



Semnan University of Medical Sciences

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

Volume 21, Issue 2 (Spring 2019), 205- 393

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:

Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

نقش سیستم نیتریک ارژیک هسته اکومبسن در تغییرات متابولیکی ناشی از استرس حاد

یاسمن حسینی (Ph.D)، علیرضا محمدی (Ph.D)، ژایلا پیرزاد جهرمی (Ph.D)، هدایت صحرایی (Ph.D)، بشری هاتف* (Ph.D)

مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲۸

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۸۰۴۰۰۶۰ boshrahatef@bmsu.ac.ir

چکیده

هدف: هدف این مطالعه بررسی دخالت سیستم نیتریک ارژیک بر تغییرات متابولیک ناشی از القای استرس، در پوسته هسته اکومبسن با تزریق ال-آرژینین (پیش‌ساز NO) و L-NAME (مهارکننده NO) در موش صحرایی نر بود. مواد و روش‌ها: موش‌های نر نژاد ویستار در دستگاه استریو تاکسی قرار گرفتند و پوسته هسته اکومبسن چپ آن‌ها کانول‌گذاری شد. در چهار روز متوالی ۵ دقیقه قبل از هر القای استرس ۶۰ ثانیه‌ای شوک الکتریکی ۴۰ میلی آمپری به کف پای حیوانات، نرمال سالین (۰/۲۵ میکرولیتر در هر موش) یا دوزهای مختلف ال-آرژینین یا L-NAME (1 و ۱۰ میکروگرم در موش) تزریق شد. در روز اول و چهارم سطح کورتیزول پلاسما و هر روز میزان مصرف آب و غذا و زمان شروع غذا خوردن و در آخر وزن غده فوق کلیه اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: بعد از چهار روز که به‌طور مشخص کورتیزول در گروه کنترل مثبت افزایش یافت. تزریق ال-آرژینین ۱۰ میکروگرم در موش سطح کورتیزول پلاسما، آب و غذای دریافتی را کاهش داد. اما L-NAME در همان دوز باعث افزایش آن‌ها شد. ال-آرژینین و L-NAME ده میکروگرم در موش در هر دو شرایط به‌طور معناداری باعث کاهش سطح کورتیزول پلاسما و افزایش آب‌نوشی و غذا خوردن شده بودند. فاکتورهای متابولیک بین روز اول و چهارم در گروه‌ها متفاوت بود. افزایش وزن غده آدرنال به دنبال تزریق ال-آرژینین ۱۰ میکروگرم در موش در هر دو شرایط با و بدون استرس دیده شد. استرس و دارو در تغییر زمان شروع غذا خوردن اثر تداخلی بر هم داشتند. نتیجه‌گیری: نیتریک اکساید در بخش پوسته هسته اکومبسن چپ در عملکرد متابولیک و تغییرات آن به‌دنبال استرس نقش دارد.

واژه‌های کلیدی: کورتیزول، نیتریک اکساید، ال-آرژینین، L-NAME، استرس، پوسته هسته اکومبسن

مقدمه

استرس، واکنش فرد نسبت به شرایط و موقعیت‌های جدید زندگی و تلاش برای سازگار شدن با این شرایط است. در واقع نه تنها استرس همواره دارای بار معنایی منفی نیست، بلکه در شرایط خاصی وجود آن برای زندگی سالم، ضروری و مفید است. آنچه که نامطلوب و مضر است استرس شدید و کنترل نشده می‌باشد. مهم‌ترین محل تأثیر استرس در بدن را مغز دانسته‌اند و دستگاه عصبی اولین واکنش‌دهنده به استرس می‌باشد [۱]. مطالعات قبلی نشان داده که به دنبال اعمال استرس، تغییرات عصبی و هورمونی زیادی در بدن موجود زنده ایجاد می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از افزایش غلظت هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی (کورتیزول و کورتیکوسترون) رها شده از غده فوق کلیه به دلیل افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس-

هیپوفیز-فوق کلیه (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal; HPA)، افزایش غلظت پلاسمایی کاتکولامین‌ها (آدرنالین و نورآدرنالین) به دلیل فعالیت محور سمپاتوآدرنال (Sympato-Adrenal; SA)، و ترشح نوروپپتیدهایی نظیر وازوپرسین در خون که می‌توانند باعث بروز تغییر در خصوصیات الکتریکی، شکل‌پذیری سیناپسی و تغییر در ظرفیت تکثیری سلول‌ها در مغز شود. به همین دلیل از کورتیزول و کورتیکوسترون اغلب به‌عنوان بیومارکرهای استرس استفاده می‌شود [۲، ۳]. تحریک سلول‌های قشر غدد فوق کلیه در اثر هورمون رها شده از غده هیپوفیز در حین استرس باعث افزایش اندازه و تعداد این سلول‌ها (هیپرپلازی) گردد [۴]. گرچه کورتیکوسترون به‌عنوان گلوکوکورتیکوئید اصلی در تنظیم پاسخ‌های استرس در جوندگان می‌باشد، ولی محققان از تغییرات غلظت کورتیزول نیز

در تحقیقات استرس در جوندگان (موش‌های بزرگ و کوچک آزمایشگاهی) استفاده کرده‌اند [۲]. تحقیقات نشان می‌دهد که کورتیزول پتانسیل گلوکوکورتیکویدی بیش‌تری در مقایسه با کورتیکوسترون دارد. هم‌چنین دیده شد که سطح کورتیزول پلازما در جوندگان در ارتباط نزدیک با سطح کورتیکوسترون پلازما در شرایط استرس‌زا و یا فیزیولوژیکی می‌باشد و هر دو می‌توانند به‌عنوان یک مارکر نشان‌دهنده استرس در موش‌ها استفاده شوند. هم‌چنین دیده شد که طی استرس حاد حتی کورتیزول سریع‌تر از کورتیکوسترون افزایش می‌یابد و طی استرس مزمن سطح کورتیکوسترون پلازما روند کاهشی را طی می‌کند ولی سطح کورتیزول تغییر چندانی را نشان نمی‌دهد [۳،۲].

هسته آکومبنس به عنوان یکی از مهم‌ترین ساختارهای مغز پیشین و قسمت شکمی استریاتوم، نقش مهمی را در پاداش طبیعی مانند خوردن و آشامیدن و نیز پاداش دارویی ایفا می‌کند. تحقیقات ایمنوهِستوشیمیایی و مورفومتری نشان داده‌اند که این هسته از دو بخش قشر یا پوسته و مغز تشکیل شده است. قسمت پوسته که رابط مهم پاداش و انگیزش است دارای رشته‌های عصبی زیاد است و سلول‌های کمی در آن قرار دارند [۵،۶]. پایانه‌های دوپامینی از ناحیه تگمنتوم شکمی و پایانه‌های گلوتاماتی از نواحی دیگر مانند قشر مخ نواحی پریفروتال، هیپوکمپ، تالاموس و آمیگدال به این بخش از هسته آکومبنس می‌رسند. هم‌چنین ارتباط پیتیدرژیکی از نوع اورکسینرژیک بین ناحیه هیپوتالاموس جانبی و این بخش از هسته آکومبنس برقرار است [۷]. نورون‌های این بخش بسیار محدود بوده و شامل نورون‌های خاری کوچک گابائُرژیک هستند که نقش واسط را ایفا می‌کنند [۸]. این بخش از هسته آکومبنس هم‌چنین بخشی از یک ساز و کار عملیاتی به نام آمیگدال گسترش یافته می‌باشد که به همراه هسته مرکزی آمیگدال و چند ساختمان دیگر، نقش مهمی را در شرطی شدن ابزاری و بروز بخش هیجانی اعتیاد (هم بخش هیجانی مثبت مانند سرخوشی و هم بخش هیجانی منفی مانند تنفر) بازی می‌کنند [۹]. این بخش از مغز هم‌چنین دارای عملکرد مهمی در بروز پاسخ به استرس می‌باشد [۱۰]. در تحقیقات قبلی، مشخص شده است که استرس با تحریک مدارهای نورونی گلوتاماتی و گابائُرژیک موجود در بخش‌های مختلف آمیگدال و از جمله در هسته مرکزی آن باعث بروز شکل‌پذیری عصبی و در نتیجه تقویت فعالیت این بخش از دستگاه عصبی بعد از استرس می‌گردد [۱]. این اثرات به دلیل ارتباطات مهم بین هسته مرکزی آمیگدال و بخش پوسته هسته آکومبنس به این هسته منتقل شده و از طرف دیگر، هر گونه دست‌کاری در پوسته هسته آکومبنس می‌تواند به فعالیت‌های بخش "آمیگدال گسترش یافته" تسری پیدا کند و آن را تحت تاثیر قرار دهد [۱۱-۱۳].

یکی از مهم‌ترین میانجی‌هایی که در هنگام تحریک گیرنده‌های گلوتاماتی (NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) فعال شده و حداقل مسئول قسمتی از اثرات گلوتامات می‌باشد [۱۴]، نیتریک اکساید (Nitric Oxide; NO) می‌باشد که به دلیل ورود یون کلسیم در اثر فعالیت گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی به نورون و فعال شدن آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در سیتوپلاسم نورون‌ها تولید شده [۱۵] و به عنوان یک میانجی عصبی که می‌تواند هم سلول پیش‌سیناپسی و هم سلول پس‌سیناپسی را تحت تاثیر قرار دهد، شناخته شده است. [۱۶] این میانجی یک رادیکال آزاد است که به دلیل ماهیت رادیکالی خود قادر است طیف وسیعی از بیو مولکول‌های موجود در غشاء، سیتوپلاسم و فضای بین سلولی را تحت تاثیر قرار داده و آن‌ها را نیتروزیله کند [۱۷]. این امر باعث بر هم خوردن فعالیت این بیو مولکول‌ها شده و در نتیجه اثرات نیتریک اکساید ظاهر می‌شود. لازم به توضیح است که این اثرات ممکن است در حالات مختلف متفاوت بوده و بسته به شرایط، محل، و جنس و گونه جاندار متفاوت باشد حتی ممکن است در یک گونه و جنس مشخص در زمان‌های مختلف اثرات متفاوتی دیده شود [۱۸]. از سوی دیگر، نیتریک اکساید با فعال کردن آنزیم گوانیلات سیکلاز باعث افزایش تولید گوانیلات منو فسفات حلقوی (cGMP) شده و این پیامبر ثانویه نیز مسئول بخشی از اثرات نیتریک اکساید است [۱۹]. به همین دلیل، برای نیتریک اکساید بیش‌تر نقش تعدیل‌کنندگی را قائلند و نقش ترانسمیتری آن را چندان قوی نمی‌باشد [۲۰،۲۱].

در تحقیقات قبلی، نقش بخش پوسته هسته آکومبنس (به‌صورت فعال و غیر فعال بودن آن) به عنوان یکی از بخش‌های آمیگدال گسترش یافته در تعدیل اثرات متابولیکی استرس در موش‌های کوچک [۲۲] و بزرگ [۱۲] آزمایشگاهی نر [۱۲] و ماده [۱۳] مورد بررسی قرار گرفته است. هم‌چنین، نقش سیستم گلوتاماتی در این امر در موش‌های کوچک و بزرگ آزمایشگاهی بررسی شده است [۱۴،۲۳]. اما تحقیقی در مورد نقش نیتریک اکساید در بخش پوسته هسته آکومبنس در بروز این پاسخ‌ها انجام نشده است. از سوی دیگر، نقش نیتریک اکساید در رفتارهای مختلفی مانند ترجیح مکانی شرطی شده در موش بزرگ آزمایشگاهی نر [۲۴] و نیز در بروز سندرم قطع مورفین [۲۵] بررسی شده است. در این تحقیق اثرات فعال‌سازی و غیر فعال شدن سیستم نیتریک اثرژیک در بخش پوسته هسته آکومبنس سمت چپ در بروز تغییرات متابولیک حاصل از استرس در موش بزرگ آزمایشگاهی نر بررسی شده است. لازم به توضیح است که در تحقیقات قبلی مشخص شده است که بخش پوسته هسته آکومبنس سمت چپ و راست دارای عملکرد یکسان در تعدیل

سرنگ هامیلتون 15μ و با استفاده از یک رابط پلی اتیلنی به قطر $20 \mu\text{m}$ که یک سر آن به سرنگ هامیلتون و یک سر دیگر به کانول متصل می‌باشد، ماده تریپان بلو با دوز $0.15 \mu\text{g}/\text{m}$ در پوسته هسته اکومینس چپ مغز حیوان تزریق شد، سپس سر حیوان توسط گیوتین قطع شده و پس از خارج کردن مغز از حجمه آن را به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده تا قوام لازم جهت برش در ماتریکس مخصوص را به دست آورد. برش‌هایی به ضخامت ۱ میلی‌متر از مغز حیوان با ماتریکس مخصوص زده شد تا مسیر کانول و تزریق داروی تریپان بلو در پوسته هسته اکومینس چپ مغزی مشخص شود و محل مورد نظر تایید شد.

داروهای مورد استفاده در این آزمایش ال-آرژنین و یا L-NAME (تهیه شده از شرکت سیگما-آمریکا) بود که با استفاده از سرنگ هامیلتون به داخل هسته اکومینس تزریق شد. حیوانات توسط مخلوط دیازپام هیدروکلراید ($4 \text{mg}/\text{kg}$) و کتامین ($60 \text{mg}/\text{kg}$) بی‌هوش شدند و پس از جراحی حجمه یک عدد کانول راهنما از جنس استیل زنگ زن شماره ۲۳ با استفاده از دستگاه استریوتکس طبق مختصات اطلس پاکسینوس برای هسته اکومینس ($LA=0.8$, $AP=1.7$, $DV=5.6$ میلی متر) در سر حیوان کار گذاشته شد [۲۶]. این کانول‌ها ۵۰۰ میکرون بالاتر از پوسته هسته اکومینس قرار می‌گرفتند. برای جلوگیری از بسته شدن کانول‌ها یک سیم نازک استریل شده در داخل کانول‌ها قرار داده شد. بعد از جراحی و قبل از تزریق درون مغزی داروها به حیوانات هفت روز استراحت داده شد تا استرس و تخریب بافتی احتمالی که توسط جراحی صورت گرفت از بین برود و حیوان به حالت عادی خود برگردد [۲۷]. کانول تزریق (سر سوزن شماره ۳۰ دندان پزشکی) با طول ۵۰۰ میکرون بلندتر از کانول راهنما داخل آن قرار می‌گرفت و دارو به آرامی توسط سرنگ هامیلتون با حجم 0.5 میکرولیتر در بخش پوسته هسته اکومینس چپ در مدت زمان ۶۰ ثانیه تزریق می‌شد. پس از پایان آزمایش‌ها، حیوانات با دوز بالای کتامین عمیقاً بی‌هوش شده، مغز آن‌ها با روش تزریق ترانس کاردیال سالین سرد غیر فعال شده و خارج می‌شد. سپس به سرعت بررسی‌های بافت‌شناسی به منظور تعیین محل کارگذاری کانول انجام شده و مغز حیوانات برای بررسی‌های سلولی-مولکولی به فریزر -80°C درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شد.

القای استرس. استرس با استفاده از دستگاه Communication Box (ساخت شرکت برج صنعت، تهران، ایران) به حیوانات القا شد. این دستگاه متشکل از ۹ قسمت مجزا به ابعاد $16 \times 16 \times 50$ سانتی‌متر (طول $\times$ عرض $\times$ ارتفاع) از جنس پلکسی‌گلاس است. کف دستگاه دارای میله‌هایی از جنس استیل زنگ زن به قطر ۴ میلی‌متر است که در فواصل $1/3$ سانتی‌متری

عملکرد استرس نیستند و سمت چپ این هسته اثرات بهتری را در تعدیل اثرات متابولیکی استرس نسبت به سمت راست دارد [۲۲]. از آنجایی که NO دارای اثرات تعدیل‌کنندگی بر عملکرد نورون‌ها می‌باشد، فرضیه این مطالعه این بود که تغییر NO در هسته پوسته اکومینس قادر به تغییر پاسخ‌های متابولیکی مغز در نتیجه استرس می‌باشد و کاهش و افزایش اثر NO دارای تاثیرات معکوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات. در این تحقیق تجربی مداخله‌ای از ۸۴ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۲۰ تا ۱۸۰ گرم (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، تهران) استفاده شد. حیوانات در قفس‌های ۶ تایی با دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته، درجه حرارت $22-24^\circ\text{C}$ ، آب شرب شهری، و غذای کافی (تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس-ایران) نگهداری شدند. در هر سری آزمایش ۶ سر حیوان مورد استفاده قرار گرفت. بعد از کانول‌گذاری حیوانات در قفس‌های تکی قرار داده شدند. مقدار آب و غذای حیوانات طی آزمایش ثبت می‌شد. تمام آزمایش‌ها بر اساس پروتکل کار با حیوانات آزمایشگاهی کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه بقیه الله (عج) انجام گردید.

گروه‌ها. حیوانات به صورت تصادفی در ۱۴ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. حیوانات گروه کنترل منفی در هسته اکومینس سمت چپ کانول‌گذاری انجام شد و سالی‌ن به درون هسته تزریق گردید اما در آن‌ها استرس القا نشد. در حیوانات گروه کنترل مثبت پس از جراحی و کانول‌گذاری هسته اکومینس سمت چپ، سالی‌ن تجویز شد و به مدت چهار روز نیز تحت استرس قرار گرفتند. دوازده گروه دارویی نیز به صورت یک‌طرفه در هسته اکومینس چپ کانول‌گذاری شدند و شش گروه دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش داروی ال-آرژنین و یا L-NAME تجویز شد و ۵ دقیقه بعد در حیوانات استرس القاء شد. شش گروه دیگر، دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش داروی ال-آرژنین و یا-L-NAME بدون القای استرس تجویز شد.

تزریق داروها. پس از پایان جراحی استریوتاکسی و قرار گرفتن کانول مورد نظر در بطن چپ مغزی حیوان، با استفاده از ماده تریپان بلو (Trypan blue) یک ترکیب شیمیایی با جرم مولکولی $88/872$ که از این ماده جهت بررسی نسبت سلول‌های زنده به مرده در کشت‌های سلولی استفاده می‌شود، به‌طوری که غشاء سلول مرده می‌تواند توسط این ماده شیمیایی به رنگ آبی تیره رنگ شوند، اما سلول‌های زنده در برابر نفوذ این ماده به داخل غشاء سلول مقاومت از خود نشان می‌دهند (جهت ردیابی مسیر صحیح کانول در مغز حیوان استفاده شد. با استفاده از

از هم قرار دارند. این میله‌ها به ژنراتوری که به کامپیوتر متصل است وصل شده و ولتاژ و مدت زمان القا شوک توسط کاربر تعیین می‌شود [۱۴]. در این تحقیق شوک الکتریکی کف پا (ولتاژ ۴۰ میلی‌ولت، فرکانس ۱۰ هرتز و به مدت ۶۰ ثانیه) به صورت تصادفی بین ساعات ۹-۱۶ به مدت چهار روز متوالی القا شد. حیوانات یک ساعت قبل از آزمایش به منظور سازش با محیط به اتاق آزمایش منتقل شدند سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه قرار گرفته آن‌گاه به مدت ۶۰ ثانیه تحت شوک الکتریکی کف پا قرار گرفتند و به دنبال آن ۳۰ دقیقه دیگر نیز در دستگاه ماندند [۲۸، ۱۰]. حیوانات گروه کنترل منفی و گروه‌های دارویی بدون القا استرس، به مدت ۶۰ دقیقه بدون القا شوک در دستگاه قرار گرفتند.

خون‌گیری. در روز آخر آزمایش بین ساعات ۹ الی ۱۱ صبح از سینوس رترواوربیتال واقع در گوشه چشم تمامی حیوانات گروه کنترل و آزمایش خون‌گیری شد و با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پلاسمای رویی جهت سنجش هورمون کورتیزول جمع‌آوری گردید و سپس با استفاده از کیت سنجش هورمون کورتیکوسترون (کیت الایزا کورتیزول موش بزرگ آزمایشگاهی از شرکت DRG-Germany) با روش الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجیده شد [۲۲].

اندازه‌گیری میزان آب و غذای مصرفی و زمان شروع غذا خوردن. برای این‌کار حیوانات به قفس‌های تکی محل نگهداری منتقل شده و آب و غذا در اختیار آن‌ها قرار می‌گرفت. بدین صورت که هر روز بعد از اتمام کار با دستگاه القای شوک به کف پای حیوانات مقدار ۱۰ گرم غذا و ۱۰۰ سی‌سی آب برای هر حیوان گذاشته شد و روز بعد، قبل از تزریق دارو و القای شوک میزان آب و غذای مصرفی طی روز قبل برای هر حیوان اندازه‌گیری و ثبت شد (در کل دوره آزمایش از روز دوم القای شوک به مدت ۴ روز ثبت آب و غذای حیوانات انجام شد).

اندازه‌گیری زمان شروع غذا خوردن حیوانات. هر روز بلافاصله بعد از اتمام شوک‌دهی، حیوانات به قفس‌های نگهداری حیوانات برگردانده شده و توسط یک ناظر و با مشاهده مستقیم، شروع غذا خوردن حیوانات ثبت شد. این کنترل هر چهار روز بعد از القای شوک به کف پای حیوانات انجام شد (در کل دوره از روز اول القای شوک و به مدت ۴ روز ثبت زمان شروع غذاخوردن حیوانات انجام شد).

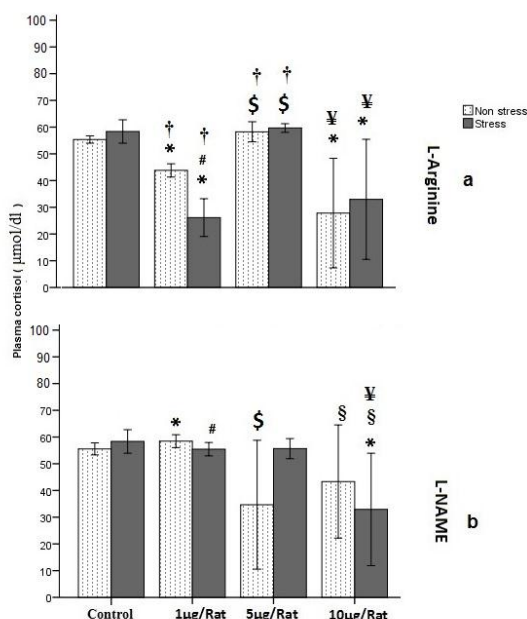
بررسی تغییرات وزن غده فوق کلیه. در پایان دوره، پس از بی‌هوش کردن حیوانات و باز کردن شکم، دو غده فوق کلیوی آن‌ها جدا شده، بافت‌های اضافی و چربی‌های آن‌ها با پنس و قیچی در زیر میکروسکوپ تشریح جدا گردید و نمونه‌ها با ترازوی حساس دیجیتال توزین شدند.

تجزیه و تحلیل آماری. برای تجزیه و تحلیل سطح کورتیزول پلاسما در روز اول و چهارم و وزن غده آدرنال از آنالیز واریانس سه طرفه استفاده شد. در این آزمون اثر تداخلی و مستقل سه فاکتور نوع دارو (ال-آرژینین و L-NAME)، مقدار دوز (۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در موش) و شرایط (با استرس، بدون استرس) بعد از اطمینان از توزیع نرمال متغیرها در گروه‌ها و هموژن بودن واریانس‌ها، بررسی شد. در ادامه برای مقایسه بین گروه‌ها چون تعداد نمونه‌ها در گروه‌ها کم بود ($N=6$ در هر گروه) از تست غیرپارامتریک من‌ویتنی استفاده شد. به منظور آنالیز میزان آبنوشی و مقدار غذا خوردن و زمان شروع غذا خوردن از تست آماری four-way mixed model ANOVA استفاده شد. در این آزمون اثر تداخلی و مستقل سه فاکتور نوع دارو (ال-آرژینین و L-NAME)، مقدار دوز (۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در موش) و شرایط (با استرس، بدون استرس) در طی چهار روز بعد از اطمینان از توزیع نرمال متغیرها در گروه‌ها و هموژن بودن واریانس‌ها، بررسی شد. در ادامه برای مقایسه دو به دو گروه‌ها از تست غیرپارامتریک من‌ویتنی استفاده شد. در تمامی بررسی‌ها $P < 0.05$ به عنوان مرز معنی‌دار بودن اختلافات در نظر گرفته شد.

نتایج

تأثیر تجویز داخل پوسته هسته آکومبسن L-Arginine و L-NAME بر تغییرات سطح کورتیزول پلاسما ناشی از استرس در روز اول

نتایج آنالیز three-ways model ANOVA نشان داد که اثر تداخلی نوع دارو در مقدار دوز آن در شرایط معنادار بوده است ($p < 0.02$). بدین معنا که تنها تزریق ال-آرژینین به داخل قسمت پوسته هسته آکومبسن چپ در حیوانات در دوزهای ۱ و ۱۰ میکروگرم/موش و هم‌چنین تزریق L-NAME در دوز ۱۰ میکروگرم/موش باعث کاهش کورتیزول پلاسما و L-NAME در دوز ۱ میکروگرم/موش باعث افزایش سطح کورتیزول پلاسما نسبت به گروه کنترل منفی شدند. القای استرس در روز اول باعث افزایش سطح معنادار در سطح پلاسمایی کورتیزول در حیوانات نشد و تزریق داخل پوسته هسته آکومبسن ال-آرژینین و L-NAME در دوز ۱ میکروگرم/موش قبل از استرس باعث کاهش معنادار بیش‌تر سطح کورتیزول در مقایسه با بدون استرس شد. در دوز ۱۰ میکروگرم/موش هر دو ماده نیز کاهش معنادار در شرایط استرس نسبت به گروه کنترل مثبت دیده شد (شکل ۱).



شکل ۲: میانگین و $CI \pm 95\%$ میزان غلظت کورتیزول پلاسما در گروههای کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین (a) و L-NAME (b) در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط استرس دیده و بدون استرس در روز چهارم. *: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ بین گروههای تحت تزریق دارو با دوزهای مختلف با گروه کنترل خودشان در آن شرایط است. #: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ بین شرایط با استرس و بدون استرس در هر دوز و هر دارو است. \$: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ مقایسه دوز ۱ و ۵ میکروگرم در موش در هر شرایط و دارو. †: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ مقایسه دوز ۱ و ۱۰ میکروگرم در موش در هر شرایط و دارو. ‡: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ مقایسه بین داروها

تغییرات وزن غده فوق کلیوی در موشهای استرس دیده و

استرس ندیده

تاثیر استرس بر تغییرات اندازه و وزن غدد فوق کلیه حیوانات

از مهم ترین اهداف این تحقیق بود. نتایج آنالیز

three-ways model ANOVA نشان داد که اثر تداخلی نوع

دارو در مقدار دوز معنادار بوده است ($p < 0.00001$) و اثر

دوز دارو در شرایط هم معنادار بوده است ($p < 0.02$). نتایج

نشان داد که تجویز ال-آرژنین در دوز ۱ میکروگرم/موش چه

در شرایط استرس و بدون استرس و L-NAME در دوز ۱۰

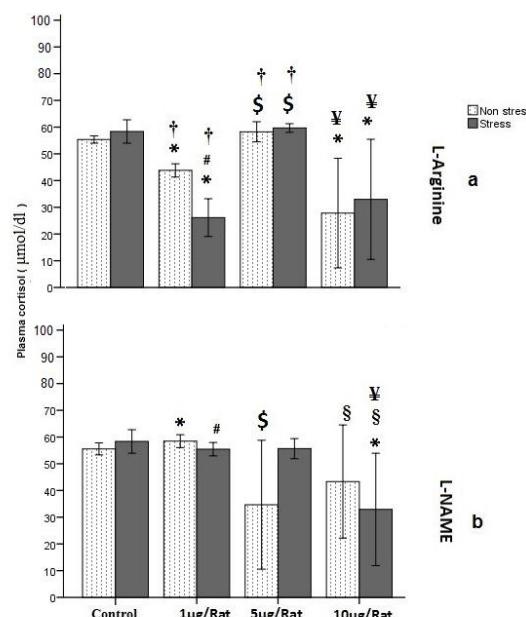
میکروگرم/موش در شرایط بدون استرس باعث افزایش وزن

غدد فوق کلیه نسبت به گروه کنترلشان شد و L-NAME تجویز

در دوز ۵ میکروگرم/موش در شرایط بدون استرس باعث

کاهش وزن غده نسبت به گروه کنترل منفی و دیگر دوزهای

این ماده شد (شکل ۳).



شکل ۱: میانگین و $CI \pm 95\%$ میزان غلظت کورتیزول پلاسما در گروههای کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین (a) و L-NAME (b) در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط استرس دیده و بدون استرس در روز اول. *: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ بین گروههای تحت تزریق دارو با دوزهای مختلف با گروه کنترل خودشان در آن شرایط است. #: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ بین شرایط با استرس و بدون استرس در هر دوز و هر دارو است. \$: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ مقایسه دوز ۱ و ۵ میکروگرم در موش در هر شرایط و دارو. †: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ مقایسه دوز ۱ و ۱۰ میکروگرم در موش در هر شرایط و دارو. ‡: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ مقایسه بین داروها

تأثیر تجویز داخل پوسته هسته آکومینس L-Arginine و L-

NAME بر تغییرات سطح کورتیزول پلاسما ناشی از استرس در

روز چهارم

نتایج آنالیز three-ways model ANOVA نشان داد که اثر

تداخلی نوع دارو در مقدار دوز آن در شرایط معنادار بوده است

($p < 0.009$). در مقایسه دو به دو گروهها می توان گفت که

استرس در روز چهارم باعث افزایش معنادار کورتیزول در گروه

کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی شد. تجویز ال-آرژنین و

L-NAME در داخل قسمت پوسته هسته آکومینس چپ در

حیوانات در دوز ۱۰ میکروگرم/موش در شرایط بدون و با

استرس بعد از چهار روز باعث کاهش کورتیزول پلاسما و تزریق

L-NAME در دوز ۱ میکروگرم/موش چه در شرایط استرس و

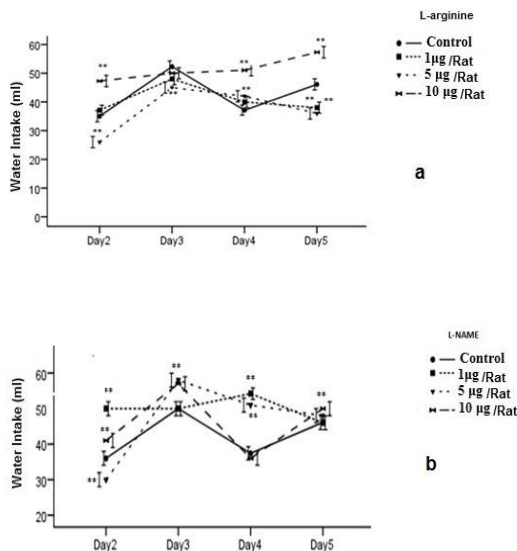
بدون استرس باعث افزایش سطح کورتیزول پلاسما نسبت به گروه

کنترل شدند در حالی که ال-آرژنین در همین دوز در شرایط

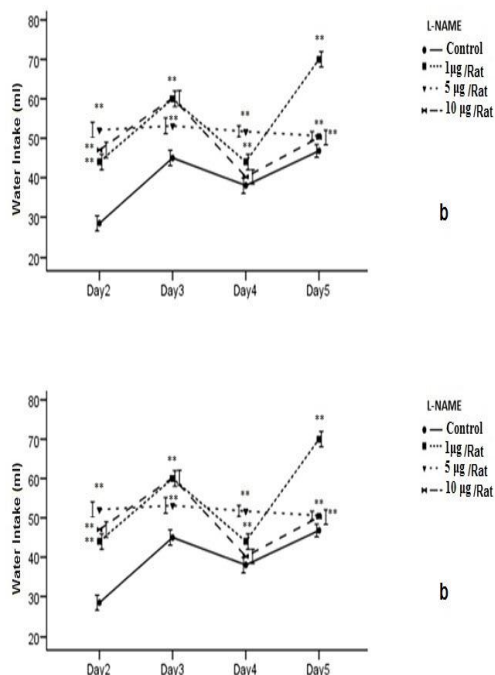
استرس به شدت باعث کاهش سطح کورتیزول در مقایسه با گروه

کنترل و در مقایسه با تزریق همین ماده در شرایط بدون استرس

شد (شکل ۲).

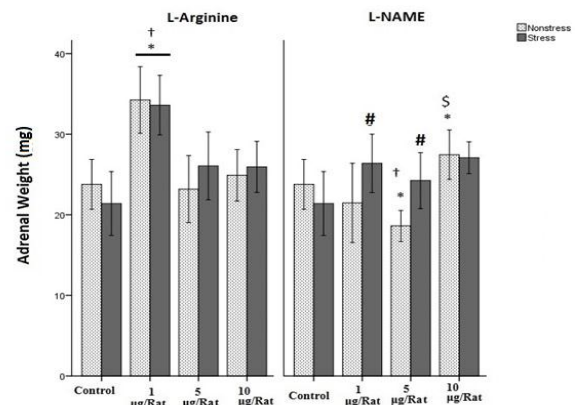


شکل ۴. میانگین و انحراف معیار میزان آنبوشتی در گروههای کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین (a) و L-NAME (b) در دوزهای ۱، ۵، و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط بدون استرس. تفاوت معنادار با گروه کنترل: **p-0.001 و value n=6 در هر گروه است



شکل ۵. میانگین و انحراف معیار میزان آنبوشی در گروههای کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین (a) و L-NAME (b) در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط با استرس. تفاوت معنادار با گروه کنترل*: p-0.001 و value n=6 در هر گروه است.

بررسی تغییرات میزان غذا خوردن حیوانات پس از استرس نتایج آنالیز four-ways mixed model ANOVA و مقایسه دو به دو گروه‌ها در ادامه نشان داد که اثر تداخلی همه فاکتورها در طی روزها معنادار بود ($P < 0.02$). بدین معنا که تجویز ال-

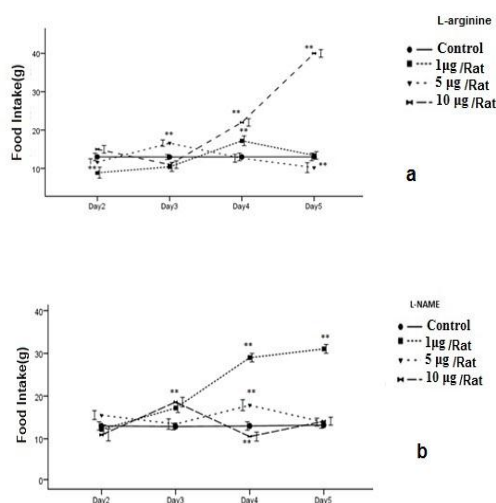


شکل ۳: میانگین و ۹۵٪ CI تغییرات وزن غده فوق کلیوی در گروههای کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین و L-NAME در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط بدون و با استرس. *: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ بین گروههای تحت تزریق دارو با دوزهای مختلف با گروه کنترل خودشان در آن شرایط است. #: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ بین شرایط با استرس و بدون استرس در هر دوز و هر دارو است. \$: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ مقایسه دوز ۱ و ۱۰ میکروگرم در موش و ۵ و ۱۰ میکروگرم در موش در هر شرایط و دارو †: تفاوت معنادار با $p\text{-value} < 0.05$ مقایسه بین داروها

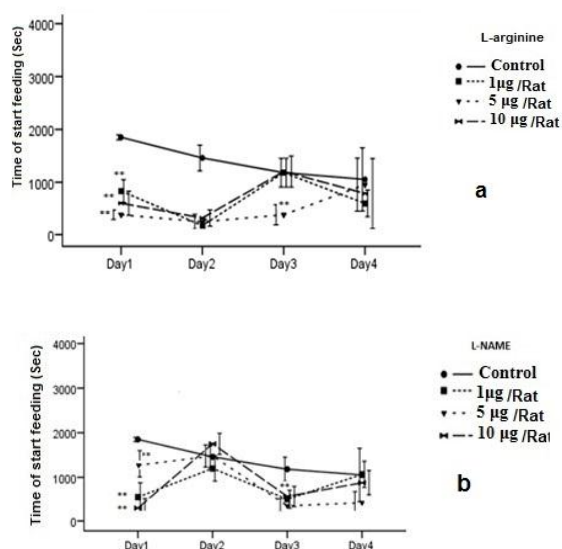
اثر استرس بر میزان آب نوشی

نتایج آنالیز four-ways mixed model ANOVA و مقایسه دو به دو گروه‌ها در ادامه نشان داد که اثر تداخلی همه فاکتورها در طی روزها معنادار بود ($P < 0.0001$). بدین معنا که ال-آرژنین در دوز ۱ میکروگرم/موش باعث کاهش مصرف آب، و در دوز ۱۰ میکروگرم/موش باعث افزایش مصرف آب شد. L-NAME در هر سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش باعث افزایش مصرف آب نسبت به گروه کنترل منفی شد. در گروه‌های استرسی، استرس توانست میزان آب نوشی حیوانات را افزایش دهد اما تجویز ال-آرژنین در دوز ۱۰ میکروگرم/موش باعث افزایش مصرف آب نسبت به گروه کنترل مثبت شد. در حالی که تزریق این ماده در دوزهای ۱ و ۵ میکروگرم/موش باعث کاهش مصرف آب نسبت به گروه کنترل مثبت شد. تجویز L-NAME به داخل بخش پوسته هسته آکومبنس سمت چپ در موش‌های استرس دیده در دوزهای ۱ و ۱۰ میکروگرم/موش باعث افزایش مصرف آب در روز اول و در دوز ۵ میکروگرم/موش باعث کاهش مصرف آب شد (شکل ۴ و ۵).

در موش‌ها شد. تجویز داخل هسته آکومبانس ال-آرژنین و به ترتیب در دوزهای ۱ و ۵ میکروگرم/موش و ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش باعث کاهش اثر استرس شدند (شکل ۸ و ۹).

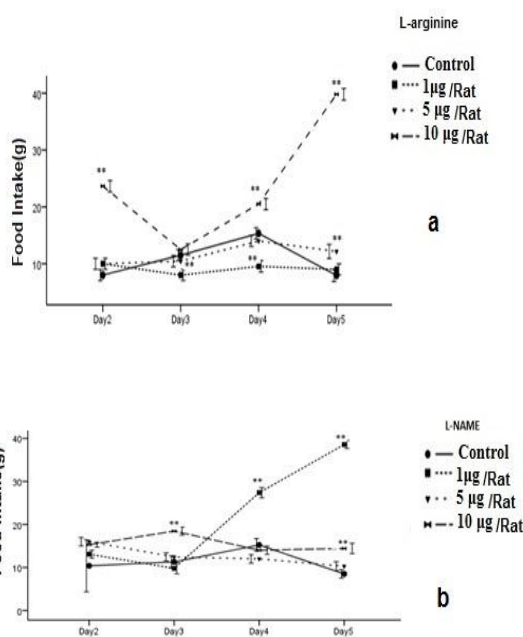


شکل ۷: میانگین و انحراف معیار میزان غذا خوردن در گروههای کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین (a) و L-NAME (b) در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط با استرس. تفاوت معنادار با گروه کنترل** p -value < 0.001 و $n=6$ در هر گروه است.



شکل ۸: میانگین و انحراف معیار زمان شروع غذا خوردن در گروههای کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین (a) و L-NAME (b) در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط بدون استرس: تفاوت معنادار با گروه کنترل** p -value < 0.001 و $n=6$ در هر گروه است.

آرژنین با دوز ۱۰ میکروگرم/موش باعث افزایش شدید در روند میزان غذا خوردن حیوانات نسبت به گروه کنترل منفی شد. در حالی که تجویز داروی L-NAME دوز ۱ میکروگرم/موش باعث افزایش میزان غذا خوردن شد. در گروه استرس، استرس میزان دریافت غذا را نسبت به گروه کنترل منفی کاهش داد. ال-آرژنین با دوز ۱ میکروگرم/موش این اثر استرس را تشدید و در دوز ۱۰ میکروگرم/موش آن را خنثی کرد. تجویز داروی L-NAME در دوزهای ۱ و ۱۰ میکروگرم/موش اثر استرس را مهار کرد. این امر در گروههای استرسی نیز دیده شد. ضمن آن که در گروه کنترل مثبت، افزایش میزان غذا خوردن نسبت به گروه کنترل منفی دیده شد (شکل ۶ و ۷).



شکل ۹: میانگین و انحراف معیار میزان غذا خوردن در گروههای کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین (a) و L-NAME (b) در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط بدون استرس. تفاوت معنادار با گروه کنترل** p -value < 0.001 و $n=6$ در هر گروه است.

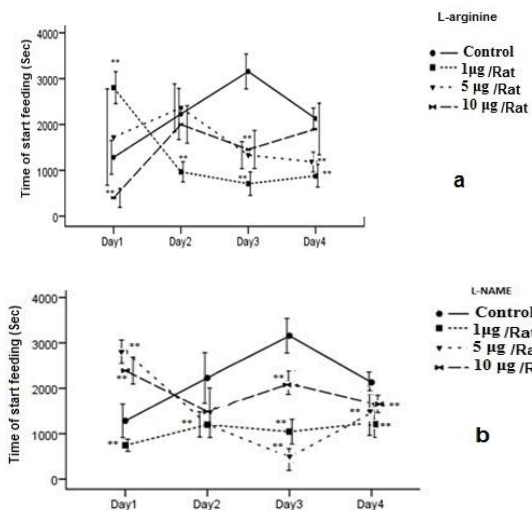
تأثیر تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس ال-آرژنین و L-NAME بر زمان شروع غذا خوردن در حیوانات استرس دیده و استرس ندیده

نتایج آنالیز four-ways mixed model ANOVA مقایسه دو به دو گروه‌ها در ادامه نشان داد که اثر تداخلی همه فاکتورها در طی روزها معنادار بود ($P < 0.03$). بدین معنا که تجویز هر دو داروی ال-آرژنین و L-NAME در هر سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم/موش باعث کاهش زمان غذا خوردن نسبت به حیوانات کنترل منفی شدند. در حیوانات استرس دیده، استرس اثر دوفازی بر شروع غذا خوردن داشت که در روز اول باعث کاهش و در روزهای بعد سبب افزایش زمان شروع غذا خوردن

در مورد اثرات متابولیکی داروهای موثر بر سیستم نیتریکریژیک موجود در پوسته هسته آکومبنس بر فعالیت‌های متابولیکی تغذیه تحقیقات زیادی انجام نگرفته است. در تحقیقات قبلی دیده شده که مهار موقت پوسته هسته آکومبنس در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نه موجب کاهش اثرات استرس می‌شود [۱۲]. هم‌چنین، مهار موقت بخش پوسته هسته آکومبنس موجب کاهش اثرات استرس حاد در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ماده نیز می‌شود [۱۳]. در تحقیق دیگری، مهار موقت هسته آکومبنس توسط لیدوکائین باعث مهار اثرات متابولیکی استرس مزمن در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نه گردید [۲۲]. مجموعه این نتایج نشان‌دهنده نقش هسته آکومبنس و به‌خصوص بخش پوسته این هسته در میانجیگری اثرات استرس بر متابولیسم است.

پوسته هسته آکومبنس به‌صورت وابسته به سمت عمل می‌کند (سوگیری) و بین سمت چپ و راست این هسته تفاوت‌هایی در این زمینه مشاهده می‌شود. باید در نظر داشت که سمت چپ پوسته هسته آکومبنس از نظر کارکردی در متابولیسم، در تحقیقات قبلی اثرات بهتری را نسبت به سمت راست از خود نشان داده است [۲۲] و به همین دلیل، این بخش برای تحقیق حاضر در نظر گرفته شد. از سوی دیگر، تحقیقات قبلی نشان داده است که عصب‌دهی گلوتاماترژیک پوسته هسته آکومبنس سمت چپ بیش‌تر از سمت راست است و ممکن است یکی از دلایل تفاوت عملکردی بین دو سمت راست و چپ این هسته همین مسئله باشد. جالب است که در تحقیق دیگری دیده شده که مهار گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA توسط ممانتین در هسته آکومبنس سمت چپ باعث مهار اثرات متابولیکی استرس در موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده شده است [۲۹]، که باز هم مبحث سوگیری در عملکرد سمت چپ و راست این هسته در پاسخ به مهار گیرنده‌های فوق مشاهده شده است. هر چند به دلیل مشکلات تکنیکی، امکان تزریق دقیق ممانتین در بخش پوسته هسته آکومبنس در این تحقیق نبوده است و به همین دلیل، تمایز عملکردی بین بخش پوسته و مرکزی هسته آکومبنس انجام نشده است. به یاد بیاوریم که یکی از راه‌های بروز اثرات گلوتامات در بخش‌های مختلف مغز فعال‌سازی گیرنده‌های NMDA می‌باشد که با تحریک آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتاز (NOS) و افزایش تولید نیتریک اکساید همراه است [۳۰]. و به همین دلیل، ممکن است اثرات دیده شده از ممانتین در واقع به دلیل مهار تولید نیتریک اکساید باشد.

در تحقیق حاضر، استرس باعث افزایش غلظت پلاسمایی کورتیزول گردید و احتمالاً به دنبال آن، سایر اثرات متابولیکی استرس از قبیل تغییر در غذا خوردن و آب‌نوشی به وقوع پیوست. در تحقیقات قبلی نیز مشخص شده بود که استرس با



شکل ۹. میانگین و انحراف معیار زمان شروع غذا خوردن در گروه‌های کنترل و تحت تزریق ال-آرژنین (a) و L-NAME (b) در دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در هر موش در شرایط با استرس: تفاوت معنادار با گروه کنترل: *p-value < 0.001 و n=6 در هر گروه است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق پنج نشانه مهم متابولیکی در حیوانات (تغییرات میزان کورتیزول پلاسمای، وزن غدد فوق کلیه، میزان آب نوشی، میزان دریافت غذا، و زمان شروع غذا خوردن) پس از تزریق ال-آرژنین و L-NAME به درون بخش پوسته هسته آکومبنس سمت چپ موش‌های نه در دو حالت استرس و غیر استرس مورد سنجش قرار گرفت. نتایج ما حاکی از اثربخشی سیستم نیتریک اثرژیک در بروز اثرات متابولیکی مختلفی مانند تغییرات ترشح هورمون کورتیزول، تغییر در میزان آب‌نوشی و دریافت غذا و نیز زمان شروع غذا خوردن بود.

تجویز دوز یک میکروگرم در موش ال-آرژنین باعث کاهش غلظت کورتیزول پلاسمای، میزان آب‌نوشی و دریافت غذا مخصوصاً در شرایط تحت استرس و افزایش وزن غدد فوق کلیه شده بود. اما در L-NAME دوز یک میکروگرم در موش اثر معکوس با ال-آرژنین در موارد ذکر شده افزایش دیده شد. اما دوز ده میکروگرم در موش ال-آرژنین و L-NAME مانند هم باعث کاهش کورتیزول پلاسمای و افزایش آب‌نوشی و غذا خوردن می‌شود مخصوصاً در روز چهارم در گروه ال-آرژنین. L-NAME دوز ۵ میکروگرم در شرایط بدون استرس وزن غده آدرنال را کاهش داده بود و مقدار غذای مصرفی را افزایش داده بود. هر دو دارو باعث زودتر شروع به خوردن در موش‌ها شده بود که استرس اثر آن‌ها را معکوس کرده بود.

تحریک مسیر HPA باعث افزایش رها شدن هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی مانند کورتیکوسترون، کورتیزول و انواع دیگری از این هورمون‌ها در خون می‌شود [۲]. این امر در تحقیق ما نیز به وقوع پیوسته است و نتایج ما بیانگر اثرات استرس در افزایش هورمون کورتیزول در حیوانات استرس دیده در روز چهارم بعد از استرس بود. در بسیاری از تحقیقات از تغییرات غلظت پلاسمایی هورمون کورتیکوسترون به عنوان معیار اصلی فعال شدن محور HPA در جوندگان استفاده شده است [۲۲]. تحقیق ما نشان داد که اولاً هورمون کورتیزول در پلاسمای موش‌ها قابل ردگیری بود و ثانیاً، غلظت پلاسمایی این هورمون در حالت استرس و غیر استرس با هم متفاوت بود که این خود نشان‌دهنده حساس بودن این هورمون به استرس است. به همین دلیل ما پیشنهاد می‌کنیم که از تغییرات غلظت پلاسمایی این هورمون نیز می‌توان برای بررسی اثرات استرس بر فعالیت سیستم HPA در جوندگان استفاده کرد.

مطالعات نشان داده‌اند که فعال شدن هسته اکومبنس باعث فعال شدن قشر پریفروتال می‌شود [۳۱] و به دنبال آن محور HPA مهار می‌گردد [۳۲]. نتایج ما نشان داد که ال-آرژنین در دوز ۱ و ۱۰ و L-NAME در دوز ۱۰ میکروگرم که باعث کاهش سطح کورتیزول در شرایط استرس و بدون استرس شده بود شاید بر این مسیر اثر گذاشته است.

Ventral tegmental area (VTA) که در ارتباط دو طرفه با هسته اکومبنس است، دارای ارتباطات دو طرفه با لوکوس سرلیوس ساقه مغز به عنوان منبع نورآدرنالین مغز می‌باشد. اثرات لوکوس سرلیوس نهایتاً باعث افزایش فعالیت مدولار غده آدرنال می‌شود [۳۳-۳۵]. نتایج ما نشان داد که ال-آرژنین در همه دوزها مخصوصاً در دوز یک میکروگرم و در شرایط تحت استرس احتمالاً با تحریک بیش‌تر ساقه مغز و به دنبال آن افزایش فعالیت سیستم آدرنرژیک در بخش مدولاری غده فوق کلیه، وزن غده را افزایش داده بود چون مقدار کورتیزول را نه تنها افزایش نداده بود بلکه از گروه کنترل هم به‌طور مشخصی کم‌تر کرده بود. احتمالاً پاسخ مشابه در دوز ده میکروگرم ال-آرژنین و L-NAME می‌تواند به دلیل حالت سمیتی باشد که غلظت بالای ایندو دارو در هسته اکومبنس ایجاد کرده است.

نتایج اعمال استرس در گروه کنترل مثبت نشان داد که استرس باعث افزایش وزن غده فوق کلیه نگردیده است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در استرس‌های مزمن وزن غده فوق کلیه به دلیل افزایش هیپرپلازی در بخش فاسیکولاتای قشر غدد فوق کلیه افزایش می‌یابد. این هیپرپلازی به دلیل تاثیر تروفیک هورمون ACTH هیپوفیز قدامی بر فعالیت سلول‌های ناحیه فاسیکولاتای غدد فوق کلیه است که می‌تواند باعث افزایش حجم

سلول‌ها و نیز افزایش تعداد این سلول‌ها گردد. افزایش وزن غده فوق کلیه یکی از مهم‌ترین شاخصه‌های استرس مزمن است [۴]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که میزان استرس اعمال شده در این مطالعه به حد مزمن نرسیده بود.

پوسته هسته اکومبنس به علت ارتباطات آناتومیکی مستقیم و غیر مستقیمی با هیپوتالاموس جانبی در کنترل رفتار بلعی خوردن، نقش دارد. نتایج نشان داده است که تحریک پوسته هسته اکومبنس باعث افزایش جویدن در حیوان می‌شود [۳۶]. در واقع هسته اکومبنس یک ناحیه جلوی مغزی می‌باشد که در بخش قدامی هیپوتالاموس واقع شده است، بنابراین ورودی‌های واگی را بعد از پردازش انجام شده در هیپوتالاموس دریافت می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد که هسته اکومبنس در تنظیم اتونومیکی مرکزی تغذیه نقش دارد [۳۳] و این کنترل عمدتاً به وسیله اثرات اتونومیکی بر جزایر لانگرهانس، هپاتوسیت‌ها و آدیپوسیت‌ها صورت می‌گیرد [۳۷]. بنابراین هسته اکومبنس می‌تواند در تداخل سیگنال‌های معدی وابسته به پردازش هضمی مناسب نقش داشته باشد [۳۳]. ناحیه پاراسمپاتیک هیپوتالاموس به دلیل ارتباط با هسته پاراونتیکولار هیپوتالاموس بر ترشحات اندوکرینی نیز اثر می‌گذارد. [۳۸] سلول‌های پاراونتولار دارای اثر دو جانبه در کنترل غذاخوردن هستند و در ارتباط با هسته آرکویت و هسته لترال هیپوتالاموس هم بر افزایش و هم کاهش غذا خوردن تاثیر دارند [۳۹]. از طرف دیگر سلول‌های پوسته هسته اکومبنس به‌طور غیر مستقیم باعث مهار فعالیت سلول‌های لترال هیپوتالاموس می‌شود [۴۰]. لذا با تغییر فعالیت پوسته اکومبنس غذاخوردن نیز تغییر می‌کند. بر اساس نتایج موجود به نظر می‌آید که اثر هسته اکومبنس بر خروجی مقدار آبنوشی و غذا خوردن به‌صورت مهاری است. زیرا در حضور L-NAME در دوز یک میکروگرم به‌عنوان مهارکننده NO نتایج حاکی از افزایش غذاخوردن بود. اما با تزریق ال-آرژنین در دوز یک میکروگرم به‌عنوان فعال‌کننده NO کاهش آبنوشی و به میزان کم‌تر کاهش غذاخوردن را مشاهده کردیم. یافته جالب این است که استرس خود باعث افزایش غذاخوردن و تا حدودی آبنوشی می‌شد و اثر ال-آرژنین ۱ میکروگرم را کاهش داده بود. در ضمن استرس تشدیدکننده و هم‌راستا با اثر L-NAME در غذا خوردن و آبنوشی بود. بالا رفتن دوز ال-آرژنین و استرس باعث کاهش و چه‌بسا معکوس شدن اثر این ماده بر میزان آبنوشی و غذا خوردن شده بود. در حالی که در L-NAME دوز ده میکروگرم اثرات آن در مقایسه با یک میکروگرم معکوس شده بود. شروع غذا خوردن با استرس ابتدا زودتر است و در طی روزهای آینده دیرتر از گروه کنترل می‌شود. اثر تزریق داروها در کل شروع غذاخوردن را زودتر می‌کند و اثر

روزهای بعدی که تحت استرس تکرار شونده قرار گرفتند غذا خوردنش از تاخیر و مقدار بیش‌تری برخوردار بود. با مداخلات دارویی نتایج نشان داد که ال-آرژنین و L-NAME در دوز یک میکروگرم دارای اثرات متضاد بر وزن غده آدرنال، غلظت کورتیزول و عمل‌کرد متابولیک بودند. اما در دوز ۱۰ میکروگرم هر دو دارو دارای تاثیرات مشابه در غلظت کورتیزول پلاسما و وزن غده آدرنال و میزان غذاخوردن و آب‌نوشی بودند. استرس اثرات متابولیک دوز یک میکروگرم ال-آرژنین را کم می‌کرد اما هم‌راستا با L-NAME در همان دوز بود. بنابراین نتایج این مطالعه نشان داده است که دست‌کاری سیستم نیتریکریژیک ممکن است با تعدیل عملکرد هسته آکومبنس بر ارتباطات آن با مناطق درگیر در سیستم استرسی و تنظیم متابولیکی بر خروجی آن‌ها اثر بگذارد. و در نهایت غلظت این مواد اثر مستقیم و گاهاً معکوسی دارد. استفاده از دوزهای کم‌تر از یک میکروگرم در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله بابت حمایت از این طرح تشکر و قدردانی می‌شود

منابع

- [1] Yaribeygi H, Panahi Y, Sahraei H, Johnston TP, Sahebkar A. The impact of stress on body function: A review. EXCLI J 2017; 16: 1057.
- [2] Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, Luo MJ, Tan JH. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. PLoS One 2015; 10: e0117503.
- [3] Amouei N, Sahraei H, Alibeik H, Meftahi GH, Bahari Z, Mohammadi A. Intrahippocampal and peripheral effects of nicotine injection on the metabolic and behavioral response to inescapable stress. Bios Biotechnol Res Asia 2016; 13: 1363-1371. (Persian).
- [4] Bali A, Jaggi AS. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. Eur J Pharmacol 2015; 746: 282-292.
- [5] Lopez J, Almaguer W, Perez H, Frey JU, Bergado J. Opposite effects of shell or core stimulation of the nucleus accumbens on long-term potentiation in dentate gyrus of anesthetized rats. Neuroscience 2008; 151: 572-578.
- [6] Mohammadian Z, Sahraei H, Meftahi GH, Ali-Beik H. Effects of unilateral- and bilateral inhibition of rostral ventral tegmental area and central nucleus of amygdala on morphine-induced place conditioning in male Wistar rat. Clin Exp Pharmacol Physiol 2017; 44: 403-412.
- [7] Sofiabadi M, Nazemi S, Erami E, Azhdari-Zarmehri H. Role of orexinergic system in the effects of morphine on food and water intake in male rat. Koomesh 2014; 15: 380-387. (Persian).
- [8] Afanas'ev I, Ferger B, Kuschinsky K. The associative type of sensitization to d-amphetamine is expressed as an NO-dependent dramatic increase in extracellular dopamine in the nucleus accumbens. Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol 2000; 362: 232-237.
- [9] Chiara G, Tanda G, Bassareo V, Pontieri F, Acquas E, Fenu S, et al. Drug addiction as a disorder of associative learning: role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. Ann N Y Acad Sci 1999; 877: 461-485.
- [10] Daloei JR, Sahraei H, Meftahi GH, Khosravi M, Bahari Z, Hatef B, et al. Temporary amygdala inhibition reduces stress effects in female mice. J Advanc Res 2016; 7: 643-649.

افزایشی تاخیر در غذاخوردن در طی روزها در موش‌های استرس‌دیده را نیز کم می‌کند.

استرس به دلیل این‌که باعث افزایش جذب گلوکز در سلول‌ها و کاهش آن در خون می‌شود محرک غذاخوردن است [۴۱]. هم‌چنین از آن‌جا که در هنگام استرس با تحریک هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس علاوه بر این‌که مقادیر زیادی هورمون CRH به داخل برجستگی میانی ترشح می‌گردد [۴۲]، هورمون ضد ادراری (ADH) نیز از سلول‌های موجود در این هسته به داخل گردش خون می‌شود [۴۳]. این امر می‌تواند عاملی برای القای پرنوشی در شرایط استرسی باشد [۴۴]. و تحقیق ما در این زمینه هم‌راستا با این نتیجه بود. آنورکسیا در گروه استرس بیش‌تر از گروه بدون استرس بود که نشان‌دهنده اثر سرکوب‌گر استرس بر میل به غذا خوردن می‌باشد.

در تحقیقی که توسط صادقی و همکاران انجام شد دیده شد استرس بر میزان دریافت آب بی‌تاثیر بوده ولی باعث کاهش دریافت غذا و افزایش تاخیر در خوردن غذا گردید [۴۵]. هنگامی که تاثیر استرس بر تغذیه حیوانات مورد بررسی قرار گرفت، مشخص شد که میزان تغذیه حیوانات تغییر معنی‌داری نداشت، که متناقض با کاهش تغذیه پس از استرس در تحقیقات قبلی بود [۴۶]. هر چند در تحقیقی که توسط صحرایی و همکاران انجام شد دیده شد که استرس باعث افزایش میزان غذاخوردن، افزایش زمان تاخیر آب‌نوشی شد و تاثیر چندانی بر میزان آب خوردن نداشت ولی با سرکوب موقت هسته آکومبنس میزان غذا خوردن، میزان آب خوردن و زمان تاخیر در آب‌نوشی کاهش یافت [۴۷]. در حالی‌که در مطالعه ما استرس و L-NAME در همه دوزها باعث افزایش غذا خوردن و آب‌نوشی شده بود و ال-آرژنین هم در همه دوزها به غیر از ۱ میکروگرم در شرایط با استرس (در مقدار غذاخوردن) و ۵ میکروگرم در موش (مقدار آب‌نوشی) در شرایط بدون استرس باعث افزایش آب‌نوشی و غذاخوردن شده بود.

محدودیت‌های این مطالعه شامل عدم بررسی مواردی مانند وزن موش، سطح لپتین خون، دوپامین مغز، بررسی هیستروشمیایی غده فوق کلیه و میزان بیان ژن‌های NOS بود. در ضمن با وجود رعایت نکات دقت در تزریق در پوسته هسته آکومبنس احتمال انتشار مواد به قسمت‌های مجاور محتمل بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که استرس در روز چهارم باعث افزایش معنادار کورتیزول پلاسما شد. شاخص‌های مربوط به غذا خوردن بین روز اول و طی روزهای بعد متفاوت بود. بدین صورت که در روز اول هر چند موش‌ها زودتر شروع به خوردن می‌کردند اما مقدار غذای کم‌تری را خورده بودند. در طی

- response to acute and chronic stress. *J Appl Pharm Sci* 2016; 6: 176-184.
- [29] Sarahian N, Sahraei H, Zardooz H, Ali-Beik H, Sadeghi B, Javadifar T, et al. Comparison of effect of intraperitoneal vs. intra-accumbal injection of memantine on response to acute stress in female NMRI mice. *Physiol Pharmacol* 2015; 18: 383-396. (Persian).
- [30] Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
- [31] Robinson TE, Kolb B. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 1598-1604.
- [32] Gold PW. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Mol Psychiatry* 2015; 20: 32-47.
- [33] Mehendale S, Xie JT, Aung HH, Guan XF, Yuan CS. Nucleus accumbens receives gastric vagal inputs. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 271-275.
- [34] Haghparsat A, Moaddab M, Ebrahimzadeh-Sarvestani M, Kermani M. Effects of reversible inactivation of the ventral tegmental area on the firing rate of neurons in the shell sub-region of the nucleus accumbens and on morphine-induced conditioned place preference in the rat. *Koomesh J* 2012; 13: 189-200. (Persian).
- [35] Ferrucci M, Giorgi FS, Bartalucci A, Busceti CL, Fornai F. The effects of locus coeruleus and norepinephrine in methamphetamine toxicity. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11: 80-94.
- [36] Robinson S. The effect of hypothalamus and nucleus accumbens on orosensory fat preferences in rat: A literature review. *Pharmacol Exp* 1998; 258: 208-214.
- [37] Steffens A, Strubbe J, Balkan B, Scheurink A. Neuroendocrine mechanisms involved in regulation of body weight, food intake and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev* 1990; 14: 305-313.
- [38] Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 141-193.
- [39] Gibson C, Camell S, Ochner C, Geliebter A. Neuroimaging, gut peptides and obesity: novel studies of the neurobiology of appetite. *J Neuroendocrinology* 2010; 22: 833-845.
- [40] Castro DC, Cole SL, Berridge KC. Lateral hypothalamus, nucleus accumbens, and ventral pallidum roles in eating and hunger: interactions between homeostatic and reward circuitry. *Front Syst Neurosci* 2015; 9: 90.
- [41] Danowski T. Emotional stress as a cause of diabetes mellitus. *Am Diabetes Assoc*; 1963.
- [42] McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 2007; 87: 873-904.
- [43] Scantamburlo G, Anseau M, Legros J. Role of the neurohypophysis in psychological stress. *L'encephale* 2001; 27: 245-259.
- [44] Aguilera G. HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. *Exp Gerontol* 2011; 46: 90-95.
- [45] Sadeghi B, Zardooz H, Sahraei H, Sarahian N. Role of NMDA glutamate receptors within the amygdale in inhibition of the metabolic effects of acute stress in male mice. *Feyz J Kashan Univ Med Sci* 2016; 19. (Persian).
- [46] Gluck ME. Stress response and binge eating disorder. *Appetite* 2006; 46: 26-30.
- [47] Eftekhari F, Sahraei H, Alibeik H, Rezaeian E J, Nikaeili F, GHamari F, Sarahian N. Role of nucleus accumbens in response to chronic stress in small male nmri mouse. *J Rafsanjan Univ Med Sci Health Serv* 2016; 15: 319-330. (Persian).
- [11] Asalgoo S, Jahromi G, Meftahi G, Sahraei H. Posttraumatic stress disorder (ptsd): Mechanisms and possible treatments. *Neurophysiology* 2015; 47: 482-489.
- [12] Ranjbaran M, Aghaei H, Hajihoseinlou V, Sahraei H, Ranjbaran K. Transient inactivation of shell part of nucleus accumbens inhibits and exacerbates stress-induced metabolic alterations in wistar rats. *Basic Clin Neurosci* 2017; 8: 121-128.
- [13] Javadifar TS, Sahraei H, Ketabi MA, Nasehi M, Zarrindast MR. Transient inactivation of the nucleus accumbens (NAc) shell prominently ameliorates responses to acute stress in female rats. *Brain Res* 2016; 1649: 1-8.
- [14] Osanloo N, Sarahian N, Zardooz H, Sahraei H, Sahraei M, Sadeghi B. Effects of memantine, an NMDA antagonist, on metabolic syndromes in female NMRI mice. *Basic Clin Neurosci* 2015; 6: 239.
- [15] Wolf ME, Xue CJ, White FJ, Dahlin SL. MK-801 does not prevent acute stimulatory effects of amphetamine or cocaine on locomotor activity or extracellular dopamine levels in rat nucleus accumbens. *Brain Res* 1994; 666: 223-231.
- [16] Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book: Elsevier Health Sciences; 2015.
- [17] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.
- [18] Tsang K, Ip S, Leung R, Tipoe G, Chan S, Shum I, et al. Exhaled nitric oxide: the effects of age, gender and body size. *Lung* 2001; 179: 83-91.
- [19] Ånggård E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *The Lancet* 1994; 343: 1199-1206.
- [20] Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AMG. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 766-775.
- [21] Motahari AA, Sahraei H, Meftahi GH. Role of nitric oxide on dopamine release and morphine-dependency. *Basic Clin Neurosci* 2016; 7: 283-290.
- [22] Nicaeili F, Sahraei H, KHosravi M, Rezaeian J, Eftekhari F, Sarahian N, GHamari F. Effect of temporary inactivation of nucleus accumbens on chronic stress induced by electric shock to the sole of the foot in female nmri mice. *J Babol Univ Med Sci* 2016; 18: 21-28. (Persian).
- [23] Lin P, Pratt WE. Inactivation of the nucleus accumbens core or medial shell attenuates reinstatement of sugar-seeking behavior following sugar priming or exposure to food-associated cues. *PloS One* 2014; 9: e99301.
- [24] Esmaeili MH, Sahraei H, Ali-Beig H, Ardehali-Ghaleh M, Mohammadian Z, Zardooz H, et al. Transient inactivation of the nucleus accumbens reduces both the expression and acquisition of morphine-induced conditioned place preference in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 102: 249-256.
- [25] Sheibani V, Sepehri G, Baghaiee F, Farazifard R. The Effect of Nitric Oxide Microinjection in Nucleus Accumbens Shell on Morphine Withdrawal Signs in Male Rats. *J Kerman Univ Med Sci* 2005; 12: 228-236. (Persian).
- [26] Badreh F, Abbasnejad M, Derakhshani A, Jonaidi H. Interaction between ascorbic acid and dopamine D2 receptor in the nucleus accumbens shell in response to feeding. *Int J Biol Chem* 2009; 3: 132-141.
- [27] Bachtell RK, Whisler K, Karanian D, Self DW. Effects of intranucleus accumbens shell administration of dopamine agonists and antagonists on cocaine-taking and cocaine-seeking behaviors in the rat. *Psychopharmacology* 2005; 183: 41-53.
- [28] Ghobadi N, Sahraei H, Meftahi GH, Bananej M, Salehi S. Effect of estradiol replacement in ovariectomized NMRI mice in

Role of NO-ergic system of the he nucleus accumbens in metabolic disturbances under acute stress

Yasaman Husseini (Ph.D), Alireza Mohammadi (Ph.D), Gila Pirzad Jahromi (Ph.D), Hedayat Sahraei (Ph.D), Boshra Hafez (Ph.D)*

Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21-88040060 boshrahatef@bmsu.ac.ir

Received: 5 Jan 2018; Accepted: 20 Oct 2018

Introduction: The aim of the study was to evaluate the involvement of nitricergic system within the shell part of the nucleus accumbens (NAc) by injection of L-arginine, a nitric oxide precursor, and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor in the metabolic disturbances induced by acute stress in the male rat.

Materials and Methods: Male Wistar rats were cannulated unilaterally in the left part of the shell of the NAc. Correspondingly, five minutes before each stress session (60 seconds of foot electrical shock of 40 mA), the animals either received sterile saline (0.25 µl/rat) or different doses of L-arginine and/or L-NAME (1, 5, and 10 µg/rat) for four days. Blood samples were taken on day 1 and 4 for plasma cortisol measurements. In addition, animals' food and water intake, time elapsing for food intake were recorded. Finally, their adrenal glands were removed and weighted.

Results: The level of cortisol significantly increased in the positive control after the fourth day. The L-arginine (1 µg/Rat) decreased the level of cortisol, water and food intake. In opposite, the L-NAME (1 µg/Rat) increased the cortisol level of plasma and metabolic function. Both L-arginine and L-NAME (10 µg/Rat) significantly decreased the level of cortisol but increased the amount of water and food intake. The L-arginine (1 µg/Rat) increased the weight of adrenal gland in both the presence of absent of stress conditions. There was an interaction between the drugs and stress on the time for initiation of food intake.

Conclusion: Our data indicated that nitric oxide within the left side of shell part of NAc may have a role in the metabolic disturbances induced by stress.

Keywords: Cortisol, Nitric Oxide, L-arginine, L-NAME, Stress, Shell Part of Nucleus Accumbens