

بررسی اثر تزریق ال - آرژینین و L-NAME در هسته 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^۲، حسن قشونی^۱، هدایت صحرانی^۲

۱- دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری

۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج)، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک

۳- دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه تشریح

چکیده

هسته آکومبانس بعنوان یک مرکز مهم در ایجاد وابستگی روانی شناخته شده است. با توجه به اینکه غلظت بالای از آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در این هسته یافت گردیده و از 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 - 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 ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. پس از جراحی و کانول گذاری و طی زمان لازم برای بهبودی، به حیوان مقادیر متفاوتی از ال - 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 - آرژینین در مقادیر ۰/۳ و ۱ و ۳ $\mu\text{g}/\text{Rat}$ قادر به القای ترجیح مکان شرطی شده می باشد. تجویز حاد L-NAME (۵۰mg/kg) سبب کاهش ترجیح مکان شرطی شده توسط ال - آرژینین می شود در حالیکه تجویز مزمن آن در مقادیر مختلف (۱۰mg./kg و ۵۰ و ۲۰۰) اثری را بر کار ال - 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 و ۱ و ۳ $\mu\text{g}/\text{Rat}$) ندارد. از این آزمایشات نتیجه می گیریم که تزریق داخل آکومبانشی ال - آرژینین قادر به القای ترجیح مکان شرطی شده می باشد.

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

مقدمه

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

انتقال عصبی دوپامین در سیستم مزولیمبیک و بویژه در هسته آکومبانس عموماً به عنوان هدف اصلی

از آب و غذای مخصوص (پلت) (بجز در زمان آزمایش) برخوردار بودند. حیوانات دورهٔ روشنایی طبیعی داشته و در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری می شدند. هر حیوان تنها یک بار مورد استفاده قرار می گرفت.

داروها: داروهای بکار رفته در این پژوهش عبارت بودند از: ال - آرژینین، L-NAME، پنتوباریتال سدیم (تهیه شده از شرکت سیگما - آمریکا). به منظور تزریق داخل صفاقی، داروها در نرمال سالین حل شده و بصورت ۱ml/kg به حیوانات تزریق می شدند. برای تزریق داخل هستهٔ آکومبانس، این داروها در مایع مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF) حل شده و در حجم ۱ µl/Rat به حیوانات تزریق می شد.

جراحی: حیوانات بوسیله تزریق داخل صفاقی محلول پنتوباریتال سدیم (۴۰mg/kg) بیهوش شده و به کمک دستگاه استریوتاکسی یک کانول راهنما بطول ۴/۶ میلی متر بصورت یک طرفه در داخل جمجمه آنها قرار گرفته و توسط دو عدد پیچ و آکریل دندانپزشکی در جای خود محکم می شد. مشخصات محل کارگزاری کانول از روی اطلس استریوتاکسی پاکسینو، $A=1/7$ ، $L=0/8$ ، $V=4/6$ می باشد [۱۲]. تزریق توسط یک سرنگ هامیلتون که با رابط پلی اتیلنی به یک سر سوزن شماره ۳۰ وصل بود انجام می شد. طول سر سوزن طوری انتخاب می شد که ۳ میلی متر از انتهای کانول راهنما بیرون بزند. پس از جراحی به هر موش ۵ روز برای بهبودی زمان داده می شد و سپس آزمایشات آغاز می شد.

شبکه: برای انجام آزمایش ترجیح مکان شرطی شده (CPP) از قفس مخصوصی از جنس پلاکسی گلاس استفاده شد [۶]. این قفس از سه قسمت یا سه خانه (Compartment) مجزا تشکیل شده که دارای ابعاد مساوی ۳۵×۳۵×۴۰ (ارتفاع، طول، عرض) سانتی متر

خصوصیات مخدری آنها ارتباط داده شده است [۴]. اجسام سلولی سیستم دوپامینرژیک از ناحیهٔ تگمتموم شکمی^(۱) (VTA) منشاء گرفته (که معمولاً به عنوان نرون های A10 کاتکول آمینی طبقه بندی می شوند) و به نواحی جلو مغزی^(۲) و عمدتاً به هستهٔ آکومبانس، پیاز بویایی، کورتکس پری فرونتال، آمیگدالا و دیواره های سپتال ختم می شوند [۳]. نقش هستهٔ آکومبانس در ایجاد و تداوم وابستگی روانی به داروهای مخدر مختلف توسط پژوهشگران مورد تحقیق قرار گرفته است [۱۰]. این هسته بعنوان محل تبدیل احساس به حرکت نقش مهمی را در انجام رفتارهای برانگیخته شده توسط داروهای مخدر بازی می کند [۱۳]. اخیراً مشخص شده که در این هسته غلظت بالائی از آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) یافت می شود [۵] و این آنزیم مسئول تولید نیتریک اکساید از ال - آرژینین در دستگاه عصبی مرکزی می باشد [۸]. تحقیقات قبلی نشان دهندهٔ نقش نیتریک اکساید در کسب و پایداری وابستگی روانی به داروهای مخدر مختلف در مدل های متفاوت مطالعهٔ وابستگی روانی می باشد [۱۲، ۷، ۲، ۱]. با توجه به مطالب فوق، در این تحقیق بر آن شدیم تا اثر تزریق داخل هستهٔ آکومبانس ال - آرژینین (بعنوان پیشساز تولید نیتریک اکساید) و L-NAME یا آمینوبیوانیدین [بعنوان مهارگر نیتریک اکساید سنتاز (NOS)] را در القاء ترجیح مکان شرطی شده در موش سفید بزرگ آزمایشگاهی بررسی کنیم.

مواد و روش ها

حیوانات: در این تحقیق از موش های بزرگ آزمایشگاهی نر، نژاد Wister (که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند) با میانگین وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در گروه های ۶-۵ تایی نگهداری شده و

بوده و با زاویه ۱۲۰ درجه نسبت به هم قرار می‌گیرند و هر قسمت توسط یک درب کشویی از دیگر قسمت‌ها جدا می‌شود. برای تقویت ترجیح مکان ایجاد شده در هر قسمت از محرک‌های حسی (بینائی، لامسه، بویایی) متفاوت استفاده شد به این معنی که: دیواره‌ها رنگ سفید داشت ولی در هر قسمت دارای تزئینات متفاوت نسبت به دو قسمت دیگر بوده و کف یکی از قسمت‌ها مشبک و کف قسمت دوم زیر و کف قسمت سوم صاف می‌باشد. در یکی از قسمت‌ها از بوی اسید استیک ۱۰٪ و در قسمت دیگر از بوی عطر و در قسمت سوم از بوی سالیسین (بدون بو) استفاده شد.

روش کار: برای انجام آزمایش CPP به روش Hand عمل شد [۶]. طول هر دوره مطالعه چهار روز بود و جهت مطالعه هر دوز از داروهای موردنظر، یک گروه موش (n=۶) انتخاب شد. هر موش در روز اول به مدت ۱۰ دقیقه آزادانه در قسمت‌های مختلف قفس گردش می‌کرد و اگر در طی این مدت بیش از ۶۰٪ زمان را در یک قسمت صرف می‌کرد، آن قسمت بعنوان قسمت ترجیحی در نظر گرفته می‌شد. برای موش‌هایی که در دو قسمت بصورت تقریباً مساوی بسر می‌بردند، قسمت سوم (که معمولاً کمتر از ۱۰٪ زمان در آن سپری می‌شد)، بعنوان قسمت تنفیری در نظر گرفته می‌شد. شرطی شدن نسبت به بخش ترجیحی (یا تنفیری) انجام نمی‌شد. در روز دوم به حیوان دارو تزریق شده و به مدت ۲۰ دقیقه در یکی از دو قسمت باقی مانده قرار می‌گرفت. در روز سوم حیوان سالیسین دریافت کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در قسمت باقی مانده دیگر قرار می‌گرفت. در روز چهارم درب دو قسمت دریافت دارو و سالیسین برداشته شده و حیوان به مدت ۱۰ دقیقه در این دو قسمت آزادانه حرکت می‌کرد. مدت زمان توقف حیوان در هر قسمت ثبت شده

و میانگین آن بعنوان زمان ترجیح مکان محاسبه می‌شد. به منظور بررسی اثر تجویز حاد مهارگران NOS بر کار آل آرژینین، داروها در روز آزمایش به حیواناتی که در روزهای آموزش آل - آرژینین دریافت کرده بودند، تزریق شد. برای بررسی اثر تجویز مزمن مهارگران NOS بر کار آل - آرژینین، این داروها در روزهای آموزش به همراه آل - آرژینین به حیوانات تزریق می‌شد.

آنالیز آماری: در این مطالعه زمان صرف شده در قسمت دریافت دارو (CPP Time) بعنوان شاخصی جهت ارزیابی ترجیح مکانی در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل آماری گروه‌های کنترل و گروه‌های تجربی از Unpaired t-test، آنالیز واریانس یکطرفه و یا تست کروسکال - والیس استفاده گردید. نتایج بصورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ زمان CCP بیان شد و در تمامی موارد $P < 0.05$ بعنوان مرز معنی دار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

الف: اثر آل - آرژینین: تزریق آل - آرژینین به داخل هسته آکومبانس در مقادیر ۰/۵ و ۱ و ۳ $\mu\text{g}/\text{rat}$ ، سبب ایجاد ترجیح مکان شرطی شده در موش گردید. ($KW=9/55, P<0/05$)، (شکل ۱).

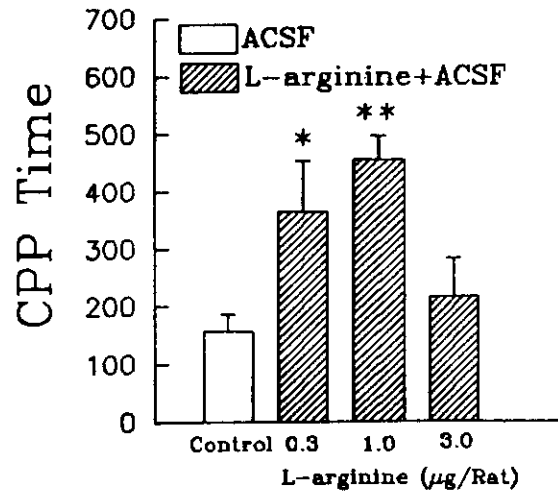
ب: اثر L-NAME: تزریق L-NAME به داخل هسته آکومبانس در مقادیر ۰/۲ و ۱ و ۳ $\mu\text{g}/\text{rat}$ ، ترجیح مکان شرطی شده معنی داری را نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد [$F(3,20)=0/13, P=0/3$] (شکل ۲).

ج: اثر آمینوبیگوانیدین: تزریق آمینوبیگوانیدین به داخل هسته آکومبانس در مقادیر ۰/۲ و ۱ و ۳ میکروگرم به ازای هر موش، ترجیح مکان شرطی شده معنی داری را

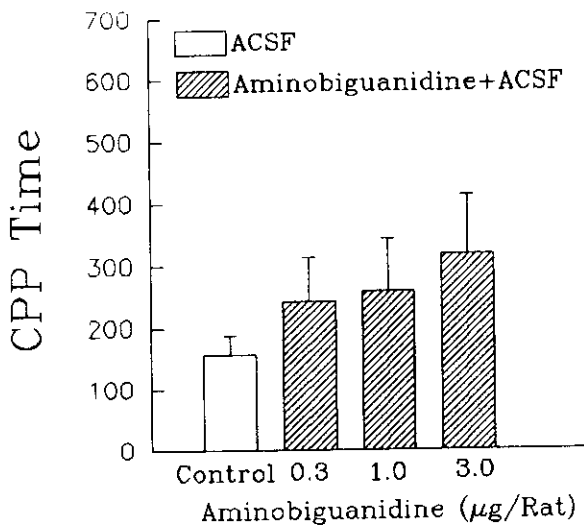
د: اثر تزریق حاد L-NAME بر ترجیح مکان شرطی شده ناشی از تزریق مرکزی ال - آرژینین : تزریق حاد L-NAME بصورت داخل صفاقی (50 mg/kg) در روز آزمایش و یک ساعت قبل از تست سبب کاهش شدید ترجیح مکان شرطی شده ناشی از تزریق ال - آرژینین به داخل هسته آکومبانس گردید ($P < 0.01$ ، (شکل ۴). ($t_{18} = 3.29$)

ه: اثر تزریق مزمن L-NAME بر ترجیح مکان شرطی شده ناشی از تزریق مرکزی ال - آرژینین : تزریق مزمن L-NAME بصورت داخل صفاقی (در

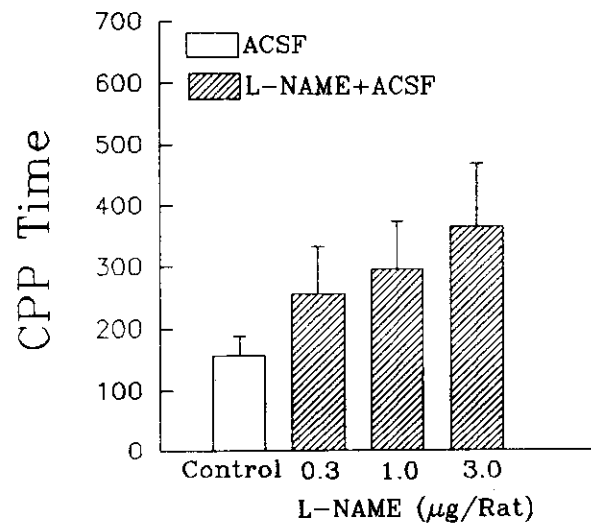
نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد ($P = 0.05$ ، $KW = 2.245$) (شکل ۳).



شکل ۱- مقایسه اثر تجویز داخل هسته آکومبانس دوزهای مختلف ال - آرژینین با گروه کنترل (n=6) داده ها بصورت mean±SEM، (**P<0.01، *P<0.05)

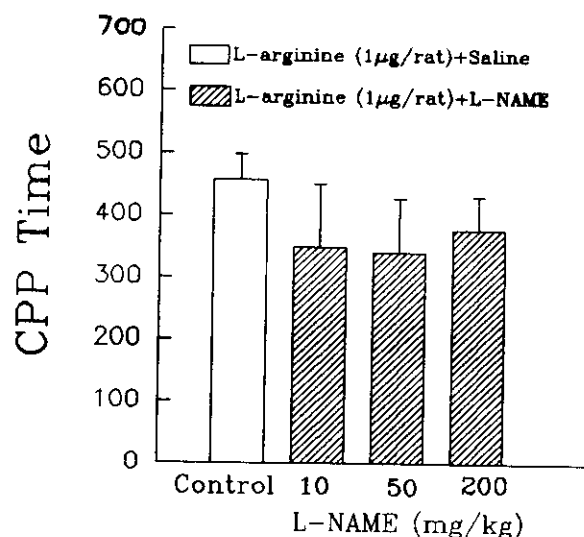


شکل ۳ - اثر تزریق داخل هسته آکومبانس داروی آمینوبیگوانیدین در القاء ترجیح مکان شرطی شده (n=6) داده ها بصورت (mean±SEM) مقادیر 10 mg/kg و 50 و 200) در روز آموزش، اثری بر ترجیح مکان شرطی شده ناشی از تزریق ال - آرژینین به داخل هسته آکومبانس نداشت ($P = 0.75$ ، $KW = 1.77$) (شکل ۵).

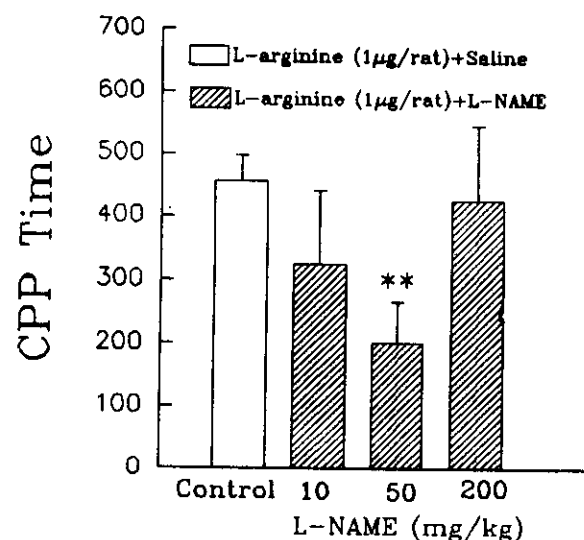


شکل ۲- اثر تزریق داخل هسته آکومبانس داروی L-NAME در القاء ترجیح مکان شرطی شده (n=6) داده ها بصورت (mean±SEM).

عوامل عصبی و بیولوژیک مؤثر در اعتیاد به مواد مخدر، هنوز عوامل ناشناخته در این زمینه زیانند. 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 - آرژینین ساخته می شود و در سال های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است [۸]. 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 [۱، ۲، ۷، ۱۲]. اخیراً مشخص شده که در هسته آکومبانس غلظت بالائی از آنزیم NOS یافت می شود [۵] که نشان دهنده نقشی برای نیتریک اکساید در اعمال این هسته است. هسته آکومبانس از مراکز اصلی مسیر پاداش در دستگاه عصبی می باشد و مطالعات مختلف نقش مهمی را در بروز خواص پاداشی داروهای مخدر نشان داده اند [۹، ۱۰]. در مطالعه حاضر تجویز داخل هسته آکومبانس ال - آرژینین توانست سبب القاء ترجیح مکان شرطی شده در موش نژاد ویستار شود. این نتیجه با نتایج قبلی ما در موش سوری همخوانی دارد [۱]. تحقیقات قبلی نشان داده اند که ال - آرژینین می تواند در دستگاه عصبی مرکزی سبب رها شدن نیتریک اکساید گردد و به عنوان پیش ساز آن عمل کند [۸]. بنابراین می توان نتیجه گرفت که ال - آرژینین از طریق القاء رها شدن نیتریک اکساید سبب بروز خواص پاداشی شده است. همچنین نتایج این تحقیق نشان می دهد که داروهای مهار کننده سنتز نیتریک اکساید اثری در ایجاد ترجیح یا تنفر مکان شرطی شده ندارند. از طرفی این نتایج بیان می کنند که تزریق حاد L-NAME



شکل ۴- اثر تجویز مزمن L-NAME بر CPP ناشی از ال - آرژینین (n=۶، داده ها بصورت mean±SEM).



شکل ۵- اثر تجویز حاد L-NAME بر CPP ناشی از ال - آرژینین (n=۶، داده ها بصورت mean±SEM، *P<۰/۰۱، اختلاف با گروه شاهد می باشد).

بحث

با وجود پیشرفت های بسیار زیاد در زمینه شناخت

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 حلقه 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 ... (عج) انجام شد. بدین وسیله از زحمات این عزیزان قدردانی می‌شود.

منابع

- [1] شریعتی م ر ، آقائی فیروزآبادی س ح ، خوش باطن ۴، علی، عسگری ع ر. قشونی ح، صحرایی ه نقش نیتریک اکساید در ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین در موش سوری نر، **فیزیولوژی و فارماکولوژی**، سال دوم (شماره ۲)، ۱۳۷۷، ۱۴۳-۱۳۷.
- [2] فوادالدینی م، آقائی فیروزآبادی س ح، خوش باطن ع، عسگری ع ر، قشونی ح، صحرایی ه، اثر ال - آرژینین و L-NAME بر خود - 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*

می‌تواند سبب ایجاد تنفر مکان شرطی شده در موش‌هائی شود که قبلاً با تزریق ال - آرژینین در آنها ترجیح مکان شرطی شده القاء شده است. نقش نیتریک اکساید در کسب و پایداری ترجیح مکان شرطی شده و خود - تزریقی داروهای مخدر مانند مرفین [۲،۱] و همچنین کوکائین [۱۲،۶] 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 در مناطق 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

- of mesocortical dopamine neurons, *Pharmacological Reviews*, 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

- behaviors: ambulation-accelerating activity, reverse tolerance and conditioned 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.