

## اثرات تزریق داخل آمیگدالی ممانتین بر علایم متابولیکی استرس مزمن در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI

بهاره صادقی<sup>۱</sup> (M.Sc)، هدایت صحرائی<sup>۲\*</sup> (Ph.D)، حمیرا زردوز<sup>۳</sup> (Ph.D)، هنگامه علی‌بیگ<sup>۱</sup> (Ph.D)، ناهید سراحیان<sup>۱</sup> (M.Sc)

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران، گروه زیست‌شناسی

۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

۳- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، گروه فیزیولوژی

### چکیده

سابقه و هدف: تحقیقات قبلی نقش مهم آمیگدال را در هنگام استرس نشان داده است. هم‌چنین، ورودی‌های گلوتاماتی به آمیگدال در حین استرس فعال می‌شوند. در این مطالعه تاثیر مهار گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA موجود در آمیگدال در پاسخ به استرس مزمن مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: به کمک دستگاه استریوتاکس کانول‌گذاری یک‌طرفه و یا دو طرفه آمیگدال انجام شد. پس از هفت روز بهبودی حیوانات دوزهای متفاوت ممانتین (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میکروگرم به ازای موش) را پنج دقیقه قبل از شروع استرس دریافت کردند. استرس به مدت هفت روز متوالی القاء شد و میزان آب و غذای دریافتی و هم‌چنین زمان تاخیر در غذا خوردن و میزان دفع به عنوان معیاری از استرس سنجیده شد. یافته‌ها: استرس باعث کاهش دریافت غذا، و افزایش میزان آب‌نوشی، زمان تاخیر در غذا خوردن و میزان دفع شد. تجویز داخل آمیگدالی ممانتین اثر استرس را در میزان غذای دریافتی به جز در دوزهای متوسط و زیاد آن هم در سمت راست هسته تشدید کرد. هم‌چنین ممانتین باعث مهار اثر استرس در میزان آب‌نوشی به جز در دوز متوسط سمت راست شد و زمان تاخیر در غذا خوردن را نیز به میزان قابل توجهی کاهش داد. از طرفی ممانتین به صورت وابسته به دوز و محل تزریق منجر به مهار و یا تقویت اثر استرس بر میزان دفع گردید. نتیجه‌گیری: مکانیسم‌های گلوتاماتی در آمیگدال بر استرس موثر هستند و این اثر به صورت وابسته به دوز و وابسته به سمت (چپ و یا راست) می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گیرنده‌های ان متیل دی آسپاراتات، بادامک، تنش، ممانتین

### مقدمه

بروز عوارضی مانند بالا رفتن قند خون، افزایش ضربان قلب، و نیز افزایش سطح هوشیاری می‌گردند [۲،۳]. استرس مزمن، شدید و غیر قابل کنترل می‌تواند بیماری‌زا باشد و منجر به اختلالاتی مانند افسردگی، اضطراب، فشار خون بالا، آلزایمر، پارکینسون یا آسیب‌های مغزی و سکنه مغزی شود [۴]. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که در مدل‌های حیوانی اختلال در

اثرات مخرب استرس بر سلامت انسان به صورت گسترده مورد شناسایی قرار گرفته است، منبع استرس می‌تواند جسمانی یا روانی باشد [۱]. تحقیقات فراوان نشان می‌دهند که به دنبال بروز استرس، هورمون‌های استرسی مانند گلوکوکورتیکوئیدها و نیز آدرنالین در خون آزاد شده و سبب

گیرنده‌ها می‌توان بسیاری از اثرات تخریبی استرس مزمن را کاهش داد. در همین راستا، در این تحقیق تاثیر یک آنتاگونیست ضعیف گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی (ممانتین) بر بروز پاسخ‌های استرسی مطالعه شد. ممانتین آنتاگونیست غیر رقابتی گیرنده NMDA با میل ترکیبی کم است که در درمان بیماری آلزایمر به کار می‌رود. ممانتین مانند دیگر آنتاگونیست‌های گیرنده NMDA در غلظت‌های بالا می‌تواند مکانیسم‌های سیناپسی را که گمان می‌رود در یادگیری و حافظه نقش داشته باشد مهار کند، ممانتین هم‌چنین ممکن است موجب بروز فرآیندهای تغییرات شکل‌پذیری در مغز شود [۱۰]. از آنجایی که تاکنون تحقیقی در زمینه نقش احتمالی گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA موجود در آمیگدال بر تشدید یا کاهش اثرات متابولیک استرس مزمن در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر صورت نگرفته است ما در این مطالعه نقش گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA را توسط تجویز داروی ممانتین به صورت درون آمیگدالی بر اثرات استرس مزمن بررسی کردیم. تحقیقات متعدد نشان داده است که در آمیگدال نوعی از سوگرایی (Laterality) در انجام کارها دیده می‌شود، به این معنی که در رابطه با حافظه و یادگیری ناشی از ترس، و یا درد آمیگدال سمت راست و چپ یکسان عمل نمی‌کنند و در حالی که آمیگدال سمت راست بیش‌تر در بروز هیجان دخالت دارد، آمیگدال سمت چپ بیش‌تر در بروز حرکات ناشی از ترس و درد دخالت دارد [۱۱]. چون استرس اعمال شده در این تحقیق از نوع الکتروشوک است که به نوعی یک محرک دردزا نیز محسوب می‌شود، در این تحقیق تاثیر سوگرایی آمیگدال در این زمینه نیز مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

در این آزمایش از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI (انستیتو پاستور ایران، تهران) با میانگین وزنی  $25 \pm 5$  گرم (۶ سر در هر گروه) استفاده شد. حیوانات در قفس‌های شش تایی با دوره تاریکی و روشنایی طبیعی و در دمای  $22-24$  °C با آب و غذای کافی نگه‌داری می‌شدند. آب و

توانائی مقابله با استرس (افزایش بار آلوستاتیک = Allostatic overload) که از عوارض استرس مزمن محسوب می‌شود، باعث تحلیل نورون‌ها در هیپوکامپ و قشر جلو پیشانی می‌شود. این مناطق مغزی در حافظه، توجه و عمل‌کرد اجرایی دخالت دارند. هم‌چنین، استرس مزمن باعث تقویت نورون‌ها در آمیگدال که یک ناحیه مغزی است که در ترس و اضطراب و هم‌چنین پرخاشگری دخالت دارد می‌شود [۵]. سازمان‌دهی پاسخ به موقعیت‌های استرس‌زا نه تنها شامل فعالیت انواع مختلف سیستم‌های نوروترنسمیتری و چندین ناحیه از سیستم لیمبیک می‌شود بلکه هم‌چنین پاسخ نورون‌ها در این نواحی با چندین ماده شیمیایی و هورمون (عمدتاً گلوکوکورتیکوئیدها) که از غدد و اندام‌های محیطی آزاد می‌شود صورت می‌گیرد [۲، ۶]. یکی از مهم‌ترین مناطق مغزی که در پاسخ به محرک‌های استرس‌زا فعال می‌شود، آمیگدال است. آمیگدال مجموعه‌ای از هسته‌های متعدد کوچک با ساختاری بادامی شکل است که در عمق لوب گیجگاهی میانی و در ساختار سیستم لیمبیک قرار دارد. این ساختار به علت نقش حیاتی که در پردازش احساسی (هیجانی) دارد توجه زیادی را به خود معطوف کرده است [۷، ۸]. به نظر می‌رسد که آمیگدال به دو دلیل جزء بسیار مهمی از شبکه پاسخ به استرس مزمن باشد، اول به دلیل عصب‌دهی گسترده‌اش به ساختارهای قشری، زیر قشری و ساقه مغز و دوم به دلیل نقش مهمی که در تثبیت حافظه دارد [۷]. تحقیقات نشان داده است که محرک‌های استرس‌زا که باعث رها شدن هورمون رهاکننده کورتیکوتروپین از هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس می‌شوند می‌توانند تیرات مهمی بر دیگر ساختارهای مغزی درگیر در پاسخ‌های استرسی از جمله آمیگدال [۴، ۸، ۹] بر جای بگذارند. تحقیقات قبلی نشان داده است که اصلی‌ترین ورودی‌های آمیگدال، آکسون نورون‌های گلوتاماتی هستند که با اثر بر گیرنده‌های متابوتروپیک و آیونوتروپیک (بیش‌تر گیرنده‌های NMDA) خود که بر غشاء سلول‌های این منطقه قرار دارند، باعث تحریک آن‌ها شوند [۶]. به همین دلیل، محققان پیشنهاد داده‌اند که با مهار این

کنترل نیز به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه خاموش قرار گرفتند (حیوانات به صورت تصادفی در گروه‌های کنترل و استرس قرار گرفتند). دستورالعمل القای استرس به مدت هفت روز متوالی ادامه یافت. در این تحقیق وزن مدفوع در زمان استرس و زمان آنورکسی (زمان بی‌اشتهایی)، آب و غذای دریافتی به عنوان معیارهای متابولیکی در گروه‌های آزمایشی و کنترل در مدت هفت روز آزمایش اندازه‌گیری شد.

روش تحلیل داده‌ها: اطلاعات به دست آمده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد بیان شدند. از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه و به دنبال آن از تست توکی برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف‌ها استفاده شد.  $P < 0.05$  مرز معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد.

## نتایج

تاثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر تغییرات غذای دریافتی در حیوانات مواجه شده با استرس غیر قابل کنترل. نتایج نشان دادند که استرس منجر به کاهش میزان غذای دریافتی گردید. از سوی دیگر، تجویز داخل آمیگدالی ممانتین باعث تشدید اثر استرس به جز در دوزهای  $1 \mu\text{g}/\text{mouse}$  و  $0.5$  سمتم راست آمیگدال گردید (شکل ۱). آنالیز دو طرفه، اثر معنی‌دار ممانتین [ $F(1,60) = 1.861, P < 0.05$ ]، اثرات معنی‌دار تزریق یک یا دو طرفه [ $F(2, 60) = 1.33, P < 0.05$ ] و تعامل معنی‌دار بین آنها [ $F(10, 60) = 2.69, P < 0.05$ ] است. تفاوت بین گروه‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

تاثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر تغییرات آب دریافتی در حیوانات مواجه شده با استرس غیر قابل کنترل. در قسمت دوم این تحقیق، میزان آب دریافتی حیوانات پس از القا استرس و تاثیر ممانتین بر این روند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که استرس می‌تواند میزان آب دریافتی را افزایش دهد. از سوی دیگر، تجویز ممانتین به صورت داخل آمیگدال اندکی باعث مهار اثر استرس در میزان آب‌نوشی به جز در دوز  $0.5 \mu\text{g}/\text{mouse}$  سمتم راست

غذای هر حیوان طی آزمایش به صورت روزانه در ساعات مشخصی ثبت می‌شد.

در این تحقیق ممانتین هیدروکلراید (سیگما-آمریکا)، کتامین هیدروکلراید (سیگما-آمریکا) ( $50-75 \text{ mg}/\text{kg}$ ) و دیازپام هیدروکلراید (سیگما-آمریکا) ( $5-7 \text{ mg}/\text{kg}$ ) متناسب با وزن حیوانات توزین و در نرمال سالین حل شدند.

روش اجرای مطالعه: به منظور کانون‌گذاری در داخل آمیگدال ابتدا حیوانات با مخلوط کتامین ( $50-75 \text{ mg}/\text{kg}$ ) و دیازپام ( $5-7 \text{ mg}/\text{kg}$ ) بی‌هوش شده، سپس سر حیوان در دستگاه استریوتکس ثابت شد، با ایجاد یک شکاف یک سانتی‌متری و مشاهده نقاط برگما و لامبدا یک یا دو عدد کانون راهنما (سر سوزن شماره ۲۳)  $500 \mu$  بالاتر از آمیگدال با استفاده از مختصات اطلس پاکسینو [۱۲] (برای هسته آمیگدال  $0.8 \text{ mm}$  عقب‌تر از نقطه برگما،  $2/5 \text{ mm}$  از خط وسط و  $4/5 \text{ mm}$  پایین‌تر از سطح جمجمه) در سر حیوان قرار گرفت و کانون‌ها با استفاده از پیچ عینک و سیمان دندان پزشکی محکم شد. پس از جراحی حیوانات به مدت هفت روز در محیطی آرام دوره بهبودی را سپری کردند. جهت تزریق از سر سوزن شماره ۳۰ دندان پزشکی و لوله پلی‌اتیلنی و سرنگ هاملتون  $10 \mu\text{L}$  استفاده شد. ممانتین با حجم تزریق  $0.5 \mu\text{L}$  و  $1.0 \mu\text{L}$  (در هر طرف) به صورت درون آمیگدالی هر روز ۵ دقیقه قبل از القا استرس تجویز می‌شد و دوزهای تجویزی بر اساس تحقیقات قبلی بود [۱۳]. تزریق مغزی به آهستگی به مدت ۶۰ ثانیه به طول انجامید و در این مدت حیوانات حرکت آزادانه داشتند. سپس حیوانات جهت القای استرس به دستگاه Communication Box (ساخت شرکت برج صنعت، تهران، ایران) منتقل شدند. این دستگاه از ۹ قسمت مجزا ولی با ارتباطات دیداری، بویایی و شنیداری تشکیل شده (دیواره‌ها از جنس پلکسی‌گلاس با سوراخ‌هایی ریز به قطر ۲ میلی‌متر) و کف دستگاه دارای میله‌های استیل زنگ نزن متصل به یک ژنراتور است که ولتاژ و مدت زمان شوک توسط رایانه متصل به ژنراتور کنترل می‌شود (ولتاژ ۴۰ میلی‌ولت، فرکانس ۱۰ هرتز و به مدت ۱۰۰ ثانیه). گروه

سایر روزها با توجه به آن محاسبه شده است (درصد گیری). اطلاعات میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد برای ۶ سر حیوان است.  $P < 0.001$ .  $P < 0.001$  اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می باشد.

تاثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر زمان آنورکسی. حیوانات پس از دریافت استرس به محل های نگه داری بازگردانده می شدند و زمان لازم برای شروع غذا خوردن در آن ها به مدت هفت روز متوالی ثبت شد. نتایج نشان دادند که استرس می تواند زمان تاخیر در غذا خوردن را در حیوانات افزایش دهد. همچنین تجویز داخل آمیگدالی ممانتین در تمام دوزهای تجویزی می تواند اثرات استرس را به طور چشمگیری مهار کند (شکل ۳). آنالیز دو طرفه، اثر معنی دار ممانتین [F(1,60)=3.1, P<0.05]، اثرات معنی دار تزریق یک یا دو طرفه [F(2, 60)= 1.69, P<0.05] و تعامل معنی دار بین آنها [F(10, 60)=2.71, P<0.05] است. تفاوت بین گروهها در شکل ۳ نشان داده شده است.

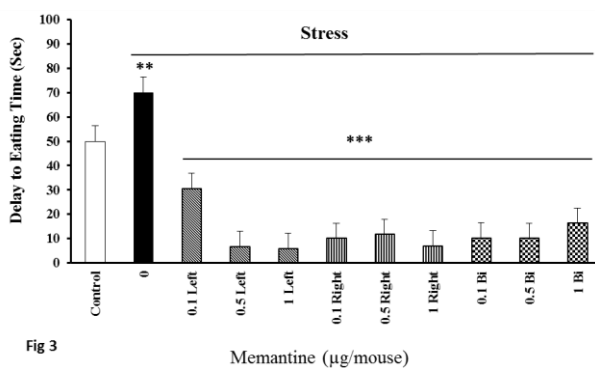


Fig 3

شکل ۳. تاثیر تجویز داخل هسته ی آمیگدال ممانتین بر زمان تاخیر در غذا خوردن ناشی از استرس مزمن. حیوانات پس از القای استرس به محل های نگه داری خود برگشت داده می شدند و زمان تاخیر در غذا خوردن آنها به مدت هفت روز متوالی اندازه گیری شد. استرس موجب افزایش زمان تاخیر در غذا خوردن شد و تجویز ممانتین به صورت داخل آمیگدال باعث مهار اثر استرس بر این متغیر گردید و زمان تاخیر در غذا خوردن را در تمام دوزهای مصرفی و تزریقات یکطرفه و دو طرفه داخل آمیگدالی کاهش داد. اطلاعات میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد برای ۶ سر حیوان است.  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل است.

آمیگدال شد (شکل ۲). آنالیز دو طرفه، اثر معنی دار ممانتین [F(1,60)=3.01, P<0.05]، اثرات معنی دار تزریق یک یا دو طرفه [F(2, 60)= 2.11, P<0.05] و تعامل معنی دار بین آنها [F(10, 60)=2.41, P<0.05] است. تفاوت بین گروهها در شکل ۲ نشان داده شده است.

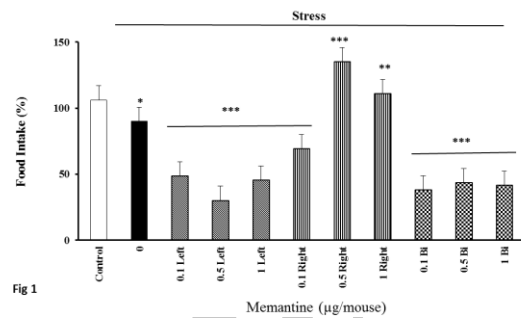


Fig 1

شکل ۱. تاثیر تجویز داخل هسته ی آمیگدال ممانتین بر میزان غذایی دریافتی حیوانات پس از القای استرس مزمن. حیوانات هر روز پس از القای استرس به محل های نگه داری خود برگشت داده می شدند و میزان غذایی دریافتی آنها در ۲۴ ساعت بعد به مدت هفت روز متوالی اندازه گیری شد. همان طور که در شکل می بینید، استرس موجب کاهش غذایی دریافتی شد. تجویز ممانتین به صورت داخل هسته آمیگدال از کاهش تغذیه توسط استرس در دوزهای ۰/۵ و ۱  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  سمت راست آمیگدال جلوگیری کرده است. نتایج حاصل برای گروه ها در روز اول برابر ۱۰۰ در نظر گرفته شده و برای سایر روزها با توجه به آن محاسبه شده است (درصد گیری). اطلاعات میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد برای ۶ سر حیوان است.  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می باشد.

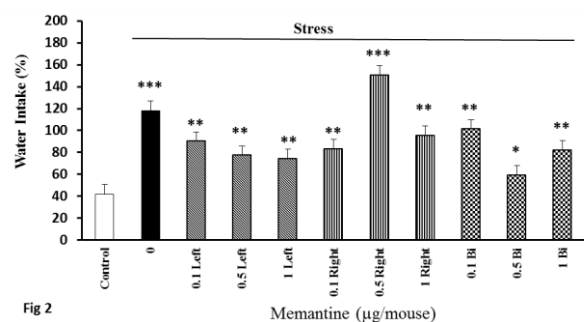


Fig 2

شکل ۲. تاثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر میزان آب دریافتی حیوانات پس از القای استرس مزمن. حیوانات هر روز پس از القای استرس به محل های نگه داری خود برگشت داده می شدند و میزان آب دریافتی آنها در ۲۴ ساعت بعد به مدت هفت روز متوالی اندازه گیری شد. همان طور که در شکل می بینید استرس موجب افزایش آب نوشی گردید. تجویز ممانتین به صورت داخل آمیگدال از پرنوشی ناشی از استرس به جز در دوز ۰/۵  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  سمت راست جلوگیری کرده است. نتایج حاصل برای گروه ها در روز اول برابر ۱۰۰ در نظر گرفته شده و برای

حدودی مشخص شد. تحقیق حاضر نشان داد که استرس مزمن می‌تواند موجب کاهش غذای دریافتی و افزایش آب مصرفی شود و همچنین باعث افزایش زمان تاخیر در غذا خوردن و افزایش میزان دفع مدفوع گردد. از سوی دیگر، تحقیق ما نشان داد که تجویز مزمن ممانتین به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی [۱۴] در آمیگدال باعث مهار اثرات استرس مزمن گردید که این امر بیانگر این است که گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA در آمیگدال تاثیر مهمی را در مهار اثرات استرس مزمن دارد. این اثرات به صورت وابسته به دوز و وابسته به محل تزریق بود که نشان‌دهنده سوگیری در آمیگدال چپ و راست در پاسخ به استرس در شرایط مهار گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA است.

الفا استرس منجر به تحریک فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق کلیه (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis, HPA) و در نتیجه قرار گرفتن قسمت‌های مختلف بدن از جمله مغز در معرض غلظت بالایی از هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی (در انسان کورتیزول و در موش کورتیکوسترون) می‌شود که ممکن است این امر نقش بالقوه‌ای در چاقی احشایی داشته باشد [۱۵]. محور HPA نه تنها مسئول پاسخ نورآندوکراین به استرس است بلکه هم‌چنین در تنظیم آندوکرینی اشتها نقش اساسی دارد [۱۵]. تحقیقات نشان داده‌اند که استرس مزمن با افزایش ترشح گلوکوکورتیکوئیدها از غده فوق کلیه موجب کاهش وزن بدن در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی می‌گردد در حالی که در انسان این امر ممکن است منجر به افزایش مصرف مواد غذایی و اضافه وزن و یا کاهش مصرف غذا و از دست دادن وزن می‌شود [۱۶]. این کاهش تغذیه به دلیل فعال شدن محور استرسی HPA در حیوان استرس دیده و در نتیجه افزایش ترشح CRF از هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس می‌باشد که به کاهش تمایل به تغذیه منجر می‌شود. محققان دیگر دریافتند که در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی مقادیر بالای گلوکوکورتیکوئیدها، ترشح هورمون رشد را مهار کرده و به دنبال آن رشد خطی حیوان به تاخیر می‌افتد. هم‌چنین این

تاثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر میزان دفع مدفوع. در قسمت آخر این تحقیق، میزان مدفوع دفع شده توسط حیوانات در زمان القاء استرس شوک الکتریکی کف پا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که استرس می‌تواند میزان دفع را در طول القاء استرس افزایش دهد. تجویز داخل آمیگدالی ممانتین اثر استرس را به صورت وابسته به دوز و سمت تزریق مهار و یا تقویت کرد (شکل ۴). آنالیز دو طرفه، اثر معنی دار ممانتین [F(1,60)=1.85, P<0.05]، اثرات معنی دار تزریق یک یا دو طرفه [F(2, 60)= 1.33, P<0.05] و تعامل معنی دار بین آنها [F(10, 60)=2.51, P<0.05] است. تفاوت بین گروهها در شکل ۴ نشان داده شده است.

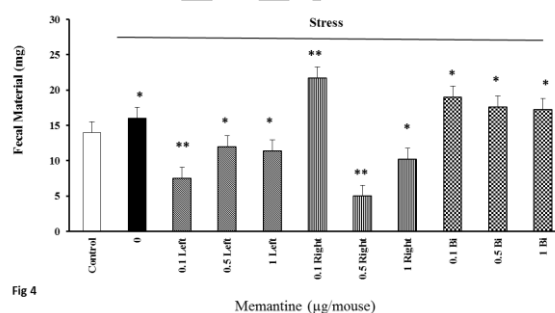


Fig 4

شکل ۴. تاثیر تجویز مزمن داخل هسته ی آمیگدالی ممانتین بر میزان مدفوع حیوانات پس از القای شوک الکتریکی کف پا. میزان دفع مدفوع حیوانات در حین القاء استرس و مدت زمان قرار گیری در دستگاه استرس هر روز اندازه گیری شد. استرس موجب افزایش دفع مدفوع شد و تجویز ممانتین به صورت وابسته به دوز و محل تزریق موجب مهار و یا تقویت اثرات استرس در میزان دفع گردید. اطلاعات میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد برای ۶ سر حیوان است.  $P < 0.05$  \* و  $P < 0.01$  \*\* اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می باشد

## بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق تاثیر استرس مزمن غیر قابل اجتناب بر فاکتورهای مهم متابولیکی مانند تغذیه و آنورکسی (تاخیر در غذا خوردن بررسی شد. هم‌چنین تاثیر تجویز ممانتین در آمیگدال (به عنوان مهم‌ترین ناحیه پاسخگو به استرس در مغز) بر اثرات استرس بررسی شد. نتایج تحقیق تاثیر استرس و نیز تداخل ممانتین در اثرات استرس را به‌خوبی نشان داد. از سوی دیگر، وجود سوگیری در عمل‌کرد ممانتین و نیز تا

عدم توزیع یکسان، باعث بروز اثرات متفاوت در آمیگدال چپ و راست می‌شود. لازم به توضیح است که عدم توزیع متقارن گیرنده‌های نوروترانسمیترها در نقاط دیگر دستگاه عصبی هم دیده شده است [۲۵].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استرس می‌تواند به القاء پرنوشی در حیوانات منجر شود. افزایش مصرف آب پس از استرس در اثر فعالیت محور HPA و در نتیجه تحریک ترشح هم‌زمان CRF و نوروهورمون وازوپرسین (VP) از نورون‌های پاراوتریکولار هیپوتالاموس است [۲۶]. تحقیق حاضر نشان داد که این اثر استرس نیز با تجویز ممانتین به صورت مرکزی در آمیگدال به جز در دوز  $0.5 \mu\text{g}/\text{mouse}$  در آمیگدال راست کاهش می‌یابد اما کاملاً از مهار نمی‌شود. تفاوت نسبی بین پاسخ در آمیگدال سمت راست و چپ ممکن است نشان‌دهنده جانبی‌گرایی نسبی این بخش از دستگاه عصبی باشد. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی به صورت پیش و پس سیناپسی وجود دارند و تحریک هر کدام از این نوع گیرنده‌ها ممکن است اثرات متفاوتی را از خود نشان دهند [۲۷]. از سوی دیگر، هم‌چنان‌که گفته شد، ممانتین ممکن است سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری موجود در آمیگدال مانند سیستم نورآدرنژیک را هم درگیر کند و به همین دلیل، ممکن است بخشی از نتایج دیده شده مرتبط با این سیستم باشد. با توجه به این گفته‌ها، در یک جمع‌بندی به نظر می‌رسد که نوعی از سوگیری در پاسخ سیستم گلوتاماتی به استرس در آمیگدال وجود دارد. از سوی دیگر، ممکن است ممانتین انواع متفاوتی از گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی در مجموعه آمیگدال را تحت تاثیر قرار داده باشد و در نتیجه اثرات متفاوتی از این دارو دیده شده باشد. هم‌چنین نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد که سیستم گلوتاماتی در مجموعه آمیگدال در کنترل میزان آب دریافتی حیوان دخالت دارد و این دخالت از طریق گیرنده‌های NMDA انجام می‌گردد. و یا این‌که ممکن است سیستم نورآدرنژیک آمیگدال در این پاسخ‌ها نقش داشته باشد.

وضعیت جریان عصبی سمپاتیکی را کاهش داده و تجمع برخی از انواع چربی را کاهش می‌دهد [۱۷-۱۹]. بایستی اشاره کرد که تفاوت‌های جنسی در این خصوص وجود دارد و برخی پژوهش‌ها نشان دادند که در زمان استرس مصرف مواد غذایی به ویژه در جنس ماده بیش‌تر می‌شود [۲۰]. در این تحقیق، تجویز داخل آمیگدالی ممانتین به آمیگدال چپ اثر استرس را بر کاهش تغذیه تشدید کرد. این اثر جالب یعنی تقویت اثر استرس نشان می‌دهد که سیستم گلوتاماتی در آمیگدال سمت چپ احتمالاً باعث مهار اثرات ضد استرسی آمیگدال می‌شود و مهار آن اثر استرس را تشدید می‌کند. تحقیقات قبلی نشان داده است که بیش‌ترین نورون‌های موجود در آمیگدال از نوع گابا و مهاری هستند [۲۱]. تحریک این نورون‌ها (مثلاً توسط ورودی‌های گلوتاماتی) باعث افزایش تون مهاری گابا در آمیگدال شده و می‌تواند به تقویت اثر ورودی‌های آمیگدالی منجر شود و این تقویت وابسته به جنس نیز می‌باشد [۲۲]. احتمالاً ممانتین با مهار گیرنده‌های گلوتاماتی در این نورون‌ها باعث کاهش تحریک این نورون‌ها و مهار اثراتی مهاری آن‌ها (مهار مهار) شده و این امر به تشدید اثرات استرس منجر شده است. بایستی در نظر داشت که ممانتین علاوه بر مهار گیرنده‌های NMDA می‌تواند بر سیستم‌های نورآدرنژیک و سروتونینرژیک مغز نیز موثر باشد [۲۳، ۲۴]. از آن‌جا که مکانیسم‌های نورآدرنژیک در آمیگدال یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های پاسخگوئی در استرس محسوب می‌شوند، ممکن است اثرات دیده شده از ممانتین به دلیل تاثیر این دارو بر سیستم آدرنژیک باشد. در این تحقیق هم‌چنین مشخص شد که اثر ممانتین در آمیگدال سمت راست کاملاً معکوس آمیگدال سمت چپ بوده و اثرات استرس مزمن در کاهش غذای دریافتی را مهار می‌کند. این اثر وابسته به دوز بود و با افزایش دوز ممانتین، این اثر بیش‌تر شد. اولین نکته از این قسمت تحقیق، سوگیری پاسخ آمیگدال چپ و راست در بروز رفتار تغذیه‌ای در موش‌ها بود. آن‌چه که از این تحقیق بر می‌آید این است که احتمالاً توزیع گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی در دو آمیگدال چپ و راست یکسان نیست و این

ممانتین، نقش ورودی‌های گلوتاماتی نیز خنثی شده، ترشح CRF در حین استرس افزایش نیابد و آنورکسی ناشی از استرس کاهش یابد. در نظر گرفتن جمیع جهات به نظر می‌رسد که ورودی‌های گلوتاماتی به هسته‌های قاعده‌ای جانبی آمیگدال که در هنگام استرس فعال می‌شوند در بروز آنورکسی نقش مهم‌تری دارند به خصوص که تجویز آنتاگونیست گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA در آمیگدال توانست اثر استرس را در تحقیق ما به طور کامل مهار کند. هم‌چنین به نظر می‌رسد که مکانیسم‌هایی که در هنگام استرس برای تغذیه، نوشیدن آب و آنورکسی فعال می‌شوند تا حدودی با هم تفاوت دارند. به این ترتیب که در تحقیق ما مشخص گردید که پاسخگویی آمیگدال چپ و راست و هم‌چنین پاسخ به دوزهای متفاوت ممانتین در این نواحی در سه رفتار فوق یکسان نبود و این تفاوت‌ها احتمالاً نشان‌دهنده تفاوت در طبیعت این رفتارها و مکانیسم‌های درگیرشونده در آن‌ها می‌باشد.

در آخرین بخش از مطالعه حاضر، مشخص شد که استرس توانست دفع مدفوع را در حیوانات افزایش دهد که این امر با نتایج قبلی هم‌خوانی دارد [۳۳]. محققان نشان دادند که با القا استرس مسیرهای عصبی سمپاتیک و پاراسمپاتیک فعال شده و واکنش‌هایی مانند افزایش ضربان قلب، فشار خون، تنفس، فعالیت لوله گوارش و دفع ادرار و مدفوع از نشانه‌های فعالیت این سیستم‌ها می‌باشد [۳۳، ۳۱]. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که استرس می‌تواند باعث افزایش فعالیت گلوتاماتی در هسته‌های قاعده‌ای جانبی آمیگدال شده و این فعالیت باعث افزایش ترشح CRF در بخش‌های هدف این هسته‌ها به خصوص در ساقه مغز شوند [۳۱]. این افزایش فعالیت بر هسته‌های سمپاتیک و پاراسمپاتیک ساقه مغز اثر گذاشته و به صورت فردی ممکن است فعالیت یکی از این بخش‌ها یا هر دو آن‌ها را افزایش دهد [۳۳]. این افزایش فعالیت با رفتارهایی نظیر دفع مدفوع نشان داده می‌شوند. تحقیق ما نشان داد که تجویز ممانتین با دوزهای مختلف به آمیگدال چپ باعث کاهش دفع مدفوع در حیوانات می‌گردد در حالی

تحقیق در مورد هر یک از این فرضیات، مجال دیگری را می‌طلبد.

در ادامه نتایج مشخص شد که استرس باعث افزایش زمان شروع غذا خوردن (به عنوان نمادی از آنورکسی) در حیوانات می‌شود که این نتیجه با نتایج دیگر محققین هم‌خوانی دارد [۲۸]. محققان نشان داده‌اند که CRF ترشح شده از هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس عامل مهمی در القاء آنورکسی ناشی از استرس است [۲۹]. به همین دلیل مهار رها شدن CRF از این هسته را به عنوان نمادی از کاهش آنورکسی ناشی از استرس بیان کرده‌اند [۲۹]. برخی محققان معتقدند که CRF با اثر بر گیرنده‌های نوع ۱ خود که در هسته‌های مسئول تغذیه در هیپوتالاموس وجود دارد باعث مهار این هسته‌ها و القا بی‌اشتهایی می‌شود [۱۷]. بنابر نظریه دیگر، نوراپی‌نفرین رها شده در حین استرس با تحریک رها شدن نوروپپتید Y این اثر را در هسته سیری در هیپوتالاموس القا می‌کند [۳۰]. البته بایستی گفت که ممکن است مسیرهای CRF از هسته‌های قاعده‌ای جانبی آمیگدال به مناطق منوآمیینی ساقه مغز نیز در این پدیده دخالت داشته باشد [۳۱]. ورودی‌های گلوتاماتی به هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس که از مناطقی مانند قشر جلو پیشانی منشأ می‌گیرند، نقش مهمی در تحریک نورون‌های هسته پاراونتریکولار و در نتیجه افزایش رها شدن CRF از این نورون‌ها در حین استرس دارند [۳۲]. به همین دلیل مهار این ورودی‌های گلوتاماتی می‌تواند عامل مهمی در کاهش CRF و در نتیجه مهار استرس باشد. در ادامه تحقیق، تجویز ممانتین به صورت داخل آمیگدالی در تمام دوزها و به صورت یک طرفه و دو طرفه توانست به صورت چشمگیری باعث مهار اثرات استرس در القا آنورکسی شده و زمان تاخیر در غذا خوردن را کاهش دهد. نکته مهم در این قسمت این بود که اثر ممانتین بدون وابسته به دوز بود و نیز، سوگیری در این قسمت دیده نشد. با توجه به آنچه در فوق در مورد نقش مهم ورودی‌های گلوتاماتی به هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس در القاء ترشح CRF در حین استرس گفته شد، بدیهی به نظر می‌رسد که با مهار گیرنده‌های گلوتاماتی توسط

[14] Maeng S, Zarate C. The role of glutamate in mood disorders: Results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Curr Psychiatry Rep* 2007; 9: 467-474.

[15] Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 2007; 91: 449-458.

[16] Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 11696-11701.

[17] Rodgers BD, Strack AM, Dallman MF, Hwa L, Nicoll CS. Corticosterone regulation of insulin-like growth factor I, IGF-binding proteins, and growth in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1995; 44: 1420-1425.

[18] Strack AM, Horsley CJ, Sebastian RJ, Akana SF, Dallman MF. Glucocorticoids and insulin: complex interaction on brown adipose tissue. *Am J Physiol* 1995; 268: R1209-R1216.

[19] Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 1995; 268: R142-R149.

[20] Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 2007; 91: 449-458.

[21] Duvarci S, Pare D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 2014; 82: 966-980.

[22] Farrell MR, Sengelaub DR, Wellman CL. Sex differences and chronic stress effects on the neural circuitry underlying fear conditioning and extinction. *Physiol Behav* 2013; 122: 208-215.

[23] Chen HS, Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 2006; 97: 1611-1626.

[24] Lipton SA, Rosenberg RA. Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway in neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330: 613-622.

[25] Feldman S, Conforti N, Weidenfeld J. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 1995; 19: 235-240.

[26] Aguilera G. HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. *Exp Gerontol* 2011; 46: 90-95.

[27] Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, Baldessarini RJ. Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: Comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synapse* 1998; 30: 227-235.

[28] Merali Z, Graitson S, Mackay JC, Kent P. Stress and eating: a dual role for bombesin-like peptides. *Front Neurosci* 2013; 7: 193.

[29] Stengel A, Taché Y. CRF and urocortin peptides as modulators of energy balance and feeding behavior during stress. *Front Neurosci* 2014; 8: 52.

[30] Duan Y, Zhang R, Zhang M, Sun L, Dong S, Wang G, et al. Metformin inhibits food intake and neuropeptide Y gene expression in the hypothalamus. *Neural Regen Res* 2013; 8: 2379-2388.

[31] Jedema HP, Grace AA. Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus recorded in vitro. *J Neurosci* 2004; 24: 9703-9713.

[32] Marek R, Strobel C, Bredy TW, Sah P. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J Physiol* 2013; 591: 2381-2391.

[33] Rao SS, Hatfield RA, Suls JM, Chamberlain MJ. Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 985-990.

[34] Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 332-339.

که تجویز دارو به آمیگدال راست وابسته به دوز باعث تقویت یا مهار اثرات استرس در دفع مدفوع می‌شود. این یافته می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت در هم‌گیرنده‌های NMDA موجود در مجموعه آمیگدال و نیز می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت در آمیگدال چپ و راست در پدیده دفع مدفوع ناشی از استرس در این حیوانات باشد.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب

دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام شد.

## منابع

[1] Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* 1950; 1: 1383-1392.

[2] Mora F, Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res* 2012; 1476: 71-85.

[3] Koob GF. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 1167-1180.

[4] McEwen BS. Central effect of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J pharmacol* 2008; 583: 174-185.

[5] McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation central role of the brain. *Physiol Rev* 2007; 87: 873-904.

[6] Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 2007; 83: 803-83.

[7] McGaugh JL. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 2002; 25: 456-461.

[8] Winsky-Sommerer R, Boutrel B, deLecea L. Stress and arousal: the corticotrophin-releasing factor/hypocretin circuitry. *Mol Neurobiol* 2005; 32: 285-294.

[9] Vyas A, Mitra R, Rao BSS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 6810-6818.

[10] Babic S, Ondrejckova M, Bakos J, Racekova E, Jezova D. Cell proliferation in the hippocampus and in the heart is modified by exposure to repeated stress and treatment with memantine. *J Psychiatr Res* 2012; 46: 526-532.

[11] Baas D, Aleman A, Kahn RS. Lateralization of amygdala activation: a systematic review of functional neuroimaging studies. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45: 96-103.

[12] Paxinos G, Franklin KBJ. Editors. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 2001.

[13] Bagheri Nikoo GR, Khosravi M, Sahraei H, Ranjbaran M, Sarahian N, Zardooz H, et al. Effects of systemic and intra-accumbal memantine administration on the effects of electro foot shock in male NMRI mice. *Physiol Pharmacol* 2014; 18: 61-71.



## Effects of intra-amygdala memantine infusion on metabolic symptoms induced by chronic stress in male NMRI mice

Bahareh Sadeghi (MSc)<sup>1</sup>, Hedayat Sahraei (PhD)<sup>2</sup>, Homeira Zardoos (PhD)<sup>3</sup>, Hengameh Alibeik (PhD)<sup>1</sup>, Nahid Sarahian (MSc)<sup>1</sup>

1 - *Depat. of Biology, Islamic Azad University, North Tehran branch, Tehran, Iran.*

2 - *Neuroscience Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

3 - *Depat. of Physiology, School of Medicine, ShahidBeheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

(Received: 24 May 2014; Accepted: 3 Jan 2015)

**Introduction:** Pervious studies indicate an important role for amygdala in stress. In addition, glutamate inputs to the amygdala are activated during stress. In the present study, the effects of amygdala NMDA glutamate receptors inhibition on metabolic symptoms induced by chronic stress in male NMRI mice were investigated.

**Material and Methods:** Intra-amygdala uni- or bi-lateral cannulations were performed. Seven days after recovery from surgery animals received different doses of memantine (0.1, 0.5 and 1  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) five minutes before inducing stress. Stress was applied for seven consecutive days. Changes in the amount of food and water intake and delay in eating and defecation were considered as indicators for stress.

**Results:** Stress reduced food, while increased water intake and delayed the time of eating and defecation. Intra-amygdala memantine injections exacerbated the effects of stress on food intake except with the medium and high doses in the right side of the nucleus. Memantine also inhibited the effects of stress on water intake except with the medium doses in the right side. Also, reduced delay in the time of eating significantly. On the other hand, memantine inhibited or increased effects of stress on defecation, in a dose- and side- dependent manner.

**Conclusion:** Stress activates glutamatergic systems in the amygdala and impacts the metabolic functions. This effect is probably based on the concentration and the side of neurotransmitter action in the nucleus.

**Key Words:** N-Methyl-D-Aspartate receptors, Amygdala, Stress, Memantine

\* Corresponding author: Tel: +98 21 26127286

h.sahraei@bmsu.ac.ir