



## The role of adenosine A<sub>2</sub> receptors in regulation of pial vessels blood flow in anesthetized morphine dependent rats.

Marzieh Hosseini, Sohrab Hajizadeh\*, Yaghoub Fathollahi, Mojtaba Golmohammadi, Batoul Erfani, Ali Heidarian Pour

*Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran.*

Received: 12 Aug 2007

Revised: 10 Jan 2008

Accepted: 7 Mar 2008

### Abstract

**Introduction:** Adenosine as a potent vasodilator has a physiological role in regulation of regional cerebral blood flow (rCBF).

**Method:** Laser-Doppler flowmetry technique was used to study pial vessels blood flow responses to adenosine receptors agonists and antagonist. Male Sprague Dawley rats (250-350 g) that were housed in standard conditions were anesthetized with Urethane (1.5 g/kg). Adenosine (general agonist), NECA (A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> receptor agonist) and CGS-21380 (A<sub>2A</sub> selective agonist), were used in absence and presence of A<sub>2A</sub> receptors selective antagonist, ZM-243185, in naive and morphine-dependent rats.

**Results:** Adenosine, NECA and CGS-21680 increased pial vessels blood flow in naive and dependent rats dose dependently. These responses were blocked significantly by ZM-243185. Responses of pial vessels to adenosine (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-6</sup> M) and NECA (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-6</sup> M) were increased significantly in morphine-dependent rats in comparison to naive rats. Pial vessels responses to CGS-21680 did not show any significant differences between morphine dependent and naive rats.

**Conclusion:** Based on these results it could be concluded that the role of A<sub>2B</sub> receptors in regulation of rCBF in morphine dependent rats is more effective than A<sub>2A</sub> receptors.

**Keywords:** Adenosine receptors, morphine-dependence, pial vessels blood flow.

\* Corresponding Author Email: hajizads@modares.ac.ir  
Available online @: www.phypha.ir/ppj

## گیرنده‌های آدنوزینی A<sub>2</sub> و تنظیم جریان خون عروق نرم شامه‌ای مغز، در موشهای صحرایی وابسته به مرفین

مرضیه حسینی، سهراب حاجی‌زاده\*، یعقوب فتح‌الهی، مجتبی گل‌محمدی، بتول عرفانی، علی حیدریان‌پور  
گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
دریافت: مرداد ۸۶ بازبینی: دی ۸۶ پذیرش: اسفند ۸۶

### چکیده

**مقدمه:** آدنوزین به عنوان یک متسع کننده رگی، نقشی فیزیولوژیک در تنظیم جریان خون مغزی به عهده دارد.

**روش‌ها:** در این بررسی با استفاده از تکنیک جریان سنجی لیزر داپلر، تغییرات جریان خون عروق نرم شامه‌ای به دنبال کاربرد موضعی آگونیست‌های گیرنده‌های آدنوزین (آدنوزین، CGS-21380، NECA) با غلظت‌های  $10^{-8}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-4}$  M به تنهایی و سپس به همراه آنتاگونیست انتخابی گیرنده  $A_{2A}$  ( $10^{-6}$  -  $10^{-8}$  M) آدنوزینی در گروه حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین، تحقیق شد. در این تحقیق موشهای صحرایی نر نژاد Sprague Dawley با وزن ۲۵۰ - ۳۵۰ گرم که در شرایط استاندارد و یکسان نگهداری شده بودند پس از بیهوشی با اورتان  $1/5$  g/kg مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** آدنوزین، CGS-21380 و NECA به صورت وابسته به دوز در هر دو گروه مورد بررسی باعث افزایش جریان خون عروق مربوطه شدند که این اثر توسط آنتاگونیست گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی به گونه‌ای معنی دار مهار شد. پاسخ‌های افزایش جریان خون در گروه حیوانات وابسته به مرفین که آدنوزین دریافت کرده بودند در غلظت‌های  $10^{-7}$  M،  $10^{-6}$ ،  $10^{-5}$  و گروه‌هایی که NECA دریافت کرده بودند در غلظت‌های  $10^{-6}$  M،  $10^{-5}$ ،  $10^{-4}$  از پاسخ‌های افزایش جریان خون ایجاد شده در گروه حیوانات دست نخورده به گونه‌ای معنی دار بیشتر بود، ولی اختلافی میان افزایش جریان خون ایجاد شده در گروه‌هایی که CGS-21380 دریافت کرده بودند دیده نشد.

**نتیجه‌گیری:** براساس یافته‌های فوق به نظر می‌رسد گیرنده‌های  $A_{2B}$  آدنوزینی در شرایط وابستگی به مرفین نقش بیشتری را نسبت به گیرنده‌های  $A_{2A}$  آدنوزینی در تنظیم جریان خون نرم شامه‌ای بعهده دارند.

**واژه‌های کلیدی:** گیرنده آدنوزینی، وابستگی به مرفین، جریان خون نرم شامه‌ای.

### مقدمه

اثبات رسیده است. همچنین وجود گیرنده‌های آنکفالین و داینورفین در سرخرگ‌های بزرگ مغزی خوک به روش واکنش ایمنی نشان داده شده است. اپیوئیدها از قبیل متیونین - آنکفالین و لوسین - آنکفالین موجب اتساع عروق مغزی می‌شوند، در صورتیکه داینورفین اثرات وابسته به تون عروقی ایجاد می‌کند (اتساع عروقی در حالت فشار خون طبیعی و تنگی عروقی در حالت فشار خون پایین). در این اثرات، اپیوئیدها از طریق رهائش نیتریک اکساید (NO) و افزایش گوانوزین منوفسفات حلقوی

اثرات ضد درد و اعتیاد آور اپیوئیدها مدتهاست که شناخته شده و بسیار مورد بررسی قرار گرفته است، اما اپیوئیدها بر سیستم‌های دیگر از جمله سیستم تنظیم جریان خون نیز اثر می‌گذارد [۷]. وجود گیرنده‌های اپیوئیدی در عروق ریز مغزی به

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

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله:

ریخته می‌شد. بواسطه طعم تلخ مرفین سولفات، ساکاروز با غلظت ۳٪ به آب آشامیدنی حیوان اضافه می‌شد و شیشه‌های حاوی آب و مرفین توسط ورق‌های نازک آلومینیومی پوشانده شده تا از تجزیه مرفین توسط نور جلوگیری شود. با این روش، موشها از روز بیست و یکم پس از شروع تجویز دارو، وابسته به مرفین شده و برای آزمایشات بعدی آماده بودند. برای حصول اطمینان از ایجاد وابستگی به مرفین در حیوانات، یک تا دو عدد از موش‌های تحت درمان با مرفین در هر گروه کاری با تزریق زیر جلدی نالوکسان با دوز  $3 \text{ mg/kg}$  در ناحیه گردن تحت بررسی قرار می‌گرفتند و سپس ظهور علائم سندروم ترک به عنوان شاخص وابستگی حیوان به مرفین در طی یک ساعت مشاهده و ثبت می‌گردید.

پس از وزن کردن، حیوانات توسط اورتان ( $1/5 \text{ g/kg, i.p.}$ ) بیهوش می‌شدند و بر روی heating pad (Narco Bio-system) قرار می‌گرفتند و درجه حرارت بدن حیوانات در حد  $37^\circ \text{C}$  ثابت می‌شد. تراکتوستومی انجام شده و به حیوان اجازه داده می‌شد خود بخود تنفس کند. در صد اشباع اکسیژن خون شریانی توسط پالس اکسی متر (Radiometr-Copenhagen) مانیتور می‌شد. توسط کنتری که در شریان فمورال قرار داده می‌شد نمونه خون جهت بررسی pH در طی آزمایش جمع آوری می‌شد. فشار خون و ضربان قلب حیوان توسط مبدل فشار خون (Narco Bio-System P-1000 B) که کاف آن به دم موش متصل می‌شد، به وسیله فیزیو گراف (Narco Bio-System) ثبت می‌شد. برای ثبت جریان خون مغزی (CBF) از دستگاه جریان سنج لیزری (LDF) استفاده می‌شد (MBF3D, Moor instrument, UK). برای این منظور ابتدا سر حیوان را در یک وضعیت افقی داخل دستگاه استریوتاکس قرار داده، سپس موه‌های سر موش را تراشیده و با کمک یک اسکالپل تیز، پوست سر در حدفاصل چشم‌ها و استخوان پس سری و به موازات صفحه سائیتال برش داده می‌شد. متعاقباً لبه‌های پوست سر را با کمک پنس یا گیره‌های کوچک بطرفین کشیده و نسوج ناحیه فوقانی سر برداشته می‌شد. پس از مشخص نمودن نقطه برگما، به کمک اطلس پاکسینوس محل کورتکس حسی اندام عقبی حیوان را مشخص کرده (در حدفاصل  $0/3 \text{ mm}$  تا  $3/3 \text{ mm}$  - برگما و  $1/3$  تا  $4$  میلی‌متر از خط سائیتال). استخوان جمجمه در نقطه میانی این ناحیه (۲ میلی‌متر عقب برگما و  $2/7$  میلی‌متر بطور

(cGMP) موجب اتساع عروقی می‌شوند [۱۳].

آدنوزین یک تعدیل کننده درون زاد مهم عصبی است که عموماً اثرات مهاری بر عملکرد مغزی دارد [۱۶]. آدنوزین به عنوان یک واسط بین فعالیت عصبی و افزایش جریان خون مغزی مطرح است [۸]. سیستم آدنوزینی دارای برهم کنش وسیعی با سیستم اپیوئیدی است تا آنجا که از آدنوزین به عنوان واسط اثرات مرفین یاد می‌شود، به عنوان مثال متیل گزانتین‌ها (آنتاگونیست گیرنده‌های آدنوزینی) اثرات بی‌دردی ناشی از تجویز داخل نخاعی مرفین را بلوک می‌کنند و هیپوتانسیون ناشی از مرفین را کاهش می‌دهند. آدنوزین و مرفین به گونه‌ای وابسته به دوز موجب کاهش فشار خون دیاستولی در موش‌های بی‌هوش می‌گردند که این اثرات توسط آنتاگونیست‌های گیرنده A1 آدنوزینی بلوک می‌شوند [۲۵].

تحقیقات مختلف تغییرات تعداد و فعالیت گیرنده‌های آدنوزینی را در نواحی مختلف مغزی در پی وابستگی به مورفین نشان می‌دهند. از آن جمله تنظیم کاهشی گیرنده A1 آدنوزینی و تنظیم کاهشی گیرنده A2 آدنوزینی در هسته دسته منزوی در موشهای صحرایی وابسته به مرفین است [۲۵، ۲۶]. تنظیم افزایشی گیرنده A1 در کورتکس موش صحرایی و تنظیم کاهشی گیرنده A1 در نخاع نیز از آن جمله است [۲۳]. تحقیقات نشان داده اند، گیرنده‌های A2 آدنوزینی نقش بارزی در تنظیم جریان خون عروق قشر مغز در موشهای وابسته به مرفین ایفاء می‌کنند [۲۷]. لذا با توجه به شواهد مذکور هدف این تحقیق بررسی نقش گیرنده‌های A2 آدنوزینی و تغییرات سازشی احتمالی ایجاد شده بر زیر نوع های این گیرنده در عروق قشر مغز در موشهای صحرایی وابسته به مرفین است.

## مواد و روش‌ها

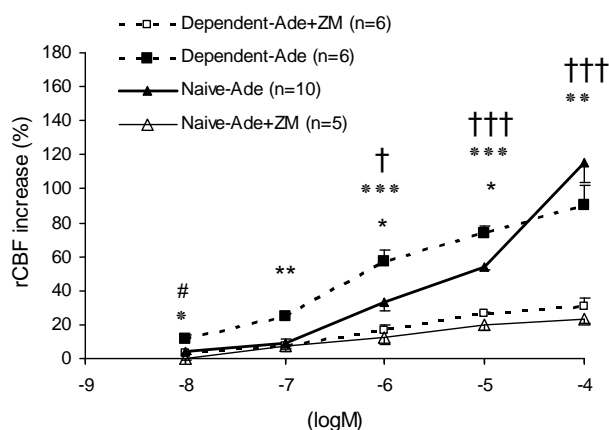
در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر بالغ، نژاد Sprague Dawley در محدوده وزنی ( $250-350 \text{ g}$ ) که در شرایط یکسان و استاندارد نگهداری می‌شدند، استفاده شد. تعداد نمونه در هر گروه ۵-۷ سر موش صحرایی بود. در این تحقیق از روش خوراکی جهت ایجاد وابستگی به مرفین استفاده شد. مرفین با غلظت‌های متوالی  $0/3$ ،  $0/2$ ،  $0/1$  mg/ml به مدت ۴۸ ساعت و  $0/4 \text{ mg/ml}$  در طی روزهای بعدی، در آب آشامیدنی حیوان

A<sub>2A</sub> ۲۰ دقیقه قبل و در طی سوپرفیوژن آگونیست‌ها بکار برده می‌شد. جریان خون مغزی در کل مراحل آزمایش توسط دستگاه جریان سنج لیزری (LDF) ثبت و همزمان اطلاعات به کامپیوتر منتقل می‌شد. در پایان آزمایش‌ها، حیوان با تزریق KCl اشباع کشته شده و جریان خون ثبت شده به عنوان صفر زیستی (BZ) در جریان سنج لیزری ثبت می‌شد. مقادیر صفر زیستی از مقادیر جریان خون ثبت شده قبلی کسر شده و سپس درصد تغییرات جریان خون محاسبه می‌شد.

مرفین سولفات و ساکاروز در آب، اورتان و نالوکسان هیدروکلراید در سالیین، آدنوزین در 2-p-(2-carboxyethyl)-phenethyl-amino-5'-aCSF، CGS-21680، 4-N-ethylcarboxamido adenosine (CGS-21680)، (ZM-241385) [1,2,4]-triazolo [2,3-a] [1,3,5] triazin-5-ylamino ethyl phenol 5-N-ethylcarboxamido-adenosine (NECA) در دی متیل سولفوکسامید (DMSO) حل شده تا یک محلول استوک با غلظت 10 mM بدست آید. سپس یک حجم از محلول استوک را صد برابر با aCSF رقیق نموده تا غلظت نهایی DMSO به ۱٪ و غلظت دارو به ۱۰<sup>-۴</sup> مول برسد. برای مقایسه تغییرات جریان خون مغزی در هر گروه از Student's paired t-test و برای مقایسه گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس یک و دو طرفه استفاده شد و بدنبال آن برای مقایسه چندگانه نیز از آزمون Tukey's استفاده می‌شد. در همه جداول و نمودارها اطلاعات بصورت میانگین ± خطای انحراف از میانگین ارائه شده و سطح معنی دار در مقایسه‌ها P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

## یافته‌ها

درمقایسه نتایج بدست آمده از تاثیر آگونیست عمومی گیرنده‌های آدنوزینی در حضور و عدم حضور آنتاگونیست گیرنده A<sub>2A</sub> آدنوزینی: الف- کاربرد موضعی آدنوزین با غلظت‌های (M) ۱۰<sup>-۸</sup>، ۱۰<sup>-۷</sup>، ۱۰<sup>-۶</sup>، ۱۰<sup>-۵</sup>، ۱۰<sup>-۴</sup> در گروه حیوانات دست نخورده و حیوانات وابسته به مرفین پاسخ‌های وابسته به دوز نشان داد (شکل ۱). حد اکثر غلظت آدنوزین ۱۰<sup>-۴</sup> M در نظر گرفته شد، چون پاسخ‌های ایجاد شده در غلظت‌های بالاتر در حد



شکل ۱- اثرات آدنوزین (M) ۱۰<sup>-۴</sup>، ۱۰<sup>-۵</sup>، ۱۰<sup>-۶</sup>، ۱۰<sup>-۷</sup>، ۱۰<sup>-۸</sup> در حضور و عدم حضور ZM-241385 بر جریان خون عروق نرم شامه‌ای در گروه حیوانات وابسته به مرفین و دست نخورده. پاسخ‌ها به صورت درصد تغییرات از مقادیر پایه جریان خون عروق نرم شامه‌ای به صورت Mean ± SEM گزارش شده‌اند، ۰/۰۵ < P < ۰/۰۱، \* P < ۰/۰۱، \*\* P < ۰/۰۰۱، † P < ۰/۰۵، †† P < ۰/۰۰۱، ††† P < ۰/۰۰۰۱، †††† P < ۰/۰۰۰۰۱. در شرایط عدم حضور ZM، P < ۰/۰۵، † P < ۰/۰۰۱، †† P < ۰/۰۰۰۱، ††† P < ۰/۰۰۰۰۱. در شرایط عدم حضور و حضور ZM، \* P < ۰/۰۵، \* P < ۰/۰۱، \* P < ۰/۰۰۱، † P < ۰/۰۰۱، †† P < ۰/۰۰۰۱، ††† P < ۰/۰۰۰۰۱. بین گروه حیوانات وابسته به مرفین در شرایط عدم حضور و حضور ZM، ۰/۰۵ < P < ۰/۰۰۱. بین گروه حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین که ZM + آدنوزین دریافت کرده بودند.

جانبی) توسط مته و دریل دندانپزشکی سوراخ شده (قطری حدود ۳ میلی‌متر)، سپس با دقت تمام، سخت شامه را نیز جدا نموده و سطح قشر با مایع مغزی نخاعی مصنوعی (aCSF) گرم شده (۳۷°C) که با اکسیژن ۹۵٪ و CO<sub>2</sub> ۵٪ کاملاً اکسیژنه شده و pH در حد ۷/۴ ثابت نگهداشته می‌شد سوپرفیوژمی شد. ترکیب aCSF (mM) به قرار ذیل است: 131.9 NaCl, 2.95 KCl, 2.95, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 0.665 MgCl<sub>2</sub>, 24.6 NaHCO<sub>3</sub>, Urea 6.7 and 3.7 D-glucose (pH 7.4). پروب LDF در فاصله ۲/۰ mm از سطح قشر مغز قرار داده می‌شد و پس از گذشت نیم تا یک ساعت از شروع ثبت و برقراری حالت پایدار در جریان خون مغزی، آدنوزین، CGS-21680 و NECA با غلظت‌ها ۱۰<sup>-۸</sup>، ۱۰<sup>-۷</sup>، ۱۰<sup>-۶</sup>، ۱۰<sup>-۵</sup>، ۱۰<sup>-۴</sup> مول مورد استفاده قرار می‌گرفت که با فاصله‌های زمانی ۱۰ دقیقه جایگزین می‌شد. در هر حیوان تنها از یک آگونیست استفاده می‌شد. پس از کاربرد دارو مثبت جریان خون مغزی، محل مربوطه توسط aCSF شسته شده و پس از رسیدن به جریان خون پایه (حدود ۲۰ دقیقه بطول می‌انجامید)، در موارد بررسی اثر آگونیست در حضور آنتاگونیست، آنتاگونیست گیرنده

وجود بیشتر بودن تغییرات جریان خون در گروه حیوانات وابسته به مرفین، اختلاف میانگین‌ها از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۱)  $P < 0.05$ .

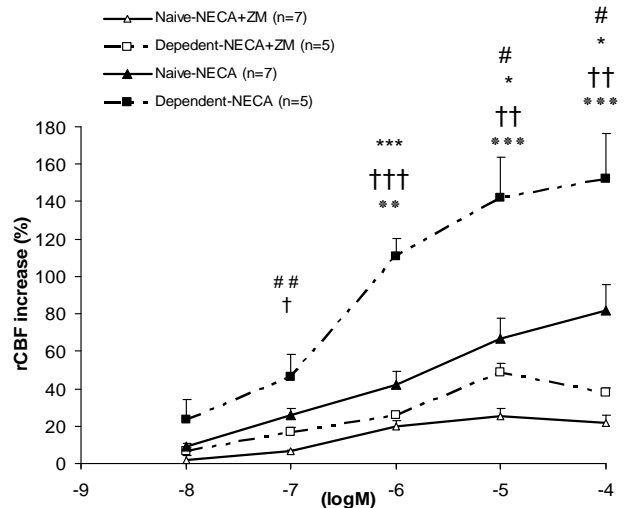
درمقایسه نتایج بدست آمده از تاثیر آگونیست گیرنده‌های  $A_{2A}$  و  $A_{2B}$  آدنوزینی بر عروق نرم شامه‌ای در حضور و عدم حضور آنتاگونیست گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی:

الف- کاربرد NECA به عنوان آگونیست گیرنده‌های  $A_{2A}$  و  $A_{2B}$  آدنوزینی ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M) در گروه حیوانات دست نخورده و گروه حیوانات وابسته به مرفین پاسخ‌های وابسته به دوز نشان داد (شکل ۲)، که مقایسه میانگین‌ها بین دو گروه نام برده از نظر آماری در هر سه غلظت  $(10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$  M) معنی دار بود  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  (شکل ۲).

ب- در هر دو گروه حیوانات مورد آزمایش افزایش جریان خون ایجاد شده توسط NECA ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M) در حضور آنتاگونیست گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی ZM-241385 ( $10^{-6}$  M)، به گونه‌ای معنی دار مهار شد (شکل ۲)  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ ،  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ .

ج- مقایسه نتایج بدست آمده از کاربرد هم زمان آنتاگونیست گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی، ZM-241385 ( $10^{-6}$  M)، و آگونیست گیرنده‌های آدنوزینی  $A_{2A}$  و  $A_{2B}$  آدنوزینی، NECA، ما بین گروه‌های مورد آزمایش در غلظت  $10^{-7}$  M ( $P < 0.01$ )، در غلظت  $10^{-5}$  و  $10^{-4}$  M ( $P < 0.05$ )، از نظر آماری اختلاف معنی دار نشان داد (شکل ۲).

درمقایسه نتایج بدست آمده از تاثیر آگونیست اختصاصی گیرنده‌های  $A_{2A}$  آدنوزینی بر عروق نرم شامه‌ای در حضور و عدم حضور آنتاگونیست گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی: الف- کاربرد CGS-21680 به عنوان آگونیست اختصاصی گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی با غلظت‌های ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M) در گروه حیوانات دست نخورده و گروه حیوانات وابسته به مرفین، افزایش جریان خون وابسته به دوز نشان داد (شکل ۳). از نظر آماری مقایسه میانگین‌ها بین گروه حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین در هیچ یک از غلظت‌ها اختلاف معنی دار نشان نداد (شکل ۳). ب- افزایش جریان خون ایجاد شده توسط CGS-21680 ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M) در حضور

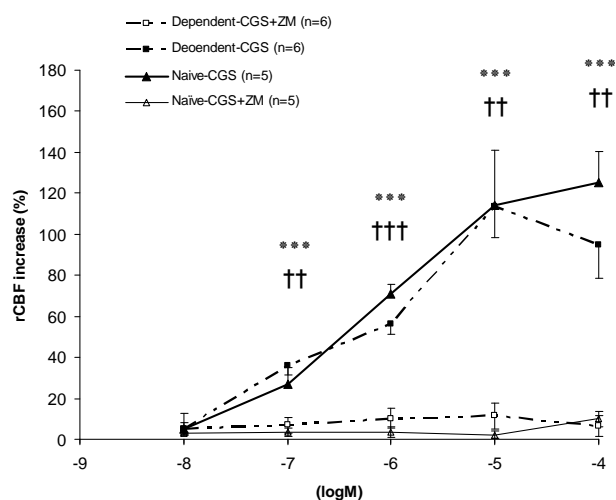


شکل ۲- اثرات NECA ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M) بر جریان خون عروق نرم شامه‌ای، در حضور و عدم حضور ZM-241385 در گروه حیوانات وابسته به مرفین و دست نخورده. پاسخ‌ها به صورت درصد تغییرات از مقادیر پایه جریان خون عروق نرم شامه‌ای به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش شده‌اند.  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ ، بین گروه حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین در شرایط عدم حضور ZM،  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  بین گروه حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین در شرایط حضور ZM،  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  بین گروه حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین در شرایط عدم حضور و در حضور ZM.

کفه قرارمی گرفت و مدت زمان رسیدن به جریان خون پایه به بیشتر از ۶۰ دقیقه زمان نیاز داشت. از نظر آماری مقایسه میانگین‌ها مابین گروه حیوانات دست نخورده و گروه حیوانات وابسته به مرفین که آدنوزین دریافت کرده بودند در غلظت‌های  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M اختلاف معنی دار نشان داد  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ . در غلظت  $10^{-4}$  M این اختلاف معنی دار نبود (شکل ۱). ب- افزایش جریان خون ایجاد شده توسط آدنوزین ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M) در حضور آنتاگونیست گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی، ZM-241385 ( $10^{-6}$  M)، در هر دو گروه به گونه‌ای معنی دار مهار شد،  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  (شکل ۱). ج- مقایسه میانگین‌های افزایش جریان خون ناشی از تاثیر آدنوزین در حضور آنتاگونیست گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی، ZM-241385 ( $10^{-6}$  M)، ما بین گروه حیوانات دست نخورده و گروه حیوانات وابسته به مرفین تنها در غلظت  $10^{-8}$  M اختلاف معنی دار نشان داد و در غلظت‌های ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$  M) با

(افزایش جریان خون) بیشتر از پاسخ بدست آمده از گروه حیوانات دست نخورده نشان داد (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهد که سیستم آدنوزینی در حیوانات وابسته به مرفین نقش برجسته تری در تنظیم جریان خون عروق این ناحیه ایفا می‌کند. از آنجا که آدنوزین اثرات خود را از طریق فعال کردن گیرنده‌های ویژه‌ی موجود بر سطح سلول (A1, A2A, A2B, A3) و اتصال به G- پروتئین‌ها اعمال می‌کند [۱۲] پاسخ حاصله می‌تواند ناشی از حساس شدن، تنظیم افزایشی در تعداد گیرنده‌های آدنوزینی و یا تغییراتی در مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی باشد. تغییرات گیرنده‌های آدنوزینی در موارد مختلف گزارش شده است، چنانچه درمان طولانی مدت با آنتاگونیست‌های آدنوزینی معمولاً منجر به افزایش اثرات آدنوزین می‌گردد که از طریق افزایش انتخابی در تعداد گیرنده‌های A1، حساس شدن گیرنده و یا تغییر بر هم کنش بین گیرنده و G- پروتئین‌های وابسته می‌باشد [۱۷، ۲۰]. علاوه بر این تغییرات مختلفی در گیرنده‌های آدنوزینی در حالت وابستگی به مرفین در نواحی مختلف مغزی رخ می‌دهد که از جمله تنظیم کاهشی گیرنده A1 در هسته دسته منزوی و نخاع [۲۶، ۲۲]، تنظیم افزایشی گیرنده A1 در قشر و کل همونای مغزی [۱۴، ۱]، افزایش گیرنده A2 در هسته دسته منزوی [۵، ۶]، کاهش گیرنده A2A در استریاتوم موش صحرائی [۱۵]، افزایش حساسیت نورون‌های هسته پارازیگانتوسولولاریس به کافئین [۱۵] و... می‌باشد.

آدنوزین به عنوان آگونیست عمومی گیرنده‌های آدنوزینی، بر تمام زیر نوع‌های گیرنده اثر دارد. از طرفی گیرنده‌ها در تمایلشان به آدنوزین، گستردگی و عملکردشان نیز متفاوت هستند. گیرنده‌های A1 و A2A از نوع گیرنده‌های با تمایل بالا هستند، زیرا تمامی آنها با غلظت‌های نانومولار آدنوزین فعال می‌شوند. در صورتی که A2B، A3 با غلظت‌های میکرومولار فعال می‌شوند [۱۰]. بر اساس بررسی‌های پیشین اتساع شریان‌های پارانشیم مغز توسط آدنوزین، اساساً توسط فعال شدن گیرنده‌های A2 آدنوزینی ایجاد می‌شود [۱۹]. نتایج بدست آمده در این بررسی نیز بر نقش گیرنده‌های A2 آدنوزینی در تنظیم جریان خون عروق نرم شامه‌ای در حیوانات وابسته به مرفین و دست نخورده اذعان دارد، به علاوه این نقش در گروه حیوانات وابسته به مرفین بارزتر به نظر می‌رسد که با نتایج ارائه شده پیشین، هم



شکل ۳- اثرات CGS-21680 ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  M) بر جریان خون عروق نرم شامه‌ای، در حضور و عدم حضور ZM-241385 در گروه حیوانات وابسته به مرفین و دست نخورده. پاسخ‌ها به صورت درصد تغییرات از مقادیر پایه جریان خون عروق نرم شامه‌ای به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش شده‌اند.  $P < 0.001$ ،  $††† P < 0.001$  بین گروه حیوانات دست نخورده در شرایط عدم حضور و حضور ZM.  $P < 0.001$ ،  $***$  بین گروه حیوانات وابسته به مرفین در شرایط عدم حضور و در حضور ZM.

آنتاگونیست گیرنده A2A آدنوزینی، ZM-241385 ( $10^{-6}$  M)، در غلظت‌های  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M به گونه‌ای معنی دار در هر دو گروه مورد آزمایش مهار شد (شکل ۳)  $P < 0.001$ ،  $††† P < 0.001$ ، ج- مقایسه نتایج بدست آمده از کاربرد هم زمان آنتاگونیست و آگونیست گیرنده‌های A2A آدنوزینی، CGS-21380، ما بین گروه حیوانات دست نخورده و گروه حیوانات وابسته به مرفین، در هیچ یک از غلظت‌های مورد آزمایش ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  M) از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۳).

## بحث

سیستم اپیوئیدی در تنظیم جریان خون مغزی دخالت دارد و آدنوزین نیز به عنوان حلقه ارتباطی میان فعالیت عصبی و افزایش جریان خون مغزی مطرح است. به ویژه نقش گیرنده‌های آدنوزینی A2 در تنظیم جریان خون عروق مغزی مورد بررسی قرار گرفته است [۱۶، ۲۵].

در این بررسی گروه حیوانات وابسته به مرفین در غلظت‌های  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$  M

گیرنده‌های  $A_{2B}$  از گیرنده‌های  $A_{2A}$  سود مند است. هر دوی این گیرنده‌ها به صورت مثبت به آدنیلیل سیکلاز کوپل میشوند و توسط آگونیست غیر انتخابی NECA فعال می‌شوند. حقیقتاً CGS-21680، بر گیرنده‌های  $A_{2B}$  بی‌تاثیر است اما به اندازه NECA در فعال کردن گیرنده  $A_{2A}$  موثر است ((EC50) برای هر دو آگونیست‌ها در حدود نانومولار) [۹]. CGS-21680 یک آگونیست بسیار انتخابی است که واقعاً بر گیرنده  $A_{2B}$  و سایر گیرنده‌های آدنوزینی بی‌تاثیر است [۱۹].

شناسائی فارماکولوژیک گیرنده‌ها توسط آنتاگونیست‌های مربوطه نیز امکان پذیر است. اما متأسفانه آنتاگونیستی با قدرت انتخاب بالا برای گیرنده  $A_{2B}$  هنوز در دسترس نیست. گیرنده  $A_{2B}$  اغلب با سایر گیرنده‌های آدنوزینی در یک بافت یافت می‌شود و حتی در یک سلول بیان میشود. از آنجا که آنتاگونیست‌های انتخابی برای گیرنده‌های  $A_1$ ،  $A_{2A}$ ،  $A_3$  در دسترس می‌باشد، بررسی اثر گیرنده  $A_{2B}$  با حذف اثر سایر گیرنده‌های آدنوزینی امکان پذیر است. یکی از آنتاگونیست‌های انتخابی گیرنده  $A_{2A}$ ، ZM-241385 می‌باشد که ۳۰ تا ۸۰ بار برای گیرنده  $A_{2A}$  نسبت به گیرنده  $A_{2B}$  انتخابی تر [۹] و براساس بررسی‌های انجام شده بر گیرنده‌های آدنوزینی عروق مغزی حتی اختصاصی عمل می‌کند [۱۹].

بر اساس مطالب بالا، برای بررسی زیر نوع‌های گیرنده‌های  $A_2$  آدنوزینی که افزایش جریان خون عروق نرم شامه‌ای به آن نسبت داده شده است از CGS-21680، NECA و ZM-241385 استفاده شد. نتایج نشان داد CGS-21680 به عنوان آگونیست اختصاصی گیرنده  $A_{2A}$  آدنوزینی در گروه حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین باعث افزایش جریان خون عروق نرم شامه‌ای به صورت وابسته به دوز شد. به علاوه ZM-241385 این اثر را در هر دو گروه به طور کامل بلوک کرد (شکل ۳)، که با توجه به اختصاصی بودن آگونیست و انتخابی بودن آنتاگونیست مربوطه، با قدرت نقش گیرنده  $A_{2A}$  در تنظیم rCBF را تایید می‌کند. قابل ذکر است کار برد ZM-241385 ( $10^{-6}$  M) به همراه حلال DMSO با غلظت ۱٪ بر جریان عروق مورد آزمایش تاثیری نداشت (شکل ۴).

مقایسه میانگین‌های درصد افزایش rCBF میان گروه‌های حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین نه تنها پس از کاربرد CGS-21680 بلکه بعد از کاربرد CGS-21680+ZM-241385

خوانی دارد [۳]. بر اساس نتایجی که پیشتر بدست آمده به احتمال زیاد گیرنده‌های  $A_1$  آدنوزینی در تنظیم جریان خون عروق نرم شامه‌ای در گروه کنترل و وابسته به مرفین نقشی ندارند، چون بررسی اثر سیکلو هگزیل آدنوزین (CHA) به عنوان آگونیست اختصاصی گیرنده  $A_1$  آدنوزینی و سیکلو پنتیل تتوفیلین (CPT) به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده  $A_1$  آدنوزینی بر جریان خون عروق نرم شامه‌ای، توسط تکنیک LDF، هیچ اثر معنی داری نشان نداده است. افزایش معنی دار جریان خون ایجاد شده توسط آدنوزین در گروه حیوانات وابسته به مرفین نسبت به حیوانات دست نخورده، توسط تتوفیلین (آنتاگونیست گیرنده‌های آدنوزینی) بلوک شده است و افزایش معنی دار جریان خون ایجاد شده توسط NECA در گروه حیوانات وابسته به مرفین در مقایسه با گروه حیوانات دست نخورده، توسط آلوکسازین (مهار کننده انتخابی گیرنده‌های  $A_{2B}$ ) مهار شده است. این نتایج می‌تواند نقش برجسته گیرنده‌های  $A_2$  آدنوزینی را در تنظیم جریان خون عروق مغزی به ویژه در شرایط وابستگی به مرفین نشان دهد [۲۷].

گیرنده‌های  $A_2$  آدنوزینی بر اساس تمایل گیرنده به آدنوزین به دو زیر گروه  $A_{2A}$  (تمایل بالا) و  $A_{2B}$  (تمایل پایین) تقسیم شده که هر دوی آنها آدنیلیل سیکلاز را فعال می‌کنند [۳، ۴]. آگونیست‌های قوی و انتخابی برای گیرنده‌های  $A_1$ ،  $A_{2A}$ ،  $A_3$  طراحی شده اند. این مواد ابزارهایی مهم برای شناسایی عملکرد این گیرنده‌ها هستند. هر چهار زیر گروه گیرنده‌ها به گونه‌ای طبقه‌بندی شده توانایی پاسخ گویی به این آگونیست‌ها را دارا می‌باشند ولی تا کنون هیچ آگونیست انتخابی برای رسپتورهای  $A_{2B}$  یافت نشده است [۹].

آنالوگ آدنوزینی، NECA، قدرتمندترین آگونیست گیرنده  $A_{2B}$  باقی مانده است، که با غلظت  $2 \mu\text{M}$ ، نصف-اثرحد اکثر (EC50) را در تحریک ایجاد آدنیلیل سیکلاز در پی دارد. البته این ماده به عنوان آگونیست گیرنده  $A_{2B}$  غیر انتخابی است و حتی سایر گیرنده‌ها را با تمایلی بیشتر (برای گیرنده‌های  $A_1$  و  $A_{2A}$  غلظت EC50 در حدود پایین نانومولار و برای گیرنده‌های  $A_3$  غلظت EC50 در حدود بالای نانومولار) فعال می‌کند. پس شناسایی گیرنده‌های  $A_{2B}$  اغلب زمانی امکان پذیر است که آگونیست‌های انتخابی سایر گیرنده‌ها فاقد اثر باشند. به طور مثال آگونیست انتخابی گیرنده  $A_{2A}$ ، CGS-21680، در افتراق

کاربرد آدنوزین در حیوانات وابسته به مرفین نسبت به گروه حیوانات دست نخورده، احتمالاً ناشی از گیرنده‌های A<sub>2B</sub> آدنوزینی است.

Haw Kyong Shin و همکارانش نشان داده‌اند که با افزایش غلظت NECA و آدنوزین و نه CGS-21680، همگام با اتساع عروق نرم شامه‌ای وابسته به غلظت، افزایش تولید NO وجود دارد که این اتساع عروقی توسط L-NAME، یک مهار کننده نیتریک اکساید سینتاز، مهار می‌شود و نتیجه گرفته‌اند، گیرنده‌های A<sub>2B</sub> و نه گیرنده‌های A<sub>2A</sub> از طریق تولید نیترات/نیتریت باعث ایجاد اتساع عروقی این ناحیه می‌شوند [ ۲ ] Martin. و همکارانش نتایج مشابهی را در شریان‌های کلیوی حاوی گیرنده‌های A<sub>2B</sub> نشان داده‌اند. محل این گیرنده‌ها، آندوتلیوم عروق است و باعث آزاد سازی NO می‌شوند [ ۱۸ ]. از طرفی آدنوزین در عروق کرونر قلبی از طریق فعال کردن G-پروتئین‌های حساس به توکسین پرتوزیس موجب باز شدن کانالهای پتاسیمی حساس به ATP آندوتلیوم می‌شود. این امر باعث تولید رهایش NO شده که از طریق گوانیل سیکلاز موجب اتساع عروقی می‌شود [۱۱].

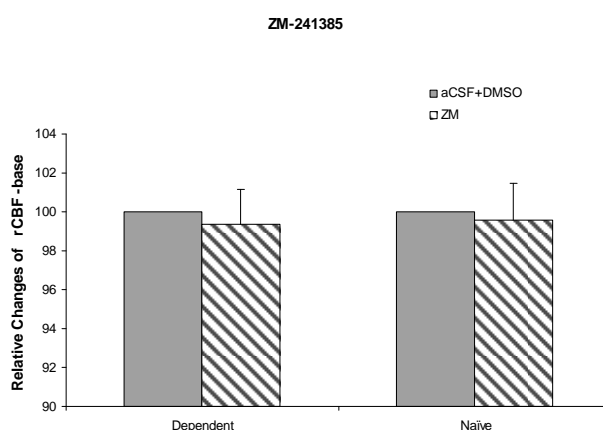
سیستم اپیوئیدی نیز در تنظیم و رهایش NO نقش دارد. اپیوئیدهای اندورژن شامل متیونین - آنکفالین و لوسین - آنکفالین و داینورفین که آگونیست اختصاصی گیرنده‌های  $\kappa, \delta, \mu$  هستند از طریق NO موجب اتساع عروق نرم شامه‌ای شده که در این ارتباط گیرنده  $\kappa$  وابستگی بیشتری (نسبت به سایر گیرنده‌ها) به رهایش NO نشان می‌دهد [۲۴، ۵]. در خوکه‌های تازه متولد شده انبساط سرخرگ‌های نرم شامه‌ای ناشی از داینورفین به فعال شدن کانالهای پتاسیمی حساس به ATP نسبت داده شده است [۲]. از آنجا که در طی وابستگی به مرفین در سطوح مختلف سلولی پدیده تحمل ظاهر می‌گردد از این رو شاید مکانیسم‌های موازی، با فعالیت بیشتر خود کمبودهای ایجاد شده را مرتفع می‌کنند.

بر اساس شواهد ذکر شده چنین نتیجه گرفته شد که احتمالاً در شرایط وابستگی به مرفین گیرنده‌های آدنوزینی A<sub>2B</sub> نقش برجسته تری در تنظیم جریان خون عروق نرم شامه‌ای در مقایسه با گیرنده‌های A<sub>2A</sub> آدنوزینی ایفا می‌کنند و دلایلی نیز که بتواند این افزایش پاسخ دهی را توجیه کند تا اندازه‌ای بر شمرده شد. اما اینکه دقیقاً چه مکانیسم‌هایی همزمان با افزایش پاسخ

21680 هیچ اختلاف معنی داری نشان نداد (شکل ۳). از این رو می‌توان اظهار کرد که بیشتر بودن افزایش جریان خون پس از کاربرد آدنوزین در حیوانات وابسته به مرفین نسبت به گروه حیوانات دست نخورده، احتمالاً ناشی از گیرنده A<sub>2B</sub> آدنوزینی است. برای بررسی احتمال فوق اثرات NECA بر جریان خون عروق نرم شامه‌ای در حضور و عدم حضور ZM-241385 بررسی شد.

کاربرد NECA در گروه حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین باعث افزایش جریان خون عروق نرم شامه‌ای به صورت وابسته به دوز شد از آنجا که NECA بر هر دو زیر گروه گیرنده‌های A<sub>2</sub> آدنوزینی موثر است برای حذف تقریبی اثر گیرنده‌های A<sub>2A</sub> آدنوزینی از ZM-241385 (۳۰ تا ۸۰ بار نسبت به گیرنده‌های A<sub>2A</sub> انتخابی‌تر عمل می‌کند) استفاده شد. نتایج به وضوح مهار اثرات اعمال شده توسط NECA را در هر دو گروه نشان داد اگر چه این مهار بخصوص در غلظت‌های بالای  $10^{-6}$  M کامل نبود (شکل ۲). این نتایج نشان می‌دهد بخشی از افزایش جریان خون عروق نرم شامه‌ای در هر دو گروه توسط گیرنده‌های A<sub>2B</sub> آدنوزینی اعمال می‌شود.

مقایسه میانگین‌های درصد افزایش rCBF میان گروه‌های حیوانات دست نخورده و وابسته به مرفین نه تنها پس از کاربرد NECA، بلکه بعد از کاربرد NECA + ZM-241385 به وضوح اختلاف معنی داری نشان داد (شکل ۲). از این رو می‌توان اظهار کرد که بیشتر بودن افزایش جریان خون دیده شده پس از



شکل ۴- اثرات ZM-241385 به عنوان آنتاگونیست انتخابی گیرنده A<sub>2A</sub> آدنوزینی با غلظت  $10^{-6}$  M بر جریان خون پایه ی عروق نرم شامه‌ای، در گروه‌های حیوانات دست نخورده (n=۱۲) و وابسته به مرفین (n=۱۲). پاسخ‌ها به صورت درصد تغییرات از مقادیر پایه جریان خون عروق نرم شامه‌ای (۱۰۰٪) به صورت  $\pm$  SEM گزارش شده‌اند.



human mast cell: co-expressing A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 34 (1997) 123-129.

- [12] Fredholm BB, Abbrachio MP, Burnstock G, Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46 (1994) 146-166.
- [13] Kaplan GB and Leite-Morris KA, Up-regulation of adenosine transporter binding sites in striatum and hypothalamus of opiate tolerant mice. *Brain Res* 763 (1997) 215-220
- [14] Kaplan GB, Leite-Morris KA and Sears MT, Alteration of adenosine A<sub>1</sub> receptors in morphine dependence. *Brain Res* 657 (1994) 347-350.
- [15] Khalili M, Semnani S and Fathollahi Y, Caffeine increases paraventricular neuronal firing rate and induces withdrawal signs in morphine dependent rats. *Eur J Pharmacol* 412 (2001) 239-245.
- [16] Ko KR, Ngai AL, Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *Am J Physiol* 259 (1990) H1703-H1708.
- [17] Lupic CR, Jarvis MF and Berma RF, Chronic theophylline treatment in vivo increases high affinity adenosine A<sub>1</sub> receptor binding and sensitivity to exogenous adenosine in the in vitro hippocampal slice. *Brain Res* 542 (1991) 55-62.
- [18] Martin PL, Potts AA, The endothelium of the rat renal artery plays an obligatory role in A<sub>2</sub> adenosine receptor-mediated relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 270 (1994) 893-899.
- [19] Ngai AL, Coyne EF, Meno JR, West GA and Winn HR, Receptor subtypes mediating adenosine-induced dilation of cerebral arterioles. *Am J Physiol* 280 (2001) H2329-H2335.
- [20] Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA and Daly JW, Effects of chronic caffeine on adenosine, dopamine and acetylcholine systems in mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 328 (1994) 261-287.
- [21] Shine HK, Shine SN, Hong KW, Role of adenosine A<sub>2B</sub> receptors in vasodilation of rat pial artery and cerebral blood flow auto regulation. *A J Physiol* 278 (2000) H339-H334.
- [22] Tao PL, Liu CF and Tsai HC, Chronic intracerebroventricular administration of morphine down-regulates spinal adenosine A<sub>1</sub> receptors in rats. *Eur J Pharmacol* 278 (1995) 233-237.
- [23] Tao PL, Liu CF, Tsai HG, Chronic intracerebroventricular administration of morphine down-regulation

دهی گیرنده‌های آدنوزینی A<sub>2B</sub> در شرایط وابستگی به مرفین این اثرات را واسطه‌گری می‌کند، جای بررسی دارد.

## منابع

- [1] Ahlijanian MK and Takemori AE, Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine – tolerant and dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther* 236 (1986) (3): 615- 620.
- [2] Benyo Z, Wahl M, Opiate receptor – mediating mechanisms in the regulation of cerebral blood flow. *Cereb Brain Metab Rev* 8 (1996) 326-357.
- [3] Brun RF, Lu GH, Pugsely TA, Characterization of the A<sub>2</sub> adenosine labeled by [<sup>3</sup>H] NECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* 29 (1992) 331-346.
- [4] Daly JW, Butts-lamb P and Padgett W, Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: Interaction with caffeine and related methylxantines. *Cell Mol Neurobiol* 41 (1983) 69-80.
- [5] Dalziel HH, Westfall DP, Receptors for adenine nucleotides and nucleosides Sub classification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev* 46 (1994) 449-466.
- [6] De Montis MG, Devoted P, Meloni D, Saba PL and Taglia Monte A, Decreased adenosine A<sub>2</sub> receptor function in morphine dependent rats. *Pharmacol Res* 25 (1992) 232-233.
- [7] Devine JO and Armstead WM, The role of nitric oxide in opioid-induced pial artery vasodilation. *Brain Res* 675 (1995) 257-263.
- [8] Dirnagl U, Niwa K, Lindauer U and Villringer A, Coupling of cerebral blood flow to neuronal ] Feoktistov I, Biaggioni I, Adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *Pharmacol Rev* 49 (1997) 381-402.
- [9] Dirnagl U, Niwa K, Lindauer U and Villringer A, Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am J Physiol* 267 (1994) H269-H300.
- [10] Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362 (2000) 364-374.
- [11] Feoktistov L, Biaggioni I, Pharmacological characterization of adenosine A<sub>2B</sub> receptors: studies in

- [26] White PJ, Hope W and Rose' Meyer: Changes in adenosine receptors mediating hypotension in morphine-dependent rats. *Eur J Pharmacol* 294 (1995) 215-220.
- [27] Zahedi Korasani M, Hajizadeh S, Semnianian S and Fathollahi Y, Cerebral blood flow regulation in anesthetized morphine dependent rats. *Med J I R Iran* 18 (2005) 353-359.
- spinal adenosine A<sub>1</sub> receptors in rats. *Eur J Pharmacol* 278 (1995) 233-237.
- [24] Thureson Klein A, Kong JY, Klein RJ, Enkephalin and neuropeptid in large cerebral arteries of the pig after ischemia and reserpine. *Blood Vessels* 26 (1989) 177-184.
- [25] White PJ, Hope W and Rose' Meyer RB, The role of adenosine in the hypotensive actions of morphine. *Eur J Pharmacol* 286 (1995) 315-319.