



Effect of chronic morphine administration on Ca²⁺/Calmodulin-Dependent protein kinase II α activity in rat locus coeruleus and its possible role in morphine dependency

Mojdeh Navidhamidi, Mohammad Javan, Yaghoub Fatholahi, Saeed Semnanian*

Dept. Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 1 Dec 2009

Accepted: 5 May 2010

Abstract

Introduction: The aim of this study was to assess the effect of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II α (CaMKII α) inhibitor (KN-93) injection into the locus coeruleus (LC) on the modulation of withdrawal signs. We also sought to study the effect of chronic morphine administration on CaMKII α activity in the rat LC.

Methods: The research was based on behavioral and molecular studies. In the behavioral study, we cannulated the LC with stereotaxic surgery and after 7 days of recovery, injections of KN-93, KN-92 (inactive analogue of KN-93) or DMSO (vehicle) was performed. Morphine and saline were injected in control groups. In the molecular study, we assessed the amount of phosphorylated CaMKII α (pCaMKII α) protein expression in LC nucleus using western blot technique.

Results: Behavioral study; There was a significant difference in withdrawal signs between KN-93 and morphine dependent groups ($P < 0.05$). No significant difference was observed between KN-92 and morphine dependent groups and also between DMSO and morphine dependent groups. Molecular study; Morphine and control groups and also morphine and naloxone groups showed significant differences in the level of pCaMKII α ($P < 0.05$). There was no significant difference between control and naloxone groups.

Conclusion: Chronic morphine administration can increase the amount of CaMKII α activity in LC nucleus and inhibition of this enzyme can decrease some withdrawal signs in dependent rats.

Key words: Morphine, Dependency, CaMKII α (Ca²⁺-Calmodulin Kinase II α), Locus coeruleus, Rat

*Corresponding author e-mail: ssemnan@modares.ac.ir
Available online at www.phypha.ir/ppj

تأثیر کاربرد مزمن مرفین بر فعالیت آنزیم کلسیم-کالمودولین کیناز $\text{CaMKII}\alpha$ در هسته لوکوس سروئوس موش صحرایی و اثر احتمالی این آنزیم در وابستگی به مرفین

مژده نوید حمیدی، محمد جوان، یعقوب فتح الهی، سعید سمنانیان*
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، تهران

پذیرش: ۱۵ اردیبهشت ۸۹

دریافت: ۱۰ آذر ۸۸

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر مهار کننده آنزیم $\text{CaMKII}\alpha$ بر میزان بروز علائم سندرم محرومیت در موش های صحرایی وابسته به مرفین و تاثیر تزریق مزمن مرفین بر فعالیت آنزیم $\text{CaMKII}\alpha$ در هسته لوکوس سروئوس موش صحرایی بود.

روش ها: این مطالعه در دو بخش رفتاری و ملکولی با استفاده از موش های صحرایی نژاد ویستار (۳۰۰-۲۵۰ گرم) انجام شد. در مطالعه رفتاری پس از کانول گذاری در هسته LC داروهای KN-93 (مهار کننده آنزیم $\text{CaMKII}\alpha$)، KN-92 (آنالوگ غیر فعال KN-93) درون هسته LC تزریق شد. گروه های کنترل نیز شامل گروه دریافت کننده مرفین و گروه دریافت کننده نرمال سالیین بودند. در مطالعه ملکولی با استفاده از تکنیک وسترن بلات، میزان پروتئین $\text{pCaMKII}\alpha$ در هسته LC در سه گروه کنترل، وابسته به مرفین و دریافت کننده نالوکسان مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: یافته های به دست آمده حاکی از آن است که در مطالعه رفتاری، گروه دریافت کننده KN-93 نسبت به گروه وابسته به مرفین در چهار علامت writhing، jumping، freezing و head shake کاهش معنی داری را نشان داد. در مطالعه ملکولی تفاوت معنی داری در میزان فعالیت پروتئین $\text{pCaMKII}\alpha$ در گروه وابسته به مرفین نسبت به گروه کنترل و نیز بین گروه مرفین با گروه نالوکسان مشاهده شد.

نتیجه گیری: بنابراین می توان نتیجه گرفت تزریق مزمن مرفین سبب افزایش فعالیت آنزیم $\text{pCaMKII}\alpha$ در هسته LC شده و مهار این آنزیم در کاهش برخی از علائم سندرم محرومیت از مرفین نقش دارد. به نظر می رسد با مهار این آنزیم می توان تا حدودی از ایجاد وابستگی به مرفین در افراد مصرف کننده آن جلوگیری نمود.

واژه های کلیدی: وابستگی، آنزیم $\text{CaMKII}\alpha$ (کلسیم-کالمودولین کیناز $\text{II}\alpha$)، لوکوس سروئوس، موش صحرایی

مقدمه

اپیوئیدی ایجاد می شود، فرآیند های هومئوستاتیکی را ایجاد می کند که منجر به گسترش وابستگی به اپیوئیدها می شود. با مصرف مداوم داروهای اپیوئیدی، مکانیسم های سازشی شروع می شوند که منجر به تغییرات کوتاه مدت و دراز مدت در عمل نورون های حساس به اپیوئید و شبکه های عصبی می شوند. با قطع دریافت دارو یک سری از نشانه های قطع آشکار می شود.

اختلال در اعمال سلسله اعصاب مرکزی که به وسیله داروهای

ssemnan@modares.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

هسته LC دانسته بالایی از گیرنده‌های اپیوئیدی به ویژه μ و K دارند [۲۷]. کاربرد موضعی یا سیستمیک اپیوئیدها در موش-های صحرایی سبب مهار ثبت تک واحدی نورون‌های LC می‌شود [۳]. همچنین در گربه‌ها تزریق موضعی اپیوئیدها سبب کاهش فعالیت نورون‌های LC می‌شود [۱۷، ۱۱]. در موش‌های صحرایی وابسته به اپیوئیدها با محرومیت القایی یا آنتاگونیست، افزایش بارزی در شلیک نورونی LC [۳، ۴، ۱۸] Turn over نوراپینفرین و رهایش آن در نواحی هدف دیده می‌شود [۶، ۲۱]. این فرضیه مطرح است که افزایش فعالیت نورون‌های LC نقش مهمی در علائم محرومیت ایفا می‌کنند، زیرا از نظر زمانی افزایش شلیک نورونی آن با رفتارهای محرومیت مطابقت دارد [۱۸]. هم‌چنین تزریق سیستمیک و موضعی کلونیدین (آگونیست گیرنده α_2 آدرنرژیک) به LC سبب سرکوب شلیک افزایش یافته LC [۴] و سرکوب افزایش Turn over نوراپینفرین و رهایش آن در نواحی هدف [۶، ۲۱] و نیز بسیاری از علائم رفتاری ناشی از محرومیت اپیوئیدی می‌شود [۲۳]. تخریب LC علائم فیزیکی محرومیت اپیوئیدی را کاهش می‌دهد [۱۴] و حساس‌ترین محل برای القای علائم محرومیت توسط تزریق موضعی آنتاگونیست اپیوئیدی، هسته LC می‌باشد [۱۵].

مواد و روشها

موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۲۵۰-۳۰۰ گرمی) تهیه شده از موسسه رازی کرج مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند و کار با حیوانات بر اساس مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

موش‌های صحرایی با استفاده از کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زیلازین (۵ mg/kg) [۱۶] تحت بیهوشی قرار گرفته و درون دستگاه استریو تاکسی قرار داده شدند. کانول گذاری با کانول نمره ۲۶ درون هسته لوکوس سرولئوس با مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس ($L=1/3$, $H=7/3$, $AP=-9/8$) میلی متر از سطح برگما انجام شده و سه پیچ در اطراف هر کانول در مجمله برای ثابت نگه داشتن کانول قرار داده شده و توسط

احتمال می‌رود که مکانیسم‌های درگیر در فرآیندهای سازشی در نورون‌ها و سیناپس‌ها همان مکانیسم‌های دخیل در LTP و LTD باشند که تصور می‌شود اساس حافظه سلولی را تشکیل می‌دهند [۳۰]. یکی از آنزیم‌های دخیل در ایجاد LTP و شکل‌پذیری سیناپسی، آنزیم کلسیم-کالمودولین کیناز $II\alpha$ (CaMKII α) است که نقش مهمی در حساس و غیرحساس شدن گیرنده اپیوئیدی دارد [۱۲]. CaMKII α یک پروتیین کیناز از گروه پروتیین کینازهای سرین-ترئونین وابسته به کلسیم-کالمودولین است. دو نوع اصلی CaM Kinase وجود دارد. یک نوع آن Specialized CaM Kinase نظیر MLCK و دیگری Multifunctional CaM Kinase است که در مجموع CaM Kinase II نامیده می‌شوند و در فرآیندهایی نظیر ترشح واسطه‌های شیمیایی، تنظیم فاکتورهای ترجمه‌ای و متابولیسم گلیکوژن نقش دارند. حدود ۱-۲ درصد پروتیین‌ها در مغز CaM Kinase II هستند. از اعمال CaM Kinase II می‌توان به تکامل سلول‌های مغزی، یادگیری و حافظه و تغییرات در اعمال سیناپسی اشاره کرد ولی هنوز نقش CaMKII α در ایجاد تحمل و وابستگی به مرفین به طور کامل شناخته نشده است [۱۰].

هسته لوکوس سرولئوس نزدیک سطح شکمی طرفی بطن چهارم در حد پل مغزی قرار گرفته و حاوی حدود ۱۵۰۰ نورون در موش صحرایی است [۳۱]. تراکم گیرنده‌های اپیوئیدی در لوکوس سرولئوس مغز بسیار زیاد است و به این علت ونیز حضور آندورفین‌ها، هسته LC مکان مناسبی برای مطالعه وابستگی و تحمل ایجاد شده در اثر کاربرد مزمن مرفین به شمار می‌رود [۵]. تزریق آنتاگونیست‌های اپیوئیدی در LC موش‌های صحرایی وابسته به مرفین، سبب تولید سندرم محرومیت می‌شود که پیشنهاد می‌کند این هسته در ایجاد وابستگی به اپیوئیدها دخالت دارد [۱۸، ۱۹]. در لوکوس سرولئوس، اپیوئیدها از طریق گیرنده‌های μ عمل کرده و به طور حاد به وسیله باز کردن کانال‌های پتاسیمی، سلول‌ها را هایپر پلاریزه می‌کنند. کاهش سریع پاسخ به مرفین زمانی رخ می‌دهد که گیرنده‌ها در معرض دارو قرار می‌گیرند و هایپر پلاریزاسیون ایجاد شده را کم می‌کنند. این غیرحساس شدن گیرنده‌ها نشانگر اولین مرحله جبران در سلول‌هایی است که تلاش دارند به حالت تعادل خویش باز گردند [۹]. سلول‌های

۵- به مدت ۹ روز، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مرفین، (KN-92 ۱۰ نانومول و حجم ۱۰۰ نانو لیتر) از طریق کانول درون هسته LC تزریق شده و در روز دهم مرفین (زیر جلدی) و نالوکسان به روش گروه وابسته تزریق شد.

۶- به مدت ۹ روز، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مرفین، (DMSO ۰/۱ درصد و حجم ۱۰۰ نانو لیتر) از طریق کانول درون هسته LC تزریق شده و در روز دهم مرفین (زیر جلدی) و نالوکسان به روش گروه وابسته تزریق شد.

علایم مورد بررسی شامل به هم خوردن دندان ها (teeth chattering)، به خود پیچیدن (writhing)، گشت زدن در محیط (exploration)، پریدن (jumping)، روی دو پا ایستادن (rearing)، جویدن بدون وجود غذا در دهان (chewing)، لرزش پنجه پا (paw tremor)، لرزش سر (head shake)، خاراندن بدن (scratching)، سگ لرزه (wet-dog shake)، بی حرکتی (freezing) بود که به مدت ۳۰ دقیقه پس از شروع علایم سندرم قطع بررسی شدند [۳۳، ۱۱].

گروه های مورد مطالعه در آزمایش مولکولی:

۱- گروه وابسته که به مدت ۹ روز مرفین هیدروکلراید (۱۰ mg/kg/s.c. (تهیه شده در حجم ۱ میلی لیتر) دو بار در روز دریافت نموده و در روز دهم پس از تزریق آخرین دوز مرفین بافت LC تهیه شد.

۲- گروه دریافت کننده نالوکسان (تزریق نالوکسان ۱ mg/kg/i.p. (۲ ساعت پس از آخرین دوز تزریق شده مرفین).

۳- گروه کنترل (دریافت نرمال سالیین به روش گروه وابسته).

بافت LC با بافر لیز (تریس- HCl ۵۰ mM با pH=8، ۱۵۰ mM NaCl، ۰/۱ X-100 Triton، سدیم دی اکسی کولات ۰/۲۵٪، سدیم دی اکسی سولفات (SDS) ۰/۱٪، ۱ mM EDTA، مهارکننده پروتئازها ۱٪) در شرایط سرما (درون جعبه پر شده از یخ) هموژن گردید و سپس سانتریفوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و درجه حرارت ۴ °C به مدت ۴۰ دقیقه) انجام شد. قسمت فوقانی نمونه جمع آوری و غلظت پروتئین با روش برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه های پروتئینی در ژل پلی آکریل آمید (۳/۸٪) SDS حل و الکتروفورز گردید. سپس بر روی کاغذ PVDF (Amersham Bioscience)

سیمان دندان پزشکی ثابت شدند. یک هفته پس از بهبودی تزریق داخل هسته ای انجام شد. تزریق داروهای مورد استفاده ۱۵ دقیقه قبل از هر بار تزریق مرفین انجام گرفت. تزریق درون هسته LC از طریق کانول توسط سوزن های تزریق نمره ۳۰ که اندازه آن ها ۲ میلی متر بلند تر از کانول بود و توسط لوله پلی اتیلن شماره ۲۰ به سرنگ هامیلتون ۱ میکرولیتری متصل بود، انجام شد. پس از انجام آزمایش، کانول ها ی کاشته شده از لحاظ بافت شناسی بررسی شدند و درستی قرار گیری آنها درون LC مورد تأیید قرار گرفت. داروهای مورد استفاده شامل داروی KN-93 (مهارکننده CaMKII α) و (KN-92 آنالوگ KN-93) (تهیه شده از شرکت سیگما) و حلال آنها (DMSO (۱/۰٪) بودند [۲۲].

حیوان های مورد مطالعه در آزمایش رفتاری به مدت ۹ روز مرفین هیدروکلراید (۱۰ mg/kg/s.c. (تهیه شده در حجم ۱ میلی لیتر) دو بار در روز دریافت کردند و در روز دهم (۲ ساعت پس از تزریق مرفین)، نالوکسان ۱ mg/kg/i.p. تزریق شده و علایم سندرم محرومیت در یک دوره زمانی ۳۰ دقیقه ای در حالی که حیوان در یک محفظه شفاف پلکسی گلاس با ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ سانتی متر قرار گرفته بود، شمارش شد [۷].

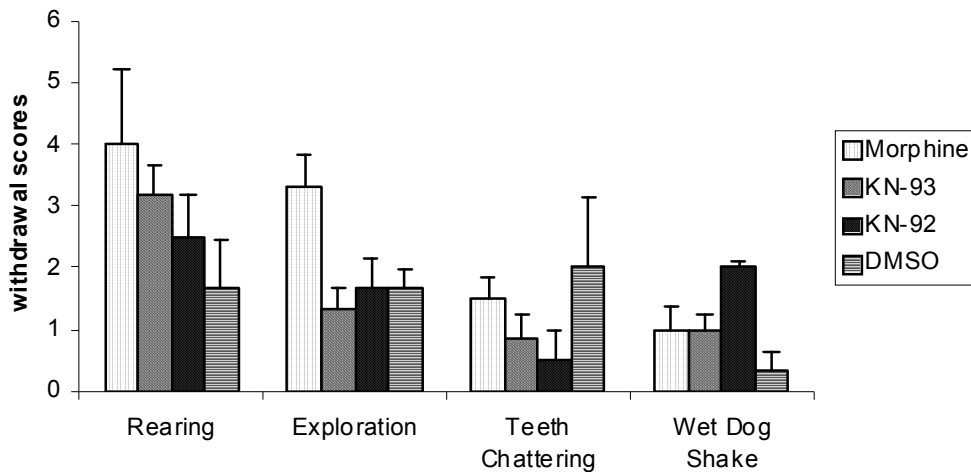
گروه های مورد مطالعه در آزمایش رفتاری:

۱- گروه وابسته که به مدت ۹ روز مرفین هیدروکلراید (۱۰ mg/kg/s.c. (تهیه شده در حجم ۱ میلی لیتر) دو بار در روز دریافت نموده و در روز دهم (۲ ساعت پس از تزریق مرفین)، نالوکسان ۱ mg/kg/i.p. تزریق و علایم سندرم محرومیت بررسی شد.

۲- گروه کنترل که با شرایط مشابه گروه وابسته، ۹ روز سالیین دریافت کردند و سپس نالوکسان ۱ mg/kg/i.p. در روز دهم تزریق شده و بروز علائم سندرم محرومیت بررسی شد.

۳- به مدت ۹ روز، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق سالیین در گروه کنترل، KN-93 (۱۰ نانومول و حجم ۱۰۰ نانو لیتر) از طریق کانول درون هسته LC تزریق شده و در روز دهم سالیین (زیر جلدی) و نالوکسان به روش گروه وابسته تزریق شد.

۴- به مدت ۹ روز، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مرفین، KN-93 (۱۰ نانومول و حجم ۱۰۰ نانو لیتر) از طریق کانول درون هسته LC تزریق شده و در روز دهم مرفین (زیر جلدی) و نالوکسان به روش گروه وابسته تزریق شد.



شکل ۱- مقایسه علایم سندرم محرومیت از مرفین (rearing و exploration, teeth chattering, wet dog shake) در چهار گروه DMSO, KN-92, KN-93 و وابسته به مرفین در مدت زمان ۳۰ دقیقه (n=۶). تفاوت معنی داری بین ۳ گروه فوق و مرفین وجود ندارد. مرفین ۱۰ mg/kg/s.c. دو بار در روز به مدت ۹ روز تزریق و در روز دهم ۲ ساعت پس از تزریق مرفین، نالوکسان ۱ mg/kg/i.p. تزریق شده و علایم سندرم محرومیت در طی ۳۰ دقیقه بررسی شد. در گروه های دریافت کننده KN-92، KN-93 و 92 DMSO ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مرفین داروهای فوق از طریق کانول درون هسته LC تزریق شدند و سپس مرفین به روش گروه وابسته تزریق و در روز دهم علایم سندرم محرومیت بررسی شد.

یافته ها

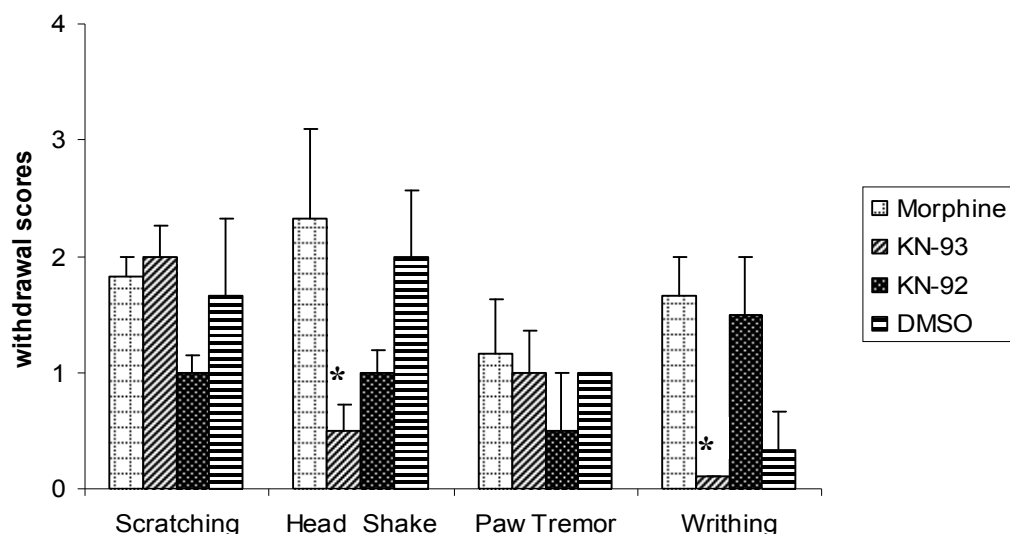
مطالعه حاضر نشان داد که مهار آنزیم CaMKII α سبب ایجاد کاهش وابستگی به مرفین می شود. حیواناتی که مرفین دو بار در روز به مدت ۹ روز دریافت کرده و سپس در روز دهم نالوکسان دریافت کردند علایم محرومیت از مرفین را نشان دادند (شکل ۱، ۲، ۳). در گروهی که KN-93 داخل هسته ای (۱۰nmol و حجم ۱۰۰ نانو لیتر) تزریق شده بود، کاهش چهار علامت jumping, head shake, writhing, freezing (P < ۰/۰۵) مشاهده شد (شکل ۲، ۳).

گروه دریافت کننده KN-92 (آنالوگ غیر فعال KN-93) به عنوان گروه کنترل برای KN-93 در نظر گرفته شد. تزریق ۱۰۰ نانو لیتر KN-92 با غلظت ۱۰ نانومول داخل هسته LC نتوانست تاثیری در کاهش علایم سندرم محرومیت داشته باشد (شکل ۱، ۲، ۳).

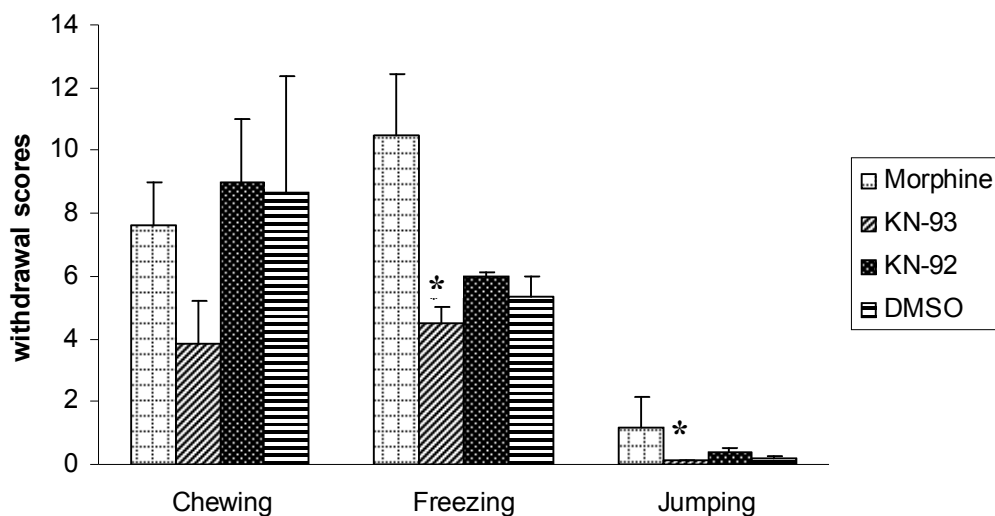
در گروه حلال (vehicle)، تزریق DMSO ۰/۱٪ با حجم ۱۰۰ نانولیتتر نیز نتوانست علایم سندرم محرومیت از مرفین را تغییر دهد (شکل ۱، ۲، ۳). در گروه کنترل که نرمال سالین دریافت کرده بود هیچ یک از علایم سندرم محرومیت از مرفین مشاهده نشد (داده ها نشان داده نشده است).

منتقل شد. بلات (کاغذ) در ۲٪ ماده بلوک کننده کیت ECI advanced بلوک شد. سپس بلات ها با آنتی بادی اولیه منوکلونال علیه CaMKII α فسفریله ویتا اکتین به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند. بعد از شستشوی کافی، بلات ها برای ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با آنتی بادی ثانویه کوئژوگه با HRP انکوبه شدند. سپس با استفاده از کیت ECI advanced و فیلم رادیولوژی و استفاده از محلول ظهور و ثبوت باندهای فوق آشکار شدند [۲۸، ۲۹].

در آنالیز آماری یازده علامت سندرم محرومیت از مرفین مورد بررسی قرار گرفت. تعداد وقوع هر یک از این علایم در طی ۳۰ دقیقه ثبت شد و محاسبه نهایی بر اساس روش زیر صورت گرفت. برای هر ۵ بار تکرار یک علامت، نمره خاصی در نظر گرفته شد. به عدم وجود علامت شماره ۰، به تکرار یک علامت بین ۵-۱ شماره ۱، تکرار علامت بین اعداد ۱۰-۶ شماره ۲، تکرار علامت بین ۱۱-۱۵ شماره ۳ و... داده شد [۱۹، ۱۸]. نتایج با استفاده از نرم افزار Prism و تست آماری Mann Whitney مورد سنجش قرار گرفته و P < ۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد. در مطالعه وسترن بلات از روش آماری ANOVA برای تعیین اختلاف بین میانگین دانسیته باندهای به دست آمده در سه گروه وسترن بلات استفاده شد (n=۴).



شکل ۲ - مقایسه علائم سندرم محرومیت از مرفین (scratching, head shake, paw tremor, writhing) در چهار گروه DMSO, KN-92, KN-93 و وابسته به مرفین در مدت زمان ۳۰ دقیقه (n=۶). تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) در دو علامت writhing و head shake بین گروه های KN-93 و مرفین وجود دارد. مرفین ۱۰ mg/kg/s.c. دو بار در روز به مدت ۹ روز تزریق و در روز دهم ۲ ساعت پس از تزریق مرفین، نالوکسان ۱ mg/kg/i.p تزریق شده و علائم سندرم محرومیت در طی ۳۰ دقیقه بررسی شد. در گروه های دریافت کننده KN-93، KN-92، و DMSO ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مرفین داروهای فوق از طریق کانول درون هسته LC تزریق شدند و سپس مرفین به روش گروه وابسته تزریق و در روز دهم علائم سندرم محرومیت بررسی شد.

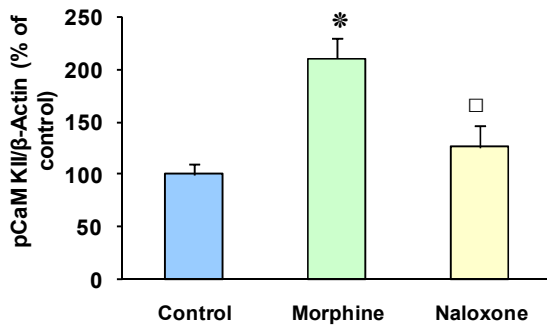
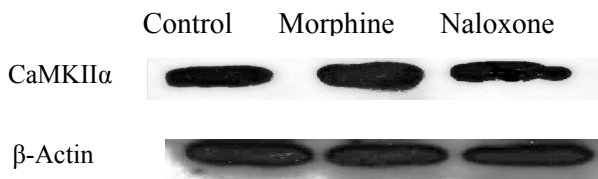


شکل ۳ - مقایسه علائم سندرم محرومیت از مرفین (chewing, freezing, jumping) در چهار گروه DMSO, KN-92, KN-93 و وابسته به مرفین در مدت زمان ۳۰ دقیقه (n=۶). تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) در دو علامت freezing و jumping بین گروه های KN-93 و مرفین وجود دارد. مرفین ۱۰ mg/kg/s.c. دو بار در روز به مدت ۹ روز تزریق و در روز دهم ۲ ساعت پس از تزریق مرفین، نالوکسان ۱۰ mg/kg/i.p تزریق شده و علائم سندرم محرومیت در طی ۳۰ دقیقه بررسی شد. در گروه های دریافت کننده KN-93، KN-92، و DMSO ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مرفین داروهای فوق از طریق کانول درون هسته LC تزریق شدند و سپس مرفین به روش گروه وابسته تزریق و در روز دهم علائم سندرم محرومیت بررسی شد.

کاهش وابستگی به مرفین در برخی از علائم سندرم محرومیت می شود.

با توجه به این نکته که KN-92 تاثیری در کاهش علائم

بررسی این نتایج نشان می دهد که آنزیم CaMKII α نقش مهمی در ایجاد وابستگی به مرفین دارد و تزریق داخل هسته - ای KN-93 (مهار کننده اختصاصی CaMKII α) سبب



شکل ۴- مقایسه میزان pCaMKIIα به کمک دانسیتومتری باند های حاصل از وسترن بلات و نرمالایز کردن آن با β-Actin (n=۴).
* = P<0.05 (Control and Morphine)
□ = P<0.05 (Morphine and Naloxone)

کاهش دهد [۱۸]. به نظر می رسد که هسته LC به علت موقعیت خاص خود و ارتباطات و ورودی های وسیعی که از دیگر نواحی مغزی دارد [۲۰] می تواند نقش برجسته ای در ایجاد وابستگی به مرفین داشته باشد. به عنوان مثال تخریب هسته PGi (شکمی جانبی بصل النخاع) که یک منبع اصلی آوران های آمینواسید تحریکی به LC است سبب کاهش فعالیت افزایش یافته ناشی از محرومیت نورون های LC می-شود [۲۰]. همچنین در طی محرومیت القایی با نالوکسان میزان گلوتامات خارج سلولی در LC افزایش می یابد [۲،۳۴] و این افزایش رهایش گلوتامات برای حدود ۳۰ دقیقه پایدار است [۲۵]. پیش تیمار با آنتاگونیست انتخابی AMPA بطور بارزی این افزایش فعالیت را کاهش می دهد [۲۹]. تزریق نالوکسان، گلوتامات یا آگونیست NMDA به صورت icv یا درون هسته LC در موش های وابسته به مرفین سبب ایجاد علائم فیزیکی محرومیت می شوند؛ این علائم توسط پیش تیمار با MK-801 (آنتاگونیست برگشتناپذیر NMDA) بطور کامل بلوک می-شوند [۲۵]. آنتاگونیست های گیرنده NMDA از ایجاد تحمل و وابستگی به اپیوئید ها و همچنین از ایجاد تحمل به عمل ضد-دردی مرفین جلوگیری می کنند [۲۶]. لذا مطالعات نشان دهنده

سندرم قطع ندارد بنابراین نحوه تاثیر داروی KN-93 تنها به عمل مهارکنندگی آنزیم CaMKIIα توسط این دارو بستگی دارد. علائم سندرم قطع ندارد بنابراین نحوه تاثیر داروی KN-93 تنها به عمل مهارکنندگی آنزیم CaMKIIα توسط این دارو بستگی دارد.

نتایج حاصل از آنالیز وسترن بلات نشان داد که میزان فعالیت آنزیم CaMKIIα بعد از تزریق مزمن مرفین به شکل معنی داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد. این نتایج هم چنین نشان داد که میزان فعالیت آنزیم CaMKIIα پس از تزریق نالوکسان و بروز علائم سندرم قطع نسبت به گروه مرفین به شکل معنی داری کاهش می یابد. تفاوت معنی داری در میزان فعالیت این آنزیم بین گروه کنترل و گروه نالوکسان وجود نداشت (شکل ۴).

بحث

کاربرد مکرر مرفین سبب ایجاد وابستگی و اعتیاد می شود ولی مکانیسم های مربوط به آن به طور کامل شناخته نشده است. مطالعه حاضر نشان می دهد که مهار آنزیم CaMKIIα قادر است بعضی از علائم سندرم محرومیت از مرفین را کاهش دهد. این امر نشان دهنده آن است که افزایش فعالیت آنزیم CaMKIIα در هسته LC در ایجاد وابستگی به مرفین دخالت دارد. مطالعات زیادی پیشنهاد کرده اند که CaMKIIα و PKC برای تولید و بقای وابستگی و تحمل ضروری هستند [۲۴]. مطالعات نشان داده اند که کاربرد حاد و مزمن مرفین بیان و فعالیت CaMKIIα در هیپوکامپ را تعدیل می کنند [۱۳]. مهار کننده های فعالیت CaMKIIα در هیپوکامپ به طور قوی گسترش تحمل و وابستگی فیزیکی در پاسخ به کاربرد مزمن مرفین را کاهش می دهند. CaMKIIα، CREB را نیز فسفریله می کند و واسطه فعال شدن MAPK است [۲] و MAPK در مکانیسم های تحمل و وابستگی به خوبی توصیف شده است. بنابراین چندین خط شاهد از فرضیه نقش فسفریلاسیون با واسطه CaMKIIα در گسترش تحمل و وابستگی به مرفین حمایت میکنند. پیشتر نشان داده شده که کاربرد مهار کننده CaMKIIα در دیگر نواحی مغزی نظیر هیپوکامپ قادر است علائم سندرم محرومیت از مرفین را

– پروتئینی و عملکرد این گیرنده ها [۳۵،۳۴،۱۸] نیز در ایجاد بعضی از علائم سندرم محرومیت دخالت داشته باشند. بنابراین برای از بین بردن کامل وابستگی به مرفین که در موارد استفاده بالینی به فراوانی مشاهده می شود، استفاده همزمان از چندین مسیر مهار کننده آنزیم CaMKII α و همچنین مهار کننده-های مسیر های دیگر دخیل در ایجاد وابستگی نظیر مسیر CREB [۹] و NMDA [۲۶] نیز ممکن است ضرورت داشته باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران که حمایت مالی این طرح را به عهده داشتند سپاس گذاری می نمایند.

نقش گیرنده های AMPA و NMDA [۳۴] در این وضعیت به عنوان عوامل خارجی می باشد. از سوی دیگر، افزایش سطح آنزیم CaMKII α در اثر کاربرد مزمن مرفین و کاهش شدید آن در اثر تزریق نالوکسان در هسته LC، نشان دهنده نقش برتر این آنزیم در ایجاد وابستگی به مرفین در این هسته می باشد و نتایج به دست آمده از این تحقیق در تعامل مثبت با مطالعات قبل نقش CaMKII α در ایجاد وابستگی را مجددا اثبات کرد. هر چند اثر مهار کنندگی آنزیم CaMKII α در هسته LC محدود به برخی علائم خاص بود اما ممکن است همین آنزیم و تغییرات عملکردی آن در سایر هسته های مغزی در تکوین تحمل و وابستگی نقش داشته و احتمال می رود که بقیه علائم ایجاد شده در سندرم محرومیت از مرفین با دخالت سایر هسته ها و مراکز مغزی بوده باشد. ممکن است مراحل قبل از فعال شدن آنزیم CaMKII α نظیر در گیر شدن مرفین با گیرنده های G

References

- [1] Abercrombie E.D, Levine E.S., Jacobs B.L., Microinjected morphine suppresses the activity of locus coeruleus noradrenergic neurons in freely moving cats. *Neurosci Lett*, 86 (1988) 334-339.
- [2] Aghajanian G.K., Kogan J.H., Moghaddam B., Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*, 636 (1994) 126-130.
- [3] Aghajanian G.K., Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature*, 276 (1978) 186-188.
- [4] Akaoka H, Aston-Jones G., Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. *J Neurosci*, 11 (1991) 3830-3839.
- [5] Carvalho L. A.V., Azevedo L.O., A model for the cellular mechanisms of morphine tolerance and dependence. *Math Comput Model*, 32(2000) 933-953.
- [6] Done C., Silverstone P., Sharp T., Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. *Eur J Pharmacol*, 215 (1992) 333-336.
- [7] Fan G.H., Wang L. Z., Qiu H. CH., Inhibition of Ca/calmodulin dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Mol Pharmacol*, 56(1999) 39-45.
- [8] Granados-soto V., kalcheva I., Hua X., Newton A., Yaksh TL., Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. *Pain*, 85(2000) 395-404.
- [9] Lane-Ladd S.B., Pineda J., Boundy V., Feuffer T.P., Krupinski J., CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) in the Locus Coeruleus: Biochemical, Physiological and Behavioral Evidence for a Role in Opiate Dependence. *Neuroscience*, 17(1997) 7890–7901.
- [10] Liang D., Clark X. LI., Clark J.D. Increased expression of Ca/calmodulin dependent protein kinase II α during chronic morphine exposure. *Neuroscience*, 13(2004) 769-775.
- [11] Liu N., Rockhold R., Electrical stimulation of nucleus paragigantocellularis induces opioid withdrawal-like behaviors in the rat. *Pharmacol Biochem and Behavi*, 62(1999) 263-271.
- [12] Liu J.G., Anand K.J.S., Protein kinases modulate the cellular adaptation associated with opioid tolerance and

- dependence. *Brain Res Rev*, 38(2001) 1-19.
- [13] Lou L., Zhou T., Wang P., Pei G., Modulation of Ca/calmodulin dependent protein kinase II activity by acute and chronic morphine administration in rat hippocampus. *Mol Pharmacol*, 55(1999) 557-563.
- [14] Maldonado R., Koob G.F., Destruction of the locus coeruleus decreases physical signs of opiate withdrawal. *Brain Res*, 605 (1993) 128-138.
- [15] Maldonado R., Stinus L., Gold L.H., Koob G.F., Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther*, 261 (1992) 669-677.
- [16] Mestek A., Hurley J. H., The human μ opioid receptor: modulation of functional desensitization by Ca/calmodulin dependent protein kinase and protein kinase C. *J Neurosci*, 15(1995) 2396-2406.
- [17] Rasmussen K., Jacobs B.L., Locus coeruleus unit activity in freely moving cats is increased following systemic morphine administration. *Brain Res*, 344 (1985) 240-248.
- [18] Rasmussen K., Beitner-Johnson D.B., Krystal J.H. , Aghajanian G.K. , and Nestler E.J., Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J Neurosci*, 10 (1990) 2308-2317.
- [19] Rasmussen K., Kendrick W.T., Kogan J.H., A selective AMPA antagonist, LY293558, suppresses morphine withdrawal- induced activation of locus coeruleus neurons and behavioral signs of morphine withdrawal. *Neuropharmacology*, 15(1996) 497-505.
- [20] Rasmussen K., Aghajanian G.K., Withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons in opiate-dependent rats: attenuation by lesions of the nucleus paragigantocellularis. *Brain Res*, 505 (1989) 346-350.
- [21] Rasmussen K., Fuller R.W., Stockton M.E., Perry K.W., Swinford R.M., and Ornstein P.L., NMDA receptor antagonists suppress behaviors but not norepinephrine turnover or locus coeruleus unit activity induced by opiate withdrawal. *Eur J Pharmacol*, 197 (1991) 9-16.
- [22] Riahi E., Mirzaii-Dizgah I., Karimian S.M., Attenuation of morphine withdrawal signs by a GABAB receptor agonist in the locus coeruleus of rats. *Behavi Brain Res*, 196(2009) 11-14.
- [23] Taylor J.R., Elsworth J.D., Garcia E.J., Grant S.J., Roth R.H., Redmond D.E., Clonidine infusions into the locus coeruleus attenuate behavioral and neurochemical changes associated with naloxone-precipitated withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*, 96 (1988) 121-134.
- [24] Tang L. Shukla P.K., Wang, L.X., Wang Z.J., Reversal of morphine antinociceptive tolerance and dependence by the acute supraspinal inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Pharmacol Exp Ther*, 317 (2006) 901-909.
- [25] Tokuyama S., Zhu H., Oh S., Ho I.K., Yamamoto T., Further evidence for a role of NMDA receptors in the locus coeruleus in the expression of withdrawal syndrome from opioids. *Neurochem Int*, 39 (2001) 103-109.
- [26] Trujillo K.A., Effects of noncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on opiate tolerance and physical dependence. *Europ J Pharmacology*, 13 (1995) 301-307.
- [27] Tempel A. and Zukin R.S., Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 84 (1987) 4308-4312
- [28] Van Bockstaele E.J., Rudoy C., Mannelli P., Oropeza V., Elevated l-opioid receptor expression in the nucleus of the solitary tract accompanies attenuated withdrawal signs after chronic low dose naltrexone in opiate-dependent rats. *J Neurosci Res*, 183 (2006) 508-514.
- [29] Verona M., Zanotti S., Schafer T., Racagni G., Popoli M., Changes of synaptotagmin interaction with t-SNARE proteins in vitro after calcium/calmodulin-dependent phosphorylation. *J Neurochem*, 74(2000) 209-221.
- [30] Williams J.T., Christie M.D., Manzoni D.O., Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev*, 81(2001) 299-343.
- [31] Williams J.T., North R.A., Shefner S.A., Nishi S., Egan T.M. Membrane properties of rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience*, 13(1984) 137-156.
- [32] Yokota S., Yamamoto M., Moriya T., Akiyama M., Fukunaga K., Miyamoto E., Shibata S., Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not mitogen-activated protein kinase in Light - induced phase delays and Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster. *J Neurochem*, 77(2001) 618- 627.
- [33] Zachariou V., Pharmacobrunzell D.H., Hawes J., The

- neuropeptide galanin modulates behavioral and neurochemical signs of opiate withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 100(2003) 9028-9033.
- [34] Zhang T., Feng Y., Rockhold R.W., Ho I.K., Naloxone-precipitated morphine withdrawal increases pontine glutamate levels in the rat. *Life Sci*, 55 (1994) 25-31.
- [35] Zhong W., Dong ZH., Tian M., Cao J., Opiate withdrawal induces dynamic expressions of AMPA receptors and its regulatory molecule CaMKII α in hippocampal synapses. *Life Sci*, 79(2006) 861-869.