپ گزارش نمودند. اکبری و همکاران نیز عدم تأثیر SB-334867-A بر روی شیب fEPSP پتانسیل برانگیخته میدانی پایه در ناحیه ژيروس دنداندار را گزارش کردند (۲۲). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که رهایش اورکسین در هیپوکمپ تأثیری بر شیب fEPSP پتانسیل برانگیخته میدانی پایه ندارد. بنابراین با وجودی که مصرف مورفین سبب افزایش فعالیت نورون‌های اورکسی نرژیک (۱۲) و احتمالاً رهایش آن در هیپوکمپ می‌شود اما اورکسین سبب تغییر در پاسخ سیناپسی پایه از طریق تغییر کارایی سیناپسی نمی‌شود.

در این مطالعه به منظور بررسی اثر مورفین سولفات بر شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت و نیز نقش

گردید که گیرنده‌های اورکسینی ۱ ناحیه CA1 نقشی در این اثر مورفین بر شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت در هیپوکمپ ایفا نمی‌کند.

القای سندرم قطع مصرف مورفین توسط نالوکسان و بررسی علائم آن، به منظور اطمینان از ایجاد وابستگی به مورفین و ارزیابی کمی آن استفاده می‌شود. روش‌های مختلفی جهت ایجاد وابستگی به مورفین و بررسی سندرم قطع مصرف استفاده می‌شود که روش تزریقی، به دلیل مطمئن بودن از تجویز مقدار دقیق مورفین به حیوان مورد توجه محققین قرار گرفته است. ما در این مطالعه به بررسی نقش گیرنده‌های اورکسینی نوع-۱ ناحیه CA1 هیپوکمپ در وساطت نمودن اثر مورفین بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت پرداختیم. چرا که این احتمال مطرح است که اورکسین به عنوان یک عامل ارتباطی عمل کرده و در اثر مصرف مزمن مورفین این سیستم سبب تغییر در فعالیت نورون‌ها و فعالیت شبکه نورونی در هیپوکمپ گردد.

SB-334867-A یک آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های نوع یک اورکسینی (OXIR) است. این فرآورده هنگامی که به طور سیستمیک تزریق شود بعد از نیم ساعت در پلاسما به غلظت حداکثری می‌رسد و نیمه عمر آن حدود ۴ ساعت است (۱۶). ما در این پژوهش، آنتاگونیست را ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین به صورت داخل هیپوکمپی تزریق کردیم تا مطمئن باشیم که آنتاگونیست به صورت پروفیلاکسی اثر می‌کند.

به منظور بررسی سطح فعالیت نورون‌های ناحیه CA1 پاسخ سیناپسی پایه را بررسی نمودیم. نتایج این مطالعه نشان داد وابستگی به مورفین، افزایش اندک و غیر معنی‌داری در شیب fEPSP نسبت به گروه کنترل ایجاد کرد که پیش‌درمانی با SB-334867-A تأثیری بر این اثر مورفین نداشت. ما در مطالعه خود پاسخ سیناپسی پایه را با استفاده از ثبت fEPSP از لایه استریاتوم رادیاتوم CA1، بررسی کردیم. ثبت امواج مربوط به fEPSP در مجموعه نورون‌ها در واقع برداشتی در مورد سیناپس‌های تحریکی و

فعالیت گیرنده های  $\mu$  اپیوئیدی در CA1 منجر به هایپرپلاریزه شدن نورون های واسطه مهاری می شوند و با رفع مهار (Disinhibition) باعث افزایش وقایع سیناپسی تحریکی در CA1 می گردد (۲۸)، که در تحریکات زوج پالس خود را به صورت کاهش دپرسیون یا افزایش تسهیل نشان داده است. گزارش شده است که در ناحیه CA1 گیرنده های  $\mu$  اپیوئیدی به وسیله مهار رهائش گابا هم بر گیرنده های گابا A و هم گابا B عمل می کنند و مهار یا کاهش IPSP گیرنده های گابا A و B در همه لایه های CA1 توسط فعال شدن گیرنده های  $\mu$  اپیوئیدی نشان داده شده است (۲۸) بنابراین می توان گفت که کاهش مهار گابائریک در موش های وابسته به مورفین منجر به تضعیف ورودی های مهاری و در نتیجه تشدید وقایع تحریکی سیناپسی می گردد، که خود را به صورت افزایش PPI در فاصله زمانی ۸۰ میلی ثانیه نشان می دهد.

علاوه بر این نشان داده شده است که پایانه های گلوتامینرژیک شاخه های جانبی شافر گیرنده های گابا A را بیان می کنند و فعال کردن آنها منجر به دپلاریزاسیون، شروع پتانسیل عمل، ورود کلسیم و افزایش رهائش گلوتامات می گردد (۲۹) با توجه به نقش مهاری اپیوئیدها بر نورون های واسطه ای گابائریک می توان انتظار داشت که کاهش فعالیت گیرنده های  $GABA_A$  در پایانه های شاخه های جانبی شافر منجر به کاهش رهائش میانجی گلوتامات و کاهش رهائش میانجی، همراه با افزایش PPF در PPI ۸۰ میلی ثانیه خواهد بود. با توجه به این که این اثر مهاری مورفین بر رهائش گابا ناشی از اثر مستقیم آن بر گیرنده های  $\mu$  اپیوئیدی در CA1 می باشد، بنابراین مهار گیرنده های اورکسینی با SB نتوانسته است از این اثر جلوگیری کند.

در گروه پیش درمان شده با SB-334867-A اگرچه در حالت کلی شبیه گروه وابسته به مورفین بود یعنی در IPI ۲۰ میلی ثانیه PPD و در PPI های ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه PPF دیده شد ولی نکته جالب توجه این که پیش درمانی با SB منجر به کاهش معنی دار PPI در IPI ۲۰۰ میلی ثانیه نسبت به گروه وابسته شده بود. بنابراین می توان

گیرنده های اورکسینی ناحیه CA1 در وساطت نمودن این اثر، از تحریک زوج پالس استفاده شده است، که راه مناسبی برای ارزیابی تحریک پذیری مدار هیپوکمپی است. مشخص شده که سیستم GABAergic برای شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت اهمیت فراوانی دارد (۲۳).

تعدیل زوج پالس که ساده ترین نوع شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت می باشد معمولاً در فواصل زمانی بین ده ها میلی ثانیه تا چندین ثانیه اتفاق می افتد و می تواند به شکل PPD و PPF ظاهر شود (۲۴). مشخص گردیده است که نورون های واسطه GABAergic به عنوان پایه و اساس فیزیولوژیک سازوکارهای مهاری پس و پیش خورد در هیپوکمپ عمل می کنند (۲۵). به دلیل این که در پدیده PPD، تضعیف پاسخ به دومین تحریک از یک زوج پالس که با فاصله خاصی به دنبال هم می آیند، اندازه گیری می شود؛ این پدیده به عنوان یک فرایند همئوستاتیک در نظر گرفته می شود که سطح عمل سیستم مهاری را در مدار هیپوکمپ منعکس می نماید (۲۶).

سازوکار پیش سیناپسی PPF در پیوندگاه های سیناپسی مختلف از جمله هیپوکمپ نشان داده شده است. در حقیقت بزرگ تر بودن پاسخ دوم در اثر تسهیل رهائش پیک عصبی است (۲۷). نتایج ما نشان داد که در گروه وابسته به مورفین و کنترل مربوط و همین طور در گروه پیش درمان شده با SB-334867-A و کنترل آن؛ در فواصل زمانی کوتاه بین دو تحریک متوالی (۲۰ میلی ثانیه) پدیده PPD اتفاق می افتد و در فواصل زمانی ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه PPF اتفاق می افتد. در گروه وابسته به مورفین نسبت به گروه کنترل در IPI مساوی ۸۰ میلی ثانیه؛ شاهد افزایش معنی دار در PPF بودیم و پیش درمانی با SB-334867-A نتوانست از این اثر مورفین بر شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت جلوگیری کند، به طوری که شاخص زوج پالس در گروه پیش درمانی شده با این دارو تفاوت معنی داری با گروه وابسته نداشت. در حالی که پیش درمانی با SB-334867-A سبب کاهش معنی دار PPI در IPI ۲۰۰ میلی ثانیه نسبت به گروه وابسته گردید.

امکان انجام تحقیق در مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی را فراهم نمودند.

#### منابع

1. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature reviews neuroscience*. 2001;2(2):119-28.
2. Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiology of learning and memory*. 2002;78(3):637-47.
3. 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 of London Series B: Biological Sciences*. 2003;358(1432):773-86.
4. Harris GC, Aston-Jones G. Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends in neurosciences*. 2006;29(10):571-7.
5. Zhou Y, Bendor J, Hofmann L, Randesi M, Ho A, Kreek MJ. Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. *Journal of endocrinology*. 2006;191(1):137-45.
6. Chen C-T, Dun S, Kwok E, Dun N, Chang J-K. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroscience letters*. 1999;260(3):161-4.
7. Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neuroscience letters*. 1999;264(1):101-4.
8. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Åkerman KE. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2002;283(6):C1567-C91.
9. Sil'kis I. Possible Mechanisms for the Effects of Orexin on Hippocampal Functioning and Spatial Learning (analytical review). *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013;43(9):1049-57.

گفت که آنتاگونیست کردن گیرنده های اورکسینی در ناحیه CA1 سبب افزایش مهار گابا ترژیک در موش های وابسته به مورفین گردیده است. نقش گیرنده های اورکسینی در تحریک ترشح گابا (۳۰) و مهار ترشح گابا گزارش (۲۲) شده است. به نظر می رسد که SB-334867-A از طریق رفع مهارتی که توسط گیرنده های اورکسینی بر روی ترشح گابا وجود دارد موجب افزایش مهار گابا ترژیک می شود. این احتمال مطرح است که در حیوانات وابسته، مورفین علاوه بر اثر مستقیم، با واسطه رهایش اورکسین در ناحیه CA1 هیپوکمپ نیز سبب مهار رهایش گابا و در نتیجه افزایش PPI می گردد. بنابراین با مهار گیرنده های اورکسینی از اثر مهارتی مورفین بر رهایش گابا کاسته شده و رهایش این میانجی مهارتی سبب کاهش PPI می گردد که در مطالعه حاضر در IPI ۲۰۰ میلی ثانیه شاهد کاهش معنی دار نسبت به گروه وابسته هستیم.

#### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه پیشنهاد می کند مصرف مزمن مورفین پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه CA1 هیپوکمپ را متأثر نمی کند و گیرنده های نوع ۱ اورکسین در این ناحیه نقشی در وساطت نمودن پاسخ سیناپسی پایه در حیوانات وابسته به مورفین ندارد. علاوه بر این تغییرات مشاهده شده در شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت (افزایش تسهیل سیناپسی) در ناحیه CA1 هیپوکمپ در حیوانات وابسته به مورفین نیز وابسته به فعالیت گیرنده های نوع ۱ اورکسین در این ناحیه نمی باشد.

#### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ۱۳/۷۱۲ می باشد که بدین وسیله نویسندگان از مسئولین آن تشکر و سپاسگزاری می نمایند. هم چنین تقدیر و تشکر فراوان از استاد بزرگوار سر کار خانم دکتر معتمدی که

10. Yang L, Zou B, Xiong X, Pascual C, Xie J, Malik A, et al. Hypocretin/Orexin neurons contribute to hippocampus-dependent social memory and synaptic plasticity in mice. *The Journal of Neuroscience*. 2013;33(12):5275-84.
11. Mori K, Kim J, Sasaki K. Electrophysiological effects of orexin-B and dopamine on rat nucleus accumbens shell neurons in vitro. *Peptides*. 2011;32(2):246-52.
12. Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*. 2005;437(7058):556-9.
13. Sharf R, Sarhan M, DiLeone RJ. Role of orexin/hypocretin in dependence and addiction. *Brain research*. 2010;1314:130-8.
14. A ziziH, Mirnajafi-Zadeh J, Rohampour K, Semnanian S. Antagonism of orexin type 1 receptors in the locus coeruleus attenuates signs of naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. *Neuroscience letters*. 2010;482(3):255-9.
15. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*: Academic press; 2006.
16. Akbari E, Motamedi F, Naghdi N, Noorbakhshnia M. The effect of antagonization of orexin 1 receptors in CA1 and dentate gyrus regions on memory processing in passive avoidance task. *Behavioural brain research*. 2008; 187(1):172-7.
17. Drake CT, Milner TA. Mu opioid receptors are in somatodendritic and axonal compartments of GABAergic neurons in rat hippocampal formation. *Brain research*. 1999; 849(1): 203-15.
18. Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnanian S, Shafizadeh M. Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain research*. 2003;965(1):108-13.
19. Hoseinmardi N, Azimi L, Javan M, Naghdi N, Fathollahi Y. Augmentation of paired pulse index as short-term plasticity due to morphine dependence. *Physiology and Pharmacology*. 2009; 13(2):108-19.
20. Peng H-Y, Chang H-M, Chang SY, Tung K-C, Lee S-D, Chou D, et al. Orexin-A modulates glutamatergic NMDA-dependent spinal reflex potentiation via inhibition of NR2B subunit. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008;295(1):E117-E29.
21. Aou S, Li X-L, Li A-J, Oomura Y, Shiraishi T, Sasaki K, et al. Orexin-A (hypocretin-1) impairs Morris water maze performance and CA1-Schaffer collateral long-term potentiation in rats. *Neuroscience*. 2003;119(4):1221-8.
22. Akbari E, Motamedi F, Davoodi FG, Noorbakhshnia M, Ghanbarian E. Orexin-1 receptor mediates long-term potentiation in the dentate gyrus area of freely moving rats. *Behavioural brain research*. 2011;216(1):375-80.
23. Zhang L-H, Xu L, Xu T-L. Glycine receptor activation regulates short-term plasticity in CA1 area of hippocampal slices of rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 344(3):721-6.
24. Kravchenko MO, Moskalyuk AO, Fedulova SA, Veselovsky NS. Calcium-dependent changes of paired-pulse modulation at single GABAergic synapses. *Neuroscience letters*. 2006; 395(2):133-7.
25. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The hippocampus book*: Oxford University Press; 2006.
26. Davies C, Davies S, Collingridge G. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *The Journal of Physiology*. 1990; 424(1):513-31.
27. Santschi LA, Stanton PK. A paired-pulse facilitation analysis of long-term synaptic depression at excitatory synapses in rat hippocampal CA1 and CA3 regions. *Brain research*. 2003;962(1):78-91.
28. McQuiston AR. Effects of  $\mu$ -opioid receptor modulation on GABAB receptor synaptic function in hippocampal CA1. *Journal of neurophysiology*. 2007;97(3):2301-11.
29. Jang I-S, Ito Y, Akaike N. Feed-forward facilitation of glutamate release by presynaptic GABA A receptors. *Neuroscience*. 2005; 135(3): 737-48.
30. Selbach O, Doreulee N, Bohla C, Eriksson K, Sergeeva O, Poelchen W, et al. Orexins/hypocretins cause sharp wave-and  $\theta$ -related synaptic plasticity in the hippocampus via glutamatergic, gabaergic, noradrenergic, and cholinergic signaling. *Neuroscience*. 2004; 127(2): 519-28.