تغییرات مورفولوژیک نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ پس از تزریق نیکوتین در موش صحرایی نر

سیروس جلیلی[۱]؛ یوسف صادقی[۲]؛ هدایت صحرائی[۳] *

چکیده

زمینه: *تغییرات مورفولوژیک به‌دنبال تزریق داخل صفاقی داروهای اعتیادآور در مطالعات انسانی و حیوانی قبلی مشاهده شده است. در تحقیق حاضر تأثیر تزریق داخل صفاقی نیکوتین بر تغییرات مورفولوژیک نورون‌های هرمی‌شکل ناحیه CA1 هیپوکمپ مورد بررسی قرار گرفته است.*

روش‌ها: *در این تحقیق از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر، نژاد Wistar با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات پس از دریافت نیکوتین (سه‌روز با دوز ۰/۴ mg/kg و سه‌روز با دوز ۱/۵ mg/kg)، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۰mg/kg) بیهوش شده و مغز آن‌ها به‌روش ترانس کاردیاک با فرمالین ۴ درصد و بافر فسفات ۶ فیکس شد. پس از آن، پردازش بافتی برای رنگ‌آمیزی به روش گلژی انجام شد. برش‌های بافتی رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ نوری و نرم افزار موتیک از نظر تغییرات بافتی مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از روش آماری t مستقل تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها: *نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اندازه سلول‌های پیرامیدی موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ در گروه دریافت‌کننده نیکوتین نسبت به گروه شاهد کاهش چشم‌گیری یافته بود. این کاهش در تعداد سلول‌ها هم دیده شد. از سوی دیگر، زوائد و استطاله‌های سلول‌های پیرامیدی هم نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود. ولی در گروه آزمایش تعداد آستروسیت‌ها نسبت به گروه شاهد افزایش چشم‌گیری را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *از آزمایش‌های مذکور نتیجه می‌گیریم که تجویز نیکوتین می‌تواند به کاهش اندازه‌های سلول‌های پیرامیدی ناحیه CA1 هیپوکمپ منجر شود.*

کلیدواژه‌ها: *نیکوتین، ناحیه CA1 هیپوکمپ، سلول‌های پیرامیدی، موش بزرگ آزمایشگاهی*

«دریافت:۱۳۸۷/۱۰/۲۴ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۲/۲۰»

---

۱. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشگی شهید بهشتی

۳. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

* **عهده‌دار مکاتبات:** تهران، نیاوران، سه راه اراج، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک ، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۶۵۵۸، تلفکس: ۰۲۱-۲۶۱۲۷۲۳۵

Email: h.sahraei@bmsu.ac.ir

مقدمه

مصرف نیکوتین به صورت سیگار یا دیگر فراورده‌های حاوی آن مانند قلیان و پیپ در جوامع بشری بسیار گسترده است. اعتیاد به نیکوتین که حدود ۳۰ درصد جوامع را در کشورهای مختلف درگیر می‌کند، عامل اصلی استعمال دخانیات به شمار می‌رود. دود سیگار مهم‌ترین عامل قابل پیشگیری در بروز بیماری‌های قلبی– عروقی و سرطان‌های ریه، معده، پانکراس، مری، دهان و حنجره می‌باشد (۱ و ۲). یکی از مهم‌ترین تأثیرات نیکوتین، تحریک سیستم مزوکورتیکولیمبیک یا همان دستگاه پاداش مغزی و به دنبال آن القاء سرخوشی و کاهش اضطراب است که عامل مهمی در شروع و ادامه کشیدن سیگار در بین سیگاری‌ها محسوب می‌شود (۳ و ۴). مسیر سیستم دوپامینی مزوکورتیکولیمبیک را که از ناحیه تگمنتوم شکمی در مزانسفال شروع شده و به هسته آکومبانس در مغز جلویی ختم می‌شود، عامل اصلی در بروز رفتارهای اعتیادی وابسته به مواد اعتیادآور و نیز پاداش‌های طبیعی مانند غذا می‌دانند (۵). یکی از نقاط کلیدی مغز که در اثر فعالیت سیستم مذکور تحریک می‌شود، هیپوکمپ می‌باشد که عامل مهمی در القاء حافظه توسط داروهای اعتیادآور محسوب می‌گردد (۶). تجویز داروهای اعتیادآور می‌تواند به تغییر رفتار جاندار منجر شود و بنابراین احتمال تغییر مورفولوژی نورون‌ها نیز وجود دارد. به‌همین دلیل، مطالعات زیادی تأثیرات داروهای اعتیادآور را بر تغییرات مورفولوژی نورون‌های موجود در قسمت‌های مختلف دستگاه دوپامینی مزولیمبیک مورد بررسی قرار داده‌اند. این مطالعات به کوچک شدن اندازه سلول‌های دوپامینی موجود در ناحیه تگمنتوم شکمی پس از تجویز مزمن مورفین اشاره دارد. به دنبال این مطالعه، تحقیق بعدی نشان داده است که کاهش ماده سوبسترای شماره ۲ گیرنده انسولینی (IRS2) عامل مهمی در کاهش اندازه این سلول‌ها می‌باشد (۷). از سوی دیگر، در یک تحقیق جدید برگستروم و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که تجویز نیکوتین از طریق یک پمپ اسمزی به حیوان می‌تواند موجب افزایش طول دندریت نورون‌های پیرامیدال در بخش قاعده‌ای سلول‌های پیرامیدی موجود در قشر پیشانی– میانی گردد (۸). هرچند تحقیقات مختلفی به‌منظور بررسی اثر نیکوتین در القاء یادگیری وابسته به هیپوکمپ از جمله ماز آبی موریس، ماز شعاعی و نیز یادگیری ناشی از ترس در مدل‌های حیوانی انجام پذیرفته است (۹)، با این حال تاکنون تحقیقی که به تأثیرات نیکوتین در بروز تغییرات مورفولوژیکی در ناحیه CA1 اشاره کند، انجام نشده است. از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده است که مصرف طولانی‌مدت داروهای اعتیادآور به بروز فراموشی در فرد مصرف‌کننده می‌انجامد. این امر در مورد افراد سیگاری، امری شناخته‌شده است که دلیل آن را به تغییرات در سلول‌های هسته ماینرت در مغز جلویی نسبت می‌دهند (۱۰). فرضیه محقق در مطالعه حاضر این بود که ممکن است بروز فراموشی در مدل‌های حیوانی اعتیاد به نیکوتین و نیز انسان‌هایی که سیگار دود می‌کنند، تأثیر نیکوتین بر تغییرات مورفولوژیکی در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ باشد. تحقیق حاضر به‌منظور بررسی صحت این فرضیه طراحی

و انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر، نژاد Wistar (انستیتوپاستور ایران) با میانگین وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات در گروه‌های ۶-۵ تایی نگه‌داری شده و از آب و غذای مخصوص (پلت)، به‌جز در زمان آزمایش برخوردار بودند. حیوانات در دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (۷ صبح تا ۷ شب روشن) و در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شدند.

نیکوتین هیدروژن (+) - تارتارات (سیگما- آمریکا) در سالین حل‌شده و به‌صورت داخل صفاقی (i.p) تزریق می‌شد.

برای فیکساسیون از روش ترانس کاردیاک استفاده شد (۱۱). در این روش ابتدا حیوان با تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۰ mg/kg) بیهوش شده و سپس با ایجاد یک برش در قفسه سینه قلب حیوان آشکار می‌گردید. در این هنگام، کانول متصل به محلول نرمال‌سالین با ایجاد یک شکاف در بطن چپ به آئورت وارد شده و در محل محکم می‌شد. با بستن آئورت نزولی محلول سالین فقط به قسمت بالاتنه حیوان می‌رسید. محلول واردشده پس از شستشوی نواحی مختلف مغز از طریق شکافی که در دهلیز راست ایجاد شده بود خارج می‌شد. پس از خروج کامل خون از بدن حیوان، پیچ مرتبط با سالین بسته شده و پیچ مربوط به محلول فرمالین ۴ درصد و بافرفسفات ۶ باز شده و مغز حیوان به‌تدریج و طی مدت ۲۰ دقیقه فیکس می‌شد. با این روش سلول‌های دستگاه عصبی در معرض هیپوکسی قرار نگرفته و همچنین خونی در رگ‌های مغز باقی نمی‌ماند و بررسی‌های میکروسکوپی با دقت بیشتری انجام می‌گیرد.

رنگ‌آمیزی به‌روش گلژی انجام شد (۱۲). برای این منظور، ابتدا نمونه‌های فیکس‌شده در محلول بافرفرمالدئید برای مدت‌زمان ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به محلول A منتقل شده و به‌مدت ۴۸ ساعت قرار می‌گرفتند. فرمول محلول A به قرار ذیل می‌باشد: ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ۲ درصد دی‌کرومات پتاسیم به همراه ۱۰ میلی‌لیتر محلول فرمالین ۳۷ درصد و ۵ میلی‌لیتر محلول اسیداستیک غلیظ با هم مخلوط می‌شدند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه شستشو با آب مقطر دوبار تقطیر به محلول B منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در آن قرار می‌گرفتند. فرمول محلول B شامل: ۱ گرم نیترات نقره ۰/۷۵ درصد بود که در ۱۳۳ میلی‌لیتر آب مقطر دوبارتقطیر حل شد. سپس هر نمونه در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت قرار می‌گرفت و روز بعد به‌مدت ۳۰ دقیقه با آب‌مقطر شستشو می‌شد. این نمونه‌ها به‌ترتیب آب‌گیری و شفاف‌سازی شده و برای قالب‌گیری در پارافین قرار می‌گرفتند. از این بلوک‌ها مقاطع ۳۵ میکرومتری تهیه و پس از چسباندن بر روی لام، مورد بررسی میکروسکوپی قرار می‌گرفتند. در این تحقیق تمامی لام‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

از آن‌جا که تجویز دوز بالای نیکوتین کشنده است، بنابراین برای احتراز از اثر سمی نیکوتین به‌روش ذیل عمل شد: ابتدا در سه روز متوالی در ساعت معین به حیوانات نیکوتین ۰/۴mg/kg به‌صورت داخل صفاقی

تزریق شد. پس از این سه روز، میزان نیکوتین تزریق شده به ۱/۵ mg/kg افزایش یافت و تزریق برای سه روز بعد هم ادامه یافت. با این ترتیب، میزان مرگ و میر ناشی از تزریق نیکوتین به صفر کاهش یافت.

در این مطالعه، سطح سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار موتیک اندازه‌گیری شد و به‌عنوان نموداری از اندازه آن‌ها به میکرومتر مربع بیان گردید. همچنین، تعداد سلول‌ها و تعداد زوائد هر سلول در واحد سطح در ۵ قسمت مختلف لام شمارش شده و با گروه کنترل مقایسه شد. برای تجزیه و تحلیل آماری گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد از آزمون t مستقل استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف‌معیار بیان شدند. در تمامی موارد $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنادار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

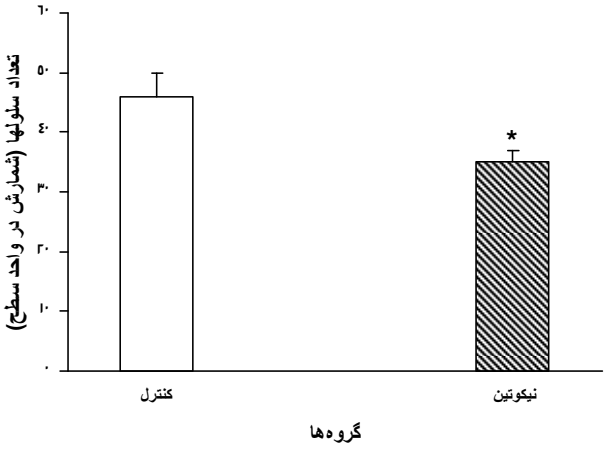
یافته‌ها

● بررسی اثر نیکوتین بر تعداد سلول‌های پیرامیدی ناحیه CA1 هیپوکمپ:

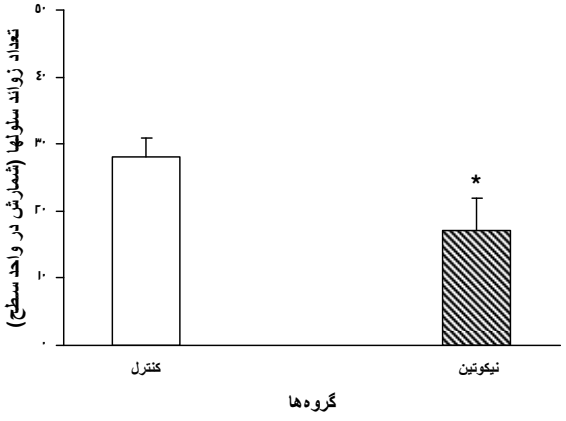
تزریق داخل صفاقی (i.p.) نیکوتین به روش گفته‌شده در قسمت روش‌ها (یک‌بار در روز، سه‌روز اول با دوز ۰/۴mg/kg و سه‌روز بعدی با دوز ۱/۵mg/kg) به حیوانات مورد مطالعه موجب کاهش تعداد سلول‌ها در ناحیه CA1 هیپوکمپ این حیوانات نسبت به گروه کنترل (سالین) گردید و این کاهش از نظر آماری کاملاً معنادار بود (نمودار ۱ و شکل ۱ و ۲).

● بررسی اثر تجویز نیکوتین بر تعداد زوائد سلولی سلول‌های پیرامیدی ناحیه CA1 هیپوکمپ:

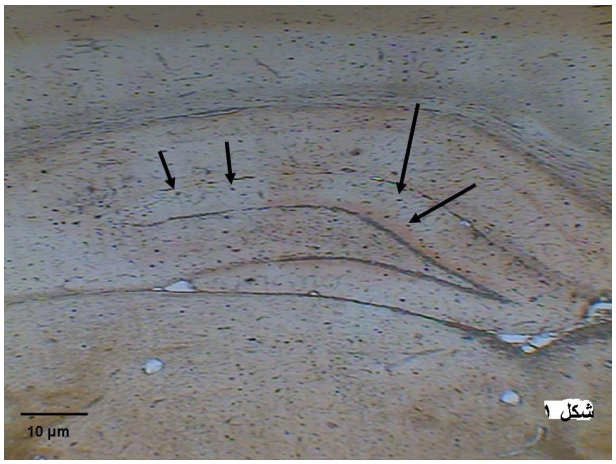
به نحو مشابه، تزریق نیکوتین به حیوانات موجب کاهش تعداد زوائد سلولی سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ این حیوانات نسبت به گروه کنترل شد که این کاهش از نظر آماری معنادار بود (نمودار ۲ و شکل ۳ و ۴).



نمودار ۱– تاثیر تجویز نیکوتین بر تغییرات تعداد سلول‌های پیرامیدی موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ در موش بزرگ آزمایشگاهی. (n=۶، داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف‌معیار، P<0.05 *)



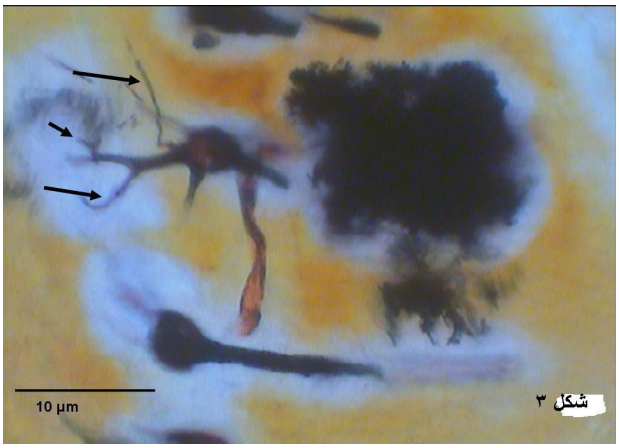
نمودار ۲– تغییر تعداد زوائد سلولی در نورون‌های پیرامیدی موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ در موش بزرگ آزمایشگاهی. (n=۶، داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار ، P<0.05 *)



شکل ۱ و ۲- تغییر تعداد نورون‌های پیرامیدی در ناحیه CA1 هیپوکمپ بعد از تزریق سالین (شکل ۱) و نیکوتین (شکل ۲). فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌ها می‌باشند. به عدم رنگ‌پذیری برش مغزهای موش‌های دریافت‌کننده نیکوتین (شکل ۲) دقت شود.

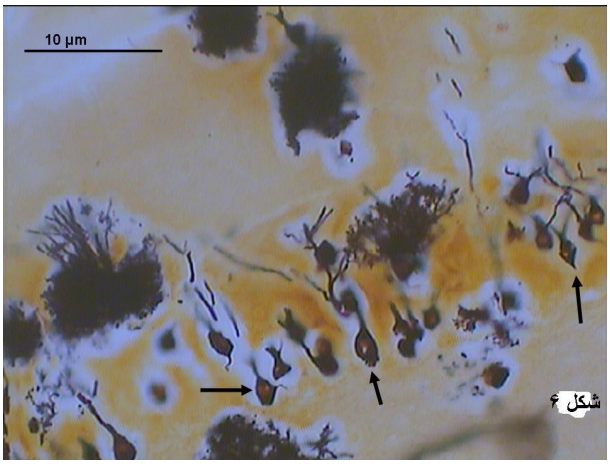
- **بررسی اثر تجویز نیکوتین بر اندازه سلول‌های پیرامیدی ناحیه CA1 هیپوکمپ:**

همچنان‌که در نمودار ۳ و شکل‌های ۵ و ۶ مشخص است، تزریق نیکوتین به روش گفته شده در بالا موجب کاهش اندازه سلول‌های پیرامیدی در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش‌های گروه آزمایش گردید.



شکل ۳ و ۴- تغییر تعداد زوائد سلولی در نورون‌های پیرامیدی در ناحیه CA1 هیپوکمپ پس از دریافت سالین (شکل ۳) و نیکوتین (شکل ۴). فلش‌ها نشان‌دهنده زوائد سلول‌ها می‌باشند.

نمودار ۳- کاهش اندازه نورون‌های پیرامیدی موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ در موش بزرگ آزمایشگاهی پس از دریافت نیکوتین.
(n=۶، داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف‌معیار، $P<0.05$ *)



شکل ۵ و ۶– کاهش اندازه نورون‌های پیرامیدی در ناحیه CA1 هیپوکمپ پس از دریافت نیکوتین (شکل ۶) در مقایسه با سالین (شکل ۵). فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌ها می‌باشند.

بحث

این تحقیق به منظور بررسی اثر نیکوتین بر تغییرات مورفولوژیکی نورون‌های موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ انجام شد. تحقیق حاضر نشان داد که تجویز نیکوتین موجب بروز تغییرات مورفولوژیکی چشم‌گیری در نورون‌های این ناحیه می‌گردد که در کاهش تعداد و اندازه سلول‌ها و نیز در کاهش استطاله‌های آن‌ها نمایان بود. با توجه به این‌که در تحقیقات قبلی چنین نتیجه‌ای بیان نشده بود و با توجه به این‌که هیپوکمپ از مهم‌ترین مناطق مغزی در روند یادگیری و حافظه است و از طرف دیگر، با توجه به این‌که در مطالعات قبلی اثر تخریبی استعمال دخانیات بر حافظه مشخص شده است (۱۳ و ۱۴)، شاید بتوان گفت که یکی از مناطقی که در بروز اثر سوء سیگار بر حافظه ممکن است دخیل باشد، ناحیه هیپوکمپ است. با توجه به این‌که تجویز حاد دوزهای بالای نیکوتین می‌تواند کشنده باشد، در این تحقیق ابتدا دوز کم نیکوتین به‌مدت سه‌روز به حیوان تزریق شد تا حیوان نسبت به دارو تحمل پیدا کند (۱۵) و سپس دوز بالای نیکوتین به حیوان تزریق و تحقیق ادامه یافت. به این ترتیب، میزان مرگ و میر در حیوانات بر خلاف تحقیقات قبلی (۱۶ و ۱۷) به صفر کاهش یافت. دو نکته مهم دیگر در این تحقیق مشخص شد که عبارت است از: اول این‌که تعداد آستروسیت‌ها در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد هم افزایش یافته بود و هم استطاله‌های آن‌ها نیز بیشتر شده بود و دوم این‌که به‌نظر می‌رسید رنگ‌پذیری برش‌های مغز حیوانات گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود. تحقیقات جدیدی که در تأثیر نیکوتین بر پروتئین‌های درون‌سلولی در مناطق مختلف مغز انجام می‌پذیرد نشان داده‌اند که نیکوتین هم بر میزان پروتئین‌های درون‌سلولی و هم بر عوامل ژنتیکی مؤثر بر تولید این پروتئین‌ها اثر دارد. برای مثال، تحقیقی که در روی نورون‌های مهاری واسطه گابائرژیک در لایه‌های I قشر مخ در ناحیه قشر پیشانی پس از تزریق مداوم نیکوتین انجام شده است نشان داده است که پس از تجویز نیکوتین میزان آنزیم DNA-methyltransferase در این نورون‌ها افزایش یافته و در عین حال فعالیت

گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین در آن‌ها کاهش معناداری یافته بود (۱۸). این افزایش فعالیت در آنزیم DNA-methyltransferase در سلول‌های ناحیه هیپوکمپ هم دیده شد (۱۹). همچنین، تجویز حاد نیکوتین موجب افزایش میزان بیان ژن c-fos و نیز mRNA پروتئین‌های اسکلت سلولی در هیپوکمپ موش‌های جوان شده اما بر میزان بیان این ژن‌ها در نوزادان موش بی‌تأثیر بوده است. این امر نشان‌دهنده حساسیت بالاتر موش‌های بالغ به این اثر ویژه نیکوتین است (۱۶). از سوی دیگر، تأثیرات ماندگار نیکوتین بر رفتارهای شناختی در مغز را به تأثیر این دارو بر افزایش فعالیت گیرنده‌های AMPA گلوتاماتی در ناحیه CA1 هیپوکمپ نسبت می‌دهند که خود این مسأله نشان‌دهنده اثر مخرب نیکوتین بر حافظه در طولانی‌مدت است (۱۳). در نهایت، تجویز نیکوتین موجب فسفریلاسیون پروتئین وابسته به cAMP (CREB) در نورون‌های هیپوکمپ می‌شود که این امر از مهم‌ترین تأثیرات نیکوتین در کاهش فعالیت نورون‌های این منطقه برشمرده شده است (۱۰). این تحقیق و تحقیقات مشابه آن به‌خوبی بیان می‌کنند که تجویز نیکوتین می‌تواند موجب بروز تخریب در سطح پروتئین‌های اسکلت سلولی و نیز پروتئین‌های دخیل در امر عملکرد سلول‌های ناحیه هیپوکمپ شده و بر پاسخ‌های آن‌ها اثر منفی خواهد گذاشت. از سوی دیگر، هم‌خوان با این تحقیقات، تحقیق حاضر بیان می‌کند که تجویز نیکوتین موجب کاهش تعداد و اندازه سلول‌های پیرامیدی موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش شد که می‌تواند در راستای تحقیقات قبلی در نظر گرفته شود (۸). این‌که چه عامل یا عوامل سلولی و مولکولی باعث بروز این پاسخ شده‌اند، نیاز به تحقیقات بعدی در این زمینه را نشان می‌دهد. اما نکته مهم در این یافته آن است که سلول‌های مهم پیرامیدی هیپوکمپ در اثر تجویز نیکوتین دچار تغییرشکل شده و همین امر احتمالاً می‌تواند به بروز مشکلات بعدی در حیوان مانند کاهش حافظه منجر شود. تحقیق انجام‌شده توسط کارمونا و همکاران (۲۰) در این زمینه نیز نشان داده است که تجویز نیکوتین به افزایش متابولیت‌های حاصل از استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ موش بزرگ آزمایشگاهی منجر می‌شود که این موضوع عامل اصلی بروز مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز (۲۱)) در این سلول‌ها است (۲۰). در این‌جا یک سؤال مهم مطرح می‌شود که نیکوتین باعث بهبود حافظه و توجه در کوتاه‌مدت شده و بر آن اثر مثبت دارد (۲۲)، این امر چگونه با یافته‌های ما سازگار است؟ برای پاسخ به این سؤال بایستی اشاره کرد که اثر دیده‌شده از نیکوتین در بهبود حافظه و شناخت مربوط به دوزهای بسیار کم آن بوده و در دوزهای نسبتاً بالا (مانند آنچه ما در این تحقیق به‌کار برده شده است) دیده نمی‌شود (۲۲) و سپس، اثر نیکوتین بسته به فرد، جنس، نژاد و سن متفاوت است و ممکن است در سنین کم تأثیرات مثبتی هم داشته باشد که با افزایش سن و تداوم مصرف تأثیرات مضر آن بیشتر بروز کند (۸ و ۱۴). در توجیه آن‌چه که از آزمایش ما به‌دست آمد بایستی گفت که اثر نیکوتین ممکن است به دلیل تحریک ژن‌های مرتبط با گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین مانند گیرنده α_7 (۲۲ و ۲۳)، افزایش فعالیت گیرنده‌های گلوتاماتی مانند گیرنده‌های AMPA (۱۳)،

افزایش فسفریلاسیون پروتئین‌های سازنده اسکلت سلولی نظیر نورتروفین-۳ (۱۷) و نیز افزایش بیان ژن‌های فوری-زودرس c-fos و پروتئین وابسته به cAMP یعنی CREB (۱۶ و ۱۰) و یا مسیرهای ناشناخته دیگری عمل کرده باشد.

نتیجه‌گیری

در یک جمع‌بندی می‌توان گفت که تجویز نیکوتین با تغییر مورفولوژی سلول‌های پیرامیدی ناحیه CA1 هیپوکمپ می‌تواند به بروز پاسخ‌های رفتاری تغییر یافته در حیوان منجر شود و ممکن است که این امر در کاهش حافظه دیده شده و در افرادی که برای مدت طولانی استعمال دخانیات دارند، دخالت داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت که بدین‌وسیله از ایشان قدردانی می‌گردد.

References

1. Jacobs DR, Adachi H, Mulder I, Kromhout D, Menotti A, Nissinen A, et al. Cigarette smoking and mortality risk. Arch Intern Med 1999; 159: 733–740.
2. Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C, Doll R. Mortality from smoking worldwide. Br Med Bull 1996; 52(1): 12–21.
3. Brody AL, Olmstead RE, London ED, Farahi J, Meyer JH, Grossman P, et al. Smoking-induced ventral striatum dopamine release. Am J Psych 2004; 161(7): 1211–18.
4. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Mathew RJ, London ED, Hawk TC, et al. PET studies of the influences of nicotine on neural systems in cigarette smokers. Am J Psych 2003; 160: 323–33.
5. Wise RA. Drug activation of brain reward pathways. Drug and Alcohol Dep 1998; 51: 13-22.
6. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. Ann Rev Neurosci 2006; 29: 565–98.
7. Russo SJ, Bolanos CA, Theoblad DE. IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates. Nature 2007; 10(1): 93-99.
8. Bergstrom HC, McDonald CG, French HT, Smith RF. Continuous nicotine administration produces selective, age-dependent structural alteration of pyramidal neurons from prelimbic cortex. Synapse 2008; 62(1): 31-9.
9. Kenney JW, Gould TJ. Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. Mol Neurobiol 2008; 38(1):101-21.
10. Chiamulera C, Di Chio M, Tedesco V, Cantù C, Formaggio E, Fumagalli G. Nicotine-induced phosphorylation of phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein (pCREB) in hippocampal neurons is potentiated by agrin. Neurosci Lett 2008; 442(3): 234-8.
11. Hopwood D. Fixation and fixatives: In: Bancroft JD, Gamble M, editors. Theory and practice of histological techniques. 5th ed. Churchill Livingstone Publishers 2002: 63-84.
12. Chan K, Lowe J. Techniques in neuropathology: In: Bancroft JD, Gamble M, editors: Theory and practice of histological techniques. 5th ed. Churchill Livingstone Publishers 2002: 371-414.
13. Vaglenova J, Parameshwaran K, Suppiramaniam V, Breese CR, Pandiella N, Birru S. Long-lasting teratogenic effects of nicotine on cognition: gender specificity and role of AMPA receptor function. Neurobiol Learn Mem 2008; 90(3): 527-36.
14. McClernon FJ, Kozink RV, Rose JE. Individual differences in nicotine dependence, withdrawal symptoms, and sex predict transient fMRI-BOLD responses to smoking cues. Neuropsychopharmacol 2008; 33(9): 2148-57.
15. Shoaib M, Stolerman IP, Kumar RC. Nicotine-induced place preference following prior nicotine exposure in rats. Psychopharmacol 1994; 113(3-4): 445-452.
16. Schmitt HF, Huang LZ, Son JH, Pinzon-Guzman C, Slaton GS, Winzer-Serhan UH. Acute nicotine activates c-fos and activity-regulated cytoskeletal associated protein mRNA expression in limbic brain areas involved in the central stress-response in rat pups during a period of hypo-responsiveness to stress. Neurosci 2008;157(2):349-59.
17. Yang JT, Chang CN, Wu JH, Chung CY, Weng HH, Cheng WC, et al. Cigarette smoking decreases neurotrophin-3 expression in rat hippocampus after transient forebrain ischemia. Neurosci Res 2008; 60(4): 431-8.
18. Satta R, Maloku E, Zhubi A, Pibiri F, Hajos M, Costa E, et al. Nicotine decreases DNA methyltransferase 1 expression and glutamic acid decarboxylase 67 promoter methylation in GABAergic interneurons. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(42):16356-61.
19. Szabo SI, Zelles T, Vizi ES, Lendvai B. The effect of nicotine on spiking activity and Ca2+ dynamics of dendritic spines in rat CA1 pyramidal neurons. Hippocampus 2008; 18(4): 376-85.
20. Carmona P, Rodríguez-Casado A, Alvarez I, de Miguel E, Toledano A. FTIR microspectroscopic analysis of the effects of certain drugs on oxidative stress and brain protein structure. Biopolymers. 2008; 89(6): 548-54.
21. Catassi A, Servent D, Paleari L, Cesario A, Russo P. Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. Mutat Res 2008; 659(3): 221-31.
22. Lagostena L, Trocme-Thibierge C, Morain P, Cherubini E. The partial alpha7 nicotine acetylcholine receptor agonist S 24795 enhances long-term potentiation at CA3-CA1 synapses in the adult mouse hippocampus. Neuropharmacol 2008; 54(4): 676-85.
23. Waring JF, Abel S, Li J, Bitner RS, Nikkel AL, Blomme EA, et al. Analysis of gene expression profiles in rat hippocampus following treatment with nicotine and an alpha7 nAChR selective agonist. Neurosci Res 2008; 60(3): 266-74.