[Article in Persian] Physiology and Pharmacology Vol. 10, Spring 2006, 3-10

Sex differences and role of gonadal hormones in development of tolerance to morphine analgesia and glutamate level in the nucleus accumbens of rats: A microdialysis study

Mosavi SZ[1], Shafaghi B[1], Kobarfard F[2] and Jorjani M[3*]

[1]Dept. of Pharmacology-Toxicology, School of Pharmacy, [2]Dept. of Medicinal chemistry, School of Pharmacy,
[3]Neuroscience Res. and Dept. of Pharmacology-Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti Univ. of Med. Sci.;Tehran

Abstarct

Introduction: Sex differences are observed in the development of tolerance to antinociceptive effect of opioid drugs such as morphine, but the underlying mechanisms remain unclear. Critical role of glutamate in the development and maintenance of opioid tolerance has been reported by many investigators. There are also evidences about interaction between gonadal hormones and neuromodulatory systems including opioidergic and glutamatergic systems. The present study examined the sex differences and role of gonadal hormones on the glutamate level in the nucleus accumbens in morphine tolerant rats using in vivo microdialysis.

Methods: Intact, gonadectoized and sham-operated male and female rats were used. Morphine (7 mg/kg/day, SC) was administered for 8 days. Response to thermal noxious stimuli were measured by tail-flick test. Tolerance was defined as the response which was not significantly different from baseline.

Results: The results showed that after chronic morphine administration, antinociceptive tolerance in male rats was significantly greater than females ($P<0.05$). Sex differences in morphine tolerance disappeared with gonadectomy of animals. There was also significant sex difference in glutamate level in nucleus accumbens of morphine tolerant rats ($P<0.05$), Glutamate level was decreased after ovariectomy of female rats ($P<0.05$), but gonadectomy had not significantly effect on glutamate level in males.

Conclusion: Results of this study provide evidence of sex differences in development of tolerance to morphine in rats and mediatory roles of gonadal hormones and glutamate levels in these differences.

Keywords: Sex differences, Morphine antinociception tolerance, Glutamate, Microdialysis, Tail flick test, Rat.

* Corresponding Author Email: mjorjani@sbmu.ac.ir

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۸۵

بررسی تفاوت جنسی و نقش هورمون های جنسی در تحمل به اثر ضددردی مرفین و نیز تغییرات مقدار گلوتامات آزاد شده در هسته اکومبنس در بروز این تفاوت در موش صحرایی با استفاده از روش میکرودیالیز

سیده زهرا موسوی[۱]، بیژن شفقی[۱]، فرزاد کبارفرد[۲] و معصومه جرجانی[۳*]
۱- گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دریافت: آبان ۱۳۸۴ بازبینی: بهمن ۱۳۸۴ پذیرش: اسفند ۱۳۸۴

چکیده

هدف: علیرغم وجود گزارش هایی مبنی بر تفاوت جنسی در تکوین تحمل به اثر ضد دردی مرفین، تاکنون مکانیسم دقیق این تفاوتها ناشناخته است. با تکیه بر شواهد موجود در خصوص دخالت هورمون های جنسی در بروز تفاوت های وابسته به جنس در اثرات ضددردی اپیوئیدها و نقش شناخته شده نروترنسمیتر گلوتامات در بروز پدیده تحمل نسبت به مرفین، در این مطالعه ابتدا تفاوت جنسی و نقش استروئیدهای جنسی بر تکوین تحمل به اثر ضد دردی مرفین در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته و سپس میزان دخالت تغییرات گلوتامات در هسته اکومبنس در بروز این تفاوت مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار: در موش های صحرایی نر و ماده، اندازه گیری درد با آزمون Tail-flick صورت گرفته و تحمل به اثر ضد دردی مرفین با تجویز ۷ mg/kg, s.c. مرفین برای ۸ روز متوالی، ایجاد گردید. با استفاده از روش میکرودیالیز در حیوانات هشیار، مایع خارج سلولی هسته اکومبنس استخراج و سپس با روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی و استفاده از ردیاب فلورسانس، میزان گلوتامات در نمونه های دیالیزی تعیین مقدار شد.

یافته ها: بر اساس نتایج حاصله، اثر ضددردی مرفین در موش های صحرایی نر دست نخورده بطور معنی داری بیشتر از جنس ماده مشابه بود($P<0.05$). با گنادکتومی حیوانات، این تفاوت جنسی در اثر ضد دردی مرفین از بین رفت. میزان تحمل به اثر ضد دردی مرفین در جنس نر دست نخورده بطور معنی داری بیشتر از جنس ماده دست نخورده بود($P<0.05$). بروز تحمل در حیوانات ماده دست نخورده سریعتر از حیوانات نر مشاهده شد. نتایج مطالعات میکرودیالیز نشان داد که میزان گلوتامات در هسته اکومبنس پس از تجویز تک دوز مرفین، در حیوانات ماده دست نخورده و گنادکتومی شده بطور معنی داری بیشتر از حیوانات نر می باشد. پس از ایجاد تحمل به مرفین، تفاوت جنسی در میزان گلوتامات در حیوانات دست نخورده همچنان وجود داشته ولی با انجام گنادکتومی تفاوت جنسی در میزان گلوتامات هسته اکومبنس، در حیوانات تحمل یافته از بین رفت.

نتیجه گیری: بنظر می رسد آزادسازی اسید آمینه گلوتامات در هسته اکومبنس در روند تکوین تحمل به مرفین از طریق مکانیسم های حساس به استروژن تنظیم گردیده و تفاوت جنسی مشاهده شده در بروز تحمل، حداقل بخشی متاثر از نوع استروئید جنسی غالب در حیوان است.

واژه های کلیدی: تفاوت جنسی، تحمل به اثر ضد دردی مرفین، گلوتامات، میکرودیالیز، آزمون Tail-flick، موش صحرایی.

مقدمه

گزارشهای متعددی مبنی بر وجود تفاوت جنسی در پاسخ به داروهای اپیوئیدی از جمله مرفین در انسان و حیوان ارائه شده است. اگرچه در اکثر این مطالعات اثر ضد دردی اپیوئیدها در جنس نر بیشتر از ماده گزارش شده است[۲۶,۱۶,۱۲,۷] لیکن گزارشهای متناقض نیز از سوی پژوهشگران منتشر شده است[۳۶,۳۴]. همچنین گزارشهای معدودی مبنی بر تفاوت دو جنس در تکوین تحمل به اثر ضددردی مرفین در موش صحرایی وجود دارد[۱۵,۳].

بنظر می رسد که استروئیدهای جنسی با تاثیر بر روندهای مختلف عصبی در CNS در بروز چنین تفاوت هایی دخالت می نمایند. لیکن تاکنون مطالعه ای در رابطه با مکانیسم بروز تفاوت های وابسته به

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:
mjorjani@sbmu.ac.ir

جنس در بروز تحمل به بی دردی مرفین گزارش نشده است. استروژن ها بر فعالیت بسیاری از نواحی سیستم عصبی مرکزی مانند مراکز دخیل در کنترل درد و از جمله هسته اکومبنس تاثیر می گذارند. وجود رسپتورهای استروژنی و پروژستینی در نواحی درگیر در احساس درد مانند: Central Gray گزارش شده است[۳۱,۳۰]. از سوی دیگر، گزارش های متعددی در خصوص تداخل بین استروئیدهای تخمدانی و اسیدهای آمینه تحریکی در تنظیم عملکرد سیستم های مختلف عصبی از جمله افزایش ترشح اسیدهای آمینه تحریکی(EAAs: Excitatory amino acids) در آغاز بلوغ و تحت کنترل استروئیدهای تخمدانی[۱۰]، نقش واسطه ای اسیدهای آمینه تحریکی بر ترشح هورمون لوتئینی (LH: Luteinizing Hormone) و هورمون محرک فولیکولی (FSH: Follicle Stimulating Hormone) از هیپوفیز قدامی با تأثیر بر نرونهای آزاد کننده هورمون گنادوتروپین (GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone) در هیپوتالاموس [۸]، اثرات تحریکی قوی استرادیول روی برخی اعمال غیر تولید مثل مانند: فعالیت های حسی- حرکتی، توجه و ادراک ، صرع، حافظه و یادگیری که اسیدهای آمینه تحریکی نیز در آنها نقش مهمی دارند،ارائه شده است[۳۵,۳۱,۳۰].

با توجه به نقش شناخته شده اسید آمینه تحریکی گلوتامات در تکوین تحمل به اثرات اپیوئیدها و وجود شواهدی مبنی بر اثر 17β-استرادیول در تقویت اثرات تحریکی گلوتامات، بنظر می رسد که حداقل بخشی از مکانیسم تفاوت وابسته به جنس در تحمل به بی دردی مرفین از طریق تاثیر استروئیدهای جنسی بر غلظت گلوتامات در CNS باشد. از آنجا که هسته اکومبنس بعنوان یکی از ساختمان های درگیر در تکوین تحمل به اپیوئیدها شناخته شده و حضور استروژن نیز در این هسته نشان داده شده است[۲۲] و نیز وجود ارتباط عملکردی بین رسپتورهای گلوتامات و مرفین در این ناحیه مغزی، هدف اصلی این تحقیق بررسی تغییرات میزان گلوتامات در این هسته و نقش آن در بروز تفاوت جنسی در تحمل به اثر ضددردی مرفین در موش صحرایی بود.

مواد و روش ها

حیوانات

در این مطالعه از موش های صحرایی نر و ماده، نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی۲۴۰-۱۸۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ساعت روشنایی بصورت گروه های ۶-۴ تایی در قفسه های مخصوص، نگهداری شده و آب و دان فشرده کافی بصورت آزاد در اختیار حیوانات قرار داشت. گروه هایی که تحت عمل جراحی استرئوتاکسی قرار گرفته بودند تا زمان آزمایش به طور انفرادی در محفظه های شیشه ای مخصوص نگهداری شدند. آزمون ها در ساعات مشخص از روز (۶۱-۹) صورت گرفت.

داروها

مرفین سولفات (شرکت Sigma) در آب مقطر و پنتوباربیتال سدیم (شرکت Merck) نیز در آب مقطر حل وسپس به میزان مورد نیاز استفاده شد.

گنادکتومی حیوانات

به منظور حذف منبع اصلی هورمون های جنسی از متد گنادکتومی در حیوانات نر و ماده استفاده شد. پس از اطمینان از بیهوشی کامل حیوان با تزریق پنتوباربیتال سدیم (در جنس نر ۴۵mg/kg و در جنس ماده ۴۰mg/kg) به صورت داخل صفاقی، در جنس ماده در ناحیه بین واژن و تخمدانها، برش کوچکی در پوست و عضله ایجاد کرده و پس از مشاهده لوله های رحمی، ناحیه اتصال لوله های رحمی و تخمدانها با نخ جراحی بصورت محکم بسته و سپس تخمدانها را از بافت های مجاور جدا کردیم. جهت گنادکتومی حیوانات نر نیز دو بیضه، اپی دیدیم و قسمتی از مجرای وازدفران آنها برداشته و سپس محل جراحی دوخته و ضدعفونی گردید.

در گروه Sham تمام عملیات فوق بدون برداشتن تخمدانها و یا بیضه ها انجام گرفت. حیوانات پس از گذشت حدود ۴ هفته از عمل جراحی مورد آزمون قرار گرفتند.

روش اندازه گیری درد حرارتی

تغییرات میزان درد با استفاده از آزمون Tail-Flick اندازه گیری شد. در این آزمون، ستونی از اشعه نوری در ناحیه وسط سطح پشتی دم حیوان تابانده شده و تاخیر زمانی جهت احساس درد و کنار کشیدن دم (Tail-Flick Latency) به عنوان شاخص اندازه گیری درد قلمداد شد. شدت تابش اشعه نوری طوری تنظیم شد که پاسخ پایه بین ۳-۲ ثانیه باشد و Cut off time نیز ۱۰ ثانیه در نظر گرفته شد.

نحوه ایجاد و ارزیابی تحمل به اثر ضددردی مرفین

جهت ایجاد تحمل به مرفین، حیوانات روزانه ۷ mg/kg مرفین سولفات بصورت زیرجلدی و بمدت ۸ روز متوالی دریافت کردند. برای ارزیابی بروز تحمل نسبت به اثر ضددردی مرفین ابتدا تاخیر زمانی در پاسخ پایه حیوان به محرک دردزا و سپس ۲۰ دقیقه بعد از تزریق مرفین در روزهای اول، چهارم، ششم و هشتم اندازه گیری شد. تفاوت تاخیر زمانی در کنار کشیدن دم در روزهای اول و هشتم بعنوان درجه تحمل در نظر گرفته شد.

روش میکرودیالیز

حیوانات پس از بیهوشی با تزریق داخل صفاقی ۴۵mg/kg -۴۰ پنتوباربیتال در دستگاه استریوتاکس قرار گرفتند. پس از تثبیت سر حیوان در دستگاه، و مشخص شدن ناحیه برگما و لامبدا، کاوند (پروب میکرودیالیز) بصورت یکطرفه در ناحیه هسته اکومبنس با مختصات

(AP, 1.8mm; L, 1.2mm; DV, -7.2mm) قرار داده شد و با استفاده از سیمان دندانپزشکی در محل ثابت گردید. ۲۴ ساعت پس از کاشت کاوند حیوان برای انجام میکرودیالیز آماده شد.

جهت پرفیوژن و انجام عمل دیالیز از محلول مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF: artificial cerebrospinal fluid) حاوی (NaCl: 114 mM, $MgSO_4$: 2mM, KCl: 3mM, NaH_2PO_4: 1.25mM, $CaCl_2$: 1mM, $NaHCO_3$: 26mM, NaOH:1mM, Glucose 10mM, pH (7.3-7.4) استفاده و با سرعت ۳ میکرو لیتر در دقیقه توسط پمپ تزریق (Microsyringe Pump, Eicon, Ep-60, Japan) در کانوند جریان یافت. پس از سه نمونه پایه هر کدام بمدت ۲۰ دقیقه، نمونه مورد نظر جهت تعیین مقدار گلوتامات بمدت ۳۰ دقیقه و حدود ۲۰ دقیقه پس از تزریق زیرجلدی مرفین در لوله اپندرف در محفظه ای پر از یخ جمع آوری و بلافاصله در تانک ازت مایع تا زمان تعیین مقدار نگهداری شد.

تعیین مقدار گلوتامات

دستگاه HPLC با مشخصات پمپ (LC-10AD, Shimadzu, Japan) و ستون (Shim-pack.VP-ODS Column, 250L × 4.6mm, 5µm, Shimadzu, Japan) و ردیاب از نوع فلورسانس (RF-10SAXL, Shimadzu, Japan) مورد استفاده قرار گرفت. محلول فاز متحرک شامل: 100mM disodium hydrogen phosphate solution (76.5%) methanol (20%) and acetonitrile (3.5%) تهیه و با اسید فسفریک در pH=6.7 تنظیم گردید. فاز متحرک بصورت ایزوکراتیک با سرعت جریان معادل ۰/۸ ml/min به دستگاه HPLC پمپ شد.

ردیاب فلورسانس جهت تعیین مقدار در طول موج $\lambda_{ex.}$=340 nm و λ_{em}=475 nm تنظیم گردید. جهت مشتق سازی گلوتامات، ۵ میکرولیتر از محلول working مشتق ساز (حاوی ارتوفتالدئید و بتا-مرکاپتواتانل) با ۲۰ میکرولیتر نمونه دیالیزی مخلوط و بمدت ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از این نمونه به دستگاه HPLC تزریق شد.

محاسبه زمان احتباس یا RT و مساحت زیر منحنی پیک های حاصله بطور اتوماتیک توسط کامپیوتر و نرم افزار CLASS-VP محاسبه و ثبت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد، گلوتامات با غلظت های ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر و هر غلظت ۴-۵ بار، بصورت تازه تهیه و پس از مشتق سازی به دستگاه HPLC تزریق شد. منحنی استاندارد گلوتامات در محدوده ۱۰۰۰-۵۰ نانوگرم در میلی لیتر خطی بود. وجود گلوتامات در نمونه دیالیزی با توجه به RT ثبت شده، ردیابی و غلظت آن با توجه به میزان AUC نمونه دیالیزی و بکمک منحنی استاندارد محاسبه گردید.

بررسی آماری

داده ها بصورت Mean ± SEM نشان داده شده اند. تجزیه و تحلیل داده ها، با تهیه syntax در نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) انجام شد. اختلاف داده ها با $P<0/05$ معنی دار تلقی گردیدند.

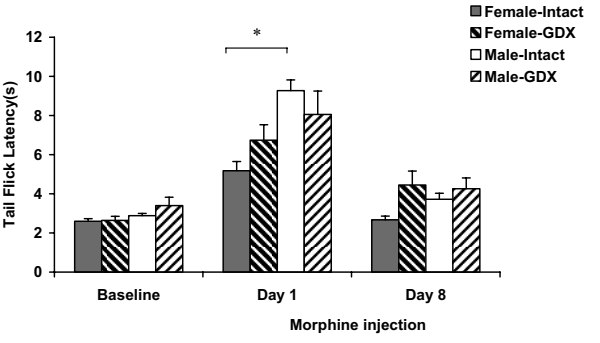
نتایج

مطالعه تاثیر جنسیت و حذف هورمون های جنسی از طریق گنادکتومی بر تحمل به اثر ضد دردی مرفین در مدل درد Tail-flick در موش صحرایی

نتایج ارائه شده در جدول (۱) نشان می دهد که آستانه درد حرارتی (Tail-flick latency پایه) در جنس نر و ماده (در گروه

جدول۱- تاثیر جنسیت و هورمون های جنسی بر اثر ضددردی و تحمل به اثر ضددردی مرفین در موش صحرایی.

	Tail-flick Latency (s)					
گروه ها	**میزان پایه**	**روز اول**	**روز چهارم**	**روز ششم**	**روز هشتم**	**درجه تحمل (روز اول- روز هشتم)**
جنس نر						
گروه سالین (n=4)	۳/۱۲ ± ۰/۵۴	۳/۴۰ ± ۰/۵۱	۳/۴۵ ± ۰/۲۹	۳/۲۷ ± ۰/۲۹	۳/۱۰ ± ۰/۳۸	۰/۳۰ ± ۰/۱۳
گروه مرفین						
حیوان دست نخورده (n=8)	۲/۸۸ ± ۰/۱۲	۹/۲۷ ± ۰/۵۵*†	۸/۸۴ ± ۰/۶۲*†	۵/۸۱ ± ۰/۸۳ †	۳/۷۲ ± ۰/۳۱	۵/۵۵ ± ۰/۲۴ *
حیوان گنادکتومی شده (n=8)	۳/۴ ± ۰/۴۲	۸/۰۵ ± ۱/۲۰ †	۸/۱۲ ± ۱/۱۶ †	۳/۹۸ ± ۰/۷۲	۴/۲۶ ± ۰/۵۵	۳/۷۹ ± ۰/۶۵
حیوان Sham (n=4)	۲/۶۲ ± ۰/۴۶	۹/۶۲ ± ۰/۳۷*†	۹/۲۰ ± ۰/۸۰ †	۱۰/۰۰ ± ۰/۰۰ †	۴/۶۲ ± ۰/۶۱	۵/۰۰ ± ۰/۲۴ *
جنس ماده						
گروه سالین (n=4)	۲/۴۵ ± ۰/۰۹	۲/۸۲ ± ۰/۲۳	۲/۱۷ ± ۰/۱۲	۲/۶۵ ± ۰/۱۳	۲/۵۷ ± ۰/۱۲	۰/۲۵ ± ۰/۱۱
گروه مرفین						
حیوان دست نخورده (n=8)	۲/۶۰ ± ۰/۱۳	۵/۱۸ ± ۰/۴۷ †	۵/۳۲ ± ۰/۸۲ †	۳/۱۶ ± ۰/۳۹	۲/۷۶ ± ۰/۱۹	۲/۵۱ ± ۰/۲۸
حیوان گنادکتومی شده (n=8)	۲/۶۴ ± ۰/۲۱	۶/۷۴ ± ۰/۷۹ †	۷/۸۲ ± ۰/۵۴ †	۴/۸۰ ± ۰/۶۲ †	۴/۴۵ ± ۰/۷۱ †	۲/۲۹ ± ۰/۰۸



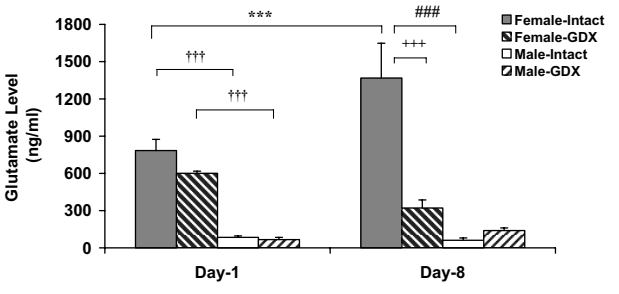
نمودار۱- تفاوت جنسی و نقش هورمون های جنسی در اثر ضد دردی و تحمل به اثر ضد دردی مرفین در موش صحرایی. داده ها Mean ± SEM می باشد، GDX: حیوان گنادکتومی شده. (n=6 - 8) (* P<0.05) .

دست نخورده و گنادکتومی شده) تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارد. حذف هورمون های جنسی هم تاثیر خاصی بر احساس درد در هر جنس نداشت.

اثر ضد دردی مرفین بطور معنی داری در جنس نر دست نخورده بیشتر از جنس ماده مشابه است (P<0.05). حذف هورمون های جنسی از طریق گنادکتومی، تفاوت جنسی در بیدردی ناشی از مرفین را از بین برد. گرچه گنادکتومی در جنس نر باعث کاهش و در جنس ماده سبب افزایش پاسخ به مرفین گردید، اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی دار نبود (نمودار۱). درجه تکوین تحمل به مرفین پس از ۸ روز دریافت زیر جلدی مرفین، در جنس نر دست نخورده بطور معنی داری بیشتر از جنس ماده بود (P<0.05). در حیوانات گنادکتومی شده درجه تکوین تحمل به مرفین بین دو جنس اختلاف معنی دار آماری نداشت (جدول۱). سرعت بروز تحمل در جنس ماده دست نخورده سریعتر از نر مشابه می باشد. گنادکتومی در جنس نر منجر به بروز سریعتر تحمل به مرفین گردید. در حیوان نر دست نخورده پس از ۸ روز و در حیوان نر گنادکتومی پس از ۶ روز تحمل به مرفین مشاهده شد.

تاثیر جنسیت و گنادکتومی بر تغییرات میزان گلوتامات در هسته اکومبنس در تحمل به اثر ضددردی مرفین

میزان گلوتامات در هسته آکومبنس پس از تزریق دوز منفرد مرفین، در جنس ماده (دست نخورده و نیز گنادکتومی) بطور معنی داری بیشتر از جنس نر بود. گنادکتومی حیوان در هر جنس، تاثیر معنی داری بر میزان گلوتامات پس از تجویز مرفین نداشت. پس از ایجاد تحمل به مرفین، میزان گلوتامات در جنس ماده دست نخورده نسبت به روز اول، پس از تجویز اولین دوز مرفین، افزایش معنی داری داشت (P<0.001) و در سایر گروه ها این تغییرات معنی دار نبود. در حیوانات تحمل یافته، همچنین میزان گلوتامات در جنس ماده دست نخورده بطور معنی داری بیش از گروه نر مشابه بود (P<0.001)، اما اختلاف بین میزان گلوتامات در حیوانات گنادکتومی شده در دو جنس معنی دار نبود(نمودار۲).



نمودار۲- تفاوت جنسی و نقش هورمون های جنسی در میزان گلوتامات نوکلئوس اکومبنس در روند تحمل به اثر ضددردی مرفین در موش صحرایی. داده ها Mean ± SEM می باشد، GDX: حیوان گنادکتومی شده. (n=3 - 4)، غلظت گلوتامات اندازه گیری شده مربوط به ۲۰ دقیقه پس از تزریق مرفین در هر گروه می باشد.
*** P<0.001 گروه ماده تحمل نیافته در مقایسه با گروه ماده تحمل یافته.
††† P<0.001 گروه نردست نخورده (یا گنادکتومی) تحمل نیافته در مقایسه با گروه ماده دست نخورده (یا گنادکتومی) تحمل نیافته. +++ P<0.001 گروه ماده دست نخورده تحمل یافته در مقایسه با گروه ماده گنادکتومی تحمل یافته. ### P<0.001 گروه ماده دست نخورده تحمل یافته در مقایسه با گروه نر دست نخورده تحمل یافته.

بحث

در مورد تفاوت جنسی در اثر ضد دردی مرفین در دو دهه اخیر گزارش های بسیاری ارائه شده است، اما در مورد تفاوت تحمل به اثر ضد دردی مرفین در حیوانات نر و ماده گزارش های اندکی موجود است. در این مطالعه تاثیر استروئیدهای جنسی بر تکوین تحمل به اثر ضد دردی مرفین و مکانیسم اثر احتمالی آنها بر این پدیده از طریق سیستم گلوتاماترژیک مورد مطالعه قرار گرفت، که نتایج حاصله می تواند در سه محور اصلی به ترتیب ذیل مورد بحث و بررسی قرار گیرد.

تفاوت جنسی در تکوین تحمل به اثر ضد دردی مرفین

مطالعه حاضر تایید می کند که تجویز مزمن مرفین به میزان ۷mg/kg، بصورت زیر جلدی و برای ۸ روز متوالی منجر به ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین در موش صحرایی نر و ماده می گردد. کاهش پاسخ به مرفین بعلت سازش یافتن ناشی از بکارگیری مکرر محرک دردزا نیست، زیرا جنس نر و ماده پاسخ های مشابهی به تجویز منفرد و مکرر سالین (1ml/kg, s.c.) نشان دادند. حساسیت به محرک دردزا در مدل درد tail flick در بین موش صحرایی نر و ماده در حالت پایه اختلاف معنی دار آماری نداشت. این در حالی است که برخی محققین ذکر نموده اند که آستانه درد در جنس ماده پایین تر از جنس نر است[۶].

نتایج حاضر در راستای مطالعات قبلی نشان می دهد که تجویز حاد مرفین (روز اول) سبب بروز اثر ضد دردی بیشتر در جنس نر نسبت به ماده در مدل درد tail flick می شود [۲۸,۲۴,۱۵,۱۲]. در اغلب مطالعات قبلی که از روش های دیگر ارزیابی درد (hot plate, tail withdrawal, abdominal

constriction, paw pressure, shock jump) استفاده شده است، مرفین اثرات ضد دردی بیشتری در موش سوری و موش صحرایی نر نسبت به ماده ایجاد نمود. البته مطالعاتی نیز وجود دارند که تفاوت جنسی در اثر ضد دردی مشاهده نشد و یا اثر ضد دردی در جنس ماده بیشتر از نر بود[۳۶,۳۴].

نتایج این مطالعه بیانگر تفاوت جنسی در سرعت و درجه تکوین تحمل به اثر ضد دردی مرفین در مدل درد tail flick می باشد. در واقع داده های ما نشان می دهد که تفاوت جنسی در اثر ضد دردی مرفین با تجویز مزمن مرفین و بروز تحمل از بین می رود. در مدل درد بکار رفته در این مطالعه، سرعت بروز تحمل در جنس ماده دست نخورده سریعتر از نر مشابه می باشد. البته مهم است توجه کنیم که پاسخ اولیه به مرفین در مدل درد tail flick بطور قابل ملاحظه در جنس ماده کمتر از نر بوده و بنابراین مدت کوتاهتری مورد انتظار است تا پاسخ latency به میزان پایه قبل از تزریق برسد. مطالعات قبلی نیز وجود تفاوت جنسی در تکوین تحمل به مرفین را با اختلاف گزارش کرده اند. در یک مطالعه ، میزان تکوین تحمل به مرفین (در تجویز مکرر مرفین بصورت زیر جلدی) در موش صحرایی جنس نر بیشتر و نیز سریعتر از ماده[۲۳,۱۵] و در مطالعه دیگری میزان تکوین تحمل به مرفین (در تجویز داخل وریدی مرفین بمدت ۴۸ساعت) در جنس ماده بیشتر از نر و با سرعت کمتر گزارش شده است[۳۶]. در موش سوری نیز تکوین تحمل به اثر ضددردی مرفین با آزمون tail- withdrawal در جنس ماده بیشتر از نر گزارش شده است[۲۷].

چندین فاکتور وجود دارد که سبب اختلاف در نتایج بررسی ها می گردد. اولا، در مطالعات تحمل معمولا مراحل مختلف سیکل جنسی کنترل نمی شود. در این آزمایشات بعلت اینکه دارو برای چندین روز متوالی تجویز می گردد کنترل مراحل سیکل جنسی از لحاظ اجرایی بسیار مشکل است و از سوی دیگر، تجویز مزمن مرفین خود می تواند سیکل جنسی را در موش صحرایی مختل کند[۱۵]. روش ارزیابی درد (حاد، مزمن)، شدت تحریکات دردزا، طراحی روش ایجاد تحمل، انتخابی بودن اپیوئید برای گیرنده خاص (selectivity)، نژاد و گونه حیوان مورد مطالعه نیز می تواند اختلاف ساز باشد[۲۳-۵،۱۶،۲۶].

تاثیر حذف استروئیدهای جنسی در تکوین تحمل به اثر ضد دردی مرفین

حذف استروئیدهای جنسی از طریق گنادکتومی طولانی مدت (۲۸روزه) در هر دو جنس نر و ماده، تاثیری بر آستانه درد نداشت. یافته های محققین در زمینه تاثیر هورمون های تخمدانی بر رفتار درد، در مدل های مختلف ارزیابی درد بسیار متفاوت است. بسیاری از محققین عدم تغییر در آستانه درد در مراحل مختلف سیکل جنسی و نیز بدنبال اوارکتومی را گزارش کرده اند، در حالی که دیگران افزایش حساسیت به محرک دردزا و کاهش حساسیت به اپیوئیدهای اندوژن و اگزوژن در طول دوره هایی که فعالیت استروژن حداکثر است (در طول مراحل پرواستروس و استروس) را گزارش نموده اند[۳۹,۳۸,۲۹,۲۴,۲۳,۱۸] .

گزارش های محققین در مورد تاثیر گنادکتومی بر آستانه درد در جنس نر نیز همراه با اختلاف نظر می باشد. بعضی از محققین همانند نتایج مطالعه حاضر، عدم تغییرات معنی دار در آستانه درد با انجام گنادکتومی[۳۷,۲۴,۱۲,۲] و برخی نیز کاهش آستانه درد [۳۳,۱۷] را گزارش نموده اند. بر اساس داده های مطالعه حاضر، اثر ضد دردی مرفین با عمل جراحی گنادکتومی در جنس ماده افزایش و در نر کاهش داشت، هرچند این تغییرات معنی دار نبود.

مطالعات قبلی، نتایج متفاوتی را از تاثیر گنادکتومی بر اثر ضد دردی مرفین گزارش نموده اند. بر اساس برخی از گزارش ها، گنادکتومی موش صحرایی نر بالغ و یا موش سوری سبب افزایش [۳۶,۱۱,۲] ، در برخی مطالعات کاهش [۳۸,۳۷] و در بعضی نیز موجب عدم تغییر[۳۸,۲۸,۲۵,۱۴,۱۲,۹] در اثر ضد دردی اپیوئیدها می گردد.

بر اساس مطالعات قبلی، نتایج گنادکتومی در موش صحرایی ماده بالغ نیز متفاوت است. برخی محققین افزایش[۲ ,۲۴ ,۲۸ ,۳۸]، برخی کاهش [۴] و بعضی هم عدم تغییر [۱۲ ,۱۴ ,۲۵ ,۳۸] در اثر ضد دردی اپیوئیدها گزارش نموده اند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که، میزان بروز تحمل به مرفین در حیوانات نر و ماده گنادکتومی شده تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت. اما گنادکتومی در جنس نر منجر به بروز سریعتر وقوع تحمل به مرفین گردید.

علت اختلاف در نتایج مطالعات مختلف در بررسی تاثیر گنادکتومی در حیوانات بالغ می تواند ناشی از اختلاف در متدولوژی تحقیق باشد. فاصله بهبودی جراحی گنادکتومی تا انجام تست ارزیابی درد ممکن است مهم باشد. اگرچه میزان هورمون های در حال گردش، بطور معنی داری پس از ۲۴ ساعت از انجام گنادکتومی افت می کنند، اما اثرات این هورمون ها بر رفتار تولید مثل ممکن است برای چندین هفته پس از جراحی در جوندگان همچنان وجود داشته باشد. فاصله زمانی تغییرات اثر ضد دردی پس از گنادکتومی نیز دقیقا روشن نشده است. علاوه بر موارد فوق، روش ارزیابی درد و اثر ضد دردی نیز بسیار مهم است. برخی محققین تنها تک دوز مرفین را بررسی کرده اند[۲] در حالی که دیگران محدوده ای از دوزهای مختلف را بکار برده اند [۱۲ ,۲۴].

در تفسیر چگونگی تاثیر جنس و حذف استروئیدهای جنسی بر پدیده درد و اثر ضد دردی ناشی از اپیوئیدها، باید ذکر نمود که، برخی معتقدند، گرچه گنادکتومی و جنسیت ممکن است قدرت اثر مرفین را تغییر دهد اما هیچکدام تمایل (affinity) و تراکم (density) رسپتوری را تغییر نمی دهند[۲۴] و با توجه به این مسئله که، سطح مرفین در مغز، ۵۳٪ در موش نر بیشتر از ماده است[۹]، احتمالا علت این اختلافات، تفاوت در فارماکوکینتیک مرفین است. از سوی دیگر مطالعاتی نیز نشان داده اند که هیچگونه تفاوتی در سطح خونی و مغزی مرفین در موش صحرایی نر و ماده پس از تجویز مرفین وجود ندارد[۱۳] هورمون های جنسی بعلت آنکه می توانند بیان ژنها را در سیستم های مختلف تغییر دهند

(از جملـه تنظیم میزان پپتیدهای اپیوئیدی اندوژن و نیز mRNAs آنها، تنظیم گیرنده های اپیوئیدی) می توانند از طریق تاثیر بر فارماکودینامیک دارو سـبب بروز اختلافات جنسی شـوند[۹]. نقش واقعی و میزان اهمیت فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک در این پروسه ها بدرستی شناخته نشده است و همچنان نیازمند مطالعات بیشتر و دقیقتر در این زمینه است.

بررسـی تاثیر جنسـیت و حـذف اسـتروئیدهای جنسـی بر تغییرات گلوتامات در هسـته اکومبنس در روند تحمل به اثر ضد دردی مرفین

تاکنون مطالعه ای در زمینه تاثیر جنسـیت و اسـتروئیدهای جنسـی بر آزادسـازی گلوتامات در روند تحمل به مرفین انجام نپذیرفته اسـت. بر اساس مطالعه حاضر، بالا بودن میزان گلوتامات (بعنوان یک عامل تسهیل کننده درد) در هسـته اکومبنـس پس از تزریق منفـرد مرفین، در جنس ماده نسـبت به نر در راسـتای مطالعات رفتاری است. همانطور که پیشتر بیان شـد قدرت اثر ضد دردی مرفین در جنس ماده کمتر از نر اسـت. با حذف اسـتروئیدهای جنسی سطح گلوتامات در جنس ماده کاهش داشت، همانگونه کـه اثر ضد دردی مرفین با گنادکتومی افزایش نشـان داد. در حیوانات تحمل یافته، میزان گلوتامات در هسـته اکومبنس جنس نر ۳۰٪ کاهش و در جنس ماده ۲۰۰ ٪ افزایش داشته است. به این ترتیب در روند تحمل افزایش معنی دار میزان گلوتامات در جنس ماده نسبت به نر با بروز سـریعتر تحمل در جنس ماده مطابقت دارد. با حذف استروئیدهای جنسی در حیوانات نر تغییرات معنی داری در سطح گلوتامات هسته اکومبنس در تجویز دوز منفرد و مزمن مرفین مشاهده نشد. احتمالا نقش استروئیدهای تخمدانی در میزان گلوتامات هسـته اکومبنس در روند تحمل به مرفین از هورمونهای جنسی مردانه اهمیت بیشتری دارد.

انتقـالات عصبـی گلوتامـات عمدتـا بواسـطه رسـپتورهای NMDA (N-methyl-D-aspartate)، در پروسـه هـای اعتیـاد و تحمـل به اثر ضـد دردی اپیوئیدها حائز اهمیت اسـت[۲۰ ,۴۰]. برخی از محققین به کاهش میزان گلوتامات خارج سـلولی در مغز بدنبال تجویز مرفین [۱۹] و ارتباط بین آزادسـازی اسید آمینه تحریکی و کاهش پاسخ ضد دردی مرفین اشاره نموده اند[۴۰]. افزایش آزادسازی اسید های آمینه تحریکی در nucleus accumbens, locus coeruleus neurons, striatal system موش صحرایی تحمل یافته به مرفین و نیز در سندرم قطع با نالوکسـان در حیوانات تحمل یافته به مرفین گزارش شـده است. از سـوی دیگر آنتاگونیست های مختلف گیرنده های اسید آمینه تحریکی مانـع تکوین تحمل به مرفین میگردند. این شـواهد حاکی از نوعی رابطه کنترل فیدبکی مثبت بین اپیوئیدها و رسـپتورهای اسـید آمینه تحریکی می باشند[۱, ۲۱].

از میان نواحی مختلف سیسـتم عصبی مرکزی که در پروسـه تحمل به مرفین نقش دارند، هسـته اکومبنس یکـی از جایگاههای مهم مغز در روند تحمل و وابسـتگی به اپیوئیدها بشـمار می آید. بر اسـاس شـواهد موجود تماس طولانی مدت با اپیوئیدها ممکن اسـت باعث ایجاد تغییرات در انتقالات عصبی گلوتاماترژیک بصورت پیش و پس سیناپسی در هسته اکومبنس گردد. این نروپلاستیسـیتی طولانی مدت ممکن اسـت کنترل آوران های گلوتاماتی به نرونهای هسـته اکومبنـس را تقویت کند[۲۲]. در سـالهای اخیر افزایش آزادسازی گلوتامات و آسپارتات در مایع مغزی- نخاعی (CSF: cerebrospinal fluid) بیماران سـرطانی که مرفین را برای تسکین درد بصورت نخاعی دریافت کرده و اثر ضد دردی دارو نیز بعلت تجویز طولانی مدت کاهش یافته بود، مشاهده شده است[۴۱].

وجود شـواهدی مبنی بر فعالیت اسـتروژن ها بر بسـیاری از نواحی سیستم عصبی ار جمله نوکلئوس اکومبنس [۳۰ ,۳۱]، وجود رسپتورهای اسـتروژنی و پروژسـتینی در نواحـی درگیـر در پروسـه درد[۳۰] و نیز گزارش هایی در خصوص تداخل هورمون های تخمدانی و رسـپتورهای NMDA جهـت تشـکیل سـیناپس های جدیـد و یا تنظیم افزایشـی (up regulation) بزرگترین سـاب یونیت رسـپتورNMDA در جسم سـلولی برخی از نرون های مغزی توسـط استروژن[۳۱]، همگی بر تاثیر پذیری سیسـتم گلوتاماترژیک از این هورمون اسـتروئیدی دلالت دارد. با توجه به این ارتباط و سـطح بالای اسـترادیول در جنس ماده، شاید بتوان افزایش غلظت گلوتامات در هسـته اکومبنس در مطالعه حاضر را ناشی از افزایش آزادسـازی اسـید آمینه گلوتامات در روند ضد دردی و تحمل به مرفین از طریق مکانیسم حساس به استروژن دانست.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشـی از یافته های پژوهشی طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد. ضمن تشکر و قدردانی از مسئولین مرکز تحقیقات علوم اعصاب و معاونت پژوهشی دانشگاه، بدین وسیله از همکاری ارزنده آقای صفرعلی غفاری (تکنسین گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) و کارشناسـان گروه شـیمی دارویی و فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی، دانشـگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را در انجام مراحل عملی این پژوهش یاری کردند نیز صمیمانه تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع

[1] Aghajanian GK, Kogan JH, Moghaddam B, Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. ***Brain Res*** 636 (1994) 126-130.

[2] Ali BH, Sharif SI, Elkadi A, Sex differences and the effect of gonadectomy on morphine-induced antinociception and dependence in rats and mice. ***Clin Exp Pharmacol Physiol*** 22 (1995) 342-344.

[3] Badillo-martines D, Kirchgessner AL, Butler PD,

Bodnar RJ, Monosodium glutamate and analgesia induced by morphine. Test-specific effects. ***Neuropharmacol*** 23 (1984) 1141-1149.

[4] Banerjee P, Chatterjee T, Ghosh J, Ovarian steroids and modulation of morphine-induced analgesia and catalepsy in female rats. ***Eur J Pharmacol*** 96 (1983) 291-294.

[5] Barrett AC, Cook CD, Terner JM, Roach EL, Syvanthong C, Picker MJ, Sex and rat strain determine sensitivity to kappa opioid-induced antinociception. ***Psychopharmacol*** 160 (2002) 170-181.

[6] Bodnar RJ, Romero MT, Kramer E, Organismic variables and pain inhibition: roles of gender and aging. ***Brain Res Bull*** 21 (1988) 947-953.

[7] Boyer JS, Morgon MM, Craft RM, Microinjection of morphine into the rostral ventromedial medulla produces greater antinociception in male compared to female rats. ***Brain Res*** 796 (1998) 315-318.

[8] Brann DW, Mahesh VB, Excitatory amino acids: Function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. ***Front Neuroendocrinol*** 5 (1994) 3-49.

[9] Candido J, Lutfy K, Billings B, Sierra V, Duttaroy A, Inturrisi CE, Effect of adrenal and sex hormones on opioid analgesia and opioid receptor regulation. ***Pharmacol Biochem Behav*** 42 (1992) 685-692.

[10] Carbone S, Szwarcfarb B, Otero Losada ME, Moguilevsky JA, Effect of ovarian steroids on the gonadotropin response to N-methyl-D-Aspartate and on hypothalamic excitatory amino acid levels during sexual maturation in female rats. ***Endocrinology*** 130 (1992) 1365-1370.

[11] Chatterjee TK, Das S, Banerjee P, Ghosh JJ, Possible physiological role of adrenal and gonadal steroids in morphine analgesia. ***Eur J Pharmacol*** 77 (1982) 119-121.

[12] Cicero TJ, Nock B, Meyer ER, Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. ***J Pharmacol Exp Ther*** 279 (1996) 767-773.

[13] Cicero TJ, Nock B, Meyer ER, Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: relationship to serum and brain morphine concentration. ***J Pharmacol Exp Ther*** 282 (1997) 939-944.

[14] Cicero TJ, Nock B, O'Connor L, Meyer ER, Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: Activational and organizational effects. ***J Pharmacol Exp Ther*** 300 (2002) 695-701.

[15] Craft RM, Stratmann JA, Bartok RE, Walpole TI, King SJ, Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. ***Psychopharmacol*** 143 (1999) 1-7.

[16] Craft RM, Bernal SA, Sex differences in opioid antinociception: kappa and 'mixed action' agonists. ***Drug Alcohol Depend*** 63 (2001) 215-228.

[17] Forman LJ, Tingle V, Estilow S, Cater J, The response to analgesia testing is affected by gonadal steroids in the rat. ***Life Sci*** 45 (1989) 447-454.

[18] Frye CA, Cuevas CA, Kanarek RB, Diet and estrous cycle influence pain sensitivity in rats. ***Pharmacol Biochem Behav*** 45 (1993) 255-260.

[19] Hao Y, Yang JY, Guo M, Wu CF, and Wu MF, Morphine decreases extracellular levels of glutamate in the anterior cingulate cortex: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. ***Brain Res*** 1040 (2005) 191-196.

[20] Hsu MM, Wong CS, The role of pain facilitatory systems in opioid tolerance. ***Acta Anaesthesiol Sin*** 38 (2000) 155-166.

[21] Ibuki T, Marsala M, Masuyama T, Yaksk TL, Spinal amino acid release and repeated withdrawal in spinal morphine tolerant rats. ***Br J Pharmacol*** 138 (2003) 689-697.

[22] Jacobs EH, Wardeh G, Smit AB, Schoffelmeer AN, Morphine causes a delayted increase in glutamate receptor functioning in the nucleus accumbens core. ***Eur J Pharmacol*** 511 (2005) 27-30.

[23] Kasson BG, George R, Endocrine influences on the actions of morphine: IV. Effects of sex and strain. ***Life Sci*** 34 (1984) 627-634.

[24] Kepler K, Kest B, Kiefel JM, Cooper ML, Bodnar RJ, Roles of gender, gonadectomy and estrous phase in the analgesic effects of intracerebroventricular morphine in rats. ***Pharmacol. Biochem. Behav*** 34

(1989) 119-127.

[25] Kepler KL, Standifer KM, Paul D, Kest B, Pasternak GW, Bodnar RJ, Gender effects and central opioid analgesia. ***Pain*** 45 (1991) 87-94.

[26] Kest B, Wilson SG, Mogil JS, Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype. ***J Pharmacol Exp Ther*** 289 (1999) 1370-1375.

[27] Kest B, Sarton E, Dahan A, Gender differences in opioid-mediated analgesia: animal and human studies. ***Anesthesiology*** 93 (2000) 539-547.

[28] Krzanowska EK, Bodnar RJ, Morphine antinociception elicited from the ventral priaqueductal gray is sensitive to sex and gonadectomy differences in rats. ***Brain Res*** 821 (1999) 224-230.

[29] Martinez-Gomez M, Cruz Y, Salas M, Hudson R, Pacheco P, Assessing pain threshold in the rat: changes with estrus and time of day. ***Physiol Behav*** 55 (1994) 651-657.

[30] McEwen BS, Alves SE, Estrogen action in the central nervous system. ***Endocrine Reviews*** 20 (1999) 279-307.

[31] McEwen BS, Genome and hormones: Gender differences in physiology. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. ***J Appl Physiol*** 91 (2001) 2785-2801.

[32] Mogil JS, Chestler EJ, Wilson SG, Juraska JM, Stemberg WF, Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. ***Neurosci Biobehav Rev*** 24 (2000) 375-389.

[33] Pednekar JR, Mulgaonker VK, Role of testosterone on pain threshold in rats. ***Indian J Physiol Pharmacol*** 39 (1995) 423-424.

[34] Shekunova EV, Bespalov AY, Estrous cycle stage-dependent expression of acute tolerance to morphine analgesia in rats. ***Eur J of Pharmacol*** 486 (2004) 259-264.

[35] Smith SS, Estrogen administration increases neuronal responses to excitatory amino acids as a long-term effect. ***Brain Res*** 503 (1989) 354-357.

[36] South SM, Wright AW, Lau M, Mather LE, Smith MT, Sex-related differences in antinociception and tolerance development following chronic intravenous infusion of morphine in the rat: Modulatory role of testosterone via morphine clearance. ***J Pharmacol Exp Ther*** 297 (2001) 446-457.

[37] Stoffel EC, Ulibarri CM, Craft RM, Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. ***Pain*** 103 (2003) 285-302.

[38] Terner JM, Barrett AC, Grossell E, Picker MJ, Influence of gonadectomy on the antinociceptive effects of opioids in male and female rats. ***Psychopharmacology*** 163 (2002) 183-193.

[39] Vincler M, Maixner W, Vierck CJ, Light AR, Estrous cycle modulation of nociceptive behaviors elicited by electrical stimulation and formalin. ***Pharmacol Biochem Behav*** 69 (2001) 315-324.

[40] Wen ZH, Chang YC, Cherng CH, Wang JJ, Tao PL, Wong CS, Increasing of intrathecal CSF excitatory amino acids concentration following morphine challenge in morphine-tolerant rats. ***Brain Res*** 995 (2004) 253-259.

[41] Wong CS, Cherng CH, Luk HN, Ho ST, Tung CS, Effects of NMDA receptor antagonists on inhibition of morphine tolerance in rats: binding at μ-opioid receptors. ***Eur J Pharmacol*** 297 (1996) 27-33.

متن کامل این مقاله از طریق وب سایت مجله قابل دسترسی است www.phypha.ir/ppj