



Changes in gene expression levels of the enzymes involved in biosynthesis and degradation of catecholamines following chronic administration of morphine and pain in rats

Leila Satarian¹, Mohammad Javan^{1*}, Fereshteh Motamedi²

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

2. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University, (.M.C), Tehran, Iran

Received: 14 Sep 2007

Revised: 7 Feb 2008

Accepted: 7 Mar 2008

Abstract

Introduction: Stress inhibits the development of tolerance to morphine analgesia via activating Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis. Modified catecholamine systems have been reported following morphine tolerance development. In the current study we tried to evaluate changes in the gene expression levels for MAO-A, MAO-B, COMT and tyrosine hydroxylase (TyH) enzymes following chronic pain, development of morphine tolerance and their combined administration.

Methods: Analgesic tolerance was induced by intraperitoneal injections of morphine 20 mg/kg twice a day for 4 days. To study the effect of pain on morphine tolerance, 50 μ l of formalin 5% was injected into the animal paws prior to morphine injections. Semi-quantitative RT-PCR was used to evaluate the gene expression level in lumbar spinal cord on day 5. Three separate control groups received saline or morphine injections or pain induction.

Results: Chronic administration of morphine increased the expression level of MAO-B, decreased the expression of TyH and did not change the expression of COMT and MAO-A. Pain increased the expression of MAO-A, but did not change the expression of MAO-B, COMT and TyH. The combination of morphine treatment and pain induction for 4 days partially reversed the reduced expression of TyH and did not change the expression of MAO-A, MAO-B and COMT.

Conclusion: Our results showed that in the context of morphine tolerance, gene expression was changed toward decreased biosynthesis and increased elimination of catecholamines. It seems that chronic administration of morphine caused lower level of catecholamines in spinal neurons and help development of morphine tolerance. Also, chronic pain partially produced compensational changes in gene expression. This may explain for its anti-tolerance effect.

Keywords: Gene expression, MAOa, MAOb, COMT, Tyrosine hydroxylase, Morphine tolerance, Rat

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

تغییر در بیان ژن برخی آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز و تجزیه کتکولامین‌ها بدنبال تجویز مزمن مرفین و درد در موش صحرایی

لیلا ستاریان^۱، محمد جوان^{۱*}، فرشته معتمدی^۲

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: شهریور ۸۶ بازبینی: بهمن ۸۶ پذیرش: اسفند ۸۶

چکیده

مقدمه: استرس قادر به مهار تحمل به اثر ضد دردی مرفین است. تغییر در میزان کته کولامین‌ها به دنبال مصرف مزمن مرفین مشاهده شده است. در مطالعه حاضر به دنبال مصرف مزمن مرفین و بروز تحمل به اثر ضد دردی آن، میزان بیان آنزیم تنظیم گر (Rate limiting) بیوسنتز کتکولامین‌ها یعنی تیروزین هیدروکسیلاز (TyH) و آنزیم‌های تجزیه کننده آنها یعنی منوآمین اکسیداز A و B (MAO-A, MAO-B) و کتکول-0-متیل ترانسفراز (COMT) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: از تزریق مزمن مرفین بصورت داخل صفاقی با دوز ۲۰ mg/kg دو بار در روز به مدت ۴ روز برای القاء تحمل به مرفین استفاده شد. درد التهابی مزمن در طی ۴ روز با تزریق روزانه ۵۰ میکرو لیتر فرمالین ۵٪ به طور متناوب به پنجه پاهای چپ و راست حیوان ایجاد گردید. برای برآورد اثر ضد دردی مرفین در روز ۵ از آزمون Tail- Flick استفاده شد. بررسی بیان ژنهای مورد نظر با کمک روش RT-PCR نیمه کمی در روز ۵ انجام گرفت.

یافته‌ها: در گروه دریافت کننده مرفین تغییر بارزی در میزان بیان ژن MAO-A دیده نشد اما درد مزمن، میزان بیان این ژن را افزایش داد. درد+مرفین بیان این ژن را تغییر نداد. بررسی تغییرات بیان MAO-B نشان دهنده افزایش بیان این ژن در گروه دریافت کننده مرفین مزمن و عدم تغییر آن در گروههای دریافت کننده درد ویا درد+مرفین بود. بیان COMT در گروههای مختلف تغییری نداشت. بیان تیروزین هیدروکسیلاز توسط مرفین مزمن کاهش یافت. درد+مرفین بیان آنرا نسبت به گروه دریافت کننده مرفین مزمن افزایش داد.

نتیجه گیری: در طی ایجاد تحمل، بیان ژنها به نفع کاهش سنتز و افزایش حذف کتکولامین‌ها تغییر می‌نماید. به نظر می‌رسد مصرف مزمن مرفین باعث کاهش دسترسی نرونهای نخاعی به کتکولامین‌ها شده و از این طریق به تکوین تحمل کمک می‌نماید. مشاهده قبلی ما مهار ایجاد تحمل به مرفین با کاربرد موضعی و توام ایی نفرین را نشان داده بود.

واژه‌های کلیدی: تحمل، بیان ژن، کتکولامین‌ها، تیروزین هیدروکسیلاز، منوآمین اکسیداز A و B، کتکول-0-متیل ترانسفراز، مرفین، تحمل، موش صحرایی

مقدمه

برای رسیدن به همان اثر بی‌دردی اولیه باید دارو در مقادیر بالاتر مصرف گردد [۴، ۲۹، ۲۸، ۹]. علیرغم تلاشهای پژوهشی فراوان مشکل تحمل و وابستگی همچنان باقی است. شناخت بهتر مکانیزم‌های تحمل، به یافتن راهکارهایی برای کاهش ایجاد تحمل به داروهای اپیوئیدی کمک خواهد نمود.

گفته می‌شود که استرس با فعال نمودن محور

اپیوئیدها از دیر باز برای ایجاد بی‌دردی استفاده شده‌اند در حالیکه با تجویز طولانی مدت آنها تحمل ایجاد می‌شود. بطوریکه

mjavan@modares.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar با محدوده وزنی 20 ± 220 گرم که تصادفی در گروه‌های حداقل ۶ تایی قرار می‌گرفتند، مورد استفاده بودند. حیوانات محدودیتی در دسترسی به آب و غذا نداشتند و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند.

از تزریق مزمن مرفین (شرکت تماد، ایران) بصورت داخل صفاقی دو بار در روز با دوز 20 mg/kg به مدت ۴ روز برای القاء تحمل به مرفین استفاده شد. گروه‌های کنترل حیواناتی بودند که با همان الگو سالین داخل صفاقی مزمن می‌گرفتند.

درد التهابی مزمن با ۴ روز تزریق روزانه ۵۰ میکرو لیتر فرمالین ۵٪ به طور متناوب به پنجه پاهای چپ و راست حیوان ایجاد می‌گردید. محل‌های تزریق عبارت بودند از: روز اول کف پای راست، روز دوم پشت پای چپ، روز سوم پشت پای راست، روز چهارم کف پای چپ [۱۵].

برای برآورد اثر ضد دردی مرفین از آزمون Tail- Flick استفاده شد [۷]. در ابتدا زمان تاخیر قبل از مصرف مرفین (BL) اندازه‌گیری می‌گردید و زمان تاخیر پس از مصرف مرفین (TL) نیز ۲۰ دقیقه بعد از تزریق اندازه‌گیری می‌شد. شدت نور دستگاه طوری تنظیم شد که زمان تاخیر پایه بین ۳ تا ۴ ثانیه باشد. برای جلوگیری از صدمه بافتی تابش نور پس از ۸ ثانیه قطع می‌شد (زمان cut-off). در هر مورد زمان تاخیر برای کشیدن دم سه بار با فواصل یک دقیقه‌ای در سه نقطه متفاوت از یک سوم میانی دم اندازه‌گیری می‌شد و میانگین به عنوان زمان تاخیر قبل و یا بعد از تیمار محاسبه می‌شد. پاسخ تاخیر آزمون Tail- Flick با استفاده از فرمول زیر به درصد بیدردی از حداکثر بی‌دردی ممکن (MPE %) تبدیل و مقایسه می‌شد [۱۵].

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

بررسی بیان ژن‌های مورد نظر با کمک روش RT-PCR نیمه کمی انجام انجام می‌گرفت. این کار در چند مرحله انجام می‌شد: الف) استخراج قطعه کمری نخاع: حیوان پس از دریافت تزریقات مورد نظر به مدت ۴ روز، در روز پنجم (حدود ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق) برای استخراج نخاع استفاده می‌شد. بخش پشتی قطعه کمری نخاع جدا و به میکروتیوپ استریل منتقل می‌گردید. نمونه‌ها پس از استخراج در نیتروژن

هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) قادر است روند تحمل را مهار کند. در حضور درد ناشی از فرمالین تحمل به اثر ضد دردی مرفین در موش‌های صحرایی به وجود نمی‌آید [۵، ۱۵، ۲۱، ۳۰]. HPA در پاسخ به تحریکات استرس زا از جمله تزریق کف پای فرمالین فعال می‌شود و باعث مهار روند تحمل می‌گردد [۲۰]. آدرنالکتومی و هیپوفیزکتومی اثر آنتاگونیستی درد بر روند تحمل را حذف می‌کند [۱۳]. هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) نیز از ایجاد تحمل به مرفین جلوگیری می‌کند [۳۴].

این اثر استرس را بیشتر به حضور ACTH و گلوکوکورتیکوئیدها مربوط دانسته اند. اما با توجه به گزارش‌های متعددی که حاکی از تغییر عملکرد سیستم کاتکولا مینرژیک به دنبال مصرف مزمن مرفین است، نقش احتمالی استرس از طریق فعال کردن بخش مرکزی غده آدرنال و تغییر جبرانی در عملکرد سیستم کاتکولا مینرژیک نیاز به بررسی دارد. به دنبال مصرف مرفین و آگونیست‌های اختصاصی گیرنده μ عملکرد نورون‌های کاتکولا مینرژیک در هیپوتالاموس دستخوش تغییر می‌شود [۱۰]. گزارش شده است که مرفین از طریق افزایش حساسیت اتورسپتورهای 5-HT_{1A} و رسپتورهای α_2 سنتز منوآمین‌های مغز را تغییر می‌دهد [۲۶]. مصرف مزمن مرفین با واسطه فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز BDNF باعث پلاستیسیته نورون‌های نورآدرنرژیک می‌گردد [۱]. با وجود گزارش‌های متعدد از تغییرات بوجود آمده در نورون‌های کاتکولا مینرژیک به دنبال مصرف حاد و مزمن مرفین، تا کنون گزارش قاطعی از نقش این تغییرات در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین گزارش نشده است.

قبلا گزارش نموده‌ایم که کاربرد داخل نخاعی و توام اپی نفرین و مرفین از ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین جلوگیری می‌نماید که خود حاکی از کاهش احتمالی در میزان کته کولامین‌ها به دنبال مصرف مزمن مرفین می‌باشد [۲۷]. در مطالعه حاضر به دنبال مصرف مزمن مرفین و بروز تحمل به اثر ضد دردی آن، میزان بیان آنزیم تنظیم‌گر (Rate limiting) بیوسنتز کتکولامین‌ها یعنی تیروزین هیدروکسیلاز (TyH) و آنزیم‌های تجزیه کننده آنها یعنی منوآمین اکسیداز B و A (MAO-B، MAO-A) و کتکول-0-متیل ترانسفراز (COMT) مورد بررسی قرار گرفته است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر بخشی از مربوط به ژن های مورد مطالعه

نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر
MAO-A	F	5'- GCCAGGAACGGAAATTTGTA -3'
	R	5'- TCTCAGGTGGAAGCTCTGGT -3'
MAO-B	F	5'- TGGGAAGATTCCAGAGGATG -3'
	R	5'- GCTGACAAGATGGTGGTCAA -3'
COMT	F	5'- ATCTTCACGGGGTTTCAGTG -3'
	R	5'- GAGCTGCTGGGGACAGTAAG -3'
TyH	F	5'-CATGCCTCCTCACCTATGCA-3'
	R	5'-GTACGGGTCAAACCTCACAGA-3'
β -Actin	F	5'- CCCAGAGCAAGAGAGGCATC -3'
	R	5'- CTCAGGAGGAGCAATGATCT -3'

TyH= تیروزین هیدروکسیلاز، MAO-A = منوآمین اکسیداز A، MAO-B = منوآمین اکسیداز B، COMT = کتکول-0-متیل ترانسفراز

Master mix تهیه می‌شد و در هر واکنش پرایمرهای مربوط به یکی از ژنهای β -Actin، TyH، MAO-A، MAO-B و یا COMT استفاده می‌شد. بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات بهینه کردن واکنش PCR، از ۲۸ سیکل برای ژنهای MAO-A، MAO-B و COMT و ۳۲ سیکل برای TyH استفاده شد. نهایتاً به منظور اطمینان از هویت قطعه تکثیر شده با PCR، الگوی هضم محصول PCR برای قطعات تکثیر شده با کمک آنزیم‌های برش دهنده مورد بررسی قرار گرفت و تایید شد.

محصول PCR تحت تابش نور ماورای بنفش و بواسطه حضور اتیدیوم بروماید در ژل آگارز رؤیت و از آن عکسبرداری شد. شدت سیگنال‌های هر باند به کمک نرم‌افزار Labworks سنجیده شد و نتایج حاصله با کمک آزمون t-test مقایسه شد. برای هر نمونه تراکم باند مربوط به تیروزین هیدروکسیلاز (TyH)، MAO-A، MAO-B و COMT نسبت به تراکم باند مربوط به β -Actin اندازه‌گیری می‌شد. هر گروه شامل نمونه‌های بدست آمده از حداقل ۶ حیوان بود.

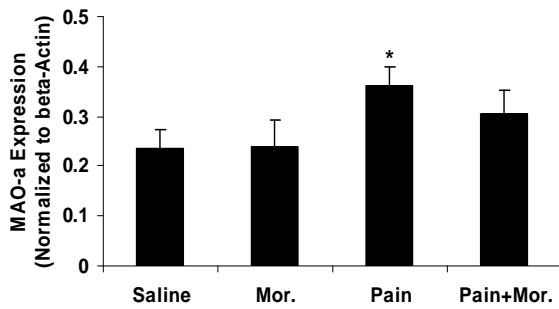
یافته‌ها

برای ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین، سه گروه از حیوانات مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا در طی ۴ روز، دو بار (صبح و عصر)، در گروه اول مرفین ۲۰ mg/kg تزریق شد و گروه‌های دوم و سوم سالیان را بصورت داخل نخاعی دریافت کردند. صبح روز پنجم (۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق مرفین) تزریق مرفین ۱۰ mg/kg و یا سالیان انجام می‌شد و اثر آخرین تزریق با آزمون Tail-Flick سنجش می‌شد. تزریق مرفین در گروهی که در طی ۴ روز قبل سالیان دریافت کرده

مایع (170°C) نگهداری می‌شدند. ب) استخراج RNA ی کل از بافت نخاع: RNA ی کل با استفاده از محلول RNX plus (سیناژن) و روش فنل-کلروفرم-الکل بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج گردید. ج) بررسی کمی و کیفی RNA ی استخراج شده: بدین منظور رقت یک صدم از RNA استخراج شده تهیه می‌شد و جذب نوری آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بدست می‌آمد و غلظت RNA سنجش می‌شد. د) واکنش RT (نسخه برداری معکوس): یک میکروگرم از RNA ی بدست آمده از بافت نخاع با ۴ میکرولیتر از بافر تکثیر 5X [Fermentase] و مقادیر مناسب از dNTP، [Fermentase] Oligo dT، [Fermentase] RNasin، [Fermentase] MgCl₂، آنزیم M- MULV و آب تیمار شده با DEPC به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده می‌شد و ابتدا به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد (برای غیر فعال سازی آنزیم) انکوبه می‌گردید. محصول واکنش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد.

برای تهیه پرایمرهای واکنش‌های PCR توالی ژن‌های TyH، MAO-A، MAO-B و COMT و β -actin در موش صحرايي با کمک وبگاه Swiss-Prot به دست آمد. پرایمرهای پیش‌رو و پس‌رو ژنهای مذکور با مشخصات ارائه شده در جدول ۱ طراحی و یکتا بودن آنها با کمک نرم افزار Blast روی وبگاه NCBI تایید شد.

فرآیند PCR با کمک آنزیم پلیمراز Taq (سیناژن) و پرایمرهای اختصاصی پیش‌رو و پس‌رو برای هر ژن انجام گرفت. برای هر ژن مورد نظر، یک واکنش PCR جداگانه استفاده گردید. برای هر نمونه واکنش‌های PCR با کمک



شکل ۳- اثر مصرف مزمن مرفین (روزی دوبار و به مدت پنج روز) (Mor.)، درد مزمن (Pain) و دردمزمن+مرفین مزمن (Pain+Mor.) بر میزان بیان ژن منوآمین اکسیداز A (MAO-A) در ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق مرفین. میزان بیان ژن با کمک RT-PCR نیمه کمی سنجش و نسبت به بیان استاندارد داخلی بتا-آکتین نرمالایز شده است. $p < 0.05$. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است.

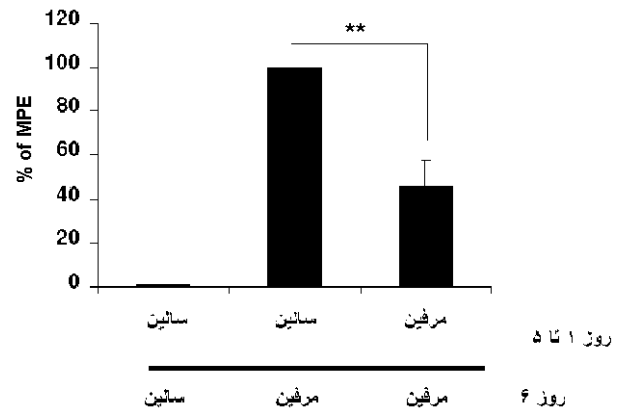
درد مزمن به تنهایی با الگوی فوق اثری بر پاسخ دهی به اثر ضد دردی مرفین ندارد اما در کاربرد توأم با مرفین ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین را کاهش می دهد (شکل ۲).

برای بررسی تغییرات بیان MAO-A، میزان بیان ژن آن در ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق (روز ۵) بررسی شد. در گروه دریافت کننده مرفین تغییر بارزی در میزان بیان ژن در مقایسه با گروه سالین دیده نشد. اما در گروه دریافت کننده درد مزمن، میزان بیان ژن نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0.05$). در گروه دریافت کننده درد+مرفین، تغییر بیان ژن نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود (شکل ۳).

بررسی تغییرات بیان MAO-B در گروههای مختلف، نشان دهنده افزایش بیان این ژن در گروه دریافت کننده مرفین مزمن نسبت به گروه کنترل بود ($p < 0.05$). در گروههای دریافت کننده درد ویا درد+مرفین تغییری در بیان MAO-B دیده نشد (شکل ۴).

بررسی تغییرات بیان COMT در گروههای مختلف، حاکی از آن بود که این ژن در هر سه گروه دریافت کننده مرفین، درد ویا درد+مرفین تغییر معنی داری نسبت به گروه کنترل ندارد (شکل ۵).

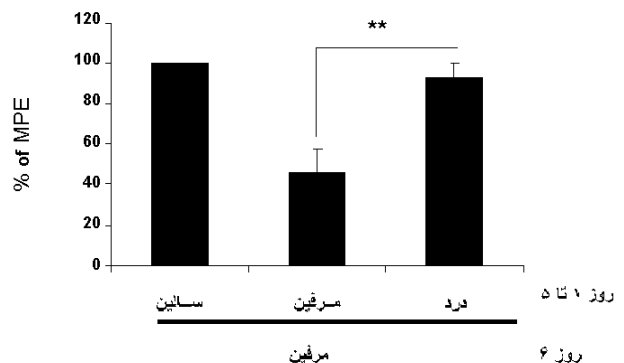
برای بررسی تغییرات بیان تیروزین هیدروکسیلاز، میزان بیان آن در ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق (روز ۵) بررسی شد. میزان بیان این ژن در گروه دریافت کننده مرفین مزمن کاهش معنی داری نسبت به گروه دریافت کننده سالین داشت



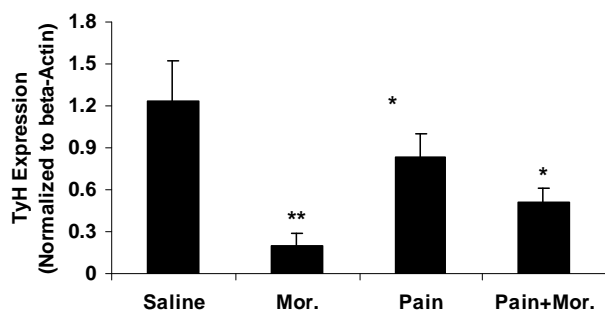
شکل ۱- مصرف مزمن مرفین روزی دوبار و به مدت پنج روز باعث کاهش میزان بی دردی ناشی از مرفین در روز ششم و بیعارتی تکوین تحمل نسبت به اثر ضد دردی مرفین گردید در صورتیکه در گروه دریافت کننده سالین مزمن، مرفین بی دردی شدیدی ایجاد کرد. $p < 0.05$ ، $p < 0.001$. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است. MPE= حداکثر بی‌دردی ممکن.

بودند باعث ایجاد بی دردی کامل شد در حالیکه تجویز همان دوز از مرفین در گروهی که قبلاً" نیز مرفین دریافت کرده بود، بی دردی کمتری را ایجاد کرد ($p < 0.05$). بعنوان کنترل در گروهی که طی ۴ روز اول سالین دریافت کرده بودند، در روز پنجم نیز سالین تزریق شد. آزمون Tail-Flick نشان دهنده عدم ایجاد بی دردی در این گروه بود (شکل ۱).

برای بررسی اثر درد مزمن بر تحمل به اثر ضد دردی مرفین، در آزمایش دیگری از سه گروه حیوان استفاده شد که در طی ۴ روز دو بار در روز (صبح و عصر) به ترتیب مرفین ۲۰ mg/kg، درد ویا درد+مرفین می گرفتند. در صبح روز ششم به هر سه گروه مرفین با دوز ۱۰ mg/kg تزریق شد. نتایج نشان داد که کاربرد



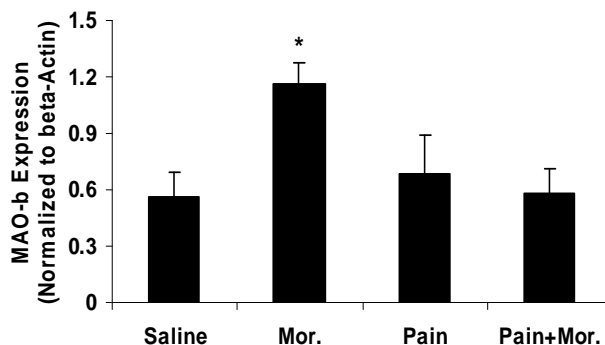
شکل ۲- اثر ایجاد همزمان درد بر ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین. درد با تزریق زیر جلدی فرمالین به پنجه حیوان ایجاد شد. کاربرد توأم درد و مرفین در طی ۵ روز اول باعث ایجاد بی دردی قوی و بارزتری توسط مرفین به تنهایی در روز ششم گردید $p < 0.001$ ، نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است. MPE= حداکثر بی‌دردی ممکن.



شکل ۶- اثر مصرف مزمن مرفین (روزی دوبار و به مدت پنج روز) (Mor.)، درد مزمن (Pain) و دردمزمن+مرفین مزمن (Pain+Mor.) بر میزان بیان ژن تیروزین هیدروکسیلاز (TyH) در ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق مرفین. میزان بیان ژن با کمک RT-PCR نیمه کمی سنجش و نسبت به بیان استاندارد داخلی بتا-اکتین نرمالایز شده است. $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است.

در بیان ژنهای مورد مطالعه در این گزارش عملاً در شرایط تحمل به مرفین مشاهده شده‌اند و احتمالاً می‌توانند در ایجاد تحمل دخیل باشند. همچنین درد مزمن در الگوی مورد استفاده قادر بود تحمل به مرفین را کاهش دهد. این مشاهده با یافته‌های حاصل از گزارشات قبلی از جمله عدم ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین در موشهای صحرایی در حضور درد ناشی از فرمالین [۱۵، ۳۴-۳۶] مطابقت دارد. تغییرات دیده شده در بیان ژنهای مورد مطالعه در این گزارش به دنبال مصرف مزمن مرفین با درد مزمن عملاً در شرایط کاهش تحمل به مرفین مشاهده شده‌اند و احتمالاً می‌توانند در مهار تحمل دخیل باشند. 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 نسخه برداری معکوس (RT)، از یک استاندارد داخلی استفاده شد. استفاده از بتا اکتین به عنوان استاندارد داخلی در مطالعات مختلف مورد توجه است. در مطالعه حاضر برای هر نمونه بافتی میزان mRNA ژنهای MAO-a، MAO-b، COMT و تیروزین هیدروکسیلاز نسبت به بتا اکتین سنجیده شد تا از خطای مربوط به مراحل قبل از PCR کاسته شود.

به دنبال مصرف مرفین و آگونیستهای اختصاصی گیرنده μ عملکرد نورونهای کاتکولامینرژیک در هیپوتالاموس دستخوش تغییر می‌شود [۱۰]. گزارش شده است که مرفین از طریق افزایش حساسیت اتورسپتورهای 5-HT_{1A} و رسپتورهای α_2

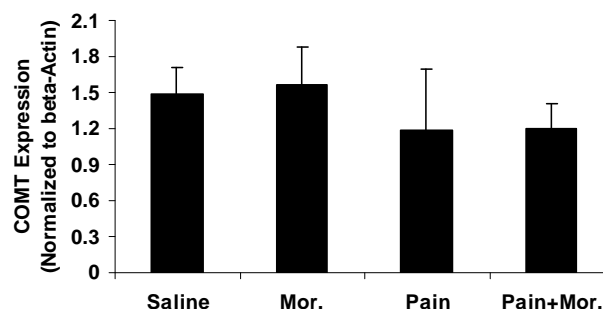


شکل ۴- اثر مصرف مزمن مرفین (روزی دوبار و به مدت پنج روز) (Mor.)، درد مزمن (Pain) و دردمزمن+مرفین مزمن (Pain+Mor.) بر میزان بیان ژن منوآمین اکسیداز B (MAO-B) در ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق مرفین. میزان بیان ژن با کمک RT-PCR نیمه کمی سنجش و نسبت به بیان استاندارد داخلی بتا-اکتین نرمالایز شده است. $p < 0.05$ ، نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است.

($p < 0.01$) درد مزمن اثر معنی داری بر میزان بیان این آنزیم نداشت. در گروه دریافت کننده درد+مرفین، هرچند بیان ژن تیروزین هیدروکسیلاز نسبت به گروه کنترل بصورت کاهش یافته دیده شد ($p < 0.05$) اما بیان آن نسبت به گروه دریافت کننده مرفین مزمن افزایش نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۶).

بحث

نتایج بدست آمده از مطالعات رفتاری نشان داد که مرفین در الگوی مزمن بکار رفته در این آزمایش قادر بود باعث ایجاد تحمل به اثر ضددردی مرفین گردد. بنابراین تغییرات دیده شده



شکل ۵- اثر مصرف مزمن مرفین (روزی دوبار و به مدت پنج روز) (Mor.)، درد مزمن (Pain) و دردمزمن+مرفین مزمن (Pain+Mor.) بر میزان بیان ژن کتکول-0-متیل ترانسفراز (COMT) در ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق مرفین. میزان بیان ژن با کمک RT-PCR نیمه کمی سنجش و نسبت به بیان استاندارد داخلی بتا-اکتین نرمالایز شده است. $p < 0.05$ ، نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است.

تحمل ایپوئیدی می‌شود. به نظر می‌رسد درد التهابی مزمن با ایجاد تغییرات جبرانی در بیان ژنهای مورد مطالعه با مکانیزمهای ایجاد تحمل مقابله می‌نماید.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت همکاری مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است. بدین وسیله از مراکز فوق سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- [1] Akbarian S, Rios M, Brain-driven neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. *J Neurosci* 22 (2002) 4153- 4162.
- [2] Anderson T, Slotkin T, Effects of morphine on the rat adrenal medulla. *Biochem Pharmacol* 24 (1975) 671-679.
- [3] Basbaum AI, Fields HL, Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann Rev Neurosci* 7 (1984) 309-338.
- [4] Basbaum AI, Jessell TM, The perception of pain. In: Kandel ER (editor) *Principles of neural science*. 2000, 24: 472- 491.
- [5] Burd AL, El-Kouhen R, Erickson H, Loh LI, Law PY, Identification of serine 356 and 363 as the amino acids involved in etorphine induced down-regulation of the mu-opioid receptor. *J Biol Chem* 273 (1998) 34488-34495.
- [6] Connor M, Borgland SL, Christie MJ, Continued morphine modulation of calcium channel currents in acutely isolated locus coeruleus neurons from morphine-dependent rats. *Br J Pharmacol* 128 (1999) 1561-1565.
- [7] D'Amour FE, Smith DL, A method for determination loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72 (1941) 74-79.
- [8] Elliott J, Guo L, Traynor JR, Tolerance to mu-opioid agonists in human neuroblastoma SH-SY5Y cells as determined by changes in guanosine-5'-[3S]-thio triphosphate binding. *Br J Pharmacol* 121 (1997) 1422-1428.

سنتز منوآمینهای مغز را تغییر می‌دهد [۲۶]. مصرف مزمن مرفین با واسطه فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز BDNF باعث پلاستیسیته نرونها نورا در نورژیک می‌گردد [۱]. با وجود گزارشهای متعدد از تغییرات بوجود آمده در نرونها کاتکولا مینرژیک به دنبال مصرف حاد و مزمن مرفین، در مطالعه حاضر امکان تغییر در بیان ژنهای دخیل در بیوسنتز کتکولامینها مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که در طی ایجاد تحمل بیان ژنها به نفع کاهش سنتز و افزایش حذف کتکولامینها تغییر می‌نماید. به نظر می‌رسد مصرف مزمن مرفین باعث کاهش دسترسی نرونها نخاعی به کتکولامینها شده و از این طریق به تکوین تحمل کمک می‌نماید. این مشاهده با گزارشات قبلی ما از مهار ایجاد تحمل به مرفین توسط کاربرد موضعی اپی نفرین همخوانی دارد.

قبلا گزارش شده است که القاء تحریک سنتز کاتکولامینها در مغز موش صحرایی باعث مهار تکوین تحمل به اثر ضد دردی مرفین می‌شود، هر چند در دیگر گونهها نتایج مختلف به دست آمد [۲] که این نتیجه در تعامل با نتایج پژوهش حاضر است. اپی نفرین اثرات ضد دردی اپیپاتهای درون زا یا برون زا را احتمالا از طریق رسپتورهای آلفا-۲ تقویت می‌کند [۱۱]. ضایعه یا مهار آورانهای نور آدرنژیک هیپرالژزیای ایجاد کرده و اثر ضد دردی اپیپاتها را کاهش می‌دهد [۳، ۱۴، ۲۵]. با توجه به این گزارشها و شباهت مکانیزمی هیپرالژزی و تحمل پیش بینی می‌گردد که کاهش اپی نفرین یکی از علل ایجاد تحمل باشد و نتایج ما این مسئله را تایید نمود. در کنار مکانیزمهای متعدد دیگر، ثابت شده که یکی از پروتئینهای دخیل در ایجاد تحمل در بافت نخاع رسپتور N متیل دی اسپاراتات (NMDA) می‌باشد [۶، ۸، ۳۱-۳۳، ۳۷، ۳۸]. آنتاگونیستهای NMDA مانع از ایجاد تحمل ایپوئیدی می‌شوند [۲۳، ۲۴، ۳۹]. همچنین اطلاعات رادیوگرافی حضور تعداد بارزی از محلهای باند شدن NMDA و گلوتامات را در شاخ خلفی نخاع ثابت می‌کند [۲، ۱۲، ۱۳، ۲۲] و انتظار می‌رود رهایش افزایش یافته گلوتامات در نخاع بتواند منجر به بروز تحمل گردد. نور اپی نفرین بطور معنی داری رهایش گلوتامات از سیناپتوزومهای نخاع را کاهش می‌دهد [۱۶]. بنابراین شاید بتوان پیشنهاد کرد که تغییر در میزان کتکولامینها از جمله اپی نفرین با مهار رهایش گلوتامات باعث کاهش کنداکتانس رسپتورهای NMDA و مانع از تکوین

- morphine tolerance and dependence is associated with translocation of protein kinase C. *Pain* 61 (1995) 365-374.
- [22] Melzack R, The tragedy of needles pain. *Sci Am* 262 (1991) 27-33.
- [23] Monaghan DT, Cotman CW, Distribution of *N*-methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H] glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci* 5 (1985) 2909- 2919.
- [24] Nestler EJ, Aghajanian GK, Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278 (1997) 58-63.
- [25] Nestler EJ, Molecular mechanisms underlying opiate addiction: implications for medications development. *Sem Neurosci* 9 (1997) 84-93.
- [26] Sagen J, Proudfit HK, Effect of intrathecally administered noradrenergic antagonists on nociception in the rat. *Brain Res* 310 (1984) 295-301.
- [27] Sastre-coll A, Esteban S, Garcia-sevilla J, Supersensitivity of 5-HT_{1A}-autoreceptors α ₂-adrenoceptors regulating monoamine synthesis in the brain of morphine-dependent rats. *Naunyn schmiedebergs Arch Pharmacol* 356 (2002) 210-219.
- [28] Sawynok j, Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacol Rev* 55 (2003) 1-20.
- [29] Shen J, Benedict GA, Gallader A, Stafford K, Yoburn BC, Role of cAMP-dependent protein kinase (PKA) in opioid agonist-induced mu-opioid receptor down regulation and tolerance in mice. *Synapse* 38 (2000) 322-327.
- [30] Suzuki T, Modification of morphine dependence under chronic pain and its mechanism. *Yakugaku Zasshi* 121 (2001) 909-914.
- [31] Trujillo KA, Akill H, Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 251(1991) 85-87.
- [32] Trujillo KA, Akill H, Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 251(1991) 85-87.
- [33] Ueda H, Miamae T, Hayashi C, Watanabe S, Fukushima N, Ssaki Y, Lwamura T, Misu Y, Protein kinase C involvement in homologous desensitization of delta-opioid receptor coupled to Gi 1-phospholipase C activation in xenopus oocytes, *J Neurosci* 15 (1995) 7485-7499.
- [34] Vaccarino AL, Couret TR, Relationship between hypothalamic-pituitary-adrenal activity and blockade of
- [9] Foley KM, Opioids. *Neurol Clin* 11 (1993) 503-522.
- [10] Fuertes G, Milanes MV, Changes in hypothalamic paraventricular nucleus catecholaminergic activity after acute and chronic morphine administration. *Eur J Pharmacol* 388 (2000) 49-56.
- [11] Grabow TS, Hurley RW, Banfor PN, Hmmond DL, Supraspinal, spinal delta (2) opioid receptor-mediated antinociceptive synergy is mediated by spinal alpha(2) adrenoceptors. *Pain* 83 (1999) 47-55.
- [12] Greenamyre JT, Young AB, Penney JB, Quantitative autoradiographic distribution of L-[³H] glutamate-binding sites in rat central nervous system. *J Neurosci* 4 (1984) 2133-2144.
- [13] Hendrie CA, ACTH: a single pretreatment enhances the analgesic efficiency of and prevents the development of tolerance to morphine. *Physiol Behav* 42 (1988) 41-45.
- [14] Hylden JL, Thomas DA, Iadarola MJ, Nahin RL, Dubner R, Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: possible involvement of noradrenergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 194 (1991)135-143.
- [15] Javan M, Ahmadiani A, Motamadi F, Kazemi B, Changes in G proteins gene 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.
- [16] Satarian L, Javan M, Fathollahi Y, Epinephrine inhibits analgesic tolerance to intrathecal administrated morphine and increases the expression of calcium-calmodulin dependent protein kinase IIa. *Neurosci Lett* , 430 (2008) 213-7.
- [17] Kamisaki Y, Hamada T, Maeda K, Ishimura M, Itoh T, Presynaptic alpha-2 adrenoceptors inhibit glutamate release from rat spinal cord synaptosomes. *J Neurochem* 60 (1993) 522-529.
- [18] Liu JG, Anand KJS, Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 38 (2001) 1-19.
- [19] Mao J, Price DD, Mayer DJ, Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interaction. *Pain* 62 (1995) 259-274.
- [20] Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD, Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 7731-7736.
- [21] Mayer JM, Mao J, Price DD, The development of

- Schoffelmeer AN, Adaptive changes in the number of Gs and Gi-proteins underlie adenylyl cyclase sensitization in morphine-treated rat striatal neurons. *Eur J Pharmacol* 245 (1993) 23-29.
- [38] Williams JT, McDonald JC, Manzoni O, Cellular and synaptic adaptation mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81 (2001) 299- 343.
- [39] Wong CS, Su YF, Chang KJ, Watkins WD, Intrathecal pertussis toxin treatment attenuates opioid analgesia and reduces high- affinity state of opioid receptors. *Anesthesiology* 77 (1992) 691-699.
- tolerance to morphine analgesia by pain: a strain comparison. *Pain* 63 (1995) 385-389.
- [35] Vaccarino AL, Marek P, Kest B, Ben Eliyahu S, Couret JR, Kao, Liebeskind JC, Morphine fail to produce tolerance when administered in the presence of formalin pain in rats. *Brain Res* 627 (1993) 287-290.
- [36] Vaccarino AL, Nores WL, Soignier RD, Olson RD, The role of corticosterone in the blockade to morphine analgesia by formalin-induced pain in the rat. *Neurosci Lett* 232 (1997) 139-142.
- [37] Vliet VBJ, Rilswijk VAL, Wardeh G, Mulder AH,