



Response to Morphine in a unicellular animal model (*Paramecium caudatum*)

Seyed Sajad Shahrokhi¹, Manizheh Karami^{*1}, Bahram Kazemi²

1. Dept. Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

2. Cellular and Molecular Researches Center at Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 5 Mar 2011

Accepted: 4 Aug 2011

Abstract

Introduction: Response to morphine and role of Nitric Oxide (NO) on expression of morphine response has been studied in vertebrates. But, little evidence is provided in the matter in earlier invertebrates. This investigation for the first time evaluated the effect of NO on expression of morphine potency in *Paramecium caudatum*.

Methods: Animal after isolation from natural media and specific identification was cultured in laboratory. 1 ml of the isolated medium including the animals was added into the Sedgwick– Rafter cell counter. One μ l of drugs was infused into the cell counter. Morphine (1-60 μ g/ μ l) was infused into the cell and its effect was recorded throughout 0-180 sec. L-Arginine (1-8 μ g/ μ l), a NO precursor, was infused prior to morphine (2 μ g/ μ l). The NO producing enzyme was inhibited by preinfusion of L-NAME. Also the naloxone was used to show the involvement of the opioid receptors in the signaling of morphine response. In control specimens distilled water was added solely.

Results: The *Paramecia* under the infusion of morphine were aggregated. The most aggregation rate was observed at a relatively low dose of the drug (2 μ g/ μ l). L-Arginine showed a positive effect on the response ($p < 0.001$) whereas the effect was blocked by preinfusion of the L- NAME. Naloxone showed an inhibitory effect to morphine response. The activity of the NOS was shown by using the NADPH-diaphorase.

Conclusion: A sign of morphine potency in single-celled animal is the cell aggregation, and the present results are showing the interaction of NO system with the opioidergic system in this line. On the other hand, concerning the potentiation effect of L-arginine on morphine effective dose in the model, this finding may be useful in reducing of morphine's side effects in patients under the treatment of the drug, and in the drug economy as well.

Key words: *Paramecium caudatum*, Morphine Potency, Nitric oxide

* Corresponding author e-mail: karami@shahed.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

پاسخ مرفین در مدل حیوانی تک یاخته ای (*Paramecium caudatum*)

سید سجاد شاهرخی^۱، منیژه کرمی^{۲*}، بهرام کاظمی^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۱۳ مرداد ۹۰

دریافت: ۱۴ اسفند ۸۹

چکیده

مقدمه: پاسخ مرفین و نقش عوامل مختلف به ویژه نیتریک اکساید (NO) بر بیان آن در مهره داران مطالعه شده است، اما شواهد کافی برای این مساله در بی مهرگان پست وجود ندارد. در این پژوهش نقش NO در بیان قدرت مرفین در *Paramecium caudatum* برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت.

روش ها: نمونه حیوانی پس از جداسازی از محیط طبیعی و تأیید گونه در آزمایشگاه پرورش داده شد. یک میلی لیتر از محیط کشت خالص به لام سلول شمار Sedgwick-Rafter اضافه و دارو در حجم یک μl تلقیح شد. اثر تلقیح مرفین ($1-60 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) طی فواصل زمانی (0-180 sec) گزارش گردید. ال-آرژنینین ($1-8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)، پیش ساز NO، قبل از مرفین ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) تلقیح و آنزیم مولد NO با پیش تجویز L-NAME مهار شد. همچنین برای نشان دادن دخالت گیرنده های اپیوئیدی در اثرات سیگنالینگ مرفین از Naloxone استفاده شد. فعالیت سیستم NO با NADPH-diaphorase مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه های شاهد آب مقطر اضافه شد.

یافته ها: سلول های *P. caudatum* تحت تأثیر مرفین مجتمع شدند و بیشترین حالت تجمع نیز تحت دوز نسبتاً پائین مرفین ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) مشاهده شد. ال-آرژنینین اثر مثبت بر این فرایند داشت ($p < 0.001$) در حالیکه پیش تجویز L-NAME این اثرات را متوقف کرد. Naloxone نیز تأثیر مهاری نشان داد. تغییر فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سینتاز (Nitric Oxide Synthase) با NADPH-diaphorase در *P. caudatum* نشان داده شد.

نتیجه گیری: یکی از اثرات دارویی مرفین در مدل حیوانی تک یاخته ای بروز تجمع سلولی است و نتایج فوق نشان می دهد که سیستم NO با سیستم اپیوئیدی در *P. caudatum* در این راستا تداخل دارد. از طرف دیگر با توجه به پاسخ تقویتی ال-آرژنینین بر دوز موثر مرفین، این یافته می تواند در راستای کاهش اثرات جانبی مرفین (در بیماران تحت درمان با مرفین) و مسائل مربوط به اقتصاد دارویی ارزشمند باشد.

واژه های کلیدی: *P. caudatum*، قدرت مرفین، نیتریک اکساید

مقدمه

نیتریک اکساید سینتاز (Nitric Oxide Synthase) است اولین بار در ماکروفاژها و سلول های اندوتلیال پستانداران شرح داده شد و امروزه لااقل سه ایزوفرم اصلی (NOS_1 , NOS_2 , NOS_3) از آن در پستانداران معرفی شده است [۳، ۱۷]. اما در رابطه با این مولکول سیگنال و نقش آن در بروز اثرات دارویی مرفین در جانوران بی مهره شواهد کافی در دست نیست. از جمله محدود شواهد موجود می توان به تأثیر مرفین در تولید NO در *Ascaris suum* (نوعی نماتد) اشاره کرد [۲۵] و نیز مطالعاتی برای معرفی روند انتقال سیگنال مرفین و

نیتریک اکساید (Nitric Oxide) مولکول کوچک و گازی شکل است که در انجام بسیاری از فرایندها مشارکت می کند. اهمیت این عامل در القای اثرات مرفین در مدل های حیوانی نشان داده شده است [۱۲]. مسئول بیوستنزی این عامل آنزیم

karami@shahed.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

آبگیرهای کم عمق و آبگاه‌ها جمع آوری و با کشت طبیعی (خیسانده یونجه) در آزمایشگاه نگه داری و تأیید گونه ای شد [۱۰، ۱۱].

به منظور کشت و پرورش حیوان در آزمایشگاه ابتدا مقداری یونجه خشک (۵ گرم) را در ۵۰۰ میلی لیتر آب به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و مخلوط را پس از خنک شدن در شیشه درب دار در دمای 4°C (به عنوان محیط غذایی پایه) نگه داشت. برای تهیه محیط کشت طبیعی به ازای هر 200 ml آب ۲۰ میلی لیتر از محیط مغذی یونجه اضافه شد، سپس تک یاخته مورد نظر با کمک پیپت به این محیط تلقیح گردید. در نهایت هر ۷۲ ساعت یک بار، پاساژ کشت تک یاخته مورد نظر از محیط قبلی به محیط تازه انجام گرفت و این عمل تا آنجا که کشت نسبتاً خالصی از تک یاخته مورد نظر تهیه شود، تکرار گردید. سرانجام فرایند کشت دادن در محیط مصنوعی به اجرا درآمد [۱۱].

برای تهیه محیط کشت مصنوعی 2 g پودر مخمر در یک لیتر آب مقطر حل و حاصل پس از اتوکلاو در دمای 4°C نگه داری شد. به منظور تهیه محیط کشت حاوی تک یاخته مورد نظر، به ازای هر 60 ml از این محیط که در پتری دیش استریل اضافه می‌شد، تعدادی میکروارگانیسم از محیط کشت طبیعی به کمک پیپت به این محیط تلقیح شد. در نهایت هر ۷۲ ساعت یک بار، پاساژ کشت از محیط قبلی به محیط تازه، انجام شد و این عمل تا زمانی که مطالعات رفتاری و سیتو شیمیایی به پایان برسد، ادامه پیدا کرد.

pH بهینه برای رشد سلول های *P. caudatum* در محدوده 6.8 ± 0.2 می‌باشد. برای تنظیم pH در این محدوده از محلول‌های استیک اسید و سود ۰/۱ نرمال استفاده شد [۱۱]. همچنین دمای بهینه برای رشد سلول‌های *P. caudatum* در محدوده 32 ± 2 درجه سانتیگراد می‌باشد [۱۴]، جهت تنظیم دما، محیط کشت حاوی *P. caudatum* در شرایط آزمایشگاه تحت دمای 32 ± 2 درجه سانتیگراد نگه داری شد و مطالعات رفتاری در همین محدوده دمایی به انجام رسید.

مواد مورد استفاده عبارتند از: Morphine sulphate (خریداری شده از شرکت تماد با مجوز رسمی از وزارت بهداشت)، L-arginine (از شرکت Sigma-USA)، N^{G} -nitro-L-Arginine methyl ester) L-NAME از شرکت

β -اندورفین در تعدادی حیوان تک یاخته ای مژه دار مانند *Paramecium*, *Stentor* و *Tetrahymena* انجام گرفته است که برهمکنش این مواد را با رسپتورهای اپیوئیدی و G-پروتئین‌ها در سطح این مدل‌های سلولی نشان می‌دهد [۱۵، ۱۶]. اما از آنجا که شناخت مولکول‌های هدف مواد اپیوئیدی مانند مرفین در سطح سلولی دارای کاربردهای بسیار مهم فارماکولوژیک است که به گستردگی عملی استفاده داروئی این مواد در حیوانات و انسان می‌انجامد هرگونه مطالعه در سطح سلولی و مولکولی باعث روشن تر شدن جریان‌ات بیوشیمیایی مداخله کننده در بیان تأثیرات داروئی این مواد و صرفه بهداشتی-اقتصادی خواهد شد. با گستردگی عمل NO در سلسله جانوری، دور از انتظار نخواهد بود اگر عامل مذکور در تک یاختگان نیز عملکرد مؤثر و مشابه با آنچه در حیوانات عالی تر و حتی انسان گزارش گردیده است در تمامی فرآیندهای حیاتی از جمله اثرات داروئی مرفین داشته باشد، زیرا در *P. caudatum* بیومولکول‌های هدف NO مانند گوانیلیل سیکلاز [۱۳]، کانال پتاسیم و کانال کلسیمی دریچه دار وابسته به ولتاژ [۹، ۱۹، ۲۰، ۲۲]، کالمودولین [۴] (یکی از پروتئین‌های لازم برای فعالیت آنزیم NOS) و یک پروتئین با وزن 155kDa [۱۴] که بسیار شبیه به آنزیم NOS_1 پستانداران می‌باشد به دست آمده است. قدرت داروئی (Drug Potency) مواد مخدر مانند مرفین یکی از مشخصه‌های بارز فارماکودینامیک برای معرفی پاسخ موجود زنده به این مواد است [۱۰، ۲۱] در حالیکه ساز و کارهای سیتو شیمیایی این جریان به وضوح تبیین نشده است تنها به دخالت بعضی مولکول‌ها از جمله NO در این روند استناد شده است همچنانکه پاسخ ضد دردی مواد اپیوئیدی (به ویژه مرفین) و نیز جریان‌ات یادگیری و حافظه را در مهره داران به سیستم نتریک ارژیک نیز منتسب می‌دانند [۵، ۱۲، ۱۸، ۲۴]. بنابراین مطالعه پاسخ مرفین در بی مهرگان، به ویژه مدل‌های حیوانی تک یاخته ای مانند *Paramecium caudatum* می‌تواند به شناخت پایه‌های زیستی اثرات مواد مخدر و در راس آن‌ها مرفین بیانجامد.

مواد و روش‌ها

P. caudatum از ایستگاه‌های آب شیرین موقت، از جمله

Naloxone (Biochemical Research Inc., -USA hydrochloride (از شرکت تولید دارو).

برای تلقیح دارو به محیط کشت نمونه تک یاخته‌ای و تهیه دوزهای مشخصی از داروها، این مواد با ترازوی دقیق توزین و در آب مقطر به صورت محلول تهیه گردیده و در نهایت در حجم یک میکرولیتر توسط سرنگ همیلتون تلقیح شد. قبل از هر بار تلقیح داروئی، ابتدا ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی سلول‌های *P. caudatum* به درون لام استاندارد و مخصوص شمارش سدویک-رافتر (Sedgwick-Rafter Counting Chamber) انتقال داده شد، طوریکه تراکم سلول‌های *P. caudatum* در درون لام برابر با ۲۵۰ paramecia/ml و دمای محیط در زمان مطالعات رفتاری $22 \pm 3^\circ\text{C}$ و دمای سانتیگراد و $6/8 \pm 0/2^\circ\text{C}$ باشد [۱۴]. قبل از تلقیح ابتدا یک دقیقه فرصت داده شد تا سلول‌های *P. caudatum* با مکان جدید (لام سدویک) سازگار شوند. سپس مواد فوق‌الذکر در نقطه مشخصی از لام سدویک (که در زیر لنز ۴ (تحت 4X) میکروسکوپ نوری تنظیم شده بود) تلقیح و رفتار سلول‌های *P. caudatum* در نقطه تلقیح از طریق لنز ۴ میکروسکوپ نوری (4X) مشاهده و بررسی گردید.

به منظور بررسی رفتار جانور تک یاخته‌ای پس از تلقیح رفتار این حیوان از طریق شمارش تعداد سلول‌های *P. caudatum* در نقطه تلقیح درون لام استاندارد سدویک-رافتر طی فواصل زمانی ۰، ۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰" از طریق میدان دید لنز ۴ (تحت 4X) میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت و محاسبات مربوطه ثبت گردید، لازم به ذکر است که تزریق هر دوز مشخص از دارو یا مواد مورد نظر حداقل ۵ بار تکرار شد.

در کنار مطالعات رفتاری و جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها مطالعات سیتوشیمیایی با روش سیتوشیمیایی NADPH-diaphorase [۱،۲۳] برای بررسی تداخل سیستم NO با مرفین، انجام شد:

به منظور اجرای مراحل تکنیک NADPH-diaphorase هر نمونه (Sample) از سلول‌های *P. caudatum* را که قبلاً تحت تلقیح دوزهای مشخصی از مواد قرار گرفته بودند، بر روی سطح لام‌های تمیزی منتقل، دقایقی در هوای آزمایشگاه خشک و فیکس گردید و سپس بر روی لام‌های فیکس شده،

عملیات زیر، مرحله به مرحله و بلافاصله به اجرا در آمد.
۱- آبدهی: با شستشو در درجات نزولی الکل از 96° تا 50° هریک به مدت ۳ ثانیه و سپس شستشو در آب به مدت ۱۰ ثانیه.

۲- رنگ آمیزی اختصاصی: برای رنگ آمیزی اختصاصی سیتوشیمیایی NADPH-d بر روی هر نمونه لام فیکس شده به نسبت مساوی از محلول‌های NADPH (۱mg/ml) در بافر فسفات)، و 0.2 mg/ml از Nitro Blue N.B.T (Tetrazolium) در بافر فسفات اضافه شد (بافر فسفات به عنوان حلال تحت $\text{pH}=7$ استفاده شد). به این ترکیب چند قطره Triton-x-100 (به عنوان Detergent مواد و رنگ‌های اضافی) که به کمک بافر رقیق شده بود (۳٪) اضافه گردید، و هر لام به مدت چند ثانیه تکان داده شد تا برای مراحل بعدی آماده شود.

۳- انکوباسیون تحت دمای 40°C : هر یک از لام‌های فیکس شده که با روش فوق تحت رنگ آمیزی اختصاصی سیتوشیمیایی NADPH-d واقع شد، در بنماری 40°C به مدت ۳۰ دقیقه نگه داری گردید. سپس نمونه از بنماری خارج شده، جهت شستشوی رنگ، نمونه از آب مقطر سریعاً عبور داده و برای مرحله بعد آماده شد

۴- آب گیری با درجات افزایشی الکل از 50° تا 96° هر یک به مدت ۳ ثانیه.

۵- شفاف سازی با دو تعویض گزلیل هریک به مدت ۱۵ ثانیه.

۶- چسباندن (Mounting): در نهایت هر نمونه لام به کمک چسب انتلان (Entellan) خریداری شده از شرکت Merck چسبانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری اولیه با استفاده از آزمون K.S. (Kolmogorov Smirnov) مشخص کرد که داده‌ها دارای توزیع نرمال هستند. سپس با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه در محیط نرم افزار آماری SPSS، معنی دار بودن اختلافات گروه‌های تحت آزمایش نسبت به کنترل نشان داده شد. در ادامه به منظور بررسی اختلافات بین گروه‌ها، با تست‌های Post-hoc (LSD و Tukey HSD) محاسبات بیشتر انجام شد. اختلاف داده‌های (اعداد) ثانیه شصتم پس از تزریق دوزهای مختلف به داده‌های ثانیه پنجم به

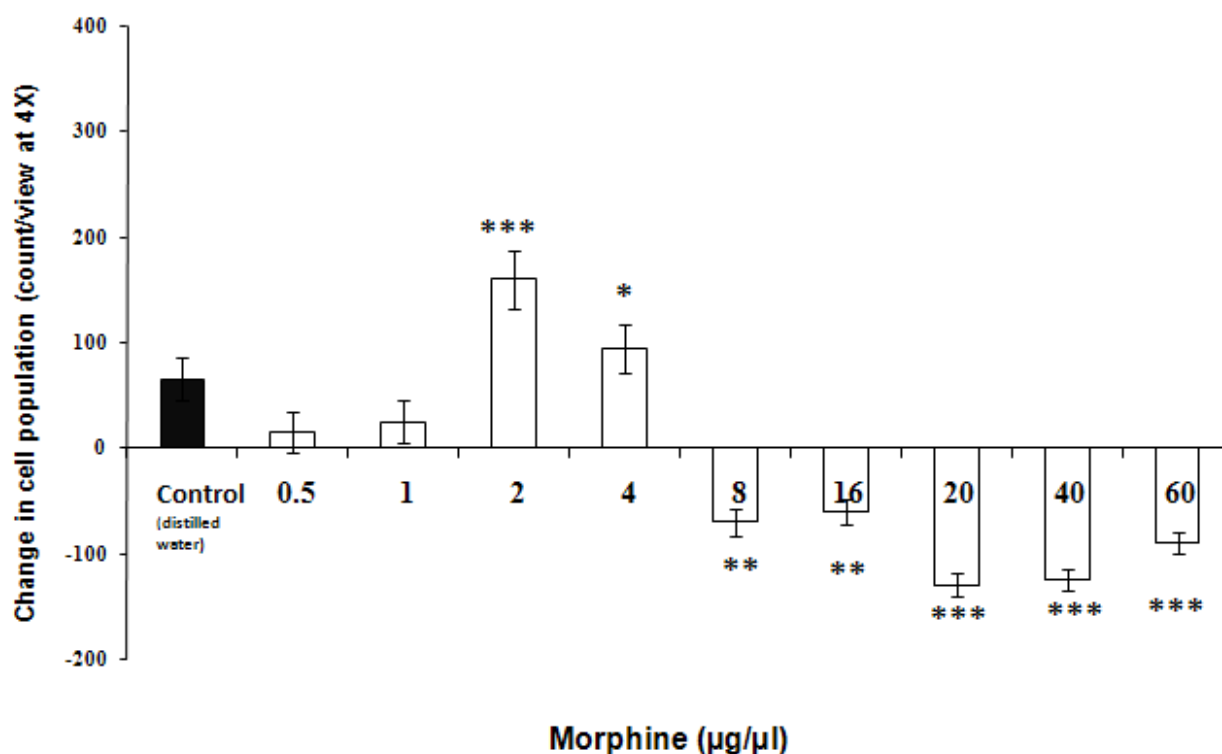
صورت حسابی (اختلاف تعداد) محاسبه و به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نمایش داده شد. ضریب آلفا $\alpha=0.05$ در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی داده های مربوط به تکنیک سیتوشیمیایی NADPH-d با استفاده از نرم افزار Image Tool از هر نمونه لام عکس برداری به عمل آمد، و عکس ها در محیط این نرم افزار تحت کالیبراسیون در مساحت های ۱۰۰ میکرومتری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

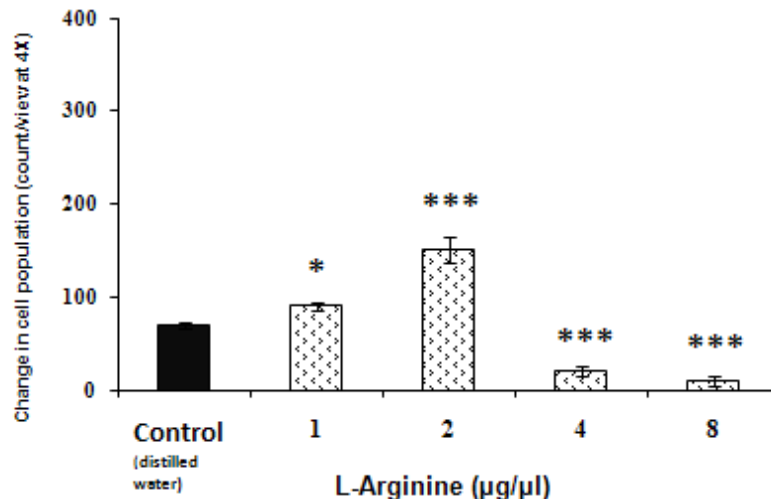
بر اساس مشاهدات رفتاری مربوط به زمان های مختلف ۰، ۵"، ۱۵"، ۳۰"، ۶۰"، ۱۲۰" و ۱۸۰" (Time interval)، اختلاف تعداد سلول ها در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم مبنای پاسخ رفتاری سلول های *P. caudatum* به داروها در نظر گرفته شد (پنج ثانیه اول به عنوان زمان آشنایی و سازگاری حیوانات در مواجهه با ماده تلقیح شده و برقراری

گرادیان غلظت ماده مذکور در نظر گرفته شد). پاسخ Morphine: شکل ۱ نشان دهنده پاسخ مرفین در *P. caudatum* است. داده ها با آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که با توجه به نتیجه آزمون: ($F(9,30) = 97.813, p < 0.001$) اختلافات گروه ها با کنترل کاملاً معنی دار است. آنالیز بیشتر با آزمون های Post hoc نشان می دهد که مرفین در دوز ۲ μg نسبت به سایر دوزها بیشترین افزایش را در تعداد سلول ها دارد.

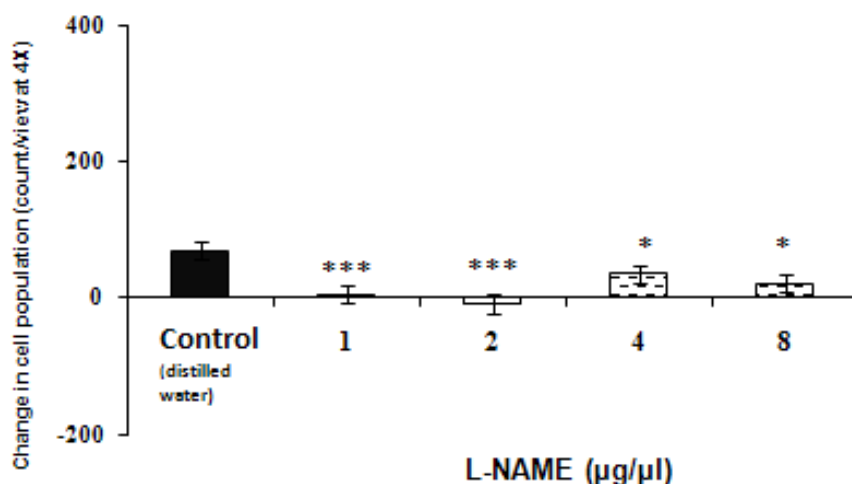
پاسخ ال-آرژینین (L-Arginine): شکل ۲ نشان دهنده تاثیر دوزهای مختلف L-arginine (۱، ۲، ۴، ۸، $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ بر حسب $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) به تنهایی بر سلول های *P. caudatum* در مقایسه با کنترل است. اختلاف تعداد سلول ها در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم، تحت 4X از میکروسکوپ نوری بارها محاسبه و داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نمایش داده شده اند. نتیجه آنالیز داده ها با آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA): ($F(4,19) = 140.699, p < 0.001$) نشان



شکل ۱- نمودار دوز- پاسخ مرفین در حیوان تک یاخته ای است دوزهای مختلف مرفین (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۰، ۴۰، ۶۰ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) مطابق دستورالعمل مندرج در متن به حیوانات تجویز و در فواصل زمانی ۰ تا ۱۸۰ ثانیه رفتار آن ها به واسطه شمارش سلولی نسبت به کنترل که آب مقطر بود ثبت گردید. داده ها به صورت میانگین $\pm$ SEM اختلاف تعداد سلول های *P. caudatum* در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم (مطابق با مندرجات بخش روش ها)، تحت 4X از میکروسکوپ نوری ارائه شده است. با آنالیز Post hoc اختلافات نسبت به کنترل $p < 0.001$ و $p < 0.01$ و $p < 0.05$ می باشد.



شکل ۲- پاسخ ال-آرژینین را به تنهائی در حیوان تک یاخته ای نشان می دهد. عامل (۴،۸،۱۰،۲۰ برحسب µg/µl) مطابق دستورالعمل مندرج در متن به حیوانات تجویز و در فواصل زمانی ۰ تا ۱۸۰ ثانیه رفتار آن ها به واسطه شمارش سلولی نسبت به کنترل که آب مقطر بود ثبت گردید. داده ها به صورت میانگین $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ اختلاف تعداد سلول های *P. caudatum* در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم (مطابق با مندرجات بخش روش ها)، تحت 4X از میکروسکوپ نوری ارائه شده است. با آنالیز Post hoc اختلافات نسبت به کنترل $p < 0.001$ *** و $p < 0.05$ * می باشد.

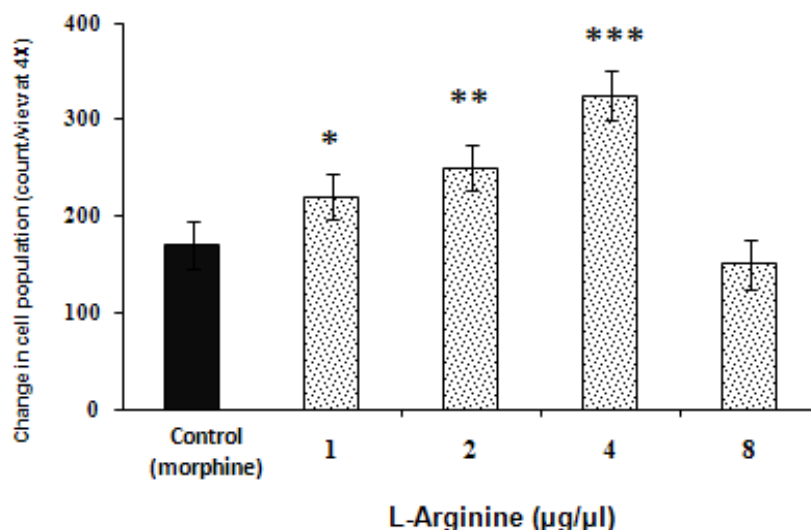


شکل ۳- پاسخ L-NAME را به تنهائی در حیوان تک یاخته ای نشان می دهد. عامل (۱،۲،۴،۸ µg/µl) مطابق دستورالعمل مندرج در متن به حیوانات تجویز و در فواصل زمانی ۰ تا ۱۸۰ ثانیه رفتار حیوانات به واسطه شمارش سلولی نسبت به کنترل (آب مقطر) ثبت گردید. داده ها به صورت میانگین $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ اختلاف تعداد سلول های *P. caudatum* در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم (مطابق با مندرجات بخش روش ها)، تحت 4X از میکروسکوپ نوری ارائه شده است. با آنالیز Post hoc اختلافات نسبت به کنترل $p < 0.001$ *** و $p < 0.05$ * داده شد.

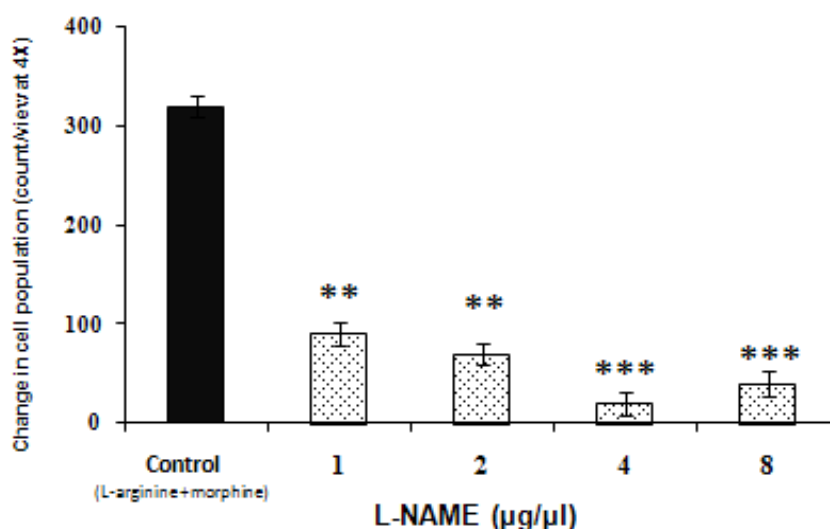
پنجم، تحت 4X از میکروسکوپ نوری بارها محاسبه شد و میانگین داده ها $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید. گروه کنترل فقط آب مقطر را دریافت کرد. داده ها با آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، که با توجه به نتیجه آزمون: $F(4,19)=48.905$, $p < 0.001$) اختلاف گروه ها با کنترل کاملاً معنی دار می باشد. آنالیز بیشتر حاکی است که دوز 2 µg L-NAME بیشترین کاهش تعداد سلول های *P. caudatum* را به دنبال داشته است.

می دهد که اختلاف گروه ها با کنترل کاملاً معنی دار است. از آنالیز های Post hoc مشخص گردید که دوز 2 µg L-arg نسبت به سایر دوزهای L-arg بیشترین افزایش را در تعداد سلول های *P. caudatum* به دنبال داشته است.

پاسخ L-NAME: شکل ۳ پاسخ L-NAME را به تنهائی نشان می دهد. دوزهای مختلف L-NAME (۱،۲،۴،۸ µg/µl) به حیوانات تجویز و اختلاف تعداد سلول های *P. caudatum* در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه



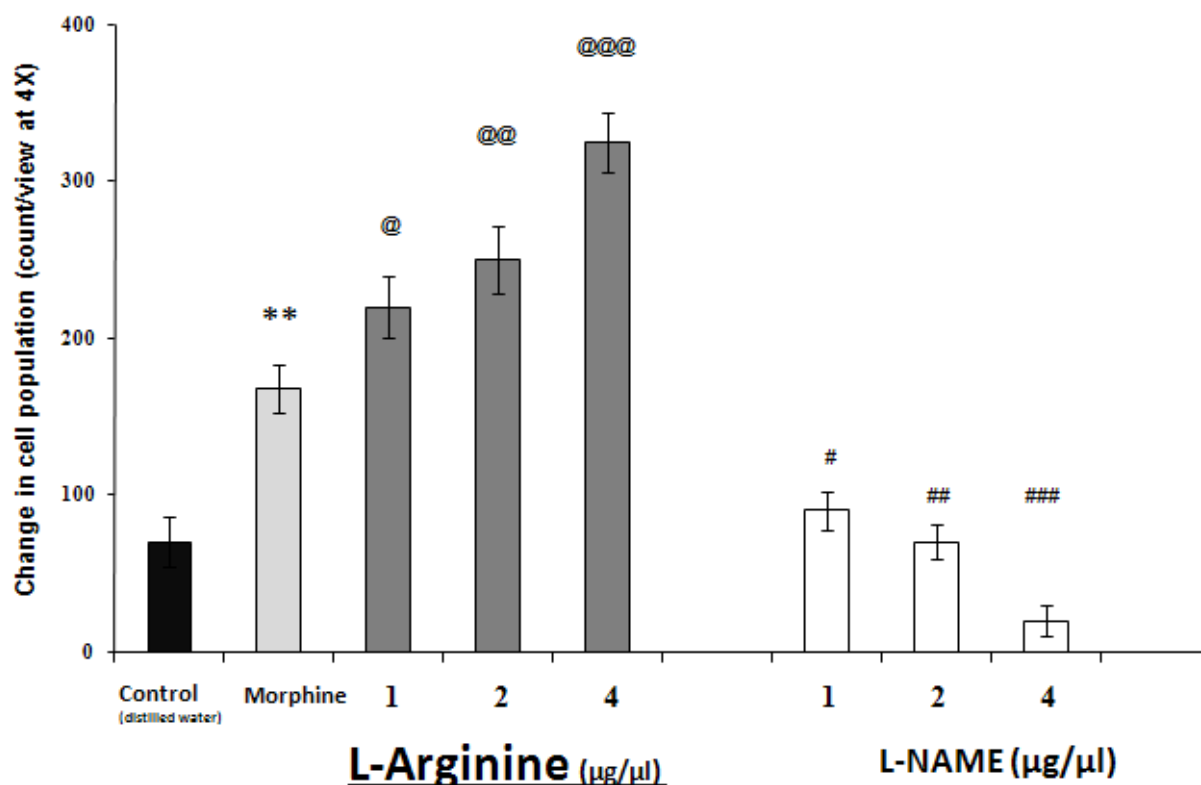
شکل ۴- پاسخ ال-آرژنین را همراه با مرفین در حیوان تک یاخته ای نشان می دهد. عامل سیستم نیتریک اکساید ($4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) مطابق دستورالعمل مندرج در متن مقدم بر دوز موثر مرفین ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) به حیوانات تجویز و در فواصل زمانی ۰ تا ۱۸۰ ثانیه رفتار آن ها به واسطه شمارش سلولی نسبت به کنترل که فقط مرفین ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) بود ثبت گردید. داده ها به صورت میانگین $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ اختلاف تعداد سلول های *P. caudatum* در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم (مطابق با مندرجات بخش روش ها)، تحت 4X از میکروسکوپ نوری ارائه شده است. با آنالیز Post hoc اختلافات نسبت به کنترل $p < 0.001$ *** و $p < 0.01$ ** و $p < 0.05$ * می باشد.



شکل ۵- پاسخ L-NAME را همراه با ال-آرژنین و مرفین در حیوان تک یاخته ای نشان می دهد. عامل سیستم نیتریک اکساید ($8-1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) مطابق دستورالعمل مندرج در متن مقدم بر دوز موثر ال-آرژنین ($4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) و این عامل اخیر مقدم بر مرفین ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) به حیوانات تجویز و در فواصل زمانی ۰ تا ۱۸۰ ثانیه رفتار آن ها به واسطه شمارش سلولی نسبت به کنترل که فقط مرفین ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) بود ثبت گردید. داده ها به صورت میانگین $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ اختلاف تعداد سلول های *P. caudatum* در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم (مطابق با مندرجات بخش روش ها)، تحت 4X از میکروسکوپ نوری ارائه شده است. با آنالیز Post hoc اختلافات نسبت به کنترل مثبت $p < 0.001$ *** و $p < 0.01$ ** می باشد.

کردند. داده ها حاصل تکرار مکرر آزمایش و محاسبه میانگین $\pm$ انحراف معیار است. آنالیز واریانس (ANOVA) این داده ها اختلاف کاملاً معنی دار را نشان می دهد: $F(4,15)=76.786$ ، $p < 0.001$ می باشد. آنالیز بیشتر حاکی است که دوز $4 \mu\text{g}$ L-arg (نسبت به سایر دوزهای L-Arg) به همراه دوز $2 \mu\text{g}$ Morphine بیشترین افزایش را در تعداد سلول های

پاسخ مشترک مرفین و ال-آرژنین ($2 \mu\text{g}$ L-arg+Morphine) شکل ۴ پاسخ مشترک مرفین و ال-آرژنین را نشان می دهد. محور افقی نشان دهنده دوزهای مختلف L-arg+ $2 \mu\text{g}$ Morphine (۸،۴،۲،۱ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) بر حسب $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ می باشد که نسبت به کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند. کنترل مذکور را نمونه هائی تشکیل دادند که تنها دوز موثر مرفین را دریافت



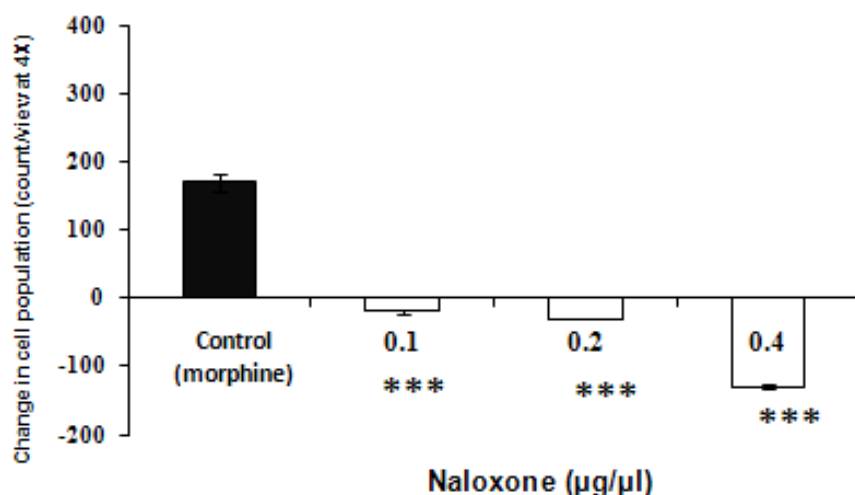
شکل ۶- پاسخ ال-آرژینین و یا پاسخ ترکیبی ال-آرژینین و L-NAME را همراه با مرفین در حیوان تک یاخته ای نشان می دهد. عامل پیش ساز (ال-آرژینین) (۴ μg/μl) یا به تنهایی مقدم بر دوز موثر مرفین (۲ μg/μl) تجویز شد و یا مهار کننده سیستم نیتریک اکساید (۱-۸ μg/μl) مطابق دستورالعمل مندرج در متن مقدم بر دوز موثر ال-آرژینین (۴ μg/μl) و این عامل اخیر مقدم بر مرفین (۲ μg/μl) به حیوانات تجویز و در فواصل زمانی ۰ تا ۱۸۰ ثانیه رفتار آن ها به واسطه شمارش سلولی نسبت به کنترل های منفی (فقط آب مقطر) و مثبت (مرفین ۲ μg/μl) ثبت گردید. داده ها به صورت میانگین Mean±SEM اختلاف تعداد سلول های *P. caudatum* در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم (مطابق با مندرجات بخش روش ها)، تحت 4X از میکروسکوپ نوری ارائه شده است. با آنالیز Post hoc اختلافات نسبت به کنترل مثبت *** p<0.001 و * p<0.05 و ** p<0.01 می باشد.

P. caudatum به دنبال داشته است.

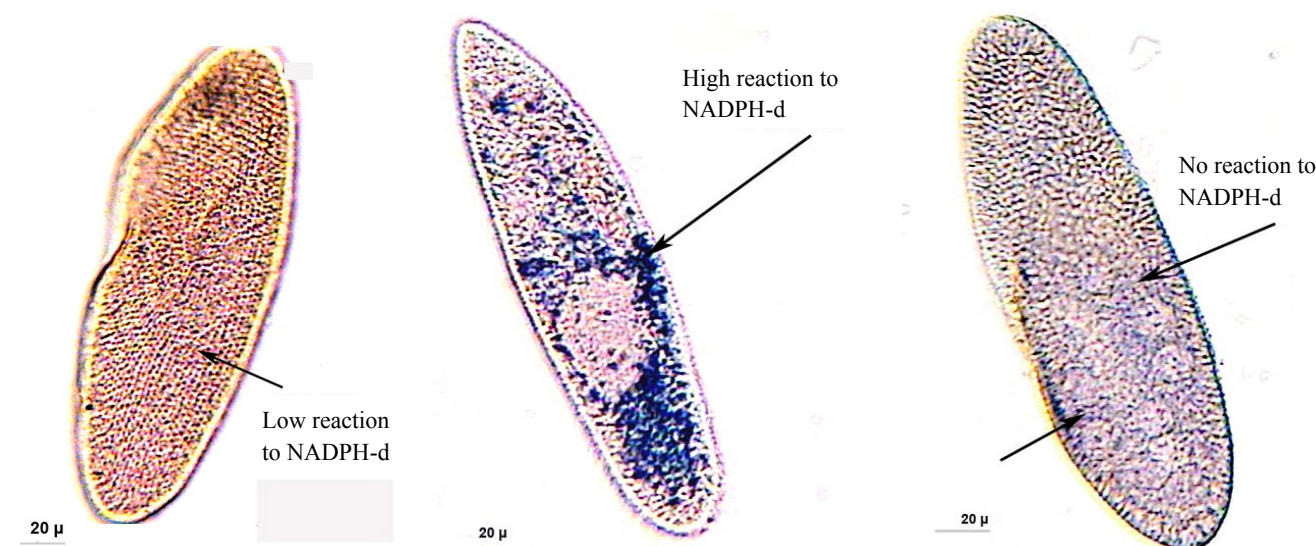
پاسخ مشترک L-NAME+L-Arginine+Morphine: شکل ۵ این پاسخ را نشان می دهد. محور افقی نشان دهنده دوزهای مختلف L-NAME (۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ μg/μl) است که مقدم بر 4 μg L-arg و آن مقدم بر 2 μg Morphine تجویز شد. پس از محاسبه داده ها مطابق قسمت های دیگر داده ها با آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، که با توجه به نتیجه آزمون: (F(4,19)=1.037, p<0.001) اختلاف گروه ها با کنترل که منهای L-NAME است کاملاً معنی دار می باشد. در دوز 4 μg L-NAME نسبت به سایر دوزها بیشترین کاهش در تعداد سلول های *P. caudatum* رخ داده است. به منظور مقایسه اثرات تقویتی ال-آرژینین بر پاسخ مرفین و اینکه این اثرات به واسطه نیتریک اکساید و نه ال-آرژینین است پاسخ ترکیبی

عامل مهار کننده آنزیم مولد نیتریک اکساید و پیش ساز این مولکول (نیتریک اکساید) در حیوانات در شکل ۶ نمایش داده شده است. همانگونه که این تصویر نشان می دهد با مهار آنزیم اثرات تقویتی متوقف شد که این امر بر مشارکت نیتریک اکساید در پاسخ تقویت شده دلالت دارد.

پاسخ مشترک مرفین و نالوکسون: (Naloxone+Morphine) شکل ۷ این پاسخ را نشان می دهد. محور افقی نشان دهنده آن است که دوزهای مختلف Naloxone (۰/۴، ۰/۲، ۰/۱، برحسب μg/μl) مقدم بر دوز موثر مرفین ۲ μg/μl تجویز شده است و داده ها با آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، که با توجه به نتیجه آزمون (F(4,19)=400.856, p<0.001) اختلاف گروه ها با کنترل کاملاً معنی دار می باشد. نمونه کنترل را مرفین ۲ μg/μl تشکیل می دهد. آزمون های



شکل ۷- پاسخ نالوکسون را همراه با مرفین در حیوان تک یاخته ای نشان می دهد. عامل رقابتی ($0.1-0.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) مطابق دستورالعمل مندرج در متن مقدم بر دوز موثر مرفین ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) به حیوانات تجویز و در فواصل زمانی ۰ تا ۱۸۰ ثانیه رفتار آن ها به واسطه شمارش سلولی نسبت به کنترل که فقط مرفین ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) بود ثبت گردید. داده ها به صورت میانگین $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ اختلاف تعداد سلول های *P. caudatum* در ثانیه شصتم پس از تلقیح نسبت به ثانیه پنجم (مطابق با مندرجات بخش روش ها)، تحت 4X از میکروسکوپ نوری ارائه شده است. با آنالیز Post hoc اختلافات نسبت به کنترل مثبت $p < 0.001$ *** می باشد.



8A

8B

8C

شکل ۸- این شکل شواهد سیتولوژیک را با استفاده از روش سیتوشیمیایی NADPH-diaphorase برای نشان دادن فعالیت سیستم NO در سلول های *P. caudatum* نشان می دهد. با این روش تحت شرایط مختلف: A: دوز موثر مرفین به تنهایی B: دوز موثر مرفین همراه با ال-آرژینین و C: دوز موثر مرفین همراه ال-آرژینین و L-NAME، میزان و شدت رنگ آبی تولید شده که شاخصی از میزان فعالیت سیستم NO (فعالیت آنزیم NOS) می باشد، تغییر کرده است. پیکان ها موقعیت واکنش NADPH-diaphorase را نشان می دهند.

فعالیت سیستم NO در سلول های *P. caudatum* نشان داده شد. شواهد به دست آمده با این روش سیتوشیمیایی مشخص کننده آن است که تحت شرایط مختلف میزان و شدت رنگ آبی تولید شده، شاخصی از میزان فعالیت سیستم NO (فعالیت

بیشتر مشخص کرد که اثر مهارى Naloxone بر قدرت مرفین (Morphine Potency) با افزایش غلظت (دوز) بیشتر می شود. علاوه بر شواهد رفتاری با استفاده از روش سیتوشیمیایی NADPH-diaphorase (مندرج در قسمت مواد و روش ها)

یافته می تواند بیانگر این امر باشد که وجود سیستم NO در سلول های *P. caudatum* بسیار محتمل است. در تأیید این احتمال می توان به پاسخ منفی این سلول ها به ماده L-NAME اشاره کرد که L-NAME به عنوان یکی از مهار کننده های اصلی سیستم NO [۶] با مهار این سیستم در درون سلول می تواند عامل دفع *P. caudatum* در نقطه تلقیح باشد. در تلقیح مشترک مرفین با هر یک از مواد L-arginine، NAME و Naloxone، همانگونه که در بخش نتایج ذکر شد، می توان به نکات جالبی اشاره کرد، به طور مثال در تلقیح مشترک مرفین و ال-آرژنین، یافته ها در سطح رفتاری و فارماکولوژیک بیانگر تأثیر مثبت و قابل توجه ال-آرژنیندر افزایش قدرت مرفین (Morphine Potency) می باشد، به طوریکه پاسخ ایجاد شده در دوز مؤثر $2 \mu\text{g L-arg} + 4 \mu\text{g Morphine}$ بسیار بیشتر از دوز مؤثر مرفین ($2 \mu\text{g Morphine}$ به تنهایی (حالت کنترل) می باشد، و اما در سطح ملکولی با توجه به تأثیر ال-آرژنین (به عنوان یکی از اجزای اصلی سیستم NO) در تولید NO نتیجه می شود که وجود سیستم NO در سلول های *P. caudatum* بسیار محتمل می باشد. در ضمن احتمالاً سیستم سیگنالینگ NO در تداخل مثبت با مرفین (Morphine Potency) است، چرا که به دنبال تأثیر ال-آرژنین و تولید NO، قدرت مرفین در ایجاد پاسخ مثبت توسط سلول های *P. caudatum* بسیار بیشتر از قدرت مرفین بدون تزریق ال-آرژنین (حالت کنترل) می باشد. همچنین در تلقیح مشترک مرفین، ال-آرژنین و L-NAME یافته ها دال بر تأیید مباحث فوق می باشد، این یافته ها در سطح رفتاری و فارماکولوژیک بیانگر تأثیر مهاری L-NAME بر سیستم NO و به دنبال آن کاهش قدرت مرفین (Morphine Potency) می باشد، به طوریکه در دوز مؤثر $2 \mu\text{g Morphine} + 4 \mu\text{g L-NAME}$ به حالت کنترل ($2 \mu\text{g Morphine} + 4 \mu\text{g L-arg}$) پاسخ ایجاد شده شدیداً کاهش یافته است. اما در سطح ملکولی، تأکید مجددی بر وجود سیستم NO و تداخل مثبت این سیستم با مرفین می باشد و در نهایت، پاسخ منفی سلول های *P. caudatum* به Naloxone می تواند در بر دارنده اطلاعات بیشتری در مورد وجود رسپتورهای اپیوئیدی در این جانوران تک یاخته ای باشد.

آنزیم NOS بوده و با نمونه شاهد تفاوت داشته است، که با آنالیز داده ها تغییر فعالیت آنزیم NOS نشان داده شده است (شکل ۸).

بحث

مرفین سلول های *P. caudatum* را مجتمع کرد و ال-آرژنین بر این پاسخ، تأثیر مثبت و تقویتی نشان داد، در مقابل شدت پاسخ در این جانوران با پیش تجویز Naloxone (به عنوان مهارگر سیستم اپیوئیدی [۷] و L-NAME (به عنوان مهارگر سیستم NO [۶] کاهش یافت، همچنین این جانوران در حالت کنترل (بدون تلقیح هر گونه ماده ای) نیز تجمع کم تری از خود نشان دادند، که این مساله می تواند به علت حفظ تعادل دمایی بدن جانور باشد. چرا که این جانوران تک یاخته ای برای تنظیم گرمای بدن خود، سعی در تجمع در یک نقطه را دارند [۱۴]، و اما در پاسخ مرفین، می توان به طور کلی در سطح رفتاری و فارماکولوژیک نتیجه گرفت که سلول های *P. caudatum* نسبت به دوزهای مختلف مرفین پاسخ های متفاوتی از خود نشان می دهند، به طوری که در دوز $2 \mu\text{g}$ مرفین حداکثر قدرت مرفین (Morphine potency) در ایجاد تجمع سلول های *P. caudatum* رخ داده است، در حالی که در دوزهای بالاتر مرفین (۸ و ۱۶ و ۲۰ و ۴۰ و ۶۰ میکروگرم) پاسخ منفی است، و کاهش شدید تعداد سلول های *P. caudatum* و در نتیجه کاهش قدرت مرفین (Morphine potency) مشاهده می شود. این امر نشان دهنده پاسخ وابسته به دوز بوده و بروز تعدادی از اثرات جانبی را توسط دارو منعکس می کند [۲۱]. این یافته در سطح ملکولی به طور کلی بیانگر وجود سیستم سیگنالینگ مرفین (رسپتورها و ملکول های سیگنالینگ) در سلول های *P. caudatum* می باشد که در توضیح پاسخ Naloxone ذیلاً در مورد آن بیشتر بحث خواهد شد. و اما در توجیح پاسخ ال-آرژنین یافته ها در سطح رفتاری بیانگر این است که سلول های *P. caudatum* نسبت به ال-آرژنین پاسخ مثبتی از خود نشان می دهند یعنی ال-آرژنین به عنوان یکی از اجزای اصلی سیستم نیتریک اکساید [۸]، با تولید NO در درون سلول می تواند عامل جذب سلول های *P. caudatum* در نقطه تلقیح باشد، و اما در سطح ملکولی این

آن با مرفین تاثیر این ماده مخدر همراه با ال-آرژنین در تشدید فعالیت آنزیم NOS قابل مشاهده می‌باشد (شکل B ۸). در تائید این یافته می‌توان به نتایج بررسی سیتولوژیک در نمونه هائی که با پیش تجویز مهار گر آنزیم مذکور مواجه بودند اشاره کرد که در این شرایط شدت فعالیت آنزیم نسبت به تیمار مشترک مرفین و ال-آرژنین به طور معنی دار کاهش نشان داد (شکل C ۸).

با توجه به اطلاعات بدست آمده در بخش نتایج، سلولهای *P. caudatum* در دوز های مشخصی به مرفین پاسخ مثبت می دهند (نمودار دوز- پاسخ مرفین)، و این پاسخ مثبت در دوز های مشخصی از ال-آرژنین همراه با مرفین افزایش یافته و تقویت می شود (نمودار دوز- پاسخ Morphine + ال-آرژنین). این اثر افزایشی و تقویت کننده ال-آرژنین در پاسخ به مرفین می تواند از نظر بهداشتی و کلینیک بسیار حائز اهمیت باشد، چرا که اگر بتوان در بیماران تحت درمان با مرفین با استفاده همزمان مرفین و ال-آرژنین دوز مؤثر مرفین را کاهش داد، این مسئله (کاهش دوز مؤثر مرفین) می تواند در راستای کاهش اثرات جانبی مرفین از قبیل وابستگی (Dependence) و اعتیاد (Addiction) و همچنین مباحث مربوط به اقتصاد دارویی (Pharmacoeconomic) گام مؤثری تلقی شود. از این رو مطالعه تکمیلی بر روی این مدل حیوانی به منظور بهره برداری دقیق از یافته های این پژوهش و تعمیم یافته های حاصل به انواع مهره دار و حتی انسان مورد پیشنهاد است چرا که این حیوانات نه تنها با توجه به اساس سلولی حیات پایه های قابلیت های زیستی را نمایان می کنند بلکه به دلیل برخورداری از توازن فیزیولوژیک در سطح یک سلول در نوع خود بسیار پیچیده و منحصر به فرد و از نظر مطالعاتی فوق العاده جالب هستند.

سیاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه شاهد انجام شده است و از این رو مولفان از معاونت محترم پژوهشی دانشکده علوم پایه و دانشگاه سپاسگزارند.

با توجه به اینکه Naloxone به عنوان آنتاگونیست رقابتی (در برابر مرفین) برای تصاحب رسپتور μ عمل می کند [۷]، وجود رسپتور μ در *P. caudatum* بسیار محتمل می شود. از طرف دیگر می توان فرض کرد که قدرت مرفین (Morphine Potency) با عملکرد رسپتور μ رابطه تنگاتنگ و مستقیمی دارد [۲۱]. احتمالاً دوزهای ۰/۵ و ۱ میکروگرم مرفین (نمودار دوز- پاسخ مرفین)، کاهش در تعداد سلول های *P. caudatum* را به واسطه کافی نبودن غلظت (دوز) مرفین برای تحریک و فعال کردن رسپتورهای اپیویدی نشان دادند، که البته این مشکل غلظت (دوز) برای فعال کردن رسپتور μ در دوزهای ۲ و ۴ میکروگرم مرفین مرتفع شده است، به طوریکه بیشترین افزایش قدرت مرفین در دوز 2 μ g مرفین قابل مشاهده است. و اما در دوزهای ۸ و ۱۶ و ۲۰ و ۴۰ و ۶۰ میکروگرم مرفین می توان علت کاهش در تعداد سلول های *P. caudatum* (کاهش قدرت مرفین) نسبت به سایر دوزهای مرفین را در رابطه با تداخل عمل رسپتورهای اپیویدی (μ و δ و κ) با یکدیگر توجیه کرد [۲۱]، چراکه احتمالاً در غلظت های (دوزهای) بالای مرفین، علاوه بر رسپتور μ ، رسپتورهای دیگر (δ و κ) نیز تحریک و فعال می شوند، ولی از آنجاییکه سیگنالینگ که در اثر فعالیت یک رسپتور به راه می افتد، ممکن است سیگنالینگ رسپتور دیگر را مهار کند [۲، ۲۱]. می توان چنین در نظر گرفت که اولاً رسپتور μ تحریک پذیرتر از رسپتورهای δ و κ می باشد، که این مساله می تواند توجیه کننده حالت تقریباً سینوسی نمودار دوز- پاسخ مرفین (شکل ۱) باشد. دیگر اینکه عملکرد رسپتورهای δ و κ مانع اعمال اثر رسپتور μ می شود و در نتیجه کاهش قدرت مرفین (Morphine Potency) در دوزهای بالای مرفین (۸ و ۱۶ و ۲۰ و ۴۰ و ۶۰ میکروگرم) اتفاق می افتد.

در کلیه این جریانات دخالت سیستم نیتریک اکساید به واسطه مطالعه سیتولوژیک نیز بررسی گردید و نتایج با یافته های رفتاری و فارماکولوژیک تطابق نشان می دهد. بر اساس شواهد سیتولوژیک بدست آمده در حیوانات تحت تجویز مرفین شدت فعالیت این سیستم کم (شکل A ۸) ولی در تجویز مشترک با ال-آرژنین این شدت به طور معنی دار تشدید می یابد، این امر حاکی از آن است که این پیش ساز احتمالاً به عنوان محرکی موثر باعث تقویت فعالیت آنزیم مولد نیتریک اکساید شده است [۸]، و از آنجا به دلیل تداخل مثبت

References

- [1] Amaroli A, Ognibene M, Trielli F, Trombino S, Falugi C, Corrado MUD, Detection of NADPH-diaphorase activity in *Paramecium primaurelia*. *Eur J Protistol* 42 (2006) 201-8.
- [2] Bourne HR, Zastrow MV, Drug Receptor & Pharmacodynamics. In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. London: McGraw Hill, 2007, p. 11-33.
- [3] Bredt DS, Snyder SH, Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 682-5.
- [4] Chan CW, Saimi Y, Kung C, A new multigene family encoding calcium-dependent calmodulin-binding membrane proteins of *Paramecium tetraurelia*. *Gene* 231 (1999) 21-32.
- [5] Dambisya YM, Lee TL, Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. *Br J Pharmacol* 117 (5) (1996) 914-18.
- [6] Gammie SC, Dawson VL, Nelson RJ, Influence of Nitric Oxide on Neuroendocrine Function and Behavior. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric oxide, biology and pathobiology*. New York: Academic press, 2000, p. 429-39.
- [7] Gutstein HB, Akil H, Opioid Analgesics In: Brunton LL, editor. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basic of Therapeutics*. London: McGraw Hill, 21th ed. 2005, p.547-90.
- [8] Ignarro LJ, Introduction and Overview. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric oxide, biology and pathobiology*. New York: Academic press, 2000, p. 3-20.
- [9] Imada C, Oosawa Y, Thermoreception of *Paramecium*: different Ca^{2+} channels were activated by heating and cooling. *J Mem Biol* 168 (1999) 283-87.
- [10] Karami M, Biosystematic of fresh water protozoa (Msc thesis). Tehran: Tehran University, 1991.
- [11] Karami M, Fresh water protozoa; a beginner's guide for collection, isolation, and cultivation. Tehran: Shahed University publishing center, 1996.
- [12] Karami M, Zarrindast MR, Sepehri H, Sahraei H, Role of nitric oxide in the rat hippocampal CA₁ area on morphine-induced conditioned place preference. *Eur J Pharmacol* 449 (2002) 113-19.
- [13] Linder JU, Engel P, Reimer A, Kruger T, Plattner H, Schultz A, Schultz JE, Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*. *EMBO J*. 18 (1999) 4222-32.
- [14] Malvin GM, Cecava N, Nelin LD, Nitric oxide production and thermoregulation in *Paramecium caudatum*. *Acta Protozool* 42 (2003) 259-67.
- [15] Marino MJ, Sherman TG, Wood DC, Partial Cloning of Putative G-Proteins Modulating Mechanotransduction in the Ciliate *Stentor*. *J Euk Microbiol* 48 (5) (2001) 527-36.
- [16] Marino MJ, Wood DC, β -endorphin modulates a mechanoreceptor channel in the protozoan *Stentor*. *J Comp Physiol* 173 (1993) 233-40.
- [17] Nathan C, Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 (1992) 3051-64.
- [18] Powell JK, Hosokawa A, Bell A, Sutak M, Milne B, Quirion R, Jhamandas K, Comparative effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on the development and reversal of spinal opioid tolerance. *Br J Pharmacol* 127 (1999) 631-44.
- [19] Prajer M, Fleury A, Laurent M, Dynamics of calcium regulation in *Paramecium* and possible morphogenetic implication. *J Cell Sci* 110 (1997) 529-35.
- [20] Preston RR, Saimi Y, Kung C, Calcium current activated upon hyperpolarization of *Paramecium tetraurelia*. *J Gen Physiol* 100 (1992) 233-51.
- [21] Schumacher MA, Basbaum I, Way WL, Opioid Analgesics & Antagonists. In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. London: McGraw Hill, 2007, p 489-510.
- [22] Thiele J, Schultz JE, Ciliary membrane vesicles of *Paramecium* contains the voltage-sensitive calcium channel. *Proc Nat Acad Sci USA* 78 (1981) 3688-91.
- [23] Weinberg RG, Valtschanoff JG, Schmidt HHW, The NADPH diaphorase histochemical staining In: Stamler J, Ferelisch M, editors. *Methods in Nitric Oxide Research*, New York: John Wiley & Sons Ltd., 1996, p. 237-48.
- [24] Zarrindast MR, Karami M, Sepehri H, Sahraei H, influence of nitric oxide on morphine-induced conditioned place preference in the rat central amygdale. *Eur J Pharmacol* 453 (2002) 81-89.
- [25] Zhu W, Pryor SC, Putnam J, Cadet P, Stefano GB, Opiate alkaloids and nitric oxide production in the nematode *Ascaris suum*. *J Parasitol* 90 (1) (2004) 15-22.