مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۹، دوره ۲۲، صفحه ۱۶-۹

نقش پروتئین های P-CREB و c-Fos ناحیه آمیگدال قاعده ای جانبی در اثرات اضطراب زایی نیکوتین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی

محمدرضا زرین دست (PhD)[۱]، آمنه رضایوف (PhD)[۲]، موسی صاحبقرانی (PhD)[۱]، سید محمد توانگر (MD)[۳]، آمنه امیدی (PhD)[۴]، حمیده بشیری (PhD)[۵و۶*]

۱-گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲-بخش علوم جانوری، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳-گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴-گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵-مرکز تحقیقات علوم اعصاب، انستیتو نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۶- دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سیرجان، سیرجان، ایران

دریافت: ۹۷/۱۰/۱۶، اصلاح: ۹۸/۲/۳۱، پذیرش: ۹۸/۴/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: نیکوتین از شایع‌ترین مواد اعتیادآور است که اثرات زیادی بر سیستم عصبی مرکزی از جمله اضطراب‌زایی وابسته به دوز دارد، که به‌واسطه پروتئین‌های مختلفی انجام می‌شود. با توجه به مشخص نبودن مکانیسم و پروتئین‌های درگیر در اضطراب‌زایی نیکوتین، هدف از این مطالعه بررسی نقش پروتئین های P-CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) و c-Fos آمیگدال قاعده‌ای-جانبی (BLA) بر رفتارهای شبه‌اضطرابی ناشی از نیکوتین می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار به سه گروه ۷ تایی (سالین، نیکوتین ۰/۳ و ۰/۷ mg/kg، داخل صفاقی) در آزمایش رفتاری و چهار گروه ۳تایی (کنترل (بدون تزریق و آزمون)، سالین، نیکوتین ۰/۳و ۰/۷ mg/kg) در آزمایش ایمونوهیستوشیمی تقسیم شدند. رفتارهای شبه‌اضطرابی با پارامترهای درصد مدت حضور در بازوی باز (%OAT: Open Arm Time)، تعداد ورود به بازوی باز (%OAE: Open Arm Entry) و فعالیت حرکتی در دستگاه ماز به‌علاوه مرتفع ارزیابی شد. همچنین تغییر بیان پروتئین‌های P-CREB و c-Fos در ناحیه BLA با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی بررسی گردید.

یافته ها: تجویز داخل صفاقی نیکوتین ۰/۷ mg/kg سبب کاهش %OAT (۵/۴±۰/۴۲) و %OAE (۲۹/۴±۰/۶۱) نسبت به سالین (۱۵/۲±۰/۸۲) و (۴۲/۱±۰/۴۵) شد (به‌ترتیب p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۱). به علاوه، در بیان پروتئین‌های P-CREB و c-Fos در ناحیه BLA بین گروه‌های درمانی تفاوت معنی‌داری وجود داشت (p< ۰/۰۵، H(3)=۶/۹۹) و (p<۰/۰۱، H(3)=۱۳/۱۱). بیان پروتئین P-CREB در ناحیه BLA حیوانات گروه کنترل نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بود. بیان پروتئین c-Fos در BLA گروه کنترل، نیکوتین ۰/۳ mg/kg و ۰/۷ نسبت به گروه سالین کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۱).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که مصرف سیستمیک نیکوتین در دوز بالا رفتارهای شبه‌اضطرابی ایجاد می‌کند. هم‌چنین بیان پروتئین P-CREB و c-Fos در گروه‌های درمانی نسبت به سالین به‌ترتیب بدون تغییر و کاهش‌یافته بود.

واژه های کلیدی: نیکوتین، اضطراب، هسته آمیگدال قاعده‌ای-جانبی، ایمونوهیستوشیمی.

مقدمه

در طی سال‌های اخیر سوء مصرف مواد بسیار افزایش یافته است. در این میان نیکوتین از اصلی‌ترین مواد اعتیادآور است که از طریق دود سیگار دریافت می‌شود و عوارض متعددی بر روی سیستم‌های مختلف بدن از جمله سیستم عصبی مرکزی دارد. از جمله این عوارض می‌توان به اضطراب‌زایی وابسته به دوز ناشی از مصرف نیکوتین اشاره کرد (۱). از دیدگاه فیزیولوژیک، اضطراب واکنش پیچیده‌ای است که به‌دنبال پیامدهای بیوشیمیایی و اندوکرینی مختلف ایجاد می‌شود (۲). از مهم‌ترین آنها می‌توان به افزایش قابل توجه در آزادسازی نوراپی‌نفرین در مناطق مختلف مغزی از جمله آمیگدال اشاره کرد (۳). آمیگدال یکی از اجزاء اصلی سیستم لیمبیک بوده و نقش بسیار مهمی در نوروبیولوژی اضطراب ایفا می‌کند و با مراکز هیجانی زیادی در مغز در ارتباط است (۴). سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلفی در آمیگدال، رفتارهای شبه اضطرابی را تعدیل می‌نمایند (۵). در میان این نوروترانسمیترها، نوراپی نفرین نقش مهمی را در تعدیل اضطراب در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد (۶). نوراپی نفرین با اتصال به گیرنده‌های آدرنرژیک سبب آغاز آبشاری از رخدادهای داخل سلولی می‌شود که به موجب آن فسفریلاسیون

این مقاله حاصل پایان نامه حمیده بشیری دانشجو رشته دکترای تخصصی فارماکولوژی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۲۵۱ دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر حمیده بشیری
آدرس: کرمان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، مرکز تحقیقات علوم اعصاب. تلفن: ۳۳۲۵۷۵۸۱-۰۳۴
E-mail: bashiry_h@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.2.4]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.9]

(cAMP Response Element-Binding Protein) انجام می‌گیرد، CREB فسفریله شده با اتصال به محل خاص خود سبب افزایش رونویسی از برخی ژن‌های دخیل در فرآیند اضطراب از جمله ژن fos و افزایش بیان c-Fos در نواحی مختلف مغز از جمله هسته قاعده‌ای-جانبی آمیگدال (BLA: Basolateral Amygdala) می‌شود که نقش مهمی در اضطراب دارد (۸ و۷). مطالعات نشان داده‌اند که تجویز سیستمیک نیکوتین در مقادیر خاص، اضطراب را در انواع مختلف مدل‌های رفتاری نظیر ماز به‌علاوه مرتفع (EPM: Elevated Plus Maze) افزایش می‌دهد. همچنین مشخص شده است که نیکوتین از طریق برهم‌کنش با بسیاری از سیستم‌های نوروترانسمیتری در جایگاه‌های مختلف مغزی، اثرات اضطراب‌زایی القا می‌کند (۹).

علیرغم مطالعات مختلف، اطلاعات کمی در رابطه با مکانیسم‌های عملکرد نیکوتین بر فعالیت نورونی آمیگدال در شرایط in vivo وجود دارد. به علاوه مسیرهایی که از طریق آن نیکوتین اثرات اضطراب زایی و ضد اضطرابی اعمال می کند به خوبی مشخص نشده است. انجام مطالعات پایه در این زمینه و آگاهی هرچه بیشتر از مکانیسم‌های عمل در مغز می‌تواند به درک ما از علت و درمان اختلالات اضطرابی کمک کند و راه‌گشای مطالعات آینده جهت کاهش اثرات مضر استعمال سیگار بر اضطراب باشد. فهم عمل آبشارهای مولکولی درگیر پس از تیمار با نیکوتین از مهمترین فاکتورها در درک مسیرهای اضطراب‌زایی است و از این طریق می‌توان با کمک داروهای موثر از اثرات سوء ناشی از مصرف آن‌ها، در موارد درمانی و رفع اعتیاد استفاده کرد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش پروتئین های c-Fos و P-CREB در ناحیه BLA بر رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از نیکوتین با استفاده از روش EPM می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق IR.TUMS. REC. 1392. 51 بر روی ۲۴ سر موش بزرگ آزمایشگاهی جنس نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد دمایی (۲± ۲۲ درجه سانتی‌گراد) و نوری (سیکل ۱۲ ساعته تاریکی و روشنایی) و با امکان دسترسی کافی به آب و غذا به‌صورت چهارتایی در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. حیوانات پنج روز قبل از انجام آزمایشات و در هر روز دو بار به مدت پنج دقیقه با دست جابه‌جا شدند تا استرس آن‌ها کاهش یابد. تمامی آزمایشات در محدوده ساعت نه صبح تا سه بعد از ظهر انجام گرفت. به منظور انجام آزمایشات رفتاری سه گروه حیوان (سالین، نیکوتین ۰/۳ و ۰/۷ mg/kg داخل صفاقی) استفاده شد که هر گروه آزمایشگاهی شامل ۷ سر حیوان بود و هر حیوان یک بار برای انجام آزمایش، مورد استفاده قرار می‌گرفت و به منظور انجام مطالعات ایمونوهیستوشیمی چهار گروه حیوان (کنترل (بدون تزریق و آزمون)، سالین، نیکوتین ۰/۳ و ۰/۷ mg/kg) که در هر گروه ۳ سر بود استفاده شد.

داروها: نیکوتین (Sigma, USA) در سالین حل شده و به کمک محلول هیدروکسید سدیم یک دهم و یک صدم نرمال، PH آن درمحدوده ۷/۴-۷/۲ تنظیم شد. این دارو به‌صورت داخل صفاقی به میزان ml/kg ۱ و در دوزهای mg/kg ۰/۳ و ۰/۷ به حیوانات تزریق شد. تزریق سالین به عنوان گروه کنترل با میزان ml/kg ۱ انجام شد. انتخاب دوزها بر اساس تحقیقات قبلی انجام شد (۱۰).

دستگاه ماز به‌علاوه مرتفع (EPM): روش های مختلفی برای سنجش اضطراب در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد (۱۱) که از این میان EPM از بهترین روش‌ها برای بررسی اثر مواد بر میزان اضطراب در حیوانات آزمایشگاهی است. EPM از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت به‌علاوه (+) است. ابعاد بازوهای باز و بسته ۵۰×۱۰ سانتی‌متر بوده و در دو طرف و انتهای راهرو بسته، دیواره‌ای به بلندی ۴۰ سانتی‌متر وجود دارد. در دو طرف و انتهای راهروی باز لبه‌ای به ارتفاع ۰/۵ cm از جنس شیشه نصب شده است (۱۲). چهار راهرو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متر منتهی می‌شوند. ماز به‌وسیله پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار می‌گیرد. موش درون محدوده مرکزی ماز و رو به یک بازوی باز قرار داده می‌شود. نور مناسب به‌وسیله یک لامپ ۶۰ واتی که در بالای مرکز ماز قرار دارد، تامین می‌شود (۱۳).

آزمون رفتاری: حیوان در این مرحله یک ساعت در اتاق آزمایش جهت آشنایی ماند. سپس هر حیوان ۳۰ دقیقه پس از تزریق نیکوتین یا سالین داخل صفاقی، به‌آرامی در مرکز ماز و رو به بازوی باز قرار گرفت. در مدت ۵ دقیقه تعداد دفعات ورود و مدت زمان حضور در بازوی باز و بسته و فعالیت حرکتی که نشان‌دهنده مجموع تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و بسته است، اندازه‌گیری شد. سپس درصد ورود به بازوی باز (%OAE: % Open arm entry) که معادل تعداد دفعات ورود به بازوی باز بر مجموع تعداد ورود به بازوها ضرب‌در ۱۰۰ است و همچنین درصد زمان ماندن در بازوی باز (%OAT: % Open arm time) که معادل مدت زمان حضور در بازوی باز بر مجموع مدت زمان حضور در دو بازو ضرب در ۱۰۰ است، محاسبه شد. افزایش معنی‌دار این دو پارامتر نشان‌دهنده کاهش اضطراب در این آزمون است. همه بخش‌های آزمایش به‌وسیله یک دوربین که در فاصله ۲/۸ متری از سطح زمین و درست در بالای مرکز ماز قرار داشت و به یک کامپیوتر متصل بود، ثبت شد (۱۴).

آماده سازی بافتی و ایمونوهیستوشیمی: برای بررسی میزان بیان پروتئین های P-CREB و c-Fos از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. بعد از بیهوشی، پرفیوژن داخل قلبی با استفاده از بافر فسفات سالین (PBS) و در ادامه پارافرمالدهید ۴٪ (PFA: Sigma, USA) در ۰/۱ mol/L از PBS با pH=۷/۴ برای حیوانات انجام شد. سپس مغزها برداشته شدند، به مدت یک شب در پارافرمالدهید ۴٪ قرارگرفتند و با PBS شسته شدند، برش‌های بافتی فیکس‌شده در پارافرمالدهید و پارافین تهیه شد، بافت ها با الکل دهیدراته و در پارافین غوطه ور شدند. سپس طبق اطلس پاکسینوس و واتسون (Paxinos and Watson) (۱۰) برش هایی به ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم تهیه شد. برش‌ها بر روی لام های شارژ مثبت یا پلی ال لیزین دار منتقل، دپارافینه و رهیدراته شدند.

جهت بازیافت آنتی ژنی از بافر سیترات برای پروتئین P-CREB با PH= ۹ و برای c-fos با PH= ۶/۸ استفاده شد و لام ها ۵ دقیقه در دمای بالا در مایکروویو قرار داده شدند. آنزیم پراکسیداز داخلی به وسیله انکوبه‌کردن برش‌ها در محلول H2O2 ۳٪ در متانول در دمای اتاق انکوبه شد. از پروتئین بلاکینگ برای P-CREB مدت ۱۵ دقیقه و برای c-fos در ابتدا proteinase K ۵ دقیقه و سپس پروتئین بلاکینگ مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. آنتی‌بادی‌های anti-c-Fos (Abcam, ab7963, USA) و anti-P-CREB (Abcam, ab32096, USA) به میزان یک به پنجاه رقیق و بر روی بافت‌ها ریخته شد. اسلایدها در PBS شسته و محلول detection (envision-TM+Rb) بر

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.2.4]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.9]

روی بافت ها اضافه شد و مقدار مورد نیاز محلول دی آمینوبنزیدین(DAB) بر روی بافت ریخته شد. سپس بافت‌ها با درجات مختلف الکل دهیدراته و مونت (mount) شده و سلول‌های بیان کننده پروتئین ها با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شدند. میزان بیان پروتئین‌ها به صورت نمره از ۳–۰ درجه‌بندی شد. به این صورت که بیان پروتئین زیر ۵٪ نمره صفر، ۳۶٪–۵٪ نمره ۱، ۳۷٪–۶۸٪ نمره ۲ و ۶۹٪–۱۰۰٪ نمره ۳ را به خود اختصاص داده اند (۱۵).

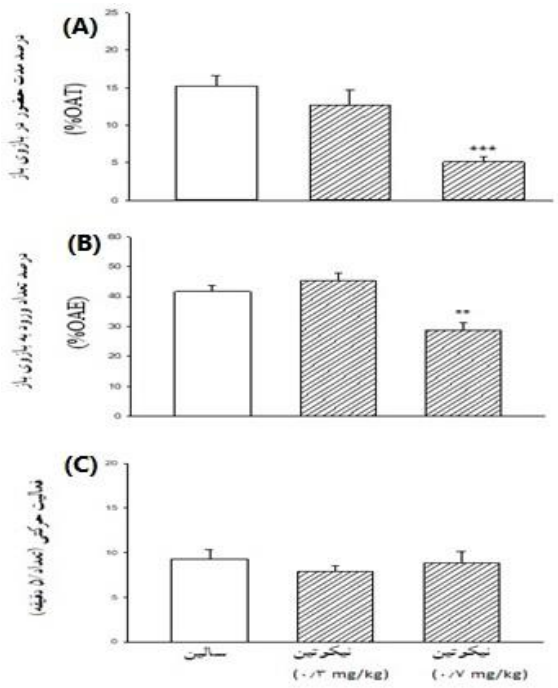
آنالیز آماری: آنالیز داده‌های آزمایشات رفتاری در صورت نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه انجام شد. به دنبال معنی‌دار بودن نتایج، آنالیز مکمل با استفاده از آزمون توکی برای بررسی مقایسه معنی‌دار بودن تک تک گروه‌ها با گروه کنترل انجام شد. همه ارزیابی‌ها به صورت Mean±SEM بیان شدند. آنالیز داده‌های ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آزمون غیر پارامتریک کروسکال–والیس انجام شد. به دنبال معنی‌دار بودن، آنالیز Mann-Whitney U برای بررسی معنی‌دار بودن تک‌تک گروه‌ها با گروه کنترل انجام شد. محاسبات آماری داده‌های حاصل از آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Sigmaplot و Graphpad prism صورت گرفت و $p< ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

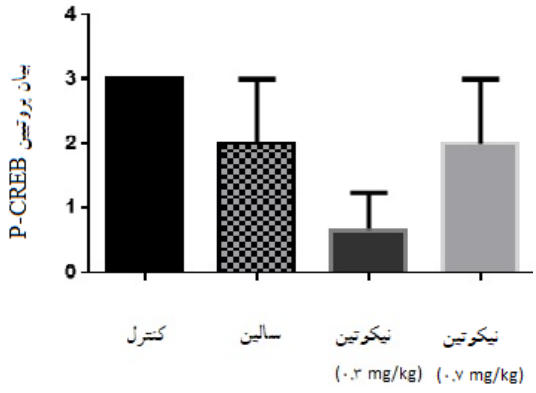
یافته‌های آزمایش رفتاری: تفاوت معنی‌دار بین گروه های سالین ۱mg/kg و مقادیر مختلف نیکوتین ۰/۳ mg/kg و ۰/۷ در %OAT [$F(۲/۱۸)= ۱۳/۶۹ ,p<۰/۰۰۱$] و %OAE [$F(۲/۱۸) =۱۳/۴۱ ,p<۰/۰۰۱$] دیده شد (نمودار ۱، A و B)، اما در فعالیت حرکتی وجود نداشت [$F(۲/۱۸) =۰/۵۱ ,p>۰/۰۵$] (نمودار ۱، C). تجویز داخل صفاقی نیکوتین ۰/۷ mg/kg سبب کاهش %OAT (۵/۴±۰/۴۲) و %OAE (۲۹/۴±۰/۶۱) نسبت به سالین (۱۵/۲±۰/۸۲) و (۴۲/۱±۰/۴۵) شد که نشان‌دهنده اثر شبه اضطرابی است (به‌ترتیب $p<۰/۰۰۱$ و $p<۰/۰۱$) (نمودار ۱، A و B).

یافته‌های ایمونوهیستوشیمی P-CREB: تفاوت معنی‌داری در بیان پروتئین P-CREB در ناحیه BLA بین گروه‌های مورد آزمایش مشاهده شد [$H(3)=۶/۹۹ ,p<۰/۰۵$] بیان پروتئین P-CREB در ناحیه BLA حیوانات کنترل (نمره ۳) بالاتر از سایر گروه‌ها بود. نیکوتین ۰/۳ mg/kg میزان بیان پروتئین P-CREB را در ناحیه BLA به‌طور غیرمعنی‌دار کاهش داد (نمره<۱) (نمودار ۲). تصویر بافت‌شناسی ناحیه BLA نشان داده شده است (شکل ۱). تصاویر ایمونوهیستوشیمی بیان پروتئین P-CREB در ناحیه BLA در گروه‌های کنترل، سالین، نیکوتین ۰/۳و۰/۷ mg/kg دیده شود (شکل ۲، به ترتیب A، B، C، D).

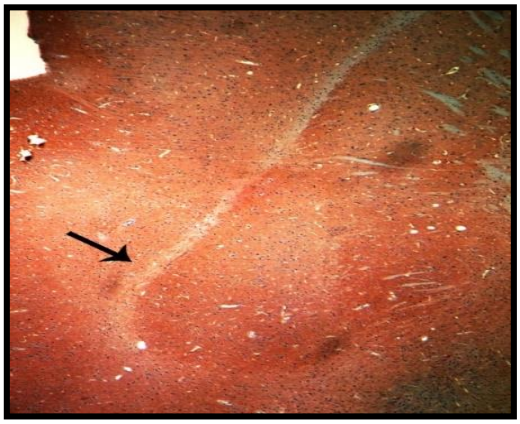
یافته‌های ایمونوهیستوشیمی c-Fos: تفاوت معنی‌داری در بیان پروتئین c-Fos در ناحیه BLA گروه‌های مورد آزمایش مشاهده شد [$H(3)=۱۳/۱۱ ,p<۰/۰۱$] بیان پروتئین c-Fos در ناحیه BLA حیوانات کنترل، نیکوتین ۰/۳و۰/۷ mg/kg (نمره<۱) نسبت به گروه سالین (نمره ۳) به طور معنی‌داری کمتر بود ($p<۰/۰۱$) (نمودار ۳). تصاویر ایمونوهیستوشیمی بیان پروتئین c-Fos در ناحیه BLA در گروه‌های کنترل، سالین، نیکوتین ۰/۳و۰/۷ mg/kg دیده شد (شکل ۳، به ترتیب A، B، C، D).



نمودار ۱. اثر تجویز داخل صفاقی نیکوتین بر رفتار شبه اضطرابی حیوانات در دستگاه EPM (p < 0.01), ***(p < 0.001)** در مقایسه با گروه سالین**

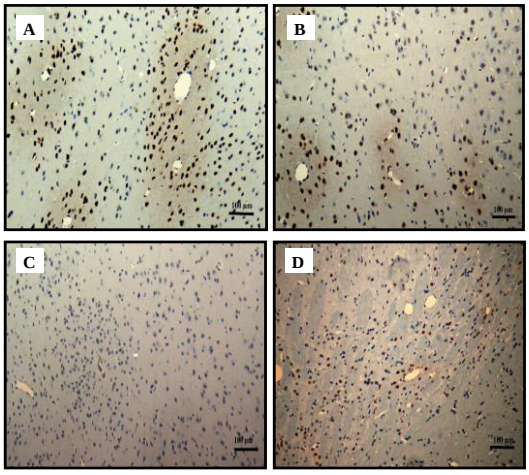


نمودار ۲. مقایسه بیان پروتئین P-CREB در BLA. گروه های آزمایش

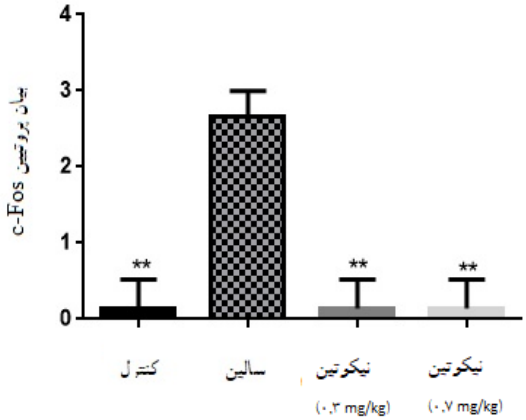


شکل ۱. تصویر بافت شناسی ناحیه BLA که با فلش مشخص شده است.

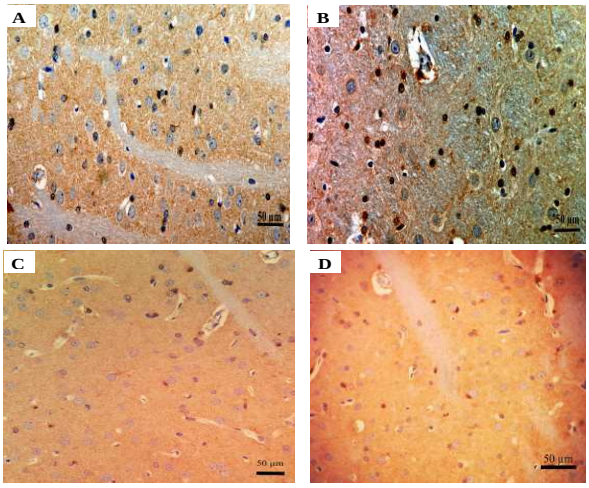
[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.2.4]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.9]



شکل ۲. تصاویر ایمونوهیستوشیمی بیان پروتئین P-CREB در BLA. (تصاویرA، B، C و D به ترتیب گروه‌های کنترل، سالین، نیکوتین ۰/۳ mg/kg و نیکوتین ۰/۷ mg/kg)



نمودار ۳. مقایسه بیان پروتئین c-Fos در BLA. گروه های آزمایش (p<۰/۰۱) در مقایسه با گروه سالین**



شکل ۳. تصاویر ایمونوهیستوشیمی بیان پروتئین c-Fos در BLA. (تصاویرA، B، C و D به ترتیب گروه‌های کنترل، سالین، نیکوتین ۰/۳ mg/kg و نیکوتین ۰/۷ mg/kg)

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق کاهش %OAT و %OAE به دنبال مصرف سیستمیک نیکوتین در دوز ۰/۷mg/kg در دستگاه EPM بدون اثر بر فعالیت حرکتی مشاهده شد، که نشان‌دهنده اثر اضطراب‌زایی نیکوتین است. مطالعات قبلی نیز تاییدکننده اثر شبه اضطرابی نیکوتین به دنبال تجویز سیستمیک (۱۶) و تزریق به داخل آمیگدال مرکزی (۱۸و۱۷) با استفاده از دستگاه EPM بوده است. در مقابل، برخی مطالعات اثرات اضطراب‌زدایی القا شده توسط نیکوتین را در مدل‌های حیوانی اضطراب گزارش کرده‌اند (۲۰و۱۹). دوز نیکوتین، روش تجویز، مدل حیوانی مورد استفاده و نژاد و گونه حیوان ممکن است در پاسخ‌های رفتاری گوناگون دارو موثر باشد. از یافته‌های مهم دیگر حاصل از مطالعه سطح بالاتر P-CREB در حیوانات کنترل نسبت به سایر گروه‌ها بود. علاوه براین، تجویز سیستمیک نیکوتین در دوز ۰/۳ mg/kg بیان پروتئین P-CREB را در ناحیه BLA کاهش، در حالی‌که دوز ۰/۷mg/kg نیکوتین آن را افزایش می‌دهد. مطالعات نشان داده‌اند فعالیت آمیگدال منجر به پاسخ‌های رفتاری و فیزیولوژیک مرتبط با اضطراب می‌شود (۲۱). Rubino و همکاران گزارش کردند سطح پروتئین P-CREB در آمیگدال پس از در معرض قرار گرفتن با EPM تغییر نکرد (۲۲). در مطالعه دیگری در هنگام افزایش رفتارهای شبه‌اضطرابی، فعالیت CREB در هسته اکامبنس کاهش یافت (۲۳). Pandey و همکاران دریافتند که کاهش عملکرد CREB در آمیگدال با رفتار شبه اضطرابی در رت‌هایی که الکل مصرف کردند ارتباط دارد (۲۴). مطالعات نشان دادند که تجویز نیکوتین به صورت حاد هیچ اثری بر سطح کلی CREB و P-CREB در ناحیه هسته اکامبنس ندارد، اما تجویز مزمن نیکوتین کاهش معنی‌داری در سطح این پروتئین‌ها ایجاد کرد (۲۵). در مطالعه دیگری مشاهده شد هنگامی که آگونیست گیرنده α_2-آدرنرژیک قبل از آموزش تجویز شود کاهش در فسفریلاسیون CREB و بیان c-Fos در هسته‌های مرکزی، قاعده-ای-جانبی و جانبی آمیگدال رخ می‌دهد (۷). ناحیه مغزی مورد بررسی، نوع آزمون رفتاری و داروی مورد تجویز می تواند از دلایل پاسخ های متفاوت در مطالعات باشد.

همچنین یافته های به‌دست‌آمده نشان داد حیوانات دریافت کننده سالین سطح بالاتری از c-Fos را نسبت به سایر گروه ها بیان کردند. در تایید یافته‌های ما گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد پس از در معرض قرار گرفتن با EPM بیان c-Fos در آمیگدال افزایش می‌یابد (۲۶و۲۲). به‌علاوه یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد تجویز سیستمیک نیکوتین بیان پروتئین c-Fos را در ناحیه BLA کاهش می‌دهد. Kiba و همکاران گزارش کردند که تزریق حاد نیکوتین در رت‌ها منجر به افزایش بیان c-Fos در ناحیه استریاتوم می‌شود که از طریق گیرنده‌های دوپامینی واسطه می‌شود (۲۷). در مطالعه دیگری نشان داده شد که پس از تجویز سیستمیک نیکوتین نواحی مغزی از جمله تالاموس و ناحیه تگمنتوم شکمی c-Fos را بیان نکردند (۲۸). Chen و همکاران نشان دادند که نیکوتین رفتار اضطرابی و بیان c-Fos در موش را تنظیم می‌کند. این افراد مشاهده کردند که اضطراب منجر به افزایش معنی داری در بیان c-Fos در هسته‌ی مرکزی و قاعده‌ای-جانبی آمیگدال می شود (۲۹). این مشاهدات نشان می‌دهد زیرمجموعه‌ای از نورون‌های سیستم عصبی با تغییر در بیان c-Fos در پاسخ‌های رفتاری نیکوتین نقش دارند. دوز دارو، نحوه تجویز، برنامه زمانی تجویز دارو و ناحیه مغزی مورد بررسی در بیان متغیر پروتئین c-Fos در مطالعات نقش مهمی دارد. از آن‌جا که در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.2.4]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.9]

تحقیق حاضر تغییر بیان پروتئین‌های c-Fos و P-CREB در گروه‌های درمانی مختلف که تحت آزمون EPM قرار گرفتند دیده شد، در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ناحیه BLA تا حدی می تواند در اثرات اضطراب‌زایی نیکوتین نقش ایفا کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت حمایت مالی از این تحقیق و همچنین از آقای دکتر ایرج راگردی کاشانی به سبب راهنمایی‌های مفیدشان در مراحل انجام کار تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.2.4]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.9]

Investigating the Role of P-CREB and c-Fos protein Expression in Nicotine-Induced Anxiogenesis in Rats

M. Zarrindast (PhD)[1], A. Rezayof (PhD)[2], M. Sahebgharani (PhD)[1] , S.M. Tavangar (MD)[3], A. Omidi(PhD)[4] , H. Bashiri (PhD)*[5, 6]

1.Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
2.Department of Zoological Sciences, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran
3.Department of Pathology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
4.Department of Anatomy, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran
5.Neuroscience Research Center, Institute of Neurophrmacology, Kerman University of Medical Sciences, , Kerman, I.R.Iran
6.Faculty of Medical Sciences, Sirjan University of Medical Sciences, Sirjan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 22; 2020; PP: 9-16
Received: Jan 6th 2019, Revised: May 21st 2019, Accepted: Jul 7th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Nicotine is one of the most common addictive substances that has many effects on the central nervous system, including dose-dependent anxiety that is mediated by various proteins. Since the mechanisms and proteins involved in nicotine anxiety are unclear, the purpose of the present study was to investigate the role of p-CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) and c-Fos proteins in the basolateral amygdala (BLA) on nicotine-induced anxiety behaviours.

METHODS: In this experimental study, 24 male Wistar rats were divided into three groups of 7 (saline, nicotine 0.3 and 0.7 mg/kg, intraperitoneally) in behavioral experiment and four groups of 3 (control: no injection and test, Saline, nicotine 0.3 and 0.7 mg/kg) in immunohistochemical experiments. Anxiety-like behaviours were evaluated with % OAT (Open Arm Time), %OAE (Open Arm Entry), and locomotor activity in the elevated plus maze. The expression of p-CREB and c-Fos proteins in BLA region was also assessed by immunohistochemistry.

FINDINGS: Intraperitoneal administration of nicotine at a dose of 0.7mg/kg decreased %OAT (5.4±0.42) and %OAE (29.4±0.61) compared to saline group (15.2±0.82) and (42.1±0.45), indicating an anxiety-like effect (respectively, $p<0.001$, $p<0.01$). In addition, there was a significant difference in the expression of p-CREB ($H(3)= 6.99$, $p<0.05$) and c-Fos ($H(3)=13.11$, $p<0.01$) protein in the BLA between treatment groups. P-CREB protein expression was higher in the BLA area of control group than in the other groups. C-Fos protein expression was significantly lower in the BLA region of the animals of control, nicotine 0.3 mg/kg and 0.7 mg/kg groups compared to saline group ($p<0.01$).

CONCLUSION: The results of this study indicated that systemic administration of nicotine induced anxiety-like behaviors at high doses. Also, the expression of P-CREB and c-Fos protein was unchanged and decreased in the treatment groups, respectively.

KEY WORDS: *Nicotine, Anxiety, Basolateral amygdala, Immunohistochemistry.*

Please cite this article as follows:

Zarrindast M, Rezayof A, Sahebgharani M, Tavangar SM, Omidi A, Bashiri A. Investigating the Role of P-CREB and c-Fos protein Expression in Nicotine-Induced Anxiogenesis in Rats. J Babol Univ Med Sci. 2020; 22: 9-16.

***Corresonding Author: H. Bashiri (PhD)**
Address: Neuroscience Research Center, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, I.R.Iran
Tel: +98 34 3325 7581
E-mail: bashiry_h@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.2.4]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.9]

References

1.Mansvelder HD, Mertz M, Role LW. Nicotinic modulation of synaptic transmission and plasticity in cortico-limbic circuits. Semin Cell Dev Biol. 2009;20(4):432-40.

2.Nutt DJ. Neurobiological mechanisms in generalized anxiety disorder. J Clin Psychiatry. 2001;62 Suppl 11:22-7; discussion 28.

3.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(4):191-202.

4.Moses SN, Cole C, Driscoll I, Ryan JD. Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. Brain Res Bull. 2005;67(1-2):62-76.

5.Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. Synapse. 1996;23(1):28-38.

6.Martin EI, Ressler KJ, Binder E, Nemeroff CB. The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. Psychiatr Clin North Am. 2009;32(3):549-75.

7.Davies MF, Tsui J, Flannery JA, Li X, DeLorey TM, Hoffman BB. Activation of alpha2 adrenergic receptors suppresses fear conditioning: expression of c-Fos and phosphorylated CREB in mouse amygdala. Neuropsychopharmacology. 2004;29(2):229-39.

8.Bashiri H, Hosseini-Chegeni H, Alsadat Sharifi K, Sahebgharani M, Salari AA. Activation of TRPV1 receptors affects memory function and hippocampal TRPV1 and CREB mRNA expression in a rat model of biliary cirrhosis. Neurol Res. 2018;40(11):938-947.

9.Zarrindast MR, Aghamohammadi-Sereshki A, Rezayof A, Rostami P. Nicotine-induced anxiogenic-like behaviours of rats in the elevated plus-maze: possible role of NMDA receptors of the central amygdala. J Psychopharmacol. 2012;26(4):555-63.

10.Bashiri H, Rezayof A, Sahebgharani M, Tavangar SM, Zarrindast MR. Modulatory effects of the basolateral amygdala α2-adrenoceptors on nicotine-induced anxiogenic-like behaviours of rats in the elevated plus maze. Neuropharmacology. 2016;105:478-486.

11.Kosari-Nasab M, Sadeghi T, Bashiri H, Shokouhi G, Salari AA. The blockade of corticotropin-releasing factor 1 receptor attenuates anxiety-related symptoms and hypothalamus-pituitary-adrenal axis reactivity in mice with mild traumatic brain injury. Behav Pharmacol. 2019;30(2 and 3-Spec Issue):220-228.

12.Filgueiras GB, Carvalho-Netto EF, Estanislau C. Aversion in the elevated plus-maze: Role of visual and tactile cues. Behav Processes. 2014;107:106-11.

13.Zarrindast RM, Eslimi Esfahani D, Oryan S, Nasehi M, Torabi Nami M. Effects of dopamine receptor agonist and antagonists on cholestasis-induced anxiolytic-like behaviors in rats. Eur J Pharmacol. 2013;702(1-3):25-31.

14.Albani SH, Andrawis MM, Abella RJH, Fulghum JT ,Vafamand N, Dumas TC. Behavior in the elevated plus maze is differentially affected by testing conditions in rats under and over three weeks of age. Front Behav Neurosci. 2015;9:31.

15.Hamidkhaniha S, Bashiri H, Omidi A, Hosseini-Chegeni A, Tavangar SM, Sabouri S, et al. Effect of pretreatment with intracerebroventricular injection of minocycline on morphine-induced memory impairment in passive avoidance test: Role of P-CREB and c-Fos expression in the dorsal hippocampus and basolateral amygdala regions. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2019;46(8):711-722.

16.Zarrindast MR, Tajik R, Ebrahimi-Ghiri M, Nasehi M, Rezayof A. Role of the medial septum cholinoceptors in anxiogenic-like effects of nicotine. Physiol Behav. 2013;119:103-9.

17.Zarrindast MR, Solati J, Oryan S, Parivar K. Effect of intra-amygdala injection of nicotine and GABA receptor agents on anxiety-like behaviour in rats. Pharmacology. 2008;82(4):276-84.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.2.4]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.9]

18.Zarrindast MR, Khalifeh S, Rezayof A, Rostami P, Aghamohammadi Sereshki A, Zahmatkesh M. Involvement of rat dopaminergic system of nucleus accumbens in nicotine-induced anxiogenic-like behaviors. Brain Res. 2012;1460:25-32.
19.Szyndler J, Sienkiewicz-Jarosz H, Maciejak P, Siemiątkowski M, Rokicki D, Członkowska AI, et al. The anxiolytic-like effect of nicotine undergoes rapid tolerance in a model of contextual fear conditioning in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2001;69(3-4):511-8.
20.Cohen A, Young RW, Velazquez MA, Groysman M, Noorbehesht K, Ben-Shahar OM, et al. Anxiolytic effects of nicotine in a rodent test of approach–avoidance conflict. Psychopharmacology. 2009;204(3):541-9.
21.Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. Neuron. 2005;48(2):175-87.
22.Rubino T, Sala M, Vigano D, Braida D, Castiglioni C, Limonta V, et al. Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats. Neuropsychopharmacology. 2007;32(9):2036-45.
23.Barrot M, Wallace DL, Bolaños CA, Graham DL, Perrotti LI, Neve RL, et al. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(23):8357-62
24.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(10):2762-73.
25.Pluzarev O, Pandey SC. Modulation of CREB expression and phosphorylation in the rat nucleus accumbens during nicotine exposure and withdrawal. J Neurosci Res. 2004;77(6):884-91.
26.Hinks GL, Brown P, Field M, Poat JA, Hughes J. The anxiolytics CI-988 and chlordiazepoxide fail to reduce immediate early gene mRNA stimulation following exposure to the rat elevated X-maze. Eur J Pharmacol. 1996;312(2):153-61.
27.Kiba H, Jayaraman A. Nicotine induced c-fos expression in the striatum is mediated mostly by dopamine D1 receptor and is dependent on NMDA stimulation. Brain Res Mol Brain Res. 1994;23(1-2):1-13.
28.Ren T, Sagar SM. Induction of c-fos immunostaining in the rat brain after the systemic administration of nicotine. Brain Res Bull. 1992;29(5):589-97.
29.Chen HH, Hsu HR, Chan MH. Nicotine modulates restraint-induced anxiety-like behavior and c-Fos expression in mice. FASEB J. 2006;20(4):50-100.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.2.4]
[DOI: 10.22088/jbums.22.1.9]