

## Role of NMDA glutamate receptors within the amygdale in inhibition of the metabolic effects of acute stress in male mice

Sadeghi B<sup>1</sup>, Zardooz H<sup>2</sup>, Sahraei H<sup>1</sup>, Sarahian N<sup>1\*</sup>

1- Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.  
2- Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received January 21, 2015; Accepted October 19, 2015

### Abstract:

**Background:** Amygdala is known as one of the most important regions of the brain in response to stressful stimuli. In the present study, the role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors within the amygdala in inhibition of the metabolic effects of acute stress in male mice was investigated.

**Materials and Methods:** In this experimental study, bilateral or unilateral amygdala cannulation was performed stereotaxically. After a seven-day recovery period, the animals (11 groups of seven each) received different doses of memantine (1, 0.5, and 0.1 µg/mouse) five min before the stress induction. Food and water intake, delay to eating time, and fecal material as stress metabolic parameters were measured.

**Results:** Stress had no effect on water intake, but reduced food intake and, increased delay to eating time and fecal materials. Moreover, injection of memantine to the right or left side of amygdala decreased water intake, and injection at a dose of 0.1 µg to the left amygdala inhibited the effect of stress and increased the food intake. Also, an injection of memantine in the left or right amygdala decreased delay to eating time and decreased fecal material at 1 and 0.5 µg/mouse doses that the right of the core had the greatest inhibitory effect in this regard.

**Conclusion:** It seems that the amygdala glutamate system, in particular its NMDA receptors, may have a significant effect on regulating the stress responses, which this effect is a side-dependent phenomenon.

**Keywords:** Acute stress, Amygdala, Male mouse, NMDA glutamate receptor antagonist

\* Corresponding Author.

Email: sarahiannahid@yahoo.com

Tel: 0098 912 638 0524

Fax: 0098 212 612 7286

Conflict of Interests: No

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2016; Vol. 19, No 6, Pages 476-485*

Please cite this article as: 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* 2016; 19(6): 476-85.

# نقش گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی آمیگدال در مهار اثرات متابولیکی استرس حاد در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر

بهاره صادقی<sup>۱</sup>، حمیرا زردوز<sup>۲</sup>، هدایت صحرایی<sup>۳</sup>، ناهید سراحیان<sup>۱\*</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** آمیگدال یکی از مهم‌ترین مناطق مغزی در پاسخ به محرک‌های استرس‌زا است. در مطالعه حاضر نقش گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی موجود در مهار اثرات متابولیکی استرس حاد در موش‌های نر بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی-مداخله‌ای کانول گذاری یک‌طرفه و دوطرفه آمیگدال توسط دستگاه استریونکس صورت گرفت. پس از یک هفته بهبودی، حیوانات (۱۱ گروه ۶ تایی) دوزهای مختلف ممانتین (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میکروگرم/موش) را ۵ دقیقه قبل از القا استرس دریافت کردند. میزان آب و غذای دریافتی، زمان تاخیر در غذا خوردن و وزن مدفوع به‌عنوان معیارهای متابولیکی استرس سنجیده شد.

**نتایج:** استرس بر میزان دریافت آب بی‌تاثیر بوده ولی باعث کاهش دریافت غذا و افزایش تاخیر در خوردن غذا و افزایش مدفوع گردید. تزریق داخل آمیگدال راست و یا چپ ممانتین موجب کاهش آبنوشی گردید. تجویز ممانتین در دوز ۰/۱ میکروگرم به آمیگدال چپ موجب مهار اثر استرس و در نتیجه افزایش غذای دریافتی گردید. تزریق ممانتین چپ در آمیگدال چپ و چه راست زمان تاخیر در غذا خوردن را کاهش داد و در دوزهای ۱ و ۰/۵ میکروگرم نیز میزان دفع را کاهش داد که سمت راست هسته بیشترین اثر مهارکنندگی را در این زمینه داشت.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد سیستم گلوتامات موجود در آمیگدال و به‌خصوص گیرنده‌های NMDA آن تاثیر مهمی در تنظیم پاسخ به استرس دارد که این اثر وابسته به سمت نیز می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** استرس حاد، آمیگدال، موش نر، آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی

دو ماه نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۴، صفحات ۴۸۵-۴۷۶

## مقدمه

یکی از سیستم‌های نورواندوکرینی مهم در پاسخ به استرس محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق کلیه (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis-HPA) است که در طول استرس‌های روانی یا فیزیکی فعال می‌شود [۲]. در طول درک یک استرس روانی یا فیزیکی ابتدا ترشح هورمون آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRH) از هیپوتالاموس موجب رهاشدن هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) از هیپوفیز قدامی به داخل جریان خون می‌شود و به-دنبال آن گلوکوکورتیکوئیدها از قشر غده فوق کلیه ترشح می‌شوند [۳]. درحالی‌که فعالیت محور HPA را می‌توان به‌عنوان یک مکانیسم انطباقی اساسی در پاسخ به تغییرات محیطی در نظر گرفت، فعالیت طولانی مدت این سیستم می‌تواند سلامتی موجود زنده را به خطر بیندازد و هم‌چنین موجب اختلال در رشد و ترمیم بافتی شود [۴]. مطالعات نشان داده‌اند که گلوکوکورتیکوئیدها توسط بازخورد منفی در غده هیپوفیز و هیپوتالاموس به پاسخ استرسی پایان می‌دهند [۵]. همان‌طورکه در بالا اشاره گردید، استرس به هر وضعیتی اطلاق می‌شود که برای بدن مضر تشخیص داده شود و در آن عملکردهای ذهنی، مغزی، هورمونی، متابولیکی و قلبی-عروقی در پاسخ به این تحریک فعال می‌شوند [۶]. استرس موجب فعال شدن مسیرهای عصبی سمپاتیکی و پاراسمپاتیکی و

چالش‌های زیستی بخشی از زندگی روزانه هر فرد است و هر زمانی که یک چالش درونی یا خارجی به‌عنوان یک عامل ناخوشایند، فرد را تهدید کنند مجموعه‌ای از سیستم‌ها و فرآیندها در بدن فعال می‌شوند و یک پاسخ هماهنگ را در برابر این تهدید تولید می‌کنند. به مجموعه این پاسخ‌های هماهنگ تولید شده پاسخ استرس می‌گویند که بخش جدایی ناپذیری از هر سیستم بیولوژیک سازگار است که در طول تکامل حفظ شده است. به‌عنوان مثال، یک اتفاق ناخوشایند، مشکلات مالی یا خانوادگی، از دست دادن دوستان یا رخ دادن یک اتفاق غیر قابل پیش بینی همه این‌ها می‌توانند آغاز کننده پاسخ استرس باشند [۱].

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۳</sup> استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

## \*نشانی نویسنده مسئول:

تهران، نیاوران، سه راه اراج، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

تلفن: ۰۹۱۲۶۳۸۰۵۲۴

دوره‌نویس: ۰۲۱ ۲۶۱۲۷۲۸۶

پست الکترونیک: sarahiannahid@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۷/۲۷

شواهد اخیر نشان می‌دهند که ممانتین ترجیحا مناطق سطحی تری از منافذ کانال را نسبت به گیرنده‌های NMDA با اثرات شبه روانی (Psychotomimetic) بیشتر نسبت به کتامین و فن-سیکلیدین (PCP) اشغال می‌کند [۱۹]. طبق مطالعات صورت گرفته به نظر نمی‌رسد که ممانتین بر خلاف دیگر آنتاگونیست‌های گیرنده NMDA نظیر کتامین یا دکسترومتورفان پتانسیل سوء مصرف داشته باشد [۱۷]. ممانتین علاوه بر مهار گیرنده‌های NMDA می‌تواند بر سیستم‌های نورآدرنژیک و سروتونرژیک نیز تاثیر گذار باشد و از آنجایی که مکانیسم‌های نورآدرنژیک در آمیگدال یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های پاسخگوئی در استرس محسوب می‌شوند، مهار این سیستم‌ها توسط تجویز ممانتین نیز می‌تواند بر کاهش اثرات متابولیکی استرس موثر باشد [۲۰]. از آنجایی که تاکنون تحقیقی در زمینه تغییرات متابولیکی در اثر استرس حاد و اثر ممانتین داخل آمیگدالی بر این تغییرات در موش‌های نر صورت نگرفته بود، این امر در تحقیق حاضر بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی-مداخله‌ای از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر با میانگین وزنی  $27 \pm 5$  گرم استفاده شد. حیوانات در ۱۱ گروه ۶ تایی با دوره روشنایی-تاریکی طبیعی و در دمای  $24-22^{\circ}\text{C}$  با آب و غذای کافی نگهداری می‌شدند. در هر سری آزمایش ۶ سر حیوان در دو گروه آزمایش و کنترل مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات گروه کنترل و استرس به صورت تصادفی انتخاب شدند و برای سازگاری با محیط جدید حدود یک هفته قبل از شروع آزمایش به محیط آزمایش منتقل شدند. پروتکل نگهداری حیوانات بر اساس آئین نامه نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق پزشکی معاونت پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) بود. تمام تحقیقات در فصل بهار و تابستان ۱۳۹۲ در آزمایشگاه علوم اعصاب دانشگاه بقیه الله انجام گرفت. داروی مورد استفاده در این تحقیق ممانتین هیدروکلراید (سیگما-آمریکا) بود که در نرمال سالین ۰/۹ درصد حل شد. از کتامین هیدروکلراید (۵۰-۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) (سیگما-آمریکا) و دیازپام هیدروکلراید (۵-۷ میلی‌گرم/کیلوگرم) (سیگما-آمریکا) جهت بی‌هوشی استفاده شد. حیوانات به صورت تصادفی در ۱۱ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. به حیوانات گروه کنترل نه استرس القا شد و نه دارو تجویز شد، حیوانات گروه استرس هم فقط تحت استرس قرار گرفتند. نه گروه دیگر از حیوانات به صورت یکطرفه راست و یا چپ و به صورت دوطرفه در مجموعه

در نتیجه اختلال در فعالیت‌های متابولیکی می‌شود و واکنش‌هایی مانند تغییر در تغذیه و میزان آبنوشی، تغییر در زمان شروع تغذیه و تغییر در فعالیت لوله گوارش (تخلیه مثانه و رکتوم) را به دنبال دارد [۸،۷]. هم‌چنین، استرس‌های مختلف قادر به تحریک آمیگدال بوده و این تحریکات در نهایت مجموعه‌ای از عملکردهای هماهنگ عصبی و هورمونی را در پاسخ به استرس مدیریت می‌کنند [۶]. آمیگدال از مجموعه‌ای ناهمگن از هسته‌هایی با منشا و عملکرد متنوع تشکیل شده است که در لوب گیجگاهی میانی و در مجاورت هیپوکامپ قرار گرفته است [۹]. هیپوکامپ و آمیگدال جزء نواحی کلیدی در تنظیم خلق‌وخو و رفتار هستند [۱۰]. مطالعات صورت گرفته در حیوانات مشخص کرده است که آمیگدال از طریق ارتباطاتی که با هیپوتالاموس دارد می‌تواند به-عنوان تنظیم‌کننده محور HPA و در نهایت ترشح گلوکوکورتیکوئیدها در هنگام استرس نقش داشته باشد [۱۱]. اعتقاد بر این است که پاسخ به استرس در بخش‌های مختلف مغز به-خصوص آمیگدال، جمع بندی می‌شوند و پس از آن این پاسخ‌ها در هیپوتالاموس بروز می‌کنند [۱۲،۱۱]. به همین دلیل، گلوکوکورتیکوئیدهای ترشح شده ناشی از فعالیت محور HPA به-صورت مستقیم و یا غیر مستقیم می‌توانند آمیگدال را تحت تاثیر قرار دهند [۱۳]. به علاوه آمیگدال با تاثیر مستقیم بر رفتار تغذیه‌ای و نیز با تاثیر بر دستگاه عصبی خودمختار ممکن است بر وضعیت متابولیکی فرد نیز موثر باشد. در همین رابطه تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که استرس‌های روانی ممکن است با تغییر در رفتار تغذیه-ای فرد و افزایش تمایل به مصرف غذاهای شیرین یا چرب موجب بروز تغییر در وضعیت متابولیک فرد شوند [۱۴]. از سوی دیگر، فعالیت گلوتاماتی در مغز به دنبال بروز استرس افزایش یافته و این افزایش در مناطقی مانند آمیگدال به بروز پاسخ‌های استرسی منجر می‌شود [۱۵]. به همین دلیل هرچند ممکن است ارتباط مستقیمی بین گیرنده‌های گلوتاماتی و وضعیت متابولیکی فرد وجود نداشته باشد، اما به نظر می‌رسد که یک ارتباط قوی-هرچند غیر مستقیم- بین گلوتامات مغز و وضعیت متابولیکی بدن وجود دارد. تغییر در میزان متابولیسم گلوتامات در اثر القا استرس حاد موجب افزایش غلظت کورتیکوسترون می‌شود [۱۶]. ممانتین آنتاگونیست غیر رقابتی گیرنده‌های NMDA است که گیرنده‌های استیل کولینی را نیز مهار می‌کند [۱۷]. این دارو برای درمان زوال عقل متوسط تا شدید در بیماری آلزایمر تجویز می‌شود و از آمانتادین مشتق شده است [۱۸]. ممانتین مانند یون منیزیم کانال‌های گیرنده NMDA را با مهار می‌کند. با این حال بر خلاف منیزیم، کانال‌های NMDA را با میل ترکیبی بیشتر و وابستگی کمتری به ولتاژ مهار می‌کند. به علاوه

شوک حیوانات به قفس منتقل شدند و مدت زمان شروع به غذا خوردن در آنها ثبت شد. علاوه بر سنجش زمان تاخیر در غذا خوردن، میزان آب و غذای دریافتی طی ۲۴ ساعت و میزان دفع مدفوع در هنگام استرس نیز به عنوان تغییرات متابولیکی استرس اندازه گیری شد. اطلاعات به صورت  $\bar{X} \pm SD$  متغیرها بیان شد. به منظور بررسی آماری داده‌ها از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس دو طرفه و تست توکی برای تعیین اختلافات استفاده شد.  $P < 0.05$  معیار معنی دار بودن اختلافات در نظر گرفته شد.

#### نتایج

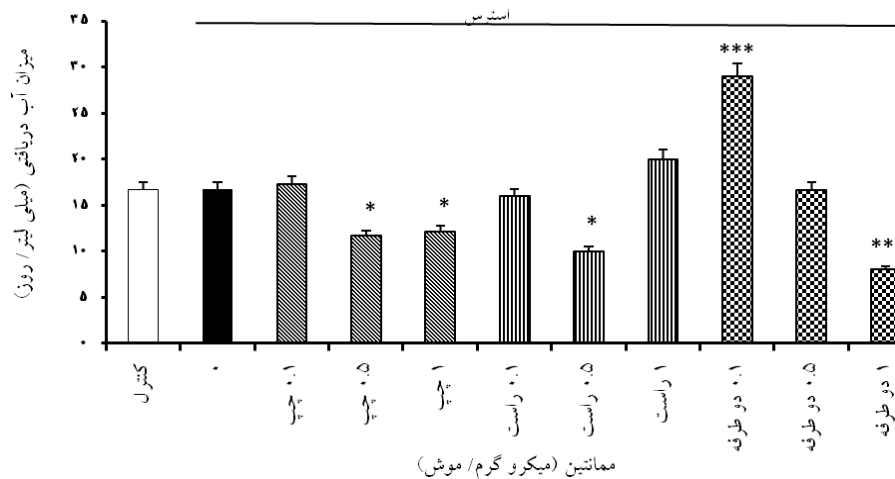
اثر تزریق داخل آمیگدالی ممانتین بر میزان آبنوشی ناشی از استرس حاد

در بخش اول این تحقیق، حیوانات در دو گروه کنترل و استرس قرار گرفتند. گروهی از آنها ممانتین را در دوزهای مختلف (۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۱ میکروگرم/موش) ۵ دقیقه قبل از القا استرس به صورت داخل آمیگدالی (یک طرفه و دوطرفه) دریافت کردند. میزان آب دریافتی توسط حیوانات طی ۲۴ ساعت پس از القا استرس حاد اندازه گیری شد. نتایج نشان دادند که استرس تاثیری در میزان دریافت آب نداشت. تجویز داخل آمیگدالی ممانتین در دوز کم و به صورت تجویز دوطرفه موجب افزایش میزان آبنوشی شد. از سوی دیگر، تجویز ممانتین به صورت یک-طرفه راست و یا چپ در دوز ۰/۵ و یک طرفه چپ و دوطرفه در دوز ۱ موجب کاهش میزان آبنوشی گردید (شکل شماره ۱).

اثر تزریق داخل آمیگدالی ممانتین بر میزان غذای دریافتی ناشی از استرس حاد

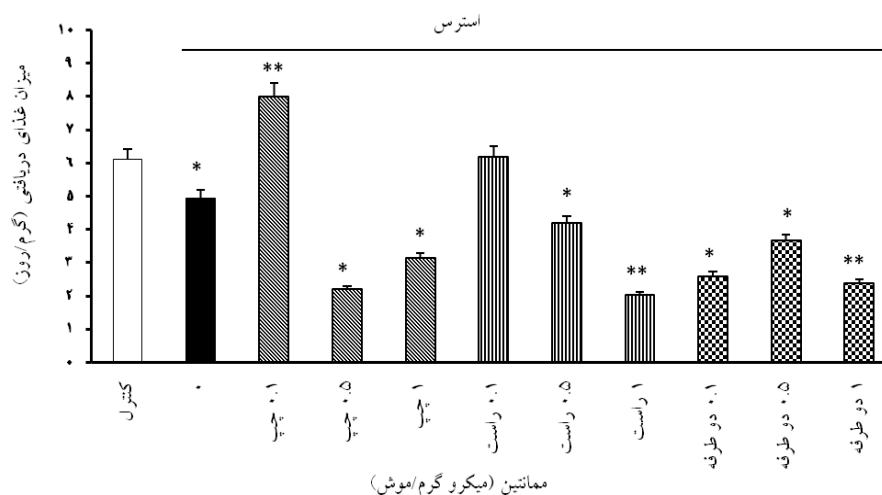
در قسمت بعدی از تحقیق حاضر، پس از تجویز ممانتین و القا استرس حاد، میزان غذای دریافتی توسط حیوانات طی ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. نتایج نشان دادند که استرس میزان غذای دریافتی را کاهش می‌دهد. تجویز داخل آمیگدالی ممانتین در دوز ۰/۱ میکروگرم به آمیگدال چپ موجب مهار اثر استرس و در نتیجه افزایش میزان غذای دریافتی گردید و تجویز آن در دیگر دوزها (هم به صورت یک طرفه و هم دوطرفه داخل آمیگدالی) موجب تقویت اثر استرس گردید (شکل شماره ۲).

آمیگدال کانول گذاری شدند و داروی ممانتین همراه با القای استرس تجویز شد. برای انجام جراحی و کانول گذاری ابتدا حیوانات بی‌هوش شدند. پس از تراشیدن موها سر حیوان در دستگاه استریوتکس ثابت شد. با ایجاد شکافی در پوست سر، بافت‌های سطحی تمیز گردید تا نقطه برگما و لامبدا در سطح جمجمه کاملا مشخص شود. بر اساس مختصات اطلس پاکسینوس [۲۱] مختصات آمیگدال مشخص شد ( $AP = -0.8$ ،  $DV = 4.5$ ،  $ML = \pm 2.5$ ). سپس نقاط مشخص شده توسط مته دندانپزشکی سوراخ گردید. کانول راهنما از سرسوزن شماره ۲۳ و کانول تزریق با سرسوزن شماره ۳۰ دندانپزشکی تهیه شد. طول کانول تزریق ۵۰۰ میکرون بلندتر از طول کانول راهنما در نظر گرفته شد. پس از جراحی به منظور بهبودی، حیوانات یک دوره هفت روزه را در محیطی آرام سپری کردند. حیوانات یک ساعت قبل از شروع استرس به منظور سازش با محیط به اتاق آزمایش منتقل شدند، سپس دوزهای متفاوت ممانتین (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میکروگرم/موش) توسط سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری با حجم تزریق ۰/۵ میکرولیتر به صورت یک طرفه (و ۰/۲۵ میکرولیتر به صورت دوطرفه) تزریق شد. تزریق درون آمیگدالی ۵ دقیقه قبل از شروع آزمایش صورت گرفت. به منظور انتشار بهتر دارو در مجموعه آمیگدال تزریق به آرامی و به مدت ۶۰ ثانیه به طول انجامید و کانول تزریق نیز ۶۰ ثانیه بعد از تزریق دارو از داخل کانول راهنما خارج گردید. در طول این مدت حیوانات حرکت آزادانه داشتند، سپس شوک الکتریکی کف پا توسط دستگاه Communication Box به حیوانات القا شد. این دستگاه متشکل از ۹ قسمت مجزا است که این قسمت‌ها توسط دیواره‌های شفاف (پلکسی گلاس) سوراخ‌دار با هم ارتباط دارند (ارتباط دیداری، شنوایی و بویایی برقرار است). کف دستگاه دارای میله‌های استیل به قطر ۴ میلی‌متر با فواصل ۱/۵ سانتی‌متری است و شوک الکتریکی توسط رایانه متصل به دستگاه توسط کاربر تنظیم می‌شود (ولتاژ ۴۰ ولت، فرکانس ۱۰ هرتز و مدت ۱۰۰ ثانیه). حیوانات ۳۰ دقیقه قبل و ۳۰ دقیقه بعد از استرس در دستگاه باقی ماندند. با حیوانات گروه کنترل نیز همانند گروه آزمایش رفتار می‌شد، با این تفاوت که آنها در دستگاه استرس بدون القا شوک به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از القای



شکل شماره ۱- تاثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر میزان آب‌نوشی در حیوانات مواجه شده با استرس حاد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، استرس تأثیری بر میزان آب‌نوشی نداشت. از سوی دیگر، تجویز ممانتین داخل آمیگدالی به‌صورت وابسته به دوز باعث مهار و یا تقویت اثر استرس بر میزان دریافت شد.

$P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  \*\*\* اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

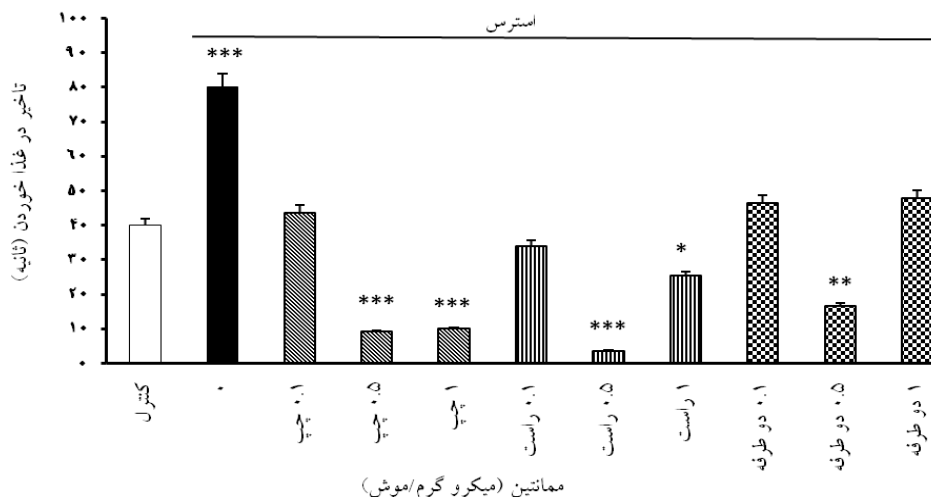


شکل شماره ۲- تاثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر میزان غذای دریافتی پس از القای شوک الکتریکی کف پا. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، استرس میزان غذای دریافتی را کاهش داد و تجویز ممانتین به‌صورت داخل آمیگدالی در دوز ۰/۱ میکروگرم/موش آن هم به‌صورت تجویز یک‌طرفه سمت چپ و راست آمیگدال موجب مهار اثر استرس شد و غذای دریافتی را افزایش داد.

$P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  \*\*\* اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

و ۰/۵ میکروگرم/موش به‌خصوص به‌صورت تجویز یک‌طرفه چپ و یا راست موجب مهار اثر استرس گردید و زمان تأخیر در غذا خوردن را کاهش داد (شکل شماره ۳).

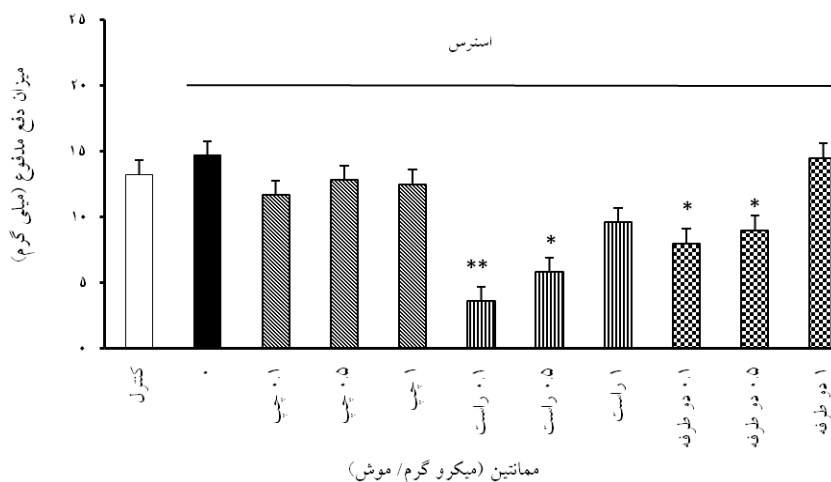
اثر تزریق داخل آمیگدالی ممانتین بر زمان تأخیر در غذا خوردن ناشی از استرس حاد استرس مدت زمان تأخیر در غذا خوردن را در حیوانات به‌صورت معنی‌داری افزایش داد و تجویز ممانتین در دوزهای ۱



شکل شماره ۳- تجویز داخل آمیگدالی ممانتین به همراه القا استرس حاد و تاثیر آن بر زمان تاخیر در غذا خوردن. همان طور که در شکل می بینید، استرس به شدت زمان تاخیر در غذا خوردن را افزایش داد. همچنین، تجویز ممانتین به صورت داخل آمیگدالی در دوزهای متوسط و زیاد به خصوص به صورت تجویز یک طرفه چپ و یا راست موجب مهار اثر استرس گردید.  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل می باشد.

ممانتین به صورت داخل آمیگدالی باعث مهار اثر استرس و کاهش دفع مدفوع گردید و تجویز دوزهای ۰/۱، ۰/۵ میکروگرم/موش ممانتین به آمیگدال راست و تجویز آن به صورت دوطرفه بیشترین تاثیر مهار کنندگی را در این امر داشتند (شکل شماره ۴).

اثر تزریق داخل آمیگدالی ممانتین بر میزان دفع ناشی از استرس حاد در آخرین بخش از این پژوهش، استرس موجب افزایش میزان دفع مدفوع در موش های آزمایشگاهی نر گردید. تجویز



شکل شماره ۴- تاثیر تجویز داخل آمیگدالی ممانتین بر میزان مدفوع حیوانات پس از القای استرس حاد. همان طور که در شکل می بینید استرس موجب افزایش دفع مدفوع گردید که این افزایش در میزان دفع از نظر آماری چندان چشمگیر نیست. تجویز ممانتین به صورت داخل آمیگدالی نیز موجب مهار اثر استرس در دوزهای ۰/۵ و ۰/۱ میکروگرم/موش گردید و سمت راست آمیگدال بیشترین اثر مهار کنندگی را در این زمینه داشت.  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل می باشد.

کوچک آزمایشگاهی نر بر پاسخ به استرس طراحی گردید. باید در نظر داشت که این پاسخها در افراد مختلف و در شرایط مختلف می تواند تا حدودی متغیر باشد. در تحقیق حاضر علاوه

بررسی نقش گیرنده های NMDA گلوتاماتی موجود در مجموعه آمیگدال موش های

بر بررسی اثر استرس تاثیر مهار گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی موجود در مجموعه آمیگدال در این پاسخ‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. باتوجه به اینکه بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که بخش‌های مختلف مجموعه آمیگدال در بروز پاسخ‌ها به استرس نقش دارند و از طرف دیگر باتوجه به اینکه امکان بررسی نقش هر بخش از آمیگدال در تحقیق حاضر به دلیل مشکلات اندازه آمیگدال در موش کوچک امکان نداشت، تزریق در داخل مجموعه آمیگدال قرار گرفت. بنابراین، بایستی به این نکته توجه کرد که اثرات دیده شده مربوط به مجموعه تداخل بین داروی ممانتین و آمیگدال می‌باشد. استرس بر میزان دریافت آب تائیری نداشت، اما موجب کاهش میزان غذای دریافتی و افزایش زمان تاخیر در غذا خوردن گردید. هم‌چنین، میزان دفع مدفوع را نیز افزایش داد. هم‌چنین، در تحقیق ما استرس باعث بروز تغییر معنی‌دار در میزان آبنوشی حیوان نگردید. همان‌طور که می‌دانیم در هنگام استرس با تحریک هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس مقادیر زیادی هورمون CRH به داخل برجستگی میانی ترشح می‌گردد [۲۲]. اما در کنار آن هم‌چنین مقادیری هورمون ضد ادراری (ADH) نیز از سلول‌های موجود در این هسته به داخل گردش خون رها می‌شود [۲۳] که این امر می‌تواند عاملی برای القای پرنوشی باشد [۲۴]. اما نتایج تحقیق ما نشان داد که استرس نتوانست در حیوانات القا پرنوشی کند؛ بایستی گفت که نتایج محققان نیز در این زمینه دارای تناقض است [۷] و در حالی که برخی از محققان نشان داده‌اند پرنوشی بعد از استرس به وجود می‌آید، اما در برخی از تحقیقات دیگر نیز این امر به وجود نیامده است [۲۵،۷]. به نظر می‌رسد که برخی حیوانات ممکن است در مقابل اثرات استرس در القا پرنوشی مقاوم باشند. تحقیق ما نشان داد که تجویز داخل آمیگدال ممانتین به صورت وابسته به دوز می‌تواند اثرات متفاوتی را بر پرنوشی از خود نشان دهد. تحقیقات کمی در مورد تاثیر مستقیم گلوتاماتی و گیرنده‌های آن در آمیگدال بر میزان نوشیدن آب وجود دارد و ما توجیه کاملی را در این مورد نداریم. به نظر می‌رسد که ممکن است ممانتین با اثر بر گیرنده‌های NMDA که به صورت پیش یا پس سیناپسی در پایانه‌های گلوتاماتی به عنوان اتورسپتور یا در سایر پایانه‌ها به عنوان هتورسپتور وجود دارند [۱۴]، در این زمینه نقش داشته باشد. 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. جالب است که در هنگام تجویز دوطرفه ممانتین با دوز کم پرنوشی بسیار قوی دیده می‌شود و به همین دلیل به نظر

می‌رسد که این دوز از داروی ممانتین با مهار گیرنده‌های NMDA موجود در آمیگدال تاثیر شگرف خود را در این پدیده گذاشته است. با دقت در این نتایج به نظر می‌رسد که گیرنده‌های NMDA در هر دو بخش چپ و راست آمیگدال نقش‌های مشابهی را در نوشیدن آب بعد از استرس دارند. هنگامی که تاثیر استرس بر تغذیه حیوانات مورد بررسی قرار گرفت، مشخص شد که میزان تغذیه حیوانات کاهش می‌یابد. این کاهش تغذیه پس از استرس در تحقیقات قبلی دیده شده است [۲۶] و تحقیقات متعدد CRH مترشح از هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس را در القا کاهش تغذیه موثر می‌دانند [۲۷،۲۸]. هم‌چنین، محققان معتقدند که کاهش تغذیه ممکن است با CRH ترشح شده از آمیگدال به خصوص بخش قاعده‌ای - جانبی آمیگدال نیز در ارتباط باشد [۲۹]. از آنجایی که محور HPA پاسخ‌های استرسی و تغذیه‌ای را تنظیم می‌کند و این محور شامل نورون‌های حاوی CRH و نورون‌های حاوی یوروکورتین هستند، عملکرد این نوروترانسمیترها در پاسخ به استرس ممکن است به صورت کاهش یا افزایش در مصرف غذا باشد [۲۸]. فعالیت بخش قاعده‌ای-جانبی آمیگدال با سیستم گلوتاماتی مغز به طور مستقیم در ارتباط است [۱۴] و به همین دلیل به نظر می‌رسد که تجویز ممانتین بتواند بر فعالیت‌های این دو بخش از مغز در حین استرس موثر باشد. باید در نظر داشت که در برخی حالات از جمله هنگامی که دسترسی به غذای پر کربوهیدرات وجود دارد، ممکن است افزایش تغذیه در حین و یا بعد از استرس دیده شود [۳۰]. به همین دلیل استرس به عنوان یک عامل وابسته به فرد در تغییر رفتار تغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شود [۳۱]. تحقیق ما نشان داد تجویز ممانتین در دوز کم به صورت وابسته به سمت (چپ) تاثیر استرس را بر کاهش تغذیه از بین می‌برد. جالب توجه است که هنگام تجویز ممانتین به سمت چپ میزان تغذیه نیز از حالت عادی بیشتر می‌گردد. تاثیر ممانتین بر میزان تغذیه در انسان یا مدل‌های حیوانی به خوبی مطالعه نشده است، اما به نظر می‌رسد با توجه به اینکه آمیگدال را جزء مناطقی می‌دانند که با رفتار تغذیه‌ای ارتباط دارد [۳۲] شاید مهار سیستم گلوتاماتی آمیگدال چپ توسط ممانتین تاثیر استرس را بر رفتار تغذیه‌ای نیز به مقدار زیادی تحت تاثیر قرار داده است. به نظر می‌رسد که ممانتین در دوز کم به صورت وابسته به سمت در آمیگدال با اثرات استرس در کاهش تغذیه مقابله می‌کند، اما با افزایش دوز (و احتمالاً درگیر شدن هر نوع گیرنده پیش و پس سیناپسی NMDA) اثر خالص مهار گلوتامات دیده می‌شود. بایستی در نظر داشت که ارتباطات گلوتاماتی آمیگدال و قسمت پوسته

نبود. در تحقیقات قبلی صورت گرفته بر روی موش‌های کوچک آزمایشگاهی نیز مشخص شد که القا استرس موجب افزایش در میزان دفع ادرار و مدفوع می‌شود [۳۶]. همان‌طور که در بالا گفته شد نوروئیدهای حاوی CRH که از آمیگدال جانبی-قاعده-ای منشاء می‌گیرند و به قسمت‌های مختلف بصل النخاع ختم می‌شوند، باعث تحریک این نواحی گردیده [۳۷] و در صورتی که این تحریک منجر به فعال شدن هسته‌های پاراسمپاتیکی ساقه مغز شود می‌تواند باعث افزایش فعالیت پاراسمپاتیکی از جمله تخلیه مثانه و تخلیه رکتوم شوند [۸]. بایستی در نظر داشت که این اثر با واسطه‌گری نوروئیدهای گلوتاماتی و گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی همراه است. در تحقیق ما مهار گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی در آمیگدال توسط ممانتین توانست یک اثر وابسته به سمت و وابسته به دوز دارو یا مقدار دارو را در حیوانات القا کند. نکته جالب در مجموع این نتایج آن بود که اولاً ممانتین اثرات خود را به‌صورت وابسته دوز یا وابسته به مقدار نشان داد و ثانیاً اثرات ممانتین به‌صورت وابسته به سمت بود. در تحقیقات قبلی تفاوت در پاسخگویی آمیگدال چپ و راست به استرس و نیز این تفاوت در عملکردهای آمیگدال گزارش شده است [۳۹، ۳۸] و تحقیق ما نیز همین تاثیر را نشان داد.

#### نتیجه‌گیری

در مجموع به‌نظر می‌رسد سیستم گلوتامات موجود در آمیگدال و به‌خصوص گیرنده‌های NMDA آن تاثیر مهمی در تنظیم پاسخ‌های حیوان به استرس دارد که این تاثیر وابسته به سمت نیز می‌باشد.

#### تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی دانشگاه بقیه الله (عج) انجام شده است.

#### References:

- [1] Lucassen PJ, Pruessner J, Sousa N, Almeida OF, Van Dam AM, Rajkowska G, et al. Neuropathology of stress. *Acta Neuropathol* 2014; 127(1): 109-35.
- [2] Francis DD, Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9(1): 128-34.
- [3] Lupien SJ, Buss C, Schramek TE, Maheu F, Pruessner J. Hormetic influence of glucocorticoids on human memory. *Nonlinearity Biol Toxicol Med* 2005; 3(1): 23-56.

هسته آکومبئس در کنترل تغذیه نقش دارند و به‌همین دلیل ممکن است که با مهار گلوتامات در آمیگدال اثر تحریکی آن بر قسمت پوسته هسته آکومبئس و در نتیجه بروز رفتار تغذیه‌ای مهار گردیده است. دیگر نتایج این تحقیق نشان داد که استرس به‌طور معنی‌داری قادر به القا تاخیر در شروع تغذیه (آنورکسی) در حیوانات گردیده و دوزهای کم، متوسط و زیاد ممانتین این اثر استرس را خنثی کردند. آنورکسی یا تاخیر در شروع تغذیه از جمله نشانه‌های استرس محسوب می‌شود که در مدل‌های مختلف استرس در جنس نر و ماده دیده شده است [۳۳]. در موارد انسانی نیز همین رفتار پس از استرس دیده می‌شود. همان‌ور که در بالا گفته شد آزاد شدن هورمون CRH از هسته پاراونتریکولار نقش بسیار مهمی را در بروز این پدیده دارد؛ به-عبارت دیگر CRH با اثر بر گیرنده‌های نوع ۱ خود که در هسته‌های مسئول تغذیه در هیپوتالاموس وجود دارد، باعث مهار این هسته‌ها و القای اشتها می‌شود [۳۴]. تحقیق حاضر نشان داد که هم‌خوان با مطالعات قبلی استرس باعث افزایش زمان تاخیر در تغذیه می‌شود [۳۵] و این امر می‌تواند نشان دهنده آن باشد که استرس به‌کار رفته در این تحقیق توانسته است اثر خود را اعمال کند. این بخش از نتایج با یافته‌های قسمت قبلی که شامل کاهش تغذیه حیوانات بود، هم‌خوانی دارد و نشان گر آن است که این دو پدیده در یک راستا اثر می‌کند. نکته قابل توجه دیگر آن بود که اثر داروی ممانتین در دوز متوسط قوی‌تر از دوزهای کم و زیاد بود که نشان دهنده وابسته به دوز بودن اثر ممانتین است. با توجه به این امر به‌نظر می‌رسد گیرنده‌های پیش یا پس سیناپسی NMDA که در پایانه‌های گلوتاماتی موجود در آمیگدال قرار دارند، ممکن است در بروز این پدیده موثر باشند. در بخش پایانی تحقیق تاثیر در میزان مواد دفعی در حیوانات بررسی شد. القا استرس حاد در موش‌های نر موجب افزایش در میزان دفع گردید که البته این افزایش از نظر آماری معنی‌دار

- [4] Meaney MJ, Aitken DH. [3H] dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res* 1985; 328(1): 176-80.
- [5] Bangasser DA, Valentino RJ. Sex differences in molecular and cellular substrates of stress. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32(5): 709-23.
- [6] McEwen BS, Milner TA. Hippocampal formation: shedding light on the influence of sex and stress on the brain. *Brain Res Rev* 2007; 55(2): 343-55.
- [7] Sarahian N, Sahraei H, Zardooz H, Alibeik H, Sadeghi B, Javadifar T, et al. Comparative effect



- of memantine intraperitoneal and intra accumbal on responding to acute stress in female NMRI mice. *Physiol Pharmacol* 2015; 18(4): 383-96. [in Persian]
- [8] Rao SS, Hatfield RA, Suls JM, Chamberlain MJ. Psychological and physical stress induced differential effects on human colonic motility. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(6): 985-90.
- [9] Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 2002; 137(1-2): 75-114.
- [10] Han F, Xiao B, Wen L, Shi Y. Effects of fluoxetine on the amygdala and the hippocampus after administration of a single prolonged stress to male Wistar rats: In vivo proton magnetic resonance spectroscopy findings. *Psychiatry Res* 2015; 232(2): 154-61.
- [11] Marek R, Strobel C, Bredy TW, Sah P. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J Physiol* 2013; 591 (Pt 10): 2381-91.
- [12] Duvarci S, Pare D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 2014; 82(5): 966-80.
- [13] Shirazi SN, Friedman AR, Kaufer D, Sakhai SA. Glucocorticoids and the Brain: Neural Mechanisms Regulating the Stress Response. *Adv Exp Med Biol* 2015; 872: 235-52.
- [14] Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 2007; 91(4): 449-58.
- [15] Reznikov LR, Grillo CA, Piroli GG, Pasumarthi RK, Reagan LP, Fadel J. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* 2007; 25(10): 3109-14.
- [16] Knox D, Perrine SA, George SA, Galloway MP, Liberzon I. Single prolonged stress decreases glutamate, glutamine, and creatine concentrations in the rat medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 2010; 480(1): 16-20.
- [17] Olive MF, Clewa RM, Kalivas PW, Malcolm RJ. Glutamatergic medications for the treatment of drug and behavioral addictions. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 100(4): 801-810.
- [18] Greenamyre JT, Maragos WF, Albin RL, Penney JB, Young AB. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1988; 12(4): 421-30.
- [19] Kotermanski SE, Wood JT, Johnson JW. Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping. *J Physiol* 2009; 587(Pt 19): 4589-04.
- [20] Chen HS, Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 2006; 97(6): 1611-26.
- [21] Paxinos G, Franklin KBJ, The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Second ed.* San Diego, Academic Press; 2001.
- [22] McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 2007; 87(3): 873-904.
- [23] Scantamburlo G, Ansseau M, Legros JJ. Role of the neurohypophysis in psychological stress. *Encephale* 2001; 27(3): 245-59.
- [24] Aguilera G. HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. *Exp Gerontol* 2011; 46(2-3): 90-5.
- [25] Nicaeili F, Sahraei H, Khosravi M, Rezaeian J, Eftekhari F, Sarahian N, et al. Effect of temporary inhibition of nucleus accumbens in response to foot shock chronic stress in female NMRI mouse. *J Babol Univ Med Sci* 2016 (in press). [in Persian]
- [26] Gluck ME. Stress response and binge eating disorder. *Appetite* 2006; 46(1): 26-30.
- [27] Laue L, Gold PW, Richmond A, Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anorexia nervosa and bulimia nervosa: pathophysiologic implications. *Adv Pediatr* 1991; 38: 287-316.
- [28] Maniam J, Morris MJ. The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* 2012; 63(1): 97-110.
- [29] Dallman MF, 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(20): 11696-701.
- [30] Rostamkhani F, Zardooz H, Zahediasl S, Farrokhi B. Comparison of the effects of acute and chronic psychological stress on metabolic features in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012; 13(11): 904-12.
- [31] Picard M, Juster RP, McEwen BS. Mitochondrial allostatic load puts the 'gluc' back in glucocorticoids. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(5): 303-10.
- [32] Stratford TR, Wirtshafter D. Injections of muscimol into the paraventricular thalamic nucleus, but not mediodorsal thalamic nuclei, induce feeding in rats. *Brain Res* 2013; 1490: 128-33.
- [33] Groesz LM, McCoy S, Carl J, Saslow L, Stewart J, Adler N, et al. What is eating you? Stress and the drive to eat. *Appetite* 2012; 58(2): 717-21.
- [34] 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(12): 1420-5.
- [35] Merali Z, Graitson S, Mackay JC, Kent P. Stress and eating: a dual role for bombesin-like peptides. *Front Neurosci* 2013; 7: 193.
- [36] Bagheri Nikoo GR, Khosravi M, Sahraei H, Ranjbaran M, Sarahian N, Zardooz H, et al. Effects of systemic and intra-accumbal memantine administration on the effects of electro foot shock

in male NMRI mice. *Physiol Pharmacol* 2014; 18(1): 61-71.

[37] Lawson EA, Klibanski A, Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4(7): 407-14.

[38] Hooshmandi Z, Rohani AH, Eidi A, Fatahi Z, Golmanesh L, Sahraei H. Reduction of metabolic and behavioral signs of acute stress on male

Wistar rats by saffron water extract and its constituent safranal. *Pharm Biol* 2011; 49(9): 947-54.

[39] Halataei B, Khosravi M, Arbabian S, Sahraei H, Golmanesh L, Zardooz H, et al. Saffron (*Crocus sativus*) aqueous extract and its constituent crocin reduces stress-induced anorexia in mice. *Phytother Res* 2011; 25(12): 1833-8.