# اثرات اعتیاد آور نیکوتین بر کورتکس مغز موش صحرایی

**سیروس جلیلی[1*]، زهرا جلیلی[2]، فروزان خادمی[3]، داریوش پورمند[4]، محمد رضا سلحشور[1*]**

۱- مرکز تحقیقات باروری و نا باروری، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۲- بخش قلب کودکان، مرکز قلبی عروقی امام علی (ع) کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۳ - دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۴- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه ، ایران.

**عهده دار مکاتبات: مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.*

***Email:***
*reza.salahshoor@yahoo.com*

**چکیده**

**زمینه:** مهم ترین ترکیب آلکالوئیدی موجود در توتون، نیکوتین است. اعتیاد به نیکوتین حدود ۳۰٪ از جوامع را در کشورهای مختلف درگیر می کند و عامل اصلی استعمال دخانیات به شمار می رود. پری فرونتال قسمتی از کورتکس مغز است که نقش بسیار مهمی در شخصیت و وضعیت روحی داشته و باقرار گرفتن در مسیر سیستم دوپامینی مزوکورتیکولیمبیک آن را عامل اصلی اعتیاد می دانند. با این حال با توجه به اهمیت نقش قشر پری فرونتال تا کنون تحقیقی که به تاثیرات نیکوتین در بروز تغییرات مورفولوژیک در ناحیه قشر پری فرونتال اشاره کند انجام نشده است . لذا در این مطالعه به بررسی اثرات اعتیاد آور نیکوتین بر کورتکس مغز موش صحرائی پرداخته ایم.

**روش ها:** مطالعه بر روی ۲۴ سر موش صحرایی نرکه به چهار گروه براساس دوز تزریقی نیکوتین (سالین، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند، انجام شد. پس از انجام بیهوشی، مغز به روش ترانس کاردیاک فیکس شد. پردازش بافتی و رنگ آمیزی گلژی انجام و برشهای بافتی رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری و نرم افزار موتیک مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج با نرم افزار SPSS آنالیز شد.

**یافته ها:** نیکوتین با افزایش دوز باعث کاهش معنی دار در تعداد زوائد نورونی شد. همچنین نیکوتین در دوز بالا باعث کاهش و افزایش معنی داری به ترتیب در اندازه پریکاریونها و تعداد خارهای دندریتی شد **(P <۰/۰۵)**.

**بحث:** نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز نیکوتین می تواند به کاهش اندازه پریکاریون و تعداد زوائد دندریتی ناحیه قشر پره فرونتال منجر شود.

**کلید واژه ها:** اعتیاد، ، نیکوتین، کورتکس مغز، موش صحرایی.

**مقدمه:**

حدود ۳۵۰۰ ماده مختلف در فاز ذره ای دود توتون وجود دارد که مهمترین آن نیکوتین می باشد. اعتیاد به نیکوتین حدود ۳۰٪ از جوامع را در کشورهای مختلف در گیر می کند و عامل اصلی استعمال دخانیات به شمار می رود[1]. نیکوتین یک الکالوئید است که در گیاه تنباکو یافت می شود و جز خانواده گیاهی سولناس می باشد[2]. تحریک رسپتورهای نیکوتین باعث افزایش رها سازی استیل کولین در مغز می شود[3]. به نظر میرسد برخی اثرات نیکوتین ناشی از توانایی این ماده در آزاد کردن نوروترانسمیترهای مختلف باشد[4]. نیکوتین موجب آزاد شدن دوپامین از نورونهای دوپا مینرژیک ازسیستم لیمبیک و ناحیه تگمنتوم شکمی می شود. پیشنهاد شده است که مسیر دوپا مینرژیک به عنوان مهمترین مسیر عملکرد نیکوتین می باشد [5]. مسیرسیستم دوپامینی مزوکورتیکو لیمبیک عامل اصلی بروز رفتارهای اعتیادی وابسته به مواد اعتیادآور می باشد. سیستم دوپامینرژیک نقش محوری در کنترل، حرکات نوسانی، شناخت، حافظه و

بخصوص رفتارهای پاداشی دارد. گیرنده های نیکوتینی-استیل کولینی در نواحی مختلف این مسیر مانند تگمنتوم شکمی و هسته های اکومبنس یافت می شوند. تحریک این گیرنده ها باعث افزایش رها شدن دوپامین در هسته های اکومبنس، امیگدال، هیپوکمپ و قشر پری فرونتال شده و احساس لذت را در فرد مصرف کننده القاء می کند [۶]. ازآنجا که تجویز داروهای اعتیادآورمی تواند به تغییر رفتار جاندار منجر شود. بنابراین احتمال تغییرمورفومتریک نورونها نیز وجود دارد و به همین دلیل مطالعات زیادی تاثیرات داروهای اعتیاد آور را بر تغییرات مورفولوژی نورونهای موجود در قسمتهای مختلف سیستم دوپامین مزولیمبیک مورد بررسی قرار داده اند. تجویز نیکوتین به حیوان می تواند موجب افزایش طول دندریت نرونهای پیرامیدال در بخش قاعده ای سلولهای پیرامیدی موجود در کورتکس میانی فرونتال گردد[۷]. همچنین تجویز نیکوتین می تواند موجب کاهش اندازه سلولهای پیرامیدی ناحیه CA1 هیپوکمپ شود. ناحیه پری فرونتال کورتکس مغز نقش بسیار مهمی در شخصیت و وضعیت روحی دارد و علت بررسی ناحیه پری فرونتال کورتکس به خاطر نقشی است که این کورتکس در کنترل رفتار، قضاوت، آینده نگری و اعتیاد ایفا می کند [۸]. مطالعات زیادی تاثیرات داروهای اعتیادآور را بر تغییرات مورفولوژی نورونهای موجود در قسمتهای مختلف سیستم دوپامین مزولیمبیک مورد بررسی قرار داده اند با این حال با توجه به اهمیت نقش قشر پری فرونتال تاکنون تحقیقی که به تاثیرات نیکوتین در بروز تغییرات مورفولوژیک در ناحیه قشر پری فرونتال اشاره کند انجام نشده است. لذا این مطالعه به بررسی اثرات اعتیاد آور نیکوتین بر کورتکس مغز موش صحرائی پرداخته ایم.

## مواد و روش ها:

نیکوتین با نام شیمیایی: ۱-متیل-۲-۳-پیریدیل -پیرولیدین و فرمول شیمیایی C10H14N2. از شرکت سیگما خریداری شد (C6499, USA). نیمه عمر دفعی نیکوتین ۲ ساعت. متابولیسم: کبدی. جرم مولکولی: ۲۳گرم/مول می باشد.

تعداد ۲۴ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۲۰گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. حیوانات به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش در حیوان خانه تحت شرایط آزمایشگاهی یعنی دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد و دوره نور- تاریکی ۱۲ ساعت قرار گرفتند تا با شرایط محیط و آب و هوا عادت کنند و تا زمان انجام آزمایش آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. هنگام مطالعه موازین اخلاقی کار با حیوانات رعایت گردید [۹]. حیوانات به صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. دوزهای مختلف نیکوتین به گروه های مورد نظر از حیوانات به ترتیب به میزان صفر، ۰،۱/۵ و ۱/۵میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تزریق شد. حجم تزریق نهایی در کلیه موارد ۱میلی لیتر /کیلوگرم بود [۱۰]. از آنجا که تجویز دوز نیکوتین کشنده است، بنابر این برای احتراز از سمی بودن نیکوتین به روش زیر عمل شد: درسه روز متوالی در ساعت معین به حیوانات ۰/۴ میلی گرم/کیلوگرم نیکوتین تزریق شد. پس از آن میزان نیکوتین تزریق شده افزایش یافت و سه گروه به ترتیب دوزهای ۰/۵میلی گرم/کیلوگرم، ۱میلی گرم/کیلوگرم و ۱/۵ میلی گرم/کیلوگرم محلول نیکوتین دریافت کردند و به حیوانات گروه چهارم در همان ساعت حجم مساوی از نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تزریق شد و تزریق برای سه روز بعد هم ادامه یافت[۱۰].

جهت تثبیت سریع و یک نواخت، فیکس کردن بافت از طریق پرفیوژن صورت گرفت. ۱۲ ساعت پس از آخرین تزریق نیکوتین حیوانات با کتامین (۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. قفسه سینه در خط میانی باز شد و بعد از کامل شدن توراکوتومی، اپکس بطن چپ سوراخ و کانول شیشه ای به قطر ۱ میلی متر به داخل آن وارد و در محل آئورت صعودی فیکس شد. پریکاردیوم و اوریکل سمت راست برش داده شده و آئورت نزولی درست بالای دیافراگم کلامپ شد.

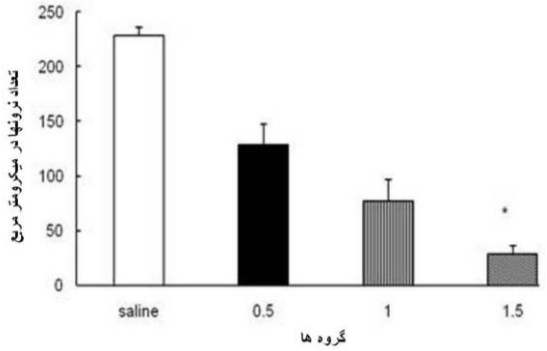
بدین ترتیب پرفیوژن ابتدا با ۲۰۰ میلی لیتر محلول سالین ۰/۹ درصد و سپس با ۱۰۰۰ میلی لیتر محلول فیکس کننده (بافر فرمالدئید) انجام گرفت (حجم مایع می بایست به اندازه حیوان معمولا۳۰۰-۲۰۰ میلی لیتر باشد و محلول قیکساتور با سرعت۲۰ میلی لیتر در دقیقه تزریق شود) [۱۱].

روش رنگ آمیزی گلژی یک تکنیک اصلی جهت دیدن دندریتها و خارهای دندریتی می باشد. مغز کامل در پر فیوژن برای ۳-۲ روز قرار داده شد. قطعات به ۱۰۰ میلی لیتر پتاسیم دی کرومات ۳/۵٪ انتقال و در دمای اتاق و در تاریکی برای ۵- ۷ روز قرارداده شد. قطعات بافتی پس از شستشو در نیترات نقره ۰/۷۵٪ برای ۳-۲ روز در دمای اتاق ودر تاریکی قرار داده شدند. شستشو در چندین مرحله با آب مقطر به مدت نیم ساعت و آبگیری در استن یا اتانول برای ۲ ساعت انجام شد. پس از آبگیری، شفاف سازی در زایلل، قالب گیری و تهیه برشهای ۲۰۰-۱۰۰ میکرون و نصب برشها بر روی لام انجام شد [۱۲].

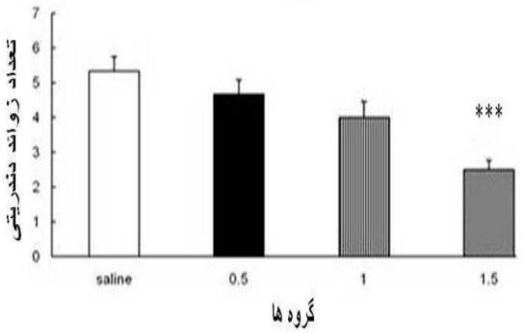
تعداد زوائد نورونی، اندازه پریکاریون و شمارش خارهای دندریتی با میکروسکوپ نوری ، نرم افزار موتیک و نرم افزار IT Image tool (version 3) مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تعداد خارهای دندریتی از روش شمارش تصادفی (تعداد خارها در ۵ مربع ۲×۲ سانتی متری در یک مساحت ۱۰×۱۰ سانتی متری در تصاویری با بزرگنمایی ۴۰۰x) استفاده شد [۱۳]. برای تجزیه و تحلیل آماری ازگروههای آزمایش نسبت به گروه شاهد از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و Tukey استفاده شد.

**نتایج:**

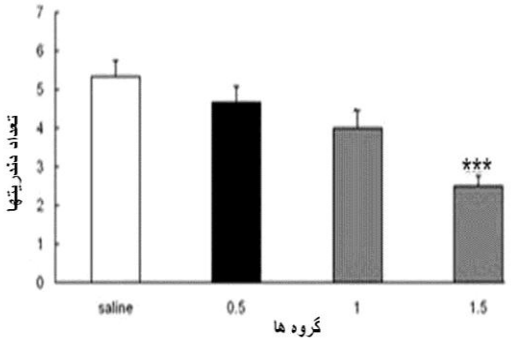
نتایج نشان داد که با افزایش میزان دوز نیکوتین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) اندازه پریکاریونها کاهش می یابد که این کاهش فقط برای دوز (۱/۵میلی گرم بر کیلوگرم) معنی دار گزارش شد (P <۰/۰۵) (نمودار ۱). همچنین که باافزایش دوز نیکوتین کاهش معنی داری در تعداد زوائد نورونی مشاهده شد (P <۰/۰۵) (نمودار ۲). نتایج نشان داد که با افزایش میزان دوز نیکوتین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تعداد خارهای دندریتی افزایش می یابد که این افزایش فقط برای دوز (۱/۵میلی گرم بر کیلوگرم) معنی دار گزارش شد (P <۰/۰۵) (نمودار ۳).




**نمودار ۱:** تاثیر نیکوتین بر تعداد نورونهای ناحیه پری فرونتال در دوزهای مختلف در رت های نر. (P <۰/۰۵).




**نمودار۲:** تاثیر نیکوتین در بر تعداد زوائد نورونی ناحیه پری فرونتال در دوزهای مختلف در رت های نر. (P<۰/۰۰۱)***




**نمودار۳:** تاثیر نیکوتین بر تعداد زوائد نورونی ناحیه پری فرونتال در دوزهای مختلف در رت های نر. (P <۰/۰۰۱)* **

## بحث

نتایج مطالعه نشان داد که تجویز دوزهای مختلف نیکوتین به عنوان یک ماده مخدر بر پارامترهای نورون موثر است و تاثیر معنی داری بر کاهش تعداد زوائد دندریتی دارد. به نظر می رسد تاثیرات فوق تا حدی به افزایش تولید لیپیداکسیداز در اثر تزریق نیکوتین مرتبط باشدکه این امر ممکن است آسیب برگشت ناپذیری به ساختمان غشای سلولی در نورونها وارد کند [۱۴]. همچنین نتایج بدست آمده می تواندلالت بر تاثیرات مختل کننده نیکوتین بر سیستم دوپامینرژیک باشدکه قشر پره فرونتال نیز جزئی از این ناحیه محسوب می شود [۱۵]. نتایج مطالعه حاضر مطالعه جلیلی وهمکاران را تایید کرد که نشان دادند تزریق نیکوتین باعث تغییرات مورفولوژیکی نورونها ی ناحیه CA1 هیپوکمپ در موش صحرایی نر می شود که این تغییرات شامل کاهش تعداد سلولها، زوائد و استطاله های سلولهای پیرامیدال نسبت به گروه کنترل بود [۱۶]. از طرفی نتایج حاصله در تضاد با نتایج Vego و همکاران بود که نشان دادند شاخه های دندریتی لایه اول تا چهارم قسمت داخلی کورتکس پره فرونتال در اثر هایپر تنشن افزایش می یابد [۱۷].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کاهش اندازه پریکاریونها در اثر نیکوتین در دوزهای پایین هم اتفاق می افتد ولی این کاهش فقط در دوز بالا (۱/۵میلی گرم بر کیلوگرم) معنی دار بود. به نظر می رسد نتایج حاصل شده در این بخش مربوط به مکانیسم های کاهش متابولیسمی نیکوتین در مغز و برخی دیگر از نقاط بدن باشد. این آسیب می تواند با اختلال در حافظه شامل تاخیر در اطلاعات فضایی همراه باشد [۱۸]. نتایج حاصل در تضاد با نتایج Haung و همکاران بود که نشان دادند تزریق مزمن مورفین از طریق تزریق زیر جلدی باعث می شود حدود ۲۵٪ اندازه جسم سلولی سلولهای دوپامین در ناحیه تگمنتال شکمی کاهش یابد [۱۹].

نتایج این مطالعه حاکی آن است که دوزهای مختلف نیکوتین باعث افزایش تعداد خارهای دندریتی می شود. خارهای دندریتی برآمدگی های غشایی از سطح نورون هستند. خارها شامل یک سر به حجم تقریبا ۱ تا ۰/۰۰۱ میکرو متر مربع می باشند که توسط یک گردن باریک به قطر ۰/۱ میکرو متر به نورون متصل می شود [۲۰]. با توجه به اینکه خارهای دندریتی در انتقال سیناپسی نقش اصلی را دارند جای تعجب نیست که بسیاری از حالات بیماری با تغییرات در مورفولوژی و دانسیته خارهای دندریتی مرتبط باشد. به نظر می رسد که خارهای دندریتی ارتباط دهنده اکسون و دندریتها بوده و در شکل گیری حافظه درگیر باشند. به نظر می رسد نتایج بدست آمده در این بخش مربوط به تاثیرات نیکوتین در تحریک الکتریکی مغز در نواحی مختلف باشد. نتایج حاصل همسو با نتایج مطالعه Brown و همکاران بود که عنوان

داشتند نیکوتین طول دندریت و دانسیته خاری را در هسته اکومبانس و قشرسینگولیت افزایش می دهد[۲۱]. افراد مبتلا به آسیب های واقع در قشر پره فرونتال، آگاهی های اجتماعی، توانایی لازم برای صحبت کردن، قضاوت و ابتکار را از دست می دهند و در آنها واکنشهای احساسی و شخصیتی عمیقا تغییر می کند به طوری که آنها به سختی می توانند زندگی کنند.

**نتیجه گیری:**

نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات تخریبی نیکوتین بر قشر پره فرونتال مغز است که این اثرات شامل کاهش اندازه پریکاریون و تعداد زوائد دندریتی این ناحیه از مغز بود.

**تقدیر و تشکر:**

این مقاله از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به شماره **۸۹۱۶۷** استخراج شد. بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه که ما را در این طرح یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

**References:**

1. Mızrak S, Turan V, Terek MC, Ercan G. The effect of long term nicotine exposure on nicotine addiction and fetal growth. Original Investigation 2012; 13: 237-41.

2. Hritul L, Stefan M, Brandsch R, Mihasan M. 6-hudroxy-nicotine from arthrobactor nicotinovorans sutain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rat. J Physiol Biochem 2013; 69(1):25-34.

3. Mousa SA, Arias H.R, Davis P.J. Role of Non-neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in Angiogenesis Modulation. Angiogenesis Modulations in Health and Disease 2013; 2:55-75.

4. Uchida S, Hotta H, Misawa H, Kavashima K. The missing link between long-term stimulation of nicotinic receptors and the increases of acetylcholine release and vasodilation in the cerebral cortex of aged rats. J physid sci 2013; 63(2):95-101.

5. Fujing L, xia C, Qiuhu P, Shukun F, Fuqing L, Hao R. The Protective Effect of PNU-282987, a Selective α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist, on the Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Is Associated with the Inhibition of High-Mobility Group Box 1 Protein Expression and Nuclear Factor κB Activation in Mice. Shock 2013; 39(2):197-203

6. Millar NS, Gotti C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. Neuropharmacology 2009; 56(1):237–246.

7. Bergstrom H, McDonald C, French H, Smith R. Continues nicotine administration produces selective age-dependent structural alteration of pyramidal neurons from prelimbic cortex. Synapse 2008; 62:31-39.

8. Jeon SM, Jong JK, Youb C, Yoon YC, Jae YJ, Ho Jin, et al. Postnatal development of parvalbumin and calbindin D-28 kimmunoreactivities in the canine anterior cingulated cortex: transient expression in layer V pyramidal cells. Int. J. Devl Neuroscience 2002; 20: 511–519.

9. Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M. Functional activities of the amygdala: an overview. J Psychiatry Neurosci 2000; 25(1):14-23.

10. Biala G, Weglinska B. Calcium channel antagonists attenuate cross-sensitization to the rewarding and/or locomotor effect of nicotine,morphine and MK-801. J phamacol2004; 56(8):1021-28.

11. Katzman R. Electrolyte distribution in mammalian central nervous system. Are glia high sodium cells? Neurology 1961; 11:27-36.

12. Gibb R, Kolb B. A method for vibrotome sectioning of Golgi–Cox stained whole rat brain. J Neurosci Methods 1998; 79:1–4.

13. KarpovAV, Bikbaev AF, Coenen AM, Van Luijtelaar G. Morphometric Golgi study of cortical locations in WAG/Rij rats: the cortical focus theory. Neurosci Res 2005; 51(2):119-28.

14. Mullane KM, Read N, Salmon JA, Moncada S. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. J Pharmacol Exp Ther 1984; 228(2): 510-22.

15. Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson R.C, Akil H, etal. Delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. J Comp Neurol 1994; 350(3):412-38.

16. Jalili, C Sadeghi Y, Sahraei H. Morphological changes in hippocampus CA1 neurons after nicotine in rats. Behbood –The scientific Quarterly journal 2009; 13:1-9[Persian].

17. Vega E, Villalobos J, Flores, G. Alteration in dendritic morphology of pyramidal neurons from the prefrontal cortex of rats with renovascular hypertension. Brain Res2004; 17(1):112-118.

18. Wilson FA, Scalaidhe SP. Goldman-Rakic P.S. Dissociation of object and spatial processing domains in primate prefrontal cortex. Science 1993; 25:1955–8.

19. Huang LZ, Abbott L.C, Winzer-Serhan UH. Effects of chronic neonatal nicotine exposure on nicotinic acetylcholine receptor binding, cell death and morphology in hippocampus and cerebellum. Neuroscience 2007; 146(4):1854-68.

20. Coss RG, Brandon JG, Globus A. Changes in morphology of dendritic spines on honeybee calycal interneurons associated with cumulative nursing and foraging experiences. Brain Res 1980; 192(1):49-590.

21. Brown RW, Kolb B. Nicotine sensitization increases dendritic length and spine density in the nucleus accumbens and cingulate cortex. Brain Res 2001; 27:(1-2): 94-100.

# Addictive effects of nicotine on rat cerebral cortex

**Cyrus Jalili [1], Zahra Jalili[2], Froozan Khademi [3], Dariyush Pourmand[4], Mohammad Reza Salahshoor [1]***

1. Fertility and Infertility Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
2. Department of Pediatric Cardiology, Imam Ali Heart Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
3. School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
4. Department of Medical Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

***Corresponding Author:***

*Kermanshah, Kermanshah University of Medical Sciences, Fertility and Infertility Research Center.*

***E-mail:*** *reza.salahshoor@yahoo.com*

**Abstract**

**Introduction**: The most important alkaloid compound in tobacco is nicotine. Around 30% of the people in different countries are addicted to nicotine. Nicotine is also the leading cause of smoking. Prefrontal is part of the cerebral cortex that plays a pivotal role in personality and mental state. It is considered the main cause of addiction as it is located in mesocorticolimbic dopamine system. However, with regard to the significant role of prefrontal cortex, no study has been conducted on the effects of nicotine on morphological changes in prefrontal cortex region, so far. Thus, we purpose to investigate the addictive effects of nicotine on rat cerebral cortex.

**Methods**: Twenty four male rats were divided into four groups based on nicotine administration dose (0, 0.5, 1 and 1.5 g/kg). After animals were anesthetized, their brains were fixed using transcardiac method. Tissue processing and Golgi staining were performed and the stained tissue sections were analyzed by optic microscope and Motic software. The data were analyzed using SPSS software.

**Results**: By increasing the dose, nicotine significantly decreased the number of neuronal processes. In the higher dose, nicotine caused a significant decrease and increase in the size of pericarions and dendritic spines, respectively ($P<0.05$).

**Conclusion**: Nicotine administration can decrease the size of pericarion and number of dendritic spines in the prefrontal cortex.

**Keywords**: Addictive, nicotine, cerebral cortex, rat