دخالت گیرنده‌های موسکارینی هیپوکامپ پشتی، بر اکتساب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی

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

هدف: هیپوکامپ از مراکز اصلی یادگیری وابسته به پاداش است. با توجه به توزیع وسیع گیرنده‌های موسکارینی در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی، احتمال می‌رود این گیرنده‌ها در یادگیری وابسته به پاداش نقش داشته باشند. در این تحقیق، اثر تحریک یا مهار گیرنده‌های موسکارینی هیپوکامپ پشتی بر پاداش ناشی از مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با استفاده از روش ترجیح مکان شرطی شده (CPP) بررسی شد. **روش:** این مطالعه به روش تجربی انجام شد. کلیه حیوانات مورد استفاده با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۴۰ گرم به وسیله دستگاه استرئوتاکس در ناحیه CA_1 هیپوکامپ پشتی به صورت دو طرفه کانول گذاری شدند. هر حیوان جراحی شده به مدت یک هفته دوران بهبود را قبل از CPP طی کرد. برای این کار از یک برنامه پنج روزه با سه مرحله مجزا استفاده شد، مرحله پیش شرطی سازی، مرحله شرطی سازی که سه روز به طول انجامید و مرحله آزمون یا بیان. **یافته‌ها:** تزریق زیرجلدی مقادیر مختلف سولفات مورفین با استفاده از شرطی سازی سه روزه) و روش Unbiased توانستCPP وابسته به مقدار ایجاد کند. تزریق داخل CA_1 مقادیر مختلف فیزوستیگمین (آنتی‌کولین استراز) و آتروپین (آنتاگونیست گیرنده موسکارینی) به طور معنی‌دار، CPP القا شده به وسیله مورفین را به ترتیب تقویت و مهار کردند. تزریق آتروپین به داخل ناحیه CA_1، تقویت القا شده به وسیله فیزوستگمین را در پاسخ به مورفین معکوس نمود. **نتیجه‌گیری:** تزریق‌های داخل CA_1 فیزوستگمین یا آتروپین، به تنهایی ترجیح یا تنفر مکانی مشخصی را القا نکردند. گیرنده‌های موسکارینی نواحی CA_1 هیپوکامپ پشتی، در پاداش ناشی از مورفین نقش مهمی بازی می‌کنند.

کلید واژه‌ها: اکتساب ترجیح مکان شرطی شده، گیرنده موسکارینی، یادگیری وابسته به پاداش، هیپوکامپ پشتی

مقدمه

شواهد متعدد نشان می‌دهند که تزریق مورفین (آگونیست گیرنده اپیوئیدی μ) به حیوانات آزمایشگاهی، می‌تواند به عنوان یک محرک پاداشی عمل کند و سبب القای ترجیح مکان شرطی شده[2] (CPP) شود (ناریتا[3]، فونادا[4] و سوزوکی[5]، ۲۰۰۱). پیشنهاد شده است که سیستم دوپامینی مزولیمبیک، که از ناحیه تگمنتوم شکمی[6] (VTA) شروع و به هسته آکومبنس (Nac) ارسال می‌شود، مهمترین جایگاه مغزی القا کننده پاداش اپیوئیدی است (کوب[7]،

2- Conditioned Place Preference
3- Narita
4- Funada
5- Suzuki
6- Ventral Tegmental Area
7- Koob

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

روبلدو[1]، مارکو[2] و کاین[3]، ۱۹۹۳). مطالعات قبلی ما نیز حاکی از آن است که جایگاه‌های دیگر مغزی مثل هیپوکامپ (کرمی، زرین‌دست، سپهری و صحرائی، ۲۰۰۲) و آمیگدال (زرین‌دست، کرمی، سپهری و صحرائی، ۲۰۰۲) نقش مهمی در القای پاداش ناشی از مورفین بازی می‌کنند.

تحقیقات نشان می‌دهند که هیپوکامپ در یادگیری و حافظه نقش اساسی دارد (اوریت[4] و رابینز[5]، ۱۹۹۷) و در یادگیری وابسته به پاداش نیز دخالت می‌کند. اهمیت این نقش به ویژه وقتی مشخص می‌شود که حیوان آزمایش شده باید مکان و علایم مرتبط شده با مصرف دارو را به یاد بیاورد (وایت[6]، ۱۹۹۶). همچنین گزارشی وجود دارد که هیپوکامپ نیز برای میانجیگری بیان یادگیری مکانی (کامپتون[7]، ۲۰۰۴) ضروری می‌باشد. برخی از مطالعات مشخص کرده‌اند که سیستم‌های نوروترانسمیتری متعدد در یادگیری و حافظه وابسته به هیپوکامپ دخالت دارند (هاسلمو[8] و باور[9]، ۱۹۹۳). همچنین نشان داده شده است که سیستم کولینرژیکی هیپوکامپ در مراحل شکل‌گیری حافظه (وارگا[10] و همکاران، ۲۰۰۳) نقش مهمی ایفا می‌کند و گیرنده‌های موسکارینی موجود در هیپوکامپ برای تشکیل یادگیری ارتباطی ضروری هستند (ون درزی[11]، بی‌امانز[12]، گرکما[13] و دان[14]، ۲۰۰۴). هیپوکامپ انواع ورودی‌های کولینرژیکی را از پیش‌مغز قاعده‌ای و سپتوم دریافت می‌کند که این برای عملکردهای عادی یادگیری و حافظه اهمیت دارد (فروسچر[15] و لرانت[16]، ۱۹۸۵).

آثار پاداشی مورفین می‌تواند به وسیله CPP ارزیابی شود (هرز، ۱۹۹۸). اگرچه واضح است که اثر مورفین در سطح VTA ایجاد می‌شود (اولمستد[17] و فرانکلین[18]، ۱۹۹۷)، ولی به نظر می‌رسد که دوپامین نیز تنها نوروترانسمیتر مسؤول القای پاداش اپیوئیدی نمی‌باشد (سوزوکی، تسودا[19]، فونادا و میساوا[20]، ۱۹۹۵). بر اساس نتایج مطالعات قبلی، سیستم‌های نوروترانسیمتری متعدد از جمله گلوتامات (برنز[21]، اوریت و رابینز، ۱۹۹۴)، استیل کولین (شیلدن[22]، هاستون[23]، شوارتینگ[24]، ۲۰۰۲)، گابا (زرین‌دست و همکاران، ۲۰۰۴)، هیستامین (سوزوکی، تاکاموری[25]، میساوا و اونودرا[26]، ۱۹۹۵) و نیتریک اکساید در ترجیح مکان القا شده به وسیله مورفین درگیرند. از آنجا که CPP یک الگوی یادگیری است (پیاپسون[27]، کیواستیک[28]، کاتاجامکی[29]، ژارکوفسکی[30] و آتی[31]، ۱۹۹۷) و گیرنده‌های موسکارینی کولینرژیک هیپوکامپ در تنظیم حافظه دخیل‌اند، در مطالعه حاضر آثار تزریق‌های داخل CA_1 آگونیست و آنتاگونیست گیرنده موسکارینی بر پاداش مورفین سنجیده شده است.

روش

در این پژوهش تجربی، از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی[32] نر نژاد ویستار[33] با میانگین وزنی ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. این حیوانات از انستیتو پاستور ایران تهیه و به صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری شدند و برای آنکه به محیط جدید عادت کنند حدود یک هفته قبل از شروع آزمایش، به حیوانخانه منتقل گردیدند. غذای آنان از کارخانه دام پارس به صورت آماده تهیه شد. محل نگهداری حیوانات دارای دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی ۷ صبح) و دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد بود و آزمایش‌ها در زمان معینی از روز انجام می‌گرفت. در هر گروه تجربی هشت حیوان وجود داشت و هر حیوان فقط یک‌بار آزمایش می‌شد.

دستگاه سه قسمتی ترجیح مکان شرطی‌شده از چوب و بر پایه طرح کار و وایت (۱۹۸۳) ساخته شده است. دو قسمت اصلی دستگاه یعنی A و B هم اندازه هستند، ولی دیواره‌های قسمت A سفید با نوارهای طولی مشکی به عرض دو سانتی‌متر به صورت راه‌راه است و یک کف توری مشبک دارد. قسمت B دارای دیواره‌های سیاه با نوارهای سفید افقی به عرض دو سانتی‌متر به

1- Robledo
2 - Markou
3- Caine
4 - Everitt
5- Robbins
6 - White
7- Compton
8 - Hasselmo
9- Bower
10 - Varga
11- Van der Zee
12 - Biemans
13- Gerkema
14 - Daan
15- Frotscher
16 - Leranth
17- Olmstead
18- Franklin
19- Tsuda
20 - Misawa
21- Burns
22 - Schildein
23- Huston
24 - Schwarting
25- Takamori
26 - Onodera
27- Piepponen
28 - Kivastik
29- Katajamaki
30 - Zharkovski
31- Ahtee
32- Rat
33- Wistar

صورت راه‌راه و یک کف چوبی صاف است. قسمت سوم (C) یک تونل قرمز رنگ است که درهای ورودی قسمت‌های A و B را به یکدیگر مرتبط می‌کند. دستگاه به وسیله یک درب گیوتینی به سه قسمت کاملاً مجزا تقسیم می‌شود.

طی آزمایش‌ها از این مواد استفاده شد: (۱) کتامین هیدروکلراید و زایلزین که به عنوان داروهای بی‌هوشی و به صورت درون صفاقی تزریق شدند، (۲) مورفین سولفات تهیه شده از شرکت تماد ایران که به صورت پودر سفید رنگ است و به علت حساسیت باید دور از نور نگهداری شود، (۳) فیزوستیگمین به عنوان آگونیست گیرنده‌های موسکارینی، (۴) آتروپین به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی.

قبل از انجام عمل جراحی برای کانول‌گذاری، حیوان وزن شد و سپس داروی بیهوشی مخلوط کتامین هیدروکلراید (۵۰mg/kg) و زایلزین (۴mg/kg) به صورت درون صفاقی با سرنگ انسولین به حیوان تزریق گردید. پس از بیهوشی کامل موهای سرحیوان قیچی و حیوان درون دستگاه استرئوتاکس قرار داده می‌شد. سپس به وسیله اسکالپل ضد عفونی شده، پوست روی جمجمه از ناحیه بین دو چشم تا انتهای استخوان پس سری به صورت طولی شکاف داده و پوست سر به وسیله گیره‌هایی به طرفین کشیده شد. بعد با پنبه آغشته به بتادین، محل شکاف ضدعفونی گردید و عضلات و بافت‌های پیوندی زیرین برداشته و استخوان با پنبه آغشته به الکل سفید تمیز شد تا محل برگما و لامبدا مشخص شود. برگما محل تقاطع درز تاجی و درز سهمی است. درز تاجی محل اتصال استخوان‌های پیشانی و آهیانه و درز سهمی شکاف بین استخوان‌های آهیانه می‌باشد. پس از تعیین نقاط برگما و لامبدا بر اساس اطلس، مختصات محل کانول‌گذاری برای ناحیهٔ CA_1 هیپوکامپ پشتی به این شرح مشخص گردید: از برگما ۳ تا ۳/۵ میلی‌متر = قدامی خلفی (AP)، از خط وسط ۱/۸± تا ۲± میلی‌متر = میانی – جانبی (ML) و ازسطح جمجمه ۳- تا ۲/۲- میلی‌متر = خلفی – شکمی (DV).

پس از تنظیم مختصات دستگاه در راستای قدامی – خلفی و نیز میانی – جانبی، محل ناحیه قاعده‌ای – جانبی CA_1 هیپوکامپ پشتی روی جمجمه با جوهر علامت‌گذاری و سپس به وسیله مته، دو سوراخ روی استخوان جمجمه تا پردهٔ مننژ ایجاد شد. دو سوراخ کم عمق دیگر هم در ناحیه دیگر جمجمه برای نصب پیچ‌های عینک ایجاد گردید. سپس با کمک دستگاه استرئوتاکس، کانول راهنما به طول ۱۰ میلی‌متر (تهیه شده از سر سوزن ۲۲ گیج) در درون سوراخ ایجادشده، یک میلیمتر بالاتر از ناحیه CA_1 قرار داده شد. آن‌گاه اطراف آن به وسیله آکریل دندانپزشکی که با محلول مونومر مخلوط شده، پوشانده شد. به این ترتیب کانول راهنما در محل مورد نظر با سفت شدن سیمان دندانپزشکی محکم گردید. برای اینکه مجرای کانول بسته نشود، با سیم فولادی ضد زنگ که به اندازه کانول بود تا زمان تزریق دارو مسدود گردید. بعد از پایان جراحی، جهت بهبود و از بین رفتن استرس جراحی یک هفته به حیوانات استراحت داده شد و بعد از پایان این مدت مورد آزمایش قرار گرفتند.

روش ترجیح مکان شرطی‌شده

اساس ترجیح مکان شرطی شده طرح غیرطرفدار می‌باشد که بر پایهٔ روش دفونسکا و همکاران (۱۹۹۵) پایه ریزی شده است. این روش شامل یک برنامه پنج روزه با سه فاز مشخص است: مرحله پیش از شرطی‌سازی، مرحله شرطی‌سازی و مرحله آزمون.

مرحله پیش از شرطی‌سازی:

این مرحله اولین روز دوره بود. در این روز دریچه‌های بین قسمت C و قسمت‌های A و B باز شد و هر حیوان ۱۵ دقیقه داخل دستگاه CPP قرار گرفت تا آزادانه در محیط گردش نماید و به منظور تخمین ترجیح، زمان توقف در هر خانه پیش از مراحل شرطی شدن اندازه‌گیری گردید. موقعیت حیوان به وسیله موقعیت سر و دست‌های جلویی تعیین می‌شد. موش‌ها به‌طور ذاتی در قسمت A، توری سیمی و در قسمت B رنگ سیاه را ترجیح می‌دهند. بنابراین قبل از تزریق مورفین، حیوانات هر دو قسمت را به یک اندازه ترجیح دادند و گرایش خاصی به هیچ‌یک از دو قسمت وجود نداشت.

مرحله شرطی سازی:

این مرحله یک روز بعد از مرحله پیش از شرطی سازی آغاز شد و شامل روزهای دوم، سوم و چهارم آزمایش بود. این مرحله از

شش نشست ۴۵ دقیقه‌ای تشکیل شده بود. (سه سالین و سه دارو) که در هر روز دو مرحله تزریق انجام می‌گرفت.

در صبح اولین روز این مرحله، حیوانات بلافاصله بعد از تزریق زیر جلدی مورفین سولفات، ۴۵ دقیقه در قسمت سفید دستگاه (A) قرار گ‌رفتند. بعد از شش ساعت، در عصر همان روز حیوانات به جای دارو، سالین دریافت کردند و ۴۵ دقیقه در قسمت سیاه دستگاه (B) قرار گرفتند. در طی مدت قرارگیری در هر قسمت، درب‌های گیوتینی بسته بودند. در صبح دومین روز با رعایت شرایط زمانی دیروز، حیوانات صبح سالین دریافت کرده، ۴۵ دقیقه در قسمت سیاه قرار داده شدند و عصر نیز دارو گرفتند، ۴۵ دقیقه در قسمت سفید محصور شدند. در سومین روز شرطی‌سازی،حیوانات مراحل تزریق را همانند روز اول طی کردند. برای مطالعه آثار آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های کولینرژیک، تزریق این عوامل به داخل CA_1 هیپوکامپ پنج دقیقه قبل از تزریق‌های زیرجلدی مورفین سولفات، در طی شرطی‌سازی صورت گرفت. دفونسکا و همکاران (۱۹۹۵) معتقدند که این نوع شرطی‌سازی دو نوبته صبح و عصر برای جلوگیری از تغییرات دوره شبانه روزی در بدن موش‌های بزرگ آزمایشگاهی مفید می‌باشد.

برای تزریق دارو به داخل ناحیهٔ CA_1 هیپوکامپ، از یک کانول تزریق که به وسیله لوله پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون دو میکرولیتری متصل شده بود، استفاده گردید. هنگام تزریق، ابتدا سیم فولادی داخل کانول راهنما بیرون آورده شد و کانول تزریق به آرامی درون کانول راهنما قرار گرفت. به هر یک از کانول‌ها، ظرف مدت یک دقیقه، ۰/۵ میکرولیتر دارو تزریق شد. پس از گذشت یک دقیقه از تزریق، کانول تزریق خارج و سیم فولادی جایگزین گردید.

مرحله پس از شرطی‌سازی (مرحله آزمون):

در روز پنجم دوره، مانند روز اول دریچه باز شد و موش‌ها در قسمت C قرار داده شدند و به آنها اجازه داده شد که ۱۵ دقیقه آزادانه هر سه قسمت را جست‌وجو کنند. هر حیوان فقط یک‌بار آزمایش می‌گردید. زمان سپری شده در قسمت دریافت مورفین و دارو برای هر حیوان ثبت شد. برای حیواناتی که مورفین و دارو را در قسمت A دریافت کرده بودند، اختلاف بین زمان سپری شده در قسمت A در روز آزمون و روز پیش از شرطی‌سازی، و برای حیواناتی که در قسمت B مورفین و دارو دریافت کرده بودند، اختلاف بین زمان سپری شده در قسمت B در روز آزمون و روز پیش از شرطی‌سازی محاسبه گردید. این متغیر به عنوان شاخص ترجیح مکانی ناشی از دارو مورد استفاده قرار گرفت.

در طی مرحلهٔ آزمون (CPP) فعالیت حرکتی نیز مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور در کف هر یک از قسمت‌های A و B دو خط عمود بر هم به شکل بعلاوه (+) کشیده شد، طوری که چهار مربع مساوی به وجود آمد. هربار که حیوان در یکی از مربع‌ها قرار می‌گرفت، به عنوان یک فعالیت حرکتی برایش ثبت می‌شد. در پایان آزمون، تمامی تعداد دفعاتی که حیوان در مربع‌های هر دو قسمت A و B قرار گرفته بود، محاسبه و به عنوان نمادی از فعالیت حرکتی در نظر گرفته شد.

مراحل آزمایش‌ها

۱- آزمایش اول (منحنی دوز- پاسخ برای CPP مورفین). برای به دست آوردن منحنی دوز - پاسخ مقادیر مختلف مورفین (۰/۵، ۱، ۳ و ۶ mg/kg) به صورت تزریق زیرجلدی استفاده شد. چهار گروه از حیوانات در مرحله شرطی‌سازی به تناوب مورفین و سالین زیرجلدی دریافت کردند. گروه دیگری نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که به آنها در کل مرحله شرطی‌سازی فقط سالین تزریق گردید. فعالیت حرکتی نیز در مرحله آزمون سنجیده شد.

۲- آزمایش دوم (آثار فیزوستیگمین، آگونیست گیرنده موسکارینی با یا بدون مورفین بر اکتساب CPP). اثر فیزوستیگمین بر اکتساب CPP، در طی مرحله شرطی‌سازی، به سه گروه از حیوانات ابتدا به صورت درون هیپوکامپی فیزوستیگمین (۲، ۴ و ۸ µg/rat) و بلافاصله بعد از آن به صورت زیرجلدی سالین (1ml/kg) تزریق شد. بنابراین بدون حضور مورفین توانایی القای CPP به وسیله آگونیست گیرنده موسکارینی مورد ارزیابی قرار گرفت. اما گروه کنترل در طی مرحله شرطی‌سازی ابتدا یک تزریق درون هیپوکامپی سالین (۱ µl/rat) و بلافاصله بعد از آن تزریق زیرجلدی سالین (۱ ml/kg) دریافت کرد. همه گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، آزمایش شدند و در طی مرحله آزمون فعالیت

حرکتی آنها اندازه‌گیری شد.

برای ارزیابی اثر فیزوستیگمین بر اکتساب CPP مورفین، چهار گروه از حیوانات در طی مرحله شرطی‌سازی، به صورت درون هیپوکامپی سالین (۱ µl/rat) یا فیزوستیگمین (۲، ۴ و ۸ µl/rat) را بلافاصله پیش از مورفین زیرجلدی (۰/۵ mg/kg) دریافت کردند. تمامی حیوانات ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، بدون هیچ‌گونه تزریقی در هنگام آزمون آزمایش شدند و در طی مرحله آزمون فعالیت حرکتی آنها نیز سنجیده شد.

۳- آزمایش سوم آثار آتروپین، آنتاگونیست گیرنده موسکارینی با و یا بدون مورفین بر اکتساب CPP. برای بررسی اثر آتروپین بر اکتساب CPP، توانایی تزریق درون هیپوکامپی آتروپین (۱، ۴ و ۷ µl/rat) در القای CPP، تحت یک مرحله شرطی‌سازی سه روزه در سه گروه از حیوانات آزمایش شد. یک گروه دیگر سالین درون هیپوکامپی (۱ µl/rat) همراه با سالین زیر جلدی (۱ ml/kg) را در طی مرحله شرطی‌سازی دریافت کرد و به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. در همه گروه‌ها، در طی مرحله شرطی‌سازی فعالیت حرکتی نیز سنجیده شد.

برای بررسی اثر آتروپین بر اکتساب CPP مورفین، چهار گروه از حیوانات مقادیر مختلف درون هیپوکامپی آتروپین (۱، ۴ و ۷ µl/rat) یا سالین (۱ µl/rat) را بلافاصله قبل از تزریق زیر جلدی مورفین سالین (۶ mg/kg) در طی مرحله شرطی‌سازی دریافت کردند. همه حیوانات ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق شرطی‌سازی، بدون هیچ تزریقی در روز آزمون آزمایش شدند و در طی این مرحله فعالیت حرکتی آنها اندازه‌گیری شد.

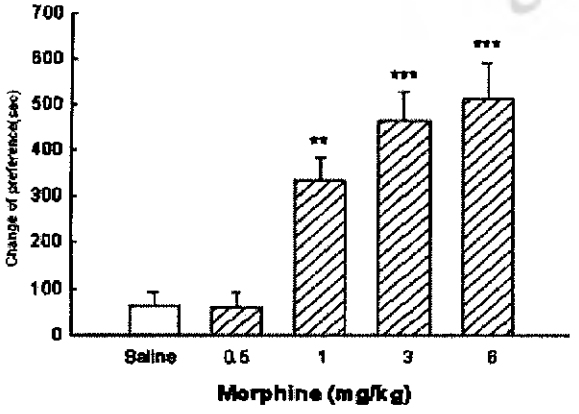
۴- آزمایش چهارم (آثار آتروپین بر واکنش فیزوستیگمین در طی CPP مورفین). هشت گروه از حیوانات یک تزریق داخل هیپوکامپی سالین (۱ µl/rat) یا آنتاگونیست گیرنده موسکارینی، آتروپین دریافت کردند و پس از پنج دقیقه به درون ناحیه CA_1 هیپوکامپ آنها سالین (۱ µl/rat) یا مقادیر مختلف فیزوستیگمین (۲، ۴ و ۸ µg/rat) تزریق شد. در نهایت کلیه حیوانات در طی مرحله شرطی‌سازی فوراً به صورت زیرجلدی مورفین (۰/۵ mg/kg) یا سالین (۱ ml/kg) دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، حیوانات در مرحله آزمون قرار گرفتند و فعالیت حرکتی آنها نیز ارزیابی شد.

آنالیزهای آماری

در آزمایش‌های انجام شده به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش، از روش آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و دوطرفه و به دنبال آن از آزمون آماری مکمل توکی استفاده و اختلاف با $p<0/05$ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای محاسبات آماری از نرم‌افزارهای کامپیوتری SPSS و INSTAT استفاده شد.

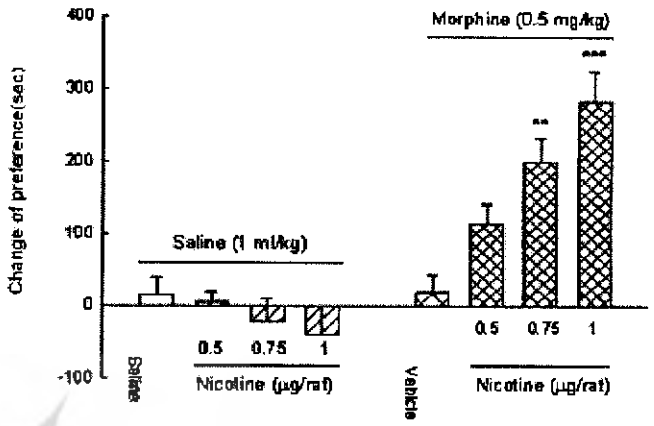
یافته‌ها

۱- آزمایش اول (منحنی دوز پاسخ برای CPP مورفین). شکل CPP1 تولید شده به وسیله تزریق زیرجلدی مقادیر مختلف مورفین را در حیواناتی که ناحیهٔ CA_1 هیپوکامپ پشتی آنها کانول‌گذاری شده است، نشان می‌دهد. آزمون آماری ANOVA یک طرفه نشان می‌دهد که تزریق زیرجلدی مورفین سبب القای CPP وابسته به دوز نسبت به گروه کنترل (سالین) شده است ($p<0/0001$، $F(4و35)=18/1$). CPP معنی‌داری در مقادیر ۱، ۳ و ۶ mg/kg به دست آمد. ماکزیمم واکنش با مقدار ۶ mg/kg مورفین بود.

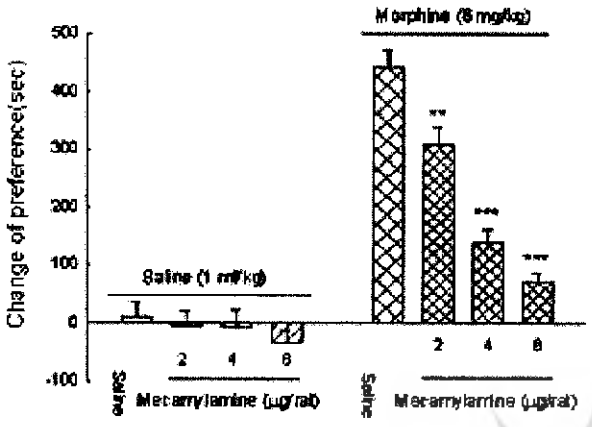


شکل ۱ - ترجیح مکان شرطی شده (CPP) ناشی از مورفین. تغییر ترجیح[1] بر اساس تفاضل زمان سپری شده در ناحیه دارو، در روز پیش از شرطی‌سازی و روز پس از شرطی‌سازی بر حسب ثانیه محاسبه شد. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار در هر گروه شامل هشت حیوان بیان شده است.

1- change of preference



شکل ۲- اثرات تزریق دوطرفه فیزوستیگمین به داخل ناحیه CA_1 هیپوکامپ پشتی با یا بدون مورفین بر اکتساب ترجیح مکان شرطی شده. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار در هر گروه متشکل از هشت حیوان بیان شده است.



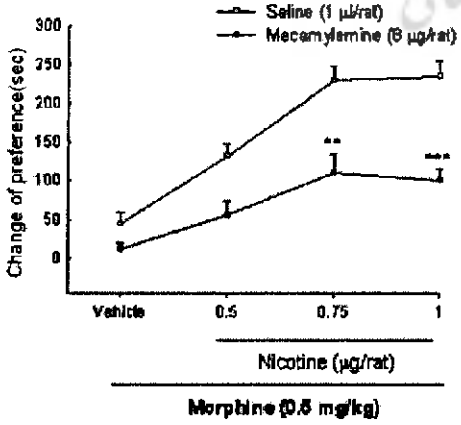
شکل ۳- اثرات تزریق دو طرفه آتروپین به داخل ناحیهٔ CA_1 هیپوکامپ پشتی به تنهایی یا همراه مورفین بر اکتساب ترجیح مکان شرطی شده. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار از میانگین (SEM) در هر گروه متشکل از هشت حیوان بیان شده است.

۲- آزمایش دوم (اثرات فیزوستیگمین با یا بدون مورفین بر اکتساب *CPP*). شکل ۲ تأثیر تزریق دو طرفه مقادیر مختلف فیزوستیگمین یا سالین را به درون ناحیهٔ CA_1 در غیاب یا حضور مورفین بر اکتساب CPP نشان می‌دهد. آزمون آماری ANOVA دو طرفه وجود تداخل معنی‌داری بین فیزوستیگمین و مورفین در اکتساب CPP را نشان داد: مقایسه داخل گروهی: اثر تیمار: $p<0/0001$، $F(3 \text{ و } 56)=89/4$؛ اثر مقدار: $p<0/01$، $F(3 \text{ و } 56)=4/5$؛ تداخل تیمار × مقدار: $p<0/01$، $F(3 \text{ و } 56)=5/9$.

علاوه بر این، آزمون آماری ANOVA یکطرفه نشان داد که تزریق درون هیپوکامپی مقادیر مختلف فیزوستیگمین یا دوز پایین‌تر مورفین به تنهایی قادر به ترجیح یا تنفر مکانی شرطی شده نمی‌باشد. مصرف فیزوستیگمین اکتساب CPP به وسیله مورفین را نیز تقویت می‌کند.

۳- آزمایش سوم (اثرات آتروپین با یا بدون مورفین بر اکتساب *CPP*). شکل ۳ تأثیر تزریق دو طرفه درون هیپوکامپی مقادیر مختلف آتروپین یا سالین را در غیاب یا حضور مورفین بر اکتساب CPP نشان می‌دهد. آزمون آماری ANOVA دوطرفه وجود تداخل معنی‌داری بین مورفین و آتروپین را در اکتساب CPP نشان داد: مقایسه داخل گروهی: اثر تیمار: $p<0/0001$، $F(1 \text{ و } 56)=172/9$؛ اثر مقدار: $p<0/001$، $F(3 \text{ و } 56)=11/9$؛ تداخل تیمار× مقدار: $p<0/0001$، $F(3 \text{ و } 56)=7/3$.

علاوه بر این، آزمون آماری ANOVA یکطرفه نشان داد که تزریق درون هیپوکامپی مقادیر مختلف آتروپین به تنهایی قادر به القای ترجیح یا تنفر مکان شرطی شده نمی‌باشد. همچنین مصرف آتروپین همراه با مورفین توانست CPP القا شده به وسیله مورفین را در یک روش وابسته به مقدار مهار نماید.



شکل ۴- اثرات تزریق دوطرفه سالین و آتروپین، قبل از تزریق فیزوستیگمین به داخل ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی همراه با مورفین بر اکتساب ترجیح مکان شرطی شده. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار، در هر گروه متشکل از هشت حیوان بیان شده است.

۴- آزمایش چهارم (اثر آتروپین بر تقویت القا شده به وسیله فیزوستیگمین در طی CPP مورفین). شکل ۴ اثرات تزریق درون هیپوکامپی آتروپین را روی ترجیح مکان القا شده به وسیله مورفین در ترکیب با فیزوستیگمین نشان می‌دهد. ANOVA دوطرفه مشخص کرد که آتروپین اثر فیزوستیگمین روی پاسخ مورفین را کاهش داد: مقایسه داخل گروهی: اثر تیمار: $p<0/0001$، $F(3$ و $56)=36/1$؛ اثر مقدار: $p<0/0001$، $F(3$ و $56)=19/0$ ؛ تداخل تیمار × مقدار : $p<0/01$، $F(3$ و $56)=4/4$.

نتایج نشان داد که آتروپین پاسخ القا شده به وسیله فیزوستیگمین به علاوه مورفین را مسدود می‌کند.

بحث

در تحقیق حاضر، تیمارهای شرطی‌سازی با مورفین به صورت وابسته به مقدار، توانست CPP معنی‌داری را در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ایجاد نماید. مشاهده شد که بیشترین اثر به وسیلهٔ مورفین (۶ mg/kg) به دست می‌آید. این یافته‌ها از مطالعات قبلی حمایت و اثبات می‌کند که اثرات پاداشی آگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی می‌تواند به محرک‌های محیطی شرطی شود. به عبارتی، آثار دارو با محرک‌های محیطی جفت می‌شود (شیپنبرگ[1]، هیدبردر[2] و لفوو[3]، ۱۹۹۶). از آنجا که اپیوئیدها آزاد شدن دوپامین را در نواحی مختلف مغز تنظیم می‌کنند (گوچی[4]، آجید[5]، گلووینسکی[6] و چرامی[7]، ۱۹۷۳)، احتمالاً این پدیده در شلیک عصبی نورون‌های دوپامینی در VTA و متعاقب آن افزایش دوپامین در نوکلئوس آکومبنس و سایر نواحی دخالت دارد (کوب، ۱۹۹۲). به هر حال شواهد زیادی وجود دارد که مشخص می‌کند، مکانیسم‌های غیر دوپامینی هم می‌تواند در پاداش مورفین دخالت داشته باشد (کالیواس[8] و استوارت[9]، ۱۹۹۱).

برخی مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت گیرنده‌های موسکارینی، تقویتی و پاداشی هستند (لسی[10]، کالابرسی[11] و نورس[12]، ۱۹۹۰). افزایش انتقال عصبی کولینرژیک در هیپوکامپ از طریق گیرنده‌های موسکارینی، حافظه و یادگیری را بهبود می‌بخشد.

همچنین مطالعات نشان می‌دهند که یادگیری برای توسعه پاداش اوپیاتی مهم است (لو[13]، زنگ[14]، لیو[15] و سنگ[16]، ۲۰۰۰) و سبب القای حروف بزرگ CPP می‌شود (بنینگر[17] و میلر[18]، ۱۹۹۸). بنابراین تحریک و مهار گیرنده‌های کولینرژیک در ناحیه CA_1 هیپوکامپ احتمالاً می‌تواند بیان و کسب ترجیح مکان شرطی شده مورفین را تغییر دهد.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در طی کسب CPP، تزریق‌های دوطرفه فیزوستیگمین (مهار کننده آنزیم کولین‌استراز) در نواحی CA_1، ترجیح مکان القا شده به وسیله مورفین (۰/۵ mg/kg) را تقویت می‌کند و اندازه و سرعت یادگیری را بهبود می‌بخشد. در این راستا سایر تحقیقات نشان می‌دهد که سیستم کولینرژیکی هیپوکامپ برای فعالیت‌های هیجانی و شناختی مرتبط با هیپوکامپ ضروری است (آلویسی[19]، ۱۹۹۷).

تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که سطوح استیل‌کولین هیپوکامپی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی و موش‌های سوری بلافاصله بعد از جست‌وجوی مکانی، در آزمون‌های ماز شعاعی هشت بازویی (تومن[20]، دورکین[21]، ماریقتو[22]، گالی[23] و جفارد[24]، ۱۹۸۸)، فضای باز و فشار دادن پدال برای کسب پاداش غذایی از حد پایه بیشتر می‌شود.

شواهد بسیاری بیان می‌کند که بین اپیوئیدها و سیستم کولینرژیک ارتباط مؤثری وجود دارد (شریف[25] و الکادی[26]، ۱۹۹۶). تزریق ترکیبی مورفین و فیزوستیگمین باعث آثار ضد درد قوی و مشخص می‌شود. لذا به نظر می‌رسد ترکیب فیزوستیگمین با مقدار کمتر مورفین می‌تواند یادگیری را افزایش دهد و CPP تقویت‌یافته‌ای را ایجاد کند. باسیل و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند که آثار پاداشی مورفین که در CPP اندازه‌گیری می‌شود، در موش‌های فاقد گیرنده‌های M_5 موسکارینی، کاهش می‌یابد. به

1- Shippenberg
2 - Heidberder
3- Lefevour
4 - Gauchy
5- Agid
6 - Glowinski
7- Cheramy
8 - Kalivas
9- Stewart
10 - Lacy
11- Calabresi
12 - North
13- Lu
14 - Zeng
15- Liu
16 - Ceng
17- Beninger
18 - Miller
19- Aloisi
20- Toumane
21- Durkin
22 - Marighetto
23- Galey
24 - Jaffard
25- Sharif
26 - el-Kadi

احتمال قوی، آثار پاداشی فیزوستیگمین در ترکیب با مورفین از طریق مکانیسم‌های گیرنده موسکارینی القا می‌گردد. مهار گیرنده‌های موسکارینی ناحیه CA_1 هیپوکامپ پشتی توسط آتروپین، از ترجیح مکان القا شده به وسیله مورفین (۶ mg/kg) ممانعت می‌کند که به‌نظر می‌رسد این اثر با کاهش یادگیری وابسته به پاداش القا می‌شود. تزریق سیستمیک یا مرکزی داروهای آنتی‌کولینرژیک (مانند آتروپین) و نیز ضایعات سیستم کولینرژیک باعث نقص در حافظه می‌شود، در حالی‌که داروهایی که فعالیت کولینرژیک را افزایش می‌دهند، حافظه را بهبود می‌بخشند (بوسیا[1]، بلک[2]، اکوستا[3] و براتی[4]، ۲۰۰۳). مطالعات قبلی مشخص کرده است که تزریق‌های آتروپین به داخل VTA پاداش تحریکی مغز را مهار می‌کند (یئومنز[5] و باپتیستا[6]، ۱۹۹۷). همچنین پژوهش حاضر نشان داد که تزریق آتروپین (۷ µg/rat) به داخل CA_1 پاسخ فیزوستیگمین را معکوس می‌کند و بنابراین اثر فیزوستیگمین احتمالاً از طریق گیرنده‌های موسکارینی میانجیگری می‌شود.

در مطالعه حاضر نشان دادیم که تزریق‌های داخل CA_1 داروها با مقادیری که در آزمایش‌های ما استفاده شده است، نتوانست فعالیت حرکتی را (در مقایسه با گروه‌های کنترل)، در طی فاز آزمون تغییر دهد. این مطلب نشان دهنده آن است که نتایج تحت تأثیر هیچ‌گونه تغییر فعالیت حرکتی قرار نگرفته است (لو و همکاران، ۲۰۰۲).

از سوی دیگر، نتایج مؤید آن است که تزریق داخل CA_1 فیزوستیگمین و آتروپین به تنهایی ترجیح یا تنفر مکانی مشخصی را القا نکرده و بر فعالیت‌های حرکتی حیوانات هم تأثیری نداشته است. سایر مطالعات نشان می‌دهد که هیپوکامپ به تنهایی در مکانیسم‌های پاداشی دخالت ندارد (رضایوف، زرین‌دست، صحرائی و حائری روحانی، ۲۰۰۳) و به نظر می‌رسد احتمالاً گیرنده‌های موسکارینی نیز به تنهایی در نواحی CA_1 هیپوکامپ در شروع واکنش‌های پاداشی دخالت ندارند، ولی می‌توانند با CPP مورفین به علت دخالتشان در یادگیری وابسته به پاداش مرتبط شوند.

برخی تحقیقات نشان داده‌اند که فعالیت گیرنده‌های موسکارینی در هیپوکامپ، القای تقویت دراز مدت[7] LTP را تسهیل می‌کند. علاوه بر آن، آتروپین القای LTP ارتباطی را کاهش می‌دهد. همچنین اثبات شده است که یادگیری و حافظه نقش مهمی در توسعه پاداش اپیاتی بازی می‌کنند (وایت، ۱۹۹۶).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر و مطالعات سایر محققان می‌توان چنین نتیجه گرفت که تزریق‌های داخل CA_1 آگونیست‌ها یا آنتاگونیست‌های گیرنده‌های موسکارینی کولینرژیکی به ترتیب یادگیری و حافظه را تسهیل یا مهار می‌کنند و بنابراین قادرند ترجیح مکان القا شده به وسیله مورفین را به ترتیب ایجاد یا مهار نمایند. احتمالاً هیپوکامپ برای ترکیب محرک‌های محیطی و پاسخ‌های داخلی تولید شده مورد نیاز است (وایت و مک‌دونالد[8]، ۲۰۰۲) و تحقیقات نشان داده است که هیپوکامپ پشتی شرطی‌سازی زمینه را هم در شرطی‌سازی ترس (آناگنوستراس[9]، گال[10] و فانسلو[11]، ۲۰۰۱) و هم در شرطی‌سازی مکانی (فربینتو[12] و مک‌دونالد، ۲۰۰۱) میانجیگری می‌کند. بر این اساس، نتایج حاضر نشان می‌دهند که تحریک گیرنده‌های موسکارینی می‌توانند با یادگیری زمینه‌ای CPP تداخل کند. تحقیقات نشان داده‌اند که تزریق مورفین مستقیماً به داخل هیپوکامپ می‌توانند CPP را القا کند (کوریگال[13] و لینسمن[14]، ۱۹۸۸).

در نتیجه می‌توان چنین پیشنهاد کرد که تزریق عوامل کولینرژیک به داخل نواحی CA_1 هیپوکامپ می‌توانند هم با خواص پاداشی مورفین و هم با خواص حافظه‌ای که در اثر CPP ایجاد می‌شود، تداخل داشته باشد.

برای بررسی‌های آینده، ارزیابی بررسی نقش گیرنده‌های موسکارینی کولینرژیکی سایر نواحی مرتبط با سیستم پاداش مغز (مانند سپتوم میانی، هیپوتسالاموس و لوکوس سرولئوس) و برهم‌کنش بین سیستم‌های دوپامینرژیک و کولینرژیک هیپوکامپ در وابستگی روانی به مورفین، و نیز ارزیابی نقش سیستم کولینرژیک در ناحیه تگمنتوم شکمی، هسته آکومبنس، هیپوکامپ و آمیگدال در القای تحمل و افزایش حساسیت به مورفین با استفاده

1- Boccia
2 - Blake
3- Acosta
4 - Baratti
5- Yeomans
6 - Baptista
7- Long Term Potentiation
8- McDonald
9- Anagnostaras
10- Gale
11- Fanselow
12- Ferbinteanu
13- Corrigall
14- Linseman

از روش ترجیح مکان شرطی‌شده در موش بزرگ آزمایشگاهی، پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

از زحمات فراوان مسئولان آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران بی‌نهایت تشکر می‌کنیم.

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۷/۲۳؛ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۱۰/۲۲

منابع

Aloisi, A. M. (1997). Sex differences in pain-induced effects on the septo hippocampal system. *Brain Research, 25* (3), 397-406.

Anagnostaras, S. G., Gale. G. D., & Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus, 11*, 8-17.

Beninger, R. J., & Miller, R. (1998). Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 22 (2),* 335-345.

Boccia, M. M., Blake, M. G., Acosta, G. B., & Baratti, C. M. (2003). Atropine, an anticholinergic drug, impairs memory retrieval of a high on solidated avoidance response in mice. *Neuroscencei Letters, 345* (2), 97-100.

Burns, L. H., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1994). Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 impairs acquisition but not performance of discriminated approach to an appetitive CS. *Behavioral and Neural Bioliology, 61*, 242-250.

Compton, D. M. (2004). Behavior strategy learning in rat: Effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behavioural Processes, 67*, 335-342.

Corrigall, W. A., & Linseman, A. M. (1988). Conditioned place preference produced by intra-hippocampal morphin. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 30*, 787-789.

Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1997). Cedntral cholinergic systems and cognition. *Annual Review of Psychology, 48*, 649-684.

Ferbinteanu, J., & McDonald, R. J. (2001). Dorsal/ventral hippocampus, fornix, and conditioned place preference. *Hippocampus, 11* (2), 187-200.

Frotscher, M., & Leranth, C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytoehemistry: A combined light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology, 239* (2), 237-246.

Gauchy, C., Agid, Y., Glowinski, J., & Cheramy, A. (1973). Acute effects of morphine on dopamine synthesis and release and tyrosine metabolism in the rat striatum. *European Journal of Pharmacology, 22* (3), 311-319.

Hasselmo, M. E., & Bower, J. M. (1993). Acetylcholine and memory. *Trends in Neurosciences, 16*, 218-222.

Herz , A. (1998). Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 76* (3), 252-258.

Inglis, F. M., & Fibiger, H. C. (1995). Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience, 66* (1), 81-87.

Kalivas, P. W., & Stewart, J. (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug – and stress – induced sensitization of motor activity. *Brain Research, 16*, 223-244.

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

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

Koob, G. F., Robledo, P., Markou, A., & Caine, B. (1993). The mesocorticolimbic circuit in drug dependence and reward - A role for the extended amygdala. In Kalivas, P. W, & Barnes, C. D. (eds.). *Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry*, (pp 289-305). Boca Raton: CRC Press.

Lacy, M. G., Calabresi, P., & North, R. A. (1990). Muscarine depolarizes rat substantia nigra zona compacta and ventral tegmental neurons in vitro through M1-like receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 253* (1), 395-400.

Lisman, J. E., & Grace, A. A. (2005). The hippocampal - VTA loop : Controlling the entry of information into long – term memory. *Neuron, 46* (5), 703-713.

Lu, L., Xu, N. J., Ge, X., Yue, W., Su, W. J. & Pei, G. (2002). Reactivation of morphine conditioned place preference by drug priming: Role of environmental cues and sensitization. *Psychopharmacology, 159* (2), 125-132.

Lu, L., Zeng, S., Liu, D., & Ceng, X. (2000). Inhibition of the amygdala and hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II attenuates the dependence and relapse to morphine differently in rats. *Neuroscience Letters, 291* (3), 191-195.

Narita, M., Funada, M., & Suzuki, T. (2001). Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacology & Therepeutics, 89* (2), 1-15.

Olmstead, M. C., & Franklin, B. J. (1997). The devlopment of a conditioned place preference to morphine: Effects of microinjections into various CNS sites. *Behavioral Neuroscience, 111*, 1324-1334.

Piepponen, T. P., Kivastik, T., Katajamaki, J., Zharkovsky, A., & Ahtee, L. (1997). Involvement of opioid mu 1 receptors in morphine – induced conditioned place preference in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 58* (1), 275-279.

Rezayof, A., Zarrindast, M. R., Sharaei, H., & Haeri – Rohani, A. (2003). Involvment of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine – induced place preference in rats. *Journal of Psychopharmacology, 17* (4), 415-423.

Schildein, S., Huston, J. P., & Schwarting, P. K. (2002). Open field habituation learning is improved by nicotine and attenuated by mecamylamine administered posttrial into the nucleus accumbens. *Neurobiology of Learning and Memory, 77* (3), 277-290.

Sharif, S. I., & el-Kadi, A. O. (1996). The role of cholinergic systems in the expression of morphine withdrawal. *Neuroscience Research, 25* (2), 155-160.

Shippenberg, T. S., Heidberder, C. H., & Lefevour, A. (1996). Sensitization to the conditioning effect of morphine: Pharmacology and temporal characteristics. *European Journal of Pharmacology, 299 (1-3)*, 33-39.

Suzuki, T., Takamori, K., Misawa, M., & Onodera, K. (1995). Effects of the histaminergic system in the morphine-induced conditioned place preference in mice. *Brain Research, 675* (1-2), 195-202.

Suzuki, T., Tsuda, M., Funada, M., & Misawa, M. (1995). Blockade of morphine-induced place preference by diazepam in mice. *European Journal of Pharmacology, 280* (3), 327-330.

Toumane, A., Durkin, T., Marighetto, A., Galey, D., & Jaffard, R. (1988). Differential hippocampal and cortical cholinergic activation during the acquisition, retention, reversal and extinction of a spatial discrimination in an 8-arm radial maze bymice. *Behavioural Brain Research, 30* (3), 225-234.

Van der Zee, E. A., Biemans, B. A., Gerkema, M. P., & Daan, S. (2004). Habituation to a test apparatus during associative learning is sufficient to enhance muscarinic acetylcholine receptor – immunoreactivity in rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience Research, 78* (4), 508-19.

Varga, C., Hartig, W., Grosche, J., Keijser, J., Luiten, P. G., Seeger, J., Brauer, K., & Harkany, T. (2003). Rabbit forebrain cholinergic system: Morphological characterization of nuclei and distribution of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus. *Journal of Comparative neurology, 460* (4), 597-611.

White, N. M. (1996). Addictive drugs as reinforcers: Multiple partial actions on memory systems. *Addiction, 91* (7), 921-49.

White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning & Memory, 77*, 125-184.

Yeomans, J., & Baptista M. (1997). Both nicotinic and muscarinic receptors in ventral tegmental area contribute to brain-stimulation reward. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 57* (4), 915-921.

Zarrindast, M. R., Ahamdi, S., Haeri-Rohani, A., Rezayof, A., Jafari, M. R., & Jafari-Sabet, M. (2004). GABA(A) receptors in the basolateral amygdala are involved in mediating morphine reward. *Brain Research, 1006* (1), 49-58.

Zarrindast, M. R., Karami, M., Sepehri, H., & Sahraei, H. (2002). Influence of nitric oxide on morphine-induced conditioned place preference in the rat central amygdala. *European Journal of Pharmacology, 453* (1), 81-9.