

## Research Paper

# The Effect of Memantine on the Expression of Dopamine Receptors in the Striatum of Male Rats With Morphine Addiction



Sahar Khalili Samani<sup>1</sup>, Solmaz Khalifeh<sup>2</sup>, Mehdi Vahiddastjerdi<sup>3</sup>, Mandana Hassanzad<sup>4,5</sup>, Afshin Kheradmand<sup>6</sup>,  
\*Farzaneh Nazari Serenjah<sup>7</sup>

1. Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Department of Neurology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Medical Genomics Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
5. Personalized Medicine Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
6. Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
7. Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.



**Citation** Khalili Samani S, Khalifeh S, Vahiddastjerdi M, Hassanzad M, Kheradmand A, Nazari Serenjah F. [The Effect of Memantine on the Expression of Dopamine Receptors in the Striatum of Male Rats With Morphine Addiction (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2023; 17:E1340.3. <https://doi.org/10.32598/qums.17.1340.3>

<https://doi.org/10.32598/qums.17.1340.3>



Received: 14 Feb 2023

Accepted: 21 Jun 2023

Available Online: 01 Aug 2023

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** Studies have indicated that the chronic use of morphine can result in physical and psychological dependence. Morphine dependence is associated with several cellular and molecular alterations in the mesocorticolimbic system, and striatal dopamine signaling is involved in this process. In the present study, we aim to investigate possible alterations in the level of dopamine receptors DRD2 and DRD4 in the striatum of male rats following chronic oral administration of morphine and assess the effect of subcutaneous injection of memantine on morphine-induced effects.

**Methods** In this experimental study, 16 male Wistar rats were randomly divided into four groups: Control, morphine, memantine, and morphine+memantine. The morphine group received increasing doses of morphine (0.1-0.4 mg/kg) via their drinking water for 21 consecutive days. The memantine groups, after receiving distilled water without morphine for 21 days, received a subcutaneous injection of 5 mg memantine. The morphine memantine group received 5 mg of memantine subcutaneously on day 21 and 30 minutes after the last oral administration of morphine. After collecting striatum tissue, dopamine receptor levels were evaluated by the western blotting method.

**Results** The chronic use of morphine increased the levels of DRD2 and DRD4 compared to the controls. Memantine administration also increased the level of these receptors compared to the controls. In addition, the expression of DRD2 and DRD4 increased in the morphine+ memantine group compared to the memantine group.

**Conclusion** Morphine affects the expression of dopamine receptors in the striatum. Treatment with memantine can increase dopamine receptors' expression.

### Keywords:

Morphine, Dopamine receptors, Striatum, Memantine, Rats

### \* Corresponding Author:

Farzaneh Nazari Serenjah, PhD.

Address: Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

Tel: +98 (916) 6636958

E-Mail: [nazari.f@pnu.ac.ir](mailto:nazari.f@pnu.ac.ir), [Nazari\\_farzaneh@yahoo.com](mailto:Nazari_farzaneh@yahoo.com)



## Extended Abstract

### Introduction

**S**tudies have indicated that chronic use of morphine can result in physical and psychological dependency. Physiological changes may also occur due to molecular modifications in receptors and transcription factors, resulting from the repeated use of morphine. Previous studies showed that the mesocorticolimbic system and striatal dopamine signaling are involved in the rewarding effect of morphine. Dopamine exerts its physiological effects by interacting with G protein-coupled receptors, which have two main subtypes: D1-like dopamine receptors (DRD1-DRD5) and D2-like dopamine receptors (DRD2, DRD3, DRD4). An alteration in dopamine activity after chronic morphine treatment has been shown. The interaction between dopamine receptors and morphine plays a crucial role in tolerance, dependence, and withdrawal syndrome. Previous studies have shown that striatal dopamine receptors are involved in morphine-induced plasticity. Memantine, as a non-competitive moderate-affinity N-methyl-D-aspartate receptor antagonist (NMDA), is used in the treatment of neurological disorders. It may have a beneficial effect on the reward effect of morphine and reduce the symptoms of morphine withdrawal and relapse. Moreover, the interaction between the dopaminergic receptors and memantine has been previously studied. However, the effect of memantine on dopamine receptor protein expression in the striatum during morphine dependency has not been investigated. In the present study, we aim to investigate the possible changes in the DRD2 and DRD4 protein levels in the striatum of rats following chronic oral administration of morphine and assess the effect of subcutaneous injection of memantine on morphine-induced effect.

### Methods

In this experimental study, 16 male Wistar rats weighing 230–250 grams were used. They were randomly divided into four groups: control, morphine, memantine, and morphine + memantine. The morphine group received increasing doses of morphine (0.1-0.4 mg/kg) via their drinking water for 21 consecutive days. The memantine groups, after receiving distilled water without morphine for 21 days, received subcutaneous injection of 5 mg memantine. On day 21 and 30 minutes after the last oral administration of morphine, the morphine + memantine group received 5 mg of memantine subcutaneously. After completing the experimental sessions, animals were killed after decapitation, their striatum tissue was collect-

ed, and dopamine receptor protein levels were evaluated by western blotting assay. We used ImageJ software to quantify the density of the blots. The data were presented as Mean±SEM and statistical analysis was performed by one-way analyses of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

### Results

The results showed that the chronic use of morphine significantly increased the level of DRD2 in striatum of morphine group compared to the control group. Also, one-way ANOVA results indicated that the DRD4 level increased in the morphine group compared to the control group. Also, the levels of DRD2 and DRD4 significantly increased in the memantine group compared to the control group. In addition, the levels of DRD2 and DRD4 increased in the morphine+memantine group compared to the memantine and control groups.

### Conclusion

Changes in the expression of striatal D2-like receptors, as well as a significant decrease in mRNA levels of D2-like receptors and neuropeptides in the output pathways of the striatum under the morphine treatment, have been reported previously. Also, imaging studies have shown that the level of striatal D2-like receptors and dopamine release are significantly lower in those with substance abuse. The functional interaction between memantine and morphine in the modulation of morphine reward has been demonstrated. Based on the findings of the present study, memantine can alter the effect of morphine on the expression of DRD2 and DRD4. Considering the effects of dopamine signalling in drug addiction, memantine can probably be considered as a drug to reduce or even reverse the effects of morphine in the nervous system.

### Ethical Considerations

#### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of [Islamic Azad University, Tehran Medical Branch](#) (Code: IR.IAU.PS.REC.1401.074).

#### Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors

#### **Authors contributions**

The authors contributed equally to preparing the manuscript.

#### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## مقاله پژوهشی

## بررسی اثر ممانتین بر سطح پروتئین گیرنده‌های دوپامینی ناحیه استریاتوم در موش‌های نر معنادار شده به مورفین

سحر خلیلی سامانی<sup>۱</sup>، سولماز خلیفه<sup>۲</sup>، مهدی وحید دستجردی<sup>۳</sup>، ماندانا حسن‌زاد<sup>۴</sup>، افشین خردمند<sup>۵</sup>، فرزانه نظری سرنجه<sup>۶</sup>

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۴. مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۵. مرکز تحقیقات پزشکی فردمحور، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران.
۶. گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۷. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.



**Citation** Khalili Samani S, Khalifeh S, Vahiddastjerdi M, Hassanzad M, Kheradmand A, Nazari Serenjah F. [The Effect of Menthane on the Expression of Dopamine Receptors in the Striatum of Male Rats With Morphine Addiction (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J*. 2023; 17:E1340.3. <https://doi.org/10.32598/qums.17.1340.3>

<https://doi.org/10.32598/qums.17.1340.3>

## چکیده

**زمینه و هدف:** مطالعات نشان می‌دهد مصرف مزمن مورفین سبب وابستگی فیزیکی و روانی می‌شود. وابستگی به مورفین با تغییرات سلولی و مولکولی متعددی در سیستم مژوکورتیکولیمبیک مرتبط است و سیگنالینگ دوپامین در ناحیه استریاتوم در این فرایند نقش دارد. در مطالعه حاضر تغییرات احتمالی در سطح پروتئین گیرنده‌های دوپامینی DRD4 و DRD2 ناحیه استریاتوم به دنبال تجویز مزمن مورفین و اثر تزریق زیرجلدی ممانتین بر سطح پروتئین این گیرنده‌ها بررسی شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۱۶ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر به‌طور تصادفی به ۴ گروه (کنترل، مورفین، ممانتین و مورفین/ممانتین) تقسیم شدند. حیوانات به‌مدت ۲۱ روز در مواجهه با مقادیر افزایشی مورفین (۰/۱-۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) قرار گرفتند. در روز بیست‌ویکم و ۳۰ دقیقه پس از دریافت مورفین، ۵ میلی‌گرم ممانتین به‌صورت زیرجلدی به حیوانات تزریق شد. پس از استخراج ناحیه استریاتوم، سطح پروتئین گیرنده‌های دوپامینی با استفاده از روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد مورفین باعث افزایش سطح پروتئین گیرنده‌های DRD4 و DRD2 می‌شود و تجویز ممانتین نیز اثر افزایشی بر سطح پروتئین این گیرنده‌ها نسبت به گروه کنترل دارد. سطح پروتئین گیرنده‌های دوپامینی در گروه مورفین/ممانتین نیز در مقایسه با گروهی که فقط ممانتین دریافت کرده بودند، افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** مورفین سطح پروتئین گیرنده‌های دوپامینی در ناحیه استریاتوم را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تیمار با ممانتین سطح بیان این پروتئین‌ها را افزایش می‌دهد.

تاریخ دریافت: ۲۵ بهمن ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۳۱ خرداد ۱۴۰۲

تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۲

## کلیدواژه‌ها:

مورفین، گیرنده‌های دوپامینی، وابستگی، استریاتوم، ممانتین، موش آزمایشگاهی

## \* نویسنده مسئول:

دکتر فرزانه نظری سرنجه

نشانی: تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۶۶۳۶۹۵۸ (۹۱۶) ۹۸+

رایانامه: nazari.f@pnu.ac.ir, Nazari\_farzaneh@yahoo.com



Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

مورفین را مهار می‌کند و علائم سندرم ترک و بازگشت به مصرف مجدد مواد را کاهش می‌دهد [۱۲]. از طرفی برهم‌کنش میان سیستم دوپامینرژیک و ممانتین در مطالعات قبلی تأیید شده است [۱۳].

بالین‌حال، اثر ممانتین بر بیان پروتئین گیرنده‌های دوپامینی در ناحیه استریاتوم در اعتیاد بررسی نشده است؛ بنابراین در مطالعه حاضر، تغییر سطح پروتئین گیرنده‌های D2 و D4 در ناحیه استریاتوم در موش‌هایی که به مدت ۲۱ روز در معرض مورفین قرار گرفته بودند و اثر ممانتین در تغییر آن بررسی شد.

## روش بررسی

### حیوانات

این مطالعه تجربی بر روی موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۳۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شده است. تعداد ۱۶ سر موش آزمایشگاهی بالغ از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و تحت شرایط استاندارد با درجه حرارت  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. مطالعات براساس دستورالعمل و ضوابط کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی آزاد انجام شد.

### گروه‌های آزمایشی

تعداد ۱۶ سر موش بزرگ آزمایشگاهی به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۴ تایی تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل: حیوانات دست‌نخورده با دسترسی آزاد به آب و غذا

۲. گروه مورفین: این گروه مورفین خوراکی را با مقادیر مختلف طبق چنین الگویی همراه با ساکارز ۲ درصد به مدت ۲۱ روز، شامل روز اول و دوم ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، روز سوم و چهارم ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم، روز پنجم و ششم ۰/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و روز هفتم تا بیست‌ویکم ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند.

۳. گروه ممانتین: این گروه پس از دریافت ۲۱ روز آب مقطر بدون مورفین، ممانتین را به‌صورت زیرجلدی (S.C) در حجم ۵ میلی‌گرم دریافت کردند.

۴. گروه ممانتین+مورفین: این گروه در روز بیست‌ویکم و ۳۰ دقیقه پس از دریافت آخرین دُز خوراکی مورفین، ممانتین را به‌صورت زیرجلدی (S.C) در حجم ۵ میلی‌گرم دریافت کردند. گروه ممانتین+مورفین، ممانتین را به‌صورت زیرجلدی و مورفین را به‌صورت خوراکی دریافت کردند.

بین داروهای اپیوئیدی، مورفین یکی از مؤثرترین داروها برای درمان دردهای شدید حاد و مزمن است [۱]. بالین‌حال، استفاده مکرر و طولانی‌مدت از مورفین سبب وابستگی فیزیکی و روانی می‌شود و در صورت قطع مصرف ناگهانی منجر به بروز سندرم ترک و بازگشت به مصرف مجدد مورفین می‌شود. مطالعه بر روی سازوکارهای دخیل در وابستگی و سندرم ترک مورفین نشان داده است سازوکارهای بیوشیمیایی متعددی که ناشی از تغییرات آزاد شدن نوروترانسمیترها، بیان گیرنده‌ها و بیان پیامبرهای ثانویه در سطح رونویسی ژن‌ها و سنتز پروتئین‌هاست، در این فرایند نقش دارند [۲].

دوپامین یکی از مهم‌ترین نوروترانسمیترهای سیستم عصبی است که در اثرات پاداشی و اعتیادآور مواد اپیوئیدی و به‌ویژه مورفین نقش دارد [۳]. دوپامین اثرات فیزیولوژیک خود را از طریق فعال کردن گیرنده‌های مختلف دوپامینی که از اعضای خانواده‌های گیرنده‌های جفت‌شونده با پروتئین G هستند، اعمال می‌کند. این گیرنده‌ها براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و دارویی به خانواده شبه D1 (شامل DRD1 و DRD5) و شبه D2 (شامل DRD2، DRD3 و DRD4) تقسیم می‌شوند [۳].

مطالعات نشان می‌دهد که نقص در سیگنالینگ گیرنده‌های دوپامینی در نتیجه مصرف مکرر مورفین، در وابستگی به مورفین تأثیر می‌گذارد. در این راستا نشان داده شده است اعتیاد با کاهش میزان دوپامین آزادشده و تغییر در سطح بیان ژنی و سیگنالینگ گیرنده‌های دوپامینی و به‌ویژه DRD2 و DRD4 مرتبط است [۴].

۵. به‌علاوه، برهم‌کنش این گیرنده‌ها با گیرنده‌های مورفین در تحمل، وابستگی و سندرم ترک مورفین نقش دارند [۶، ۷].

ناحیه استریاتوم یکی از نواحی حساس به اثرات ناشی از مصرف مورفین است [۸]. برهم‌کنش میان مورفین و سیستم دوپامینرژیک در این ناحیه تأیید شده است. در این راستا نشان داده شده است مصرف مزمن مورفین سبب اختلال تنظیمی در ورودی‌های دوپامینی این ناحیه می‌شود [۹]. به‌علاوه، مصرف مزمن مورفین بیان ژنی گیرنده‌های D2 را در این ناحیه کاهش می‌دهد [۱۰]. مطالعات نشان می‌دهد گیرنده‌های D4 در پلاستیسیته ناشی از مورفین در ناحیه استریاتوم نقش تنظیمی دارند [۴]. از سویی، تحریک گیرنده‌های D4 با تغییرات ناشی از مورفین در سیگنالینگ گیرنده‌های اپیوئیدی در استریوزوم پوتامن مقابله می‌کند [۱۱].

راهکارهای متعددی برای غلبه بر وابستگی به مورفین بررسی شده است. یکی از این روش‌ها، استفاده از آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA گلوتامات است. ممانتین یک آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده‌های NMDA با میل ترکیبی پایین است و در درمان اختلالات عصبی استفاده می‌شود. ممانتین اثرات پاداشی

بررسی تغییر میزان سطح پروتئین DRD4 نیز نشان داد سطح پروتئین DRD4 در ناحیه استریاتوم گروه آزمایش شده با مورفین ( $P < 0/001$ )، ممانتین ( $P < 0/05$ ) و همچنین گروه ممانتین+مورفین ( $P < 0/001$ ) در مقایسه با گروه کنترل افزایش بیان داشته است. ( $P < 0/001$ ) سطح پروتئین DRD4 در گروه مورفین در مقایسه با گروه ممانتین+مورفین ( $P < 0/05$ ) و در گروه ممانتین در مقایسه با گروه ممانتین+مورفین کاهش بیان را نشان داده است ( $P < 0/001$ ) (تصویر شماره ۲).

## بحث

علاوه بر مشاوره و درمان‌های رفتاری، درمان با کمک دارو یکی از روش‌های درمان اعتیاد و اختلالات ناشی از سوء مصرف مواد مانند مورفین است [۱۶]. بیشتر داروهای استفاده شده مانند متادون یا بوپرنورفین بر درمان بر پایه گیرنده‌های اوبیوئیدی عمل می‌کنند [۱۷] و سبب کاهش علائم ترک و تمایل به بازگشت در افراد می‌شوند. با وجود پیشرفت در درمان با کمک دارو، میزان بازگشت به مصرف مواد حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد تخمین زده می‌شود؛ بنابراین مطالعه برای یافتن ترکیبات مؤثرتر برای درمان اعتیاد و اختلالات ناشی از سوء مصرف مواد، یکی از موضوعات مهم تحقیقات در حوزه اعتیاد است.

یکی از اثرات مصرف مزمن مورفین، تغییر انعطاف‌پذیری ساختاری و عملکردی در نواحی مغزی مرتبط با پاداش است [۱۸]. ناحیه استریاتوم پشتی در ولع مصرف و بازگشت به مصرف مواد، شکل‌گیری عادات مرتبط با مواد و در نتیجه تداوم و تثبیت اعتیاد نقش دارد [۱۹]. مصرف مزمن مورفین ساختار سیناپسی، پروتئین‌های پیش‌سیناپسی و در نتیجه انتقال سیناپسی در استریاتوم را تغییر می‌دهد [۲۰]. به علاوه، مورفین باعث کوچک شدن محور دندریتیک و تحلیل خارهای دندریتیک در استریاتوم پشتی می‌شود [۴].

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد مصرف مزمن مورفین سطح پروتئین گیرنده‌های D2 و D4 را در استریاتوم افزایش می‌دهد. در مقایسه با مطالعات قبلی، بین تغییر سطوح پروتئین و mRNA گیرنده‌های دوپامینی در ناحیه استریاتوم اختلاف وجود دارد. مطالعات پیشین کاهش تعداد گیرنده‌های D2 در استریاتوم [۲۱] و همچنین کاهش قابل توجه در سطح mRNA گیرنده‌های D2 و نوروپپتیدها در دو مسیر خروجی استریاتوم، یعنی نورون‌های استریاتوپالیدال و استریاتونیگرال را گزارش کرده‌اند [۱۰]. به علاوه، مطالعات تصویربرداری نیز کاهش گیرنده‌های D2 و ترشح دوپامین در ناحیه استریاتوم را در افراد معتاد تأیید می‌کند. با این حال، برخی مطالعات اخیر نشان می‌دهد در زیرگروهی از افراد معتاد، این مارکر عصبی زیستی، یعنی (D2) بیان نمی‌شود [۵].

در روز بیست و یکم و ۶ ساعت پس از تزریق ممانتین [۱۴] سر حیوانات با استفاده از دستگاه گیوتین قطع و بافت مغز به سرعت استخراج و نواحی استریاتوم آن جدا شد و برای انجام آزمایشات بعدی به نیتروژن مایع منتقل و سپس در فریزر ۸۰- نگهداری شد.

## وسترن بلات

برای به دست آوردن عصاره سلولی، بافت مغز توسط بافر لیزکننده لیز شد [۱۵]. بدین منظور، درون ویال‌های مخصوص به اندازه ۴ برابر وزن نمونه‌های مغز، بافر لیزکننده ریخته و هموزن شد. بافت هموزن شده سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۰۰۰ در دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع شفاف رویی که حاوی پروتئین‌هاست، جدا شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- نگهداری شد. قبل از انجام وسترن بلات، غلظت پروتئین‌ها توسط دستگاه پیکودراپ اندازه‌گیری شد.

پس از این مرحله، مقدار برابر از پروتئین‌ها روی ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز شد. سپس پروتئین‌های جداسازی شده به غشایی از جنس پلی وینیلیدن فلوراید<sup>۱</sup> منتقل شد. میزان پروتئین‌های مطالعه شده توسط آنتی‌بادی اختصاصی شناسایی شد. سپس غشاها در معرض آنتی‌بادی ثانویه قرار گرفت. برای فرایند آشکارسازی از کیت الکتروکمی لومینسانس استفاده شد و باندها روی فیلم رادیولوژی ظاهر شدند. از آنتی‌بادی بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

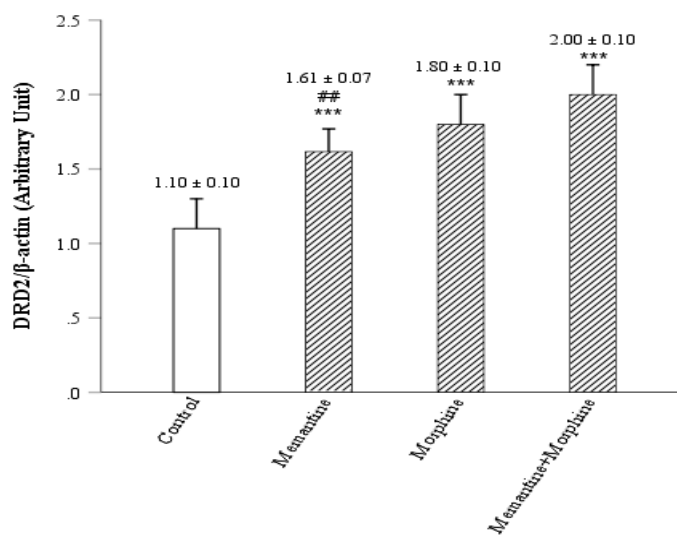
## تحلیل باندها

از نرم‌افزار ImageJ برای تحلیل و دانسیتومتری تصاویر وسترن بلات و باندهای پروتئینی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS، برای مقایسه بین گروه‌ها از آنوای یک‌طرفه<sup>۲</sup> و برای تحلیل واریانس‌ها از تست تعقیبی توکی<sup>۳</sup> استفاده شد. تمام نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شده و  $P < 0/05$  به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است.

## یافته‌ها

داده‌های حاصله از نتایج وسترن بلات و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد سطح پروتئین DRD2 در ناحیه استریاتوم گروه دریافت کننده مورفین، ممانتین و نیز گروه ممانتین+مورفین در مقایسه با گروه کنترل افزایش بیان داشته است ( $P < 0/001$ ). سطح پروتئین DRD2 در گروه ممانتین+مورفین در مقایسه با ممانتین افزایش بیان را نشان داده است ( $P < 0/01$ ) (تصویر شماره ۱).

1. Polyvinylidene Fluoride (PVDF)
2. One-way ANNOVA
3. Tukey



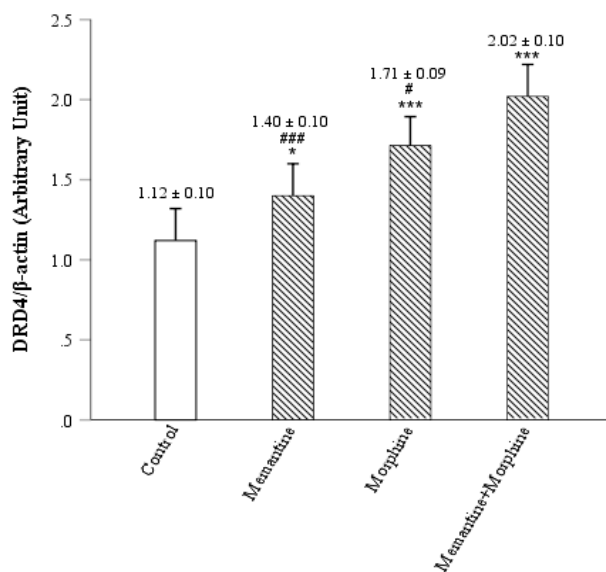
تصویر ۱. تغییر سطح پروتئین DRD2 در بافت استریاتوم هر ستون معرف میانگین و انحراف معیار است.  $P < 0.001$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.01$  ## در مقایسه با گروه ممانتین+مورفین

#### اثر می‌گذارد [۲۳، ۲۲].

هم‌پوشانی و هم‌گرایی میان سیستم گلوتاماترژیک و دوپامینرژیک در مغز امکان برهم‌کنش میان گیرنده‌های این سیستم‌ها را فراهم می‌کند. نشان داده شده است تزریق آنتاگونیست رقابتی گیرنده‌های NMDA<sup>f</sup> به درون قشر پیش‌پیشانی سبب افزایش سطح mRNA گیرنده‌های D2 در

در مطالعات یو و همکاران [۲۳، ۲۲] گزارش شده است مصرف مورفین روی سطوح mRNA و پروتئین گیرنده کاپای اوپیوئیدی در سیستم مزوکورتیکولیمبیک، اثراتی مشابه با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر دارد. این عدم هماهنگی چندین علت دارد [۲۳، ۲۲]. اگرچه پروتئین‌ها از روی mRNA سنتز می‌شوند، ارتباط بین mRNA و پروتئین همیشه خطی نیست، زیرا سازوکارهای مختلف تنظیم سنتز و تجزیه که روی mRNA و پروتئین اثر می‌گذارند، بر مقدار این دو مولکول به طور متفاوت

#### 4. N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors



تصویر ۲. تغییر سطح پروتئین DRD4 در بافت استریاتوم رت نر. هر ستون معرف میانگین و انحراف معیار است.  $P < 0.001$  \*\*\*،  $P < 0.05$  \*،  $P < 0.001$  ### در مقایسه با گروه کنترل،  $P < 0.05$  #،  $P < 0.001$  ### در مقایسه با گروه ممانتین+مورفین

استریاتوم در اعتیاد، تاکنون اثر ممانتین بر تغییرات سطح پروتئین این گیرنده‌ها در اعتیاد ارزیابی نشده است.

نتایج به دست آمده نشان داد که تزریق ممانتین به تنهایی سبب افزایش سطح پروتئین گیرنده‌های DRD2 و DRD4 در ناحیه استریاتوم در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین تزریق ممانتین در حیواناتی که به مدت ۲۱ روز تحت آزمایش با مورفین قرار داشتند (گروه ممانتین/مورفین)، در مقایسه با گروه مورفین یا ممانتین به تنهایی، سطح پروتئین DRD2 و DRD4 را افزایش می‌دهد. مطالعات قبلی نشان داده است ممانتین قادر است بیان پروتئینی در کورتکس و هیپوکمپ را تغییر دهد [۳۳].

همچنین تراکم گیرنده‌های D2 در استریاتوم و نیز پاسخ رفتاری به آگونیست گیرنده‌های D2 در حیوانات آزمایش شده با آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA افزایش می‌یابد [۳۴]. به علاوه، ممانتین یک اثر آگونیستی قوی بر گیرنده‌های D2 در استریاتوم دارد [۱۳]. مطالعات همسو با نتایج به دست آمده نیز نشان داده است ممانتین اثرات اتانول بر بیان گیرنده‌های گلوتاماتی در هیپوکمپ را تغییر می‌دهد [۳۴]. این نتایج نشان می‌دهد تغییر سطح پروتئین گیرنده‌های دوپامینی استریاتوم در میانجیگری اثرات ممانتین نقش دارند.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد مصرف مزمن و درازمدت مورفین سبب افزایش سطح پروتئین‌های گیرنده‌های دوپامینی DRD2 و DRD4 در ناحیه استریاتوم می‌شود. باتوجه به مسیرهای سیگنالینگ مختلفی که توسط این گیرنده‌ها فعال می‌شود، این افزایش بیان ممکن است بر انتقال سیناپسی و انتقال دوپامین و بر سیستم پاداش مغز تأثیر گذار باشد.

داروی ممانتین که می‌تواند باعث بهبود فعالیت‌های مغزی شود نیز در افزایش بیان این دو گیرنده اثر گذار است. بنابراین می‌توان گفت ممانتین احتمالاً می‌تواند به عنوان یک دارو برای کاهش یا حتی معکوس کردن اثرات مورفین در سیستم عصبی مورد توجه قرار گیرد.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه دارای مصوبه کمیته اخلاق دانشکده داروسازی و علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران با کد IR.IAU.PS.REC.1401.074 است.

#### حامی مالی

این پژوهش هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

استریاتوم می‌شود [۲۴]. ورما و همکاران گزارش کردند تزریق آگونیست D2DR می‌تواند توانایی MK-801، آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA را در کاهش پیشرفت تحمل به مورفین افزایش دهد [۲۵].

ممانتین یک آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده‌های NMDA است و اثر درمانی آن در اعتیاد به مورفین و اختلالات ناشی از آن در مطالعات پیش‌بالینی و بالینی متعددی بررسی شده است. در مطالعات پیش‌بالینی، قبل از ایجاد وابستگی به مواد اویپوئیدی، ممانتین به عنوان پیش‌درمانی به صورت مزمن یا حاد تجویز شد. در پیش‌درمانی حاد، تزریق تک دُز ممانتین ۳۰ دقیقه قبل از مورفین سبب کاهش مصرف مورفین در طول مصرف خودسرانه [۲۶] و کاهش اثرات محرک مورفین در موش‌هایی که ۲/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین دریافت کرده‌اند، می‌شود [۲۷]. ممانتین در دُزهای پایین‌تر (۰/۲ تا ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) شرطی شدن ناشی از مورفین را کاهش می‌دهد [۲۸]. در طول ترک نیز تجویز ممانتین ۴۸ ساعت پس از آخرین تجویز مورفین، رفتارهای پرخاشگرانه ناشی از ترک را در موش‌های آزمایشگاهی کاهش می‌دهد [۲۹].

در مطالعات بالینی نیز نشان داده شده است ممانتین به طور قابل توجهی مصرف مواد اویپوئیدی را کاهش و میزان بازگشت را پس از درمان با بوپرنورفین کاهش می‌دهد [۳۰]. سازوکار اثر ممانتین در کاهش وابستگی به اعتیاد در مطالعات قبلی بررسی شده است. باید توجه داشت که ممانتین در دُزهای بالاتر (۷/۵ تا ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ زیرجلدی) به عنوان آنتاگونیست گیرنده NMDA عمل می‌کند [۳۱]؛ بنابراین به عنوان یک مهارکننده تحمل ناشی از مورفین، وابستگی فیزیکی و اثرات جست‌وجوی مواد در مدل‌های حیوانی در نظر گرفته می‌شود [۳۲].

ممانتین در دُزهای پایین (۰/۲ تا ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم زیرجلدی) اثر مسدودکننده NMDA را ندارد و اثر نوروتروفیک و محافظت‌کننده عصبی نشان می‌دهد. در این راستا نشان داده شده است مصرف مزمن مورفین باعث افزایش سطوح IL-1 $\beta$  و IL-6 در سرم می‌شود. همچنین سطوح mRNA سیتوکین‌های IL-1 $\beta$  و IL-1 $\beta$  در نواحی مغزی مرتبط با اعتیاد به مواد مخدر مانند هسته اکومبئس و (Medial Prefrontal Cortex) mPFC افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد التهاب عصبی در اعتیاد اویپوئیدی نقش دارد. همچنین کاهش سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF) به دنبال مصرف مزمن مورفین، در سیستم عصبی محیطی و سرم گزارش شده است. این اثرات التهابی مورفین و کاهش سطح BDNF توسط پیش‌درمانی با دُز پایین ممانتین مهار می‌شود [۳۰].

با وجود اثرات مثبت ممانتین در کاهش اثرات رفتاری اعتیاد به مورفین و همچنین نقش مهم گیرنده‌های D2 و D4 ناحیه





### مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، آنالیز و تفسیر داده‌ها و نگارش پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

## References

- [1] Corder G, Castro DC, Bruchas MR, Scherrer G. Endogenous and exogenous opioids in pain. *Annu Rev Neurosci.* 2018; 41:453-73. [DOI:10.1146/annurev-neuro-080317-061522] [PMID] [PMCID]
- [2] Listos J, Łupina M, Talarek S, Mazur A, Orzelska-Górka J, Kotlińska J. The mechanisms involved in morphine addiction: An overview. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(17):4302. [DOI:10.3390/ijms20174302] [PMID]
- [3] Wise RA, Robble MA. Dopamine and addiction. *Annu Rev Psychol.* 2020; 71:79-106. [DOI:10.1146/annurev-psych-010418-103337] [PMID]
- [4] Rivera A, Suárez-Boomgaard D, Miguez C, Valderrama-Carvajal A, Baufreton J, Shumilov K, et al. Dopamine D4 receptor is a regulator of morphine-induced plasticity in the rat dorsal striatum. *Cells.* 2021; 11(1):31. [DOI:10.3390/cells11010031] [PMID]
- [5] Trifilieff P, Martinez D. Imaging addiction: D2 receptors and dopamine signaling in the striatum as biomarkers for impulsivity. *Neuropharmacology.* 2014; 76 Pt B(0):498-509. [DOI:10.1016/j.neuropharm.2013.06.031] [PMID]
- [6] Funada M, Shippenberg TS. Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the expression of morphine withdrawal signs in rats. *Behav Pharmacol.* 1996; 7(5):448-53. [PMID]
- [7] Dai WL, Xiong F, Yan B, Cao ZY, Liu WT, Liu JH, et al. Blockade of neuronal dopamine D2 receptor attenuates morphine tolerance in mice spinal cord. *Sci Rep.* 2016; 6:38746. [DOI:10.1038/srep38746] [PMID] [PMCID]
- [8] Liu J, Nickolenko J, Sharp FR. Morphine induces c-fos and junB in striatum and nucleus accumbens via D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(18):8537-41. [DOI:10.1073/pnas.91.18.8537] [PMID]
- [9] Rivera A, Gago B, Suárez-Boomgaard D, Yoshitake T, Roales-Buján R, Valderrama-Carvajal A, et al. Dopamine D4 receptor stimulation prevents nigrostriatal dopamine pathway activation by morphine: Relevance for drug addiction. *Addict Biol.* 2017; 22(5):1232-45. [DOI:10.1111/adb.12407] [PMID]
- [10] Georges F, Stinus L, Bloch B, Le Moine C. Chronic morphine exposure and spontaneous withdrawal are associated with modifications of dopamine receptor and neuropeptide gene expression in the rat striatum. *Eur J Neurosci.* 1999; 11(2):481-90. [DOI:10.1046/j.1460-9568.1999.00462.x] [PMID]
- [11] Suárez-Boomgaard D, Gago B, Valderrama-Carvajal A, Roales-Buján R, Van Craenenbroeck K, Duchou J, et al. Dopamine D<sub>4</sub> receptor counteracts morphine-induced changes in  $\mu$  opioid receptor signaling in the striosomes of the rat caudate putamen. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(1):1481-98. [DOI:10.3390/ijms15011481] [PMID]
- [12] Elias AM, Pepin MJ, Brown JN. Adjunctive memantine for opioid use disorder treatment: A systematic review. *J Subst Abuse Treat.* 2019; 107:38-43. [DOI:10.1016/j.jsat.2019.10.003] [PMID]
- [13] Seeman P, Caruso C, Lasaga M. Memantine agonist action at dopamine D2High receptors. *Synapse.* 2008; 62(2):149-53. [DOI:10.1002/syn.20472] [PMID]
- [14] Marvanová M, Lakso M, Pirhonen J, Nawa H, Wong G, Castrén E. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Mol Cell Neurosci.* 2001; 18(3):247-58. [DOI:10.1006/mcne.2001.1027] [PMID]
- [15] Rostami F, Oryan S, Ahmadiani A, Dargahi L. Morphine pre-conditioning protects against LPS-induced neuroinflammation and memory deficit. *J Mol Neurosci.* 2012; 48(1):22-34. [DOI:10.1007/s12031-012-9726-4] [PMID]
- [16] Alderks CE. Trends in the use of methadone, buprenorphine, and extended-release naltrexone at substance abuse treatment facilities: 2003-2015 (update). Rockville: Substance Abuse and Mental Health Services Administration; 2017. [PMID]
- [17] Ayanga D, Shorter D, Kosten TR. Update on pharmacotherapy for treatment of opioid use disorder. *Expert Opin Pharmacother.* 2016; 17(17):2307-18. [DOI:10.1080/14656566.2016.1244529] [PMID]
- [18] Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology.* 2004;47(Suppl 1):24-32. [DOI:10.1016/j.neuropharm.2004.06.031] [PMID]
- [19] Abul-Husn NS, Annangudi SP, Ma'ayan A, Ramos-Ortolaza DL, Stockton SD Jr, Gomes I, et al. Chronic morphine alters the presynaptic protein profile: Identification of novel molecular targets using proteomics and network analysis. *Plos One.* 2011; 6(10):e25535. [DOI:10.1371/journal.pone.0025535] [PMID] [PMCID]
- [20] Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM, Telang F. Dopamine in drug abuse and addiction: Results of imaging studies and treatment implications. *Arch Neurol.* 2007; 64(11):1575-9 [DOI:10.1001/archneur.64.11.1575] [PMID]
- [21] Yu G, Yan H, Gong ZH. Differential effects of acute and repeated morphine treatment on  $\kappa$ -opioid receptor mRNA levels in mesocorticolimbic system. *Pharmacol Rep.* 2012; 64(2):445-8. [DOI:10.1016/S1734-1140(12)70786-7] [PMID]
- [22] Yu G, Yan H, Gong ZH. Effects of acute and repeated morphine treatment on  $\kappa$ -opioid receptor protein levels in mesocorticolimbic system. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014; 34(1):44-7. [DOI:10.3109/10799893.2013.856919] [PMID]
- [23] Nair VD, Savelli JE, Mishra RK. Modulation of dopamine D2 receptor expression by an NMDA receptor antagonist in rat brain. *J Mol Neurosci.* 1998; 11(2):121-6. [DOI:10.1385/JMN:11:2:121] [PMID]
- [24] Verma A, Kulkarni SK. Role of D1/D2 dopamine and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in morphine tolerance and dependence in mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1995; 5(2):81-7. [DOI:10.1016/0924-977X(94)00140-7] [PMID]
- [25] Semenova S, Danysz W, Bespalov A. Low-affinity NMDA receptor channel blockers inhibit acquisition of intravenous morphine self-administration in naive mice. *Eur J Pharmacol.* 1999; 378(1):1-8. [DOI:10.1016/S0014-2999(99)00431-8] [PMID]

- [26] Chen Y, Evola M, Young AM. Memantine and dizocilpine interactions with antinociceptive or discriminative stimulus effects of morphine in rats after acute or chronic treatment with morphine. *Psychopharmacology*. 2013; 225(1):187-99. [DOI:10.1007/s00213-012-2807-9] [PMID] [PMCID]
- [27] Chen SL, Tao PL, Chu CH, Chen SH, Wu HE, Tseng LF, et al. Low-dose memantine attenuated morphine addictive behavior through its anti-inflammation and neurotrophic effects in rats. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012; 7(2):444-53. [DOI:10.1007/s11481-011-9337-9] [PMID] [PMCID]
- [28] Sukhotina IA, Bernalov AY. Effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and MRZ 2/579 on morphine withdrawal-facilitated aggression in mice. *Psychopharmacology*. 2000; 149(4):345-50. [DOI:10.1007/s002130000386] [PMID]
- [29] Gonzalez G, DiGirolamo G, Romero-Gonzalez M, Smelson D, Ziedonis D, Kolodziej M. Memantine improves buprenorphine/naloxone treatment for opioid dependent young adults. *Drug Alcohol Depend*. 2015; 156:243-53. [DOI:10.1016/j.drugalcdep.2015.09.020] [PMID]
- [30] Popik P, Skolnick P. The NMDA antagonist memantine blocks the expression and maintenance of morphine dependence. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 53(4):791-7. [DOI:10.1016/0091-3057(95)02163-9] [PMID]
- [31] Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. Effects of NMDA receptor antagonists (MK-801 and memantine) on the acquisition of morphine-induced conditioned place preference in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004; 28(6):1035-43. [DOI:10.1016/j.pnpbp.2004.05.038] [PMID]
- [32] Zhou X, Wang L, Xiao W, Su Z, Zheng C, Zhang Z, et al. Memantine Improves cognitive function and alters hippocampal and cortical proteome in triple transgenic mouse model of Alzheimer's Disease. *Exp Neurobiol*. 2019; 28(3):390-403. [DOI:10.5607/en.2019.28.3.390] [PMID]
- [33] Lannes B, Micheletti G, Warter JM, Zwiller J. [Chronic administration of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists induced in rats, a facilitation of striatal dopaminergic type D2 transmission: Behavioral and biochemical study (French)]. *C R Acad Sci III*. 1992; 315(10):387-94. [PMID]
- [34] Maler JM, Esselmann H, Wiltfang J, Kunz N, Lewczuk P, Reulbach U, et al. Memantine inhibits ethanol-induced NMDA receptor up-regulation in rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 2005; 1052(2):156-62. [DOI:10.1016/j.brainres.2005.06.017] [PMID]