فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۸۳

بررسی اثراسترس شنا بر Tolerance حاصل ازتجویزمرفین در موش‌های سوری

سهیلا فضلی طبایی [۱] ، سیدحسین یحیوی [۱] ، آرزو فرهودی [۱] ، پریوش ابراهیمی [۱] ، نپتون نیک انجام [۱] ، محمدرضا زرین دست [۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده پزشکی تهران، آزمایشگاه تحقیقات
۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

چکیده

دراین پژوهش، اثر استرس شنا برTolerance حاصل ازتجویز مرفین توسط فرمالین تست مورد بررسی قرار گرفت. تجویز دوزهای مختلف مرفین بصورت زیر جلدی با دوزهای mg/kg ۹ و۶ ،۳ در موشها باعث ایجاد بیدردی وابسته به دوز در هر دو فاز فرمالین تست (حاد ومزمن) میگردد.

استرس شنا دو یا سه بار در مدت سه روز متوالی به منظور ایجاد Tolerance ناشی از استرس شنا موجب کاهش اثر ضددردی مرفین گشت. همچنین استفاده از مرفین سولفات با دوز mg/kg ۲۵ بمدت سه روز متوالی در حضور دو یا سه بار استرس شنا باعث تقویت اثر Tolerance نسبت به اثر ضد دردی مرفین در هر دو فاز فرمالین تست گردید.

تجویز مرفین با دوز mg/kg۵۰ در مدت سه روز متوالی و همزمان با استرس شنا تغییری در Tolerance نسبت به مرفین ایجاد ننمود. از سوی دیگر تزریق مرفین mg/kg ۵۰ در طول سه روز وبدون استرس شنا ، اثر ضد دردی ناشی از مرفین را در هر دو فاز فرمالین تست کاهش داد.

واژه‌های کلیدی : Tolerance , Cold Water Swim Stress (CWSS) , Formalin Test , Morphine.

مقدمه

مرفین دارای خاصیت ضددردی میباشدوقادر است که درصورت تجویز به حیوانات، بصورت حاد یامزمن[۱] یابه انسان[۲]، Tolerance ایجادنماید. شواهدی دردست است که ثابت میکند مدل آزمایشی شنا میتواند اثرضددردی ایجادکند. بعنوان مثال اثرات ضدد دی استرس شنا توسط آب سرد (۴ °C) وبدنبال آن بررس ی ا تست هایی نظیر Tail flick [۳] وWrithing [۴] مطالعه شده است. فرمالین تست مشابه دردپس از جراحی است ودرمدل حیوانی جهت بررسی اثرضددردی داروهایی که دارای اثرضددردی متوسط هستند بکارمیرود.

تزریق فرمالین به کف پای موشها موجب ایجاد درد درطی دومرحله به نام درد حاد (فاز اول درد) ودرد مزمن (فاز دوم درد) میگردد [۶،۵]. مکانیسمهایی که درتولید اثر ضددردی استرس شنای آب سرد دخالت دارند بخوبی شناسایی نشده اند. گزارشهایی مبنی بردخالت رسپتورهای اپیوئیدی Spinal وSupraspinal درپدید آمدن

اثرضددردی توسط استرس شنا موجود میباشد [۷، ۸]. بنابراین اگر اپیوئیدها در اثرضددردی استرس شنا دخالت داشته باشند میتوان Tolerance به بیدردی را با تکرار تیمار موشهابا استرس شنای آب سرد ایجاد نمود[۹].

درآزمایشات حاضر، به بررسی اثراسترس شنا بر Tolerance ناشی ازتجویز مرفین بااستفاده ازفرمالین تست پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات : دراین تجربه ازموشهای کوچک وسفید نر ازنژاد NMRI به وزن تقریبی ۳۰-۲۰ گرم که در قفسهای پلاستیکی مخصوص و دراطاقی بادمای $22\pm 3^{\circ}C$ وبا سیکل تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری میشدند، استفاده شد .آب آشامیدنی وغذای استاندارد آزادانه وبراحتی بجزء درزمانهای انجام آزمایشات دراختیار موشها قرارگرفت . هرموش فقط یکبار موردآزمایش قرارمیگرفت وپس از انجام آزمایش معدوم میگردید.

داروها : دارو عبارت بود از مرفین سولفات (تماد،ایران) که پس ازحل کردن درآب مقطر وتهیه دوزهای مختلف بصورت زیرجلدی به موشها تزریق میگردید

روش کارجهت ایجاد Tolerance : به موشها یکباردرروز و راس ساعت ده صبح ۵۰mg/kg یا ۲۵ مرفین سولفات وبه گروههای کنترل سالین ۵ ml/kg بصورت زیرجلدی تزریق میگردید. . درروزچهارم مرفین سولفات بادوزهای mg/kg ۹و۳،۶ تزریق گردید. میزان تزریق فرمالین ۰/۵ ٪ به کف پای راست موش بصورت زیرپوستی ۲۵ میکرولیتر بودکه پانزده دقیقه پس ازتزریق مرفین درروز چهارم تجویز میشد.سپس موشها جهت بررسی درزیر سیلندرهای پلاستیکی ویژه که بر روی دستگاه مشاهده رفتار وجودداشت، قرارداده میشدند.

روش ایجاد استرس شنا : به منظورایجاد استرس بمدت زمانهای مختلف ۳ و ۱ ، ۰/۵ دقیقه در ظرف مخصوص شنا که تا ارتفاع ۱۵ سانتیمتر از آب ۲۰ درجه سانتیگراد پر شده بود، موشها شنا میکردند و سپس به آرامی توسط حوله خشک میشدند.

نحوه ثبت شدت درد : هرگاه موشها هیچگونه واکنشی به تزریق فرمالین نشان نمیدادند Score=0 وهرگاه موشها کف پای راست خودرا بطرف شکم بالابرده وفشارمیدادند Score=1واگر پای تزریق شده را می لیسیدند وگاز میگرفتند Score=2 به آنها تعلق میگرفت. رفتار، برای بررسی فازاول درد(دردحاد) بمدت۵دقیقه وپس ازگذشت ده دقیقه (زیرا دراین مدت فرمالین درد ایجادنمیکند)، برای بررسی فازدوم درد (دردمزمن) بمدت ۴۵ دقیقه (که به سه بخش ۱۵-۱۵-۱۵ دقیقه تقسیم شده بود) موردمطالعه قرارمیگرفت.

درهرسری ازآزمایشات از ۱۰ سر موش سوری نر (n=10) استفاده گردید ونتیجه بصورت میانگین وانحراف معیار mean ± SEM به ثبت رسید.

روشهای آماری : محاسبه آماری جهت تعیین وجود اختلاف معنی دار میان گروههای آزمایشی به روش آنالیز واریانس (ANOVA) یکطرفه وبدنبال آن روش Newman-Keuls انجام پذیرفت. اختلاف $P<0.05$ معنی‌دار درنظر گرفته شده است.

نتایج

اثرضددردی مرفین درموشهای تیمارشده با استرس شنای آب سرد

شکل ۱- بررسی اثر ضددردی مرفین درموشهایی که ۲ ویا۳ روز استرس شنا دریافت کردند را با استفاده ازفرمالین تست نشان میدهد.

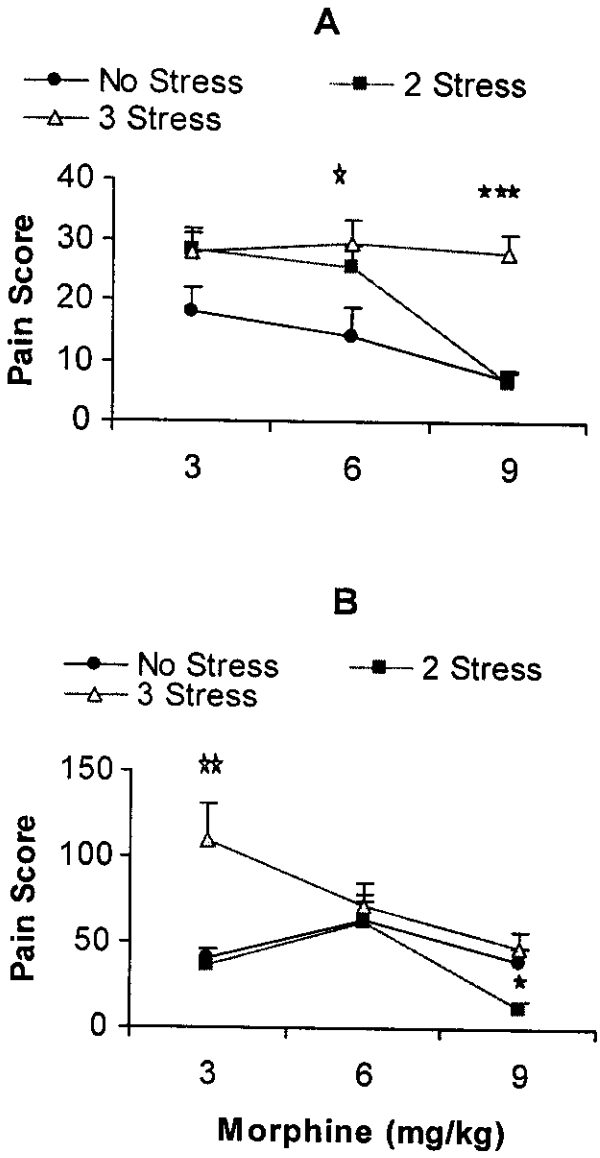
موشها بمدت ۳ دقیقه ، دو یا سه روز متوالی استرس شنا دریافت کردند. به گروههای شاهد استرس شنا داده نشد و در روز آزمایش (روز چهارم) اثرات ضددردی مرفین (S.C.، mg/kg ۹ و۶ ، ۳) در فاز اول و دوم فرمالین تست مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات نشان دادکه استرس شنا روزی یکبار بمدت ۲ یا۳ روز و ۱۵ دقیقه پس از تزریق مرفین موجب کاهش اثرضددردی مرفین درفاز اول فرمالین تست میشود (Fig. 1A).

اثراسترس شنا برTolerance ناشی از مرفین ۲۵mg/kg

شکل ۲- نشانگر اثراسترس شنای آب سرد بر Tolerance ناشی ازتجویز دوزکم مرفین میباشد. به موشهای گروه کنترل مرفین با دوزهای mg/kg ۹ و ۶ ، ۳ بصورت زیر جلدی تزریق گردید. وبه سایر موشها سه روز مرفین با دوز mg/kg ۲۵ درحضور (۲ بار استرس و ۳ بار استرس) وعدم حضوراسترس شنا تزریق شد. در روزچهارم با استفاده ازتزریق مرفین بادوزهای مختلف (mg/kg ۹ و۶ ، ۳) بیدردی ایجادشد. نتایج حاکی ازآن است که سه روز تزریق مرفین با دوزmg/kg ۲۵ باعث ایجاد بیدردی درهردو فاز فرمالین تست میگردد. تجویز استرس شنا بمدت ۲روز (روزهای دوم وسوم) یاطی ۳ روز (روزهای اول، دوم وسوم) روزی یکباروه۱۵ دقیقه پس از تزریق مرفین (۲۵ mg/kg) درطی کسب Tolerance منجربه تقویت Tolerance ناشی ازمرفین درهردوفازفرمالین تست میشود.

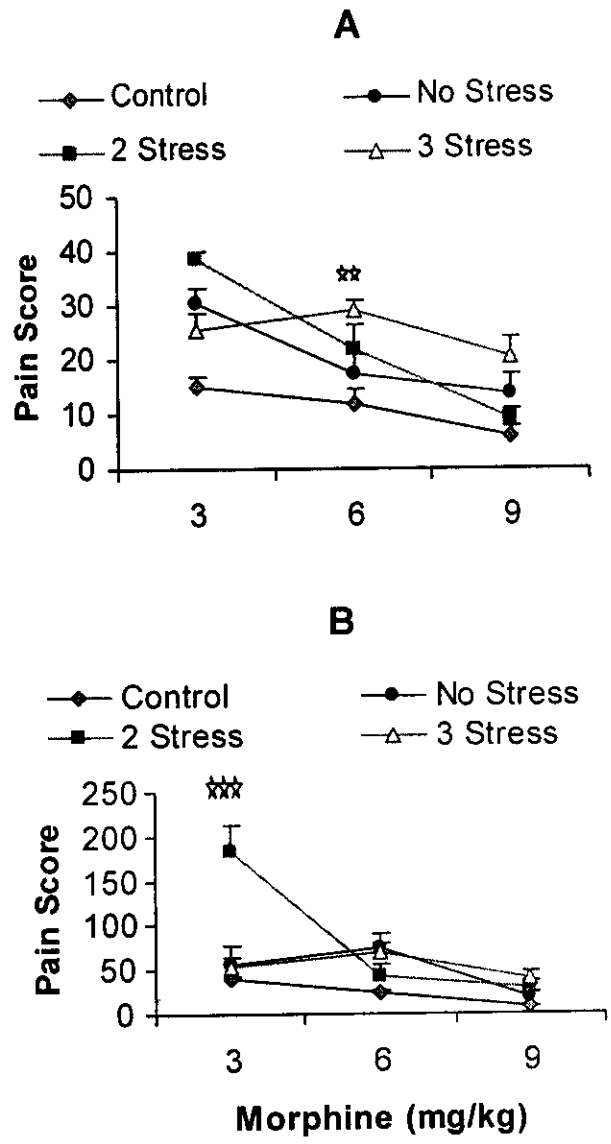
اثراسترس شنا بر Tolerance حاصل ازتجویز مرفین با دوز ۵۰ mg/kg

شکل ۳- نشانگر اثراسترس شنای آب سرد بر Tolerance ناشی ازتجویز دوز زیاد مرفین میباشد. به موشهای گروه کنترل مرفین با دوزهای mg/kg ۹ و ۶ ، ۳ بصورت زیر جلدی تزریق گردید. وبه سایر موشها سه روز



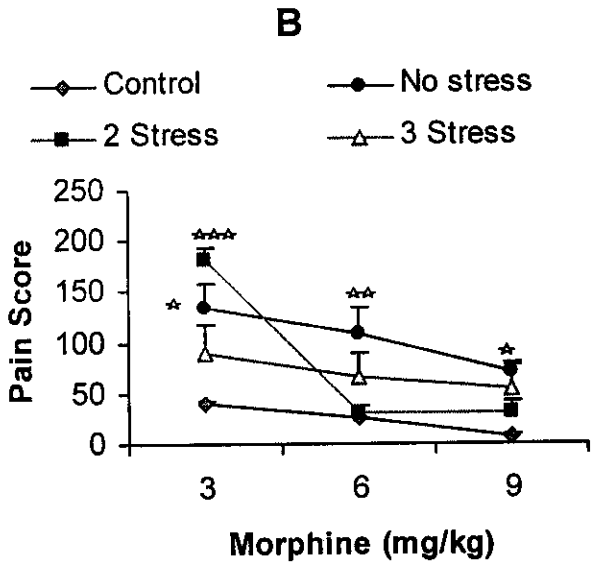
شکل ۱- نشانگرمقایسه اثرات ضددردی مرفین درحضوراسترس شنا بمدت دو روز(■) یاسه روز (▲) وعدم حضوراسترس شنا (گروه کنترل، ●) درموشهای سوری میباشد. موشها روزی یکبار ، روزهای دوم وسوم یا روز اول،دوم وسوم ۱۵ دقیقه پس از تزریق زیرجلدی سالینml/kg ۵ استرس شنا دریافت نمودند ودر روزچهارم پس ازتجویز مرفین با دوزهای مختلف (mg/kg ۹ و ۶ ، ۳) وانجام فرمالین تست، فازاول ودوم درد موردبررسی قرارگرفت. هرنقطه نشان دهنده mean ± SEM برای ۱۰ سر موش میباشد.

اختلاف $P< 0.05$ ×، $P<0.01$ ×× و $P< 0.001$ ××× باگروه کنترل معنی دار درنظر گرفته شد.



شکل ۲- بیانگراثرات ضددردی مرفین بادوز کم ۲۵ mg/kg درحضوروعدم حضور استرس شنا میباشد. به موشهای گروه کنترل مرفین سولفات با دوزهای ۹ mg/kg و ۶، ۳ (○) تجویز گردید.

سایر موشها مرفین (۲۵ mg/kg ، ●) درعدم حضورشناوحضوراسترس شنا درروزهای دوم وسوم (■) یاروزهای اول، دوم وسوم (▲) دریافت نمودند. در روز چهارم اثرات ضددردی مرفین بادوزهای ۹mg/kg و ۳،۶ درفازاول ودوم درد بااستفاده ازروش فرمالین تست موردمطالعه واقع شد. هرنقطه نشان دهنده mean ±SEM برای ده سر موش میباشد. اختلاف معنی دار با گروه کنترل P<0.05 × ، P<0.01 ×× و P<0.001 ××× درنظر گرفته شد.



شکل ۳- اثرضددردی مرفین بادوز زیاد ۵۰ mg/kg درحضوروعدم حضوراسترس شنا را نشان میدهد.گروه کنترل مرفین با مقادیر ۹ mg/kg و ۶، ۳ (○) دریافت نمودند. به موشها، مرفین (۵۰ mg/kg) درعدم حضوراسترس شنا (●) ودرحضورشنا در روزهای دوم وسوم (■) یاروزهای اول، دوم وسوم (▲) ، تزریق شد واثرات ضددردی مرفین با دوزهای ۹mg/kg و۳،۶ با استفاده ازروش فرمالین تست در روز چهارم موردبررسی قرارگرفت. هرنقطه نشان دهنده mean ± SEM برای ده سر موش میباشد. اختلاف P<0.05 × ، P<0.01 ×× و P<0.001 ××× باگروه کنترل معنی دار درنظرگرفته شده است.

مرفین با دوز mg/kg ۵۰ درحضور (۲ بار استرس و ۳ بار استرس) وعدم حضوراسترس شنا تزریق شد. اثرات ضددردی مرفین درروزچهارم باتزریق دوزهای مختلف مرفین(mg/kg ۹ و ۶ ، ۳) پدیدار گشت. ازآنجائیکه Tolerance ناشی ازتجویزمرفین mg/kg ۵۰ قوی میباشد بنابراین استرس شنا نمیتواند موجب افزایش Tolerance نسبت به اثربیدردی مرفین درهردوفاز فرمالین تست شود.

بحث

درمطالعه کنونی، استرس شنا موجب ایجاد Tolerance شده است واثرضددردی مرفین را کاهش داده است واین نتایج با گزارشهای دیگر مطابقت دارد[۱۰،۱۱]. مطالعات حاکی از آن است که گیرنده های دلتای اپیوئیدی نقش مهمی درایجادTolerance ایفاء میکنند [۹] . همچنین گزارش شده است که گیرنده های دلتا درایجادبیدردی توسط استرس شنا دخالت دارند وگیرنده های μ و κ دراین مورد نقشی ندارند [۱۲،۱۳]. به این سبب به نظر میرسد که گیرنده هایδ در ایجاد Tolerance ناشی از استرس شنا دخالت دارند.

Ono وهمکاران درسال ۲۰۰۲ گزارش کرده اند که مقادیر بسیار کم مرفین، انتهای اعصاب حسی راتحریک نموده واین عمل را ازطریق گیرنده های محیطی مرفین اعمال میکنند[۱۴]. ازسوی دیگر گزارش شده است که درموشهایی که توسط شنا بشدت دچار استرس میگردند فاز اول فرمالین تست به توسط گیرنده های مرفینی حاصل میشود درحالیکه درموشهایی که باشنا کمتردچار استرس میگردند مکانیسمهای NMDA دخالت دارند. بدین ترتیب آنتاگونیستهای NMDA میتوانند جهت بیدردی دربیمارانی که کمتر به اپیوئیدها پاسخ میدهند یا نسبت به اثر اپیوئیدها، Tolerance حاصل نموده اند بکار روند [۱۵].

مطالعه اخیرنشان داده است که استرس شنا طی ایجاد Tolerance موجب تقویت بروز Tolerance درهردو فاز فرمالین تست میشود. بنظر میرسدکه استرس ناشی از شنا و مرفین هردو از طریق یک مکانیسم مشابه موجب ایجاد Tolerance میشوند. گرچه گزارشاتی وجود دارد مبنی براینکه تجویز مزمن مرفین میتواند موجب Tolerance وغیر حساس شدن گیرنده های μ اپیوئیدی شود ولی در خرگوش موجب کاهش حساسیت این گیرنده ها نمیشود [۱۶].

بنابراین ایجادTolerance توسط استرس شنا ممکن است حداقل تاحدی مربوط به گیرنده μ اپیوئیدی ویا تداخل این گیرنده با گیرنده های δ باشد. درپژوهش اخیرتجویز مزمن مقدار زیادمرفین (mg/kg ۵۰) موجب ایجاد Tolerance گردید واسترس ناشی از شنا تغییری را در Tolerance حاصل از دوز زیاد مرفین (mg/kg ۵۰) ایجاد ننمود واین ممکن است بعلت حداکثر Tolerance باشد که مرفین ایجادکرده است وبدین جهت مکانیسمهای ناشی از شنا موجب تغییربیشتری در آن نشده است.

منابع

[1] Way, E.L., Loh, H.H. and Shen F., Stimulaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence, ***J. Pharmacol. Exp. Ther.,*** 167 (1969) 1-8.

[2] Manion, J.C., Cancer pain management in the hospice setting, ***Minn Med.,*** 78 (1995) 25-28.

[3] O'Connor, P. and Chipkin, R.E., Comparisons

between warm and cold water swim stress in mice, ***Life Sci.,*** 35 (1984) 631-639.

[4] Oluyomi, A.O. and Hart, S.L., Alpha-adrenoceptor involvement in swim stress-induced antinociception in the mouse, ***J. Pharm. Pharmacol.,*** 42 (1990) 778-784.

[5] Vaccarino, A.L., Marek, P., Kest, B., Weber, E., Keana, J.F., Liebeskind, J.C., NMDA receptor antagonists, MK-801 and ACEA-1011, prevent the development of tonic pain following subcutaneous formalin, ***Brain Res.,*** 615 (1993) 331-334.

[6] Rosland, J.H., Tjolsen, A., Michle, B. and Hole, K., The formalin test in mice: Effect of formalin concentration, ***Pain,*** 42 (1990) 235-242.

[7] Vanderah, T.W., Wild, K.D., Takemori, A.E., Sultana, M., Portoghese, P.S., Bowen, W.D., Mosberg, H.I. and Porreca, F., Mediation of swim stress antinociception by the opioid delta2-receptor in the mouse, ***J. Pharmacol Exp. Ther.,*** 262 (1992) 190-197.

[8] Killian, P., Holmes, B.B., Takemori, A.E., Portoghese, P.S. and Fujimoto, J.M. Cold water swim stress and delta 2 – opioid – induced analgesia are modulated by spinal γ – aminobutyric acid A receptors, ***J. Pharmacol. Exp. Ther.,*** 274 (1995) 730-734.

[9] Kim, K.W., Choi, S.S., Woo, R.S. and Suh, H. W., Development of antinociceptive tolerance and changes of opioid receptor ligand binding in the central nervous system of the mouse forced to single and repeated swimming in the cold water, ***Brain Res. Bull.,*** 61 (2003) 93-97.

[10] Fuchs, P.N., Kerr, B. and Melzack, R., Delayed nociceptive response following cold-water swim in the formalin test: possible mechanisms of action, ***Exp. Neurol.,*** 139 (1996) 291-8

[11] Fuchs, P.N. and Melzack, R., Repeated cold water swim produces delayed nociceptive responces, but not analgesia for tonic pain in the rat, ***Exp. Neurol.,*** 145 (1997) 303-307.

[12] Mizoguchi, H., Narita, M., Nagase, H. and Tseng L.F., Antisense oligodeoxynucleotide to a delta-opioid receptor blocks the antinociception induced by cold water swimming, ***Regul. Pept.,*** 59 (1995) 255-259.

[13] Mizoguchi, H., Narita, M., Kampine, J.P. and Tseng, L.F. [Met] enkephalin and delta 2-opioid receptors in the spinal cord are involved in the cold water swimming-induced antinociception in the mouse, ***Life Sci.,*** 61 (1997) PL 81-86.

[14] Ono, T., Inoue, M., Rashid, M.H., Sumikawa, K. and Ueda, H., Stimulation of peripheral nociceptor endings by low dose morphine and its signaling mechanism, ***Neurochem Int.,*** 41 (2002) 399-407.

[15] Lutfy, K., Sadowski, B., Marek, P., Kwon, I-S., Keana, J.F.W. and Weber, E., Differential sensitivity of mice bred for stress-induced analgesia to morphine and ACEA- 1011 in the formalin test, ***Pharmacol. Biochem. Behav.,*** 252 (1994) 495-500.

[16] Polastron, J., Meunier, J.C. and Jauzac, P., Chronic morphine induces tolerance and desensitization of μ-opioid receptor but not down regulation in rabbit, ***Eur. J. Pharmacol.,*** 266 (1994) 139-146.