

Changes in beta 1 and beta 2 integrin genes expression in rat lumbar spinal cord is supportive of the inhibitory effect of chronic pain on the development of tolerance to morphine analgesia

Jamal Ghorbi¹, Mohammad Javan^{1*}, Vahid Sheibani², Amir Zarebkohan¹

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

2. Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received: 19 Mar 2010

Accepted: 24 May 2010

Abstract

Introduction: In order to study the alterations of beta 1 and 2 integrins mRNA level in rat lumbar spinal cord following the induction of chronic pain and its effect on the development of tolerance to morphine analgesia, we examined the level of expression of these genes in the presence of chronic pain, which is an inhibitor of morphine tolerance. We used induction of chronic pain alone and in combination with morphine administration.

Methods: In order to induce tolerance to analgesic effect of morphine, morphine (15 µg/rat) was intrathecally (i.t.) injected to male adult Wistar rats twice a day for 4 days. Chronic pain was induced using formalin %5, 15 minutes before morphine injections during days 1-4. The analgesic effect of morphine was measured using tail flick test. Lumbar spinal tissues were assayed for the expression of beta-1 and 2 integrins using “semi-quantitative RT-PCR” and were normalized to beta-actin.

Results: Chronic administration of morphine for 4 days developed tolerance to morphine analgesia. Concomitant induction of pain with morphine administration inhibited the development of tolerance to the analgesic. Induction of chronic pain, 15 minutes before morphine injections resulted in significant increases in beta-1 and 2 integrins mRNA levels. Furthermore, chronic pain alone also resulted in increased beta-1 and 2 integrins mRNA.

Conclusion: Our results showed that, the induction of chronic pain prior to morphine administration, which is able to prevent morphine tolerance, increases the expression of integrins. Chronic morphine administration resulted in increases of beta 1 and 2 integrins mRNA level in lumbar spinal cord. It may be suggested that increases of beta-1 and 2 integrins mRNA is the result of the negative feedback of integrin inhibition by chronic morphine administration. Chronic pain is an enhancer of beta-1 and 2 integrins and its simultaneous presence with morphine administration results in increased beta-1 and 2 integrins and as a result prevents the development of morphine tolerance.

Key words: Morphine, Tolerance, Integrins, Chronic pain, Spinal cord, Gene Expression, Rat

*Corresponding author e-mail: mjavan@modares.ac.ir

Available online at www.phypha.ir/ppj

تغییر در بیان ژن اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری موش صحرایی اثر مهاری درد مزمن بر تکوین تحمل به اثر ضدردی مرفین را تایید می کند

جمال قربی^۱، محمد جوان^{۱*}، وحید شبانی^۲، امیر ضارب کهن^۱
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. دانشگاه علوم پزشکی کرمان، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، کرمان
دریافت: ۱۹ اسفند ۸۸ پذیرش: ۳ خرداد ۸۹

چکیده

مقدمه: برای مطالعه تغییرات احتمالی میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ در قطعه پشتی نخاع کمری موش صحرایی به دنبال القای درد مزمن و بررسی اثر آن روی تکوین تحمل به اثر ضدردی مرفین، میزان بیان این دو ژن در حضور مهارکننده تحمل به مرفین (درد مزمن) سنجیده شد.
روش‌ها: برای القای تحمل، مرفین با دوز ۱۵ میکروگرم دو بار در روز به مدت چهار روز به شیوه داخل نخاعی به موشهای صحرایی نر بالغ تزریق شد. گروهی از حیوانات مرفین را ۱۵ دقیقه بعد از القای درد مزمن، دریافت کردند. اثر ضدردی مرفین توسط آزمون Tail-Flick سنجیده شد. تغییرات بیان ژنهای اینتگرین بتا-۱ و بتا-۲ در بخش خلفی نخاع کمری توسط RT-PCR نیمه کمی بررسی شد.
یافته‌ها: تزریق مرفین در گروهی که به مدت چهار روز مرفین دریافت کرده بود، بی‌دردی کمی ایجاد کرد (تحمل). کاربرد توام درد مزمن و مرفین مانع از تحمل به اثر ضدردی مرفین شد. القای درد مزمن به تنهایی و به همراه مرفین مکرر موجب افزایش mRNA اینتگرین بتا ۱ و اینتگرین بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری شد.
نتیجه‌گیری: بخشی از اثر درد مزمن که قادر به مهار روند ایجاد تحمل به اثر ضدردی مرفین می‌باشد، به نظر می‌رسد از طریق اینتگرینها اعمال شود. مرفین مکرر موجب مهار اینتگرینها و درد که افزایش‌دهنده میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ است در تجویز توام با مرفین موجب افزایش بیان اینتگرینهای مذکور می‌شود و از تکوین تحمل به اثر ضدردی مرفین جلوگیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تحمل به مرفین، اینتگرین، درد مزمن، بیان ژن، موش صحرایی

مقدمه

اپیوئیدها از دیرباز برای ایجاد بی‌دردی استفاده شده‌اند، اما تجویز طولانی مدت آنها دارای اثرات جانبی از جمله تحمل است [۱۲]. مطالعات بالینی نشان داده‌اند هنگامیکه اپیوئیدها برای کنترل درد مورد استفاده قرار می‌گیرند تحمل به عنوان اثر جانبی مصرف اپیوئیدها دیرتر بروز می‌کند [۱۹، ۳۵].
بعد از رشد و نمو اولیه، اتصالات سیناپسی از نظر عملکردی

درد بعنوان یک مساله در طب از دیرباز مطرح بوده است.

mjavan@modares.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

پیام رسانی گیرنده‌های متصل به G-پروتئین (GPCR) گزارش شده است [۲۸, ۳۰]. با اتصال لیگاند به اینتگرین، دم سیتوپلاسمی آن، مسیرهای پیام رسانی از جمله G-پروتئین‌ها و تیروزین کینازها را فعال می‌کند که عملکردهای متنوعی از جمله انقباض اسکلت سلولی و یا تنظیم بیان ژن را به همراه دارد [۱۰].

مطالعه قبلی نشان می‌دهد فعال شدن اینتگرین اثر مهارکننده بر تکوین تحمل به اثر ضدردی مرفین دارد [۱۴]. همچنین، گزارش شده mRNA اینتگرینها بتا ۱ و بتا ۲ با مصرف مکرر مرفین افزایش می‌یابد و این افزایش ناشی از فیدبک ناشی از مهار اینتگرین توسط مرفین مکرر است [۱۵]. با توجه به مهار روند ایجاد تحمل توسط درد مزمن، در این مطالعه سعی شده است تغییرات در بیان ژنهای اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری موش صحرائی بدنبال القای درد مزمن به تنهایی و درد همراه با مصرف مرفین بررسی شود.

مواد و روشها

در این مطالعه از موشهای صحرائی نر نژاد Wistar با محدوده وزنی ۱۸۰-۲۲۰ گرم که تصادفی در گروههای حداقل شش تایی قرار گرفتند، استفاده شد. حیوانات محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند و در شرایط کنترل شده نوری و گرمایی نگهداری می‌شدند (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی از ساعت ۷ صبح بود). برای همه آزمایشها، موشهای صحرائی دو نوبت (صبح و عصر) با دارو تیمار و آزمایش شدند. برای تزریقات داخل نخاعی، حیوانات بعد از کانول گذاری، جداگانه نگهداری شدند و به آنها اجازه داده شد تا به مدت ۴۸ ساعت قبل از تیمار با دارو بهبود یابند. برای پرهیز از القای استرس، حیوانات قبل از آزمایش دست آموز شدند و هر حیوان تنها یک بار مورد آزمایش قرار گرفت. پروتکل‌های بین‌المللی برای کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد تا درد و آزار حیوانات به حداقل برسد که این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس تایید شد.

مرفین سولفات (شرکت تمد، ایران) در سالین (۰.۹٪) حل

در سراسر زندگی، دینامیک باقی می‌ماند که اجازه دهنده تشکیل ارتباطات جدید متناسب با شکل‌گیری حافظه و ترمیم صدمه مغز یا نخاع می‌باشد [۱۸]. حضور مولکولهای چسباننده در شکاف سیناپسی یا نزدیک به آن، این امکان را می‌دهد تا این مولکولها در ایجاد و حفظ پلاستیسیته سیناپسی (شکل‌پذیری سیناپسی) نقش داشته باشند [۲۹].

یک خانواده از رسپتورهای اتصال سلولی برای وساطت تغییرات در ارتباطات سیناپسی، اینتگرینها (Integrins) هستند [۷]. اصطلاح اینتگرین برای اولین بار در مقاله مروری در سال ۱۹۸۷ بکار رفت تا خانواده‌ای از گیرنده‌های هترومیک سطح سلولی را از نظر ساختمانی و عملکردی توصیف کند که ماتریکس خارج سلولی با اسکلت سلولی داخل سلولی متصل می‌کند تا اتصال و مهاجرت سلولی را وساطت کند [۵]. اینتگرینها نقشهای کلیدی در (Central Nervous System) CNS، از جمله شرکت در تولید سیناپس، انتقال سیناپسی و شکل‌گیری حافظه بازی می‌کنند [۳۶]. اینتگرینها بویژه در نواحی سیناپسی غنی شده اند، جاییکه آنها در گسترش سیناپسی، حفظ و تجدید اسکلت سلولی (که در فعالیت سیناپسی شرکت می‌کنند) نقش دارند [۳۶].

هر اینتگرین از دو زیر واحد (یک آلفا و یک بتا) تشکیل شده است، که بصورت غیر کووالانته به هم متصل شده‌اند [۱۰]. حداقل ۱۹ زیر واحد α و ۸ زیر واحد β وجود دارد، و تا کنون بیش از ۲۵ هترو دایمر $\alpha\beta$ مختلف گزارش شده است [۳۲]. اینتگرینها به عنوان متالوپروتئینها مطرح هستند. در اینتگرینها هر هترو دایمر دارای ۳-۵ جایگاه اتصال به کاتیون دو ظرفیتی است و اتصال کاتیونها اثرات قوی روی عملکرد اینتگرین دارد. [۲۷]. تمام اتصالات لیگاند-اینتگرین وابسته به کاتیونهای دو ظرفیتی هستند. [۲۲]. منگنز با ناحیه خارج سلولی اینتگرینها متصل شده و موجب فعال شدن آن می‌شود [۱, ۲۱, ۳۱, ۳۷].

حداقل ۲۱ پروتئین از جمله پروتئینهای متصل شونده به اکتین، آنزیمها، پروتئینهای آداپتور و فعال کننده‌های نسخه-برداری، شناخته شده‌اند که به دم اینتگرینهای بتا متصل می‌شوند. [۲۳]. سیگنالینگ اینتگرین از طریق مسیر PI3 کیناز / Akt، مقاومت نرونی را به آپوپتوز القای شده بوسیله گلوتامات افزایش می‌دهد [۶, ۱۳]. اخیراً ارتباطاتی میان اینتگرینها و

۸ ثانیه قطع می‌شد (cut-off time). برای مقایسه تغییرات زمان تاخیر آزمون Tail-flick در گروه‌های مختلف با کمک فرمول زیر، در هر مورد درصد بی‌دردی از حد اکثر بی‌دردی ممکن (MPE: Maximum Possible Effect %) محاسبه شد [۱۶].

$$\% \text{ MPE} = [(TL-BL) / (\text{Cut-off time}-BL)] \times 100$$

از تزریق مکرر مرفین به صورت داخل نخاعی با دوز ۱۵ میکروگرم / موش (در حجم ۱۰ میکرولیتر / موش) دو بار در روز (صبح و عصر) به مدت چهار روز برای القای تحمل به مرفین استفاده شد [۱۹]. برای ارزیابی تحمل ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق برای القای تحمل (روز پنجم)، حیوانات یک دوز دیگر مرفین داخل نخاعی (۱۵ میکروگرم / موش) دریافت کردند و اثر ضددردی آن با استفاده از آزمون Tail Flick [۹] ارزیابی شد.

برای بررسی اثر مهارى درد مزمن روی تکوین تحمل به مرفین، گروه اول از موش‌های صحرایی ۱۰ میکرولیتر / موش سالین و ۱۵ دقیقه بعد از آن ۱۵ میکروگرم / موش (در حجم ۱۰ میکرولیتر / موش) مرفین را به صورت داخل نخاعی دریافت کردند. گروه دوم ۱۵ میکروگرم / موش مرفین (i.t.) را ۱۵ دقیقه بعد از القای درد مزمن (از طریق تزریق زیر جلدی ۵۰ میکرولیتر / موش فرمالین ۵٪ به پنجه‌ها)، دریافت کردند [۱۹]. گروه سوم ۱۰ میکرولیتر / موش سالین را به صورت داخل نخاعی دریافت کردند. گروه چهارم ۱۰ میکرولیتر / موش سالین (i.t.) را ۱۵ دقیقه بعد از القای درد مزمن (از طریق تزریق زیر جلدی ۵۰ میکرولیتر / موش فرمالین ۵٪ به پنجه‌ها)، دریافت کردند. این روند به مدت ۴ روز تکرار شد، درحالی‌که تزریقات زیرجلدی فرمالین به قسمتهای مختلف پنجه‌ها اعمال شد (روز اول: راست/پشت، روز دوم: چپ کف، روز سوم: راست کف و روز چهارم: چپ/پشت) [۳۴]. در روز پنجم (۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق چهارم) زمان تاخیر آزمون Tail Flick قبل و بعد از تزریق دوز ۱۵ میکروگرم / موش مرفین اندازه‌گیری و سپس درصد Maximum Possible (MPE) Effect محاسبه شد. میزان تحمل به اثر ضددردی مرفین با مقایسه درصد MPE مرفین روز پنجم با میزان این تاخیر در گروه تیمار شده با سالین مکرر ارزیابی شد. برای بررسی بیان ژن‌ها، در گروه‌های مختلف مورد استفاده،

شده و بصورت داخل نخاعی (i.t.) در حجم ۱۰ میکرولیتر / موش (با دوز ۱۵ میکروگرم / موش) تزریق شد. فرمالین ۵٪ (با حجم ۵۰ میکرولیتر / موش) (Merk آلمان) بصورت زیرجلدی به پنجه‌ها تزریق شد.

برای تزریق داخل نخاعی (i.t.) دو روز قبل از آزمایش‌های رفتاری، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۲۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکس جهت انجام جراحی ثابت شد. یک برش کوچک به طول ۲ سانتیمتر از بین گوشه‌ها به طرف پایین ایجاد و عضلات گردنی کنار زده شد و به آرامی از روی تیغه اکسی پیتال جمجمه آزاد شدند. سپس وسط غشاء اطلس-اکسی پیتال سوراخ کوچکی ایجاد شد تا منجر به خروج مایع مغزی-نخاعی گردد که نشانه‌ای از دسترسی به فضای زیر عنکبوتیه بود. یک لوله پلی اتیلن ۱۰ به طول ۱۱ سانتی‌متر آماده و ۸ سانتی متر آن به آرامی در فضای زیر عنکبوتیه به طرف قطعه کمری نخاع پیش برده شد. لوله پلی اتیلن قبل از استفاده، به وسیله اتانول ۷۰٪ استریل و کاملاً با سالین استریل شسته شد. موش‌های صحرایی دارای کانول تغییر معنی داری را در زمان تاخیر Tail Flick قبل و بعد از جراحی نشان ندادند و زمان تاخیر قبل از دارو برای آنها مانند حیوانات بدون کانول در محدوده ۳ تا ۴ ثانیه بود. ۳ سانتی متر از لوله خارج از نخاع قرار گرفت و برای تزریق دارو استفاده شد. در هیچ یک از حیوانات بعد از کانول گذاری نقص حرکتی دیده نشد. دارو یا سالین به صورت داخل نخاعی در حجم ۱۰ میکرولیتر / موش تزریق شد. ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق برای القای تحمل (روز پنجم) حیوانات یک دوز دیگر مرفین (۱۵ میکروگرم / موش) دریافت کردند و اثر ضددردی آن با استفاده از آزمون Tail Flick [۹] ارزیابی شد. سنجش میزان بی‌دردی قبل از تزریق مرفین و ۱۵ دقیقه بعد از تزریق مرفین یا سالین ۹٪ (گروه کنترل) انجام گرفت. در هر مورد، زمان تاخیر برای کشیدن دم، سه بار با فواصل یک دقیقه‌ای اندازه‌گیری شد و میانگین آن به عنوان زمان تاخیر قبل (BL: Base Line) و یا بعد (TL: Tail-flick Latency) از مصرف دارو محاسبه شد. شدت نور دستگاه طوری تنظیم شد که زمان تاخیر پایه بین ۳ تا ۴ ثانیه باشد. برای جلوگیری از صدمه بافت، تابش نور پس از

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR برای تکثیر بخشی از ژن های مورد مطالعه

نام ژن	نوع پرایمر	5'- توالی پرایمر -3'
بتا-اکتین	پیش رو	CTACGGAGAGAACGAGACC C
	پس رو	TCTAGTAACGAGGAGGACTC
اینترگرین بتا ۱	پیش رو	GAGTGTGTCTGTGGACAGTGTG
	پس رو	GTCTCCACAACATGCACGTGAG
اینترگرین بتا ۲	پیش رو	TGTGGACGACGATCGAGAGTGT
	پس رو	AAGCTGGGGCCACCTTTACTGA

خطی میان تعداد سیکل‌های PCR و محصول PCR و همچنین رابطه خطی میان مقدار اولیه cDNA الگو و محصول PCR بدست آید. براساس نتایج بدست آمده از این آزمایشات، ۳۰ سیکل PCR برای آنالیز همه نمونه ها استفاده شد. محصولات PCR متعاقباً روی ژل آگاروز ۱٪ آنالیز شد (Roche، آلمان). دانسیته باندها توسط نرم افزار Lab works اندازه گیری شد (UV. Doc. - انگلیس).

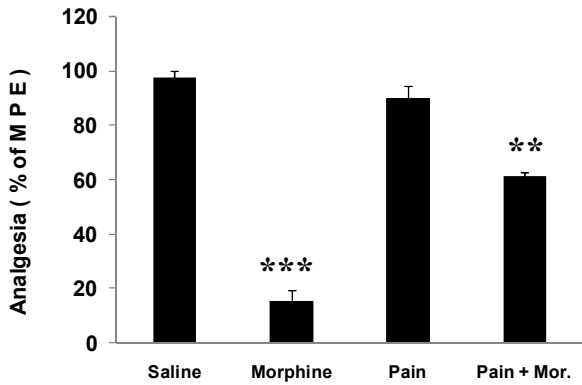
تفاوت آماری بین زمان تاخیر درآزمون Tail-flick در قبل و بعد از مصرف دارو با آزمون Paired t-test مقایسه شد. برای مقایسه دانسیته باندها و میزان اثر بی‌دردی در گروه‌های مختلف از آزمون t-test و یا آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و به دنبال آن آزمون Tukey استفاده شد. هر گروه شامل نمونه‌های بدست آمده از حداقل ۶ حیوان بود (n=۶). نتایج به صورت میانگین \pm SEM (خطای معیار میانگین) ارائه شده‌اند. $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی‌دار بودن مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها

آزمون تحمل به اثر ضد‌دردی مرفین نشان داد که تزریق مرفین در گروهی که در طی چهار روز قبل سالین دریافت کرده بودند باعث ایجاد بی‌دردی کامل شد در حالیکه تجویز همان دوز از مرفین در گروهی که قبلاً به مدت چهار روز مرفین دریافت کرده بود، بی‌دردی کمی را ایجاد کرد ($p < 0.05$). میزان بی‌دردی در دو گروه اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.001$) (شکل ۱).

۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق برای القای تحمل (روز پنجم)، سر حیوانات قطع شد. پس از استخراج طناب نخاعی، بخش خلفی نخاع کم‌ری فوری جدا و در نیتروژن مایع نگهداری شد. کل RNA سلولی بوسیله روش فنول-کلروفرم [۳] و با استفاده از معرف RNx⁺ (سیناژن- ایران) جدا شد. برای بررسی میزان بیان ژن از روش نیمه کمی PCR استفاده شد [۲۵]. بطور خلاصه، مخلوط واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمر Oligo-dT و آنزیم نسخه برداری معکوس M-MuLV (فرمنتاز) و براساس پروتکل مربوطه شد. مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد اینکوبه و بعد در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه غیر فعال شد. سه مخلوط واکنش PCR جداگانه برای مطالعه بیان ژن در نمونه‌های بدست آمده از هر موش صحرایی استفاده شد. هر واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای پیش رو و پس رو اختصاصی برای ژنهای بتا اکتین (به عنوان استاندارد داخلی)، اینترگرین بتا ۱ و بتا ۲ انجام شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ ارایه شده است.

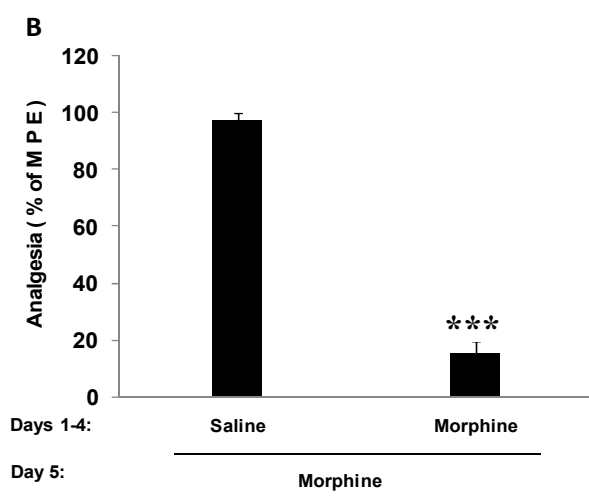
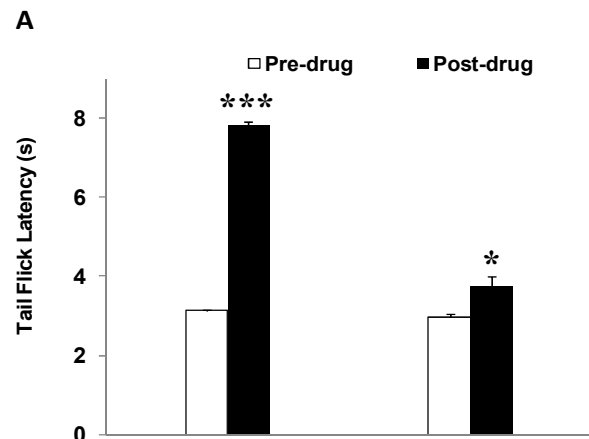
DNA پلیمرز Taq (سیناژن، ایران) برای تکثیر DNA استفاده شد و واکنشها براساس پروتکل مربوطه انجام شد. مخلوط‌های واکنش PCR به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد که با ۳۰ سیکل و با چرخه دمایی (۶۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه در ۵۷ درجه سانتی گراد و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد) دنبال شد. آخرین سیکل با مرحله ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه دنبال شد که برای تکمیل فرآیند رونویسی بود. تمام پارامترهای واکنش طوری تنظیم شد که رابطه‌ای



شکل ۲- اثر درد مزمن (فرمالین) بر بی‌دردی مرفین و تکوین تحمل به اثر ضد‌دردی آن. مصرف مکرر مرفین با دوز ۱۵ میکروگرم / موش به مدت چهار روز باعث کاهش میزان بی‌دردی ناشی از همان دوز مرفین در روز پنجم گردید، در صورتیکه در گروههایی که فقط سالیین با حجم ۱۰ میکرولیتر یا درد مزمن به مدت چهار روز می‌گرفتند در روز پنجم همین دوز مرفین بی‌دردی قابل ملاحظه-ای ایجاد کرد ($p < 0.001$ در مقایسه با گروه سالیین). مصرف مکرر مرفین به تنهایی بی‌دردی قابل ملاحظه اما ضعیفی را ایجاد نمود ($p < 0.05$) در حالیکه استفاده توأم درد مزمن و مرفین در طی چند روز اول باعث ایجاد بی‌دردی قوی و بارزی توسط مرفین به تنهایی در روز پنجم گردید ($p < 0.01$), نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است (Mor. = مرفین).

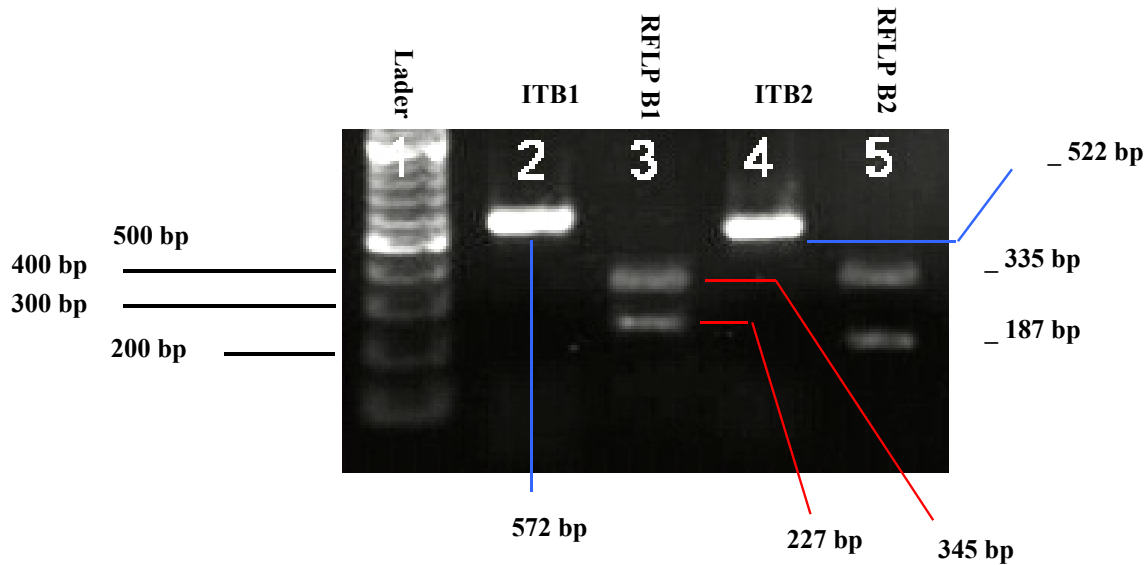
برای بررسی اثر درد مزمن بر تکوین تحمل به اثر ضد‌دردی مرفین در یک گروه از حیوانات با تزریق زیرجلدی فرمالین به پنجه‌ها، به مدت چهار روز دو بار در روز (صبح و عصر) درد مزمن القاء شد و ۱۵ دقیقه بعد از القای درد، مرفین را بصورت داخل نخاعی دریافت کردند. صبح روز پنجم به این گروه مرفین با دوز ۱۵ میکروگرم / موش تزریق شد. تزریق مرفین با دوز ۱۵ میکروگرم / موش در روز پنجم نشان داد که در صورت کاربرد توأم درد مزمن و مرفین تحمل به اثر ضد‌دردی مرفین ایجاد نمی‌شود و این گروه بی‌دردی بالایی را نشان داد ($p < 0.01$ نسبت به گروه کنترل) (شکل ۲).

هر چند اندازه قطعات تکثیر شده در واکنش PCR متناسب با اندازه مورد نظر (بر اساس موقعیت پرایمرهای طراحی شده) برای اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ بود، به منظور اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده در واکنش PCR، از روش RFLP استفاده شد. در این روش آنزیمهای محدود کننده (برش دهنده) ترادف خاصی از رشته DNA را شناسایی کرده و آن را برش می‌دهد. در این مطالعه هضم آنزیمی بر روی محصولات تکثیر شده نشان داد که آنزیم Bgl II محصول تکثیر شده برای cDNA مربوط به اینتگرین بتا ۱ را که ۵۷۲ جفت باز داشت را مطابق انتظار به دو قطعه به طولهای ۳۴۵ و ۲۲۷



شکل ۱- کاهش اثر ضد‌دردی مرفین به دنبال استفاده داخل نخاعی و مکرر آن (ایجاد تحمل). A: تغییرات زمان تاخیر در آزمون Tail Flick. B: تغییرات میزان درصد بی‌دردی از حد اکثر بی‌دردی ممکن: تجویز مکرر مرفین به شیوه داخل نخاعی با دوز ۱۵ میکروگرم / موش دوبار در روز و به مدت چهار روز باعث کاهش میزان بی‌دردی ناشی از همان دوز در روز پنجم و عبارتی تکوین تحمل نسبت به اثر ضد‌دردی مرفین گردید ($p < 0.05$). در حالیکه در گروه دریافت کننده سالیین مکرر، مرفین بی‌دردی شدیدی ایجاد کرد ($p < 0.001$). نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است.

برای بررسی اثر درد مزمن در ایجاد تحمل متقابل به اثر ضد‌دردی مرفین، در گروه اول با تزریق زیرجلدی فرمالین به پنجه‌ها، به مدت چهار روز دو بار در روز (صبح و عصر) درد مزمن القاء شد و ۱۵ دقیقه بعد از القای درد، سالیین را بصورت داخل نخاعی دریافت کردند. صبح روز پنجم به این گروه مرفین با دوز ۱۵ میکروگرم / موش تزریق شد. نتایج نشان داد که القای درد مزمن با الگوی مذکور اثری بر پاسخ دهی به اثر ضد‌دردی مرفین ندارد و باعث ایجاد تحمل متقابل به اثر ضد‌دردی مرفین یا تقویت آن نمی‌شود (شکل ۲).



شکل ۳- طرح الکتروفورزی هضم محصول PCR مربوط به cDNA اینتگرین بتا ۱ و بتا ۲ روی ژل آگارز ۱ درصد. قطعه تکثیری ژن اینتگرین بتا ۱ با آنزیم Bgl II و ژن اینتگرین بتا ۲ با آنزیم BamHI هضم شد. هضم با آنزیم Bgl II محصول تکثیر شده برای cDNA مربوط به اینتگرین بتا ۱ دو قطعه به طولهای ۳۴۵ و ۲۲۷ جفت باز و هضم با آنزیم BamHI محصول تکثیر شده برای cDNA مربوط به اینتگرین بتا ۲ دو قطعه به طولهای ۳۳۵ و ۱۸۷ نشان داد که مطابق انتظار بودند. این نتیجه تأییدی بر هویت صحیح قطعه تکثیر شده با PCR می‌باشد (ITB1 = اینتگرین بتا ۱، ITB2 = اینتگرین بتا ۲، RFLP B1: محصول واکنش هضم آنزیمی اینتگرین بتا ۱، RFLP B 2: محصول واکنش هضم آنزیمی اینتگرین بتا ۲، Mor. = مرفین).

بحث

در این مطالعه فرض این بود که درد مزمن می‌تواند بوسیله تغییر در عملکرد اینتگرینها از تکوین تحمل به اثر ضددردی مرفین در موش صحرایی ممانعت کند. برای القای تحمل به اثر ضددردی مرفین، از تزریق داخل نخاعی آن به میزان ۱۵ میکرو گرم / موش به مدت ۴ روز و دو بار در روز (صبح و عصر) استفاده شد. نتایج بدست آمده حاکی از کاهش معنی دار اثر ضددردی مرفین در این گروه از حیوانات در روز پنجم بود و نشان داد که مصرف مکرر مرفین با الگوی مذکور قادر است تا نسبت به اثر ضددردی همان دوز مرفین، ایجاد تحمل نماید (شکل ۱).

در این مطالعه برای جلوگیری از تکوین تحمل به اثر ضددردی مرفین از القای درد مزمن (بوسیله تزریق زیرجلدی فرمالین ۵٪ به پنجه‌ها)، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق داخل نخاعی مرفین با دوز ۱۵ میکرو گرم / موش (در حجم ۱۰ میکرولیتر / موش) به مدت چهار روز، دو بار در روز، (۸ صبح و ۶ عصر) استفاده شد.

نتایج به دست آمده نشان داد که مرفین در این گروهها در

جفت باز و آنزیم BamHI محصول تکثیر شده برای cDNA مربوط به اینتگرین بتا ۲ را که ۵۲۲ جفت باز داشت را مطابق انتظار به دو قطعه به طولهای ۳۳۵ و ۱۸۷ جفت باز شکست و صحت واکنش PCR را تأیید نمود (شکل ۳). صحت توالی قطعه تکثیر شده برای ژن بتا اکتین در مطالعات قبلی گزارش شده است [۱۹]. مطالعات قبلی نشان داده اند که مصرف مکرر مرفین داخل نخاعی (۱۵ میکرو گرم / موش) به مدت چهار روز میزان mRNA اینتگرین بتا ۱ را افزایش می‌دهد [۱۵]. در این مرحله از تحقیق، اثر القای درد مزمن به تنهایی و همراه با مرفین بررسی شد.

نتایج نشان داد که القای درد مزمن ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مرفین توانست تغییر معنی داری در میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ در ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق (در روز پنجم)، به وجود آورد (افزایش ۲۰۱ درصدی برای اینتگرین بتا ۱ و افزایش ۲۹۹ درصدی برای اینتگرین بتا ۲ نسبت به گروه کنترل) القای درد مزمن به تنهایی نیز موجب افزایش ۱۶۳ درصدی برای اینتگرین بتا ۱ و افزایش ۲۷۱ درصدی برای اینتگرین بتا ۲ شد (نسبت به گروه کنترل) (شکل ۴).

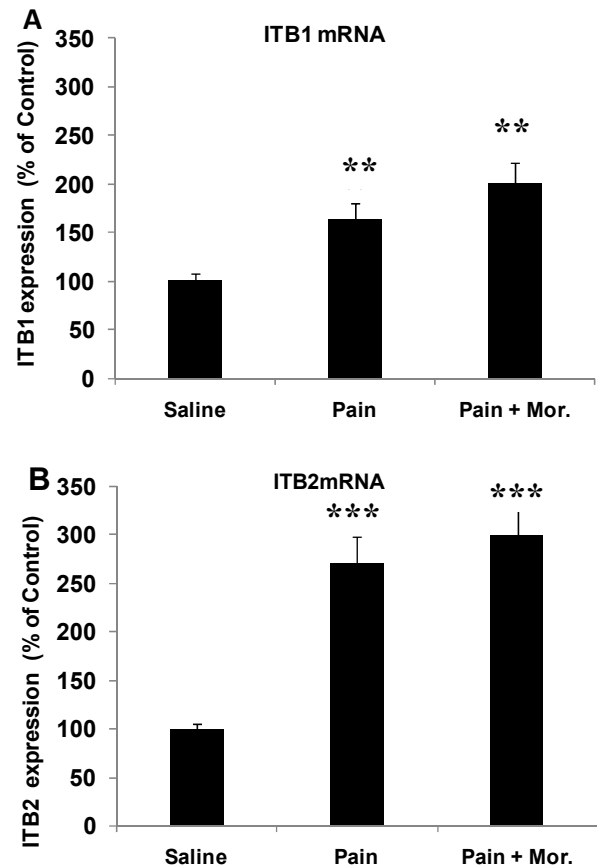
میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ نسبت به بتا اکتین سنجیده شد تا از خطای مربوط به PCR و مراحل قبل از PCR کاسته شود.

انجام واکنش‌های RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) روی محصولات تکثیر شده برای ژنهای اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ نشان داد که طول این قطعات برابر طولهای مورد انتظار بود و بدین ترتیب صحت توالیهای تکثیر شده تایید گردید. استفاده از واکنش هضم آنزیمی یا RFLP برای تشخیص قطعات تکثیر شده تاییدی قوی به شمار می‌رود [۸].

در مجموع نتایج مربوط به بهینه‌سازی پارامترهای روش مورد استفاده نشان داد که میزان محصول PCR با ۳۰ سیکل، میزان cDNA ورودی ۳ میکرولیتر، میزان $MgCl_2$ برابر با ۱/۵ میکرولیتر و دمای اتصال پرایمر ۵۷ درجه سانتیگراد، در حدی است که اولاً توسط رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل رویت زیر نور UV می‌باشد و ثانیاً با این میزان تکثیر به حد اشباع نمی‌رسد. پارامترهای مربوط به عکس برداری مانند دیافراگم و مدت اکتساب نور از دوربین برای هر عکس (Acquisition Time) نیز همواره برای تمام نمونه‌ها ثابت بود.

مطالعات ثابت کرده‌اند که ارتباط فیزیکی میان اینتگرینها و رسپتور اپیوئیدی میو در نرونهای هسته تری ژمینال وجود دارد. این اینتگرینها نقش مهمی را در تنظیم سیگنالینگ اپیوئیدی در نرونهای تری ژمینال بازی می‌کنند [۵]. بطور خلاصه این اطلاعات پیشنهاد می‌کند که تنظیم الگوی پراکندگی رسپتور اپیوئیدی میو و تنظیم مولکولهای سیگنالینگ بوسیله اینتگرینها ممکن است برای سیگنالینگ موثر در نرونهای تری ژمینال ضروری باشد. به کارگیری آنتی بتا ۱ اینتگرین، سیگنالینگ DAMGO (لیگاند رسپتور اپیوئیدی میو) را مهار می‌کند و موجب افزایش cAMP در این سلولها می‌شود. این پیشنهاد می‌کند که اینتگرینهای فعال شده ممکن است سیگنالینگ رسپتور اپیوئیدی میو را کنترل کنند، احتمالاً بوسیله تغییر تعاملات با G پروتئینها (مثلاً $G_{\alpha i}$ در مقابل $G_{\alpha s}$) [۵].

علاوه بر این، کانالهای وابسته به لیگاند، بویژه رسپتورهای گلوتامات بوسیله اینتگرینها کنترل می‌شوند [۲] و بسیاری از آنها در کمپلکسهای مرتبط با اینتگرین یافت می‌شوند [۳۶]. در نرونهای هیپوکمپی بیان $\alpha 5\beta 1$ اینتگرینها بوسیله رسپتور



شکل ۴- میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری بدنبال القای درد مزمن. تاثیر القای چهار روزه درد مزمن و همچنین استفاده همزمان درد مزمن و مرفین بر میزان بیان ژنهای اینتگرین بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری موش صحرائی، به طوریکه در شکل دیده می‌شود، استفاده توام درد مزمن و مرفین نسبت به گروه کنترل سالین باعث افزایش قابل توجهی در میزان بیان ژنهای اینتگرین بتا ۱ (A) و بتا ۲ (B) شده است. القای درد مزمن به تنهایی موجب افزایش mRNA اینتگرین بتا ۱ (A) و اینتگرین بتا ۲ (B) می‌شود. ($*p < 0.01$) و ($***p < 0.001$) نسبت به گروه سالین، $n=6$ داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است (ITB1 = اینتگرین بتا ۱، ITB2 = اینتگرین بتا ۲، Mor. = مرفین).

روز پنجم اثر ضددردی بارزی ایجاد می‌کند. این یافته حاکی از این است که القای درد مزمن با الگوی مذکور قادر است از تکوین تحمل به اثر ضددردی همان دوز مرفین جلوگیری نماید. این اطلاعات هم‌راستا با گزارشات قبلی است که درد مزمن بر تکوین تحمل به مرفین اثر مهاری دارند [۱۹].

برای برآورد تغییرات بیان ژن، در این مطالعه از یک روش نیمه کمی شده استفاده گردید. برای حذف خطاهای آزمایش در طی مراحل مختلف مانند استخراج RNA و انجام واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT)، از بتا اکتین به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد [۲۴]. در مطالعه حاضر برای هر نمونه بافتی

نتیجه باعث مهار تحمل به مرفین می‌شود.

در مطالعات قبلی نیز گزارش شده که اینتگرین αM بدنال درد نروپاتیک افزایش می‌یابد [۳۳]. نکته دیگر که باید به آن توجه داشت این است که در این تحقیق میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ اندازه‌گیری شده است نه میزان پروتئین آن، و این احتمال مطرح است که شرایط فیزیولوژیک سلول به دنبال القای درد مزمن طوری تغییر کند که امکان ترجمه mRNA حاصل از ژن اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ به پروتئین وجود نداشته باشد، عبارتی برای اینکه مطمئن شویم تحمل در حضور مقادیر افزایش یافته اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ مهار شده است، باید در تحقیقات بعدی میزان پروتئین آنها نیز اندازه‌گیری شود.

مطابق با نتایج مطالعات قبلی [۱۹]، نتایج مطالعه حاضر نیز در مجموع نشان داد القای درد مزمن قادر به مهار روند ایجاد تحمل به اثر ضدردی مرفین می‌باشند. اثر عامل فوق ممکن است تا حدودی از طریق اینتگرینها اعمال شود. درد مزمن و همچنین مرفین می‌توانند موجب تغییراتی در میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ شوند. بر اساس نتایج مطالعات قبلی، مرفین مکرر موجب افزایش میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی لومبار نخاع می‌شود [۱۵]. همچنین گزارشاتی وجود دارد که فعال کردن اینتگرینها بوسیله تجویز منگنز موجب مهار تحمل به اثر ضدردی مرفین می‌شود [۱۵]. در نتیجه می‌توان پیشنهاد کرد که افزایش میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ به دلیل فیدبک ناشی از مهار اینتگرین توسط مرفین مکرر می‌باشد. درد افزایش دهنده میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ است و تجویز توام آنها با مرفین، موجب افزایش بیان اینتگرینهای مذکور نسبت به گروه کنترل می‌شود و در نتیجه از تکوین تحمل به اثر ضدردی مرفین جلوگیری می‌کند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است. بدین وسیله از مساعدت های معاونت محترم پژوهشی آن دانشگاه تشکر می‌شود.

AMPA افزایش می‌یابد [۲]. بنظر می‌رسد اینتگرینها نقشی فعال و مهم در تمرکز گیرنده‌های غشایی از جمله رسپتورهای اپیوئیدی میو و کانالهای یونی در نقاطی خاص، بویژه در سیناپسها دارند و از این طریق در افزایش کارایی سیناپسی موثر هستند. در طی مصرف مکرر مرفین بیان بسیاری از ژنها در بافت CNS تغییر می‌یابد. در مورد اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲، نشان داده شده است که با مصرف مکرر مرفین مقدار mRNA آن در بخش خلفی نخاع کمتری افزایش می‌یابد [۱۵].

در این مطالعه، میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمتری بدنال القای درد مزمن به تنهایی و القای توام آن با مرفین بررسی شد. نتایج نشان داد القای درد مزمن که خود اثر مهاری روی تحمل نشان دارد موجب افزایش میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ می‌شود. در حضور کاربرد توام القای درد مزمن با مرفین نیز میزان mRNA مورد نظر افزایش یافت. نتایج مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تجویز مکرر مرفین به شیوه داخل نخاعی موجب افزایش میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی لومبار نخاع می‌شود [۱۵]. همچنین، در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است که مرفین (بصورت داخل نخاعی) موجب افزایش mRNA اینتگرین αM می‌شود [۳۳].

طبق گزارش قبلی، فعال کردن اینتگرینها بوسیله منگنز موجب مهار تحمل به اثر ضدردی مرفین می‌شود. همچنین نتایج بدست آمده از آزمایشات قبلی حاکی از این است که تزریق توام منگنز و مرفین و تزریق منگنز به تنهایی منجر به کاهش mRNA اینتگرین نسبت به گروه مرفین تنها می‌شود [۱۵]. بر اساس مطالعات قبلی، ایجاد تحمل به اثر ضدردی اپیوئیدها با چندین فرآیند سلولی همراه است که از جمله آنها می‌توان به افزایش NO، PKC و CaMKII اشاره کرد. شواهدی وجود دارد که هر سه این مولکولها به گونه‌ای اثرات مهاری روی فعال شدن اینتگرینها دارند [۴، ۱۱، ۱۷، ۲۰، ۲۶]. در نتیجه بنظر می‌رسد که افزایش میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ به دلیل فیدبک ناشی از مهار اینتگرین توسط مرفین مکرر می‌باشد [۱۵]. درد افزایش دهنده میزان mRNA اینتگرینهای بتا ۱ و بتا ۲ است و چون تجویز توام آن با مرفین، موجب افزایش بیان آنها نسبت به گروه کنترل تنها می‌شود، در

References

- [1] Adair B, xiong JP, Maddock C, Goodman SI, Arnaout MA, Yeager M. Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin $\alpha\beta3$ in a complex with fibronectin. *Cell Biol* 168 (2005) 1109-1117.
- [2] Arcangeli A, Becchetti A. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol* 16 (2006) 631-639.
- [3] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K., *Short Protocols in Molecular Biology*, Wiley, USA 1 (2002).
- [4] Banick P, Chen Q, Thom SR. Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic Gmp synthesis. *J Cell Physiol* 172 (1997) 12-24.
- [5] Berg K, Zardeneta G, Hargreaves KM, Clarke WP, Milam SB. Integrins regulate opioid receptor signaling in trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 144 (2007) 889-897.
- [6] Bozzo C, Lombardi G, Santoro C, Canonico PL. Involvement of $\beta1$ integrin in β AP-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 25 (2004) 1 - 8.
- [7] Chan C, Weeber EJ, Kurup S. Integrin requirement for hippocampal synaptic and spatial memory. *Neuroscience* 23 (2003) 7107-7116.
- [8] Chetsawang B, Casalotti SO, Phansuwan- Pujito P, Kotchabhakdi N, Govitrapong P. Gene expression of opioid receptors and G- Proteins in pineal glands. *Biochem Biophys Res Comm* 262 (1999) 775-780.
- [9] D'Amour F, Smith DL. A method for determination loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Therap* 72 (1941) 74-79.
- [10] Etzioni A. Integrins: The molecular glue of life. *Biochemistry* 124 (2001) 132-137.
- [11] Fan G, Wang LZ, Qiu HC, MAL P. Inhibition of calcium/calmodulin dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Mol Pharmacol* 56 (1999) 39-45.
- [12] Foley K. Opioids. *Neurol Clin* 11 (1993) 503-522.
- [13] Gary D, Mattson MP. Integrin signaling via the PI3 – kinas-AKT pathway increases neuronal resistance to glutamate-induced apoptosis. *J. Neurochem* 76 (2001) 1458-1496.
- [14] Ghorbi J, Javan M, Sheibani V, Satarian L, Zarebko-han A. Possible role for integrins in the development of tolerance to the analgesic effect of morphine in male rats. *Physiol Pharmacol* 11 (2007) 115-122
- [15] Ghorbi J, Javan M, Sheibani V. Changes in the Gene Expression of $\beta1$ and $\beta2$ Integrins Following Development of Tolerance to Analgesic Effect of Morphine in Rats. *Yakhteh Med Journal* 11 (2010) 448-455.
- [16] Harris L, Pierson AK. Some narcotic antagonists in the benzomorphan series. *J Pharmacol Exp Ther* 143 (1964) 141-148.
- [17] Heinzen E, Pollack GM. Pharmacodynamics of morphine-induced neuronal nitric oxide production and antinociceptive tolerance development. *Brain Research* 1023 (2004) 175– 184.
- [18] Huntly G. Dynamic aspects of cadherin-mediated adhesion in synapse development and plasticity. *Biology cell* 94 (2002) 335-344.
- [19] Javan M, Ahmadiani A, Motamadi F, Kazemi B. Changes in G proteins genes expression in rat lumbar spinal cord support the inhibitory effect of chronic pain on the development of tolerance to morphine analgesia. *Neurosci Res* 53 (2005) 250-256.
- [20] Lavaska J, Whelan RDH, Watso R. PKC ϵ controls the traffic of $\beta1$ integrins in motile cells. *EMBO j* 21 (2002) 3608-3819.
- [21] Lein P, Gallagher PJ, Amodeo J, Howie H, Roth JA. Manganese induces neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation of αv integrins. *Brain Res* 885 (2000) 220-230.
- [22] Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. The regulation of integrin function by Ca²⁺. *Biochimica Biophysica Acta* 1498 (2000) 91-98.
- [23] Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113 (2000) 3563-3571.
- [24] Lorkowaski S, Cullen P., Analysing gene expression, *Wiley- VCH Press* 1 (2003).
- [25] Marone M, Mozzetti S, Ritis DD, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online* 3 (2001) 19-25.
- [26] Massimo C, Pasquale M, Antonietta RM, Giovanni M,

- Ermenegildo S, Bruno A. Nitric Oxide Inhibits Neutrophil Adhesion during Experimental Extracorporeal Circulation. *Anesthesiology* 89 (1998) 443-448.
- [27] Plow E, Haas TA, Zhang L, Loftusi J, Smith JW. Ligand Binding to Integrins. *J Biol Chem* 275 (2000) 21785-21788.
- [28] Ross R. Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovas Res* 63 (2004) 381-390.
- [29] Schuman E, Murase S. Cadherins and synaptic plasticity: activity-dependent kinase 5 regulation of synaptic B-catenin-cadherin interactions. *Royal Society* 358 (2003) 749-756.
- [30] Short S, Boyer JL, Julialo RL. Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275 (2000) 12970-12977.
- [31] Takagi J, Erickson HP, Springer TA. C-terminal opening mimics inside-out activation of integrin $\alpha 5\beta 1$. *Nature Struct Biol* 8 (2001) 412-416.
- [32] Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunological Reviews* 186 (2002) 141-163.
- [33] Tawfik V, LaCroix-Fralish ML, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. Transcriptional and Translational Regulation of Glial Activation by Morphine in a Rodent Model of Neuropathic Pain. *J Pharmacol Exp Ther* 313 (2005) 1239-1212.
- [34] Vaccarino A, Coutret Jr. Relationship between hypothalamic-pituitary-adrenal activity and blockade of tolerance to morphine analgesia by pain: a strain comparison. *Pain* 63 (1995) 385-389.
- [35] Vaccarino A, Marek P, Kest B, Ben-Eliyahu S, Courret JR, Kao B, Liebeskind JC. Morphine fails to produce tolerance when administered in the presence of formalin pain in rats. *Brain Res* 627 (1993) 287-290.
- [36] Watson P, Humphries MJ, Relton J, Rothwell NJ. Integrin-binding RGD peptides induce rapid intracellular calcium increases and MAPK signaling in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* 34 (2007) 147-154.
- [37] Xiong J, Stehle T, Goodman SL, Arnaout, MA. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb and Haemost* 1 (2003) 1642-1654.