فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۴، شماره ۱، بهار و تابستان ۷۹
Archive of SID

بررسی اثر تزریق ال ـ آرژینین و L-NAME در هستهٔ آکومبانس موش بزرگ آزمایشگاهی نر بر ایجاد و رفع ترجیح مکان شرطی شده

مریم نوربخش نیا[۱]، علی حائری روحانی[۱]، حوری سپهری[۱]، سیروس جلیلی[۳]، حسن قشونی[۲]، هدایت صحرائی[۲]
۱- دانشگاه تهران، دانشکدهٔ علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری
۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک
۳- دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه تشریح

چکیده

هستهٔ آکومبانس بعنوان یک مرکز مهم در ایجاد وابستگی روانی شناخته شده است. با توجه به اینکه غلظت بالائی از آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در این هسته یافت گردیده واز سوی دیگر نقش نیتریک اکساید در کسب و بیان وابستگی روانی به داروهای مخدر مورد تأکید قرار گرفته است، در این تحقیق اثر تزریق داخل هسته آکومبانس ال ـ آرژینین (بعنوان پیشساز نیتریک اکساید) و L-NAME (N-ω-nitro-L-arginine methyl ester) و آمینوبیگوانیدین (بعنوان مهارگران آنزیم نیتریک اکساید سنتاز) در القای ترجیح مکان شرطی شده در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از موش‌های نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. پس از جراحی و کانول گذاری و طی زمان لازم برای بهبودی، به حیوان مقادیر متفاوتی از ال ـ آرژینین، L-NAME یا آمینوبیگوانیدین بصورت داخل هسته ای تزریق و مراحل شرطی سازی انجام می شد. نتایج بدست آمده نشان می دهد که: ال ـ آرژینین در مقادیر ۰/۳ µg/Rat و ۱ و ۳ قادر به القای ترجیح مکان شرطی شده می باشد. تجویز حاد L-NAME (۵۰mg/kg) سبب کاهش ترجیح مکان شرطی شده توسط ال ـ آرژینین می شود در حالیکه تجویز مزمن آن در مقادیر مختلف (۱۰mg./kg و ۵۰ و ۲۰۰) اثری را بر کار ال ـ آرژینین در القای ترجیح مکان شرطی شده نشان نداد. تزریق داخل هسته آکومبانس آمینوبیگوانیدین و L-NAME اثری در القای ترجیح مکان شرطی شده و یا تنفر مکان شرطی شده در مقادیر بکار رفته (۰/۳ µg/Rat و ۱ و ۳) ندارد. از این آزمایشات نتیجه می گیریم که تزریق داخل آکومبانسی ال ـ آرژینین قادر به القای ترجیح مکان شرطی شده می باشد.

واژه‌های کلیدی: ال ـ آرژینین، آمینوبیگوانیدین، L-NAME، ترجیح مکان شرطی شده، موش بزرگ آزمایشگاهی

مقدمه

انتقال عصبی دوپامین در سیستم مزولیمبیک و بویژه در هسته آکومبانس عموماً به عنوان هدف اصلی داروهای مخدر در بروز سرخوشی شناخته شده است [۹]. در حقیقت اکثریت قریب به اتفاق داروهایی که توسط انسان مورد استفاده واقع می شوند، انتقال دوپامین در هسته آکومبانس را تحریک می کنند که این ویژگی به

www.SID.ir

خصوصیات مخدری آنها ارتباط داده شده است [٤].

اجسام سلولی سیستم دوپامینرژیک از ناحیهٔ تگمنتوم شکمی [1] (VTA) منشاء گرفته (که معمولاً به عنوان نرون‌های A10 کاتکول امینی طبقه بندی می‌شوند) و به نواحی جلو مغزی [2] و عمدتاً به هستهٔ آکومبانس، پیاز بویایی، کورتکس پری فرونتال، آمیگدالا و دیواره‌های سپتال ختم می‌شوند [٣]. نقش هستهٔ آکومبانس در ایجاد و تداوم وابستگی روانی به داروهای مخدر مختلف توسط پژوهشگران مورد تحقیق قرارگرفته است [١٠]. این هسته بعنوان محل تبدیل احساس به حرکت نقش مهمی را در انجام رفتارهای برانگیخته شده توسط داروهای مخدر بازی می کند [١٣]. اخیراً مشخص شده که در این هسته غلظت بالائی از آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) یافت می‌شود [٥] و این آنزیم مسئول تولید نیتریک اکساید از ال ـ آرژینین در دستگاه عصبی مرکزی می باشد [٨]. تحقیقات قبلی نشان دهندهٔ نقش نتیریک اکساید در کسب و پایداری وابستگی روانی به داروهای مخدر مختلف درمدل های متفاوت مطالعهٔ وابستگی روانی می باشد [١٢،٧،٢،١]. با توجه به مطالب فوق، در این تحقیق بر آن شدیم تا اثر تزریق داخل هستهٔ آکومبانس ال ـ آرژینین (بعنوان پیشساز تولید نیتریک اکساید) و L-NAME یا آمینوبیگوانیدین [بعنوان مهارگر نیتریک اکساید سنتاز (NOS)] را در القاء ترجیح مکان شرطی شده در موش سفید بزرگ آزمایشگاهی بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این تحقیق از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر، نژاد Wister (که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند) با میانگین وزنی ٣٠٠-٢٥٠ گرم استفاده شد.

حیوانات در گروههای ٦-٥ تایی نگهداری شده و از آب و غذای مخصوص (پلت) (بجز در زمان آزمایش) برخوردار بودند. حیوانات دورهٔ روشنایی طبیعی داشته و در دمای ٢٤-٢٢ درجه سانتیگراد نگهداری می شدند. هر حیوان تنها یک بار مورد استفاده قرار می‌گرفت.

داروها: داروهای بکار رفته در این پژوهش عبارت بودند از: ال ـ آرژینین، L-NAME، پنتوباربیتال سدیم (تهیه شده از شرکت سیگما ـ آمریکا). به منظور تزریق داخل صفاقی، داروها در نرمال سالین حل شده و بصورت ١ml/kg به حیوانات تزریق می شدند. برای تزریق داخل هستهٔ آکومبانس، این داروها در مایع مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF) حل شده و در حجم ١ µl/Rat به حیوانات تزریق می شد.

جراحی: حیوانات بوسیله تزریق داخل صفاقی محلول پنتوباربیتال سدیم (٤٠mg/kg) بیهوش شده و به کمک دستگاه استریوتاکسی یک کانول راهنما بطول ٤/٦ میلی متر بصورت یک طرفه در داخل جمجمهٔ آنها قرار گرفته و توسط دو عدد پیچ و آکریل دندانپزشکی در جای خود محکم می‌شد. مشخصات محل کارگزاری کانول از روی اطلس استریوتاکسی پاکسینو، A=١/٧، L=٠/٨، V=٤/٦ می‌باشد [١٢]. تزریق توسط یک سرنگ هامیلتون که با رابط پلی اتیلنی به یک سر سوزن شمارهٔ ٣٠ وصل بود انجام می‌شد. طول سر سوزن طوری انتخاب می‌شد که ٣ میلی‌متر از انتهای کانول راهنما بیرون بزند. پس از جراحی به هر موش ٥ روز برای بهبودی زمان داده می‌شد و سپس آزمایشات آغاز می‌شد.

شبکه: برای انجام آزمایش ترجیح مکان شرطی شده (CPP) از قفس مخصوصی از جنس پلاکسی گلاس استفاده شد [٦]. این قفس از سه قسمت یا سه خانه (Compartment) مجزا تشکیل شده که دارای ابعاد مساوی ٣٥×٣٥×٤٠ (ارتفاع، طول، عرض) سانتی متر

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

بوده و با زاویهٔ ۱۲۰ درجه نسبت به هم قرار مـی‌گیرند و هر قسمت توسط یـک درب کشـوئی از دیگـر قسـمت‌ها جدا می‌شود. برای تقویت ترجیح مکان ایجاد شده در هـر قسـمت از محرک‌هـای حسـی (بینـائی، لامسـه، بویـایی) متفاوت استفاده شد به این معنی که: دیواره‌ها رنـگ سـفید داشت ولی در هر قسمت دارای تزئینات متفاوت نسبت به دو قسمت دیگر بوده و کف یکی از قسـمت‌ها مشـبک و کف قسمت دوم زبر و کف قسمت سوم صـاف می‌باشـد. در یکـی از قسـمت‌ها از بـوی اسـید اسـتیک ۱۰٪ و در قسمت دیگر از بوی عطر و در قسمت سوم از بوی سالین (بدون بو) استفاده شد.

روش کـار : بـرای انجـام آزمـایش CPP بـه روش Hand عمل شد [٦]. طول هر دوره مطالعه چهار روز بود و جهت مطالعه هر دوز از داروهای موردنظر، یـک گـروه موش (n=٦) انتخاب شد. هر موش در روز اول بـه مـدت ۱۰ دقیقه آزادانـه در قسـمت‌های مختلـف قفـس گـردش می‌کرد و اگر در طی این مـدت بیـش از ٦٠٪ زمـان را در یک قسمت صـرف می‌کـرد، آن قسـمت بعنـوان قسـمت ترجیحی درنظر گرفته می‌شد. برای موش‌هـائی کـه در دو قسمت بصورت تقریباً مساوی بسر می‌بردند، قسمت سـوم (کـه معمـولاً کمـتر از ۱۰٪ زمـان در آن سـپری می‌شـد)، بعنوان قسمت تنفری درنظر گرفته می‌شـد. شـرطی شـدن نسبت به بخش ترجیحی (یـا تنفـری) انجـام نمی‌شـد. در روز دوم به حیوان دارو تزریق شده و به مـدت ۲۰ دقیقـه در یکی از دو قسمت باقی مانده قرار مـی‌گرفـت. در روز سوم حیوان سالین دریافت کرده و به مـدت ۲۰ دقیقـه در قسمت باقی مانده دیگر قـرار مـی‌گرفـت. در روز چـهارم درب دو قسمت دریافت دارو و سـالین برداشـته شـده و حیوان به مدت ۱۰ دقیقه در این دو قسمت آزادانه حرکت می‌کرد. مدت زمان توقف حیوان در هر قسمت ثبت شـده و میانگین آن بعنوان زمان ترجیح مکان محاسبه می‌شد. بـه منظور بررسی اثر تجویز حاد مهارگران NOS بـر کـار ال ـآرژینیـن، داروهـا در روز آزمـایش بـه حیوانـاتی کـه در روزهای آموزش ال ـ آرژینین دریافت کرده بودند، تزریـق شد. برای بررسی اثر تجویز مزمن مهارگران NOS بر کـار ال ـ آرژینین، این داروها در روزهای آموزش به همـراه ال ـ آرژینین به حیوانات تزریق می‌شد.

آنالیز آماری: در این مطالعه زمان صرف شـده در قسـمت دریـافت دارو (CPP Time) بعنـوان شـاخصی جـهت ارزیابی ترجیح مکانی درنظر گرفتـه شـد. بـرای تجزیـه و تحلیـل آمـاری گروهـهای کنـترل‌وگروهـهای تجربـی از Unpaired t-test، آنـالیز واریـانس یکطرفـه و یـا تسـت کروسـکال – والیـس اسـتفاده گردیـد. نتـایج بصـورت mean±SEM زمان CCP بیـان شـد و در تمـامی مـوارد P< ۰/۰۵ بعنوان مـرز معنـی دار بـودن تفاوت‌هـا درنظـر گرفته شد.

نتایج

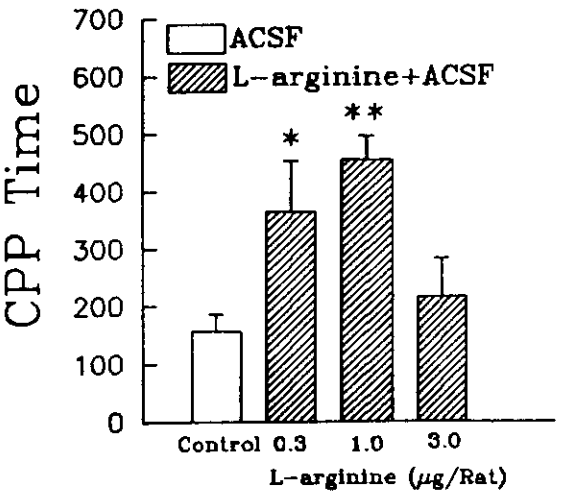
الف: اثـر ال ـ آرژینیـن : تزریـق ال ـ آرژینیـن بـه داخل هسته آکومبانس در مقادیر ۰/۵ و ۱ و ۳ µg/rat، سبب ایجاد ترجیح مکان شرطی شده در موش گردید. (KW=۹/۵۵ ،P<۰/۰۵)، (شکل ۱).

ب: اثر L-NAME : تزریق L-NAME به داخل هسـته آکومبانس در مقادیر ۰/۲ و ۱ و ۳ µg/rat ، ترجیـح مکـان شرطی شده معنی داری را نسبت بـه گـروه کنـترل ایجـاد نکرد [(F(=۳،۲۰)=۰/۱۳ ،P=۰/۳)] (شکل ۲).

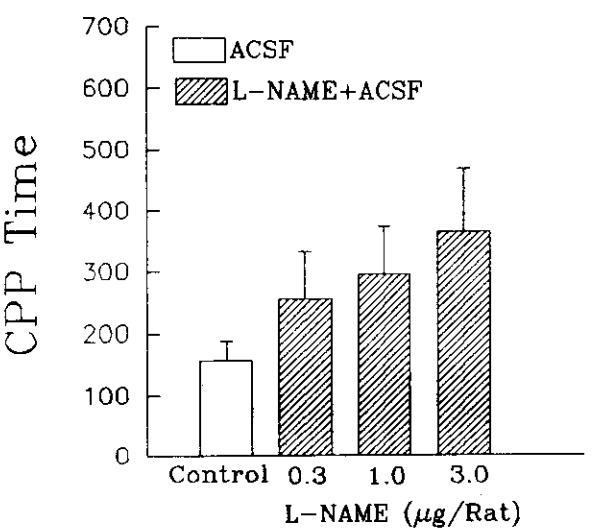
ج: اثر آمینوبیگوانیدیـن : تزریـق آمینوبیگوانیدیـن بـه داخل هسته آکومبانس در مقادیر ۰/۲ و ۱ و ۳ میکـروگـرم به ازای هر موش، ترجیح مکان شرطی شده معنـی داری را

www.SID.ir

نسبت به گروه کنترل ایجاد نکـرد (KW=۲/۲٤٥ ،P=۰/۵) (شکل ۳).



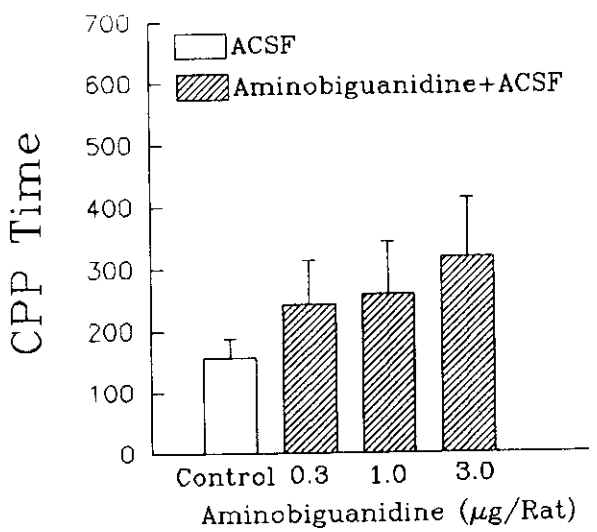
شکل ۱- مقایسه اثر تجویز داخل هسته آکومبانس دوزهای مختلف ال ـ آرژینین با گروه کنترل (n=٦، داده هـا بصـورت mean±SEM ، *P<۰/۰۵ ، **P<۰/۰۱)



شکل ۲- اثر تزریق داخـل هسـته آکومبـانس داروی L-NAME در القاء ترجیح مکان شرطی شده (n=٦ ، داده ها بصورتmean±SEM).

د: اثر تزریق حاد L-NAME بر ترجیح مکان شرطی شده ناشی از تزریق مرکزی ال ـ آرژینیـن : تزریـق حاد L-NAME بصورت داخل صفـاقی ـmg/kg ۵۰) در روز آزمایش و یک سـاعت قبـل از تسـت سـبب کـاهش شدید ترجیـح مکـان شـرطی شـده ناشـی از تزریـق ال ـ آرژینیـن بـه داخـل هسـته آکومبـانس گردیـد (P<۰/۰۱، t۸=۳/۲۹) (شکل ٤).

ه: اثر تزریق مزمن L-NAME بـر ترجیـح مکـان شرطی شده ناشی از تزریق مرکزی ال ـ آرژینیـن : تزریـق مزمـن L-NAME بصـورت داخـل صفـاقی (در

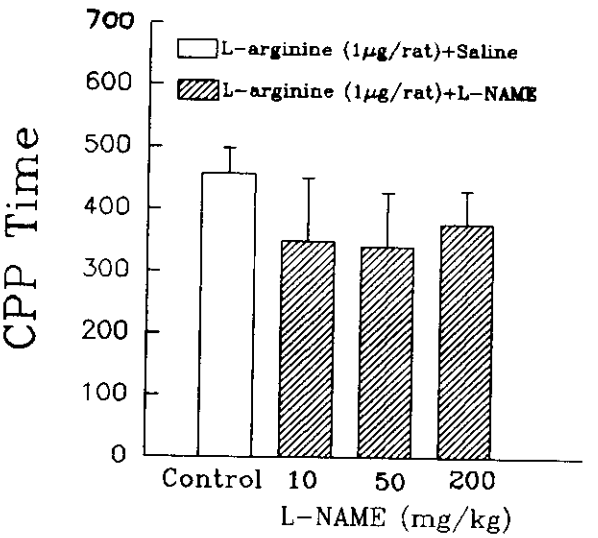


شکل ۳ ـ اثر تزریق داخل هسته آکومبانس داروی آمینوبیگوانیدیـن در القـاء ترجیـح مکـان شـرطی شـده (n=٦ ، داده هـا بصـورت (mean±SEM)

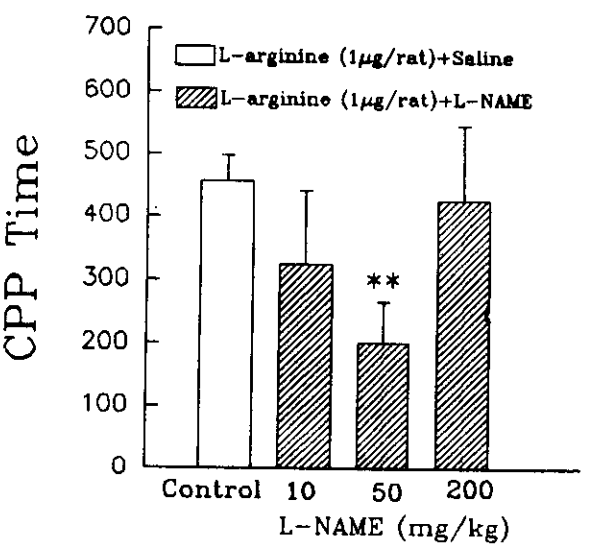
مقـادیر mg/kg ۱۰ و ۵۰ و ۲۰۰) در روز آمـوزش، اثـری برترجیح مکان شرطی شده ناشی از تزریق ال ـ آرژنین به داخـل هسـته آکومبـانس نداشـت (KW=۱/٦۷ ،P=۰/٦۵) (شکل ۵).

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- اثر تجویز مزمن L-NAME بر CPP ناشی از ال - آرژنین (n=٦ ، داده ها بصورت mean±SEM).



شکل ٥- اثر تجویز حاد L-NAME بر CCP ناشی از ال - آرژنین (n=٦ داده ها بصورت mean±SEM ، P<٠/٠١* اختلاف با گروه شاهد می باشد).

بحث

با وجود پیشرفت‌های بسیار زیاد در زمینه شناخت عوامل عصبی و بیولوژیک مؤثر در اعتیاد به مواد مخدر، هنوز عوامل ناشناخته دراین زمینه زیادند. امروزه قسمتهای مختلف دستگاه عصبی که در پاداش مؤثر هستند و ارتباطات آنها، تقریباً شناسائی شده اند اما درمان اعتیاد به مواد مخدر مسئله ای است که هنوز به صورت مشکل بزرگی بر سر راه پژوهشگران قرار دارد. از جمله این عوامل می توان به نیتریک اکساید اشاره کرد. این ماده توسط آنزیم NOS از ال - آرژنین ساخته می شود و در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است [٨]. نیتریک اکساید تأثیر مستقیمی در عملکرد داروهای مخدر داشته و همچنین در عملکرد نوروترانسمیترهایی که با اثر داروهای مخدر بر هم کنش دارند نیز، تداخل عمل دارد [١، ٢، ٧، ١٢]. اخیراً مشخص شده که در هسته آکومبانس غلظت بالائی از آنزیم NOS یافت می‌شود [٥] که نشان دهندهٔ نقشی برای نیتریک اکساید در اعمال این هسته است. هستهٔ آکومبانس از مراکز اصلی مسیر پاداش در دستگاه عصبی می‌باشد و مطالعات مختلف نقش مهمی را در بروز خواص پاداشی داروهای مخدر نشان داده اند [٩، ١٠]. در مطالعه حاضر تجویز داخل هسته آکومبانس ال - آرژنین توانست سبب القاء ترجیح مکان شرطی شده در موش نژاد ویستار شود. این نتیجه با نتایج قبلی ما در موش سوری همخوانی دارد [١]. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که ال - آرژنین می‌تواند در دستگاه عصبی مرکزی سبب رها شدن نیتریک اکساید گردد وبه عنوان پیش ساز آن عمل کند [٨]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ال - آرژنین از طریق القاء رها شدن نیتریک اکساید سبب بروز خواص پاداشی شده است. همچنین نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که داروهای مهار کننده سنتز نیتریک اکساید اثری در ایجاد ترجیح یا تنفر مکان شرطی شده ندارند. از طرفی این نتایج بیان می‌کنند که تزریق حاد L-NAME

www.SID.ir

می‌تواند سبب ایجاد تنفر مکان شرطی شده در موش‌هائی شود که قبلاً با تزریق ال ـ آرژینین در آنها ترجیح مکان شرطی شده القاء شده است. نقش نیتریک اکساید در کسب و پایداری ترجیح مکان شرطی شده و خود ـ تزریقی داروهای مخدر مانند مرفین [۲،۱] و همچنین کوکائین [۱۲،٦] قبلاً نشان داده شده است. با توجه به گستردگی مسیر پاداش در دستگاه عصبی [۹] و اینکه در کارهای انجام شده از داروهای مهارگر NOS و یا پیش‌ساز نیتریک اکساید بصورت سیستمیک استفاده شده است که در این صورت این داروها درمناطق مختلفی از دستگاه عصبی تأثیر می‌گذارند، شناسایی مکانی از دستگاه عصبی که محل اثر این داروها می‌باشد نکته حائز اهمیت است. از سوی دیگر غلظت‌های نسبتاً بالائی از نیتریک اکساید سنتاز در هسته آکومبانس پیدا شده است که این امر می‌تواند راهنمای خوبی به منظور جهت دهی تحقیق حاضر باشد. با توجه به اثرات دیده شده در این تحقیق می‌توان اظهار داشت که آنزیم NOS موجود در هسته آکومبانس از جمله اهداف موجود در سیستم پاداش می‌باشد که نقش مهمی را در فعالیت این سیستم بازی می‌کند. نتایج تحقیق بطور وضوح بیانگر تأثیر رها شدن نیتریک اکساید در القا پاداش است. با توجه به نتایج به دست آمده در یک جمع بندی کوتاه می‌توان چنین بیان کرد که نیتریک اکساید موجود در هسته آکومبانس از جمله عوامل مؤثر در ایجاد پاداش می‌باشد. اینکه نیتریک اکساید بعنوان آخرین حلقهٔ مولکولی فعال شده توسط داروهای مخدر به منظور القاء پاداش است یا خیر نکته‌ای است که باید در تحقیقات آینده روشن شود.

تقدیر و تشکر: این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) انجام شد. بدین وسیله از زحمات این عزیزان قدردانی می‌شود.

منابع

[۱] شریعتی م ر ، آقائی فیروزآبادی س ح ، خوش باطن ٤، علی، عسگری ع ر. قشونی ح، صحرائی ه نقش نیتریک اکساید در ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین در موش سوری نر، ***فیزیولوژی و فارماکولوژی***، سال دوم (شماره ۲) ۱۳۷۷، ۱٤۳-۱۳۷.

[۲] فؤادالدینی م، آقائی فیروزآبادی س ح، خوش باطن ع، عسگری ع ر، قشونی ح، صحرائی ه، اثر ال ـ آرژینین و L-NAME بر خود ـ تزریقی ناشی از مرفین در موش بزرگ آزمایشگاهی نر، ***فیزیولوژی و فارماکولوژی***، سال دوم (شماره ۱) ۱۳۷۷، ۳۹-۳۳.

[3] Bannon, M.J. and Roth, R.H., Pharmacology of mesocortical dopamine neurons, ***Pharmacological Reviws,*** 35 (1983) 53-68.

[4] Di Chiara, G. and Imperato, A., Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats, ***Proc Natl Acad Sci USA,*** 85 (1988) 5274-5278.

[5] Gracy, K.N. and Pickel, V.M., Ultrastructural localization and comparative distribution of nitric oxide synthase and N-methyl-D-aspartate receptors in the shell of the rat nucleus accumbens, ***Brain Res.*** 747 (1997) 259-272.

[6] Hnad, T.H., Stinus,L. and Me Moal, M., Differential mechanisms in the acquisition and expression of heroin-induced place preference, ***Psychopharmacol,*** 98 (1989) 61-65.

[7] Kim, H.S. and Park, W.K., Nitric oxide mediation of cocaine induced dopaminergic

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

behaviors: ambulation-accelerating activity, reverse tolerance and coditioned place preference in mice, ***J.Pharmacol Exp Ther,*** 275 (1995) 551-557,

[8] Knowles, R.G., Placios, M., Paimer, R.M. and Moncada, S., Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system, ***Proc Natl Acad Sci USA,*** 86 (1989) 5159-5169.

[9] Koob, G.F. and Bloom, F.E., Cellular and molecular mechanisms of drug dependence, ***Science,*** 242 (1988) 715-723.

[10] Nestler, E.J., Molecular mechanisms of drug addiction, ***Neuroscience,*** 12 (1992) 2439-2450.

[11] Paxinos, G. and Watson, C., ***The rat brain in the stereotaxic coordinates,*** Vol. 2, Academic Press, New York, 1986.

[12] Pulvirenti, L., Balducci, C. and Koob, G.F., Inhibition of nitric oxide synthesis reduces intravenous cocaine self-administration in the rat, ***Neuropharmacol,*** 35 (1996) 1181-1184.

[13] Stolerman, I., Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms, ***Trends Pharmacol Sci,*** 13 (1992) 170-176.

www.SID.ir