جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره پانزدهم/ پائیز ۱۳۸۹/ ۱۲-۱

کاهش سطح گلوتامات در کورتکس و ناحیه کمری نخاع موش صحرایی: یک مکانیسم احتمالی اثر ماینوسایکلین در کاهش تحمل به اثرات ضددردی مورفین

اسماعیل ایزدپناه[۱]، محبوب نعمتی[۲]، محمد چرخ‌پور[۳]، کامبیز حسن‌زاده[۴]

۱- دکترای فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲- دانشیار شیمی مواد غذایی و آب شناسی پزشکی، گروه کنترل غذا و دارو، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- استادیار فارماکولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی ، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (مؤلف مسؤول)

تلفن: ۰۸۷۱-۶۱۳۱۴۰۱، kambizhassanzadeh@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: تجویز مزمن اپیوئیدها منجر به بروز تحمل به اثرات ضد دردی می‌شود. با وجود تحقیقات فراوان در این زمینه، هنوز مکانیسم سلولی دقیق دخیل در تحمل و وابستگی به اپیوئیدها به خوبی روشن نشده است. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که پیام‌دهی گلوتاماترژیک و مسیر نیتریک اکساید- NMDA (N-methyl D-aspartate) در تحمل القاء شده توسط مورفین نقش مهمی ایفا می‌کنند. بنابراین هدف عمدهٔ این مطالعه ارزیابی اثرات تزریق داخل بطن مغزی (ICV) ماینوسایکلین (یک تتراسایکلین نسل دوم) بر تحمل و افزایش سطح گلوتامات متعاقب مصرف مورفین در کورتکس مغز و ناحیه کمری نخاع رت بود.

روش بررسی: گروه‌های مختلف مورد مطالعه یا مورفین (داخل صفاقی) به همراه آب مقطر (داخل بطن مغزی) یا مورفین به اضافه دوزهای مختلف ماینوسایکلین (داخل بطن مغزی) یا ماینوسایکلین را به تنهایی در هر روز دریافت می‌کردند. میزان احساس درد با استفاده از دستگاه Hotplate مورد بررسی قرار می‌گرفت. غلظت گلوتامات در هر دو ناحیه به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاکی از آن بود که تزریق داخل بطن مغزی ماینوسایکلین، تحمل القاء شده توسط مورفین را در دوزهای (µl/rat ۱۰/µg ۲۴۰ ,۱۲۰,۶۰) و سطح گلوتامات را در قشر مغز در دوزهای (µl/rat ۱۰/µg ۲۴۰ ,۱۲۰,۶۰) و در ناحیه کمری نخاع در دوزهای (µl/rat ۱۰/µg ۲۴۰ ,۱۲۰) کاهش داد.

نتیجه‌گیری: تجویز مرکزی ماینوسایکلین، افزایش گلوتامات القاء شده توسط مورفین در کورتکس و ناحیه کمری نخاع را کاهش می‌دهد. این اثر می‌تواند یک مکانیسم احتمالی برای تأثیر ماینوسایکلین روی تحمل القاء شده بوسیله مورفین باشد.

کلید واژه‌ها: مورفین، ماینوسایکلین، گلوتامات، تحمل، داخل بطن مغزی

وصول مقاله: ۸۹/۴/۱۵ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۶/۱۵ پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۵

مقدمه

اپیوئیدها به عنوان یکی از بهترین گروه‌های دارویی جهت کاهش دردهای شدید حاد و مزمن همچنان به طور وسیع به کار گرفته می‌شوند. اما مشکل عمده‌ای که برای مصرف طولانی مدت اپیوئیدها وجود دارد مسأله بروز تحمل و به دنبال آن بروز وابستگی به آنها می‌باشد. وابستگی و تحمل به مورفین خصوصاً اثرات ضددردی مورفین یکی از مشکلات و عوامل محدود کننده مصرف این داروها در بیماران مبتلا به دردهای حاد و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مزمن است. مطالعات مختلف در زمینه داروها و عواملی که بتوانند تحمل و وابستگی به اپیوئیدها را کاهش دهند، صورت گرفته است و همگی بیان‌کننده این هستند که جهت کاهش این پدیده‌ها شناخت مکانیسم‌های دخیل در تحمل و وابستگی ضروری است (۲و۱).

یکی از مهمترین شاخه‌های مطالعه در نوروفارماکولوژی بررسی مکانیسم‌های بروز تحمل به اپیوئیدها و یافتن راه‌هایی برای جلوگیری و یا به تعویق انداختن آن می‌باشد که در صورت توانایی جلوگیری از بروز این پدیده، کاربرد کلینیکی این داروها افزایش خواهد یافت. بطور قطع از بین مکانیسم‌های درگیر در پدیده تحمل به ترکیبات اپیوئیدی، سیستم نوروترانسمیتری گلوتامات، نیتریک اکساید و گیرنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی خصوصاً گیرنده‌های NMDA از جایگاه مهمی برخوردارند (۶-۳). فعال شدن گیرنده‌های اپیوئیدی منجر به ورود کلسیم به داخل سلول، افزایش فعالیت نیتریک اکساید سنتاز (NOS) و افزایش تولید نیتریک اکساید (NO) می‌شود. نیتریک اکساید منجر به افزایش آزاد شدن گلوتامات از نورون‌های پیش سیناپسی می‌شود و این افزایش سطح گلوتامات خود منجر به سمیت در سلول‌های عصبی می‌گردد (۹-۷ و۳).

آزاد شدن پس سیناپسی NO در پی فعال شدن گیرنده NMDA آغازگر آزاد شدن گلوتامات از نورون پیش سیناپسی است. یعنی NO به عنوان یک ناقل عصبی به صورت فیدبک مثبت منجر به آزاد سازی بیشتر گلوتامات می‌شود (۸ و۷). افزایش تولید نیتریک اکساید در بدن از طریق مکانیسم‌های زیر و نیز به واسطه افزایش Ca^{2+} داخل سلولی سبب افزایش تحمل و وابستگی به اپیوئیدها می‌شود. این مکانیسم‌ها شامل: آزاد شدن گلوتامات از قسمت پیش سیناپسی (۷ و۳)، افزایش گوانوزین مونوفسفات حلقوی (cGMP) (۷ و۳)، فعال‌سازی پروتئین کیناز C (PKC) (۵) و تولید پراکسی نیتریت ($ONOO^-$) می‌باشند (۷).

نیتریک اکساید تولید شده از طریق مکانیسم‌های فوق‌الذکر در نهایت منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی و افزایش تحریک‌پذیری سلول و در نتیجه افزایش حساسیت به درد، اینترنالیزاسیون و تنظیم کاهشی گیرنده‌های اپیوئیدی، فسفریلاسیون برخی پروتئین‌های کلیدی و مهار پاسخ‌های فیزیولوژیک شده که در نهایت همه این عوامل منجر به کاهش اثرگذاری مورفین بر سلول شده و تحمل و وابستگی به مورفین را افزایش می‌دهد (۸ و۷).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ماینوسایکلین و مشتقات نیمه صناعی دیگر تتراسایکلین، باعث ایجاد اثرات نوروپروتکتیو در مقابل ایسکمی مغزی در موش صحرایی شده‌اند (۱۱ و۱۰). در این مطالعات اثر نوروپروتکتیو ماینوسایکلین با کاهش فعالیت NOS همراه بوده است (۱۲). از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که ماینوسایکلین می‌تواند توسط بلوک کانال‌های کلسیم ولتاژی، آزاد شدن گلوتامات و افزایش سطح یون کلسیم را در نورون‌های هیپوکامپ کاهش دهد (۱۳)

با توجه به مطالب فوق در رابطه با ماینوسایکلین، در مطالعه حاضر اثر این دارو بر تحمل به اثرات ضددردی و افزایش گلوتامات ناشی از مصرف مورفین در دو ناحیه کورتکس و نخاع رت مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

روش بررسی

حیوانات

مطالعه حاضر به صورت تجربی و در ۱۳ گروه (شامل ۱۰۶ سر) انجام شد. در این مطالعه موش‌های صحرایی (رت) نر نژاد ویستار (مؤسسه رازی، تهران، ایران) در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. آنها در یک اتاق در درجه حرارت کنترل شده ۲±۲۵ درجه سانتیگراد با دوره‌های تاریکی روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شده و به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. تمام آزمایشات براساس پروتکل راهنمای مراقبت و کاربرد حیوانات آزمایشگاهی (نشریه شماره ۸۵۲۳ مؤسسه ملی بهداشت، تجدید نظر شده در سال ۱۹۸۵) انجام شد و مورد تایید کمیته اخلاق در تحقیق دانشگاه علوم پزشکی تبریز قرار گرفته‌اند.

گروه‌های مورد مطالعه

این مطالعه در دو بخش ارزیابی رفتاری و اندازه‌گیری سطح گلوتامات در نواحی کورتکس و نخاع انجام شد.

گروه‌های رفتاری (۸ سر در هر گروه) به قرار زیر بود و آزمایشات تا آنجا ادامه می‌یافت که تفاوت معنی‌داری در اثر ضد دردی بین گروه‌های درمانی و گروه سالین در هر روز وجود نداشته باشد.

- گروه دریافت‌کننده سالین به صورت داخل صفاقی (جهت مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین)
- گروه دریافت‌کننده سالین به صورت داخل بطن مغزی (جهت مقایسه با اثر ضد دردی مؤثرترین دوز ماینوسایکلین)
- گروه دریافت‌کننده مورفین به صورت داخل صفاقی + آب مقطر به صورت داخل بطن مغزی (گروه کنترل)
- گروه‌های دریافت‌کننده مورفین به صورت داخل صفاقی + دوزهای مختلف ماینوسایکلین (µg/۱۰ µl/rat ۶۰,۱۲۰, ۲۴۰) به صورت داخل بطن مغزی.
- گروه دریافت‌کننده ماینوسایکلین (µg/۱۰ µl/rat ۱۲۰) به تنهایی به صورت داخل بطن مغزی (جهت ارزیابی اثر ضد دردی مؤثرترین دوز ماینوسایکلین در کاهش تحمل مورفین).

جهت ارزیابی سطح گلوتامات در نواحی کورتکس و نخاع در گروه‌های مورد مطالعه (٦ سر در هر گروه) ۲ ساعت بعد از تزریق حامل یا دارو در روز نهم (یک روز بعد از کامل شدن تحمل در گروه کنترل)، نمونه‌های بافتی جدا گردید.

گروه‌ها جهت ارزیابی سطح گلوتامات به قرار زیر بودند:

- گروه دریافت‌کننده سالین به صورت داخل صفاقی + آب مقطر به صورت داخل بطن مغزی (جهت مقایسه با گروه دریافت‌کننده مورفین)
- گروه دریافت‌کننده مورفین به صورت داخل صفاقی + آب مقطر به صورت داخل بطن مغزی (گروه کنترل)
- گروه‌های دریافت‌کننده مورفین به صورت داخل صفاقی + دوزهای مختلف ماینوسایکلین (µg/۱۰ µl/rat ۶۰,۱۲۰, ۲۴۰) به صورت داخل بطن مغزی.
- گروه دریافت‌کننده ماینوسایکلین (µg/۱۰ µl/rat ۱۲۰) به تنهایی به صورت داخل بطن مغزی.

کانال گذاری داخل بطن مغزی(ICV)

موش‌ها توسط سدیم پنتوباربیتال (مرک آلمان) (۵۰mg/kg, IP) بیهوش شدند و تحت عمل جراحی یک سرسوزن (gauge:۲۳) در داخل بطن جانبی مغز به مختصات (۰/۸- میلی‌متر خلفی، ۱/۳- میلی‌متر لاترال و

۳/۵ میلی‌متر شکمی به نسبت نقطه برگما) بر اساس نقشه پاکسینوس کار گذاشته شد (۱٤). سپس یک سرسوزن دندانپزشکی (gauge:۳۰) در داخل کانال راهنما (سرسوزن قبلی) قرار داده شد تا از آلودگی و گرفتگی کانال جلوگیری شود. بعد از جراحی و قبل از شروع آزمایشات یک دوره بهبودی ۷ روزه برای هر حیوان در نظر گرفته شد. طی دوره بهبودی حیوانات به محیط آزمایش نظیر انتقال به اطاق آزمایش، حمل کردن، وزن کشی و قرار دادن در روی صفحه دستگاه Hotplate بمدت یک دقیقه، عادت داده شدند. و در همه گروه‌ها، آزمایش بعد از یک دوره بهبود ۷ روزه شروع شد.

تایید صحت محل کانال

در پایان همه آزمایشات رفتاری، ۵ µl محلول متیلن بلو به داخل کانال تزریق گردید و حیوانات با دوز بالای اتر و بدنبال آن جدا کردن سر کشته شدند. مغز هر حیوان خارج گردیده و برش داده شد تا جایگزینی کانال‌ها و توزیع متیلن بلو در حفره‌های بطن مغز تایید گردد. فقط اطلاعات مربوط به حیواناتی که توزیع یکنواخت متیلن بلو در حفره‌ها را نشان دادند، برای تحلیل آماری مورد استفاده قرار گرفت. روی هم رفته نتایج مربوط به شش حیوان نادیده گرفته شد زیرا که جایگزینی کانال راهنما در آنها مورد تأیید قرار نگرفت.

درمان داروئی

سولفات مورفین (سیگما آلدریچ، آلمان) روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش در آب دوبار تقطیر حل شده و با استفاده از سرنگ انسولین تزریق داخل صفاقی صورت می‌گرفت. نرمال سالین یا ماینوسایکلین (µl/rat ۱۰/µg ۶۰,۱۲۰, ۲۴۰) در نرمال سالین ۰/۹٪ حل شده و با استفاده از سرنگ همیلتون تزریق داخل بطن مغزی صورت می‌گرفت. حجم تزریق µl ۱۰ و با سرعت دقیقه/µl ۱۰ برای هر موش انجام می‌شد.

تشخیص احساس درد

احساس درد با استفاده از دستگاه hotplate اندازه‌گیری می‌شد. اثر دردزایی با استفاده از تست hotplate وقتی ثبت می‌گردید که موش پای عقب خود را می‌لیسید. یک حداکثر تأخیر زمانی ٤۰ ثانیه‌ای برای جلوگیری از آسیب بافتی در نظر گرفته می‌شد. اثر دردزایی تست hotplate بعنوان درصد حداکثر اثر ممکن (MPE٪) با استفاده از رابطه زیر بیان گردید.

MPE= [(TL-BL) / Cut-off Time – BL)]×100٪

BL: Base line
TL: Latency time

Base line برای هر موش یک بار در روز، قبل از تزریق روزانه مورفین تعیین می‌گردید. بعد از ۲۰ دقیقه داروها تزریق می‌شدند و Latency time، ۱۰ دقیقه بعد از تزریق دارو یا حامل (۳۰ دقیقه بعد از تزریق مورفین) اندازه‌گیری شده سپس MPE٪ برای آن روز محاسبه می‌شد. آزمایشات تا آنجا ادامه می‌یافت که تفاوت معنی‌داری در MPE٪ بین گروه‌های درمانی و گروه سالین در هر روز وجود نداشته باشد.

ارزیابی اثرات کلی تسکین درد

برای ارزیابی اثرات کلی تسکین درد و مقایسه اثرات آزمون رفتاری، سطح زیر منحنی (AUC) برای منحنی MPE% محاسبه گردید. به منظور محاسبه AUC از قانون ذوزنقه استفاده شد.

آماده سازی بافت

برای اندازه‌گیری غلظت گلوتامات، همه حیوانات (٦ سر در هر گروه) تحت رژیم درمانی یکسان با گروه‌های رفتاری قرار گرفتند. در روز نهم (یک روز بعد از کامل شدن تحمل در گروه کنترل)، ۲ ساعت بعد

از تزریق حامل یا دارو، حیوانات با پنتوباربیتال کشته شدند و کورتکس و ناحیه کمری نخاع سریعاً جدا گردید.

آنالیز نوروترانسمیتر گلوتامات با HPLC

برای بررسی نوروترانسمیتر گلوتامات از HPLC استفاده شد. نمونه‌های بافتی هموژنیزه شده و تست تعیین میزان پروتئین انجام شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ شتاب ثقل سانتریفیوژ شد. دستگاه HPLC مدل KNAUER ساخت کشور آلمان بود. سیستم شامل یک پمپ چهار واحدی، یک دتکتور فلورسنت (FLD) RF-551 و یک نمونه‌گیر اتوماتیک (Spark, Triatlon) بود که بوسیله نرم افزار Chromgate کنترل می‌شد. ستون آنالیز استفاده شده از نوع Hypersil ODS (۴×۲۵۰ میلی‌متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتری بود) با فاز معکوس در دمای اطاق بود. برای جدایی کروماتوگرافیک، فاز متحرک از ۸٪ استونیتریل در ۱۲/۵ میلی مولار بافر فسفات با pH= ۷/۲، با یک مشتق اسید آمینه گلوتامات (o-phthalaldehyde) تشکیل شده بود که با یک جریان گرادیانت یک میلی‌لیتر بر دقیقه به مدت ۸ دقیقه و ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه شسته می‌شد. ردیابی با طول موج‌های ۳۳۰ و ۴۶۰ نانومتر به ترتیب به عنوان طول موج‌های تحریک و نشر انجام شد. اسید گلوتامیک به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های ۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ۶ و ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید گلوتامیک به دستگاه HPLC تزریق شد و منحنی کالیبراسیون رسم گردید. محلول ۲/۵٪ مایع رویی در آب مقطر برای جداسازی و تعیین گلوتامات استفاده شد. میزان گلوتامات از مقایسه پیک‌های بدست آمده از نمونه‌ها با پیک‌های استاندار محاسبه و مقادیر به صورت پیکومول بر ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین بیان شدند (۱۵).

آنالیز آماری

داده‌های بخش رفتاری به صورت میانگین MPE±SEM٪ برای ۸ موش در هر گروه بیان شده است. به منظور یافتن روز کامل شدن تحمل و برای مقایسه MPE٪ بین گروه سالین و گروه‌های درمانی در هر روز از Student's t-test بهره گرفته شد. آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و بدنبال آن آزمون تعقیبی Tukey's برای تحلیل آماری در مقایسه چندگانه مورد استفاده قرار گرفت. در همه تحلیل‌ها مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. *p<۰/۰۵ و **p<۰/۰۱ و ***p<۰/۰۰۱ حاکی از تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین برای آن روز است. داده‌های AUC و نتایج بدست آمده از HPLC با استفاده از تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

بررسی اثر ماینوسایکلین بر تحمل به اثرات ضددردی مورفین

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد؛ روز کامل شدن تحمل برای گروه کنترل، روز ۸ می‌باشد. ماینوسایکلین در دوزهای (۶۰, ۱۲۰ µg/۱۰ µl) توانسته است روز کامل شدن تحمل را به مدت ۴ روز به تعویق بیاندازد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p <۰/۰۰۱). در مورد دوز (۲۴۰ µg/۱۰ µl) ماینوسایکلین روز کامل شدن تحمل را به طور معنی‌داری از روز ۸ به روز ۱۳ به تعویق انداخت (p <۰/۰۰۱).

بررسی اثر ضددردی ماینوسایکلین

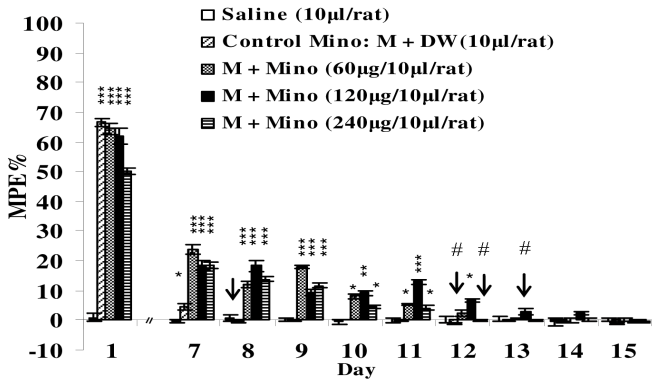
همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌گردد ماینوسایکلین با مؤثرترین دوز در کاهش تحمل به اثرات ضددردی مورفین (۱۲۰ µg/۱۰ µl)، اثر ضددردی معنی‌داری به لحاظ آماری نداشت.

ارزیابی اثر ضد دردی تام مورفین در گروه کنترل و گروه‌های درمانی

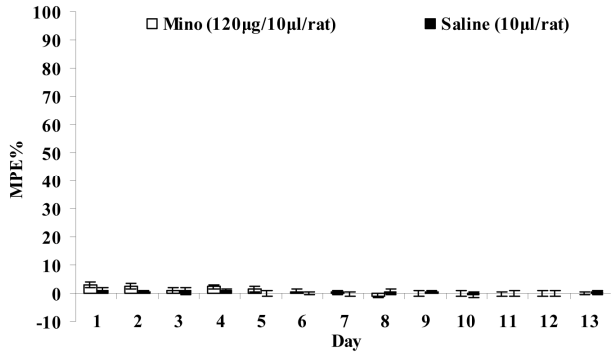
همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است سطح زیر منحنی (AUC) بیشترین اثر ممکن (%MPE) برای هر گروه در مدت ۱۳ روز محاسبه شده است. تفاوت بین گروه‌های درمانی ماینوسایکلین با گروه کنترل (سالین+مورفین) با آنالیز آماری ANOVA یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey's بررسی شد. نتایج نشان دادند که سطح زیر منحنی MPE% در گروه کنترل با گروه‌های درمانی ماینوسایکلین (۶۰,۱۲۰, ۲۴۰ µg/۱۰ µl/rat) اختلاف معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) دارد که نشان دهندهٔ افزایش اثرات ضد دردی مورفین در تجویز همزمان با دوزهای مختلف ماینوسایکلین است.

ارزیابی اثر ماینوسایکلین بر غلظت گلوتامات در کورتکس و ناحیهٔ کمری نخاع حیوانات تحت درمان با مورفین

نتایج جدول ۲ و ۳ نشان داد که تجویز مورفین (۱۰mg/kg, ip) به مدت ۹ روز به طور معنی‌داری منجر به افزایش غلظت گلوتامات در کورتکس و ناحیهٔ کمری نخاع موش صحرایی شد (p<۰/۰۰۱). همچنین نتایج نشان دادند که تزریق داخل بطن مغزی دوزهای مختلف ماینوسایکلین (۶۰,۱۲۰, ۲۴۰ µg/۱۰ µl/rat) به همراه مورفین از افزایش غلظت گلوتامات بواسطه مورفین در کورتکس مغز جلوگیری نموده که در مقایسه با گروه کنترل (سالین+مورفین) تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) نشان داد. اما ماینوسایکلین فقط در دوز (۱۲۰, ۲۴۰ µg/۱۰ µl/rat) توانست از افزایش غلظت گلوتامات در ناحیهٔ کمری نخاع ناشی از مورفین جلوگیری نماید.



نمودار ۱. اثر ضد دردی تجویز روزانه مورفین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت IP) به همراه آب مقطر (۱۰ میکرولیتر ICV) یا نرمال سالین (۱۰ میکرولیترICV). تحمل به اثر ضد دردی مورفین در روز هشتم زمانی که بین حداکثر اثر ممکن (MPE%) در گروه‌های کنترل و سالین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، کامل شد. هر ستون نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار MPE% در ۸ رت می‌باشد. در همه تحلیل‌ها مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظرگرفته می‌شد. p<۰/۰۵* و p<۰/۰۱ و p <۰/۰۰۱ *** حاکی از تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین برای آن روز است. p<۰/۰۰۱ # در مقایسه با گروه کنترل (مورفین + آب مقطر) می‌باشد. فلش نشان دهنده روز کامل شدن تحمل می‌باشد. M=morphine، DW=distilled water، Mino=minocycline.**



نمودار ۲: مقایسه اثر ضددردی موثرترین دوز ماینوسایکلین (۱۲۰µg/۱۰µl/rat) در کاهش تحمل به اثرات ضددردی مورفین نسبت به سالین (۱۰ µl/rat). هر ستون بیانگر میانگین MPE٪ ± SEM برای ۸ موش صحرایی می‌باشد. Mino = Minocycline

جدول ۱. اثر ضد دردی کلی مورفین در گروه های کنترل و درمان در طی ۱۳ روز

درمان	سطح زیر منحنی (AUC)	SEM
مورفین + آب مقطر	۱۷۷/۵	٤/۲
مورفین + ماینوسایکلین (۶۰ µg/۱۰ µl/rat)	* ۲٦٤/۷	۷/۳
مورفین + ماینوسایکلین (۱۲۰µg/۱۰ µl/rat)	* ۲۸۹/۳	۲/٦
مورفین + ماینوسایکلین (۲۴۰ µg/۱۰ µl/rat)	* ۲٤۳/۷	۲/۹

ناحیه زیر منحنی (AUC) نمودار MPE% برای هر گروه به مدت ۱۳ روز محاسبه شد. P<۰/۰۵ در همه گروه ها معنی دار در نظر گرفته شد. p<۰/۰۵* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل (مورفین + آب مقطر)

جدول ۲: مقایسه غلظت گلوتامات در ناحیهٔ کورتکس موش صحرایی در مصرف رژیمهای درمانی مختلف

(¶mol /۱۰۰ mg protein) ğĺňţĺźŷŲ ŘŢŷţ	Ɔĺňţóĺĺŕ ĆŬó
ħĦĝ/Ĩ ² ē/Č	(icv) ÀÛÔňţ ãÙ + (ÞţĺÁò Ôňţĺĺ) Kzóźţ
***čĚĎ ² đ/dĚ	(icv) ÀÙÔňţ ãÙ + (ÞţĺÁò Ôňţĺĺ) Kŷĺè
***ĎĚĎ/đ ² Ē/ĎĐ	(٦۰ µg/۱۰ µl/rat) KŷŮŷĺèźŷĺňţ + Kzóźţ
***ĎĐd/ē ² d/ĚČ	(۱۲۰µg/۱۰ µl/rat) KŷŮŷĺèźŷĺňţ + Kzóźţ
***ĎĐĐ/Ě ² Ē/ĐĚ	(۲٤۰ µg/۱۰ µl/rat) KŷŮŷĺèźŷĺňţ + Kzóźţ
***čĒd/ē ² Đ/Đđ	(۱۲۰ µg/۱۰ µl/rat) KŷŮŷĺèźŷĺňţ

هر داده نمایانگر میانگین ² SEM برای ٦ موش است. به منظور ارزیابی اختلاف معنی دار آماری از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. *** p <۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل (مورفین + آب مقطر) می باشد.

جدول ۳: مقایسه غلظت گلوتامات در ناحیهٔ کمری نخاع موش صحرایی در مصرف رژیمهای درمانی مختلف

Ɔȧŋǿǻ ƇŪø	(¶mol /۱۰۰ mg protein) ğĺŋǻźŷŲ ŘŢŷţ
ÀÛÔŋ ãŭ + Kzǿzŋ	ĥĩŦŦ/Ĩ ² Ð/ē
ÀÛÔŋ ãŭ + Kŭǻè	***ČĚČ ² ď/Ē
(٦٠ µg/۱۰ µl/rat) Kŷůǻèzǻŋ + Kzǿzŋ	čĒÐ/đ ² ď/đÐ
(۱۲۰µg/۱۰ µl/rat) Kŷůǻèzǻŋ + Kzǿzŋ	**čÐď/ē ² đ/ÐČ
(۲٤۰ µg/۱۰ µl/rat) Kŷůǻèzǻŋ + Kzǿzŋ	***čČÐ/ĒČ ² đ/Ð
(۱۲۰ µg/۱۰ µl/rat) Kŷůǻèzǻŋ	***ČēĎ/ē ² Ð/ď

هر داده نمایانگر میانگین ² SEM برای ٦ موش است. به منظور ارزیابی اختلاف معنی دار آماری از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. ۰/۰۱>p** و ۰/۰۰۱> p *** در مقایسه با گروه کنترل (مورفین + آب مقطر) می باشد.

بحث

نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان دادند که تزریق داخل بطن مغزی ماینوسایکلین از افزایش گلوتامات القاء شده توسط مورفین جلوگیری می‌کند. این اثر به نظر می‌رسد در کاهش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین ناشی از ماینوسایکلین یک نقش کلیدی داشته باشد.

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که مصرف مزمن اپیوئیدها منجر به تحمل به اثرات ضد دردی می‌شود و نیاز به افزایش دوز، برای ایجاد همان اثرات ضد دردی قبلی را ایجاد می‌کند. مکانیسم‌های نوروبیولوژیک تحمل به اپیوئیدها بسیار پیچیده و تا حدودی ناشناخته‌اند. شواهد نشان داده‌اند که رسپتورهای گلوتامات (NMDA) در پلاستیسیته ناشی از مصرف مزمن اپیوئیدها نقش دارند (۱۹-۱۶). این نظریه توسط Trujillo و همکاران پیشنهاد شد. آنها نشان دادند که آنتاگونیست‌های رسپتورهای NMDA تحمل به اثرات ضد دردی مورفین را کاهش می‌دهند. نتایج مطالعات رفتاری ما و دیگران نشان می‌دهند که دسته وسیعی از آنتاگونیست‌های رسپتورهای NMDA از تحمل به اثرات ضد دردی مورفین پیشگیری می‌کنند (۲۲-۱۶). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که فعال شدن رسپتورهای NMDA منجر به ورود کلسیم به داخل سلول و افزایش غلظت Ca^{2+} داخل سلولی می‌شود که خود منجر به اثرات متعددی شامل: تسهیل فعالیت کلسیم کالمودولین کیناز Π (CaMkII) (۲۳)، تنظیم فیدبک مثبت فعالیت پروتئین کیناز C (PKC) (۱۹) و فعال شدن نیتریک اکساید سنتاز (NOS) می‌شود (۶و۵). نیتریک اکساید با افزایش آزاد سازی گلوتامات از نورون‌های پیش سیناپسی و همچنین مهار ترانسپورترهای گلوتامات سبب القاء سمیت سلولی می‌گردد.

ماینوسایکلین مشتق نیمه صناعی تتراسایکلین است که اثرات نوروپروتکتیو قابل ملاحظه‌ای در آسیب‌های نورونی در مدل‌های حیوانی نشان داده است (۲۷-۲۴ و ۱۲) مطالعات نشان داده‌اند که ماینوسایکلین دارای اثرات متعددی می‌باشد که شامل: کاهش فعالیت NOS و ایجاد اثرات نوروپروتکتیو (۱۲)، تأثیرات نوروپروتکتیو به واسطه دخالت این دارو در مسیرهای

داخل سلولی از جمله اثرات آنتی اکسیدانی (۲۸)، اثرات بلوکری روی فاکتورها و پاسخ‌های التهابی (۲۹) و مهار آزادسازی فاکتورهای تسهیل کننده آپوپتوزیس مثل Bax و Bak و Bid و... از سیتوکروم C و غشاء میتوکندری و در نتیجه جلوگیری از اثرات مهاری این فاکتورها روی BCL-2 و در نتیجه افزایش بیان BCL-2 و جلوگیری از آپوپتوزیس است (۳۰).

نتایج مطالعات ما نشان دادند که مصرف مزمن مورفین به مدت ۸ روز سبب بروز تحمل به اثرات ضد دردی آن می‌شود. ماینوسایکلین (۱۲۰μg/۱۰ μl/rat) توانست تحمل به اثرات ضد دردی مورفین را به مدت ۵ روز و در دوزهای (۶۰، ۲۴۰ μg/۱۰ μl/rat) تحمل به اثرات ضد دردی را از روز ۸ به روز ۱۲ به تعویق بیندازد. از طرفی اثرات تام ضد دردی مورفین (سطح زیر منحنی ٪MPE) به طور معنی‌داری در گروه‌های درمانی افزایش پیدا کرد. اگرچه اختلاف معنی‌داری بین اثر دوزهای مختلف ماینوسایکلین وجود نداشت، دوز ۱۲۰μg/۱۰ μl/rat مؤثرترین دوز در کاهش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین بود.

در بخش دیگری از نتایج مشاهده شد که تجویز دوزهای مختلف ماینوسایکلین به تنهایی اثرات ضد دردی معنی‌داری ندارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر ماینوسایکلین در کاهش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین به خاطر اثرات ضد دردی خود ماینوسایکلین نمی‌باشد. در تأیید نتایج حاصل از تأثیر ماینوسایکلین در مطالعه اخیر، Mika و همکاران نشان داده‌اند که تجویز سیستمیک ماینوسایکلین سبب کاهش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین می‌شود. آنها مکانیسم اثر ماینوسایکلین را به کاهش فعالیت میکروگلیاها ارتباط دادند.

از طرفی مشخص شده است که پایانه‌های گلوتاماترژیک در نواحی وسیعی از CNS از جمله کورتکس مغز، هیپوکامپوس، آمیگدال، تالاموس و هیپوتالاموس، مخچه، هسته زیتونی تحتانی و نخاع یافت می‌شوند و گلوتامات یک نوروترانسمیتر تحریکی مهم CNS است که نقش‌های مهمی در فرآیندهای عصبی همچون انتقال سریع سیناپسی و پلاستی سیتی نورونی دارد. سیگنالینگ گلوتاماترژیک نه تنها در CNS بلکه در PNS و بافت‌های غیر عصبی هم به اثبات رسیده است (۳۱). همچنین مشخص شده است که فعال شدن مکرر یا مداوم کانال‌های دریچه‌دار گلوتاماتی ممکن است باعث دژنراسیون نورونی در بیماریهای نورودژنراتیو، سکته مغزی و صرع شود. گلوتامات و اسیدهای آمینه مرتبط با آن، عمده ترین نوروترانسمیترهای تحریکی در مغز هستند که بوسیله حدود ۴۰٪ سیناپسها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۲). بنابراین هر عاملی که میزان گلوتامات را به عنوان یک نوروترانسمیتر مهم در نواحی فوق تغییر دهد، می‌تواند در روندهای مختلف رفتاری تأثیر داشته باشد.

بررسی‌های اخیر به روشنی بیان می‌کنند که ماینوسایکلین آزاد سازی گلوتامات را در ناحیه هیپوکامپ مهار می‌کند و به تبع آن سطح Ca^{2+} و تحریک نورون‌های تحت مطالعه کم شده و از مرگ سلولی به واسطه افزایش Ca^{2+} جلوگیری می‌کند. این کاهش تحریک سلولی به همراه کاهش آزادسازی گلوتامات توجیه مناسبی برای اثرات سیتوپروتکتیو ماینوسایکلین می‌باشد (۳۳).

در بخش دیگری از مطالعه، نشان داده شد که مصرف مزمن مورفین، سطح گلوتامات در کورتکس و ناحیه کمری نخاع را افزایش می‌دهد. این نتایج با

یافته‌های حاصل از مطالعه قبلی ما که در آن تجویز مورفین به مدت ۸ روز سطح گلوتامات را در نواحی فوق افزایش داده بود، هم خوانی دارد (۳۴).

در مطالعه حاضر دوزهای مختلف ماینوسایکلین (۶۰,۱۲۰, ۲۴۰ µg/۱۰ µl/rat) به همراه مورفین از افزایش غلظت گلوتامات بواسطه مورفین در کورتکس جلوگیری کرده و سطح گلوتامات در این ناحیه را به طور معنی‌داری کاهش داد. هر چند که غلظت تام گلوتامات در بافت متناسب با میزان نوروتوکسیسیته القاء شده به واسطه آن نیست، اما نتایج مطالعات ما مؤید یافته‌های پیشین (۳۷-۳۵ و ۱۹-۱۶) که نشان داده بودند، مورفین سبب افزایش غلظت گلوتامات در CNS می‌شود، می‌باشد.

در بخش دیگری از مطالعه، مشاهده شد که ماینوسایکلین (۱۲۰, ۲۴۰ µg/۱۰ µl/rat) به همراه مورفین از افزایش غلظت گلوتامات بواسطه مورفین در ناحیه کمری نخاع جلوگیری می‌کند. تفاوت تأثیر دوزهای مختلف ماینوسایکلین در کورتکس و نخاع، احتمالاً به علت موقعیت این دو ناحیه نسبت به محل تزریق می‌باشد. چرا که در تزریق ICV مقادیر کمتری از دارو به نخاع نسبت به کورتکس رسیده است.

مطالعات دیگری نشان داده‌اند که فعال شدن گیرنده‌های NMDA باعث فعال شدن سلول‌های میکروگلیال می‌شود که این سلول‌ها در مرگ سلولی دخالت دارند و ماینوسایکلین با مهار تکثیر سلول‌های میکروگلیال و اثرات ضد التهابی که دارد، از اثر سیتوتوکسیک فعال شدن NMDA جلوگیری می‌کند (۱۲).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق داخل بطن مغزی دوزهای مختلف ماینوسایکلین موجب کاهش تحمل به اثرات ضددردی مورفین می‌شود و مکانیسم آن را می‌توان به تأثیر ماینوسایکلین بر غلظت گلوتامات در نواحی مختلف CNS از جمله کورتکس و نخاع نسبت داد.

تشکر و قدردانی

این طرح مصوب مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد و نویسندگان مقاله بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسؤولین این مرکز اعلام می دارند.

References

1. Mayer Dj, Mao J. Mechanisms of opioid tolerance current view of cellular mechanisms. Pain Forum 1999; 8: 14-18.
2. Leonard AS, Hell jW. Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosophorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. J. Biology Chem 1997; 272: 12107-12115.
3. Wei-Mng Lue, Mie-Tsu Su ,Wei-Bin Lin, Pao-Luh Tao. The role of the nitric oxide in the development of morphine tolerance in rat hippocampal slices. European Journal of Pharmacology 1999; 383: 129-135.
4. Montague PR, Gancayco CD, Winn M J, Marchase RB, Friedlander M J. Role of NO production in NMDA receptor mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. Sciences 1994; 263-273.
5. Pasternak GW, Kolesnikov YA, Babey AM. Perspectives on the N-Methyl-D-spartate/ Nitric Oxide Cascade and Opioid Tolerance. Neuropsychopharmacology 1995; 13:309-313.
6. Eri L.Heinzen, Early M.Pollack. Pharmacodynamics of morphine-induced neuronal Nitric Oxide production and antinociceptive tolerance development. Brain Research 2004; 1023: 175-184.

7. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology 9th ed. Mc Growhill: New York 2004. p: 403-410,626-647.
8. Adams ML, Kalicki JM, Meyer ER, Cicero TJ. Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by nitric oxide syntheses inhibitor, N-nitro-L-Arginine methyl ester. Life Sciences 1993; 52:245-249.
9. Cha EY, Harris JR. Nitroglycerin inhibits the development of morphine tolerance and dependence in rats. Pharmacology. Biochemistry and Behavior 2003; 74:551-557.
10. Yrja N J, Keina R n, Pellikka M, Kfelt T H, Koistinaho J. Etracyclines inhibit microglia activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Aca Sciences 1998; 95:157-169.
11. Yrja NJ. Tikka, Keina Nen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. Proc Natl Acad Sciences 1999; 96:13496-13500.
12. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-Methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting, microglia. J Immunology 2001; 166: 7527-7533.
13. González JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernandez-Gomez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandía L, and et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. Eur J Neurosci 2007 Nov; 26: 2481-95.
14. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. Academic Press: London, 1998.
15. Nemati M, Oveisi M R, Abdollahi H and Sabzevari O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. J Pharm Biomed Anal 2004; 34: 485-492.
16. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. Science 1991; 251:85-7.
17. Trujillo KA. Effects of non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on opiate tolerance and physical dependence. Neuropsychopharmacol 1995; 13: 301-7.
18. Trujillo KA. The neurobiology of opiate tolerance, dependence and sensitization: Mechanisms of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. Neurotox Res 2002; 4: 373-391.
19. Mao J. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. Brain Res Rev 1999; 30: 289-304.
20. Habibi-Asl B, Hassanzadeh K. Effects of ketamine and midazolam on morphine induced dependence and tolerance in mice. DARU 2004; 12: 101-5.
21. Habibi-Asl B, Hassanzadeh K, Moosazadeh S. Effects of ketamine and magnesium on morphine induced tolerance and dependence in mice. DARU 2005; 13: 110-5.
22. Habibi-Asl B, Hassanzadeh K, Khezri E Mohammadi S. Evaluation the effects of dextromethorphan and midazolam on morphine induced tolerance and dependence in mice. Pak J Biol Sci 2008; 11: 1690-95.
23. Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M, et al. the human μ-opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcum / calmodution – dependent kinase and protein kinase C. J Neurosci 1995; 15:2396-2406.
24. Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E. Minocycline inhibits caspase-independent and-dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. Proc Natl Acad Sci 2003; 100: 10483-87.
25. Zhu S, Stasvrovskaya IG, Drozda M, Kim BYS, Ona V, Li M, and et al. Minocycline inhibits cytochrome C release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. Nature 2002; 417: 74-8.
26. Hunter CL, Quintero EM, Gilstrap L, Bhat NR, Granholm A. Minocycline protects basal forebrain cholinergic neurons from mu p75-saporin immunotoxic lesioning. Eur J Neurosci 2004; 19: 3305-16.
27. He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cell after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. Brain Res 2001; 909: 187-193.

28. Kraus RL, Pasiweczny R, Lariosa WK, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline, neuroprotection in an oxidative stress and direct radical-scavenging activity. J Neurochem 2005; 94: 819-827.
29. Stirling DP, Khodarahmi K, Steeves JD, Tetzlaff W. Minocycline as neuroprotective agent. Neuroscientist 2005; 11:308-322.
30. Wang J, Wei Q, Wang CY, William DM, David CH, Dong Z. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. J Biology Chem 2004; 279:19948-19954.
31. Moriyama Y, Yamamoto A. Glutamatergic chemical transmission: look! Here, there, and anywhere. J Biochem 2004; 135: 155-63.
32. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science 1993; 262: 689-95.
33. Gonzalez JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernandez-Gomez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandía L, et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca2+ signaling in hippocampal neurons. Eur J Neurosci 2007; 26: 2481-2495.
34. Hassanzadeh K, Habibi-asl B, Roshangar L, Nemati M, Ansarin M, Farajnia S. Intracerebroventricular administration of riluzole prevents morphine-induced apoptosis in the rat lumbar spinal cord. Pharmacol Rep 2010; 62:664-673.
35. Bobula B, Hess G. Effects of morphine and methadone treatments on glutamatergic transmission in rat frontal cortex. Pharmacol Rep 2009; 61: 1192-1197.
36. Inturrisi CE. Preclinical evidence for a role of glutamatergic systems in opioid tolerance and dependence. Semin Neurosci 1997; 9: 110-119.
37. Wang SJ, Wang KY, Wang WC. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). Neuroscience 2004; 125:191-201.