

## بررسی تاثیر نیکوتین و نیتریک اکساید بر رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی

زهرا شهاب<sup>۱</sup>، مریم بنانچ<sup>۲</sup>، مرتضی پیری<sup>۳\*</sup>، مریم السادات شاهین<sup>۴</sup>، محمدرضا زرین دست<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال  
<sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال  
<sup>۳</sup> مربی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل  
<sup>۴</sup> کارشناس زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر ری و عضو باشگاه پژوهشگران جوان  
<sup>۵</sup> استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز ملی مطالعات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

سابقه و هدف: اضطراب یک حالت روانشناختی و فیزیولوژیکی می باشد که با تغییرات بدنی، هیجانی، شناختی و رفتاری شناسایی می شود. اضطراب واکنش طبیعی نسبت به استرس است، اما وقتی شدید می شود اختلال اضطرابی نامیده می شود. در این مطالعه برهمکنش احتمالی بین نیکوتین و سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پستی در زمینه رفتار شبه اضطرابی بررسی شده است. روش بررسی: این مطالعه تجربی بر روی ۲۳۰ موش سوری نر *NMRI* انجام شد. موش ها با تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید، به علاوه زایلین بی هوش شدند و سپس در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. دو کانول در ناحیه هیپوکامپ پستی قرار داده شد. تست ماز بعلاوه ای شکل مرتفع برای سنجش رفتارهای شبه اضطرابی مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز واریانس یکطرفه (*ANOVA*) و به دنبال آن تست *LSD* برای تحلیل داده ها استفاده شد.

یافته ها: تزریق درون صفاقی نیکوتین (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم؛  $P < 0/05$ ) یا تزریق دوطرفه *L*-آرژنین (۱ میکروگرم بر موش؛  $P < 0/05$ ) و *L*-NAME (۵ نانوگرم بر موش؛  $P < 0/01$ ) به هیپوکامپ پستی باعث القاء اثرات اضطراب زا شد. تزریق درون صفاقی مقدار کم نیکوتین (۰/۱ میکروگرم بر کیلوگرم) قبل از مقادیر مختلف *L*-آرژنین یا *L*-NAME اثرات اضطراب زای *L*-آرژنین یا *L*-NAME را مهار کرد. نتیجه گیری: به نظر می رسد که نه تنها هر دو سیستم نیتریک اکساید و نیکوتینی استیل کولین در تعدیل اضطراب در هیپوکامپ پستی موش های کوچک آزمایشگاهی نقش دارند، بلکه بین آنها برهمکنش پیچیده ای نیز وجود دارد. واژگان کلیدی: نیکوتین، نیتریک اکساید، رفتار اضطرابی، هیپوکامپ پستی، موش کوچک آزمایشگاهی.

### مقدمه

عوامل موثر زیست شناختی به میزان زیادی افزایش یافته و معیارهای تشخیصی این بیماری از مسائل سایکودینامیک فاصله گرفته و به معیارهای قابل اعتماد و شناخته شده تری نزدیک شده است (۱). با توجه به شیوع زیاد این بیماری، از دیرباز تاکنون اضطراب از جمله مباحث مهم روانشناسی و پزشکی بوده و همواره برای کنترل آن راه حل ها و داروهای مختلفی با مکانیسم های اثر متفاوت ارائه شده است. درک

اضطراب، پاسخ یک موجود به یک عامل تهدید کننده احتمالی است که می تواند هموستاز موجود را دچار اختلال نماید. اضطراب یک حالت ذهنی است که ما آن را بارها تجربه کرده ایم. در طول بیست سال گذشته، دانش ما از

آدرس نویسنده مسئول: اردبیل، میدان بسیج، دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل،

مرتضی پیری (e-mail: biopiri@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۸/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۲/۱۸

## مواد و روشها

در این مطالعه تجربی که در گروه فارماکولوژی دانشگاه پزشکی تهران انجام گرفت، از ۲۳۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی به وزن تقریبی ۲۵-۲۲ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند، استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه تحقیقاتی منتقل شده، در هر قفس ۵ سر موش قرار داده شد. در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت و هر سه روز یک بار قفس موش‌ها تمیز می‌شد. دمای حیوان‌خانه بین  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد متغیر بود. قبل از جراحی به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه تطبیق دهند. در طول یک هفته به منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوان‌ها Handling می‌شدند. هر حیوان فقط یک بار استفاده شده و در گروه هشت تایی قرار داده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام می‌شد.

برای سنجش اضطراب از مدل رفتاری ماز بعلاوه ای شکل مرتفع (elevated plus-maze) استفاده شد. تست ماز بعلاوه ای شکل مرتفع یکی از تست‌هایی است که برای شناسایی اثرات اضطراب‌زایی و اضطراب‌زدایی داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶، ۱۷). اساس این ارزیابی مدل پلو (Pellow) و فایل (File) است که بر پایه دو گزینه طراحی شده است: یکی حس جستجوگرانه جوندگان، و دیگری احتراز از محیط‌های باز و روشن. این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت بعلاوه (+) است. ابعاد بازوی باز و بسته  $40 \times 7$  سانتی‌متر است که در دو طرف و انتهای بازوی بسته دیوارهای به بلندی ۱۰ سانتی‌متر قرار دارد. برای جلوگیری از سقوط موش‌های صحرایی، در دو طرف و انتهای بازوی باز لبه‌هایی به ارتفاع یک سانتی‌متر از جنس شیشه تعبیه شده است. ماز به وسیله پایه‌هایی در ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار می‌گیرد. موش‌ها درون محدوده مرکزی و رو به یک بازوی باز قرار می‌گرفتند. نور مناسب به وسیله یک لامپ ۱۰۰ واتنی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی‌متری از مرکز ماز قرار داشت، تأمین می‌شد. در مدت پنج دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف ماز حرکت می‌کرد، چهار پارامتر به روش مشاهده اندازه‌گیری می‌شد: تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز می‌شد، تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی بسته می‌شد، مدت زمانی که حیوان در بازوی باز می‌ماند و مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته می‌ماند. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته قرار گرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر است. مدت زمان ماندن در هر بازو نیز بر همین اساس محاسبه شده است. برای

بهرتر مکانیسم‌های دخیل در اضطراب ما را به سمت یافتن داروهای جدیدتر و درمان موثرتر هدایت می‌کند (۲، ۳). نیکوتین یکی از داروهای اعتیادآوری می‌باشد که در سرتاسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو با اثر بر سیستم عصبی مرکزی و محیطی اثرات فارماکولوژیکی زیادی را ایجاد می‌کند (۴). بسیاری از اثرات نیکوتین به توانایی این دارو در برهمکنش با سیستم‌های نورترانسسمیتری مختلف بستگی دارد (۵). مطالعات انجام شده بر روی بیماران مبتلا به آلزایمر نیز تایید کننده اهمیت سیستم کولینرژیک و گیرنده‌های نیکوتینی در فرآیند اضطراب می‌باشند. در این بیماران یکی از اولین سیستم‌هایی که در لوب پیشانی و هیپوکامپ دچار مشکل می‌شود، سیستم کولینرژیک می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهند که این بیماران علاوه بر نقص پیش رونده حافظه، اضطراب فوق العاده شدیدی را نیز تجربه می‌نمایند (۶).

نیتریک اکساید نوعی میانجی عصبی گازی شکل می‌باشد که به روش آنزیمی بعد از فعال شدن گیرنده NMDA توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از L- آرژنین ساخته می‌شود و خود باعث افزایش ره‌ایش دوپامین، استیل کولین و گلوتامات می‌شود (۷). این میانجی عصبی در سیستم عصبی مرکزی اعمال متعددی را میانجی‌گری می‌نماید. مطالعات نشان می‌دهد که نیتریک اکساید در تمایز عصبی (۸)، تقویت دراز مدت سیناپسی (LTP) (۹)، تغییر شکل سیناپسی (۱۰) و حافظه و یادگیری نقش دارد (۱۱). در سیستم عصبی پستانداران آنزیم نیتریک اکساید سنتاز عصبی در نواحی مختلف سیستم عصبی آمیگدال، هیپوکامپ و بخش پشتی ماده خاکستری دور قنات سیلویوس بیان می‌شود (۱۲). با توجه به اینکه این نواحی آناتومیکی در رفتارهای شبه اضطرابی دخیل می‌باشند، این احتمال مطرح می‌شود که نیتریک اکساید در کنترل رفتارهای شبه اضطرابی نقش داشته باشد (۱۳). با در نظر گرفتن اهمیت هیپوکامپ پشتی در رفتار اضطرابی و توجه به این نکته که گیرنده‌های نیکوتینی و نیتریک اکساید سنتاز به مقدار زیاد در هیپوکامپ پشتی بیان می‌شوند (۱۴) و برخی از اثرات نیکوتین توسط نیتریک اکساید میانجی‌گری می‌شود (۱۵)، این احتمال مطرح می‌شود که بین نیکوتین و سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی در زمینه رفتار اضطرابی برهمکنش وجود داشته باشد. لذا در این مطالعه برای اولین بار برهمکنش بین نیکوتین و سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پشتی در زمینه رفتار اضطرابی بررسی شد.

میکرولیتر دارو در مدت ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق می‌شد. در طول تزریق به حیوان اجازه داده می‌شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفورم با تزریق رنگ متیلن بلو ۴ درصد (۱ میکرولیتر) به داخل هر دو کانول، مغز از درون مجسمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار می‌گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شده، محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار می‌گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاكسينوس استفاده می‌شد (۱۸). پس از کسب اطمینان از محل قرارگیری کانول‌ها در نواحی مورد نظر، اطلاعات حاصل از حیوان مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

در آزمایش اول، اثر نیکوتین بر رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی بررسی شد. در این آزمایش چهار گروه حیوان به کار رفت. گروه اول سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف نیکوتین (۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند.

در آزمایش دوم، اثر L-آرژنین در حضور و غیاب مقدار کم نیکوتین بر رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی بررسی شد. در این آزمایش هشت گروه حیوان به کار رفت. چهار گروه اول نیم ساعت قبل از آزمون اضطراب سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی و پنج دقیقه مانده به آزمون مقادیر مختلف L-آرژنین (۱، ۰/۵، ۰/۱ و صفر میکروگرم بر موش) را به صورت درون مغزی (هیپوکامپ پشتی) دریافت کردند. چهار گروه بعدی مقدار کم نیکوتین (۰/۱ میلی‌گرم بر موش) را نیم ساعت قبل از آزمون اضطراب به صورت درون صفاقی دریافت کردند و پنج دقیقه مانده به آزمون، مقادیر مختلف L-آرژنین (۱، ۰/۵، ۰/۱ و صفر میکروگرم بر موش) به ناحیه هیپوکامپ پشتی حیوان تزریق شد.

در آزمایش سوم، اثر NAME-L در حضور و غیاب مقدار کم نیکوتین بر رفتار اضطرابی در موش کوچک آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش هشت گروه حیوان به کار رفت. چهار گروه اول نیم ساعت قبل از آزمون اضطراب، سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی و پنج دقیقه مانده به آزمون مقادیر مختلف NAME-L (۵۰، ۱۰، ۵ و صفر نانوگرم بر موش) را به صورت درون مغزی (هیپوکامپ پشتی) دریافت کردند. چهار گروه بعدی مقدار کم نیکوتین

هر حیوان درصد ورود به بازوی باز (Open Arm Entries (%OAE)) و درصد زمان ماندن در بازوی باز (Open Arm Times (%OAT)) به طریق زیر محاسبه شد:

درصد ورود به بازوی باز = تعداد ورودی به بازوی باز تقسیم بر مجموع تعداد ورودی به بازوی باز و تعداد ورودی به بازوی بسته ضرب در ۱۰۰.

درصد ماندن در بازوی باز = مدت ماندن در بازوی باز تقسیم بر مجموع مدت ماندن در بازوی باز و مدت ماندن در بازوی بسته ضرب در ۱۰۰.

افزایش معنی‌دار این دو پارامتر نشان دهنده کاهش اضطراب در این تست است. البته عامل در صد ورود به بازوی باز (%OAE) نسبت به فاکتور درصد زمان حضور در بازوی باز (%OAT) در ثبت رفتارهای اضطرابی و ضد اضطرابی حیوان دارای حساسیت کمتری است.

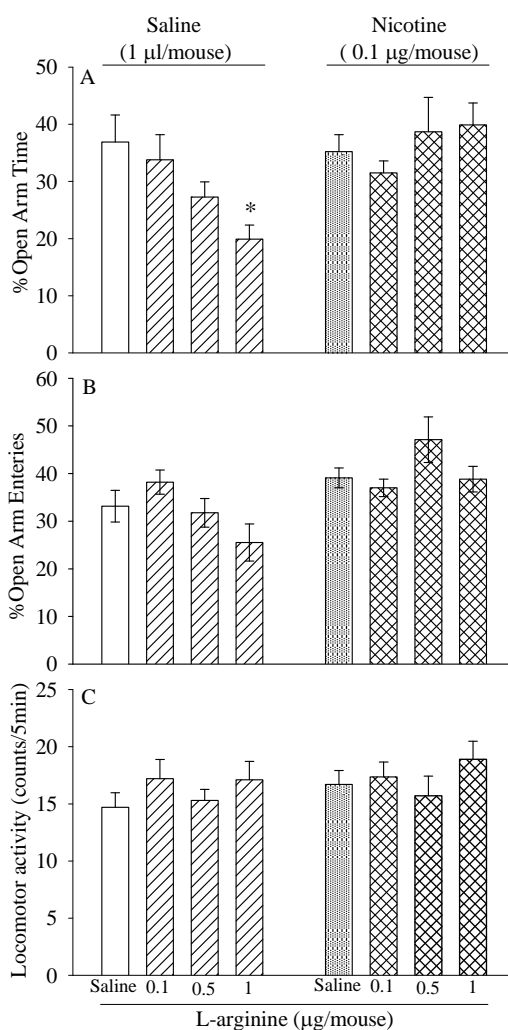
داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از نیکوتین، L-آرژنین و L-NAME که همگی از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه گردیدند. تمامی داروهای فوق بلافاصله قبل از آزمایش‌ها در سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل حل شدند. pH نیکوتین پس از حل نمودن در سرم فیزیولوژیک با اضافه نمودن سود ۰/۱ نرمال به محدوده خنثی (۷/۴) رسانده شد.

در روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه هیپوکامپ پشتی (CA1)، موش‌های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به علاوه زایلین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. کانول‌های راهنما (۲۳ G) به صورت دو طرفه یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، بر اساس اطلس پاكسينوس (۲۰۰۱) قرار داده شدند. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی عبارت بود از: AP=-۲، ML=+۱/۶، V=-۱/۵ (۱۸). بعد از قرار دادن کانول در مختصات مورد نظر با استفاده از سیستم دندان‌پزشکی کانول‌های راهنما در جای خود محکم شدند. پس از جراحی و قبل از تزریق درون مغزی دارو، به حیوان اجازه داده می‌شد ۵ تا ۷ روز دوره بهبودی پس از جراحی را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردد.

برای تزریق درون مغزی دارو، پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن ۳۰ G دندان‌پزشکی که ۹ میلی‌متر طول داشت و به کت دان تیوب نوزاد (شماره ۴) متصل بود، در داخل کانول راهنما ۲۳ G قرار داده شده، در هر کانول ۰/۵

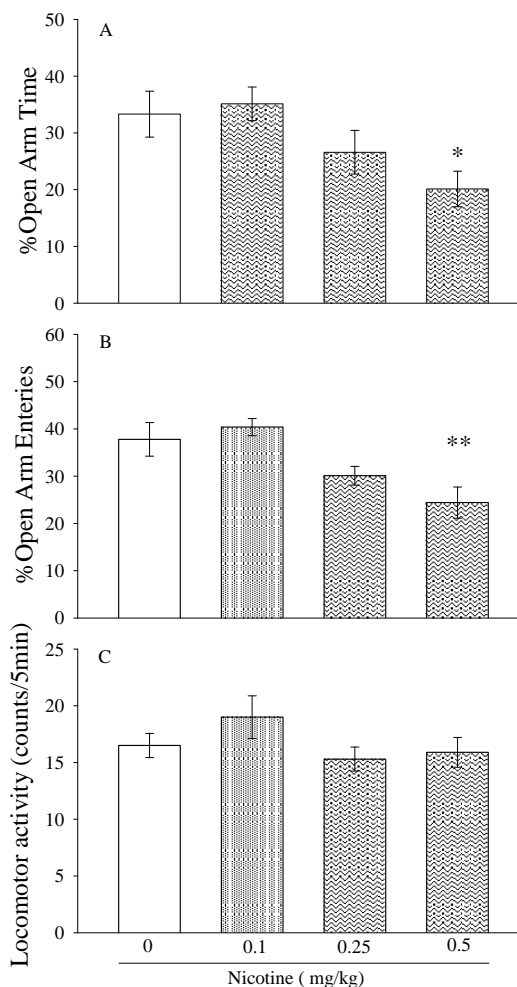
## یافته‌ها

در آزمایش اول به منظور بررسی اثر نیکوتین بر روی رفتار اضطرابی، نتایج آنالیز واریانس یک طرفه مشخص نمود که تزریق مقادیر مختلف نیکوتین به ناحیه هیپوکامپ پستی به صورت معنی‌داری درصد زمان حضور در بازوی باز  $p < 0.01$   $[F(3, 28) = 7.39]$  و درصد ورود به بازوی باز  $p < 0.01$   $[F(3, 28) = 12.47]$  را کاهش می‌دهد، اما بر روی فعالیت حرکتی حیوان اثر معنی‌داری ندارد  $[F(3, 28) = 0.94, p > 0.05]$ . این نتایج نشان دهنده اضطراب‌زا بودن نیکوتین می‌باشد. به علاوه آزمون مکمل LSD نشان داد که کاهش درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز در دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.



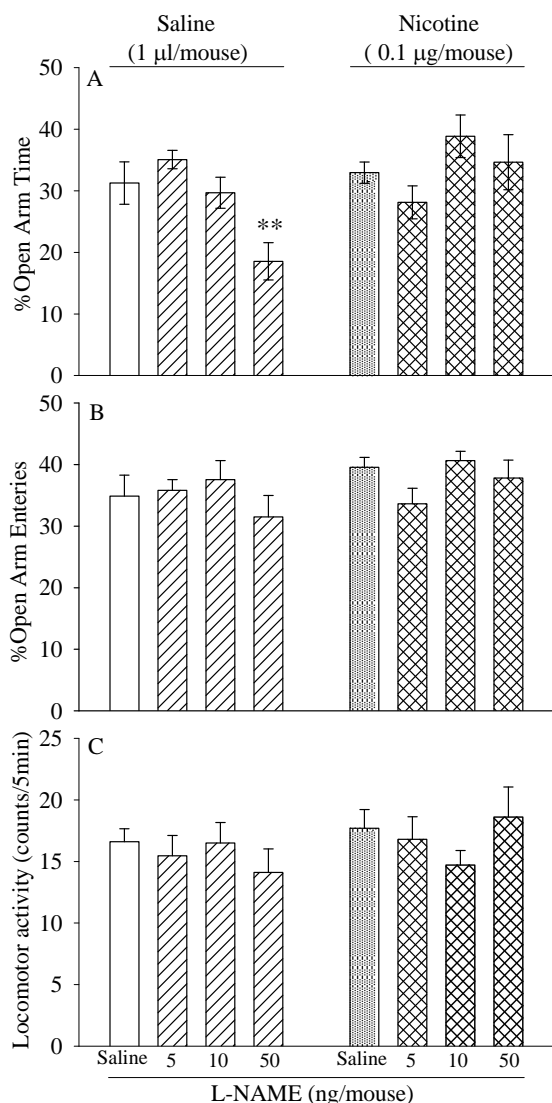
**نمودار ۲-** اثر تزریق L- آرژنین پیش ساز نیتریک اکساید در غیاب و حضور نیکوتین بر روی درصد زمان حضور در بازوی باز، درصد ورود حیوان به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان.  $P < 0.05^*$  در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین.

(۰/۱ میلی‌گرم بر موش) را نیم ساعت قبل از آزمون اضطراب به صورت درون صفاقی دریافت کردند و پنج دقیقه مانده به آزمون مقادیر مختلف NAME-L (۵۰، ۱۰، ۵ و صفر نانوگرم بر موش) به ناحیه هیپوکامپ پستی حیوان تزریق شد.



**نمودار ۱-** اثر تزریق نیکوتین بر روی درصد زمان حضور در بازوی باز، درصد ورود حیوان به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان.  $P < 0.05^*$  در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین.

در همه آزمایش‌ها درصد زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز به عنوان ملاک رفتار اضطرابی اندازه‌گیری شد. همچنین میزان فعالیت حرکتی حیوان نیز به صورت همزمان اندازه‌گیری گردید. نمره هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد ثبت گردید. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون مکمل LSD استفاده گردید.



**نمودار ۳-** اثر تزریق L-NAME مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز در غیاب و حضور نیکوتین بر روی درصد زمان حضور در بازوی باز، درصد ورود حیوان به بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان.  $P < 0.01^{**}$  در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین.

### بحث

در این مطالعه برهمکنش بین سیستم نیتریک اکساید و نیکوتین در زمینه رفتار اضطرابی در ناحیه هیپوکامپ پستی مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه مشخص نمود که بین این دو سیستم در زمینه رفتار اضطرابی برهمکنش وجود دارد و نیکوتین در مقادیر کم قادر به مهار رفتار اضطرابی القاء شده با سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پستی می‌باشد. یافته‌های ما در بخش اول این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق درون صفاقی نیکوتین، زمان حضور در بازوی باز و درصد ورود

در آزمایش دوم برای بررسی اثر تزریق L-آرژنین به هیپوکامپ پستی در حضور و غیاب نیکوتین بر روی رفتار اضطرابی، نتایج آنالیز واریانس یک طرفه مشخص نمود که تزریق مقادیر مختلف L-آرژنین در غیاب نیکوتین به ناحیه هیپوکامپ پستی به صورت معنی‌داری درصد زمان حضور در بازوی باز  $[F(3, 28)=7/39, p < 0.001]$  را کاهش می‌دهد، اما بر روی درصد ورود به بازوی باز  $[F(3, 28)=12/47, p < 0.001]$  و فعالیت حرکتی حیوان اثر معنی‌داری ندارد  $[F(3, 28)=0/94, p > 0.05]$ . این نتایج نشان دهنده اضطراب‌زا بودن نیکوتین می‌باشد. به علاوه آزمون مکمل LSD نشان داد که کاهش درصد زمان حضور در بازوی باز در دوز ۱ میکروگرم بر موش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (شکل ۲- پانل چپ). از طرف دیگر نتایج آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مکمل LSD نشان داد که در حضور مقدار کم نیکوتین، تزریق L-آرژنین به هیپوکامپ پستی اثری بر روی درصد زمان حضور در بازوی باز  $[F(3, 28)=0/94, p > 0.05]$ ، درصد ورود به بازوی باز  $[F(3, 28)=1/26, p > 0.05]$  و فعالیت حرکتی حیوان  $[F(3, 28)=1/48, p > 0.05]$  ندارد. به عبارت دیگر مقدار کم نیکوتین می‌تواند جلوی القای اضطراب با L-آرژنین را بگیرد.

در آزمایش سوم به منظور بررسی اثر تزریق L-NAME به هیپوکامپ پستی در حضور و غیاب نیکوتین بر روی رفتار اضطرابی، نتایج آنالیز واریانس یک طرفه مشخص نمود که تزریق مقادیر مختلف L-NAME در غیاب نیکوتین به ناحیه هیپوکامپ پستی به صورت معنی‌داری درصد زمان حضور در بازوی باز  $[F(3, 28)=7/39, p < 0.001]$  را کاهش می‌دهد، اما بر روی درصد ورود به بازوی باز  $[F(3, 28)=12/47, p > 0.001]$  و فعالیت حرکتی حیوان اثر معنی‌داری ندارد  $[F(3, 28)=0/94, p > 0.05]$ . این نتایج نشان دهنده اضطراب‌زا بودن نیکوتین می‌باشد. به علاوه آزمون مکمل LSD نشان داد که کاهش درصد زمان حضور در بازوی باز در دوز ۵۰ نانوگرم بر موش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (شکل ۳- پانل چپ). از طرف دیگر نتایج آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مکمل LSD نشان داد که در حضور مقدار کم نیکوتین، تزریق L-NAME به هیپوکامپ پستی اثری بر روی درصد زمان حضور در بازوی باز  $[F(3, 28)=1/31, p > 0.05]$ ، درصد ورود به بازوی باز  $[F(3, 28)=0/85, p > 0.05]$  و فعالیت حرکتی حیوان  $[F(3, 28)=1/43, p > 0.05]$  ندارد. به عبارت دیگر مقدار کم نیکوتین می‌تواند جلوی القای اضطراب با L-NAME را بگیرد.

بازوی باز می‌شود، بدون اینکه بر روی درصد حضور در بازوی باز و فعالیت حرکتی حیوان اثری بگذارد. این نتایج نشان دهنده این است که مهار سیستم نیتریک اکساید یا تحریک سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی موش سوری باعث القاء اضطراب می‌گردد. نتایج ما در این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که نیکوتین در مقدار کم می‌تواند جلوی اثرات اضطراب‌زایی L-آرژنین و L-NAME را بگیرد. یافته‌های ما در این مطالعه در راستای مطالعات قبلی می‌باشد که گزارش نموده‌اند مقادیر کم نیکوتین دارای اثرات ضد اضطرابی است (۲۰).

مطالعات قبلی نشان می‌دهند که تزریق سیستمیک یا تزریق درون بطنی L-آرژنین رفتار اضطرابی را در ماز بعلاوه ای شکل مرتفع تغییر می‌دهند (۲۶، ۲۷). همچنین گزارش شده است که تزریق درون صفاقی L-آرژنین در موش سوری اضطراب‌زا می‌باشد (۲۸) و قادر است اثرات ضد اضطرابی دیازپام را تضعیف نماید (۲۹). مطالعات قبلی ما نیز نشان می‌دهد که تزریق دوزهای بالای L-آرژنین به ناحیه هیپوکامپ پشتی در موش صحرایی باعث القاء اضطراب می‌شود (۱۳). نتایج ما در این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که تزریق L-NAME به عنوان یک مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز، باعث القاء اضطراب می‌گردد. نتایج ما در راستای مطالعات پیشینی است که نشان می‌دهند، تزریق سیستمیک مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز باعث القاء اضطراب در مدل ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع می‌شود (۳۰، ۳۱). این یافته همچنین توسط مطالعاتی که نشان می‌دهند تزریق درون صفاقی NG-نیترو L-آرژنین که یک مهار کننده دیگر نیتریک اکساید سنتاز می‌باشد، باعث القاء اضطراب می‌شود، حمایت می‌گردد (۳۲). بر خلاف اکثر گزارشات فوق، مطالعاتی نیز وجود دارد که بیان کننده اثرات ضد اضطرابی مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز می‌باشند (۳۳، ۳۴). نتایج متناقض به دست آمده در مورد اثرات اضطرابی و ضد اضطرابی داروهای نیتریک اکساید همچنین می‌تواند نتیجه برهمکنش پیچیده نیتریک اکساید با سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف باشد. مطالعات نشان داده‌اند که نیتریک اکساید، رهائش نوروترانسمیترهای مختلف از جمله گلوتامات، استیل کولین، هیستامین، سروتونین، دوپامین و نوراپی نفرین را تغییر می‌دهد. اگر چه نیتریک اکساید می‌تواند رهائش گلوتامات را افزایش دهد که نقش تسهیل کننده در واکنش‌های دفاعی دارد (۳۵)، اما باید توجه داشت که افزایش شدید تولید نیتریک اکساید باعث مهار عملکرد گیرنده‌های NMDA می‌شود. همچنین عملکرد دوگانه نیتریک اکساید بر روی

به بازوی باز را کاهش می‌دهد، بدون اینکه بر روی فعالیت حرکتی حیوان تأثیری بگذارد. این یافته‌ها نشان دهنده اضطراب‌زا بودن نیکوتین می‌باشد. یافته‌های ما توسط مطالعاتی که نشان داده‌اند نیکوتین و سایر آگونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی مانند لوبلین (lobeline) باعث القاء اضطراب در تست ماز بعلاوه ای مرتفع می‌شود، تایید می‌گردد (۱۹). در مورد اثرات نیکوتین بر رفتار اضطرابی گزارشات متناقضی وجود دارد، به گونه‌ای که برای نیکوتین اثرات اضطراب‌زا، اضطراب‌زدا یا بی‌اثر بر روی رفتار اضطرابی گزارش شده است. این تفاوت در پاسخ به نیکوتین می‌تواند نتیجه تفاوت در گونه، نژاد، مقدار نیکوتین، نحوه استفاده از نیکوتین و نوع تست اضطرابی باشد (۲۰). در این میان دوز دارو حائز اهمیت بیشتری می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهند که مقادیر کم نیکوتین دارای اثرات ضد اضطرابی می‌باشد، در حالی که مقادیر بالای نیکوتین اضطراب‌زا است (۲۱). نیکوتین به عنوان یکی از تعدیل کننده در سیستم عصبی مرکزی عمل می‌نماید (۲۲) و آگونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی می‌توانند با اثر بر روی گیرنده‌های پیش‌سیناپسی نیکوتینی و افزایش ورود کلسیم به پایانه آکسونی، رهائش نوروترانسمیترهای مختلف از جمله دوپامین، نوراپی نفرین، گلوتامات، گابا و استیل کولین را افزایش دهند (۲۳). هر چند مکانیسم فارماکولوژیکی که از طریق آن نیکوتین اثرات اضطرابی خود را اعمال می‌نماید به طور کامل درک نشده است، اما می‌توان گفت که نیکوتین اثرات اضطراب‌زای خود را به واسطه رهائش گلوتامات یا سایر نوروترانسمیترها ایجاد می‌نماید. گلوتامات نقش مهمی در رفتار اضطرابی بازی می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که فعال شدن گیرنده‌های NMDA رفتارهای اضطرابی در حیوانات آزمایشگاهی را افزایش می‌دهند (۲۴). بنابراین این احتمال وجود دارد که بخشی از اثرات نیکوتین بر رفتار اضطرابی از طرق گلوتامات و گیرنده‌های NMDA میانجی‌گری گردد.

با توجه به اینکه فعال شدن گیرنده‌های NMDA باعث فعال شدن آنزیم نیتریک اکساید سنتاز و افزایش تولید نیتریک اکساید می‌گردد و با در نظر گرفتن این نکته که خود نیتریک اکساید نیز باعث رهائش دوپامین، استیل کولین و گلوتامات می‌شود (۲۵). در بخش دوم این مطالعه نقش سیستم نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی بر رفتار اضطرابی و برهمکنش آن با نیکوتین مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه ما نشان داد که تزریق آگونیست یا آنتاگونیست نیتریک اکساید به ناحیه هیپوکامپ پشتی موش سوری باعث کاهش زمان حضور در

است، می‌تواند نقش تعدیل کننده نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی و برهمکنش پیچیده بین نیتریک اکساید و نوروترانسمیترهایی باشد که رفتار اضطرابی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۳، ۳۸).

از یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که علاوه بر اینکه نیکوتین و سیستم نیتریک اکساید هیپوکامپ پشتی رفتار اضطرابی را تحت تاثیر قرار می‌دهند، بین آنها در زمینه رفتار اضطرابی برهمکنش پیچیده‌ای وجود دارد، به گونه‌ای که با وجود اینکه مقادیر بالای نیکوتین اضطراب‌زا می‌باشد، اما مقادیر کم نیکوتین می‌تواند اضطراب ایجاد شده با پیش‌ساز و مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز را مهار نماید.

به منظور مشخص نمودن مکانیسم دقیق برهمکنش نیکوتین و نیتریک اکساید می‌توان اثر نیکوتین بر روی بیان و فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز را در هیپوکامپ پشتی بررسی نمود. همچنین به منظور مشخص شدن ابعاد مختلف برهمکنش این دو دارو در مغز در زمینه رفتار اضطرابی می‌توان برهمکنش این دو دارو را در سایر نواحی دخیل در رفتار اضطرابی در مغز بررسی کرد.

رهایش گاما آمینوبوتیریک اسید و سروتونین گزارش شده است. این عملکرد دوگانه در مورد رهایش گاما آمینو بوتیریک اسید و سروتونین می‌تواند تحت تاثیر محل اثر نیتریک اکساید در مغز و غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها قرار بگیرد (۳۶).

پاسخ اضطرابی یکسانی که توسط آگونیست و آنتاگونیست نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی موش سوری مشاهده شده است، نشان دهنده نقش تعدیل کننده نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی در زمینه رفتار اضطرابی می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که نیتریک اکساید در هیپوکامپ پشتی با سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلفی که در تعدیل اضطراب نقش دارند، برهمکنش دارد (۳۵). نقش تعدیل کننده نیتریک اکساید در زمینه رفتارهای دیگر نظیر حافظه و یادگیری در مطالعات قبلی نشان داده شده است. مطالعات نشان داده‌اند که تزریق آگونیست نیتریک اکساید به هیپوکامپ پشتی در مقادیر متوسط باعث تقویت حافظه می‌شود، در حالی که تزریق مقادیر بالای آن باعث تخریب حافظه می‌گردد (۳۷). بنابراین می‌توان گفت علت پاسخ یکسانی که توسط آگونیست و آنتاگونیست نیتریک اکساید در زمینه رفتار اضطرابی رخ داده

## REFERENCES

- Davidson RJ. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatr* 2002; 51: 68-80.
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch General Psychiatr* 2005; 62: 617.
- Toubas PL, Abla KA, Cao W, Logan LG, Seale TW. Latency to enter a mirrored chamber: a novel behavioral assay for anxiolytic agents. *Pharmacology Biochem Behav* 1990; 35: 121-26.
- Le Foll B, Goldberg SR. Effects of nicotine in experimental animals and humans: an update on addictive properties. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 192: 335-67.
- Balfour DJ. The effects of nicotine on brain neurotransmitter systems. *Pharmacol Ther* 1982; 16: 269-82.
- Weiner MF, Koss E, Wild KV, Folks DG, Tariot P, Luszczynska H, et al. Measures of psychiatric symptoms in Alzheimer patients: a review. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1996; 10: 20-30.
- Zarrindast MR, Shendy MM, Ahmadi S. Nitric oxide modulates state dependency induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. *Behav Pharmacol* 2007; 18: 289-95.
- Nicotera P, Bonfoco E, Brune B. Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis. *Adv Neuroimmunol* 1995; 5: 411-20.
- Zarrindast MR, Askari E, Khalilzadeh A, Nouraei N. Morphine state-dependent learning sensitization and interaction with nitric oxide. *Pharmacology* 2006; 78: 66-71.
- Wang JH, Ko GY, Kelly PT. Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *J Clin Neurophysiol* 1997; 14: 264-93.
- Rezayof A, Zare-Chahoki A, Zarrindast MR, Rassouli Y. Inhibition of dorsal hippocampal nitric oxide synthesis potentiates ethanol-induced state-dependent memory in mice. *Behav Brain Res* 2010; 209: 189-95.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 682-85.
- Roohbakhsh A, Moghaddam AH, Massoudi R, Zarrindast MR. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 223-29.
- LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Ann Rev Neurosci* 2000; 23: 155-84.

15. Shim I, Kim HT, Kim YH, Chun BG, Hahm DH, Lee EH, et al. Role of nitric oxide synthase inhibitors and NMDA receptor antagonist in nicotine-induced behavioral sensitization in the rat. *Eur J Pharmacol* 2002; 443: 119-24.
16. Bergink V, van Megen HJG. Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004; 14: 175-83.
17. Rezvanfard M, Zarrindast MR, Bina P. Role of ventral hippocampal GABA(A) and NMDA receptors in the anxiolytic effect of carbamazepine in rats using the elevated plus maze test. *Pharmacology* 2009; 84: 356-66.
18. Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Academic Press; 2001.
19. Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJ, Decker MW. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol* 1993; 238: 1-8.
20. Chae Y, Yeom M, Han JH, Park HJ, Hahm DH, Shim I, et al. Effect of acupuncture on anxiety-like behavior during nicotine withdrawal and relevant mechanisms. *Neurosci Lett* 2008; 430: 98-102.
21. Ouagazzal AM, Kenny PJ, File SE. Stimulation of nicotinic receptors in the lateral septal nucleus increases anxiety. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 3957-62.
22. Role LW, Berg DK. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 1996; 16: 1077-85.
23. O'Neill AB, Brioni JD. Benzodiazepine receptor mediation of the anxiolytic-like effect of (-)-nicotine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 755-57.
24. O'Tuathaigh CMP, O'Connor AM, O'Sullivan GJ, Lai D, Harvey R, Croke DT, et al. Disruption to social dyadic interactions but not emotional/anxiety-related behaviour in mice with heterozygous knockout of the schizophrenia risk gene neuregulin-1. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatr* 2008; 32: 462-66.
25. West AR, Galloway MP. Inhibition of glutamate reuptake potentiates endogenous nitric oxide-facilitated dopamine efflux in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 1997; 230: 21-24.
26. Faria MS, Muscara MN, Moreno Junior H, Teixeira SA, Dias HB, De Oliveira B, et al. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol* 1997; 323: 37-43.
27. Volke V, Soosaar A, Koks S, Bourin M, Mannisto PT, Vasar E. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 131: 399-405.
28. Kurt M, Bilge SS, Aksoz E, Kukula O, Celik S, Kesim Y. Effect of sildenafil on anxiety in the plus-maze test in mice. *Pol J Pharmacol* 2004; 56: 353-57.
29. Volke V, Soosaar A, Koks S, Vasar E, Mannisto PT. L-Arginine abolishes the anxiolytic-like effect of diazepam in the elevated plus-maze test in rats. *Eur J Pharmacol* 1998; 351: 287-90.
30. Czech DA, Jacobson EB, LeSueur-Reed KT, Kazel MR. Putative anxiety-linked effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME in three murine exploratory behavior models. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75: 741-48.
31. Pokk P, Vali M. The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behaviour of small-platform-stressed mice in the plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 2002; 26: 241-47.
32. Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides* 2001; 22: 1043-47.
33. Forestiero D, Manfrim CM, Guimaraes FS, de Oliveira RM. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 184: 166-72.
34. Guimaraes FS, Beijamini V, Moreira FA, Aguiar DC, de Lucca AC. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29: 1313-22.
35. Moreira FA, Molchanov ML, Guimaraes FS. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; 171: 199-203.
36. Trabace L, Kendrick KM. Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *J Neurochem* 2000; 75: 1664-74.
37. Huang AM, Lee EH. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 50: 327-32.
38. Philippu A, Prast H. Importance of histamine in modulatory processes, locomotion and memory. *Behav Brain Res* 2001; 124: 151-59.