

پاسخ‌دهی نورونهای هسته پارازیگانتوسولولاریس به فورسکولین در موش صحرایی وابسته به مورفین

حسن اژدری زرمهری **M.Sc.**، سعید سمنانیان **Ph.D.**، یعقوب فتح‌الهی **Ph.D.**، فیروز قادری پاکدل **Ph.D.**†
➔ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی
† دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی
✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، گروه فیزیولوژی
پست الکترونیک: sseman@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۳/۷/۱۹، پذیرش مقاله: ۸۳/۱۰/۲۳

➔ **هدف:** مطالعه اثر فورسکولین (فعال کننده آدنیل سیکلز) درون هسته‌ای روی فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGi و القاء علائم رفتاری سندرم محرومیت در موشهای وابسته به مورفین
➔ **مواد و روشها:** از ثبت تک‌واحدی خارج سلولی برای ثبت فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGi در موشهای نر نژاد NMRI، وزن ۲۰۰ تا ۳۵۰ گرم استفاده شد. فورسکولین (۱۰۰ نانومول، ۴۰۰-۳۰۰ نانولیت، ۴-۳ دقیقه) در داخل هسته ریز تزریق شد. برای بررسی علائم سندرم محرومیت، رفتارهای موش را مورد مطالعه قرار دادیم.
➔ **یافته‌ها:** میانگین فرکانس فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGi در موشهای وابسته به مورفین نسبت به گروه کنترل کمتر بود. تزریق فورسکولین در موشهای کنترل باعث افزایش فعالیت نورونهای هسته PGi اما در موشهای وابسته به مورفین باعث مهار فعالیت نورونها شد. همچنین در موشهای کنترل، تزریق فورسکولین باعث بروز علائم جویدن و سگ لرزه شد ولی در موشهای وابسته به مورفین علائمی بروز نکرد.
➔ **نتیجه گیری:** ممکن است تغییر سازشی فعالیت مسیر cAMP در نورونهای هسته PGi به دنبال مصرف طولانی مدت مورفین، در تحمل و وابستگی به مورفین نقش داشته باشد.

کل واژگان: هسته پارازیگانتوسولولاریس، فورسکولین، مورفین، ثبت تک واحدی

مقدمه

با مصرف مکرر داروهای اپیویدی، مکانیسمهای سازشی (Adaptation mechanisms) در نورونهای مغز آغاز می‌گردد. این مکانیسمها به تغییرات کوتاه مدت و ماندگار در عملکرد نورونها و شبکه‌های عصبی حساس به اپیویدها منجر می‌شوند (۱، ۲، ۳). مراحل اولیه عمل اپیویدها به وسیله فعال کردن G پروتئینها واسطه شده و از طریق G پروتئینها باعث مهار آنزیم آدنیلات سیکلز (AC) و تنظیم مسیر هدایت سلولی cAMP می‌شود. اثرات سلولی و مولکولی اپیویدها در فهم حوادثی که منجر به تحمل (Tolerance) و وابستگی (Dependence) می‌گردد، مهم است (۳). یکی از رایج‌ترین مکانیسمهای مولکولی ثابت شده در اعتیاد، تغییرات افزایشی (Up-Regulation Changes) در مسیر هدایت سلولی cAMP است که در سلولهای عصبی برخی هسته‌های مغزی از قبیل هسته آکومینس (۴، ۵، ۶)، تگمتموم شکمی (۷، ۸، ۹)، هسته رافه پشتی (۱۰)، ماده خاکستری قنات صدری (۱۱، ۱۲) و هسته لوکوس سرلئوس (L.C) (۱۳، ۱۴، ۱۵) به دنبال استفاده مکرر از اپیویدها به وجود می‌آید. این تنظیم افزایشی سبب فعالیت فاکتورهای نسخه‌برداری از قبیل CREB (cAMP Response Element Bindin Protein) می‌شود. CREB سبب بیان ژن در سلول می‌شود و بسیاری از زوایای

تحمل و وابستگی به اپیویدها را میانجی‌گری می‌کند (۱۶، ۱۷، ۱۸). افزایش میزان cAMP می‌تواند ناشی از افزایش حساسیت (supersensitization) آدنیلات سیکلز باشد (۱۹). در حقیقت افزایش حساسیت آدنیلات سیکلز در *in vitro* (رده سلولهای عصبی، نورونهای واقع در سیستم اعصاب و رده‌های سلولی دارای رسپتورهای اپیویدی (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳)) و *in vivo* (از شبکه میانرئیک عضله طولی خو کچه هندی (۲۴، ۲۵)) به دنبال استفاده مکرر از اپیویدها گزارش شده است. مدارکی دال بر نقش نورونهای PGi در بیان علائم سندرم محرومیت اتونومیک و فیزیکی ناشی از وابستگی به اپیویدها وجود دارد (۲۶، ۲۷، ۲۸). هسته PGi بزرگترین منبع گلوتامات به هسته لوکوس سرلئوس (L.C) است (۲۹) که به دنبال القای سندرم محرومیت اپیویدی افزایش آزاد شدن گلوتامات از هسته PGi به L.C در هیپراکتیویته نورونهای هسته نورآدرنژیک LC نقش دارد (۳۰، ۳۱، ۳۲). با توجه به نقش هسته PGi در تحمل و وابستگی و بروز علائم سندرم محرومیت، باید به این نکته مهم برسیم که آیا نقش هسته PGi ناشی از آورانهایی است که به این هسته می‌آید و یا ناشی از تغییرات درونی در خود این هسته است. در صورت وجود تغییرات درونی، کدامین تغییرات اتفاق افتاده است؟ آیا در این هسته تغییرات افزایشی در مسیر هدایت سلولی cAMP به دنبال استفاده مکرر از اپیویدها به وجود می‌آید؟ و آیا تغییرات سلولی مسیر cAMP در این

در داخل هسته PGI ریز تزریق شد که اثری روی رفتار موشها نداشت.

جراحی و ثبت الکتروفیزیولوژیک

موشها بعد از توزین با تزریق اورتان به صورت داخل صفاقی (۱/۲g/kg, i.p.) بیهوش شدند. ابتدا نای تشریح شده و درون آن کانول مناسبی جای گذاشته می‌شد، تا در طول جراحی و ثبت الکتروفیزیولوژیک حیوان به طور طبیعی تنفس نماید. در طول آزمایش سطح بیهوشی کنترل شده و در صورت نیاز دوزهای تقویتی (Booster Dose) از داروی بیهوشی تزریق می‌شد. موشها در استریوتاکسی قرار گرفته و پوست سر از آنها ناحیه وسط شکافته و به اطراف رانده می‌شد. پس از آشکار شدن سطح استخوان سر، موقعیتهای برگما و لامبدا مشخص شده و محل ورود الکتروود ثبت با استفاده از اطلس پاکسینوس (۳۸) تعیین و با مته دندانپزشکی سوراخ مناسبی بدون آسیب به سخت شامه ایجاد می‌شد و الکتروود ثبات وارد مغز می‌شد. برای تزریق دارو عقب‌تر از محل الکتروود سوراخی ایجاد نموده و کانول تزریق با زاویه ۱۵ درجه به محل نورون مورد مطالعه هدایت می‌شد. کانول تزریق از طریق رابط به سرنگ هامیلتون (Hamilton) متصل و حجم مورد نظر (۳۰۰-۴۰۰ نانولیتتر) تزریق می‌شد. میکروالکتروودهای تک لول با مقاومت ظاهری نوک الکتروودها ۱۰-۲ مگا اهم استفاده شد. الکتروود از محلول ۰/۵ مولار استات سدیم حاوی ۲ درصد رنگ Pontamine Sky Blue پر می‌شد (۳۹). بعد از پایدار شدن فعالیت نورون، ثبت به مدت ۲۰ دقیقه صورت می‌گرفت. فورسکولین (۳۰۰-۴۰۰ نانولیتتر، ۳-۴ دقیقه و غلظت ۱۰۰ نانومول) در کنار نورون مورد مطالعه در هسته PGI تزریق می‌شد و تغییر فعالیت نورون به عنوان اثر دارو مدنظر بود و تا برگشت فعالیت نورون به حالت پایدار ثبت ادامه پیدا می‌کرد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در این روش ثبت تک واحدی به صورت Off-line صورت می‌گرفت.

داده‌های خروجی برنامه تعداد اسپایک در مدت ۰/۵ ثانیه بود و همچنین فواصل اسپایکها را به دست می‌آورد. فایل مذکور حاوی اطلاعات اولیه PSTH (Peri Stimulus Time Histogram) و ISIH (Inter Spike Interval Histogram) مربوط به آزمایش بود، سپس میانگین فعالیت در یک دقیقه و دقایق متوالی محاسبه می‌گشت (۳۹). بعد از هر آزمایش با توجه به نشانه گذاری محل ثبت به وسیله Pontamine Sky Blue، به ترتیب سالی نرمال و فرمالین فسفات ۱۰ درصد از طریق قلب تزریق می‌شدند. به دنبال آن مغز حیوان از جمجمه خارج شده و در محلول فرمالین فسفات تا برش گیری نگهداری می‌شد.

روش ارزیابی علایم رفتاری بعد از تزریق داخل هسته‌ای فورسکولین

برای تزریق داروی فورسکولین، حیوان پس از بیهوشی، در دستگاه استریوتاکسی قرار می‌گرفت کانولهای تزریق و راهنما در هسته پاراژیکانتوسولولاریس تعبیه گردید. بعد از اتمام جراحی موش ۵ روز تا

هسته با بروز علایم سندرم محرومیت ارتباط دارد؟ برای این منظور پاسخ‌دهی نورونهای هسته PGI به فورسکولین (Forskolin)، به عنوان فعال کننده آدنیلات سیکلاز در گروه موشهای سالم و وابسته به مورفین مورد بررسی قرار گرفته است. تا به حال ۹ ایزوفرم متصل به غش $AC1 - AC9$ و یک ایزوفرم محلول از آدنیلات سیکلاز کشف شده است که همه اینها در مغز شناسایی شده‌اند. به غیر از AC9 و فرم محلول بقیه به وسیله فورسکولین فعال می‌شوند و سبب افزایش سطح cAMP در سلول می‌شود (۳۳، ۳۴، ۳۵).

مواد و روشها

مواد و دارو

نمکهای NaH_2PO_4 ، $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ، $NaCl$ ، سوکروز و فورسکولین از شرکت Merck آلمان، محلول ۳۷ درصد فرمالین از شرکت Qualigens، پودر خالص مورفین از شرکت تماد (تولید مواد اولیه دارویی، ایران) تهیه شدند.

در این پژوهش از موشهای صحرایی سفید نر، نژاد NMRI، در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۳۵۰ گرم که از انستیتو رازی تهیه شده بود، استفاده شد. اتاق نگهداری دارای تجهیزات کنترل نور و حرارت بود. آب و غذای کافی برای حیوانات غیر وابسته به صورت آزاد وجود داشت. در گروه حیوانات تحت ایجاد وابستگی، محلول حاوی مورفین و غذا به طور آزاد در اختیار حیوانات قرار داده می‌شد.

ایجاد وابستگی به مورفین به وسیله آب آشامیدنی

آب آشامیدنی حیوانات در ۴۸ ساعت اول، ۱ میلی گرم مورفین سولفات در یک لیتر آب بود. در ۴۸ ساعت دوم غلظت مورفین دو برابر شد و سپس برای ۴۸ ساعت سوم غلظت ۳ میلی گرم در لیتر استفاده کردیم. باقی مانده روزها تا روزهای ۲۱ تا ۲۵ از محلول حاوی ۴ میلی گرم در لیتر مورفین استفاده شد. سوکروز برای تمام محلولها با غلظت ثابت ۴ گرم در صد میلی لیتر استفاده شد. برای آزمایش شیوع وابستگی در موشها با تزریق زیرجلدی نالوکسان (۳mg/kg)، سندرم محرومیت در آنها القا شد. پس از تزریق نالوکسان، موشها وارد مرحله سندرم محرومیت شده و علایم محرومیت را نشان دادند (۳۷).

روش آماده کردن فورسکولین جهت تزریق

فورسکولین در DMSO حل و در دمای اتاق تا حداکثر ۶ ماه نگهداری شد. در روز آزمایش توسط ACSF رقیق و به غلظت ۱۰۰ نانومول رسید. غلظت استفاده از DMSO در آزمایشات الکتروفیزیولوژیک ۰/۰۱ درصد و به حجم ۳۰۰-۴۰۰ نانولیتتر در داخل هسته PGI تزریق شد که در غلظت ۰/۰۱ درصد اثری روی ثبت الکتروفیزیولوژیک نداشت (شکل ۱). در آزمایشات رفتاری ۰/۰۱ درصد و به حجم ۵ میکرولیتر

یک هفته دوره بهبودی را طی می کرد. بعد از دوره بهبودی، ماده مزبور به درون هسته PGI در موش که آزادانه حرکت می کرد تزریق شد. برای هر حیوان در این قسمت رفتارهای مشاهده شده سندرم محرومیت ناشی از تزریق درون هسته ای فورسکولین شمارش و تغییر رفتارها نسبت به گروههای کنترل ارزیابی شد.

یافته‌ها

ارزیابی علایم سندرم محرومیت ناشی از تزریق نالوکسان در موشهای تحت تیمار مورفین

همچنان که از نتایج حاصل از شکل ۱ استنتاج می گردد موشهای تحت تیمار مورفین علایم محرومیت از مورفین را نشان داده‌اند.

شکل ۲: فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGI در موشهای کنترل (A) و وابسته به مورفین (B) و مقایسه آماری میانگین فعالیت خود به خودی نورونهای هسته‌های PGI در موشهای غیروابسته و وابسته به مورفین (C). میانگین فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای کنترل $0.34 \pm$ اسپایک در ثانیه و در موشهای گروه وابسته به مورفین $0.25 \pm$ اسپایک در ثانیه است. (student t-test. *** $p < 0.0001$, $n=11$, values are mean \pm SEM)

اثر تزریق ۱۰۰ نانومول فورسکولین بر فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGI در گروه کنترل

در موشهای کنترل تزریق درون هسته ای ۱۰۰ نانومول فورسکولین باعث افزایش معنی دار ($p < 0.0001$) فعالیت نورونهای هسته PGI گردید (شکل ۴). مقایسه آماری میانگین فعالیت نورونها ($n=5$) نشان می دهد که نورونهای هسته PGI قبل از تزریق فورسکولین دارای فعالیت خود معادل $0.56 \pm 0.13/46$ اسپایک در ثانیه بوده و پس از تزریق فورسکولین فعالیت آنها $0.7 \pm 0.17/02$ درصد افزایش یافته و به مقدار $0.46 \pm 0.15/61$ اسپایک در ثانیه رسید. افزایش فعالیت نورونهای PGI بعد از گذشت ۱۰/۶ دقیقه به سطح فعالیت قبل از تزریق یا بهبودی (Recovery)، برابر ۱۲/۷ اسپایک در ثانیه بازگشت نمود.

شکل ۱: شکل میانگین PST H فعالیت نورونهای هسته PGI قبل و بعد از استعمال DMSO ۰/۰۱ درصد روی فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGI در موشهای کنترل. نورونهای هسته PGI قبل از تزریق DMSO دارای فعالیت خود به خودی معادل ۲۲/۳۱ اسپایک در ثانیه بود و پس از تزریق DMS فعالیت آنها به ۲۱/۸۱ اسپایک در ثانیه رسید، که تفاوت معنی داری ندارند.

شکل ۲: علایم محرومیت از مورفین در موشهای وابسته به مورفین در طی ۴۰ دقیقه پس از ایجاد محرومیت ناشی از تزریق نالوکسان ($p < 0.0005$, $n=10$). موشهای وابسته شده به مورفین به دلیل وابستگی به مورفین علایم را نشان می دهند ($n=6$).

فعالیت خودبخودی نورونهای هسته PGI در موشهای کنترل و وابسته به مورفین

ثبتهای الکتروفیزیولوژیک از هسته PGI در موشهای کنترل (A) و وابسته به مورفین (B) پس از پایدار شدن آن تا حدود یک ساعت ادامه یافت (شکل ۳). در تمام ثبتهای ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه برای ثابت شدن نورونها تجزیه و تحلیل آماری انجام نشد و یک ساعت ثبت پس از ۲۰ دقیقه فعالیت اخذ می شد. مقایسه آماری (t-test) میانگین فعالیت پایه نورونهای هسته PGI (C) نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو گروه مذکور است. میانگین فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای کنترل

شکل ۴: اثر تزریق داخل هسته ای ۱۰۰ نانومول فورسکولین روی فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGI در موشهای کنترل (A2, A1) و وابسته به مورفین (B2, B1). شکل میانگین PSTH فعالیت نورونهای هسته PGI قبل و بعد از استعمال فورسکولین و دوره برگشت. - A2, B2 مقایسه آماری فعالیت نورونهای هسته PGI در سه دوره مذکور. - C درصد تغییرات بعد از تزریق و مقایسه آنها بین دو گروه. نورونهای هسته PGI در موشهای کنترل قبل از تزریق فورسکولین دارای فعالیت خود به خودی معادل $0.56 \pm 0.13/46$ اسپایک در ثانیه بود و پس از تزریق فورسکولین فعالیت آنها $0.7 \pm 0.17/02$ درصد افزایش یافت و به مقدار $0.46 \pm 0.15/61$ اسپایک در ثانیه رسید. بعد از گذشت ۱۰/۶ دقیقه به سطح فعالیت قبل از تزریق یا بهبودی، برابر ۱۲/۷ اسپایک در ثانیه بازگشت نمود. میانگین فعالیت خود به خودی نورونها در موشهای وابسته به مورفین قبلا از تزریق $0.39 \pm 0.16/39$ اسپایک در

ثانیه بود. بعد از تزریق نورونها دچار کاهش شدید فعالیت به میزان ۷۵/۲۶ درصد به مدت ۴۷/۲۵ دقیقه شدند. بعد از گذشت ۴۷/۲۵ دقیقه به سطح فعالیت قبل از تزریق یا بهبودی برابر ۲۲/۷۶ اسپایک در ثانیه بازگشت نمود.

(***) $n=5$, values are $P>.0001$ student t-test. (mean \pm SEM)

بررسی تزریق داخل هسته ای ۱۰۰ نانومول فورسکولین بر فعالیت خود به خودی نورونهای PGI در موشهای وابسته به مورفین

میانگین فعالیت خود به خودی نورونها قبل از تزریق $6/39 \pm 2/04$ اسپایک در ثانیه بود. بعد از تزریق، نورونها دچار کاهش شدید فعالیت به میزان ۷۵/۲۶ درصد به مدت ۴۷/۲۵ دقیقه شدند (شکل ۴). همان طور که قبلاً بیان شد تزریق همین دوز فورسکولین باعث افزایش فعالیت نورون در گروه وابسته به میزان $17/52 \pm 2/07$ درصد شد که اختلاف با رزی در پاسخ دهی نورونها در گروه وابسته و گروه وابسته به مورفین دیده شد. فعالیت نورونهای PGI بعد از گذشت زمان ۴۷/۲۵ به سطح فعالیت قبل از تزریق یا بهبودی (Recovery)، برابر ۲۲/۷۶ اسپایک در ثانیه بازگشت نمود. در قسمت C (شکل ۴) درصد تغییر بعد از تزریق ۱۰۰ نانومول در موشهای کنترل نسبت به وابسته به مورفین با هم مقایسه شده است.

علائم رفتاری سندرم محرومیت به دنبال تزریق داخل هسته ای فورسکولین در موشهای کنترل و موشهای وابسته به مورفین

۰/۵ میکرولیتر فورسکولین ۱۰۰ نانومول در ۵ مورد از حیوانات این گروه تزریق و علائم رفتاری (شکل ۵) ثبت گردید. همه موشها علامت جویدن را نشان دادند و سه سر از موشها علائم سگ لرزه را نشان دادند. دو عدد از موشها هم علامت سر پا ایستادن را نشان دادند، دو علامت جویدن و سگ لرزه نسبت به گروه وابسته به مورفین معنی دار است و علامت سر پا ایستادن نسبت به گروه وابسته به مورفین معنی دار نیست.

۰/۵ میکرولیتر فورسکولین ۱۰۰ نانومول در ۴ نمونه از موشهای وابسته به مورفین به داخل هسته PGI تزریق شد. این گروه هیچ علامت سندرم محرومیت معنی داری از خود نشان ندادند و سه نمونه از موشها به حالت خواب آلودگی در گوشه ای از قفس آرام می گرفتند که این رفتار به عنوان علامت سندرم محرومیت کمیته نشده است (شکل ۵).

شکل ۵: مقایسه درصد علائم رفتاری مشاهده شده در موشهای غیر وابسته ($n=5$) و وابسته ($n=4$) به مورفین به دنبال تزریق داخل هسته ای ۱۰۰ نانومول فورسکولین.

بحث

ما از فورسکولین که یک ماده طبیعی است و باعث فعال کردن ۱۸ ایزوفرم آدنیلات سیکلاز و افزایش میزان cAMP می شود برای بررسی وجود تغییر در مسیر cAMP در نورونهای PGI موش وابسته به مورفین نسبت به موش غیر وابسته استفاده کردیم (۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶). فورسکولین با غلظت ۱۰۰ نانومتر استفاده شد که از طریق کاربرد دوزها مختلف در این آزمایشگاه به دست آمد. بعد از پایدار شدن فعالیت نورون، ثبت به مدت ۲۰ دقیقه صورت می گرفت. فورسکولین در کنار نورون مورد مطالعه در هسته PGI تزریق می شد و تغییر فعالیت نورون به عنوان اثر دارو مدنظر بود و تا برگشت فعالیت نورون به حالت پایدار ثبت ادامه پیدا می کرد. به همین دلیل مدت ثبت در دو گروه متفاوت است.

فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGI در موشهای صحرائی و سایر جانوران به وسیله محققین مختلف مطالعه شده است. Ennis و Aston-Jones فعالیت نورونهای هسته PGI را از ۱ تا ۲۰ اسپایک در ثانیه گزارش نموده اند (۲۸). بر اساس گزارش حق پرست و همکاران محدوده فعالیت نورونهای هسته PGI را ۱ تا ۳۹ اسپایک در ثانیه با متوسط $11/36 \pm 0/75$ اسپایک در ثانیه در گروه Sham Operated، $12/20 \pm 1/19$ اسپایک در ثانیه در گروه کنترل و در گروه وابسته به مورفین $12/30 \pm 0/98$ اسپایک در ثانیه گزارش نموده اند (۴۰). بر اساس گزارش حق پرست و همکاران اگرچه فرکانس فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای وابسته به مورفین تفاوت معنی داری با فرکانس فعالیت نورونهای هسته PGI موشهای غیر وابسته به مورفین نداشته است ولی طبق گزارش آنها فرکانس فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای وابسته کمتر از گروه غیر وابسته مورفین بوده است (۴۰). تحقیقاتی که توسط قادری و همکاران انجام شده است میانگین فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای وابسته به مورفین $12/63 \pm 0/95$ اسپایک در ثانیه بوده و میانگین فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای غیر وابسته به مورفین $19/72 \pm 1/7$ اسپایک در ثانیه بوده است. مقایسه آماری بین فعالیت نورونهای هسته های PGI در دو گروه فوق نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف ($p<.0001$) آنها است (۳۷). در مطالعه ما میانگین فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای وابسته به مورفین

$12/79 \pm 0/25$ و میانگین فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای غیر وابسته به مورفین $17/73 \pm 0/34$ اسپایک در ثانیه بوده است. در ثبتهای ما فعالیت نورونهای هسته PGI از $4/45$ تا $30/90$ اسپایک در ثانیه است، که در محدوده ثبتهای Aston-Jones و حق پرست از نورونهای هسته PGI است. مقایسه آماری بین فعالیت نورونهای هسته های PGI در دو گروه فوق نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف

($p < 0.001$) آنها است. که انطباق بسیار زیاد با اطلاعات قادری و همکاران دارد. وجود اختلاف بین فعالیت نورونهای هسته PGI در دو گروه فوق می تواند بیانگر وجود نوعی سازش پذیری و تغییرات سلولی - مولکولی در نورونهای هسته PGI در موشهای وابسته به مورفین نسبت به کنترل باشد. تغییرات بیان و رهایش مواد نوروشیمیایی در آورانهای هسته LC از هسته PGI ممکن است اهمیت زیادی در تنظیم فعالیت نورونهای نورآدرنژیک هسته LC هنگام تزریق مزمن اوپیائتها داشته باشد. PGI نه تنها به عنوان منبع اصلی گلوتامات برای هسته LC تلقی می شود (۳۰)، بلکه به عنوان منبع مهم آوران اوپیویدی به هسته LC نیز است (۴۱). Aston-jones تفاوت فعالیت نورونها را در مطالعات خود مربوط به داروی بیهوشی یا نحوه ایجاد شرایط وابستگی به مورفین می داند. او معتقد است که داروی بیهوشی احتمالاً می تواند اثرات افزایشی فعالیت نورونها را از بین برده و یا بر نحوه وابسته شدن روی فعالیت ذاتی نورونهای وابسته شده تأثیر بگذارد (۴۲). این مطلب را نیز نباید از ذهن دور داشت که گروههای نورونی در هسته PGI دارای فرکانسهای فعالیت متفاوتی هستند. در ثبتهای انجام یافته احتمال این خطا وجود دارد که در آزمایشات مختلف، نورونهای متفاوتی مورد ثبت قرار گیرند. این نورونها در صورت همگن بودن، می توانند پاسخی را ارایه دهند که دارای پراکندگی کمتری بوده و احتمالاً از نظر بروز اثرات وابستگی به عوامل دارویی نیز دارای تشابهات زیادی بوده و می توانند درصد بیشتری پاسخ را به یک سمت مشخص سوق دهند. بنابراین اگر فرض کنیم که نورونهای هسته PGI همگی دارای ویژگیهای یکسانی نیستند این احتمال وجود خواهد داشت که در هنگام استخراج فعالیت نورونها گروههای نورونی یک دست مورد ثبت واقع نشوند. انجام این تحقیق ضروری به نظر می رسد که نورونها در هسته PGI از نظر رفتارهای وابستگی مورد تقسیم بندی قرار دهیم.

همچنان که در شکل ۴ ملاحظه می شود تزریق موضعی ۱۰۰ نانومول فورسکولین در داخل هسته PGI در موشهای کنترل باعث افزایش ۱۷/۵۲ درصدی فعالیت این نورونها به مدت ۱۰/۶ دقیقه شد و در موشهای وابسته به مورفین سبب کاهش ۷۵/۲۶ درصدی به مدت ۴۷/۲۵ دقیقه شد. این اطلاعات نشان دهنده تفاوت در پاسخدهی نورونهای هسته PGI به فورسکولین در موشهای وابسته نسبت به موشهای غیروابسته به مورفین است. یک پدیده مهم که در مواجهه مزمن با اپیوئیدها در سطح سلولی اتفاق می افتد تغییرات افزایشی آدنیلات سیکلاز است. در مصرف حاد اپیوئیدها ایزوفرمهایی از AC دچار مهار می شود و در مصرف طولانی مدت دچار تغییرات افزایشی می گردند، از آنجا که فورسکولین باعث فعال کردن آنزیم آدنیلات سیکلاز می شود احتمال این تفاوت در پاسخدهی می تواند ناشی از افزایش حساسیت آدنیلات سیکلاز یا دیگر ترکیبات مسیر CAMP باشد. زایش حساسیت آدنیلات سیکلاز در *in vitro* و *in vivo* به دنبال استفاده مکرر از اپیوئیدها گزارش شده است (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۴۳). احتمال اینکه

در نورونهای هسته PGI در طی فرایند وابستگی تغییرات در ایزوفرمهای مختلف آنزیم AC اتفاق افتاده باشد، وجود دارد. برای تعیین اینکه کدامین ایزوفرم در طی فرایند وابستگی دچار تغییر شده است، بررسیهای دقیق تری لازم است. برای بررسی نقش تغییرات داخلی در نورونهای LC در هیپراکتیویتی ناشی از سندرم محرومیت القایی توسط نالوکسان، Ivanov و Aston-Jones از آنتاگونیستهای GABA و گلوتامات و اوبائین بر روی برشهای مغزی استفاده کردند، این ترکیبات هیچ تأثیری بر روی هیپراکتیویتی نورونی LC به دنبال سندرم محرومیت القایی نگذاشتند، از طرفی مهار کننده PKA (RP-CAMPS) باعث کاهش این هیپراکتیویتی شد که بر نقش PKA در هیپراکتیویتی نورونهای LC القاء شده به وسیله سندرم محرومیت دلالت می کند (۴۴). Kopnisky و Hyman معتقدند که تغییرات افزایشی PKA ممکن است وابسته به CREB نباشد و ممکن است به صورت پس سیناپسی وساطت شود. به علت اینکه در حضور مداوم اپیوئیدها آنزیم AC مهار است، PKA در فرم هالوآنزیم غیر فعال تجمع می یابد. به محض اینکه تعداد مولکول آنزیم cAMP زیاد شود فعالیت کینازی می تواند در سطح پایین CAMP افزایش یابد (۴۵). احتمال اینکه در آزمایشات ما در موشهای وابسته به مورفین این چنین تجمع در PKA نورونهای هسته PGI اتفاق افتاده باشد که با افزایش مقدار cAMP توسط فورسکولین، میزان PKA تجمع یافته بیشتری تجزیه شود و تفاوت پاسخدهی نورونها و رفتارهای مشاهده شده در غیر وابسته نسبت به وابسته به مورفین از تغییر در PKA ناشی شود، وجود دارد. Liu و همکاران با تحریک هسته PGI باعث بروز علائم سندرم محرومیت شبیه وابستگی به بوتورفول (Butorphenol) از قبیل سرپا ایستادن، رفتار جستجو گرانه، دندان قروچه، سگ لرزه، لرزش اندامها و وضعیت غیرطبیعی در موشهای آزاد و غیر وابسته به مورفین شدند. تزریق داخل بطن مغزی آنتاگونیستهای غیر اختصاصی و اختصاصی μ و γ قبل از تحریکات باعث کاهش معنی دار علائم سندرم محرومیت شد و این کاهش توسط آنتاگونیست اختصاص گیرنده K به وجود نیامد (۴۶).

تغییرات سازشی در مسیر CAMP در هسته های مختلف مغزی همراه با نتایج رفتاری این سازشها در این هسته ها توسط دانشمندان مختلف بررسی شده است (۴۵). به طور کلی نتایج رفتاری ما هم جهت با آزمایشات دیگر دانشمندان در هسته های مختلف بر درگیری مسیر CAMP در هسته PGI در روز علائم سندرم محرومیت دلالت دارد و اینکه چرا در موشهای وابسته به مورفین علائم سندرم بروز نکرد احتمالاً به دلیل مهار نورونی است که در آزمایشات الکتروفیزیولوژیک مشاهده شده است.

References

1. Leshner AI: Addiction is a brain disease and it matters. *Science* 1997 ; 278: 45-47
2. Kalivas P: Neurocircuitry of addiction. In *Neuropsychopharmacol*, LD Kenneth, C Dennis, TC Joseph, N Charles (ed). Amer Coll Neuropsychopharmacol, 2002; 3357-1366
3. Williams JT, Macdonald JC, Manzoni O: Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 2001; 81 299-343
4. Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL: Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 1993 11: 995-1006
5. Terwilliger RZ, Beither-Johnson D, Sevarino KA, Crain SM, Nestler EJ: A general role for adaptation in G-protein and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function *Brain Res* 1991; 548: 100-110
6. Widnell KL, Self DW, Lane SB, Russell DS: Regulation of CREB expression in vivo: evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 306-315
7. Bonci A, Williams JT: A common mechanism mediates long-term changes in synaptic transmission after chronic cocaine and morphine. *Neuron* 1996 16 631-639
8. Bonci A, Williams JT: Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* 1997 17: 796-803
9. Tolliv B, Berger S: Evidence for involvement of ventral tegmental area cyclic AMP systems in behavioral sensitization to psychostimulants *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 411-420
10. Jolas T, Nestler EJ, Aghajanian GK: Chronic morphine increases GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience* 2000; 95 433-443
11. Maldonado R, Valverde O, Garbay C, Roques BP: Protein kinases in the locus coeruleus and periaqueductal gray matter are involved in the expression of opiate withdrawal. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995 352: 565-575
12. Punch L, 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
13. Duman RS, Tallman JF, Nestler EJ: Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in brain: specific effects in locus coeruleus. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246: 1033-1039
14. Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK, Nestler EJ: CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci* 1997; 7890-7901
15. Matsuoka I, Maldonado R, Defer N, Noel F, Hanoune J, Roques BP: Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA. *Eur J Pharmacol* 1994; 268: 215-221
16. Nestler EJ: Molecular neurobiology of drug addiction. *Neuropsychopharmacol* 1994; 11: 77-87
17. Nestler EJ: Total recall: the memory of addiction. *Science* 2001; 292: 2266-2267.
18. Nestler EJ, Aghajanian GK: Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 1997; 278: 58-63
19. Avidor-Reiss T, Neo I, Levy R, Pfeuffers T, Vogel Z: Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V supersensitization. *J Biological Chem* 1996; 271(35): 21309-21315
20. Avidor-Reiss T, Bayewitch M, Levy R, Matus-Leibovitch N, Nevo I, Vogel Z: Adenylyl cyclase supersensitization in opioid receptor-transfected Chinese hamster ovary cells following chronic opioid treatment. *J Biol Chem* 1995; 270: 29732-29738
21. De Vries TJ, Van Vliet BJ, Hogenboom F, Wardeh G, Van der Laan JW, Mulder AH, Schoffelmeer: Effect of chronic prenatal morphine treatment of mu-opioid receptor-regulated cyclase activity and neurotransmitter release in rat slices. *Eur J Pharmacol* 1991; 208: 97-104
22. Van Vliet BJ, De Vries TJ, Wardeh G, Mulder AH, Schoffelmeer AN: Mu-opioid receptor-regulated adenylate cyclase activity in primary cultures of rat striatal neurons upon chronic morphine exposure. *Eur J Pharmacol* 1991; 208: 105-111
23. Wang Z, Bilsry EJ, Porreca F, Sadée W: Constitutive -receptor activation as a regulatory mechanism underlying narcotic tolerance and dependence. *Life Sci* 1994; 54: 339-350
24. Chakrabarti S, Wang L, Tang WJ, Gintzler RA: Chronic morphine augments adenylyl cyclase phosphorylation: relevance to altered signaling during tolerance/dependence. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 949-953
25. Chakrabarti S, Rivera M, Yan SZ, Tang WJ, Gintzler AR: Chronic morphine augments G/Gs stimulation of adenylyl

- cyclase: relevance to opioid tolerance. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 655-662
26. Saiepour MH, Semnani S, Fathollahi Y: Occurrence of morphine tolerance and dependence in the nucleus Paragigantocellularis neurons. *Eur J Pharmacol* 2001; 411(1-2): 892
27. Azami J, Wright DM, Roberts MHT: Effects of morphine and naloxone on the responses to noxious stimulation of neurons in the nucleus reticularis Paragigantocellularis. *Neuropharmacol* 1981; 20: 869-876
28. Ennis M, Aston-Jones G: Two physiologically distinct populations of neurons in the ventrolateral medulla innervate the locus coeruleus. *Brain Res* 1987; 425(2): 275-282
29. 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
30. 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
31. 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
32. Rasmussen K, Krystal JH, Aghajanian GK: Excitatory amino acids and morphine withdrawal: differential effects of central and peripheral kynurenic acid administration. *Psychopharmacol (Berlin)* 1991; 105: 508-512
33. Yijiang C: Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. *Cellular Signalling* 2000; 12(4): 195-204
34. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG: Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 461-480
35. Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K: Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 2001; 269: 13-25
36. Nicole D, Martin BB, Jacques H: Tissue specificity and physiological of various isoform of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F400-F416
- ۳۷- قادری پاکدل فیروز، سمنانیان سعید، فتح‌الهی یعقوب: نقش نورون‌های هسته پارازیگانتوسولولاریس (PGI) بر بروز وابستگی به مرفین در نورون‌های هسته لوكوس سرلئوس (LC) موش صحرايي. رساله دوره دکتری فیزیولوژی انسانی. دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، پاییز ۱
38. Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd edition Academic Press 1986; 62-68
۳۹. قادری پاکدل فیروز، سمنانیان سعید، فتح‌الهی یعقوب، پور میرجعفری فیروز آبادی سید محمد: روش جدید برای دریافت و تجزیه و تحلیل فعالیت الکتریکی سلول‌های عصبی. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳۸۱، سال ۶، شماره ۱، صفحه ۳۹-۵۴۰
40. Haghparast A, Semnani S, Fathollahi Y: Morphine tolerance and dependence in the nucleus Paragigantocellularis: Single unit recording study in vivo. *Brain Res* 1998; 814: 71-77
41. Johnson AD, Peoples J, Stornetta RL, Van Bockstaele EJ: Opioid circuits originating from the nucleus Paragigantocellularis and their potential role in opioid withdrawal. *Brain Res* 2002; 955: 72-84
42. Foote SL, Aston-Jones G, Bloom FE: Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Prog Nat Sci USA* 1980; 7(5): 3033-3037
43. Liu JG, Anand KJS: Protein kinases modulate the cellular adaptation associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 2001; 38: 1-19
44. Ivanov A, Aston-Jones G: Local opiate withdrawal in locus coeruleus neurons in vitro. *J Neurophysiol* 2001; 85(6): 2388-2397
45. Kopnisky KI, Hyman SE: Molecular and cellular biology of addiction. In *Neuropsychopharmacology*, LD Kenneth, C Dennis, TC Joseph, N Charles (eds). Amer Coll Neuropsychopharmacol 2002; pp 1367-1379
46. Liu N, Rockhold RW, Ho IK: Electrical stimulation of nucleus Paragigantocellularis induces opioid withdrawal-like behaviors in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 62(2): 263-271

