Physiology and Pharmacology, 12 (4), 342 - 350
Winter 2009 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

The effect of morphine dependence on expression of hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor subunits in male rats

Ali Mostafaie [1], Ali Pourmotabbed [2*], Abdolrasool Khalafi [1], Seyed Ershad Nedaei [2], Hedayat Sahraei [3,4], Reza Hajihosseini [5]

1. Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
2. Dept. Physiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Iran
3. Iranian Neuroscience Network Tehran, Iran
4. Applied Neuroscience Research Center, Bagiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Iran
5. University of Payam_e_noor, Tehran branch, Iran

Received: 30 Oct 2008 **Revised: 31 Dec 2008** **Accepted: 31 Dec 2008**

Abstract

Introduction: N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors play a pivotal role in the development of tolerance and physical dependence to opiates. Activation of NMDA receptors involves the induction of long term potentiation (LTP) in hippocampus. Our previous study suggested that chronic oral administration of morphine enhanced NMDA dependent LTP in the CA1 area of hippocampal slices of rats. The present study examines the expression levels of individual NMDA receptor subunits, NR1, NR2A and NR2B, in the hippocampus of morphine-dependent rats by using western blotting.

Methods: Total proteins of hippocampus were extracted by Tris-HCl buffer containing anti proteases and sodium dodecyl sulfate (SDS). The extracted proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidenefloride (PVDF) membrane by tank blotting and the subunits of NMDA receptor were analyzed by immunoblotting by using specific antibodies.

Results: Obtained results provide both biochemical and statistical evidence to suggest that NMDA receptor function in the hippocampus, at least in terms of expression of NR1, NR2A and NR2B protein subunits, increases in morphine-dependent rats.

Conclusion: Taken together, these data support several studies in the literature indicating that NMDA receptors in the hippocampus are involved in the process of opiate dependence.

Keywords: hippocampus, morphine-dependence, rat, NMDA receptor subunits.

* Corresponding author e- mail: apourmotabbed@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۴)، ۳۴۲ - ۳۵۰
زمستان ۱۳۸۷

اثر وابستگی به مرفین بر بیان زیرواحدهای گیرنده ان- متیل دی آسپارتات در هیپوکامپ موش صحرایی نر

علی مصطفایی[۱]، علی پورمتعبد[۲*]، عبدالرسول خلفی[۱]، سید ارشاد ندایی[۲]، هدایت صحرایی[۳،۴]، رضا حاجی حسینی[۵]

۱. مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه
۳. شبکه علوم اعصاب ایران تهران
۴. مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران
۵. دانشگاه پیام نور، شاخه تهران

دریافت: ۹ آبان ۸۷ بازبینی: ۱ دی ۸۷ پذیرش: ۱۱ آبان ۸۷

چکیده

مقدمه: گیرنده ان- متیل دی آسپارتات (NMDA) نقش اساسی در ایجاد و پیشرفت وابستگی و تحمل به اپیوئیدها ایفا می‌کند. فعال شدن گیرنده NMDA باعث القای تقویت طولانی مدت (LTP) در هیپوکامپ می‌گردد. در مطالعه پیشین ما تجویز مزمن خوراکی مرفین باعث تشدید LTP وابسته به گیرنده‌های NMDA در ناحیه CA1 در برش‌های هیپوکامپ گردید. مطالعه حاضر، به کمک روش وسترن بلات به بررسی بیان زیرواحدهای NR1، NR2Aو NR2B از گیرنده NMDA در هیپوکامپ موش‌های صحرایی وابسته به مرفین می‌پردازد.

روش‌ها: پروتئین تام هیپوکامپ با بافر تریس- HCl که دارای مجموعه‌ای از آنتی پروتئازها و سدیم دودسیل سولفات (SDS) بود، استخراج شد. پروتئین استخراج شده پس از تفکیک به روش SDS-PAGE به غشای پلی وینیلیدین دی فلورید (PVDF) انتقال داده شد و میانکنش زیرواحدهای گیرنده NMDA با آنتی بادی‌های اختصاصی به روش ایمونوبلاتینگ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج شواهد بیوشیمیایی و آماری نشان داد که عملکرد گیرنده NMDA در هیپوکامپ، از طریق افزایش بیان زیرواحدهای NR1، NR2Aو NR2B در موش‌های صحرایی وابسته به مرفین افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، این داده‌ها تائید کننده مطالعات متعددی است که نشان می‌دهد گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ در فرآیند وابستگی به اپیوئیدها نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: هیپوکامپ، وابستگی به مرفین، موش صحرایی، زیرواحدهای گیرنده NMDA.

مقدمه

در حیوانات آزمایشگاهی تجویز مزمن اپیوئیدها از جمله مرفین و هروئین باعث ایجاد وابستگی فیزیکی و تحمل می‌شود که اگر به این حیوانات نالوکسان تجویز شود، علائم سندرم ترک ایجاد خواهد شد [۱ و ۲۳]. در موش صحرایی، وابستگی فیزیکی را می‌توان توسط تجویز مکرر مرفین [۳۸] یا کشت زیر جلدی آن [۴] ایجاد نمود. ما قبلا نشان دادیم که تجویز خوراکی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: apourmotabbed@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

مرفین در آب آشامیدنی موش‌های صحرایی به مدت ۳۰ -۲۱ روز متوالی باعث القای وابستگی فیزیکی می‌شود [۳۶].

گلوتامات، یک نوروترانسمیتر تحریکی در سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد. گیرنده‌های گلوتاماتی نقش مهمی در شکل پذیری سیناپسی از جمله تقویت طولانی مدت (LTP = long term potentiation)، یادگیری و حافظه [۲۲، ۹، ۳] و ناهنجاری‌های نورولوژیک [۲۸، ۱۹] ایفا می‌کنند. گیرنده‌های گلوتاماتی بر اساس ویژگی‌های فارماکولوژیک و فیزیولوژیک به دو دسته ان- متیل دی آسپارتات (NMDA) و non-NMDA، تقسیم می‌شوند [۲۴]. زیرواحدهای گیرنده NMDA، بر اساس شباهت ردیف آمینو اسیدی، به انواع NR1، NR2 و در بعضی موارد NR3 تقسیم می‌شوند [۵۴، ۵۳، ۳۱، ۲۷، ۱۵]. mRNA زیرواحد NR1 در بسیاری از مناطق مغز یافت شده است. در حالیکه وجود mRNA انواع NR2 (NR2A-D) در هر قسمت مغز بستگی به عملکرد آن منطقه از مغز دارد. mRNA زیرواحد NR2A، بطور گسترده‌ای در مغز یافت می‌شود. اما سطح بیان آن در قشر مخ، تشکیلات هیپوکامپ و سلول‌های دانه‌ای مخچه بیشتر است [۴۴، ۳۱، ۳۰]. همچنین mRNA زیرواحد NR2B، بطور مشخص در مغز قدامی، کورتکس مخ، تشکیلات هیپوکامپ، سپتوم، پیاز بویایی، تالاموس و هسته دمی بیان بالائی دارد [۵۱، ۴۴، ۳۱، ۳۰]. mRNA زیرواحد NR2C، بطور قابل توجهی در مخچه ردیابی شده است [۵۱، ۴۴، ۳۰]. بیان فوق العاده این زیرواحد در لایه سلولی دانه‌ای مخچه گزارش شده در حالیکه بیان ضعیفی از آن نیز در پیاز بویایی و تالاموس دیده می‌شود. اما سطح پائینی از بیان mRNA زیرواحد NR2D، در تالاموس، ساقه مغز و پیاز بویایی گزارش شده است [۴۴].

گیرنده‌های NMDA در مغز، کمپلکس‌های هترومری متشکل از زیرواحدهای NR1 و NR2 می‌باشند که این زیرواحدها بخش عملی گیرنده NMDA را تشکیل می‌دهند [۴۱، ۳۱، ۱۵]. بهر صورت، گیرنده NMDA کمپلکسی پنتامر یا تترامر از زیرواحد NR1 و یک یا بیش از یک زیرواحد NR2(A-D) یا NR3(A&B) می‌باشد [۴۵، ۴۱، ۷]. بنابراین، بسته به تمایز و عملکرد هر ناحیه از مغز، بیان انواع زیرواحدهای NR2 یا NR3 علت تنوع در گیرنده‌های NMDA می‌باشد [۵۲، ۴۴].

آنتی بادی‌های اختصاصی، به عنوان ابزاری مفید برای شناسایی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طرفی انتهای کربوکسیلی گیرنده NMDA بعنوان ناحیه‌ای که توسط پروتئین کیناز C (PKC) فسفریله می‌شود، شناسایی شده است [۴۶، ۳۲]. بنابراین استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی برای انتهای کربوکسیلی زیرواحدهای NR1، NR2A و NR2B روش مفیدی برای مطالعه نقش زیرواحدها در نواحی مختلف سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد [۳۴].

شواهد نشان می‌دهد که گیرنده NMDA نقش محوری را در پیشرفت تحمل و وابستگی به اپیوئیدها ایفا می‌کند [۴۸]. آنتاگونیست‌های رقابتی جایگاه گلوتامات [۱۱] و مهار کننده‌های کانال یونی [۴۹] باعث جلوگیری از ایجاد علائم فیزیکی سندرم ترک در جوندگان می‌شوند. همچنین درموش‌های سوری جهش یافته فاقد زیرواحد NR2A، شدت علائم ترک مرفین در اثر تجویز نالوکسان کاهش می‌یابد [۲۹]. از طرفی مطالعات هیبریداسیون in situ و ردیابی رادیولیگاندها نشان داده که بیان گیرنده NMDA در جوندگان در اثر تجویز طولانی مدت مرفین یا دیگر اپیوئیدها تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۵۶، ۱۲، ۲]. بهر حال، مشخص نیست که آیا تغییر در بیان گیرنده‌های NMDA پیامد عملی و فیزیولوژیک دارد یا خیر.

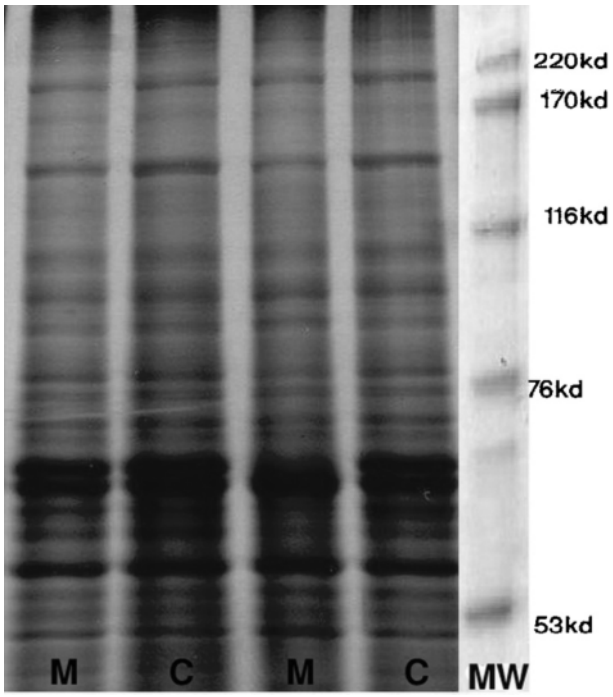
از طرف دیگرگزارش شده که فعال شدن گیرنده‌های NMDA، یکی از مکانیزم‌های مهم در ایجاد حافظه و یادگیری وابسته به هیپوکامپ می‌باشد [۵]. مطالعات متعددی اثرات مثبت یا منفی تجویز مرفین بر یادگیری و حافظه را در جوندگان نشان می‌دهند [۲۶، ۲۵، ۸]. ما پیش از این نشان دادیم که ایجاد وابستگی خوراکی به مرفین در موش صحرایی، باعث القا LTP تشدید یافته در ناحیه CA1 هیپوکامپ [۳۶] و همچنین تقویت یادگیری و حافظه فضایی [۳۹] می‌شود که هر دوی این اثرات وابسته به افزایش فعالیت گیرنده‌های NMDA در هیپوکامپ [۳۷، ۳۶] می‌باشد. اما مشخص نیست که کدام زیرواحد از گیرنده NMDA (NR1، NR2A و یا NR2B) بطور بارزی در ایجاد وابستگی خوراکی به مرفین و اثرات آن در فرآیندهای فوق الذکر مشارکت می‌کند. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی تغییرات در بیان انواع زیرواحدهای گیرنده NMDA در هیپوکامپ موش صحرایی پس از تیمار با مرفین خوراکی و به روش وسترن بلات، طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد NMRI در محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم، تهیه شده از موسسه رازی کرج استفاده شد. حیوانات در دو گروه و به تعداد ۳-۴ سر در هر قفس، تحت تاثیر سیکل تاریکی-روشنا یی ۱۲ ساعته و در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد قرار داشتند. حیوانات به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. در هر گروه آزمایش ده سر حیوان مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه ایجاد وابستگی به مرفین با الگوی خاصی انجام گرفت. به طوری که مرفین سولفات (Temad-Iran) به ترتیب ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی گرم در میلی لیتر هر یک به مدت ۴۸ ساعت و ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر در طی روزهای بعد تا روز ۳۰ ام در آب آشامیدنی حیوانات اضافه می‌شد. به منظور پوشانیدن طعم تلخ مرفین سولفات، سوکروز (۴۰ گرم در لیتر)، به آب آشامیدنی اضافه شد. در طی مطالعات مقدماتی، مقدار متوسط دریافت آب و بنابراین مرفین سولفات در بالاترین دوز (۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر) اندازه‌گیری شد که حدود ۱۳۷ میلی گرم در میلی لیتر به ازای هر روز بود. حیوانات گروه شاهد بطور مشابه فقط تحت تجویز خوراکی سوکروز (۴۰ گرم در لیتر) به مدت ۳۰ روز قرار گرفتند. ایجاد علایم سندرم ترک در اثر تجویز نالوکسان (۲ mg/kg, ip) در گروه وابسته در مطالعه قبلی ما گزارش شده است [۳۶]. در آن مطالعه حیوانات گروه شاهد در اثر دریافت نالوکسان هیچگونه علایم سندرم ترک را از خود بروز ندادند. در مطالعه حاضر پس از سی روز تیمار، حیوانات توسط اتر بیهوش شده، سر آنها به سرعت قطع، جمجمه باز و مغز خارج شد. سپس مغز در محیط سرد یخی قرار گرفت. پس از آن هیپوکامپ جدا و در نیتروژن مایع منجمد گردید و تا زمان آزمایشات در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس ۱۰ برابر وزن هر هیپوکامپ، از بافر سرد ۲۰ میلی مولار تریس-HCl با pH=۷/۵ اضافه گردید. این بافر حاوی ۲ میلی مولار اتیلن دی آمین تترا استات، ۱ میلی مولار فنیل متیل سولفونیلوراید، ۰/۳۲ مولار سوکروز به همراه مخلوطی از آنتی پروتئازها شامل (۱۰ میلی مولار N- اتیل مالمید، ۲میلی مولار یدواستات، ۲۵ میلی مولار بنز آمیدین، ۱۲/۵ میلی مولار ۶-آمینوکاپروئیک اسید) (Sigma) بود. سپس بافت در درجه حرارت پائین بکمک دستگاه هموژنیزر Potter®S (Braun Biotech) همگون گردید. مخلوط هموژنیزه شده به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ (Hettich) شد. مایع روئی حاصله مجددا با استفاده از سانتریفیوژ دور بالا بمدت ۳۰ دقیقه در g ۴۰۰۰۰ در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (VISION Scientific) شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ در حجم یک میلی لیتر بافر استخراج یکنواخت شد و دوباره در g ۴۰۰۰۰ بمدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در ۴۰۰ میکرولیتر بافر اولیه و ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه (۵x) الکتروفورز بتدریج و با تکان دادن حل شده و از آن بعنوان نمونه بدست آمده استفاده شد.

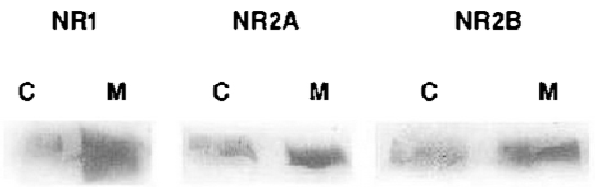
جهت سنجش پروتئین به روش بیسین کونینیک اسید (BCA) دو نوع محلول به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت:

محلول A از ۱ درصد بیسین کونینیک اسید ،۲ درصد کربنات سدیم آبدار، ۰/۱۶ درصد تارترات سدیم، ۴/. درصد هیدروکسید سدیم و ۹۵/. درصد بیکربنات سدیم ساخته شد. pH این محلول به کمک هیدروکسید سدیم ۵۰ درصد، به ۱۱/۲۵ رسید. محلول B دارای ۴ درصد سولفات سدیم آبدار در آب بدون یون بود. محلول استاندارد کار با حل نمودن ۵۰ قسمت محلول A در یک حجم محلول B تهیه شد. برای سنجش پروتئین، ۲ میلی لیتر از محلول کار به ۰/۱ میلی لیتر از نمونه آلبومین سرم گاوی (BSA) بعنوان پروتئین استاندارد، اضافه شد. غلظت پروتئین استاندارد در مقادیر ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. سپس لوله‌ها در دمای اتاق بمدت ۲ ساعت نگهداری شدند. آنگاه با سنجش میزان جذب همه نمونه‌ها در طول موج ۵۶۲ نانومتر، نسبت به محاسبه غلظت نمونه‌های مجهول به کمک منحنی استاندارد اقدام شد [۴۳]. به منظور ایمونوبلاتینگ زیرواحدهای گیرنده NMDA، نمونه‌های پروتئینی غشا سلولهای هیپوکامپ در بافر نمونه SDS-PSGE دارای ۳ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS)، ۲ درصد گلیسرول و ۱ درصد β-مرکاپتواتانول حل و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. الکتروفورز SDS-PAGE بر اساس روش لاملی [۱۶] در ژل جدا کننده ۷/۵ درصد در ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت انجام گرفت. پس از الکتروفورز، پروتئین‌ها به غشای پلی وینیلیدن دی فلوراید (PVDF) منتقل شد. این انتقال



شکل۱- طرح الکتروفورزی پروتئین‌های هیپوکامپ. همانطور که این شکل نشان می‌دهد عصاره پروتئین‌های غشا سلولهای هیپوکامپ، دارای چندین باند پروتئینی با وزن ملکولی متفاوت می‌باشد. باندهای مربوط به زیرواحدهای گیرنده NMDA، در محدوده KD ۱۱۶-۷۶ برای NR1 و در محدوده KD ۱۷۰ -۱۱۶ برای NR2A و NR2B می‌باشد. (C) گروه شاهد و (M) گروه وابسته به مرفین.

در بافر تریس-گلیسین دارای ۲۵ میلی مولار تریس، ۱۹۲میلی مولار گلیسین، SDS ۰۱/. درصد و متانول ۵ درصد انجام شد [۴۷]. سپس غشاها در بافر فسفات نمکی (PBS) دارای ۰/۵ درصد توین۲۰، بمدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد تا پیوندهای غیراختصاصی مهار گردد. پس از مهار، نسبت به انکوبه نمودن غشاها در آنتی بادی اولیه زیرواحدهای گیرنده NMDA، NR1 و NR2A (Sigma) و NR2B (Abcam)، که درPBS محتوی ۰۵/. درصد توین ۲۰ (PBS-T) رقیق شده بودند، در دمای ۴ درجه سانتیگراد و بمدت یک شب اقدام شد. آنتی بادی اولیه شامل آنتی بادی‌های ضد NR1 (با رقت ۱/۵۰۰)، آنتی بادی ضد NR2A (با رقت ۱/۲۵۰) و آنتی بادی ضد NR2B (با رقت ۱/۵۰۰) بود. پس از چند بار شستشوی غشاها با PBS-T، غشاها بمدت ۲ ساعت در آنتی بادی‌های ثانویه شامل آنتی بادی ضد IgG موش کونژوگه با پراکسیداز (ازمنبع بزی) برای NR2B و آنتی بادی ضد IgG خرگوش کونژوگه با پراکسیداز (از منبع بزی) برای NR1 و NR2A، قرار گرفتند. باندهای فعال پروتئینی مورد نظر با اضافه نمودن محلول سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB) و H_2O_2 آشکار سازی شدند. برای



شکل۲- تصویر واضحی از باندهای پروتئینی حاصل از روش وسترن بلات زیرواحدهای گیرنده NMDA در دو گروه (C) شاهد و (M) وابسته به مرفین.

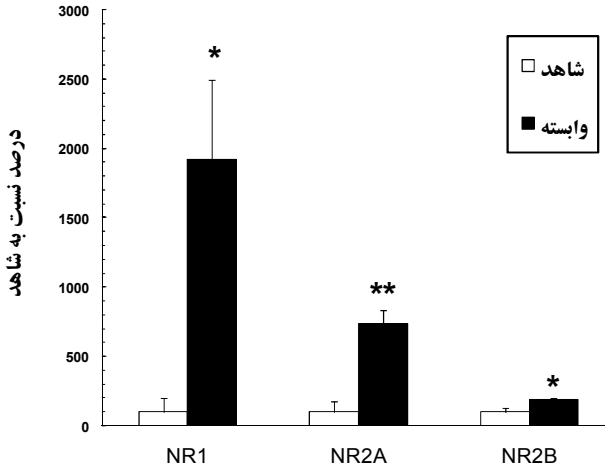
دانسیتومتری میزان پروتئین هر کدام از باندها، از نرم افزار Macintosh by institute of health. USA) scion image Wayne Rasband of national) استفاده شد. جهت آنالیز داده‌ها میزان پروتئین هر کدام از زیرواحدهای گیرنده NMDA محاسبه و بررسی تفاوت بین گروههای مورد مطالعه با استفاده از آزمون آماری t-test انجام شد. بدین منظور داده‌های بدست آمده از گروه شاهد در مورد هر زیرواحد بصورت ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و داده‌های مربوط به گروه وابسته نسبت به آن محاسبه گردید. نمودار بصورت Mean±SEM بیان شده است. در هر مورد $p<0.05$ به عنوان حداقل سطح تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در شکل۱، طرح الکتروفورزی پروتئین‌های هیپوکامپ دیده می‌شود. همانطور که این شکل نشان می‌دهد عصاره پروتئین‌های غشا سلولهای هیپوکامپ، دارای چندین باند پروتئینی با وزن ملکولی متفاوت می‌باشد. باندهای مربوط به زیرواحدهای گیرنده NMDA، در محدوده KD ۱۱۶-۷۶ برای NR1 و در محدوده KD ۱۷۰ -۱۱۶ برای NR2A و NR2B می‌باشد.

در شکل۲ تصویری از باندهای پروتئینی حاصل از روش وسترن بلات نشان داده شده است. در این تصویر به وضوح تفاوت بین باندهای حاصل از زیرواحدهای مورد مطالعه در دو گروه حیوانات وابسته (M) و شاهد (C) ملاحظه می‌شود.

در خصوص بیان زیرواحدهای گیرنده NMDA نتایج نشان داد که بیان زیرواحد NR1 بطور معناداری ($p<0.05$) پس از ۳۰ روز تجویز مرفین، در مقایسه با نمونه‌های حیوانی گروه شاهد افزایش یافت. میانگین این افزایش بیان بیش از ۱۹ برابر بود



شکل۳- مقایسه میزان بیان هر یک از زیرواحدهای گیرنده NMDA در هیپوکامپ دو گروه حیوانات مورد مطالعه. $p<0.05$* و $p<0.001$**

(۵۷۸٪ ± ۱۹۱۹٪). از طرف دیگر افزایش بیان معنی داری ($p<0.001$) در مورد زیرواحد NR2A در موش‌های وابسته به مرفین در مقایسه با گروه شاهد بدست آمد (۱۰۱٪ ± ۷۳۷٪). مشابه با تغییرات مشخص در بیان زیرواحدهای NR1 و NR2A، که در موش‌های وابسته به مرفین دیده شد، بیان زیرواحد NR2B نیز در اثر وابستگی به مرفین بطور معناداری ($p<0.05$) افزایش یافت (۲۸٪ ± ۱۸۹٪) (شکل۳).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان زیرواحدهای گیرنده NMDA، که با روش وسترن بلاتینگ آنالیز گردید، بطور معنی‌داری توسط وابستگی به مرفین افزایش می‌یابد. ایجاد وابستگی فیزیکی توسط تجویز مرفین به روش حاضر قبلا نشان داده شده‌است [۱]. روش‌های متفاوتی از جمله تزریق روزانه یا کاشت مرفین زیر پوستی جهت القای تحمل و وابستگی به مرفین وجود دارد [۳۴، ۳۳]. در آزمایش ما، مرفین در آب آشامیدنی حل شد تا از استرس ایجاد شده ناشی از لمس حیوان و استرس تزریق یا روش‌های جراحی و کاشت زیر جلدی مرفین پرهیز شود. این مدل ایجاد وابستگی بسیار شبیه مدل اعتیاد انسانی می‌باشد زیرا میزان مصرف مرفین توسط حیوان وابسته و نه شخص آزمایشگر، تعیین می‌گردد [۱].

گیرنده NMDA کمپلکسی پنتامر یا تترامر متشکل از زیرواحد NR1 و دو یا بیش از دو زیرواحدNR2 می‌باشد [۴۱، ۷]. بیان انواع مختلف زیرواحدهای NR2 در نواحی متفاوت مغز را می‌توان یکی از علل تنوع فارماکولوژیک و فیزیولوژیک انواع گیرنده‌های NMDA دانست [۵۱، ۴۴، ۳۱]. از میان انواع گیرنده‌های NMDA، گیرنده NMDA دارای زیرواحدهای NR1، NR2A و NR2B در هیپوکامپ قرار دارند [۵۲، ۵۱، ۳۱، ۳۰، ۲۷، ۱۵، ۱۳].

گزارشاتی درباره وجود گیرنده‌ها و مسیرهای اپیوئیدی در ناحیه CA1 و دیگر نواحی هیپوکامپ ارائه شده است. همچنین گزارشاتی درباره اثرات مثبت اپیوئیدها بر شکل پذیری سیناپسی در هیپوکامپ [۱۰]، و مطالعاتی درباره اثر اپیوئیدها بر فعالیت گیرنده NMDA در هیپوکامپ وجود دارد. Chavkin و همکارانش [۶] در سال ۱۹۸۵، پیشنهاد دادند که فیبرهای عصبی حاوی دینورفین-A و B در ناحیه CA1 وجود دارند. این اپیوئیدها با اثر بر گیرنده‌های اپیوئیدی μ در تنظیم تحریک پذیری سلول‌های هرمی در ناحیه CA1 دخالت دارند.

داده‌های ما نشان می‌دهد که بیان پروتئین زیرواحد NR1 بطور معناداری در هیپوکامپ موش‌های وابسته به مرفین در قیاس با حیوانات گروه شاهد افزایش می‌یابد. این داده‌ها را چندین مطالعه که افزایش بیان زیرواحد NR1 را در هیپوکامپ جوندگان وابسته به مرفین (و دیگر نواحی که در این مطالعه بررسی نشده از جمله ناحیه خاکستری periaqueductal، ناحیه تگمنتوم شکمی و دیگر نواحی CNS) گزارش می‌کند، تائید می‌نماید [۵۵، ۴۲، ۱۸، ۱۷، ۱۲]. هرچند که Zhu و همکارانش [۵۶] در سال ۱۹۹۹ هیچگونه تغییری را در بیان mRNA زیرواحد NR1 در موش هایی که مرفین را بصورت داخل بطنی بمدت ۳ روز دریافت نموده بودند مشاهده نکردند. در مطالعه حاضر همچنین بیان زیرواحد NR2A در هیپوکامپ موش‌های وابسته بطور معناداری نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. این داده‌ها را مطالعه Le Grevès و همکارانش [۱۷] در سال ۱۹۹۸ تائید می‌کند. آنها نشان دادند که بیان پروتئین زیرواحد NR2A در موش‌های وابسته به مرفین در هیپوکامپ و دیگر نواحی سیستم اعصاب مرکزی افزایش می‌یابد [۵۰، ۳۵]. اما Inoue و همکارانش در سال ۲۰۰۳ هیچگونه تغییر معنی داری را در بیان NR2A در هیپوکامپ موش صحرایی وابسته به مرفین مشاهده ننمودند [۱۲]. سرانجام اینکه داده‌های ما نشان می‌دهد که بیان زیرواحد

NR2B نیز بطور معناداری در هیپوکامپ موش‌های وابسته به مرفین افزایش می‌یابد. چندین گزارش افزایش بیان زیرواحد NR2B را در هیپوکامپ موش‌های وابسته به مرفین تائید می‌کنند [۲۱، ۲۰، ۱۷، ۱۴]. اما برخی محققین افزایش بیان NR2B را در هیپوکامپ [۴۰، ۳۳، ۱۲] و دیگر نواحی CNS [۵۶، ۴۰، ۳۳، ۲۱] حیواناتی که تحت تجویز مرفین قرار گرفته اند، تائید نمی‌کنند.

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که بیان همه زیرواحدهای NR1 , NR2A و NR2B در هیپوکامپ موش صحرایی وابسته به مرفین افزایش می‌یابد. در حالیکه در سایر مطالعات مشابه فقط تغییر (افزایش یا کاهش) در بیان یک و یا دو زیر واحد در اثر تجویز مرفین گزارش شده است. این اختلاف ممکن است ناشی از تفاوت در روش ایجاد وابستگی (روش خوراکی) در مطالعه حاضر نسبت به سایر روش‌ها باشد. زیرا همانگونه که گفته شد در روش تجویز خوراکی مرفین، میزان مصرف مرفین توسط حیوان وابسته تعیین می‌گردد. ضمنا بنظر می‌رسد که افزایش بیان زیرواحد NR1 در حیوانات وابسته به مرفین وابسته به نمونه بوده و لذا علیرغم اینکه افزایش بیان حاصله بسیار بیشتر از زیرواحدهای NR2A و NR2B می‌باشد اما میزان تفاوت پاسخ حیوانات در گروه وابسته زیاد است. که این یافته نیز می‌تواند مورد توجه مطالعات بعدی قرار گیرد. همچنین بایستی خاطر نشان نمود که دیگر انواع زیرواحدهای گیرنده NMDA (NR2C، NR2D، NR3A و NR3B (و همچنین دیگر نواحی مغز در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته اند. به عنوان مثال می‌دانیم که آمیگدال و ناحیه تگمنتوم شکمی در وابستگی به اپیوئیدها نقش دارند [۳۳]. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهند که انتقال گلوتاماتی با اثر بر گیرنده NMDA در هیپوکامپ ممکن است در پیشرفت وابستگی به اپیوئیدها موثر باشد. لذا ممکن است آنتاگونیست‌های گیرنده NMDA در درمان وابستگی به اپیوئیدها و جلوگیری از ایجاد علائم سندرم ترک موثر باشند. این داده‌ها مطالعات قبلی ما را نیز که نشان می‌دهد وابستگی خوراکی به مرفین باعث تشدید تقویت طولانی مدت در ناحیه CA1 هیپوکامپ [۳۶] و همچنین تقویت یادگیری و حافظه [۳۹] در موش‌های صحرایی که بر اثر افزایش فعالیت گیرنده‌های NMDA می‌باشد [۳۷] را تائید می‌کند.

سپاسگزاری

مقاله حاضر منتج از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد. نویسندگان مقاله همچنین از کمک و راهنمایی علمی آقای دکتر سیروس قبادی (گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه) نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

منابع

[1] Badawy AA, Evans CM, Evans M, Production of tolerance and physical dependence in the rat by simple administration of morphine in drinking water. ***Br J Pharmacol*** 75 (1982) 485-491.

[2] Bhargava HN, Reddy PL, Gudehithlu KP, Down-regulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors of brain regions and spinal cord of rats treated chronically with morphine. ***Gen Pharmacol*** 26 (1995) 131–136.

[3] Bliss TV, Collingridge GL, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. ***Nature*** 361 (1993) 31–39.

[4] Bristow LJ, Hogg JE, Hutson PH, Competitive and glycine/NMDA receptor antagonists attenuate withdrawal-induced behaviors and increased hippocampal acetylcholine efflux in morphine-dependent rats. ***Neuropharmacology*** 36 (1997) 241–250.

[5] Castellano C, Cestari V, Ciamei A, NMDA receptors and learning and memory processes. ***Curr Drug Targets*** 2 (2001) 273-283.

[6] Chavkin C, Henriksen SJ, Siggins GR, Bloom FE, Selective inactivation of opioid receptors in rat hippocampus demonstrates that dynorphine-A and -B may act on mu receptors in the CA1 region. ***Brain Res*** 331 (1985) 366–370.

[7] Chazot PL, Stephenson FA, Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. ***J Neurochem*** 69 (1997) 2138–2144.

[8] Classen W, Mondadori C, Facilitation or inhibition of memory by morphine: a question of experimental parameters. ***Experientia*** 40 (1984) 506-509.

[9] Collingridge GL, Singer W, Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. ***Trends Pharmacol Sci*** 11 (1990) 290–296.

[10] Deadwyler SA, Robinson JH, Effect of morphine on hippocampal cells recorded in vitro. ***Brain Res Bull*** 4 (1979) 609–613.

[11] Gonzalez P, Cabello P, Germany A, Norris B, Contreras E, Decrease of tolerance to, and physical dependence on morphine by, glutamate receptor antagonists. ***Eur J Pharmacol*** 332 (1997) 257–262.

[12] Inoue M, Mishina M, Ueda H, Locus-specific rescue of GluRepsilon1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. ***J Neurosci*** 23 (2003) 6529–6536.

[13] Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, Nakanishi S, Molecular characterization of the family of the N-methyl-d-aspartate receptor subunits. ***J Biol Chem*** 268 (1993) 2836-2843.

[14] Kato, H., Narita, M., Miyoshi, K., Narita, M., Asato, M., Hareyama, N., Nozaki, H., Takagi, T., Suzuki, M., Suzuki, T., Implication of Src family kinase-dependent phosphorylation of NR2B subunit-containing NMDA receptor in the rewarding effect of morphine. ***Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*** 26 (2006) 119-124.

[15] Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, Mishina M, Molecular diversity of the NMDA receptor channel. ***Nature*** 358 (1992) 36–41.

[16] Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature*** 227 (1970) 680-685

[17] Le Grevès P, Huang W, Zhou Q, Thörnwall M, Nyberg F, Acute effects of morphine on the expression of mRNAs for NMDA receptor subunits in the rat hippocampus, hypothalamus and spinal cord. ***Eur J Pharmacol*** 341 (1998) 161-164.

[18] Lim G, Wang S, Zeng Q, Sung B, Yang L, Mao J, Expression of spinal NMDA receptor and PKC gamma after chronic morphine is regulated by spinal glucocorticoid receptor. ***J Neurosci*** 25 (2005) 11145-11154.

[19] Lipton SA, Rosenberg PA, Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. ***N Engl J Med*** 330 (1994) 613–622.

[20] Ma YY, Chu NN, Guo CY, Han JS, Cui CL, NR2B-containing NMDA receptor is required for morphine-but not stress-induced reinstatement. ***Exp Neurol*** 203 (2007) 309-319.

[21] Ma YY, Guo CY, Yu P, Lee DY, Han JS, Cui CL, The role of NR2B containing NMDA receptor in place preference conditioned with morphine and natural reinforcers in rats. ***Exp Neurol*** 200 (2006) 343-355.

[22] Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA, Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission. ***Annu Rev Neurosci*** 14 (1991) 379–397.

[23] Maldonado R, Negus S, Koob GF, Precipitation of morphine Withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa selective opioid antagonists. ***Neuropharmacology*** 31 (1992) 1231–1241.

[24] McBain CJ, Mayer ML, N-methyl-d-aspartate acid receptor structure and function. ***Physiol Rev*** 74 (1994) 723–760.

[25] McNamara RK, Skelton RW, Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water maze. ***Pharmacol Biochem Behav*** 38 (1991) 651-658.

[26] McNamara RK, Skelton RW, Pharmacological dissociation between the spatial learning deficits produced by morphine and diazepam. ***Psychopharmacology (Berl)*** 108 (1992) 147-152.

[27] Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M, Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. ***Nature*** 357 (1992) 70–74.

[28] Meldrum B, Garthwaite J, Excitatory amino acid neurotoxicity and neurogenerative disease. ***Trends Pharmacol Sci*** 11 (1990) 379–387.

[29] Miyamoto Y, Yamada K, Nagai T, Mori H, Mishina M, Furukawa H, Noda Y, Nabeshima T, Behavioural adaptations to addictive drugs in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. ***Eur J Neurosci*** 19 (2004) 151–158.

[30] Monyer H, Burnashev N, Laurie D, Sakmann B, Seeberg PH, Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. ***Neuron*** 12 (1994) 529–540.

[31] Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeberg PH, Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional

distinction of subtypes. ***Science*** 256 (1992) 1217–1221.

[32] Mori H, Yamakura T, Masaki H, Mishina M, Involvement of the carboxyl-terminal region in modulation by TPA of the NMDA receptor channel. ***Neuroreport*** 4 (1993) 519–522.

[33] Murray F, Harrison NJ, Grimwood S, Bristow LJ, Hutson PH, Nucleus accumbens NMDA receptor subunit expression and function is enhanced in morphine-dependent rats. ***Eur J Pharmacol*** 562 (2007) 191-197.

[34] Narita M, Aoki T, Suzuki T, Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in the development of morphine-induced place preference. ***Neuroscience*** 101 (2000) 601-606.

[35] Noda Y, Nabeshima T, Opiate physical dependence and N-methyl-D-aspartate receptors. ***Eur J Pharmacol*** 500 (2004) 121-128.

[36] Pourmotabbed A, Motamedi F, Fathollahi Y, Mansouri FA, Semnanian S, Involvement of NMDA receptors and voltage- dependent calcium channels on augmentation of long-term potentiation in hippocampal CA1 area of morphine dependent rats. ***Brain Res*** 804 (1998) 125-134.

[37] Pourmotabbed A, Nedaei SE, Mehrabinasab E, Assessment of the role of NMDA receptors located in hippocampal CA1 area on the effects of oral morphine dependency on spatial learning and memory in rat. ***Physiol Pharmacol*** 10 (2006) 115-123.

[38] Pourmotabbed A, Rostamian B, Manouchehri G, Pirzadeh-Jahromi G, Sahraei H, Ghoshooni H, Zardooz H, Kamalnegad M, Effects of Papaver rhoeas extract on the expression and development of morphine-dependence in mice. ***J Ethnopharmacol*** 95 (2004) 431-435.

[39] Pourmotabbed A, Tahmasian M, Shahi M, Karami Darabkhani H., Fathollahi Y, Facilitating effects of morphine dependence on spatial learning and memory in rat. ***DARU*** 15 (2007) 156-161.

[40] Scheggi S, Mangiavacchi S, Masi F, Gambarana C, Tagliamonte A, De Montis MG, Dizocilpine infusion has a different effect in the development of morphine and cocaine sensitization: behavioral and neurochemical aspects. ***Neuroscience*** 109 (2002) 267-274.

[41] Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY, Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. ***Nature*** 368 (1994) 144–147.

[42] Shimoyama N, Shimoyama M, Davis AM, Monaghan DT, Inturrisi CE, An antisense oligonucleotide to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subunit NMDAR1 attenuates NMDA-induced nociception, hyperalgesia, and morphine tolerance. ***J Pharmacol Exp Ther*** 312 (2005) 834-840.

[43] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, Measurement of protein using bicinchoninic acid. ***Anal Biochem*** 150 (1985) 76-85.

[44] Standaert DG, Testa CM, Young AB, Penney JBJR, Organization of N-methyl-d-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. ***J Comp Neurol*** 343 (1994) 1–16.

[45] Stephenson FA, Subunit characterization of NMDA receptors. ***Curr Drug Targets*** 2 (2001) 233–239.

[46] Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Huganir RL, Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. ***Nature*** 364 (1993) 70–73.

[47] Towbin H, Staehelin T, Gordon J, Electerophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 76 (1979) 4350-4354.

[48] Trujillo KA, Are NMDA receptors involved in opiate-induced neural and behavioral plasticity? A review of preclinical studies. ***Psychopharmacology (Berl)*** 151 (2000) 121–141.

[49] Trujillo KA, Akil H, Inhibition of opiate tolerance by non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. ***Brain Res*** 633 (1994) 178–188.

[50] Ueda H, Anti-opioid systems in morphine tolerance and addiction—locus-specific involvement of nociceptin and the NMDA receptor. ***Novartis Found Symp*** 261 (2004) 155-162.

[51] Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M, Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. ***Neuroreport*** 3 (1992) 1138–1140.

[52] Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M, Distinct distributions of five N-methyl-d-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. ***J Comp Neurol*** 338 (1993) 377–390.

[53] Yamakura T, Shimoji K, Subunit- and Site-Specific Pharmacology of the NMDA Receptor Channel. ***Prog Neurobiol*** 59 (1999) 279–298.

[54] Yamazaki M, Mori H, Araki K, Mori KJ, Mishina M, Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. ***FEBS Lett*** 300 (1992) 39–45.

[55] Zhu H, Brodsky M, Gorman AL, Inturrisi CE, Region-specific changes in NMDA receptor mRNA induced by chronic morphine treatment are prevented by the co-administration of the competitive NMDA receptor antagonist LY274614. ***Brain Res Mol Brain Res*** 114 (2003) 154-162.

[56] Zhu H, Jang CG, Ma T, Oh S, Rockhold RW, Ho IK, Region specific expression of NMDA receptor NR1 subunit mRNA in hypothalamus and pons following chronic morphine treatment. ***Eur J Pharmacol*** 365 (1999) 47–54.