

اثر نیتریک اکساید هسته مرکزی آمیگدال در بروز رفتارهای جستجوی دارو

مهناز رحیم‌پور^۱، منیژه کریمی^۲، محمدرضا جلالی‌ندوشن^۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۱/۲۵

چکیده

مقدمه: در این پژوهش اثرات تزریق دو طرفه عوامل نیتریک اکساید به هسته مرکزی آمیگدال در بروز رفتارهای جستجوی دارو مانند ایستادن، بو کشیدن و تردد بین دو بخش دستگاہ ترجیح مکان شرطی شده بررسی شد. **روش:** آزمایش‌ها روی موش بزرگ آزمایشگاهی نر ویستار با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گردید. همه حیوان‌ها پس از جراحی با استروئیکس و کانول گذاری در مختصات هسته مرکزی آمیگدال یک هفته دوره بهبود را گذراندند. ترجیح مکان شرطی شده به روش غیر طرفدار و به صورت یک برنامه پنج روزه اجرا شد. **یافته‌ها:** حیوان‌هایی که طی شرطی سازی، مورفین (۱۰-۲/۵ mg/kg) را به صورت زیر جلدی دریافت کرده بودند به شکل معنی داری رفتارهای جستجوی دارو را نشان دادند. تزریق داخل صفاقی نالوکسون (۰/۴-۰/۱ mg/kg) در روز آزمون (پس از شرطی سازی با مورفین (۷/۵ mg/kg)، بروز این علائم رفتاری را کاهش داد. تزریق مستقیم L- آرژنین به داخل هسته مرکزی آمیگدال در روز آزمون مقدم بر تزریق دوز موثر نالوکسون (۰/۴ mg/kg)، بر بیان علائم رفتاری مذکور اثر افزایشی معنی دار داشت ولی تزریق مستقیم L-NAME به داخل هسته پیش از تزریق L- آرژنین، پاسخ L- آرژنین را به طور معنی داری کاهش داد. **نتیجه گیری:** احتمالاً سیستم نیتریک اکساید ناحیه آمیگدال مرکزی در بروز برخی از علائم رفتاری جستجوی دارو در حیوانات شرطی شده با مورفین، نقش مهمی را ایفا می‌کند.

کلید واژه‌ها: مورفین، نیتریک اکساید، آمیگدال مرکزی، L- آرژنین و L-NAME، رفتار جستجوی دارو

۱. نویسنده مسئول: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشگاه شاهد. پست الکترونیک: Rahimpour@shahed.ac.ir

۲. استادیار بیولوژی گروه زیست شناسی دانشگاه شاهد

۳. استادیار پاتولوژی گروه پاتولوژی دانشگاه شاهد

مقدمه

رفتارهای چون ایستادن^۱ و بو کشیدن^۲ و تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی^۳ از جمله علائم رفتاری جستجوی دارو^۴ در حیوانات شرطی شده با مورفین می باشند (آزورلوسا^۵ و سیمون^۶، ۱۹۹۹) و در بروز این علائم در حیوان آزمایشگاهی احتمالاً سیستم های تنظیم کننده سطح انگیزش و هیجان ایفای نقش می کنند (دانیل^۷، تانیا^۸، مارک^۹ و مت^{۱۰}، ۲۰۰۸). رفتار بو کشیدن، به ورود و خروج منظم هوا برای نمونه برداری بو و رایحه اطلاق می گردد. اولین بار واکر^{۱۱} و همکاران در سال ۱۹۹۱، رفتار بو کشیدن را به عنوان رفتاری دینامیک تعریف کردند که با هماهنگی دقیق سایر سیستم های حرکتی انجام می شود و در شکل دهی اطلاعات بو جهت پردازش توسط سیستم عصبی نقش دارد. اپیوئید^{۱۲} های مانند مورفین بی دردیشان را از طریق اثر بر نواحی از مغز که دارای گیرنده های برای پپتیدهایی با ویژگی های فارماکولوژیک شبه اپیوئیدی و جفت شونده با پروتئین G القاء می کنند.

این گیرنده ها در مناطقی از مغز و نخاع و بافت های دیگر شناسایی شده اند (کاتزونگ^{۱۳}، ۲۰۰۴). گیرنده های اپیوئیدی و لیگاند های پپتیدی درون زاد^{۱۴} در سراسر دستگاه عصبی مرکزی^{۱۵} و بافت های محیطی^{۱۶} توزیع شده اند که این توزیع وسیع مربوط به نقش مهم سیستم اپیوئیدی در کنترل پاسخ های فیزیولوژیک مانند بی دردی، رفتار هیجانی، یادگیری، حافظه و تنظیم مدارهای پاداش می باشد (بودنار^{۱۷}، ۲۰۰۸). سیستم اپیوئیدی دارای سه گیرنده اصلی μ (mu)، κ (kapa) و δ (delta) می باشد که این گیرنده ها توسط پپتیدهای اپیوئیدی درون زاد فعال می شوند (کاتزونگ، ۲۰۰۴). تجویز مکرر دوزهای درمانی مورفین یا مشتقات آن باعث می شود که این مواد تدریجاً اثرشان را از دست بدهند و در این حالت برای به دست آوردن پاسخ اولیه، مقادیر بیشتری از دارو باید تجویز گردد (تحمل^{۱۸}) (کاتزونگ، ۲۰۰۴).

- | | | |
|-------------------------------|----------------|----------------------------|
| 1. Rearing | 2. Sniffing | 3. Compartment entering |
| 4. Drug seeking | 5. Azorlosa | 6. Simmon |
| 7. Daniel | 8. Tanya | 9. Marc |
| 10. Matt | 11. Walker | 12. Opioid |
| 13. Katzung | 14. Endogenous | 15. Central Nervous System |
| 16. Peripheral Nervous System | 17. Bodnar | 18. Tolerance |

نالوکسون^۱ دارویی است که برای درمان تحمل اپیوئیدی (دوز مفرط مورفین و یا هروئین) استفاده می‌شود و تیمار همزمان مورفین با دوز بسیار کم نالوکسون، تحمل و وابستگی اپیوئیدی را به واسطه جلوگیری از تغییرات پیام‌رسانی تحرکی اپیوئیدها کاهش می‌دهد که این اثر مهاري در نالوکسون به دلیل تمایل^۲ بسیار بالای آن در واکنش با گیرنده گیرنده^۳ ایجاد می‌شود (ونگ^۴ و برنز^۴، ۲۰۰۹).

آمیگدال^۵ در تشخیص احساسات منفی مانند ترس، ارتباط بین محرک‌های محیطی و احساسات و پردازش اطلاعات پاداش بسیار اهمیت دارد (بکستر^۶ و موری^۷، ۲۰۰۲). پژوهش‌های انجام شده نشان دهنده دو مسیر خروجی اصلی از آمیگدال می‌باشند که از طرق مختلف برای پردازش اطلاعات پاداش با هم همکاری دارند. آمیگدال برای انجام فرآیندهای وابسته به پاداش با طیف وسیعی از نواحی قشری و زیر قشری مغز، هسته آکومبنس^۸، سیستم دوپامینرژیک ناحیه مغز میانی، سیستم کولینرژیک مغز جلویی قاعده‌ای قاعده‌ای و قشر پیش‌پیشانی به خصوص ناحیه میانی و شنوایی ارتباط دارد (بکستر^۶، ۲۰۰۲). استاینوس^۹، مل^{۱۰} و کوب^{۱۱} در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که هسته مرکزی آمیگدال در بیان پاسخ شرطی معکوس^{۱۲} وابسته به جریان ترک اپیوئیدی نقش دارد.

نیتریک اکساید^{۱۳} در افزایش دوپامین^{۱۴} خارج سلولی در هسته آکومبنس نقش دارد (والاس^{۱۵} و بوز^{۱۶}، ۱۹۹۷). رهایش نیتریک اکساید در قشر هسته آکومبنس، از طریق فعالیت گیرنده NMDA^{۱۷} به وسیله گلوتامات^{۱۸} صورت می‌گیرد و بنابراین گیرنده‌های گلوتاماتی، در سلول‌های تولید کننده نیتریک اکساید وجود دارند (آباکوا^{۱۹}، ۱۹۹۷). فعالیت گیرنده NMDA توسط گلوتامات و گلیسین^{۲۰}، موجب ورود یون کلسیم به سلول و تشکیل کمپلکس کلسیم-کالمودولین^{۲۱} می‌شود. سپس آنزیم نیتریک اکساید سینتاز فعال شده و سنتز نیتریک اکساید را از L-آرژنین انجام می‌دهد (مانزونی و همکاران، ۱۹۹۲). با توجه به نقش نیتریک اکساید (به عنوان یکی از ناقلین عصبی هسته مرکزی آمیگدال^{۲۲} در

۱۰۳
103

سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۰
Vol. 5, No. 19, Autumn 2011

1. Naloxone
4. Burns
7. Murray
10. Moal
13. Nitric oxide
16. Booze
19. Abecava
22. Central amygdala

2. Affinity
5. Amygdala
8. Accumbens
11. Koob
14. Dopamine
17. N. methyl D. aspartate
20. Glycine

3. Wang
6. Baxter
9. Stinus
12. Conditioned place aversion
15. Wallace
18. Glutamate
21. Calmodulin

بیان و افزایش تحمل و وابستگی به مورفین و نیز با در نظر گرفتن نقش نیتریک اکساید در بیان ویژگی های پاداشی اپیوئیدها و همچنین به دلیل اهمیت آمیگدال در بروز سندرم ترک^۱، چنین فرض می شود که بر هم کنش بین نیتریک اکساید و مورفین در این ناحیه بتواند بر علائم رفتاری جستجوی دارو تحت شرایطی تک تزریق نالوکسون تأثیر بگذارد. لذا در مطالعه حاضر اثرات تزریق دوطرفه L-آرژنین و L-NAME به ناحیه آمیگدال مرکزی بر بیان رفتارهای جستجوی دارو ناشی از شرطی شدن با مورفین همراه با تک تزریق نالوکسون بررسی شد.

روش

جامعه، نمونه و روش نمونه گیری

آزمایش ها روی موش بزرگ آزمایشگاهی^۲ نر نژاد ویستار^۳ که در شروع جراحی، میانگین وزن آن ها بین ۲۵۰-۲۰۰ گرم بود صورت گرفت. حیوان ها از انستیتو پاستور ایران تهیه و به صورت گروه های چهارتایی تحت شرایط استاندارد آزمایشگاهی با دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آسان به آب و غذا نگهداری شدند. جنس نر به واسطه نداشتن سیکل استروس^۴ و عدم تأثیرپذیری از تغییرات سطح هورمون های جنسی از این فرایند انتخاب گردید (کرمی و زرین دست، ۲۰۰۸) و مطالعات قبلی گروه حاضر نیز بر روی این جنس انجام گردیده بود. برای هر آزمایش ۶ سر حیوان مورد مطالعه قرار گرفت و هر حیوان فقط یک بار آزمایش شد. آزمایش ها بین ساعت ۸ صبح تا ۵ بعد از ظهر انجام شد. مرحله شرطی سازی به مدت ۳ روز و هر روز یک بار تزریق مورفین و به فاصله ۶ ساعت بعد تزریق سالیان انجام شد. آزمون رفتارهای جستجوی دارو در این حیوانات ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق مورفین در شرایطی که دیگر مورفین تزریق نگردید به عمل آمد. مواد مورد استفاده در آزمایش عبارت بودند از: مورفین سولفات^۵، کتامین^۶ و زایلزین^۷ (به عنوان داروی بیهوشی)، نالوکسون، L-آرژنین و L-NAME.

1. Withdrawal syndrome
3. Wistar
5. Morphine sulfate
7. Xylazine

2. Rat
4. Cycle estrous
6. Ketamine

کلیه داروها قبل از مصرف در سالین ۰/۹ درصد حل شدند. نالوکسون به صورت ویال ۰/۴ml mg/ از شرکت داروپخش، کتامین و زایلزین از داروخانه دامپزشکی و L-آرژینین و L-NAME از شرکت سیگما تهیه گردید.

به منظور جراحی و کانول گذاری، ابتدا حیوان وزن می‌شد و سپس با تزریق درون صفاقی^۱ مخلوط کتامین و زایلزین (۱۰۰mg/kg) بیهوش می‌گردید. سپس سر حیوان با استفاده از دستگاه استریو تاکس^۲، در مختصات هسته مرکزی آمیگدال بر اساس اطلس پاکسینو^۳ [برگما ۲/۱۲ = - (AP) از خط وسط ۴/۲ mm = (ML)] و از سطح جمجمه $(DV) = -V/8mm$ ، کانول گذاری می‌شد. کلیه حیوان‌های جراحی شده قبل از انجام آزمون ترجیح مکانی شرطی شده^۴، یک هفته دوره بهبود را گذراندند. دستگاه شرطی سازی^۵ دو قسمتی و از جنس چوب است که توسط یک دریچه از هم مجزا می‌شوند (کر می، ۲۰۰۲).

روش آزمون ترجیح مکانی شرطی شده بر اساس طرح غیر طرفدار^۶ و شامل یک برنامه برنامه پنج روزه با سه مرحله مشخص پیش از شرطی سازی^۷، شرطی سازی^۸ و آزمون^۹ می‌باشد. روش ترجیح مکانی شرطی شده یک کار رفتاری^{۱۰} است که اغلب برای سنجش و اندازه گیری ویژگی‌های تقویتی داروها و شکل گیری یادگیری ارتباطی بین پاداش - تحریک به کار می‌رود (مک اینتار، راگوزینو^{۱۱} و گولد^{۱۲}، ۱۹۹۸). در مرحله پیش از شرطی سازی (روز اول) حیوان با دستگاه آشنا می‌شود. در این مرحله، حیوان به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترجیح مکانی شرطی شده (شکل ۱) در حالیکه دریچه گیوتینی ۱۲ سانتی متر بالاتر از کف، ثابت شده بود قرار می‌گرفت و به این صورت به هر دو قسمت دستگاه دسترسی داشت. در طی شرطی سازی از روز دوم تا روز چهارم آزمایش (۳ روز) حیوان

۱۰۵

105

سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۰
Vol. 5, No. 19, Autumn 2011

1. Intraperitoneal
3. Paxinos
5. CPP box
7. Preconditioning
9. Test
11. Ragozzino

2. Stereotaxy
4. Conditioned Place Preference
6. Unbiased
8. Conditioning
10. Behavioral
12. Gold

پس از دریافت دارو به مدت ۴۵ دقیقه در دستگاه ترجیح مکانی شرطی شده، در حالیکه در ریچه گیوتینی در جای خود قرار داشت و دو قسمت دستگاه را از هم جدا می کرد، قرار می گرفت (به این ترتیب، فقط به یکی از دو قسمت یعنی قسمت شرطی دسترسی داشت) و پس از گذشت ۴۵ دقیقه به حیوانخانه منتقل می گردید. در روز آزمون حیوان مورد آزمایش مورفین دریافت نمی کند. در این مرحله نالوکسون در مقادیر مورد نظر و به صورت داخل صفاقی، ۱۰ دقیقه قبل از آزمون تزریق می شد و در مواردی که مقرر شده بود اثر سیستم نیتریک اکساید در CeA بر پاسخها مطالعه شود، عوامل سیستم نیتریک اکساید یعنی L-NAME و L-Arginine داخل هسته تزریق می شدند و بلافاصله تزریق نالوکسون انجام می شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، حیوان به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترجیح مکانی شرطی شده قرار می گرفت و در این روز و در لحظه آزمون مانند روز اول (آشنایی) در ریچه گیوتینی ۱۲ سانتی متر بالاتر از کف قرار داشت (در این حالت حیوان به هر دو قسمت دسترسی داشته و هر دو قسمت را مورد بررسی قرار می دهد). مدت زمان توقف حیوان در هر قسمت، در تمامی مراحل توسط دستگاه اتوویشن^۱ و زمان سنج ثبت می شد.



شکل ۱: دستگاه ترجیح مکانی شرطی شده

1. Ethovision

بررسی اثرات مورفین بر روی علائم رفتاری در مدل شرطی: چهار گروه از حیوانات مقادیر مختلف مورفین (۲/۵-۱۰ mg/kg) را به صورت زیر جلدی دریافت کردند و یک گروه نیز به منظور مقایسه بین گروه‌های تحت آزمایش با گروه کنترل به عنوان گروه شاهد، طی شرطی سازی سالین را به صورت زیر جلدی دریافت کرد. فعالیت و علائم رفتاری همه گروه‌ها در مرحله آزمون توسط دستگاه اتوویشن (ثبت و رکوردینگ رفتارها به صورت خودکار) ذخیره و سپس تجزیه و تحلیل گردید.

بررسی اثرات تداخل نالوکسون و مورفین بر روی علائم رفتاری: اثرات تزریق داخل صفاقی مقادیر مختلف نالوکسون (آنتاگونیست^۱ رقابتی گیرنده‌های اپیوئیدی) بر روی بیان علائم رفتاری بررسی شد. پنج گروه از حیوانات طی یک برنامه سه روزه شرطی سازی به صورت زیر جلدی دوز موثر مورفین (۷/۵ mg/kg) را دریافت کردند ولی ۱۰ دقیقه قبل از آزمون، نالوکسون به صورت داخل صفاقی (۰/۱-۰/۴ mg/kg) در چهار تزریق شد و یک گروه نیز به عنوان گروه کنترل بدون دریافت نالوکسون وارد مرحله آزمون شدند. علائم رفتاری کلیه حیوانات ثبت و تحلیل شد.

۱۰۷

107

بررسی اثرات L-آرژنین داخل مغزی بر روی علائم رفتاری: چهار گروه از حیوانات طی یک برنامه شرطی سازی سه روزه، مورفین را به صورت زیر جلدی دریافت کردند. در روز آزمون، تزریق داخل هسته‌ای مقادیر مختلف L-آرژنین (۰/۳-۳ μg/rat) مقدم بر تزریق داخل صفاقی دوز موثر نالوکسون (۰/۴ mg/kg) بر روی سه گروه انجام گردید و یک گروه نیز به عنوان گروه کنترل (بدون دریافت L-آرژنین) در نظر گرفته شد. حیوانات پس از ۱۰ دقیقه، تحت آزمون واقع شدند و علائم رفتاری همه گروه‌ها مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی اثرات L-NAME داخل مغزی بر روی علائم رفتاری: در این آزمایش چهار گروه از حیوانات طی یک برنامه شرطی سازی سه روزه، مورفین را به صورت زیر جلدی

1. Antagonist

دریافت کردند. در روز آزمون، مقادیر مختلف L-NAME (۳-۰/۳) به صورت داخل مغزی، مقدم بر L-آرژنین (۳ $\mu\text{gr}/\text{rat}$) و پیش از تزریق نالوکسون (۰/۴ mg/kg) بر روی سه گروه از حیوانات انجام شد و گروه چهارم به عنوان گروه کنترل (بدون دریافت L-NAME) در نظر گرفته شد. همه گروه‌ها پس از ۱۰ دقیقه وارد مرحله آزمون شدند و علائم رفتاری آن‌ها برای انجام تحلیل و بررسی ثبت و ذخیره گردید. داده‌های مربوط به علائم رفتاری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس از تست نرمالیتی اسمیرنو کولموگروو تحت تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و برای تحلیل بیشتر داده‌ها آنالیزهای Post hoc از آزمون LSD استفاده شد و در همه موارد $p < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با کمک نرم افزار state G و SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها

اثرات مورفین بر بیان رفتارهای جستجوی دارو در مدل شرطی: جدول ۱،
 پاسخ مورفین (۱۰-۲/۵ mg/kg, s.c) را در بیان علائمی مانند ایستادن، بو کشیدن و تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی نشان می‌دهد.

۱۰۸
108

جدول ۱: اثر مورفین بر علائم رفتاری (رفتارهای جستجوی دارو)

مورفین (mg/kg)	ایستادن (تعداد در ۱۵ دقیقه)	بو کشیدن (تعداد در ۱۵ دقیقه)	تردد بین دو خط (تعداد در ۱۵ دقیقه)
۰	۴۳/۵۰ ± ۲/۸۴	۱۲/۷۵ ± ۱/۲۵	۲۱/۲۵ ± ۳/۱۷
۲/۵	۱۹ ± ۴/۸۴***	۹ ± ۱/۵۸	۱۰/۵۰ ± ۱/۴۴**
۵	۳۳ ± ۲/۸۵*	۱۱/۷۵ ± ۱/۸۸	۱۷/۵۰ ± ۱/۳۲
۷/۵	۲۶ ± ۲/۶۷**	۱۴/۷۵ ± ۲/۵۹	۱۲/۲۵ ± ۱/۱۰**
۱۰	۲۰ ± ۲/۳۴***	۶/۵۰ ± ۱/۰۴*	۱۱/۲۵ ± ۱/۸۴**

مقایسه بین گروهی به کمک آزمون LSD انجام شده است: $p < 0/001$ ***, $p < 0/01$ ** , $p < 0/05$ *

جدول آنالیز واریانس یک طرفه را نشان می‌دهد که مورفین اثر معنی داری [$0/0001 <$; $F_{4,25} = 9/868$ P] بر ایستادن دارد. بررسی بیشتر با آزمون LSD نشان می‌دهد که مورفین در

تمام مقادیر نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی داری را بر بیان این رفتار نشان می دهد. اثر مورفین بر بو کشیدن اثری معنی دار [$F_{4,25}=3/395$; $P<0/01$] است و آزمون LSD حاکی از آن است که دوز بالای مورفین (10 mg/kg) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری بر بیان این رفتار نشان می دهد. اثر مورفین بر تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی نیز معنی دار [$F_{4,25}=5/816$; $P<0/001$] است و بررسی بیشتر با آزمون LSD حاکی از آن است که مورفین در مقادیر مختلف (10 mg/kg و 7/5، 2/5) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری بر این رفتار دارد.

اثرات تداخل نالوکسون و مورفین در بیان علائم رفتاری جستجوی دارو: جدول ۲، پاسخ نالوکسون (0/1-0/4 mg/kg, i.p) را در بیان علائمی مانند ایستادن، بو کشیدن و تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی نشان می دهد.

جدول ۲: اثر نالوکسون بر روی علائم رفتاری در مدل شرطی

تردد بین دو قسمت (تعداد در ۱۵ دقیقه)	بو کشیدن (تعداد در ۱۵ دقیقه)	ایستادن (تعداد در ۱۵ دقیقه)	مورفین + (7/5mg/kg) نالوکسون (mg/kg)
12/25±1/10	14/75±2/59	26±2/67	0
66±1/22*	4±1/35**	6/75±2/17***	0/1
4/75±3/19*	2/50±1/04***	7/50±4/29***	0/2
4/50±1/89*	5±2/67**	5±2/04***	0/3
4/25±1/54*	2±0/70***	6/50±2/39***	0/4

مقایسه بین گروهی به کمک آزمون LSD انجام شده است: $p<0/001$ ***, $p<0/01$ **, $p<0/05$ *.

جدول ۲ آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که نالوکسون اثر معنی داری [$F_{4,25}=9/615$; $P<0/0001$] بر ایستادن و نیز اثر معنی داری [$F_{4,25}=7/88$; $P<0/001$] بر بو کشیدن دارد. همچنین اثر مورفین بر تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی معنی داری [$F_{4,25}=2/992$; $P<0/01$] می باشد و بررسی بیشتر با آزمون LSD حاکی از آن است که نالوکسون در تمام مقادیر نسبت به گروه کنترل، اثر کاهشی معنی داری بر بیان این رفتارها دارد.

اثرات تزریق مستقیم L-آرژنین بر روی علائم رفتاری در حیوان شرطی شده با مورفین: جدول ۳، پاسخ L-آرژنین (۰/۳-۳ μgr/rat) را در بیان علائمی مانند ایستادن، بو کشیدن و تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی نشان می دهد.

جدول ۳: اثر L-آرژنین بر روی علائم رفتاری در مدل شرطی

تردد بین دو قسمت (تعداد در ۱۵ دقیقه)	بو کشیدن (تعداد در ۱۵ دقیقه)	ایستادن (تعداد در ۱۵ دقیقه)	مورفین (+۷/۵mg/kg) ناکسون (+۰/۴mg/kg) L-آرژنین (μgr/rat)
۴/۲۵±۱/۵۴	۲±۰/۷۰	۶/۵۰±۲/۳۹	۰
۲۰±۸/۳۲*	۸±۲/۰۸	۲۴/۳۳±۱۰/۸۳	۰/۳
۱۰/۶۶±۴/۴۸	۶±۱/۵۲	۸/۶۶±۳/۷۵	۱
۲۲±۲/۰۰*	۱۲±۷/۰۰	۱۹/۵۰±۰/۵۰	۳

مقایسه بین گروهی به کمک آزمون LSD انجام شده است: $p < 0/05$ *

جدول ۳ آنالیز واریانس یک طرفه حاکی از آن است که L-آرژنین اثر معنی داری را بر ایستادن و بو کشیدن نشان نمی دهد ($P < 0/05$) ولی اثر L-آرژنین بر تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی معنی دار [$F_{۳,۲} = ۲/۹۳۴$; $P < 0/01$] است. همچنان که، در بررسی بیشتر با آزمون LSD نشان داده می شود که L-آرژنین در بعضی از مقادیر (۳ و ۰/۳ μgr/rat) نسبت به گروه کنترل اثر افزایشی معنی داری را بر بیان این رفتار نشان می دهد.

اثرات تزریق مستقیم L-NAME بر روی علائم رفتاری در حیوان شرطی شده با مورفین: جدول ۴، پاسخ L-NAME (۰/۳-۳ μgr/rat) را در بیان علائمی مثل ایستادن، بو کشیدن و تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی نشان می دهد.

جدول ۴: اثر L-NAME بر روی علائم رفتاری در مدل شرطی

تردد بین دو قسمت (تعداد در ۱۵ دقیقه)	بو کشیدن (تعداد در ۱۵ دقیقه)	ایستادن (تعداد در ۱۵ دقیقه)	L-آرژنین (+۰/۳μgr/rat) L-NAME (μgr/rat)
۲۲±۲/۰۰	۱۲±۷/۰۰	۱۹/۵۰±۰/۵۰	۰
۷±۴/۰۰*	۶	۶/۵۰±۴/۵۰	۰/۳
۱۳±۴/۰۰	۱۲/۵۰±۰/۵۰	۱۴/۵۰±۳/۵۰	۱
۲/۵۰±۲/۵۰*	۴/۵۰±۳/۵۰	۸±۷/۰۰	۳

مقایسه بین گروهی به کمک آزمون LSD انجام شده است: $p < 0/05$ *

جدول ۴ آنالیز واریانس یک طرفه نشان می‌دهد که L-NAME اثر معنی داری بر ایستادن و بوکشیدن ندارد ($P < 0/05$) ولی اثر L-NAME بر تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی معنی دار [$F_{3,20} = 6/728$; $P < 0/01$] است و آزمون LSD نشان می‌دهد که L-NAME در مقادیر مختلف (3 و $0/3$ $\mu\text{gr/rat}$)، بیان این رفتارها را متوقف می‌کند.

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش نقش نیتریک اکساید در هسته مرکزی آمیگدال بر بروز علائم رفتاری القاء شده با مورفین با استفاده از دستگاه ترجیح مکانی شرطی شده و نیز به کمک ثبت خودکار علائم رفتاری مانند ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو قسمت شرطی دستگاه در روز آزمون مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه پژوهش حاکی از تأثیر مورفین بر علائم رفتاری ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی، در حیوان شرطی شده نسبت به گروه دریافت کننده سالین می‌باشد و اینکه مورفین موجب کاهش فعالیت حرکتی (تردد بین دو بخش دستگاه) در حیوان شد که این یافته با نتایج مطالعات قبلی (آزورلوسا و سیمون، ۱۹۹۹) مطابقت دارد.

یافته‌ها نشان می‌دهد که مورفین موجب تحریک پروتئین G متصل به گیرنده‌های μ ، κ و δ می‌شود اما طبق یافته‌های قبلی (اشنایدر^۱ و پاسترناک^۲، ۲۰۰۳) گیرنده μ در بروز پاسخ‌های رفتاری القاء شده با مورفین بیشترین نقش را ایفاء می‌کند. نالوکسون به عنوان آنتاگونیست اپیوئیدی تجویز شد و طبق یافته‌های حاضر پس از تزریق داخل صفاقی آن قبل از آزمون، علائم رفتاری ایستادن و بوکشیدن در حیوان شرطی شده کاهش معنی داری پیدا کرد. اما اثر نالوکسون بر فعالیت حرکتی، تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی، اثرهای متفاوت داشت. دوز کم نالوکسون ($0/1 \text{ mg/kg, i.p}$) موجب افزایش تردد بین دو بخش دستگاه گردید، حال آنکه دوزهای بالاتر نالوکسون ($0/4 - 0/2 \text{ mg/kg, i.p}$) موجب کاهش این فعالیت گردید. نتیجه این یافته‌ها این است که احتمالاً نالوکسون در دوز

۱۱۱
۱۱۱

کم (0.1 mg/kg) با انواع دیگری از گیرنده‌های اپیوئیدی مانند K و اکشن داده است (زرین دست و همکاران، ۲۰۰۲) و یا اینکه احتمالاً سازوکارهای مولکولی متعددی فعال گردیده است که در حال حاضر با این یافته‌ها درباره آنها نمی‌توان اظهار نظر نمود و لازم است تا مطالعات آتی در سطح مولکولی برای بیان و تفسیر این بخش از یافته‌ها به خدمت گرفته شود. اما نالوکسون در مقادیر بالاتر ($0.4-0.2 \text{ mg/kg}$)، احتمالاً موجب مسدود شدن گیرنده μ گردیده است (ونگ و برنز، ۲۰۰۹). فعالیت هر دو گیرنده μ و K موجب هیپرپلاریزاسیون^۱ نرون در نواحی مختلف مغزی و مهار آنزیم آدنیلات سیکلاز^۲ می‌گردد (ایشیدا^۳ و همکاران، ۲۰۰۸).

مطابق یافته‌های قبلی، گیرنده μ موجب هیپرپلاریزاسیون نرون های حد واسط^۴ غیر دوپامینی، گابا آرژیک، در ناحیه تگمنتوم شکمی شده و از این طریق با تحریک نرون های دوپامینرژیک این ناحیه ترشح دوپامین را در هسته آکومبنس افزایش می‌دهد در حالیکه فعالیت گیرنده K از طریق ارتباط پیش سیناپسی با نرون دوپامینرژیک منشعب شده از ناحیه تگمنتوم شکمی، موجب مهار ترشح دوپامین در هسته آکومبنس می‌شود (شتتک^۵ و اشمیت^۶، ۲۰۰۳). پس از فعال شدن گیرنده‌های گلوتاماتی به ویژه NMDA، ورود کلسیم به داخل سلول و سپس فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سینتاز وابسته به کلسیم-کالمودولین اتفاق افتاده و موجب رهایش نیتریک اکساید به فضای سیناپسی می‌گردد (کالیگنانو^۷، پرسیکو^۸، مانکوسو^۹ و سورنتینو^{۱۰}، ۱۹۹۳) و اثر نیتریک اکساید بر نرون پیش سیناپسی موجب رهایش بیشتر گلوتامات می‌شود (سپهری، شیبانی، بقایی و فراهی فرد، ۲۰۰۶). افزایش نیتریک اکساید در هسته مرکزی آمیگدال در ترجیح مکانی القاء شده با مورفین نقش دارد (زرین دست و همکاران، ۲۰۰۲). خروجی‌های گلوتاماترژیک آمیگدال به هسته آکومبنس موجب وابستگی به مورفین می‌شود (دیچارا^{۱۱} و ایمپراتو^{۱۲}، ۱۹۹۸) و نیز

1. Hyperpolarization
3. Ishida
5. Tzchentke
7. Calignano
9. Mancuso
11. Dichiarà

2. Adenylate cyclase
4. Interneurons
6. Schmidt
8. Persico
10. Sorrentino
12. Imperato

خروجی های گلو تاما ترژیکی که وارد تکمنتوم شکمی می شوند و سپس به آمیگدال می رسند در بیان وابستگی به مورفین نقش دارند (شتتک و اشمیت، ۲۰۰۳)

در این پژوهش اثرات عوامل نیتریک اکساید بر روی علائم رفتاری پاداشی مورفین مورد ارزیابی قرار گرفت. تزریق دوطرفه مقادیر مختلف L-آرژنین و L-NAME به هسته آمیگدال مرکزی، مقدم بر تزریق دوز موثر نالوکسون، اثر معنی داری را بر روی علائم رفتاری ایستادن و بو کشیدن نشان نداد اما بعضی از مقادیر L-آرژنین، فعالیت حرکتی تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی را افزایش داد در حالی که، تزریق L-NAME، مقدم بر L-آرژنین اثر عکس بر روی این فرایند نشان داد و این امر با مطالعات قبلی (کالیگانو و همکاران، ۱۹۹۳) مطابقت می کند. با در نظر گرفتن اثرات عوامل نیتریک اکساید بر روی تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی که کاملاً معنی دار می باشد این احتمال وجود دارد که ناقل عصبی نیتریک اکساید در سطح هسته مرکزی آمیگدال با سیستم های تنظیم کننده فعالیت های حرکتی مانند سیستم دوپامینرژیک و گابا آرژیک (جی هون^۱ و همکاران، ۲۰۰۷) بر همکنشی داشته باشد که این یافته با پژوهش های قبلی (سپهری و همکاران، ۲۰۰۶) مطابقت دارد.

۱۱۳

۱۱۳

سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۰
Vol. 5, No. 19, Autumn 2011

این یافته ها حاکی از آن است که احتمالاً نیتریک اکساید ناحیه هسته مرکزی آمیگدال، در شکل گیری علائم رفتاری ایستادن و بو کشیدن نقش مهمی را ایفاء نمی کند و بنابراین محتمل است که در این امر سازو کارهای مولکولی دیگری درگیر باشند اما فعالیت حرکتی تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی در حیوان شرطی شده با مورفین که تحت تداخل نالوکسون واقع شده است احتمالاً توسط سیستم ناقل عصبی نیتریک اکساید تنظیم می شود و این یافته ها تا ۸۵ درصد قابل تعمیم به انسان می باشد.

پیشنهاد می گردد برای تأیید برخی مطالعات مربوط به رفتارهای جستجوی دارو، سایر علائم رفتاری مانند تمیز کردن^۲، پریدن^۳ و چرخیدن^۴ را به صورت مستقل و یا همراه با هم مورد

1. Gi Hoon
3. Jumping

2. Grooming
4. Circling

ارزیابی قرار داد. سطح نیتریک اکساید را با کمک اندازه گیری متابولیت های آن در هسته مرکزی آمیگدال با روش گریس راکشن^۱ انجام داد.

از آنجا که بخشی از هزینه این پژوهش از محل بودجه پروپوزال های کارشناسی ارشد دانشگاه شاهد تأمین گردید، نویسندگان لازم می دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و مسئولین ذیربط قدردانی نمایند.

منابع

- Abecava, T. (1997). Experimental study of methamphetamine psychosis role of glutamate and nitric oxide in methamphetamine-induced dopaminergic and serotonergic neurotoxicity in the rat brain. **Hokkaido Igaco Zassh**, 72, 113-126.
- Azorlosa, J. L., Simone, E. L. (1997). Context-specific morphine withdrawal: Evidence that rearing reflects withdrawal, not exploration. **Psychobiol**, 27 (4);557-560.
- Baxter, M. G., and Murray, E. A. (2008). The amygdala and reward. **Nat. Rev. Neurosci**, 3, 563-573.
- Bodnar, R. J. (2008). Endogenous opiates and behavior. **Rev. Peptides**, 29(12), 2292-2375.
- Calignano, A., Persico, P., Mancuso, F. Sorrentino. L. (1993). Endogenous nitric oxide modulates morphine-induced changes in locomotion and food intake in mice. **Eur. J. Pharmacol**, 231, 415-419.
- Daniel, W.W., Tanya N. D., Marc, O. J., Matt, W. (2008). Sniffing Behavior of Mice during Performance in Odor-Guided Tasks. **Chem. Senses**, 33, 581-596.
- Di, Chiara, G., Imperato, A. (1998) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc. Natl Acad. Sci**, 85,5274-5278.
- Gi, Hoon, S., Sooyoung, C., Dongho, G., Sang, S. K., Wan, C., Kyungjin, K., S. (2007). Hyperactivity and alteration of the midbrain dopaminergic system in maternally stressed male mice offspring. **Biochemical and Biophysical Res**, 3, 52, 823-829.
- Ishida, S., Shimosaka, R., Kawasaki, Y., Jin, C., Kitamura, Y., Araki, H., Sendo, T., Gomita, Y. (2008). Involvement of the amygdala on place aversion induced by naloxone in single-dose morphine-treated rats. **Biochemical and Biophysical Res**. 128 (3), 395-403.

- Karami, M., Zarrindast, M. R., Sepehri, H., and Sahraei, H. (2002). Role of nitric oxide in the rat hippocampal CA1 area on morphine-induced conditioned place preference. **European Journal of Pharmacol**, 449(1-2), 113-9.
- Karami, M., Zarrindast, M. R. (2008). Morphine sex-dependently induced place conditioning in adult Wistar rats. **European Journal of Pharmacol**, 582, 78-87.
- Katzung, B. G. (2004). **Basic and Clinical Pharmacol**, 31, 626-647.
- Manzoni, O., Prezeau, L., Marin, P., Deshager, S., Bock, J. & Fagni, L. (1992). Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. **Neuron**, 8, 653-662.
- McIntyre, C. K., Ragozzino, M. E., Gold P. E., (1998). Intra-amygdala infusions of scopolamine impair performance on a conditioned place preference task but not a spatial radial maze task. **Behav. Brain Res**, 95, 219-226.
- Sepehri, G., Sheibani, V., Baghaiee, F., Farazifard, R. (2006). Effect of L-NAME/L-Arginine microinjection into nucleus accumbens shell on morphine withdrawal signs in male rats. **International Journal of Pharmacol**, 2(2), 171-176.
- Snyder, S. M., Pasternak, G. W. (2003). Historical review: Opioid receptors. **Trends Pharmacol. Sci**, 24, 198-205.
- Stinus, L., Moal, M., Koob, G. F. (1990). Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. **Neurosci**, 37, 767-773.
- Tzchentke, T. M., Schmidt, W. J. (2003). Glutamatergic mechanisms in addiction. **Psychiatry**, 8, 373-382.
- Walker, D. L., McGlynn, T., Grey, C., Ragozzino, M., Gold, P. E. (1991). Naloxone modulates the behavioral effects of cholinergic agonists and antagonists. **Psychopharmacol**, 105, 57-62.
- Wallace, D. R. Booze, R. M. (1997). Upregulation of (+)-7-hydroxy-N,N-di-n-[³H]-2-aminotetralin binding following intracerebroventricular administration of nitric oxide generator. **Neurochem. Res**, 22, 163-170.
- Wang, H. Y., Burns, L. H. Naloxone's pentapeptide binding site on filamine A blocks mu opioid receptor-Gs coupling and CREB activation of acute morphine. **PLoS ONE**, 4(1), 42-82.
- Zarrindast, M. R., Karami, M., Sepehri, H. and Sahraei, H. (2002). Influence of nitric oxide on morphine-induced conditioned place preference in the rat central amygdala. **Eur. J. Pharmacol**, 453, 81-89.