

نقش گیرنده A_1 آدنوزینی در فعالیت الکتریکی نورونهای هسته پارازیگانتوسلولاریس در موشهای صحرایی نر معتاد

محسن خلیلی Ph.D. [☆]، محمدرضا واعظ مهدوی Ph.D. [☆]

☆دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

✉ آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۷۴۳۵-۱۴۱۴۴، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

پست الکترونیک: Email:najafabady@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۹/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۳/۲/۱۴

*** هدف:** بررسی نقش گیرنده های A_1 آدنوزینی نورونهای هسته پارازیگانتوسلولاریس بر فعالیت الکتریکی این نورونها در موشهای کنترل و معتاد

*** مواد و روشها:** حیوانات مورد مطالعه به دو گروه کنترل و وابسته به مورفین تقسیم شدند (در هر گروه $n=36$). در گروه وابسته حیوانات سولفات مورفین را از طریق آب آشامیدنی به مدت ۲۱ روز دریافت می کردند. سپس حیوانات هر دو گروه به منظور ثبت فعالیت الکتریکی از نورونهای هسته PGi در دستگاه استریوتاگس قرار گرفته و توسط میکرومانیپولیتور یک عدد میکروپیت شیشه ای در کنار یک نورون هسته PGi قرار می گرفت. فعالیت الکتریکی نورون به دستگاه تقویت کننده خارج سلولی و سپس به اوسیلوسکوپ هدایت می شد. با استفاده از یک دستگاه Window discriminator فعالیت الکتریکی نورون از زمینه اوسیلوسکوپ جدا شده و وارد برنامه آنالیز کننده کامپیوتری PSTH می گردید. فعالیت نورون حدوداً بعد از ۳۰ دقیقه ثبت از نورون حالت ثابت پیدا می کرد. با اعمال داروهای آگونیست و آنتاگونیست گیرنده A_1 اثر آنها بر فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi (فرکانس در ثانیه) اندازه گیری می شد.

*** یافته ها:** با به کارگیری آگونیست اختصاصی گیرنده A_1 ، سیکلوگزیل آدنوزین ($200 \mu M$; i.p.) به داخل هسته PGi در دو گروه کنترل و معتاد فعالیت الکتریکی این هسته به مقدار معنی داری کاهش پیدا می کند، به طوری که این کاهش فالیته در گروه معتاد ($52/5 \pm 3/4$ درصد) بارزتر از گروه کنترل بود ($35/2 \pm 3/1$ درصد). همچنین حدود ۱۸-۱۰ دقیقه بعد از به کار گیری ۸-فنیل تئوفیلین (10 mg/kg ; i.p.) به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده A_1 آدنوزینی یک افزایش در فعالیت الکتریکی هسته PGi مشاهده شد که این اثر در گروه معتاد ($39/3 \pm 2/5$ ٪) مشخص تر از گروه کنترل بود ($27/2 \pm 2/2$ درصد). در آزمایشهای تکمیلی سیکلوگزیل آدنوزین (CHA) در گروهی از موشها به کار رفت که قبلاً کافئین (50 mg/kg ; i.p.) را دریافت کرده بودند. نتیجه نشان داد که CHA در حضور کافئین به عنوان آنتاگونیست عمومی گیرنده های آدنوزینی اثر بارزی بر فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi ندارد.

*** نتیجه گیری:** نتایج به دست آمده نشان داد که یک افزایش حساسیت در گیرنده های A_1 آدنوزینی در موشهای صحرایی نر معتاد به مورفین به وجود می آید که این افزایش حساسیت سبب تغییر الگوی فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi در طی وابستگی و سندرم ترک می گردد.

کل واژگان: آدنوزین، مورفین، هسته پارازیگانتوسلولاریس، کافئین، ۸-فنیل تئوفیلین، سیکلوگزیل آدنوزین، ثبت تک واحدی

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۴۳-۱۳۸

مقدمه

این علائم به خصوص در مورد سندرم ترک هنوز ناشناخته باقی مانده است. مطالعات اخیر نشان داده اند که فعالیت هسته PGi نقش اساسی در پدیده سندرم ترک دارد (۴، ۵، ۶). طی پدیده سندرم ترک این هسته

تحقیقات نشان داده است مصرف مورفین دارای چندین عارضه از جمله مقاومت، وابستگی و سندرم ترک می باشد (۱). در مورد مکانیسم این پدیده ها نظرات مختلف ارائه شده است (۲، ۳)، اما مکانیسم دقیق

مغزی نخاعی (Artificial cerebrospinal fluid, ACSF) حل می‌شد. محتویات مایع مغزی نخاعی (برحسب میلی مول) شامل ترکیبات زیر بود. $NaCl$; ۱۲۴، KCl ; ۵، $MgCl_2$; ۲، $NaHCO_3$; ۲۶، $CaCl_2$; ۲، KH_2PO_4 ; ۱/۲۵، D -glucose; ۱۰.

تجویز مزمن مورفین

غلظت مورفین مورد استفاده در آب آشامیدنی در طی ۲۱ روز مصرف، به ترتیب زیر بود. برای روزهای اول و دوم ۰/۱، برای روزهای سوم و چهارم ۰/۲، برای روزهای پنجم و ششم ۰/۳ mg/ml، سپس در ۱۵ روز باقی‌مانده موشها دوز ۰/۴ mg/ml را دریافت می‌کردند (۱۷).

روش ثبت از هسته PGI و جمع آوری داده‌ها

در ابتدا حیوانات به وسیله اورتان (۱/۲ g/kg; i.p.) بیهوش می‌شدند. سپس بعد از تراکوتومی در دستگاه استریوتاکس قرار می‌گرفتند (Narishige، ژاپن). دمای بدن آنها به کمک پتوی گرم کننده نزدیک ۳۶/۸-۳۵/۵ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته می‌شد. به منظور ثبت از هسته PGI یک سوراخ با قطر ۲ میلی‌متر بر روی جمجمه در بالای هسته PGI با مختصات ۱۱/۹۶-۱۱/۶۵ درخلف برگما و ۱/۶-۱/۷mm در جوانب خط وسط بر اساس اطلس پاکزینوس ایجاد می‌شد (۱۸). برای تزریق در داخل هسته PGI یک کانول راهنما بر روی هسته PGI با زاویه ۳۰ درجه از الکتروود ثابت (عمود)، با مختصات ۵/۷ میلی‌متر به طرف خلف نقطه سوراخ شده و ۰/۳ میلی‌متر به طرف عمق جمجمه ایمپلنت می‌شد. تجهیزات تزریق شامل یک سوزن میکرواینجکتور متصل به سرنگ هاملتون بود که از طریق کانول راهنما وارد هسته PGI می‌شد. با قرار گرفتن میکروالکتروود شیشه‌ای پر شده از پونتامین آبی (۲ درصد) به همراه سدیم استات (۰/۵ M) در کنار نورونهای هسته PGI، ثبت خارج سلولی انجام می‌گرفت. برای قرار دادن میکروالکتروود شیشه‌ای ثابت در کنار نورونهای هسته PGI از یک عدد میکرومانیپولاتور (Narishige، ژاپن) قرار گرفته بر روی دستگاه استریوتاکس استفاده شد (۱۰/۱-۹/۶ mm از سطح جمجمه به طرف عمق). ثبت نورونی از طریق الکتروود شیشه‌ای ثابت به میکروالکتروود آمپلی‌فیر (WPI، آمریکا) و از آنجا به اوسیلوسکوپ وارد می‌شد. همزمان یک دستگاه بلندگو صدای فعالیت نورون را بخش می‌کرد. با جدا کردن فعالیت نورون به کمک دستگاه Window discriminator (WPI) از زمینه اوسیلوسکوپ و هدایت آن به کامپیوتر، داده‌ها که تعداد فرکانس نورون در واحد زمان می‌باشد در برنامه کامپیوتری PSTH ذخیره می‌شد.

آنالیز داده‌ها

بعد از تثبیت فعالیت نورون (۳۰-۲۰ min) فعالیت خودبه‌خودی نورون قبل و بعد از تزریق دارو به عنوان داده در نظر گرفته شد. بعد از

با آزاد کردن اسید آمینه‌های تحرکی در هسته لوکوس سرولئوس (LC)، منجر به بالا رفتن فعالیت این هسته می‌شود (۷، ۸، ۹)، اما بر عکس طی وابستگی فعالیت PGI و به موازات آن فعالیت هسته LC کاهش می‌یابد (۲).

بسیاری از مطالعات یک ارتباط دو جانبه بین آدنوزین و رسپتورهای اوبیوئیدی گزارش کرده‌اند (۱۰، ۱۱، ۱۲). این دو سیستم از طریق مسیر سیگنالینگ مشترک cAMP اعمال اثر می‌کنند (۱۳).

همچنین نشان داده شده است که آنالوگهای آدنوزینی در درمان وابستگی به مورفین کاربرد دارند (۱۰)، چنانچه این آنالوگها باعث تخفیف علائم سندرم ترک مورفین شده در صورتی که کافئین به عنوان آنتاگونیست رسپتورهای آدنوزینی سبب تشدید این علائم می‌گردد (۱۴، ۱۵). از جنبه الکتروفیزیولوژیکی، در مطالعه قبلی انجام شده در آزمایشگاه ما نشان داده شد که اعمال آدنوزین و کافئین به ترتیب سبب کاهش و افزایش معنی‌داری در فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای معتاد به مورفین در طی مرحله سندرم ترک می‌گردد. با توجه به این یافته که فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGI به ترتیب در طی مراحل وابستگی و سندرم ترک کاهش و افزایش معنی‌دار پیدا می‌کند (۲)، و اینکه مصرف آدنوزین اثر بارزی در کاهش فعالیت نورونهای این هسته در طی سندرم ترک دارد (۱۶)، مطالعه اخیر جهت بررسی اثر آدنوزین از طریق تغییر گیرنده A_1 در هسته PGI طراحی گردیده است.

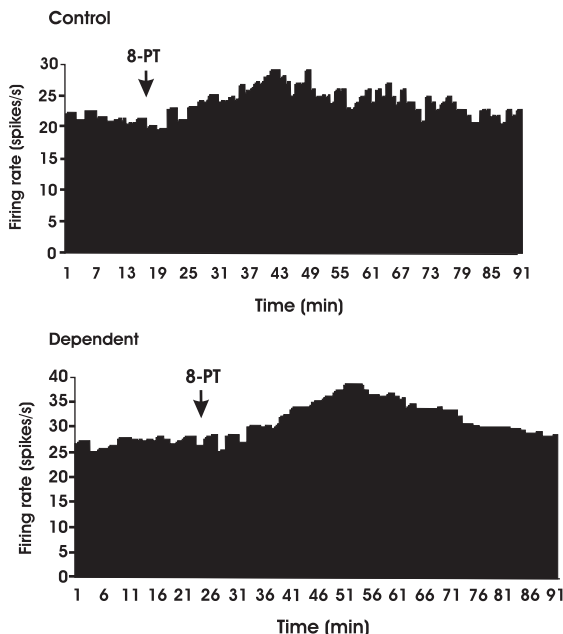
مواد و روشها حیوانات

موشهای صحرایی نر از جنس NMRI در محدوده وزنی ۳۸۰-۳۵۰ گرم به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. در هر قفس چهار موش قرار گرفته و به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. گروه کنترل (n=۳۶) سوکروز ۳ درصد در آب خوراکی دریافت می‌کردند و در گروه وابسته (n=۳۶) مورفین سولفات و سوکروز ۳ درصد مصرف شد. هر گروه به سه زیر گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند. در زیر گروه اول N-سیکلوهاگزیل آدنوزین (CHA) به داخل هسته PGI تزریق می‌شد. در زیر گروه دوم ۸-فنیل‌توفیلین بصورت داخل صفاقی تزریق گردید. در زیر گروه سوم بعد از تزریق داخل صفاقی کافئین، CHA به داخل هسته PGI تزریق می‌شد.

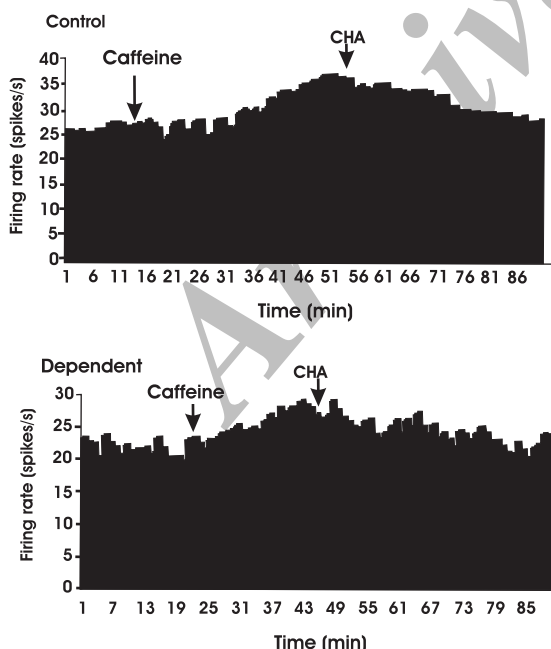
داروها

سولفات مورفین (تماد، ایران) و کافئین در آب مقطر حل می‌شدند. ۸-فنیل‌توفیلین (سیگما، آمریکا) به وسیله اتیلن دی‌آمین به صورت محلول در آمده و سپس برای تزریق داخل صفاقی به کمک آب مقطر رقیق می‌گشت. سیکلوهاگزیل آدنوزین (سیگما، آمریکا) در داخل مایع

فعالیت نورونهای هسته PGi در گروههای کنترل و معنادار اثر اعمال کاهش معنی دار پیدا کرده است ($P < 0/5$)، به طوری که این کاهش در گروه معنادار ($52/5 \pm 3/4$ ٪) بارزتر و مشخص تر از گروه کنترل ($35/2 \pm 3/1$ ٪) می باشد (شکل ۴).



شکل ۲: الگوی فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi در دو گروه کنترل و معنادار، قبل و بعد از تزریق داخل صفاقی ۸-فنیل تئوفیلین (10 mg/kg). تزریق این دارو سبب افزایش معنی دار فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi در گروه معنادار نسبت به گروه کنترل گردید ($n=12$ در هر گروه، $P < 0/05$).



شکل ۳: فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi، به دنبال تزریق سیکلوهگزیل آدنوزین در موشهایی که از قبل کافئین (50 mg/kg ; i.p.) را دریافت کرده اند. در این حالت تغییر معنی داری در فعالیت الکتریکی نورونها مشاهده نگردید ($n=12$ در هر گروه، $P < 0/05$).

تزریق دارو فعالیت الکتریکی نورون تا بازگشت این فعالیت به حالت اولیه ادامه می یافت. تغییر فعالیت نورونی هسته PGi بعد از تزریق دارو به عنوان اثر دارو در نظر گرفته می شد (شکل ۳-۱).

داده ها بر اساس $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ در نظر گرفته شد و درصد تغییرات به کمک فرمول (میانگین قبل از تزریق/میانگین قبل از تزریق - میانگین بعد از تزریق) محاسبه گردید. مقایسه بین گروههای کنترل و معنادار به کمک Unpaired t-test انجام شد و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

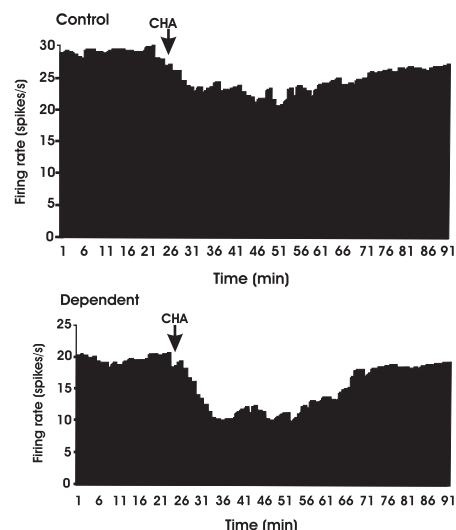
تایید بافت شناسی

در پایان هر آزمایش به دنبال تزریق بافر فرمالین-فسفات ۱۰ درصد، سالی ۹/۰ درصد برون قلب پرفیوز می شد. سپس مغز موشها جدا و پس از برش گیری به کمک پارافین (۱۰ میکرومتر) با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی می گردید. جایگاه ثبت الکتریکی به کمک رنگ دانه پوتامین آبی موجود در داخل الکتروود ثبت علامت گذاری می شد. نهایتاً جایگاههای ثبت با مقایسه با اطلس پاکزینوس و واتسون (۱۸) تایید می گردید. داده های گزارش شده از موشهایی است که محل ثبت آنها در هسته PGi تایید شده است.

یافته ها

اثر سیکلوهگزیل آدنوزین (CHA) بر فعالیت پایه نورونهای هسته PGi

در شکل ۱ اثر CHA به عنوان آگونیست اختصاصی گیرنده A₁ آدنوزینی بر فعالیت نورونهای هسته PGi در گروههای کنترل و معنادار نشان داده شده است.



شکل ۱: الگوی فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi در دو گروه کنترل و معنادار، قبل و بعد از تزریق داخل هسته ای سیکلوهگزیل آدنوزین ($200 \mu\text{M}$). به دنبال تزریق سیکلوهگزیل آدنوزین فعالیت این نورونها در دو گروه کنترل و معنادار کاهش یافته است. این کاهش فعالیت در گروه کنترل ($35/2 \pm 3/1$ ٪) به شکل معنی داری کمتر از گروه معنادار ($52/5 \pm 3/5$ ٪) بود ($n=12$ در هر گروه، $P < 0/05$).

شکل شماره ۴ نشان داده می‌شود این افزایش فعالیت در گروه وابسته (۳۹/۳±۲/۵ درصد) نسبت به گروه کنترل (۲۷/۲±۲/۱ درصد) معنی‌دارتر می‌باشد ($P < 0/05$).

تاثیر CHA بر فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای درمان شده با کافئین

پس از بلوک گیرنده‌های آدنوزین به کمک کافئین (۵۰ mg/kg; i.p) در داخل هسته PGI تزریق می‌شد. همان‌طور که در شکل ۳ و ۵ نشان داده می‌شود CHA در این شرایط توانایی تغییر معنی‌دار فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGI را ندارد.

بحث

به منظور کاهش استرس حیوانات و تزریق مورفین، جهت معنادار کردن موشها، مورفین به آب آشامیدنی آنها اضافه شد. در این روش مصرف مورفین بر اساس نیاز حیوان بوده و تقریباً به وابستگی در انسان شباهت بیشتری دارد (۱۹).

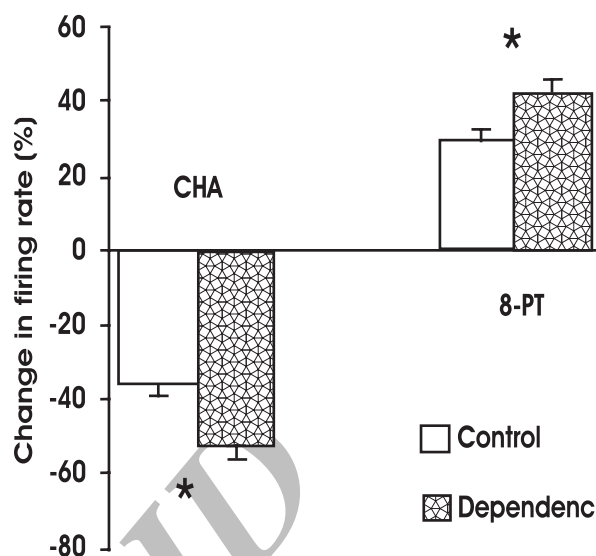
نورونهای هسته PGI که در این مطالعه فعالیت الکتریکی آنها ثبت شده است بر طبق مشاهده Ennis و همکارانش (۲۰) دارای فرکانس فعالیت بالا و بر اساس گزارش Rasmussen و همکارانش (۳) مسئول وابستگی به مورفین است. در تحقیق حاضر اعمال آگونیست اختصاصی گیرنده A_1 آدنوزینی یعنی CHA به داخل هسته PGI سبب کاهش مشخص فعالیت الکتریکی نورونهای این هسته در موشهای وابسته به مورفین گردید.

در توجیه این نتیجه گزارشات متعددی در ارتباط متقابل دو سیستم آدنوزینی و اوپیوئیدی (۱۱، ۱۲) ارائه شده است. توانایی بروز رفتارهای سندرم ترک در موشهای وابسته به آنالوگهای آدنوزینی توسط آنتاگونیستهای اوپیوئیدی و همچنین بروز این رفتارها توسط آنتاگونیستهای آدنوزینی در موشهای معتاد به مورفین توسط Aley و همکارانش گزارش شده است (۲۱).

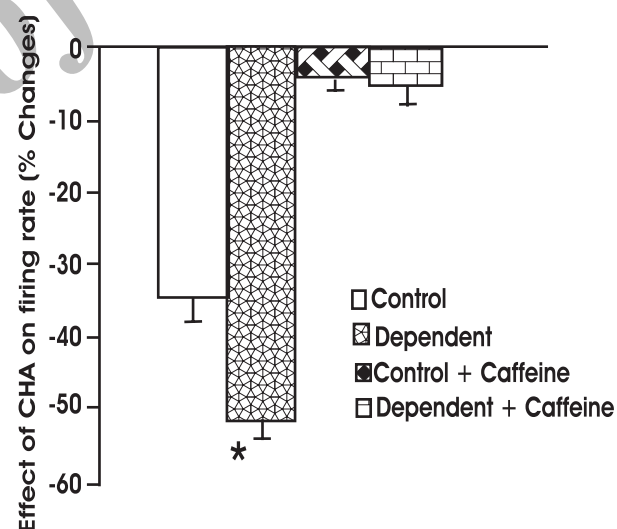
از طرفی کاهش فعالیت نورونهای هسته PGI در طی وابستگی و تنظیم افزایشی گیرنده های A_1 آدنوزینی در این دوره و از طرفی افزایش فعالیت این نورونها در طی سندرم ترک، پیشنهاد می‌کند که احتمالاً نتایج الکتروفیزیولوژیک با CHA مربوط به افزایش حساسیت یا تنظیم افزایشی گیرنده های A_1 در هسته PGI باشد.

به همین ترتیب افزایش معنی‌دار نورونهای هسته PGI در موشهای معتاد به دنبال تزریق آنتاگونیستهای اختصاصی گیرنده A_1 آدنوزینی، ۸-فنیل تنوفیلین هم احتمالاً به تغییر فعالیت گیرنده A_1 در هسته PGI مرتبط است.

در تایید نتایج ذکر شده آزمایشات ما با



شکل ۴: مقایسه اثر سیکلوهگزیل آدنوزین و ۸-فنیل تنوفیلین بر فعالیت الکتریکی پایه نورونهای هسته PGI. همان‌طور که ستونها نشان می‌دهند فعالیت این نورونها به طور معنی‌داری توسط سیکلوهگزیل آدنوزین کاهش و به دنبال تزریق ۸-فنیل تنوفیلین افزایش یافته است ($n=12$ در هر گروه، $P < 0/05$).



شکل ۵: مقایسه اثر سیکلوهگزیل آدنوزین در موشهای پیش درمان شده با داروی کافئین (۵۰ mg/kg; i.p) در گروههای کنترل و معتاد. همان‌طور که شکل نشان می‌دهد بلوک گیرنده های آدنوزین از تاثیر سیکلوهگزیل آدنوزین بر فعالیت الکتریکی نورونها جلوگیری کرده است ($n=12$ در هر گروه، $P < 0/05$).

اثر ۸-فنیل تنوفیلین (۸-PT) بر فعالیت نورونهای هسته PGI

به دنبال تزریق ۸-PT فعالیت پایه نورونهای هسته PGI در دو گروه کنترل و معتاد افزایش پیدا می‌کند (شکل ۲). همان‌طور که در

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که تغییر حساسیت گیرنده های A₁ آدنوزینی نورونهای هسته PGI در طی مصرف طولانی مورفین احتمالاً مسئول فعالیت پایین این نورونها در طی وابستگی و افزایش فعالیت این آنها در طی سندرم ترک است.

CHA به دنبال بلوک گیرنده های آدنوزینی بوسیله کافئین و عدم تاثیر CHA در این حالت موید این نکته است که مهمترین گیرنده آدنوزینی درگیر در تغییر فعالیت الکتریکی هسته PGI در طی وابستگی و سندرم ترک گیرنده A₁ باشد.

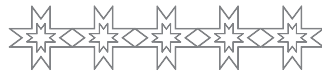


References

- Rasmussen K, Beitner DB, Krystal JH, Aghajanian GK, Nestler EJ: Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological and biochemical correlates. *J. Neurosci.* 1990; 10: 2308-
- Haghpour A, Semnani S and Fathollahi Y: Morphine tolerance and dependence in the nucleus paragigantocellularis: Single unit recording study in vivo. *Brain Res.* 1998; 814: 71-77
- Rasmussen K, Aghajanian GK: Withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons in opiate-dependent rats: attenuation by lesions of the nucleus paragigantocellularis. *Brain Res.* 1989; 505: 346-350
- Cedarbaum JM, Aghajanian GK: Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol* 1978; 178: 1-6
- Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvot M: Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin. *Neuroscience.* 1993, 65: 128-138
- Ennis M, Aston-Jones G: Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J. Neurosci.* 1988; 8: 3644-3657
- Akaoka H, Aston-Jones G: Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. *J. Neurosci.* 1991; 11: 3830-3839
- Maldonado R, Koob GF: Destruction of the locus coeruleus decrease physical signs of opiate withdrawal. *Brain Res* 1993;605: 128-138
- Punch LJ, Self DW, Nestler EJ, Taylor JR: Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors on microinfusion of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus coeruleus or periaqueductal gray. *J Neurosci* 1997; 17: 8520-8527
- Dionysopoulos T, Hope W, Coupar IM: Effect of adenosine analogues on the expression of opiate withdrawal in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1992; 42: 201-206
- Michalska E, Male D: Agonist and antagonists of adenosine receptors and morphine withdrawal syndrome in rats. *Pol. J Pharmacol* 1993; 45: 1-9
- Zarrindast MR, Naghipour B, Roushan-Zamir F, Shafaghi B: Effect of adenosine receptor agents on the expression of morphine withdrawal in mice. *Eur. J Pharmacol* 1997; 369: 17-22
- Salles KS, Colasanti BK, Craig CR, Thomas JA: Involvement of brain cyclic AMP in the acute and chronic effect of morphine in the rat. *Pharmacol* 1978; 17: 128-137
- Ahlijanian MK, Takemori AE: Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine - tolerant and - dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236: 615-620
- Kaplan GB, Leite-Morris KA, Sears MT: Alteration of adenosine A₁ receptors in morphine dependence. *Brain Res.* 1994; 657: 347-350
- Khalili M, Semnani S, Fathollahi Y: Caffeine increase paragigantocellularis neuronal firing rate and induces withdrawal signs in morphine-dependent rats. *E J Pharmacol* 2001; 412: 239-245
- Bernstein MA, Welch SP: Effect of spinal versus supraspinal administration of cyclic nucleotide - dependent protein kinase inhibition on morphine tolerance in mice. *Drug Alcohol Depend* 1997; 41: 41-46
- Paxinos G, Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press Orlando:1986
- Badavy AA, Evans CM: Production of tolerance and physical dependence in the rat by simple administration of morphine in drinking water. *Br J Pharmacol* 1982; 75: 485-491
- Ennis M, Astone-Jones G: Two physiologically distinct population of neurons in the ventrolateral medulla innervate the locus coeruleus. *Brain Res* 1987; 425: 275-282

21. Aley KO, Green PG, Levine JD: Opioid and adenosine peripheral antinociception are subject to

tolerance and withdrawal. J Neurosci.1995; 15: 8031-8038



Archive of SID