

نقش نیتریک اکساید هسته مرکزی آمیگدال در بیان رفتار پاداشی مرفین در موش سفید بزرگ

نویسندگان: مهناز رحیم پور^۱، دکتر منیژه کرمی^{۲*}، دکتر محمد رضا جلالی ندوشن^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- استادیار بیولوژی- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- دانشیار پاتولوژی- گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: karami@shahed.ac.ir

*نویسنده مسئول: دکتر منیژه کرمی

چکیده

مقدمه و هدف: نالوکسون با مرفین در بیان علائم رفتاری پاداشی، تداخل دارد. L-آرژینین، ترجیح مکانی ناشی از مرفین را افزایش و L-NAME این جریان را کاهش می‌دهد. در این پژوهش آثار تزریق L-آرژینین و L-NAME به هسته مرکزی آمیگدال بر بیان رفتارهای جستجوی دارو (ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو بخش دستگاه) القایی مرفین بررسی شد.

مواد و روش‌ها: آزمایش‌ها روی موش بزرگ نر نژاد ویستار (g ۲۵۰-۲۰۰) انجام گرفت. حیوانات با دستگاه استروناکس در مختصات هسته مرکزی آمیگدال به صورت دوطرفه کانول‌گذاری شدند و یک هفته، دوره بهبود را گذراندند. ترجیح مکانی به روش غیر طرفدار، طی برنامه‌ای پنج روزه در سه مرحله آشنایی، شرطی‌سازی و آزمون اجرا شد. در طول شرطی‌سازی، مرفین به صورت زیر جلدی روزی یکبار، عوامل نیتریک اکساید به داخل هسته و نالوکسون به صورت داخل صفاقی ۱۰ دقیقه قبل از آزمون تزریق شد.

یافته‌ها: مرفین (۱۰ mg/kg s.c) کاهش معنی‌دار را در رفتارهای جستجوی دارو نسبت به گروه کنترل نشان داد و تجویز نالوکسون (۰/۴-۰/۱ mg/kg i.p) قبل از آزمون پاسخ‌های القایی مرفین را تقویت کرد. تزریق L-آرژینین (۰/۳-۳ μg/rat) به آمیگدال مرکزی مقدم بر تزریق نالوکسون (۰/۴ mg/kg) بر بیان علائم افزایش معنی‌دار داشت ولی تزریق L-NAME (۰/۳-۳ μg/rat) مقدم بر L-آرژینین (۰/۳ μg/rat)، پاسخ L-آرژینین را متوقف کرد.

نتیجه‌گیری: نالوکسون به عنوان اگونیست گیرنده اپیویدی با مرفین در القای آثار رفتاری در مدل شرطی رقابت می‌کند و NO در هسته مرکزی آمیگدال با مرفین در بیان این آثار تداخل نشان می‌دهد. شاید مطالعه حاضر بتواند تداخل بین مرفین و NO هسته مرکزی آمیگدال را بر بیان رفتارهای جستجوی دارو تأیید کند.

واژگان کلیدی: مرفین، نیتریک اکساید، آمیگدال مرکزی، L-آرژینین، L-NAME، رفتارهای جستجوی دارو

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم - شماره ۹۰
دی ۱۳۸۹

وصول: ۸۹/۸/۲۳

آخرین اصلاحات: ۸۹/۱۰/۲۵

پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۶

مقدمه

ایستادن، بو کشیدن و تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی (فعالیت حرکتی) از جمله علائم رفتاری جستجوی دارو در مدل شرطی شده‌اند (۱). رفتار ایستادن در حیوان شرطی شده به واسطه سیستم‌های تنظیم‌کننده انگیزش و هیجان تعدیل می‌شود (۲). بو کشیدن، به ورود و خروج منظم هوا برای درک بو و رایحه اطلاق می‌گردد (۲). در سال ۱۹۶۴، Welker این گونه بیان کرد که بو کشیدن در حیوان زنده، رفتاری دینامیک است که با هماهنگی دقیق سایر سیستم‌های حرکتی انجام می‌شود و نقشی مهم در شکل‌دهی داده‌های بو برای پردازش با سیستم عصبی بازی می‌کند (۳). آلکالوئیدهای اپیویدی مانند مرفین، بی‌دردی را از طریق اثرگذاری بر آن نواحی مغز که پپتیدهایی با ویژگی‌های فارماکولوژیک شبه اپیوید دارند، القامی‌کنند (۴). آگونیست‌های اپیویدی از طریق اتصال با گیرنده‌های اختصاصی جفت‌شده با پروتئین G ایفای نقش می‌کنند که این گیرنده‌ها در مناطقی از مغز و نخاع و بافت‌های دیگر، شناسایی شده‌اند (۵). گیرنده‌های اپیویدی و لیگاند‌های پپتیدی درون‌زاد در سراسر دستگاه عصبی مرکزی (Central Nervous System) و بافت‌های محیطی (Peripheral Nervous System) توزیع شده‌اند و نقشی مهم در کنترل پاسخ‌های فیزیولوژیک مانند بی‌دردی، رفتار هیجانی، یادگیری، حافظه و تنظیم مدارهای پاداش برعهده‌دارند (۶). سیستم اپیویدی، سه گیرنده اصلی μ (میو)، κ (کاپا) و δ (دلتا) دارد که پپتیدهای اپیویدی درون‌زاد این گیرنده‌ها را فعال می‌کنند (۷). تجویز مکرر دوزهای درمانی مرفین یا مشتق‌های آن باعث می‌گردد که این مخدرها به تدریج، اثرشان را ازدست‌بدهند (بنابراین برای دستیابی به پاسخ اولیه، مقادیر بیشتری از دارو باید تجویز شود) که این پدیده، تحمل (Tolerance) نام دارد (۸). در این حالت، وابستگی دارویی به اپیوئیدها با یک سندرم ترک یا پرهیزی به نسبت اختصاصی مشخص می‌شود (۵). نالوکسون دارویی است که برای درمان تحمل اپیویدی (اور دوز مرفین یا

هروئین) استفاده می‌شود و تیمار هم‌زمان مرفین و دوز بسیار پایین نالوکسون، تحمل و وابستگی اپیویدی را در اثر جلوگیری از تغییرهای سیگنالینگ تحریکی اپیوئیدها کاهش می‌دهد که این اثر به واسطه تمایل بسیار بالای نالوکسون در واکنش با گیرنده μ ایجاد می‌شود (۷). آمیگدال در تشخیص احساس‌های منفی مانند ترس، ارتباط بین محرک‌های محیطی و احساس‌ها و پردازش داده‌های پاداشی بسیار اهمیت دارد (۹). با توجه به نقش نیتریک اکساید در مقام ناقلی عصبی در بیان و افزایش تحمل و وابستگی به مرفین و نیز با در نظر گرفتن تداخل این سیستم با مرفین در بیان ویژگی‌های پاداشی مرفین و نیز با توجه به اهمیت آمیگدال در بیان سندرم ترک القاء‌شده با نالوکسون (10)، چنین فرض می‌شود که بر-همکنش نیتریک اکساید با مرفین در این ناحیه بتواند بر علائم رفتاری القایی مرفین در تداخل با نالوکسون تأثیر بگذارد؛ لذا در مطالعه حاضر، آثار تزریق مستقیم L-آرژینین و L-NAME به هسته مرکزی آمیگدال در بیان پاسخ‌های رفتاری القاء‌شده با مرفین در مدل شرطی که با یک تزریق منفرد نالوکسون مزدوج گردیده، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌ها روی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار که در شروع جراحی، میانگین وزن آنها بین ۲۰۰-۲۵۰ گرم بود صورت گرفت؛ این حیوانات از انستیتو پاستور ایران تهیه و به صورت گروه‌های چهارتایی تحت شرایط استاندارد آزمایشگاهی با دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و در تمام مدت آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی آسان داشتند. حیوانات، به منظور ایجاد سازگاری با شرایط جدید، دست‌کم یک هفته زودتر از شروع آزمایش‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. برای هر گروه تجربی، حداقل شش سر حیوان در نظر گرفته و هر حیوان، فقط یک بار آزمایش شد. آزمایش‌ها بین ساعت ۸ صبح تا ۵ بعدازظهر انجام گرفت. مواد مورد استفاده عبارت بودند از: مرفین

نالوکسون (آنتاگونیست رقابتی گیرنده‌های اپیویدی) روی بیان علائم رفتاری بررسی شد. پنج گروه از حیوانات طی برنامه‌ای سه روزه شرطی‌سازی، به صورت زیر جلدی دوز مؤثر مرفین (۷/۵ mg/kg) را دریافت- کردند ولی ۱۰ دقیقه قبل از آزمون، نالوکسون به صورت داخل صفاقی (۰/۴-۰/۱ mg/kg) در چهار گروه تزریق شد و یک گروه نیز در جایگاه گروه کنترل بدون دریافت نالوکسون به مرحله آزمون ورود پیدا کرد. علائم رفتاری تمام حیوانات ثبت و تجزیه و تحلیل شد.

بررسی آثار L-آرژنین داخل مغزی، روی علائم رفتاری: چهار گروه از حیوانات طی برنامه شرطی‌سازی سه روزه، مرفین 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 مؤثر نالوکسون (۰/۴ mg/kg) روی سه گروه انجام- گرفت و یک گروه نیز در مقام گروه کنترل (بدون دریافت L-آرژنین) در نظر گرفته شد. حیوانات پس از ۱۰ دقیقه، تحت آزمون واقع شدند و علائم رفتاری همه گروه‌ها سنجش و ارزیابی شد.

بررسی آثار L-NAME داخل مغزی، روی علائم رفتاری: در این آزمایش، چهار گروه از حیوانات، طی برنامه شرطی‌سازی سه روزه، مرفین را به صورت زیر جلدی دریافت کردند. در روز آزمون، مقادیر مختلف L-NAME (۰/۳-۳ µg/rat) به صورت داخل مغزی، مقدم بر L-آرژنین (۳ µg/rat) و پیش از تزریق نالوکسون (۰/۴ mg/kg) روی سه گروه از حیوانات انجام شد و گروه چهارم در جایگاه گروه کنترل (بدون دریافت L-NAME) در نظر گرفته شد. همه گروه‌ها پس از ۱۰ دقیقه به مرحله آزمون وارد شدند و علائم رفتاری آنها برای تجزیه و تحلیل، ثبت و ذخیره گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به علائم رفتاری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و پس از تست نرمالیتی Smirnov Kolmogorov تحت تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و

سولفات (خریداری شده از شرکت تماد با مجوز رسمی وزارت بهداشت)، کتامین و زایلزین (تهیه شده از سازمان دامپزشکی کشور)، نالوکسون هیدروکلراید (خرید از شرکت تولید دارو)، L-آرژنین (تهیه شده از شرکت Merck) و L-NAME (خریداری شده از Research Biomedical Inc. USA). به غیر از نالوکسون، کتامین و زایلزین که به صورت ویال تهیه شدند، کلیه داروها قبل از مصرف در سالین ۰/۹ درصد حل شدند. به منظور جراحی و کانول گذاری، ابتدا هر حیوان به دقت وزن و سپس با تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلزین (۲۰ mg/kg) بی‌هوش گردید؛ آنگاه حیوان با استفاده از دستگاه استریوتاکس (خرید از شرکت Stoeling, USA) و مختصات هسته مرکزی آمیگدال بر اساس اطلس پاکسینو [$-2/12$ mm (AP) از برگما، $\pm 4/2$ mm (ML) از خط وسط و از سطح حجمه $-7/8$ mm (DV)]، در ناحیه آمیگدال مرکزی کانول- گذاری شد. همه حیوانات جراحی شده قبل از آزمون CPP، یک هفته دوره بهبود را گذراندند. دستگاه CPP از جنس چوب و دو قسمتی طراحی گردید که دو قسمت شرطی کننده آن با یک دریچه از هم مجزا بودند. روش ترجیح مکانی شرطی شده طبق طرح غیر طرفدار (Unbiased)، مشمول برنامه‌ای پنج روزه با سه مرحله پیش از شرطی‌سازی، شرطی‌سازی و آزمون اجرا گردید (۱۱).

بررسی آثار مرفین، روی علائم رفتاری در مدل شرطی: چهار گروه از حیوانات مقادیر مختلف مرفین (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، در جایگاه گروه شاهد، طی شرطی‌سازی، سالین را به صورت زیر جلدی دریافت- کرد. فعالیت و علائم رفتاری همه گروه‌ها در مرحله آزمون با دستگاه Ethovision (ثبت و رکوردینگ رفتارها به صورت خودکار) ذخیره و سپس تجزیه و تحلیل گردید.

بررسی آثار تداخل نالوکسون و مرفین، روی علائم رفتاری: آثار تزریق داخل صفاقی مقادیر مختلف

بوکشیدن دارد؛ همچنین اثر مرفین بر تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی معنی دار [$F_{4,25}=2.992$; $p<0.01$] است 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.

آثار تزریق مستقیم L- آرژینین، روی علائم رفتاری

در حیوان شرطی شده با مرفین

جدول ۳، پاسخ L- آرژینین ($3-3 \mu\text{gr}/\text{rat}$) را در بیان علائمی مانند ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی نشان می دهد.

آنالیز واریانس یک طرفه حاکی از آن است که L- آرژینین اثری معنی دار را بر ایستادن و بوکشیدن نشان نمی دهد ($p>0.05$) ولی اثر L- آرژینین بر تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی معنی دار [$F_{3,20}=2.934$; $p<0.01$] است؛ همچنان که، در بررسی بیشتر با آزمون LSD نشان داده می شود L- آرژینین در بعضی از مقادیر (3 و $3 \mu\text{gr}/\text{rat}$) نسبت به گروه کنترل اثر افزایشی معنی داری را بر بیان این رفتار آشکار می کند.

آثار تزریق مستقیم L-NAME روی علائم رفتاری در حیوان شرطی شده با مرفین

جدول ۴، پاسخ L-NAME ($3-3 \mu\text{gr}/\text{rat}$) را در بیان علائمی مثل ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی نشان می دهد.

آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که L-NAME اثری معنی دار 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 دهنده آن است که L-NAME در مقادیر مختلف (3 و $3 \mu\text{gr}/\text{rat}$)، بیان این رفتارها را متوقف می کند.

برای تحلیل بیشتر داده ها از آنالیزهای Post hoc جمله آزمون LSD استفاده شد و در همه موارد $p<0.05$ در مقام اختلافی معنی دار در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با کمک نرم افزار Gstate و SPSS انجام گرفت.

یافته ها

آثار مرفین بر بیان رفتارهای جستجوی دارو در مدل شرطی

جدول ۱، پاسخ مرفین ($10-2/5 \text{ mg}/\text{kg, s.c}$) را در بیان علائمی مانند ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی نشان می دهد.

آنالیز واریانس یک طرفه نشان می دهد که مرفین بر ایستادن اثری معنی دار [$F_{4,25}=9.868$; $p<0.0001$] دارد. بررسی بیشتر با آزمون LSD نشان می دهد که مرفین در تمام مقادیر نسبت به گروه کنترل، کاهشی معنی دار را بر بیان این رفتار آشکار می سازد. اثر مرفین بر بوکشیدن، اثری معنی دار [$F_{4,25}=3.395$; $p<0.01$] است و آزمون LSD حاکی از آن است که دوز بالای مرفین ($10 \text{ mg}/\text{kg}$) نسبت به گروه کنترل کاهشی معنی دار بر بیان این رفتار نشان می دهد. اثر مرفین 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 مرفین در مقادیر مختلف (10 و $7/5$ و $2/5 \text{ mg}/\text{kg}$) نسبت به گروه کنترل بر این رفتار، کاهشی معنی دار دارد.

آثار تداخل نالوکسون و مرفین در بیان علائم رفتاری جستجوی دارو

جدول ۲، پاسخ نالوکسون ($0/4-0/1 \text{ mg}/\text{kg, i.p}$) را در بیان علائمی مانند ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو قسمت دستگاه شرطی سازی نشان می دهد.

آنالیز واریانس یک طرفه نشان دهنده آن است که نالوکسون اثری معنی دار [$F_{4,25}=9.615$; $p<0.0001$] بر ایستادن و نیز اثری معنی دار [$F_{4,25}=7.88$; $p<0.001$] بر

جدول ۱. علائم رفتاری القایی مرفین

Compartment entering (No./15 min)	Sniffing (No./15 min)	Rearing (No./15 min)	Morphine (mg/kg)
۳/۱۷±۲۱/۲۵	۱/۲۵±۱۲/۷۵	۲/۸۴±۴۳/۵۰	۰
۱/۴۴±۱۰/۵۰	۱/۵۸±۹	*۴/۸۴±۱۹	۲/۵
۱/۳۲±۱۷/۵۰	۱/۸۸±۱۱/۷۵	*۲/۸۵±۳۳	۵
**۱/۱۰±۱۲/۲۵	۲/۵۹±۱۴/۷۵	**۲/۶۷±۲۶	۷/۵
۱/۸۴±۱۱/۲۵	*۱/۰۴±۶/۵۰	*۲/۳۴±۲۰	۱۰

مقایسه بین گروهی به کمک آزمون LSD انجام شده است: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

جدول ۲. علائم رفتاری القایی نالوکسون در مدل شرطی

Compartment entering (No./15 min)	Sniffing (No./15 min)	Rearing (No./15 min)	Morphine(7/5mg/kg)+ Naloxone (mg/kg)
۱/۱۰±۱۲/۲۵	۲/۵۹±۱۴/۷۵	۲/۶۷±۲۶	۰
*۱/۲۲±۶۶	**۱/۳۵±۴	***۲/۱۷±۶/۷۵	۰/۱
*۳/۱۹±۴/۷۵	***۱/۰۴±۲/۵۰	***۴/۲۹±۷/۵۰	۰/۲
*۱/۸۹±۴/۵۰	**۲/۶۷±۵	***۲/۰۴±۵	۰/۳
*۱/۵۴±۴/۲۵	***۰/۷۰±۲	***۲/۳۹±۶/۵۰	۰/۴

مقایسه بین گروهی به کمک آزمون LSD انجام شده است *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

جدول ۳. اثر L- آرژینین، روی علائم رفتاری در مدل شرطی

Compartment entering (No./15 min)	Sniffing (No./15 min)	Rearing (No./15 min)	Morphine(7/5mg/kg)+ Naloxone(0/4mg/kg)+ L-arginine (μgr/rat)
۱/۵۴±۴/۲۵	۰/۷۰±۲	۲/۳۹±۶/۵۰	۰
*۸/۳۲±۲۰	۲/۰۸±۸	۱۰/۸۳±۲۴/۳۳	۰/۳
۴/۴۸±۱۰/۶۶	۱/۵۲±۶	۳/۷۵±۸/۶۶	۱
*۲/۰۰±۲۲	۷/۰۰±۱۲	۰/۵۰±۱۹/۵۰	۳

مقایسه بین گروهی به کمک آزمون LSD انجام شده است: *p<0.05

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

Compartment entering (No./15 min)	Sniffing (No./15 min)	Rearing (No./15 min)	L-arginine (0/3μgr/rat)+ L-NAME (μgr/rat)
۲/۰۰±۲۲	۷/۰۰±۱۲	۰/۵۰±۱۹/۵۰	۰
*۴/۰۰±۷	۶	۴/۵۰±۶/۵۰	۰/۳
۴/۰۰±۱۳	۰/۵۰±۱۲/۵۰	۳/۵۰±۱۴/۵۰	۱
*۲/۵۰±۲/۵۰	۳/۵۰±۴/۵۰	۷/۰۰±۸	۳

مقایسه بین گروهی به کمک آزمون LSD انجام شده است: *p<0.05

بحث

در این تحقیق، نقش نیتریک اکساید (NO) داخل هسته مرکزی آمیگدال (CeA) بر بروز علائم رفتاری القاء شده با مرفین با استفاده از دستگاه شرطی سازی (CPP) و نیز به کمک ثبت خودکار علائم رفتاری مانند ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو قسمت شرطی دستگاه در روز آزمون بررسی شد؛ نتیجه تحقیق حاکی از تأثیر مرفین بر علائم رفتاری ایستادن، بوکشیدن و تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی، در حیوان شرطی شده نسبت به گروهی است که سالیان دریافت کرد و اینکه مرفین، کاهش فعالیت حرکتی (تردد بین دو بخش دستگاه) در حیوان را موجب شد که این یافته با نتایج مطالعات قبلی (۱) مطابقت دارد. یافته‌ها نشان می‌دهد که مرفین، سبب تحریک پروتئین G متصل به گیرنده‌های μ ، κ و δ می‌شود اما طبق یافته‌های قبلی (۱۲) گیرنده μ در بروز پاسخ‌های رفتاری القاء شده با مرفین بیشترین نقش را بر عهده دارد. نالوکسون در مقام آنتاگونیست اپیویدی برای القای علائم رفتاری تجویز شد و طبق یافته‌های حاضر، پس از تزریق داخل صفاقی آن، قبل از آزمون، علائم رفتاری ایستادن و بوکشیدن در حیوان شرطی شده کاهشی معنی دار پیدا کرد، اما اثر نالوکسون بر فعالیت حرکتی، تردد بین دو بخش دستگاه شرطی سازی، اثری وابسته به دوز داشت. دوز پایین نالوکسون (۰/۱ mg/kg, i.p) افزایش تردد را بین دو بخش دستگاه باعث گردید؛ حال آنکه دوزهای بالاتر نالوکسون (۰/۱ mg/kg, i.p) یا (۰/۲-۰/۴)، کاهش این فعالیت را موجب شد؛ از این یافته‌ها می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که به احتمال زیاد نالوکسون در دوز پایین (۰/۱ mg/kg) با انواع دیگری از گیرنده‌های اپیویدی مانند κ واکنش داده است (۱۳) یا اینکه شاید ساختارهای مولکولی متعددی فعال گردیده است که در حال حاضر با این یافته‌ها درباره آنها نمی‌توان اظهار نظر کرد 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 (۰/۲-۰/۴ mg/kg)، احتمال دارد که مسدود شدن گیرنده μ را سبب شده باشد (۱۷).

فعالیت هر دو گیرنده μ و κ ، هیپرپلاریزاسیون نرون در نواحی مختلف مغزی و مهار آنزیم آدنیلات سیکلاز را موجب می‌گردد (۱۴). مطابق یافته‌های قبلی، گیرنده μ موجب هیپرپلاریزاسیون نرون‌های حد واسط غیر دوپامینی، گابا آرژیک، در ناحیه تگمتموم شکمی شده، از این طریق با تحریک نرون‌های دوپامینرژیک این ناحیه، ترشح دوپامین را در هسته آکومبیس افزایش می‌دهد در حالی که فعالیت گیرنده κ از طریق ارتباط پیش‌سیناپسی با نرون دوپامینرژیک منشعب شده از ناحیه تگمتموم شکمی، مهار ترشح دوپامین در هسته آکومبیس را سبب می‌شود (۱۵). پس از فعال شدن گیرنده‌های گلوتاماتی به ویژه NMDA (N-methy-d-aspartate)، ورود کلسیم به داخل سلول و سپس فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سینتاز وابسته به کلسیم - کالمودولین اتفاق افتاده، رهایش نیتریک اکساید (NO) به فضای سیناپسی صورت می‌گیرد (۱۶) و تأثیر NO بر نرون پیش‌سیناپسی، رهایش بیشتر گلوتامات را باعث می‌شود (۱۷). افزایش نیتریک اکساید در هسته مرکزی آمیگدال در ترجیح مکانی القاء شده با مرفین نقش دارد (۱۸).

خروجی‌های گلوتاماترژیک آمیگدال به هسته آکومبیس، وابستگی به مرفین را سبب می‌شود (۱۰) و نیز خروجی‌های گلوتاماترژیکی که به تگمتموم شکمی وارد می‌شوند و سپس به آمیگدال می‌رسند در بیان وابستگی به مرفین نقش دارند (۱۹).

در این تحقیق، از L- آرژینین در مقام پیش ساز NO و از L-NAME در جایگاه مهارگر NOS استفاده شد و تأثیرشان بر علائم رفتاری پاداشی مرفین ارزیابی شد. تزریق دوطرفه مقادیر مختلف L- آرژینین (۳ μ g/rat)

منابع

- 1- Azorlosa JL, Simone EL. Context-specific morphine withdrawal: Evidence that rearing reflects withdrawal, not exploration. *Psychobiol* 1999; 27 (4): 557-560.
- 2- Daniel WW, Tanya ND, Marc OJ and Matt W. Sniffing Behavior of Mice during Performance in Odor-Guided Tasks. *Chem. Senses* 2008; 33: 581-596.
- 3- Welker WI. Analysis of sniffing in the albino rat. *Behavior* 1964, 22: 223-244.
- 4- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. "Opioid pharmacology". *Pain Physician* 2008;11 (2): 133-53.
- 5-Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*. 2004; 31:626-647.
- 6- Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior. *Rev. Peptides* 2008; 29(12): 2292-2375.
- 7- Wang HY, Burns LH. Naloxone, pentapeptide binding site on filamine A blocks mu opioid receptor-Gs coupling and CREB activation of acute morphine. *PLoS ONE* 2009; 4(1): 4282.
- 8- Maurice H, Guohua Z, Alvin M, John T, Joan J and Sarah M. Tolerance, opioid-induced allodynia and withdrawal associated allodynia in infant and young rats. *Neuroscience* 2007; 144(1): 247-262.
- 9- Baxter MG and Murray EA. The amygdala and reward. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 563-573.
- 10- Ishida S, Shimosaka R, Kawasaki Y, Jin C, Kitamura Y, Araki H, Sendo T, Gomita Y. Involvement of the amygdala on place aversion induced by naloxone in single-dose morphine-treated rat. *Yakugaku Zasshi* 2008; 128(3): 395-403.
- 11- Karami M, Zarrindast MR, Sepehri H, and Sahraei H. Role of nitric oxide in the rat hippocampal CA1 area on morphine-induced conditioned place preference. *European journal of pharmacol.* 2002; 449(1-2):113-9.
- 12- Snyder SM, Pasternak GW. Historical review: Opioid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24: 198-205.
- 13- Crain SM, Shen KF. Naloxone rapidly evokes endogenous kappa opioid receptor-mediated hyperalgesia in naïve mice pretreated briefly with GMI ganglioside or in chronic morphine-dependent mice. *Brain Res.* 2007; 1167:31-41.
- 14- Mansour A, Fox CA, Akil H and Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications, *Trends Neurosci.* 1995; 18: 22-29.
- 15- 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* 1988; 85:5274-5278.
- 16- Garthwaite J and Boulton CL. Nitric Oxide Signaling in the Central Nervous System. *Annual Review of Physiology* 1995; 57: 683-706.
- 17- Blanca P, Omar C, Carmina M and Vicente F. The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain in vivo and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats. *Learn. Mem.* 2007; 14: 254-258.

۰/۳ و (۰/۳-۳ μg/rat) L-NAME به هسته آمیگدال مرکزی، مقدم بر تزریق دوز مؤثر نالوکسون (۰/۴ mg/kg, i.p.)، اثری معنی‌دار را روی علائم رفتاری ایستادن و بوکشیدن نشان‌نداد اما بعضی از مقادیر L- آرژینین فعالیت حرکتی تردد بین دو بخش دستگاه شرطی‌سازی را افزایش داد درحالی‌که، تزریق L-NAME مقدم بر L- آرژینین اثر عکس روی این فرایند نشان‌داد و این امر با مطالعات قبلی (۲۰) مطابقت می‌کند.

با در نظر گرفتن آثار عوامل نیتریک اکساید روی تردد بین دو بخش دستگاه شرطی‌سازی که به‌طور کامل معنی‌دار است این احتمال وجود دارد که سیستم نوروترانسمیتری NO در سطح هسته مرکزی آمیگدال با سیستم‌های تنظیم‌کننده فعالیت‌های حرکتی مانند سیستم دوپامینرژیک و گابا‌رژیک (۲۱)، برهمکنشی داشته‌باشد که این یافته با تحقیق‌های قبلی (۲۲) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

این یافته‌ها حاکی از آن‌اند که به‌احتمال زیاد، نیتریک اکساید ناحیه هسته مرکزی آمیگدال، در شکل-گیری علائم رفتاری ایستادن و بوکشیدن نقشی مهم را ایفاء نمی‌کند و بنابراین محتمل است که در این امر، ساختارهای مولکولی دیگری درگیر باشند اما فعالیت حرکتی تردد بین دو بخش دستگاه شرطی‌سازی در حیوان شرطی‌شده با مرفین که تحت تداخل نالوکسون واقع شده‌است احتمال‌دارد با سیستم نوروترانسمیتری NO تنظیم‌شود.

سپاسگزاری

از آنجاکه بخشی از هزینه این تحقیق از محل بودجه پروپوزال‌های کارشناسی ارشد دانشگاه شاهد تأمین-گردید، نویسندگان لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه و مسئولان ذی ربط قدردانی‌کنند.

- 18- Zarrindast MR, Karami M, Sepehri H and Sahraei H. Influence of nitric oxide on morphine-induced conditioned place preference in the rat central amygdala. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 453: 81-89.
- 19- Tzchentke TM, Schmidt WJ. Glutamatergic mechanisms in addition. *Mol. Psychiatry* 2003; 8:373-382.
- 20- Calignano A, Persico P, Mancuso F and Sorrentino L. Endogenous nitric oxide modulates morphine-induced changes in locomotion and food intake in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 231: 415-419.
- 21- Gi Hoon S, Sooyoung C, Dongho G, Sang Soo K, Wan Sung C, Kyungjin K, Sukwoo. Hyperactivity and alteration of the midbrain dopaminergic system in maternally stressed male mice offspring. *Biochemical and Biophysical Research* 2007; 352: 823-829.
- 22- Sepehri G, Sheibani V, Baghaiee F, Farazifard R . Effect of L-NAME/L-Arginine microinjection into nucleus accumbens shell on morphine withdrawal signs in male rats. *International Journal of Pharmacology* 2006; 2(2): 171-176.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Eighteenth Year,
No.90
December, January
2010-2011*

Received: 14/11/2010

Last revised: 15/1/2011

Accepted: 16/1/2011

Role of CeA nitric oxide on expression of morphine reward behavior in the rat

Mahnaz Rahimpour¹, Manizheh Karami^{2*}, Mohammadreza Jalali Nadoushan³

1. M.Sc.Student - Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor - Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

3. Professor - Department of Pathology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

E-mail: karami@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Naloxone shows interaction with the morphine in expression of reward behaviors. L-arginine increases morphine induced conditioned place preference, whereas L-NAME decreases this process. In this project, effects of injections of L-arginine and L-NAME intra-CeA on morphine induced drug-seeking behaviors including rearing, sniffing and compartment entering were investigated.

Materials and Methods: Animals (male Wistar rats weighing 200-250 g) were cannulated bilaterally by stereotaxis apparatus for the CeA coordinates and passed a recovery period lasting one week. Conditioned place preference was conducted using a five-day schedule of an unbiased procedure including three phases (pre-conditioning, conditioning, and test). Morphine was injected subcutaneously through the conditioning once a day. NO agents were intra-nucleus injected but the administration of naloxone was intraperitoneally 10 min prior to testing.

Results: morphine (2.5-10 mg/kg s.c) induced a significant decrease in drug-seeking behaviors compared with the control group. Naloxone (0.1-0.4 mg/kg i.p) potentiated the morphine-induced responses. When L-arginine (0.3-3 µg/rat) injected intra-CeA before injection of naloxone (0.4 mg/kg) pre-testing showed a significant increase effect on the behaviors but injection of L-NAME (0.3-3 µg/rat) intra-CeA prior to L-arginine (0.3 µg/rat) pre-testing blocked the response to L-arginine.

Conclusion: Naloxone, an opioid receptor agonist, competes with morphine in inducing the behaviors in the conditioning model and NO in the CeA shows interaction with morphine in expressing these effects. Present finding may confirm that there is an interaction between NO in the CeA and morphine in expressing the drug-seeking behaviors.

Key words: Morphine, Nitric oxide, Central amygdale, L-arginine, L-NAME, Drug seeking behavior