ORIGINAL ARTICLE

Performance Evaluation of Interference Morphine and β-Adrenergic System of Dorasal Hippocampus on Anxiety-Related Behaviour in Male Wistar rat

Elmira Beirami[1],
Shahrbanoo Oryan[1],
Farhad Valizadegan[1],
Mohammadreza Zarrindast[2]

[1] Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran
[2] Department of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received December 19, 2011 ; Accepted June 25, 2012)

Abstract

Background and purpose: The adrenergic system is known to have modulatory influence on anxiety-related behaviour both in human and animals. Dorsal hippocampus is an important brain site in modulation of neurotransmittery and neuroendocrinology of anxiety. The present study, was designed to evaluate the interactions between adrenergic and opioidergic systems in dorsal hippocampus on anxiety.

Materials and methods: The male Wistar rats, weighting 200-250 grams, were used. At the time of surgery the animals were anesthetized and placed in the stereotaxic apparatus and were cannulated bilaterally. The elevated plus-maze was used to measure the anxiety. Percentage of open arm time (OAT%) and open arm entry(OAE%) was used for evaluation of anxiety.

Results: Intra peritoneal administration of morphine (6mg/kg) increased the percentage of open arm time (OAT%) in anxiety test, indicating anxiolytic-like effect. Intra dorsal hippocampus infusion of salbutamol, β_2-adrenergic receptor agonist, (4μg/rat) increased OAT% in anxiety test, demonstrating anxiolytic-like effect. While co-administration of intra dorsal hippocampus salbutamol (4μg/rat) and ineffective dose of morphine (4mg/kg) showed significant increase of OAT% in anxiety test, thus presenting anxiolytic response. Intra dorsal hippocampus administration of propranolol, β_2-adrenergic receptor non-selective antagonist, (4μg/rat) decreased OAT% ,indicating of decrease anxiety-like behaviour. While co-administration of intra dorsal hippocampus propranolol (4μg/rat) and effective dose of morphine (6mg/kg) showed a significant increase of OAT%, presenting anxiolytic response. Co-administration of ineffective doses of morphine (4mg/kg) and propranolol (1μg/rat) with the effective dose of salbutamol (4μg/rat), showed that propranolol could reverse the anxiolytic-like effect of morphine and salbutamol. It should be noted that there are no significant changes in locomotor activity.

Conclusion: The results indicate that morphine creates the compromise changes in adrenergic neurons of dorsal hippocampus by changing the effects of β-adrenergic system on anxiety.

Key words: Anxiety, noradrenergic system, morphine, dorsal hippocampus

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(91): 50-59 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۱ مرداد سال ۱۳۹۱ (۵۹-۵۰)

ارزیابی تداخل عملکرد مورفین و سیستم β-آدرنرژیک هیپوکامپ پشتی بر رفتارهای شبه اضطرابی در موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار

المیرا بیرامی[1]
شهربانو عریان[1]
فرهاد ولی زادگان[1]
محمدرضا زرین دست[2]

چکیده

سابقه و هدف: سیستم آدرنرژیک دارای تأثیرات تنظیمی بر رفتارهای مرتبط با اضطراب در انسان و حیوانات می‌باشد. هیپوکامپ پشتی جایگاه مهمی در تنظیم نوروترانسمیتری و نورواندوکرینی اضطراب در نظر گرفته می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات سیستم آدرنرژیک هیپوکامپ پشتی بر اضطراب و تداخل آن با سیستم اوپیوئیدرژیک در تنظیم رفتارهای اضطرابی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۱۵۶ رت نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد.حیوانات در ۲۶ گروه ۶ تایی قرار گرفته و با استفاده از دستگاه استرئوتاکسی به صورت دوطرفه در ناحیه CA_1 هیپوکامپ کانول‌گذاری شده و با دستگاه Elevated plus-maze تست شدند. درصد زمان گذرانده شده در بازوهای باز و درصد ورود به بازوهای باز این دستگاه به‌عنوان اندکس‌هایی جهت تعیین میزان اضطراب مورد محاسبه قرار گرفتند.

یافته‌ها: تزریق درون‌صفاقی مورفین(6mg/kg) سبب افزایش معنی‌داری در درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز (open arm time(OAT%)گردید،که نشان دهنده پاسخ شبه اضطراب‌زدایی می‌باشد. تزریق سالبوتامول (4μg/rat)، آگونیست رسپتور β_2-آدرنرژیک، در ناحیه CA_1، نیز تاثیر اضطراب‌زدایی داشت. به‌علاوه تزریق توام دوز مؤثر سالبوتامول (4μg/rat)، به همراه دوز بی اثر مورفین (4mg/kg;i.p) اثر سینرژیستی مورفین و سالبوتامول را در کاهش اضطراب نشان داد.تزریق پروپرانولول (4μg/rat)، آنتاگونیست غیرانتخابی رسپتور β_2-آدرنرژیک، در ناحیه CA_1، سبب بروز رفتار شبه اضطرابی گردید. همچنین تزریق توام پروپرانولول (4μg/rat)، به همراه دوز مؤثر مورفین (6mg/kg;i.p.) موجب افزایش OAT% شد، که نشان از اثر اضطراب زدایی دارد.تزریق توامان دوز بی‌اثر مورفین (4mg/kg;i.p) و پروپرانولول (1μg/rat) به همراه دوز مؤثر سالبوتامول (4μg/rat)، نشان داد که پروپرانولول سبب بازگشت اثرات ضد اضطرابی سالبوتامول و مورفین گردید. لازم به ذکر است که تغییر معنی‌داری در مورد فعالیت حرکتی حیوان در هیچ یک از موارد فوق مشاهده نگردید.

استنتاج: نتایج نشان می دهند که مورفین با سیتم نورآدرنرژیک هیپوکامپ پشتی میان کنش داشته و با ایجاد یک سری تغییرات سازشی در نورون‌های نورآدرنرژیک این ناحیه سبب تغییر در اثرات سیستم β-آدرنرژیک بر روی اضطراب می‌شود.

واژه های کلیدی: اضطراب، سیستم نورآدرنرژیک، مورفین، هیپوکامپ پشتی

مقدمه

از دیدگاه فیزیولوژیک، اضطراب واسترس واکنش‌های پیچیده‌ای در ارگانیسم بوده که به دنبال آبشاری از پیامدهای بیوشیمیایی و اندوکرینی و توسط استرسورها در نتیجه رفتارهای کوتاه مدت و بلند مدت

مولف مسئول: المیرا بیرامی- تهران: دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم زیستی
E-mail: Elmira_beirami@yahoo.com
۱. دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت معلم تهران
۲. گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تاریخ دریافت : ۹۰/۹/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۱۲/۲۲ تاریخ تصویب : ۹۱/۴/۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

ایجاد می‌شوند(۱). هیپوکامپ جزء اصلی سیستم لیمبیک بوده و نقش بسیار مهمی را در نوروبیولوژی اضطراب ایفا می‌کند و با مراکز هیجانی زیادی در مغز در ارتباط می‌باشد(۲). مطالعات نشان داده‌اند که ناحیه پشتی هیپوکامپ[1] (CA_1) تحت تأثیر برخی از داروهای مؤثر بر اضطراب مانند اتانول و بنزودیازپین ها قرار می‌گیرد(۳). تزریق آگونیست سروتونین به ناحیه CA_3 بر اضطراب تأثیری نداشته است، ولی تزریق همین دارو به ناحیه CA_1 باعث اثرات اضطراب‌زایی در مدل رفتاری ماز صلیبی شکل مرتفع[2] می‌شود، که این پدیده ناشی از تفاوت بخش‌های شکمی و پشتی این ناحیه از نظر ارتباطات آوران و وابرانی است که با دیگر نقاط مغز از جمله آمیگدال و هسته رافه دارد. هیپوکامپ به واسطه ارتباط اش با آمیگدال وسپتوم اثر ضد اضطرابی اعمال می‌کند. تخریب الکتریکی و شیمیایی هیپوکامپ، رفتارهای شبه اضطرابی را در تست EPM[2] نشان می‌دهد(۴). سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلفی در هیپوکامپ وجود دارند که در تعدیل رفتارهای شبه اضطرابی دخیل می‌باشند. در میان این نوروترانسمیترها، نوراپی‌نفرین نقش مهمی را در تعدیل اضطراب در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد(۵). عملکردهای مربوط به اضطراب نوراپی‌نفرین به‌واسطه زیر واحدهای مختلف گیرنده‌های آدرنرژیک میانجی‌گری می‌شود(۶).

اضطراب موجب افزایش قابل توجهی در آزادسازی نوراپی نفرین در مناطق مختلف مغزی همچون آمیگدال، هیپوکامپ، هیپوتالاموس و لوکوس سرولئوس می‌شود(۷). هیپوکامپ ورودی‌های آدرنرژیکی اصلی را از هسته لوکوس سرولئوس دریافت می‌کند(۸). گیرنده‌های آدرنرژیک در انواع مختلف سلول‌های هیپوکامپ همچون نورون‌های تحریکی اصلی، اینترنورون‌ها و سلول‌های گلیال شناسایی شده اند(۹، ۱۰) وجود گیرنده‌های اوپیوئیدی در نواحی مختلف هیپوکامپ گزارش شده است. مورفین به عنوان آگونیست گیرنده μ، مهم‌ترین آلکالوئید تریاک در نظر گرفته می‌شود و تاکنون خواص فارماکولوژیکی زیادی در مورد مورفین در خصوص اثرات ضد دردی، کاهش حافظه و یادگیری معرفی شده است(۱۱). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که تزریق سیستمیک مورفین و یا سایر آگونیست‌های گیرنده μ-اوپیوئیدی سبب رفتارهای شبه اضطراب‌زدایی می‌شوند(۱۲) در حالی‌که آنتاگونیست‌های گیرنده اوپیوئیدی، اضطراب را در انواع مختلف مدل‌های رفتاری نظیر EPM افزایش می‌دهند(۱۳). همچنین مشخص شده است که مورفین از طریق میانکنش با بسیاری از سیستم‌های نوروترانسمیتری در جایگاه‌های مختلف مغزی، همچون هیپوکامپ، آمیگدال و هسته نوکلئوس اکومبنس رفتارهای شبه اضطراب‌زدایی را القاء می‌کند. میانکنش نوروآناتومیکی بین آکسون‌ها و پایانه‌های واجد گیرنده μ و GABA[3] نشان دهنده یک تأثیر مستقیم میان آن‌هاست. این موضوع پیشنهاد می‌کند که اوپیوئیدهای اندوژن روی گیرنده‌های μ تأثیر کرده و سبب تغییر در میزان آزادسازی GABA از این هسته‌ها به صورت پیش و پس سیناپسی می‌شوند(۱۴). این پژوهش برای نخستین بار، با هدف مطالعه تداخل عملکرد مورفین و سیستم β-آدرنرژیک هیپوکامپ پشتی بر رفتارهای شبه اضطرابی صورت گرفته است. نقش مرکزی سیستم نورآدرنرژیک به عنوان اصلی‌ترین سیستم واسطه‌گر در رفتارهای اضطرابی و اهمیت به‌کارگیری داروهای نورآدرنرژیک و اوپیوئیدرژیک در مطالعات بالینی مرتبط با اضطراب، ضرورت انجام مطالعه فوق را توجیه می‌نمایند. بر همکنش این دو سیستم به عنوان یک ارزش سازشی در جهت حفظ و تنظیم هومئوستازی، قابل توجه می‌باشد.

1. Cornu Ammonis (CA)
2. Elevated plus maze (EPM)
3. aminobutyric acid (GABA)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش: در این مطالعه از ۱۵۶ رت نر بالغ نژاد ویستار خریداری شده از انستیتو پاستور تهران، با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در حیوان‌خانه‌ای با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره تاریکی روشنایی ۱۲ ساعته در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. در تمامی مدت نگهداری به‌جز هنگام آزمایش، حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص موش‌ها داشتند. جهت عادت کردن حیوانات به محیط و حذف استرس‌های ناشی از جابه‌جایی، یک هفته قبل از شروع هر گونه آزمایش، حیوانات نسبت به شرایط محیط آزمایشگاه سازگاری پیدا کردند. تست‌های رفتاری بین ساعات ۱۲ تا ۴عصر انجام گرفتند و هر حیوان فقط یکبار مورد تست قرار گرفت. رت‌ها حدود ۵ دقیقه قبل از تست رفتاری مورد نوازش (handling) قرار می‌گرفتند. لازم به ذکر است که حیوانات به ۲۶ گروه تقسیم شده و در هر گروه آزمایشی شش حیوان مورد استفاده قرار گرفت. علت انتخاب رت‌های نر بدلیل ساده‌تر بودن سیستم هورمونی و نیز تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها بود. روش جراحی و کانول‌گذاری در ناحیه هیپوکامپ پشتی (CA_1) : حیوانات با تزریق درون صفاقی مخلوط کتامین هیدروکلراید (50mg/kg) و زایلزین (4mg/kg) بیهوش و در دستگاه استروتاکسی قرار گرفتند. دو کانول راهنمای ۲۲ گیج به‌صورت دو طرفه و بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون، در هیپوکامپ پشتی قرار داده شدند(۱۵). مختصات ناحیه CA_1 هیپوکامپ پشتی برابر: (از برگما AP =-3.3 mm، از خط وسط ML = ±1.8mm و از سطح جمجمه DV = -2.5 mm). برای جلوگیری از مسدود شدن کانول راهنما یک سیم نازک فولادی در داخل کانول قرار داده شد. تزریق درون مغزی دارو: برای تزریق دارو پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سرسوزن ۲۷ گیج دندان‌پزشکی به‌طول ۹ میلی متر و متصل به کت دان تیوب (cat down tube)، در داخل کانول راهنمای ۲۲ گیج قرار داده شده و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۶۰ ثانیه و توسط سرنگ هامیلتون تزریق شد.

داروها: داروهای مورد استفاده در این تحقیق شامل مورفین (تماد، ایران) سالبوتامول (شرکت دارو پخش، ایران) و پروپرانولول (شرکت دارو پخش، ایران) بود، که تمامی داروها بیش از انجام آزمایش در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹ درصد حل شدند. تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده: در این تحقیق در آزمایش اول پنج گروه شش تایی از رت‌ها دوزهای مختلف مورفین (4،5، 6 and 7 mg/kg) را ۳۰ دقیقه قبل تست در دستگاه EPM، به صورت درون صفاقی دریافت نمودند. در آزمایش دوم چهار گروه شش تایی از رت‌ها ابتدا سالین (1 ml/kg) و یا دوز بی اثر مورفین (4 mg/kg) را به صورت درون صفاقی دریافت نموده و ۲۵ دقیقه بعد دوزهای مختلف سالبوتامول (1، 2 and 4 µg/rat) را در ناحیه CA_1 هیپوکامپ دریافت و ۵ دقیقه بعد مورد تست قرار گرفتند. به عبارتی اثرات سالبوتامول به تنهایی و نیز همراه با مورفین بر روی اضطراب مورد ارزیابی قرار گرفت.

در آزمایش سوم چهار گروه شش تایی از رت‌ها ابتدا سالین (1 ml/kg) و یا دوز مؤثر مورفین (6 mg/kg) را به صورت درون صفاقی دریافت نموده و ۲۵ دقیقه بعد دوزهای مختلف پروپرانولول (1، 2 and 4 µg/rat) را در ناحیه CA_1 هیپوکامپ دریافت و ۵ دقیقه بعد مورد تست قرار گرفتند، تا اثرات پروپرانولول به تنهایی و نیز تزریق توام آن با مورفین مورد بررسی قرار گیرد.

در آزمایش چهارم حیوانات ابتدا دوز بی‌اثر مورفین (4 mg/kg) را به‌صورت درون صفاقی، و بعد دوز بی‌اثر پروپرانولول (1 µg/rat) به همراه دوز مؤثر سالبوتامول (4µg/rat) را در ناحیه CA_1 دریافت نمودند. تا میانکنش بین این سه دارو مورد بررسی قرار گیرد. درتمامی گروه‌های آزمایشی تزریقات درون صفاقی ۳۰ دقیقه قبل تست و تزریقات درون مغزی ۵ دقیقه قبل تست انجام گرفت.

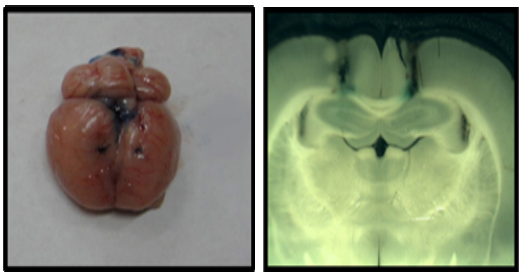
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

آزمون رفتاری: برای سنجش میزان اضطراب دستگاه Elevated plus-maze (EPM)، مورد استفاده قرار گرفت. این دستگاه از جنس چوب بوده و دارای چهار بازو به شکل صلیب می‌باشد. دو بازوی این دستگاه فاقد هر گونه دیواره بوده و با ابعاد Cm ۱۰ × ۵۰ می‌باشد. ولی دو بازوی دیگر دارای دیواره هایی به رنگ تیره و با ابعاد cm ۴۰× ۱۰× ۵۰ در طرفین می‌باشد. ارتفاع این دستگاه از زمین ۵۰cm بوده و یک لامپ ۱۰۰ واتی نیز در ارتفاع ۱۲۰ سانتی‌متری در بالای محوطه دستگاه قرار می‌گیرد. نحوه قرار گرفتن حیوان در دستگاه طوری بود که در محوطه مرکزی و رو به یک بازوی باز باشد. در مدت ۵ دقیقه ای که حیوان آزادانه در دستگاه حرکت می‌کند، تعداد ورود به بازوهای باز و بسته و کل زمان گذارنده شده در بازوهای باز و بسته مورد اندازه گیری قرار می‌گیرند. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته هنگامی است که هر چهار پای حیوان در بازوی مورد نظر قرار گیرد. درصد زمان گذرانده شده در بازوهای باز و درصد ورود به بازوهای باز به‌عنوان اندکس‌های اضطراب استاندارد هستند و به‌صورت زیر محاسبه می‌شوند :

٪OAT[1]:(نسبت زمان گذرانده شده در بازوهای باز به کل زمان گذرانده شده در هر یک از بازوها)، ٪OAE[2]:(نسبت ورودها به بازوی باز به کل ورود به هر دو بازو × ۱۰۰)، کل ورودها به بازوها به‌عنوان یک اندکس نسبی از فعالیت حرکتی در نظر گرفته می‌شود(۱۶).

بافت شناسی و تجزیه و تحلیل آماری: جهت تأئید درستی جایگاه تزریق، حیوانات توسط کلروفرم کشته شده و سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون رنگ متیلن بلو از طریق کانول راهنما به داخل مغز تزریق می‌گردید. بعد از خارج کردن مغزها و فیکس نمودن آن‌ها در فرمالین ۱۰ درصد، پس از یک هفته، با انجام پروسه‌های بافتی صحت عمل کانول گذاری با استفاده از اطلس پاکسینوس واتسون مورد تأئید قرار می‌گرفت. در صورت عدم قرارگیری صحیح کانول‌ها در جایگاه مورد نظر اطلاعات مربوط به آن حیوان حذف می‌گردید، اما از آن‌جایی که در هر گروه ۳ حیوان علاوه بر تعداد ذکر شده (گروه‌های ۶ تایی) مورد جراحی قرار می‌گرفت، بنابراین در صورت عدم تأئید جایگاه تزریق، اختلالی در نتایج آزمایش به‌وجود نمی‌آمد. لازم به ذکر است که حدود ۹۹ درصد کانول‌ها دقیقاً در محل مورد نظر (CA_1) قرار گرفته بودند.

نمودارها با استفاده از نرم افزار sigma plat رسم شدند و داده‌های به‌دست آمده توسط نرم افزار spss و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک و دو طرفه ANOVA تجزیه و تحلیل گردیدند. به دنبال F-value معنی‌دار آنالیز(Post hoc (Tukey-test برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد $p < ۰/۰۵$ بین گروه های آزمایشی از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی گردید. این تحقیق توسط کمیته اخلاقی دانشگاه تربیت معلم تهران مورد تأئید قرار گرفت.



تصویر شماره ۱: برش بافتی جهت تأئید صحت کانول گذاری در ناحیه CA_1 هیپوکامپ

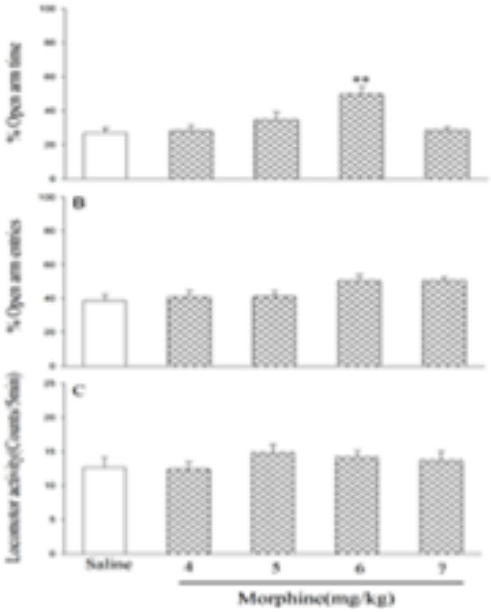
یافته‌ها

نمودار شماره ۱ نشان دهنده اثرات تزریق درون صفاقی مورفین بر رفتارهای شبه اضطرابی می‌باشد.

1. open arm time (OAT)
2. open arm entry (OAE)

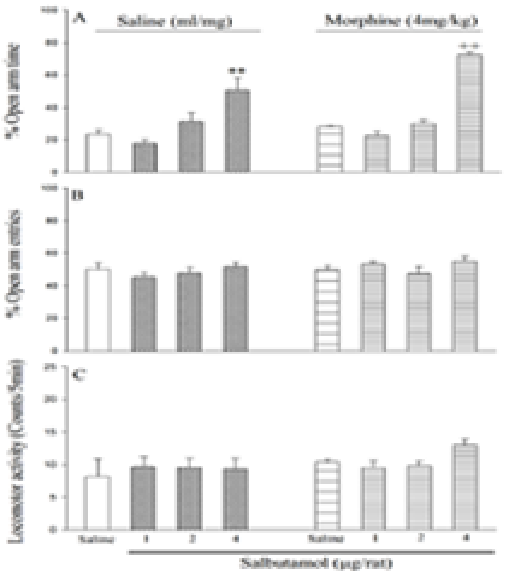
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

ANOVA یک طرفه تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف مورفین (4, 5, 6 and 7mg/kg) نشان دهنده تغییر در OAT% [p <۰/۰۱ و ۷/۰۹= (۴/۲۵) F] است. ولی تغییر معنی‌داری در OAE% [p >۰/۰۵ و ۳/۱۸= (۴/۲۵) F] و فعالیت حرکتی [p >۰/۰۵ . ۰/۷۱= (۴/۲۵) F] مشاهده نشد. آنالیز Post hoc نشان داد که تزریق درون صفاقی دوز 6mg/kg مورفین به صورت بارزی سبب افزایش OAT% می‌شود که دلالت بر اثر اضطراب‌زدایی مورفین دارد.



نمودار شماره ۱ : اثرات حاصل از تزریق درون صفاقی سالین و چهار دوز مورفین بر رفتارهای شبه اضطرابی. تفاوت با p <۰/۰۵ بین گروه های آزمایشی از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید. تفاوت های معنی دار: p <۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل سالین

نمودار شماره ۲ نشان دهنده اثرات تزریق دوزهای مختلف سالبوتامول درون هیپوکامپ پشتی و نیز تزریق توام آن با مورفین، بر روی رفتارهای شبه اضطرابی می‌باشد. ANOVA یک طرفه تزریق درون هیپوکامپی دوزهای مختلف سالبوتامول نشان دهنده تغییر در OAT% [<۰/۰۱ p و ۸/۸۰= (۳/۲۰) F] می‌باشد. اما تغییری در OAE% [p >۰/۰۵ و ۰/۷۸= (۳ /۲۰) F] و فعالیت حرکتی [p >۰/۰۵ و ۰/۱۳= (۳/۲۰) F] مشاهده نگردید. آنالیز Post hoc نشان داد که تزریق درون هیپوکامپی دوز 4μg/rat سالبوتامول به صورت بارزی سبب افزایش OAT% می‌شود، که دلالت بر اثر اضطراب‌زدایی سالبوتامول دارد. ANOVA دوطرفه همچنین بیان کننده تغییرات بارزی برای OAT% [p <۰/۰۵ و ۳/۵۷= (۳/۴۰) F] در میانکنش بین سالبوتامول و مورفین می‌باشد. در این مورد نیز تغییر معنی‌داری در OAE% [p >۰/۰۵ و ۰/۸۲= (۳/۴۰) F] و فعالیت حرکتی حیوان [p >۰/۰۵ . ۰/۷۳= (۳/۴۰) F] مشاهده نشد. آنالیز Post hoc نشان داد که تزریق درون هیپوکامپی دوز 4μg/rat سالبوتامول به همراه تزریق درون صفاقی دوز 4mg/kg مورفین به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش در OAT% می‌شود، که دلالت بر اثر سینرژیستی سالبوتامول و مورفین در کاهش اضطراب دارد.

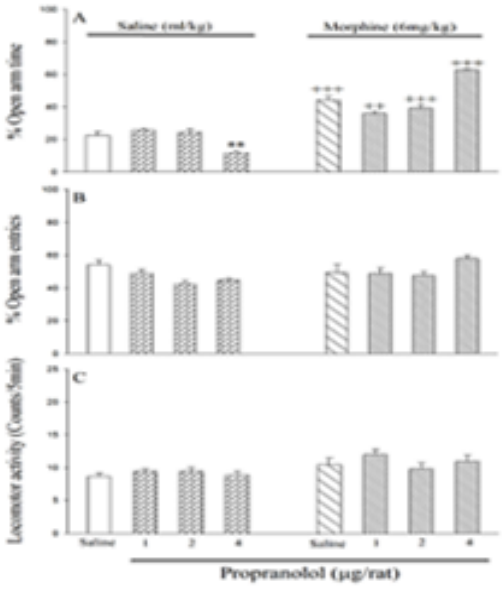


نمودار شماره ۲: اثرات تزریق دوزهای مختلف سالبوتامول درون هیپوکامپ پشتی و نیز تزریق توام آن با مورفین، بر روی رفتارهای شبه اضطرابی. تفاوت با p <۰/۰۵ بین گروه های آزمایشی در هر یک از نقاط به عنوان آمار معنی دار تلقی گردید. تفاوت های معنی دار: p <۰/۰۱ و p <۰/۰۱ (*در مقایسه با گروه کنترل سالین/سالین، + در مقایسه با گروه مربوط به خود در نمودار سمت چپ)

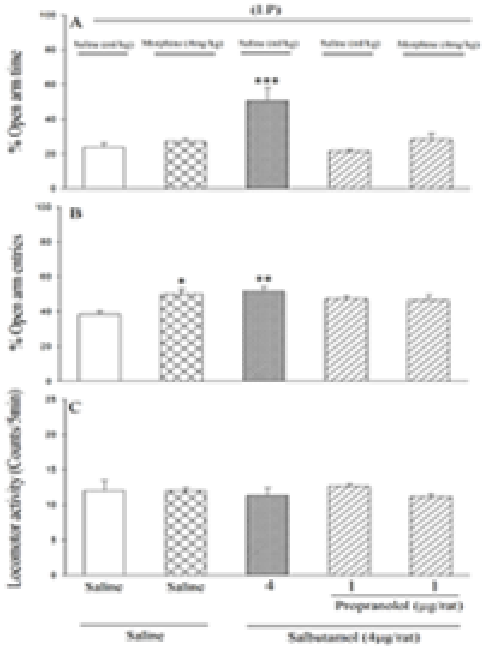
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

نمودار شماره ۳ اثرات تزریق دوزهای مختلف پروپرانولول بدرون هیپوکامپ پشتی و نیز تزریق توام آن با مورفین را بر روی رفتارهای شبه اضطرابی نشان می‌دهد. ANOVA یک طرفه نشان داد که تزریق دوزهای مختلف پروپرانولول سبب تغییر در OAT% [F (۳/۲۰) =۱۳/۹۱ و p <۰/۰۰۱] شد، اما تغییری در OAE% [F (۳/۲۰) =۵/۸۱ و p >۰/۰۵] و فعالیت حرکتی [F (۳/۲۰) =۱/۶۹ و p >۰/۰۵] مشاهده نگردید. آنالیز Post hoc نشان داد که تزریق درون هیپوکامپی دوز 4µg/rat پروپرانولول به صورت بارزی سبب کاهش OAT% می‌شود، که دلالت بر اثر اضطراب زایی پروپرانولول دارد. همچنین ANOVA دوطرفه نشان داد که تزریق دوز مؤثر مورفین به همراه تزریق درون هیپوکامپی پروپرانولول به صورت بارزی OAT% [F (۳/۴۰) =۵۲/۸۸ و p <۰/۰۰۱] را افزایش داد، که نشان دهنده معکوس شدن اثر اضطراب‌زایی پروپرانولول توسط مورفین می‌باشد. در این مورد نیز تغییر معنی‌داری در OAE% [F (۴۰ و۳) =۳/۵۲ و p <۰/۰۵] و فعالیت حرکتی [F (۴۰و۳) =۰/۸۸ و p >۰/۰۵] حیوان مشاهده نشد.

نمودار شماره ۴ نشان دهنده اثرات میانکنش بین تزریق دوز بی اثر مورفین (4mg/kg) و پروپرانولول (1µg/rat) به همراه دوز مؤثر سالبوتامول (4µg/rat)، بر روی اضطراب می‌باشد. در این مورد ANOVA یک طرفه نشان داد که تزریق درون هیپوکامپی دوز بی اثر پروپرانولول، پاسخ اضطراب زدایی سالبوتامول به همراه مورفین را در تست EPM بر می‌گرداند. در واقع پروپرانولول در این دوز به عنوان آنتاگونیست مانع بروز اثرات آگونیست می‌شود. برای OAT%، [p <۰/۰۰۱ و ۸/۹۵= و OAE% و OAE% و فعالیت حرکتی به ترتیب [p <۰/۰۱ و F(۴/۲۵) =۴/۳۸] و F (۴/۲۵) =۰/۴۸] p >۰/۰۵ به‌دست آمد.



نمودار شماره ۳: تزریق دوزهای مختلف پروپرانولول بدرون هیپوکامپ پشتی و نیز تزریق توام آن با مورفین بر روی رفتارهای شبه اضطرابی. تفاوت با p <۰/۰۵ بین گروه های آزمایشی در هر یک از نقاط به عنوان آمار معنی دار تلقی گردید. تفاوت های معنی دار: p <۰/۰۰۱ و p <۰/۰۱ (*در مقایسه با گروه کنترل سالین/سالین، + در مقایسه با گروه مربوط به خود در نمودار سمت چپ)



نمودار شماره ٤: اثرات میانکنش بین دوزهای بی اثر مورفین و پروپرانولول به همراه دوز موثر سالبوتامول بر رفتارهای شبه اضطرابی. تفاوت با p <۰/۰۵ بین گروه های آزمایشی از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید. تفاوت های معنی دار: p <۰/۰۰۱ *** و p <۰/۰۱ و p <۰/۰۵ * نسبت به گروه کنترل سالین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد در تزریق دوزهای مختلف مورفین حداکثر تأثیر در کاهش اضطراب در دوز(6mg/kg) مشاهده شد، ولیکن در دوز بیشتر (7mg/kg) میزان اثر دارو پایین آمد، که این حالت می‌تواند به علت درگیر شدن گیرنده‌های مختلف اوپیوئیدی باشد. نتایج مطالعه حاضر در توافق با سایر مطالعاتی هستند که یک اثر شبه اضطراب‌زدایی را در مورد مورفین به‌دنبال تزریق سیستمیک(۱۷)، درون بطنی(۱۸) و تزریق بدرون هیپوکامپ شکمی و نوکلئوس آکومبنس(۱۹) نشان دادند. مورفین از طریق گیرنده μ- اوپیوئیدی اثرات اضطراب‌زدایی خود را احتمالاً از طریق میانکنش با سیستم گابا انجام می‌دهد، به طوری که مورفین از طریق سرکوب ورودی‌های مهاری GABA روی نورون‌های دوپامینرژیک که از هسته VTA (Ventral tegmentum area) می‌آیند، این تأثیر را اعمال می‌نماید(۲۰). گیرنده‌های اوپیوئیدی در مسیرهای دوپامینرژیک در استریاتوم و هسته اکومبنس با تراکم بالایی یافت می‌شوند و در این نواحی ارتباط متقابلی بین سیستم اوپیوئیدی و دوپامینی وجود دارد. برای مثال تزریق درون بطنی آگونیست‌های گیرنده μ- اوپیوئیدی آزادسازی دوپامین را در مغز تسهیل می‌نمایند(۲۱). بنابراین احتمال دارد که بخشی از اثرات مورفین بر پاسخ‌های هیجانی با واسطه این نوروترانسمیتر میانجیگری شود.

نتایج نشان دادند که تزریق سالبوتامول بدرون هیپوکامپ پشتی سبب افزایش OAT% می‌گردد که نشان دهنده پاسخ اضطراب‌زدایی می‌باشد. این یافته‌ها در توافق با مطالعاتی هستند که بیان نموده اند آگونیست‌های تحریکی β_3- AR می‌توانند برای درمان اختلالات اضطرابی به‌کار روند(۲۲). همچنین مشخص شده است تزریق سیستمیک سالبوتامول باعث افزایش OAT% و OAE% می‌گردد. به‌علاوه مطالعات نشان داده‌اند زیر واحدهای مختلف β- ARs (β_1، β_2 و β_3) که جزء گیرنده‌های متصل به G پروتئین‌ها هستند، ممکن است اثرات مختلفی را در تنظیم اضطراب نشان دهند(۲۲،۲۳). رفتار شبه اضطراب‌زدایی سالبوتامول در دوز بالا ممکن است به دلیل کاهش فعالیت مکانیسم نورآدرنرژیک و یا به علت تغییر در آزادسازی نوروترانسمیترهای دخیل در اضطراب باشد. جهت بررسی میانکنش بین سیستم آدرنرژیک و اوپیوئیدرژیک در تعدیل اضطراب، دوزهای مختلف سالبوتامول به همراه دوز بی اثر مورفین، که به تنهایی سبب ایجاد پاسخ معنی‌داری نگردید، تزریق شد که نتیجه‌اش افزایش قابل توجهی در OAT% بود. یک احتمال می‌تواند این باشد که مکانیسم‌های نورآدرنرژیک در هیپوکامپ پشتی ممکن است در میانجیگری اثرات اضطراب‌زدایی ناشی از مورفین دخیل باشند. نتایج حاضر در توافق با مطالعاتی هستند که نشان داده‌اند، تزریق سیستمیک مورفین و بتا اندورفین می‌تواند آزادسازی نوراپی نفرین در کورتکس مغزی را مهار نماید و کاهش نوراپی‌نفرین سبب القای پاسخ ضد اضطرابی می‌گردد(۲۴). سیستم های اوپیوئیدی و نورآدرنرژیکی به صورت پیچیده‌ای با یکدیگر تقابل و تعامل دارند، برای مثال نشان داده شده است که اوپیوئیدها فعالیت نورآدرنرژیک را در هیپوکامپ(۲۵) کورتکس(۲۶) و لوکوس سرولئوس(۲۷) موش بزرگ آزمایشگاهی مهار می‌کنند، که این مهار توسط آنتاگونیست‌های اوپیوئیدی معکوس می‌گردد. بنابراین تزریق آگونیست β_2-AR با کاهش فعالیت سیستم آدرنرژیکی در مغز و تزریق مورفین با کاهش در آزادسازی نوراپی نفرین، به صورت سینرژیستی سبب کاهش بیشتر اضطراب در مقایسه با زمانی می‌شود که این داروها به تنهایی تزریق می‌گردند.

در مطالعه حاضر تزریق درون هیپوکامپی پروپرانولول باعث افزایش اضطراب در تست EPM گردید. نتایج آزمایش‌های فارماکولوژیکی شامل به‌کارگیری آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های مختلف

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

گیرنده‌های آدرنرژیک در مدل‌های حیوانی اضطراب متناقض است که ممکن است به‌دلیل میانکنش با سایر گیرنده‌های مونوآمینی باشد(۲۸). به عنوان مثال یوهمبین، آنتاگونیست گیرنده α_2-آدرنرژیک، که آزادسازی نوراپی نفرین را در مغز افزایش می‌دهد، تأثیر اضطراب زایی در رت‌ها داشته است(۲۹). مطالعات نشان داده اند که آنتاگونیست‌های انتخابی β_2- AR به نظر می‌رسد که در درمان اضطراب حاد بی اثر بوده اما در اضطراب‌های مزمن مؤثر می‌باشند که بستگی به میزان اضطراب و آزادسازی نوراپی نفرین دارد(۳۰) نشان داده شده که پروپرانولول باعث تعدیل رهایش گابا در مسیر پروجکشن‌های گاباارژیکی هیپوکامپ به سپتوم می‌گردد و از این طریق سبب افزایش ورودی‌های تحریکی از سپتوم به هیپوکامپ شده و خود سپتوم هم آزادسازی استیل کولین به عنوان نوروترانسمیتر دخیل در اضطراب، را به هیپوکامپ تسهیل کرده و سبب القا رفتارهای اضطراب‌زایی می‌گردد. همچنین بیان شده است که تزریق دوزهای پایین پروپرانولول باعث اثرات اضطراب زدایی می‌شود(۳۱). شایان ذکر است که نوع تست (EPM)، محل تزریق(CA_1) و نیز دوزهای مورد استفاده‌ی پروپرانولول در این تحقیق متفاوت ازتحقیقات قبلی می‌باشد. تزریق دوز موثر مورفین اثر اضطراب زایی القا شده بوسیله پروپرانولول را به‌صورت معنی‌داری برگرداند. لوکوس سرولئوس (locus ceruleus(LC) یکی از بزرگ‌ترین هسته‌های نورآدرنرژیک مغزی و غنی از گیرنده‌های اوپیوئیدی و گیرنده‌های α_2-آدرنرژیک پیش سیناپسی متصل به G پروتئین مهاری (G_i) می‌باشد(۳۲). هنگامی‌که مورفین به‌صورت حاد تزریق می‌گردد منجر به مهار نورون‌های LC و فعال نمودن α_2- AR می‌گردد، که نتیجه آن کاهش بیشتر در آزادسازی نوراپی نفرین به هیپوکامپ و القای رفتار اضطراب زدایی می‌باشد(۲۷). پاسخ اضطراب زدایی دوز موثر مورفین تا اندازه ای قوی می‌باشد که مانع از بروز رفتار اضطراب زایی پروپرانولول می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند هنگامی که مورفین به صورت مداوم تزریق می‌گردد، سبب تغییرات سازشی در گیرنده‌های آدرنرژیک پس و پیش سیناپسی می‌شود، ولی با قطع مصرف مورفین تحریک پذیری نورون‌های LC افزایش یافته، بنابراین سبب افزایش فعالیت وآزادسازی نوراپی نفرین و به دنبال آن باعث بروز اضطراب می‌گردد. گیرنده‌های μ-اوپیوئیدی همچنین از طریق ارتباط با دندریت نورون‌های حاوی آنزیم سنتز کننده اپی نفرین یعنی فنیل اتانول آمین N- متیل ترانسفراز (PNMT) می‌توانند میزان فعالیت این نورون‌ها راتنظیم نماید و این موضوع پیشنهاد می‌کند که گیرنده اوپیوئیدی می‌تواند میزان فعالیت این نورون‌ها را تنظیم نماید. هنگامی‌که آگونیست گیرنده μ بصورت گلوکوکورونیک تزریق می‌شود، می‌تواند سبب ایجاد یک سری تغییرات سازشی در نورون‌های نورآدرنرژیک واقع در لوکوس سرو لئوس شود. لذا اینترنالیزه شدن رسپتورهای μ از طریق تزریق مزمن آگونیست رسپتور μ، Endorphine، سبب ایجاد تغییرات سازشی می‌گردد(۳۳). مطالعات قبلی اثر مورفین را به تنهایی بر اضطراب مورد بررسی قرار داده‌اند، اما در مطالعه حاضر ما به بررسی میانکنش مورفین با سیستم آدرنرژیک پرداخته و نتایج حاصل بیان نمودند که سیستم اوپیوئیدرژیک با سیستم آدرنرژیک ناحیه CA_1 هیپوکامپ برهمکنش داشته و سبب کاهش رفتار اضطرابی می‌گردد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر تحریک گیرنده اوپیوئیدی توسط مورفین به نظر می‌رسد با تحت تاثیر قرار دادن فعالیت گیرنده‌های β-آدرنرژیک سبب مهار اضطراب می‌گردد.

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که سیستم آدرنرژیک دستگاه لیمبیک در ناحیه CA_1 هیپوکامپ با سیستم اوپیوئیدرژیک جهت تعدیل رفتارهای شبه اضطرابی برهمکنش دارند. تزریق مورفین به‌صورت سیستمیک احتمالاً با تعدیل در عملکردهای نورون‌های نورآدرنرژیک هیپوکامپ پشتی سبب تغییر در اثرات سیستم β-آدرنرژیک بر روی اضطراب می‌گردد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

References

1. Nutt DJ. Neurobiological in generalized anxiety disorder. Journal Clin Psychiatry 2001; 62(11): 22-27.
2. Enjin E, Treit A. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. Behavioural pharmacology 2007; 18: 365-374.
3. Ferreira M, Valen ZF, Morat GS. Role of nitric oxide dependent pathways in ethanol–induced anxiolytic effects in rat. Alchol clin EXP Research 1999; 23: 898-904.
4. Philips RG, LeDoux JE. Differential contributions of amygdala and hippocampus to cured and contextual fear conditioning. Behaviour Neuroscience 1992; 106: 274-285.
5. Dennis S, Charney J, Bremner D, Eugene Redmond Jr D. Noradrenergic Neural Substrates for Anxiety and Fear: Clinical Associations Based on Preclinical Research Neuropsychopharmacology: the Fifth Generation of Progress. 2000
6. Brunello N, Blier P, Judd LL, Mendlewicz J, Nelson CJ, Souery D, et al. Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. Int. Clin. Psychopharmacol 2003; 18: 191-202
7. Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS .Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. Synapse 1996; 23: 28–38.
8. Loy R, Koziell DA, Lindsey JD, Moore RY. Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. J. Comp. Neurol 1980; 189: 699-710.
9. Bergles DE, Doze VA, Madison DV, Smtth SJ. Excitatory actions of norepinephrine on multiple classes of hippocampal CA1 interneurons. J. Neurosci 1996; 16: 572-585.
10. Madison DV, Nicooll RA. Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA_1 pyramidal neurones, in vitro. J. Physiol. Lond. 1986; 372: 221-244.
11. Herz A, Akil H, Simon EJ. The Opioids. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 104/11. Berlin: Springer-Verlag: 1992.
12. Zarrindast MR, Rostami P, Zarei M, Roohbakhsh A. Intracerebroventricular effects of histaminergic agents on morphine-induced anxiolysis in the elevated plus-maze in rats. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 2005; 97, 276–281
13. Tsuda M, Suzuki T, Misawa M, Nagase H. Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. Eur J Pharmacol 1996; 307: 7–14.
14. LeMerrer J, Cagniard B, Cazala P. Modulation of anxiety by opioid receptors of the lateral septal region in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior 2006; 83: 465–479.
15. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. San Diego, CA: Academic Press;(2007).
16. Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. Pharmacol Biochem Behav 1995; 52: 297–303.
17. Koks S, Soosaar A, Voikar V, Bourin M, Vasar E. BOC-CCK-4, CCK (B) receptor agonist, antagonizes anxiolytic-like action of morphine in elevated plus-maze. Neuropeptides 1999; 33: 63–9.
18. Kahveci N, Gulec G, Ozluk K. Effects of intracerebroventricularly injected morphine on anxiety, memory retrieval and locomotor activity in rats: involvement of vasopressinergic system and nitric oxide pathway. Pharmacol Biochem Behav 2006; 85: 859–67.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]

19. Zarrindast MR, Babapoor-Farrokhran S, Rezayof A. Involvement of opioidergic system of the ventral hippocampus, the nucleus accumbens or the central amygdala in anxiety-related behavior. Life Sci 2008; 82: 1175–81.
20. Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. J Neurosci 1992; 12: 483–8.
21. Kabuto H, Yokoi I, Iwaya K, Mori A. Monoamine release in the rat striatum is induced by delta-guanidinovaleric acid and inhibited by GABA agonists. Life Sci 1995; 56: 1741–8.
22. Stemmelin J, Cohen C, Terranova JP, Lopez-Grancha M, Pichat P, Bergis O, et al. Stimulation of the beta(3)-adrenoceptor as a novel treatment strategy for anxiety and depressive disorders. Neuropsychopharmacology 2008; 33: 574–587
23. Pandey SC, Zhang H, Roy A, Xu T. Deficits in amygdaloid cAMP responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. J. Clin. Invest 2005; 115: 2762–2773.
24. Arbilla S, Langer SZ. Morphine and beta-endorphin inhibit release of noradrenaline from cerebral cortex but not of dopamine from rat striatum. Nature 1978; 271: 559–561.
25. Matsumoto M, Yoshioka M, Togashi H. μ-opioid receptors modulate noradrenaline release from the rat hippocampus as measured by brain microdialysis. Brain, 1994; 636: 7-8.
26. Tglesios V, Alguacil LF, Alamo C, Cuenca E. Effects of yohimbine on morphine analgesia and physical dependence in the rat. Eur. J. Pharmacol 1992; 211: 35-38.
27. Sklair tavron L, Nestler EJ, Segal M. Locus coeruleus (LC) target interaction and cAMP in control of LC development. Brain Res. Bull. 1994; 35: 397-401.
28. Ohno M, Kobayashi M, Kishi A, Watanabe S. Working memory failure by combined blockade of muscarinic and beta-adrenergic transmission in the rat hippocampus. Neuroreport 1997; 8: 1571–1575.
29. Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. Eur. J. Pharmacol. 2000; 405: 397–406.
30. Cooper SJ, Kelly CB, McGilloway S, Gilliland A. Beta 2-adrenoceptor antagonism in anxiety. Eur. Neuropsychopharmacol. 1990; 1: 75–77
31. Jie Zhang, Jing He, Yan Mei Chen, Jian Hong Wang, Yuan Ye Ma. Morphine and propranolol co-administration impair consolidation of Y-maze spatial recognition memory. Brain research 2008; 1230: 150-157.
32. Gibbs ME, Hutchinson DS, Summersb RJ. Noradrenaline release in the locus coeruleus modulates memory formation and consolidation; Roles for α- And β- adrenergic receptors. Neuroscience 2010; 170: 1209–1222.
33. Rudoy CA, Van Bockstaele EJ. Betaxolol, a selective β1-adrenergic receptor antagonist, diminishes anxiety-like behavior during early withdrawal from chronic cocaine administration in rats. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2007; 31: 1119–1129.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-11-23]