

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

بهاره صادقی^۱ (M.Sc)^۱، هدایت صحرابی^{۲*} (Ph.D)^۲، هنگامه علی‌بیک^۱ (Ph.D)^۱، ناهید سراحیان^۱ (M.Sc)^۱
۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران، گروه زیست‌شناسی
۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب
۳- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، گروه فیزیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: تحقیقات قبلی نقش مهم آمیگدال را در هنگام استرس نشان داده است. هم‌چنین، ورودی‌های گلوتاماتی به آمیگدال در حین استرس فعال می‌شوند. در این مطالعه تاثیر مهار گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA موجود در آمیگدال در پاسخ به استرس مزمن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به کمک دستگاه استریوتاکس کانول‌گذاری یک‌طرفه و یا دو طرفه آمیگدال انجام شد. پس از هفت روز بھبودی حیوانات دوزهای متفاوت ممانتین (۰/۰۵ و ۱ میکروگرم به ازای موش) را پنج دقیقه قبل از شروع استرس دریافت کردند. استرس به مدت هفت روز متوالی القاء شد و میزان آب و غذای دریافتی و هم‌چنین زمان تاخیر در غذا خوردن و میزان دفع به عنوان معیاری از استرس سنجیده شد.

یافته‌ها: استرس باعث کاهش دریافت غذا، و افزایش میزان آب‌نوشی، زمان تاخیر در غذا خوردن و میزان دفع شد. تجویز داخل آمیگدالی ممانتین اثر استرس را در میزان غذای دریافتی به جز در دوزهای متوسط و زیاد آن هم در سمت راست هسته تشدید کرد. هم‌چنین ممانتین باعث مهار اثر استرس در میزان آب‌نوشی به جز در دوز متوسط سمت راست شد و زمان تاخیر در غذا خوردن را نیز به میزان قابل توجهی کاهش داد. از طرفی ممانتین به صورت وابسته به دوز و محل تزریق منجر به مهار و یا تقویت اثر استرس بر میزان دفع گردید.

نتیجه‌گیری: مکانیسم‌های گلوتاماتی در آمیگدال بر استرس موثر هستند و این اثر به صورت وابسته به دوز و وابسته به سمت (چپ و یا راست) می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گیرنده‌های ان متیل دی آسپارتات، بادامک، تنفس، ممانتین

مقدمه

بروز عوارضی مانند بالا رفتن قند خون، افزایش ضربان قلب، و نیز افزایش سطح هوشیاری می‌گردد [۲،۳]. استرس مزمن، شدید و غیر قابل کنترل می‌تواند بیماری‌زا باشد و منجر به اختلالاتی مانند افسردگی، اضطراب، فشار خون بالا، آزاییم، پارکینسون یا آسیب‌های مغزی و سکته مغزی شود [۴]. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که در مدل‌های حیوانی اختلال در اثرات مخرب استرس بر سلامت انسان به صورت گسترده مورد شناسایی قرار گرفته است، منبع استرس می‌تواند جسمانی یا روانی باشد [۱]. تحقیقات فراوان نشان می‌دهند که به دنبال برخورد استرس، هورمون‌های استرسی مانند گلوكورتيکويدها و نيزآدرنالين در خون آزاد شده و سبب

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

مواد و روش‌ها

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

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

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

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

نتایج

تأثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر تغییرات غذای دریافتی در حیوانات مواجه شده با استرس غیر قابل کنترل. نتایج نشان دادند که استرس منجر به کاهش میزان غذای دریافتی گردید. از سوی دیگر، تجویز داخل آمیگدالی ممانتین باعث تشدید اثر استرس به جز در دوزهای $1 \mu\text{g}/\text{mouse}$ و $5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ راست آمیگدال گردید (شکل ۱). آنالیز دو طرفه، اثر معنی دار ممانتین $[F(1,60) = 1.861, P < 0.05]$ ، اشرات $[F(2, 60) = 1.33, P < 0.05]$ معنی دار تزریق یک یا دو طرفه $[F(10, 60) = 2.69, P < 0.05]$ و تعامل معنی دار بین آنها $[F(1, 60) = 1$ نشان داده شده است. تفاوت بین گروهها در شکل ۱ نشان داده شده است.

تأثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر تغییرات آب دریافتی در حیوانات مواجه شده با استرس غیر قابل کنترل. در قسمت دوم این تحقیق، میزان آب دریافتی حیوانات پس از القا استرس و تاثیر ممانتین بر این روند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که استرس می‌تواند میزان آب دریافتی را افزایش دهد. از سوی دیگر، تجویز ممانتین به صورت داخل آمیگدال اندکی باعث مهار اثر استرس در میزان آب‌نوشی به جز در دوز $5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ راست می‌باشد.

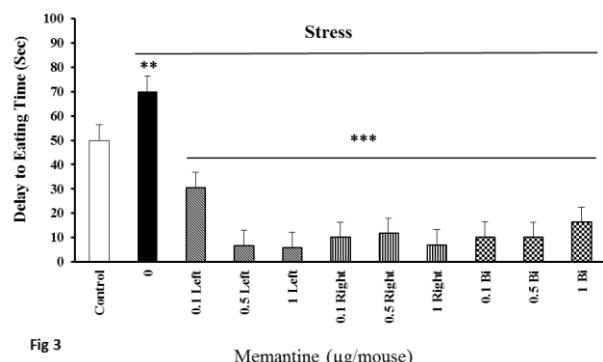
غذای هر حیوان طی آزمایش به صورت روزانه در ساعت مشخصی ثبت می‌شد.

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

روش اجرای مطالعه: به منظور کانول‌گذاری در داخل آمیگدال ابتدا حیوانات با مخلوط کنامین ($50-75 \text{ mg/kg}$) و دیازپام ($7-5 \text{ mg/kg}$) بی‌هوش شده، سپس سر حیوان در دستگاه استریوتوکس ثابت شد، با ایجاد یک شکاف یک سانتی‌متری و مشاهده نقاط برگما و لامبدا یک یا دو عدد کانول راهنمای (سر سوزن شماره ۲۳) $500 \mu\text{m}$ بالاتر از آمیگدال با استفاده از مختصات اطلس پاکسینو [۱۲] (برای هسته آمیگدال 0.8 mm عقب‌تر از نقطه برگما، $2/5 \text{ mm} \pm 0.0$ از خط وسط و $4/5 \text{ mm}$ (پایین‌تر از سطح جمجمه) در سر حیوان قرار گرفت و کانول‌ها با استفاده از پیچ عینک و سیمان دندان‌پزشکی محکم شد. پس از جراحی حیوانات به مدت هفت روز در محیطی آرام دوره بهبودی را سپری کردند. جهت تزریق از سر سوزن شماره $30 \mu\text{L}$ دندان‌پزشکی و لوله پلی‌اتیلنی و سرنگ هامیلتون $10 \mu\text{L}$ استفاده شد. ممانتین با حجم تزریق $0.25 \mu\text{L}/50 \mu\text{L}$ در هر طرف) به صورت درون آمیگدالی هر روز ۵ دقیقه قبل از القا استرس تجویز می‌شد و دوزهای تجویزی بر اساس تحقیقات قبلی بود [۱۲]. تزریق مغزی به آهستگی به مدت ۶۰ ثانیه به طول انجامید و در این مدت حیوانات حرکت آزادانه داشتند. سپس حیوانات جهت القای استرس به دستگاه Communication Box (ساخت شرکت برج صنعت، تهران، ایران) منتقل شدند. این دستگاه از ۹ قسمت مجزا ولی با ارتباطات دیداری، بویایی و شنیداری تشکیل شده (دیواره‌ها از جنس پلکسی‌گلاس با سوراخ‌هایی ریز یه قطر 2 میلی‌متر) و کف دستگاه دارای میله‌های استیل زنگ نزن متصل به یک ژنراتور است که ولتاژ و مدت زمان شوک توسط رایانه متصل به ژنراتور کنترل می‌شود (ولتاژ 40 میلی‌ولت ، فرکانس 10 هرتز و به مدت 100 ثانیه). گروه

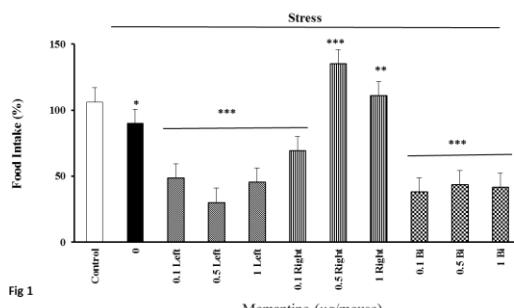
سایر روزها با توجه به آن محاسبه شده است (درصد گیری). اطلاعات میانگین \pm انحراف معیار استاندارد برای ۶ سر حیوان است. $0.001 < P < 0.0001$ اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می باشد.

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

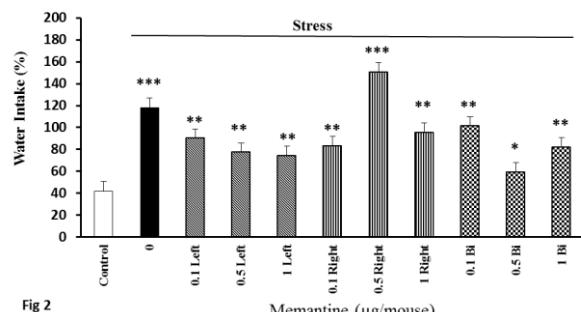


شکل ۳ تاثیر تجویز داخل هسته ای آمیگدال مماننین بر زمان تاخیر در غذا خوردن ناشی از استرس مزمن. حیوانات پس از القای استرس به محل های نگه داری خود بر گشت داده می شدند و زمان تاخیر در غذا خوردن آنها به مدت هفت روز متوالی اندازه گیری شد. استرس موجب افزایش زمان تاخیر در غذا خوردن شد و تجویز مماننین به صورت داخل آمیگدال باعث مهار اثر استرس بر این متغیر گردید و زمان تاخیر در غذا خوردن را در تمام دوزهای مصرفی و تزریقات یکطرفه و دو طرفه داخل آمیگدال کاهش داد. اطلاعات میانگین \pm انحراف معیار استاندارد برای ۶ سر حیوان است. $0.001 < P < 0.0001$ و $***P < 0.0001$ اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل است.

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



شکل ۱. تاثیر تجویز داخل هسته ای آمیگدال مماننین بر میزان غذای دریافتی حیوانات پس از القای استرس مزمن. حیوانات هر روز پس از القای استرس به محل های نگه داری خود بر گشت داده می شدند و میزان غذای دریافتی آنها در ۲۴ ساعت بعد به مدت هفت روز متوالی اندازه گیری شد. همان طور که در شکل می بینید، استرس موجب کاهش غذای دریافتی شد. تجویز مماننین به صورت داخل هسته آمیگدال از کاهش تغذیه استرس در دوزهای $0.05 \mu\text{g}/\text{mouse}$ و $0.1 \mu\text{g}/\text{mouse}$ آمیگدال جلوگیری کرده است. نتایج حاصل برای گروه ها در روز اول برابر 100 در نظر گرفته شده و برای سایر روزها با توجه به آن محاسبه شده است (درصد گیری). اطلاعات میانگین \pm انحراف معیار استاندارد برای ۶ سر حیوان است. $0.001 < P < 0.0001$ و $***P < 0.0001$ و $**P < 0.001$ اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل می باشد.



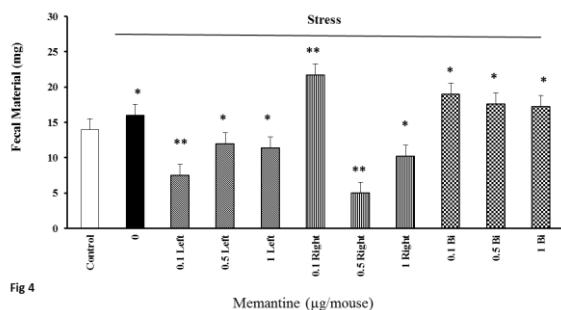
شکل ۲. تاثیر تجویز داخل آمیگدالی مماننین بر میزان آب دریافتی حیوانات پس از القای استرس مزمن. حیوانات هر روز پس از القای استرس به محل های نگه داری خود بر گشت داده می شدند و میزان آب دریافتی آنها در ۲۴ ساعت بعد به مدت هفت روز متوالی اندازه گیری شد. همان طور که در شکل می بینید استرس موجب افزایش آبنوشی گردید. تجویز مماننین به صورت داخل آمیگدال از برآورده ناشی از استرس به جز در دوز $0.05 \mu\text{g}/\text{mouse}$ آمیگدال راست جلوگیری کرده است. نتایج حاصل برای گروه ها در روز اول برابر 100 در نظر گرفته شده و برای

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

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

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

تفاوت بین گروه‌ها در شکل ۴ نشان داده شده است.



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

بحث و نتیجه‌گیری

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

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

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استرس می‌تواند به القاء پرنوشتی در حیوانات منجر شود. افزایش مصرف آب پس از استرس در اثر فعالیت محور HPA و در نتیجه تحریک ترشح هم‌زمان CRF و نوروهورمون وازوپرسین (VP) از نورون‌های پاراوتربیکولار هیپوталاموس است [۲۶]. تحقیق حاضر نشان داد که این اثر استرس نیز با تجویز ممانتین به صورت مرکزی در آمیگدال به جز در دوز $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mouse}$ /۰ در آمیگدال راست کاهش می‌یابد اما کاملاً از مهار نمی‌شود. تفاوت نسبی بین پاسخ در آمیگدال سمت راست و چپ ممکن است نشان‌دهنده جانبی‌گرایی نسبی این بخش از دستگاه عصبی باشد. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی به صورت پیش و پس سیناپسی وجود دارند و تحریک هر کدام از این نوع گیرنده‌ها ممکن است اثرات متفاوتی را از خود نشان دهند [۲۷]. از سوی دیگر، هم‌چنان‌که گفته شد، ممانتین ممکن است سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری موجود در آمیگدال مانند سیستم نورآدرنرژیک را هم درگیر کند و به همین دلیل، ممکن است به این گفته‌ها، در یک جمع‌بندی به نظر می‌رسد که نوعی از سوگیری در پاسخ سیستم گلوتاماتی به استرس در آمیگدال وجود دارد. از سوی دیگر، ممکن است ممانتین انواع متفاوتی از گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی در مجموعه آمیگدال را تحت تاثیر قرار داده باشد و در نتیجه اثرات متفاوتی از این دارو دیده شده باشد. هم‌چنین نتایج تحقیق تأثیر می‌دانند می‌دهد که سیستم گلوتاماتی در مجموعه آمیگدال در کنترل میزان آب دریافتی حیوان دخالت دارد و این دخالت از طریق گیرنده‌های NMDA انجام می‌گردد. و یا این‌که ممکن است سیستم نورآدرنرژیک آمیگدال در این پاسخ‌ها نقش داشته باشد.

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

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

در آخرین بخش از مطالعه حاضر، مشخص شد که استرس توانست دفع مدفوع را در حیوانات افزایش دهد که این امر با نتایج قبلی هم خوانی دارد [۳۳]. محققان نشان دادند که با القا استرس مسیرهای عصبی سمپاتیک و پاراسمپاتیک فعال شده و واکنش‌هایی مانند افزایش ضربان قلب، فشار خون، تنفس، فعالیت لوله گوارش و دفع ادرار و مدفوع از نشانه‌های فعالیت این سیستم‌ها می‌باشد [۳۲، ۳۱]. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که استرس می‌تواند باعث افزایش فعالیت گلوتاماتی در هسته‌های قاعده‌ای جانبی آمیگدال شده و این فعالیت باعث افزایش ترشح CRF در بخش‌های هدف این هسته‌ها به خصوص در ساقه مغز شوند [۳۱]. این افزایش فعالیت بر هسته‌های سمپاتیک و پاراسمپاتیک ساقه مغز اثر گذاشته و به صورت فردی ممکن است فعالیت یکی از این بخش‌ها یا هر دو آن‌ها را افزایش دهد [۳۳]. این افزایش فعالیت با رفتارهایی نظیر دفع مدفوع نشان داده می‌شوند. تحقیق ما نشان داد که تجویز ماننتین با دوزهای مختلف به آمیگدال چپ باعث کاهش دفع مدفوع در حیوانات می‌گردد در حالی

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

در ادامه نتایج مشخص شد که استرس باعث افزایش زمان شروع غذا خوردن (به عنوان نمادی از آنورکسی) در حیوانات می‌شود که این نتیجه با نتایج دیگر محققین هم خوانی دارد [۲۸]. محققان نشان داده‌اند که CRF ترشح شده از هسته پاراوتربیکولار هیپوپالاموس عامل مهمی در القاء آنورکسی ناشی از استرس است [۲۹]. به همین دلیل مهار رها شدن CRF از این هسته را به عنوان نمادی از کاهش آنورکسی ناشی از استرس بیان کرده‌اند [۲۹]. برخی محققان معتقدند که CRF با اثر بر گیرنده‌های نوع ۱ خود که در هسته‌های مسئول تغذیه در هیپوپالاموس وجود دارد باعث مهار این هسته‌ها و القا بی‌اشتهاای می‌شود [۱۷]. بنابر نظریه دیگر، نوراپی‌نفرین رها شده در حین استرس با تحریک رها شدن نوروپیپتید ۷ این اثر را در هسته سیری در هیپوپالاموس القا می‌کند [۳۰]. البته باستی گفت که ممکن است مسیرهای CRF از هسته‌های قاعده‌ای جانبی آمیگدال به مناطق منوآمینی ساقه مغز نیز در این پدیده دخالت داشته باشد [۳۱]. ورودی‌های گلوتاماتی به هسته پاراوتربیکولار هیپوپالاموس که از مناطقی مانند قشر جلو پیشانی منشاء می‌گیرند، نقش مهمی در تحریک نورون‌های هسته پاراوتربیکولار و در نتیجه افزایش رها شدن CRF از این نورون‌ها در حین استرس دارند [۳۲]. به همین دلیل مهار این ورودی‌های گلوتاماتی می‌تواند عامل مهمی در کاهش CRF و در نتیجه مهار استرس باشد. در ادامه تحقیق، تجویز ماننتین به صورت داخل آمیگدالی در تمام دوزها و به صورت یک طرفه و دو طرفه توانست به صورت چشمگیری باعث مهار اثرات استرس در القا آنورکسی شده و زمان تاخیر در غذا خوردن را کاهش دهد. نکته مهم در این قسمت این بود که اثر ماننتین بدون وابسته به دوز بود و نیز، سوگیری در این قسمت دیده نشد. با توجه به آن‌چه در فوق در مورد نقش مهم ورودی‌های گلوتاماتی به هسته پاراوتربیکولار هیپوپالاموس در القاء ترشح CRF در حین استرس گفته شد، بدیهی به نظر می‌رسد که با مهار گیرنده‌های گلوتاماتی توسط

- [14] Maeng S, Zarate C. The role of glutamate in mood disorders: Results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Curr Psychiatry Rep* 2007; 9: 467-474.
- [15] Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 2007; 91: 449-458.
- [16] Dallman MF1, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 11696-11701.
- [17] Rodgers BD, Strack AM, Dallman MF, Hwa L, Nicoll CS. Corticosterone regulation of insulin-like growth factor I, IGF-binding proteins, and growth in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1995; 44: 1420-1425.
- [18] Strack AM, Horsley CJ, Sebastian RJ, Akana SF, Dallman MF. Glucocorticoids and insulin: complex interaction on brown adipose tissue. *Am J Physiol* 1995; 268: R1209-R1216.
- [19] Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 1995; 268: R142-R149.
- [20] Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 2007; 91: 449-458.
- [21] Duvarci S, Pare D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 2014; 82: 966-980.
- [22] Farrell MR, Sengelaub DR, Wellman CL. Sex differences and chronic stress effects on the neural circuitry underlying fear conditioning and extinction. *Physiol Behav* 2013; 122: 208-215.
- [23] Chen HS, Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 2006; 97: 1611-1626.
- [24] Lipton SA, Rosenberg RA. Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway in neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330: 613-622.
- [25] Feldman S, Conforti N, Weidenfeld J. Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 1995; 19: 235-240.
- [26] Aguilera G. HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. *Exp Gerontol* 2011; 46: 90-95.
- [27] Tarazi FI, Campbell A, Yeghiyan SK, Baldessarini RJ. Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: Comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synapse* 1998; 30: 227-235.
- [28] Merali Z, Grajeda S, Mackay JC, Kent P. Stress and eating: a dual role for bombesin-like peptides. *Front Neurosci* 2013; 7: 193.
- [29] Stengel A, Taché Y. CRF and urocortin peptides as modulators of energy balance and feeding behavior during stress. *Front Neurosci* 2014; 8: 52.
- [30] Duan Y, Zhang R, Zhang M, Sun L, Dong S, Wang G, et al. Metformin inhibits food intake and neuropeptide Y gene expression in the hypothalamus. *Neural Regen Res* 2013; 8: 2379-2388.
- [31] Jedema HP, Grace AA. Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus recorded in vitro. *J Neurosci* 2004; 24: 9703-9713.
- [32] Marek R, Strobel C, Bredy TW, Sah P. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J Physiol* 2013; 591: 2381-2391.
- [33] Rao SS, Hatfield RA, Suls JM, Chamberlain MJ. Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 985-990.
- [34] Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 332-339.

که تجویز دارو به آمیگدال راست وابسته به دوز باعث تقویت یا مهار اثرات استرس در دفع مدفع می شود. این یافته می تواند نشان دهنده تفاوت در هم گیرنده های NMDA موجود در مجموعه آمیگدال و نیز می تواند نشان دهنده تفاوت در آمیگدال چپ و راست در پدیده دفع مدفع ناشی از استرس در این حیوانات باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام شد.

منابع

- [1] Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* 1950; 1: 1383-1392.
- [2] Mora F, Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res* 2012; 1476: 71-85.
- [3] Koob GF. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 1167-1180.
- [4] McEwen BS. Central effect of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 2008; 583: 174-185.
- [5] McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation central role of the brain. *Physiol Rev* 2007; 87: 873-904.
- [6] Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 2007; 83: 803-83.
- [7] McGaugh JL. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 2002; 25: 456-461.
- [8] Winsky-Sommerer R, Bourtet B, deLecea L. Stress and arousal: the corticotrophin-releasing factor/hypocretin circuitry. *Mol Neurobiol* 2005; 32: 285-294.
- [9] Vyas A, Mitra R, Rao BSS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 6810-6818.
- [10] Babic S, Ondrejcakova M, Bakos J, Racekova E, Jezova D. Cell proliferation in the hippocampus and in the heart is modified by exposure to repeated stress and treatment with memantine. *J Psychiatr Res* 2012; 46: 526-532.
- [11] Baas D, Aleman A, Kahn RS. Lateralization of amygdala activation: a systematic review of functional neuroimaging studies. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45: 96-103.
- [12] Paxinos G, Franklin KBJ. Editors. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 2001.
- [13] Bagheri Nikoo GR, Khosravi M, Sahraei H, Ranjbaran M, Sarahian N, Zardoz H, et al. Effects of systemic and intraaccumbal memantine administration on the effects of electro foot shock in male NMRI mice. *Physiol Pharmacol* 2014; 18: 61-71.

Effects of intra-amygda^l memantine infusion on metabolic symptoms induced by chronic stress in male NMRI mice

Bahareh Sadeghi (MSc)¹, Hedayat Sahraei (PhD)^{*2}, Homeira Zardooz (PhD)³, Hengameh Alibeik (PhD)¹, Nahid Sarahian (MSc)¹

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* Corresponding author: Tel: +98 21 26127286

h.sahraei@bmsu.ac.ir