

بررسی اثر رولیپرام بر فعالیت پایه نورونهای هسته پارازیگانتوسلولاریس و رفتارهای سندرم محرومیت در موشهای صحرایی وابسته به مورفین

حسین عزیزی [☆]M.Sc.، سعید سمنیان [☆]Ph.D.، یعقوب فتح‌الهی [☆]Ph.D.، فیروز قادری پاکدل [☆]Ph.D.
حسن اژدری زرمهری [☆]M.Sc.، کامبیز رهام‌پور [☆]M.Sc.

[☆] دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، گروه فیزیولوژی

پست الکترونیک: ssemnan@modarres.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۱۳/۱۳/۸۳، پذیرش مقاله: ۱۶/۳/۸۴

*** هدف:** بررسی اثر رولیپرام، به عنوان مهارکننده اختصاصی فسفودی استراز نوع ۴ درون‌هسته‌ای، بر فعالیت خود به خودی نورونهای هسته پارازیگانتوسلولاریس (PGi: Paragigantocellularis) و القای علائم رفتاری سندرم محرومیت در موشهای وابسته به مورفین

*** مواد و روشها:** از ثبت تک واحدی خارج سلولی برای ثبت فعالیت خود به خودی نورونهای هسته PGi در موشهای نر، نژاد NMRI، وزن ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم که با یورتان بیهوش شده بودند، استفاده شد. رولیپرام (۱/۰، ۱ و ۱۰ میکرومول) در داخل هسته PGi ریز تزریق (microinjection) شد. در بخشی دیگر برای بررسی علائم سندرم محرومیت، با ریز تزریق ۱۰ میکرومول رولیپرام داخل هسته PGi رفتارهای موش را مورد مطالعه قرار دادیم.

*** یافته‌ها:** تزریق ۱/۰ و ۱ میکرومول رولیپرام در موشهای کنترل تغییر معنی‌داری در فعالیت پایه نورونهای هسته PGi ایجاد نکرد. در حالی که تزریق رولیپرام با غلظت ۱۰ میکرومول در موشهای کنترل سبب افزایش معنی‌دار و در موشهای وابسته به مورفین باعث کاهش معنی‌داری در فعالیت پایه نورونهای هسته PGi گردید. تزریق ۱۰ میکرومول رولیپرام در موشهای کنترل با حرکت آزاد باعث بروز جویدن و دندان قروچه و در موشهای وابسته به مورفین انزال و به خود پیچیدن شد. در موشهای وابسته به مورفین تزریق ۱۰ میکرومول رولیپرام داخل هسته PGi قبل از تزریق زیر جلدی نالوکسان سبب ظاهر نشدن علائم بی‌قراری، لرزش، پریدن و افتادگی پلکها و کاهش علائم دندان قروچه و به خود پیچیدن شد.

*** نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد تغییر سازشی فعالیت مسیر cAMP در نورونهای هسته PGi به دنبال مصرف طولانی مدت مورفین، نقش مهمی در وابستگی به مورفین دارد.

کل واژگان: هسته پارازیگانتوسلولاریس، cAMP، رولیپرام، ثبت تک واحدی خارج سلولی، مورفین

نشریه پزشکی یاخته، سال هفتم، بهار ۸۴، شماره ۲۵، صفحات ۴۲-۳۵

مقدمه

فسفو دی استرازها خانواده بزرگ از آنزیمهایی هستند که cAMP و (cGMP: Cyclic guanosine monophosphate) را هیدرولیز می‌کنند. آنها بر اساس چگونگی تنظیم و نوع سوسترها به ۱۱ خانواده مجزا تقسیم‌بندی شده‌اند. دو خانواده از آنها یعنی نوع ۴ و نوع ۷ از cAMP به عنوان سوسترهای اختصاصی استفاده می‌کنند. فسفو دی استراز نوع ۴، آنزیم اصلی است که cAMP را در مغز پستانداران هیدرولیز می‌کند و یک نقش کلیدی در تنظیم مقدار cAMP نورونی ایفا می‌کند. رولیپرام با مهار فسفو دی استراز نوع ۴ سبب جلوگیری از هیدرولیز cAMP در محیط شده و غلظت آن را بالا می‌برد (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). مدارکی دال بر نقش نورونهای PGi در بیان علائم سندرم محرومیت اتونومیک و فیزیکی ناشی از وابستگی به اپیویدها وجود دارد (۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷). Rasmussen و Aghajanian گزارش نموده‌اند که علائم محرومیت اپیویدی موضعی در هسته LC با تخریب هسته PGi کاهش می‌یابد و برای اولین بار به نقش هسته PGi در ایجاد تحمل و وابستگی به مورفین پی بردند (۱۴).

مدتها بعد Liu و همکاران نشان دادند که می‌توان با تحریک

اگرچه اپیویدها به طور موثر در تسکین درد مفیدند، اما شدیداً اعتیاد آورند. با تجویز مکرر داروهای اپیویدی، مکانیسمهای سازشی آغاز می‌گردند که منجر به تغییرات کوتاه مدت و ماندگار در عملکرد نورونها و شبکه‌های عصبی حساس به اپیویدها می‌گردند. از چنین مکانیسمهایی می‌توان به ایجاد تحمل، وابستگی و حساس شدن اشاره کرد (۱). اثرات سلولی و مولکولی اپیویدها در فهم حوادثی که منجر به تحمل (Tolerance) و وابستگی (Dependence) می‌شوند، مهم هستند (۱). یکی از رایج‌ترین مکانیسمهای مولکولی ثابت شده در اعتیاد، تغییرات افزایشی (Up-Regulation Changes) در مسیر هدایت سلولی (cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate) است که در سلولهای عصبی برخی هسته‌های مغزی از قبیل هسته آکومینس (۲)، (۳)، تگمنتوم شکمی (۴)، هسته رافه پشتی (۵)، ماده خاکستری قنات صدری (۶، ۷) و هسته آبی (L. C) (۸، ۹) به دنبال استفاده مکرر از اپیویدها به وجود می‌آید.

دادند (۱۹).

روش آماده کردن رولیپرام جهت تزریق

ابتدا رولیپرام با حداکثر غلظت در (DMSO: Dimethyl sulfoxide) حل شد (۷/۳ میلی گرم بر میلی لیتر). سپس در روز آزمایش این محلول با (ACSF: Artificial cerebrospinal fluid) رقیق شد تا رولیپرام با دوزهای ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول به دست آید. غلظت DMSO نهایی در این دوزها به ترتیب ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۳ درصد بود.

آماده کردن میکروالکتروود

دو میکروالکتروود شیشه‌ای کنار هم قرار داده می‌شد و با کشنده میکروالکتروود طوری کشیده می‌شدند که یک نوک با دو مجرای جداگانه برای تزریق فراهم شود، سپس میکروالکتروود فلزی به منظور ثبت در شیار بین آن دو چسبانده شد به طوری که نوک آن حدود ۲۰-۳۰ میکرومتر جلوتر از نوک الکتروود تزریق باشد. الکتروودهای تزریق توسط لوله پلی اتیلن به سرنگ هاملتون متصل شدند. از یک مجرا برای تزریق حلال دارو و از مجرای دیگر برای تزریق دارو استفاده شد.

جراحی و ثبت الکتروفیزیولوژیکی

موشها بعد از توزین با تزریق یورتان به صورت داخل صفاقی (۱/۲ گرم بر کیلوگرم (i.p.) بیهوش شدند. ابتدا نای تشریح شده و درون آن کانول مناسبی کار گذاشته شد تا در طول جراحی و ثبت الکتروفیزیولوژیکی حیوان به طور طبیعی تنفس نماید. در طول آزمایش سطح بیهوشی کنترل شده و در صورت نیاز دوزهای تکمیلی از داروی بیهوشی تزریق می‌شد. موشها در استریوتاکسی قرار گرفته و محل ورود الکتروود ثبت با استفاده از اطلس پاکسینوس تعیین می‌گردید (فاصله از بریگما ۱۱/۹۶-، از خط وسط ۱/۶ و عمق از سخت شامه ۹ میلی متر) (۲۲). سپس با مته دندانپزشکی سوراخ مناسبی بدون آسیب به سخت شامه ایجاد می‌شد و الکتروود آماده وارد مغز می‌شد. بعد از پایدار شدن فعالیت نورون، ثبت به مدت ۲۰ دقیقه صورت می‌گرفت. بعد از تزریق حلال دارو، ثبت به مدت ۱۵ دقیقه دیگر ادامه می‌یافت، سپس دارو در کنار نورون تزریق می‌شد. 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 روش ثبت تک واحدی به صورت Off-line صورت می‌گرفت. داده‌های خروجی برنامه، تعداد اسپایک در مدت ۰/۵ ثانیه بود، همچنین فواصل اسپایکها را به دست می‌آورد. فایل مذکور حاوی اطلاعات اولیه (PSTH: PeriStimulus Time Histogram) و (ISI: InterSpike Interval Histogram) مربوط به آزمایش بود، سپس میانگین فعالیت در یک دقیقه و دقایق متوالی محاسبه می‌گشت (۲۳). بعد از هر آزمایش با توجه به نشانه گذاری محل ثبت به وسیله Pontamine Sky Blue، به ترتیب سالی نرمال و فرمالین

الکتریکی هسته PGI در موشهای غیروابسته به مورفین رفتارهایی شبیه رفتارهای مشاهده شده طی محرومیت ناشی از تزریق نالوکسان را مشاهده کرد که این رفتارها تا حدود ۳۰ دقیقه بعد از تحریک PGI نیز باقی می‌ماند (۱۸).

اژدری و همکاران در مطالعات خود نشان دادند پاسخدهی نورونهای هسته پارازیگانتوسولولاریس به فورسکولین (فعال کننده آدنیلات سیکلاز) در موش صحرائی وابسته به مورفین نسبت به گروه کنترل متفاوت است. آنها احتمال دادند که تغییر سازشی فعالیت مسیر cAMP در نورونهای هسته PGI به دنبال مصرف طولانی مدت مورفین، می‌تواند در تحمل و وابستگی به مورفین نقش داشته باشد (۱۹).

با توجه به اینکه افزایش حساسیت آدنیلات سیکلاز به دنبال استفاده مکرر از اپیویدها گزارش شده است (۲۰، ۲۱)، معلوم نیست این تغییر سازشی فعالیت مسیر cAMP در نورونهای هسته PGI ناشی از افزایش حساسیت (supersensitization) آدنیلات سیکلاز است یا تغییرسازشی در بقیه مسیر cAMP اتفاق افتاده است. برای این منظور در مطالعه حاضر افزایش میزان cAMP با مهارکننده اختصاصی فسفودی استراز نوع ۴، رولیپرام (rolipram)، در گروه موشهای سالم و وابسته به مورفین و پاسخدهی نورونهای هسته PGI بررسی شده است.

مواد و روشها

حیوانات آزمایشگاهی

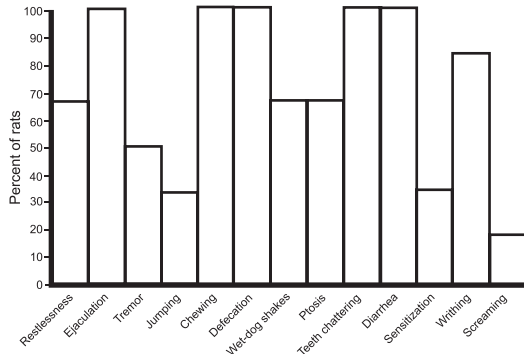
در این پژوهش از ۳۶ سر موش صحرائی سفید نر، نژاد NMRI در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم که از انستیتو رازی تهیه شده بود، استفاده گردید. اتاق نگهداری دارای سیکل روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی ساعت ۸ صبح) با دمای ۲۲±۳ درجه سانتی گراد بود. تمام آزمایشها در روز انجام شده و آب و غذای کافی برای حیوانات غیروابسته به صورت آزاد وجود داشت.

در گروه حیوانات تحت ایجاد وابستگی، محلول حاوی مورفین و غذا به طور آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد. انتخاب موشها برای آزمایشها به صورت تصادفی ساده بود. هر موش فقط یک بار مورد آزمایش قرار می‌گرفت و تلاش شد تا شرایط نگهداری و محیط قفسها مطابق شرایط اعلام شده در قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی باشد.

ایجاد وابستگی به مورفین به وسیله آب آشامیدنی

وابستگی به مورفین، با اضافه کردن مورفین به آب خوراکی ایجاد شد. برای آزمایش شیوع وابستگی در موشها با تزریق زیرجلدی نالوکسان (۳ میلی گرم بر کیلوگرم)، سندرم محرومیت در آنها القا گردید. پس از تزریق نالوکسان، موشها وارد مرحله سندرم محرومیت شده و علائم محرومیت را نشان

ثانیه، پس از تزریق حلال فعالیت آنها $10/38 \pm 3/18$ اسپایک در ثانیه و بعد از تزریق رولپیرام ۱ میکرومول به $10/56 \pm 3/28$ اسپایک در ثانیه رسید.



نمودار ۱: درصد مشاهده شده علایم رفتاری محرومیت از مورفین در موشهای گروه وابسته به مورفین طی ۶۰ دقیقه پس از ایجاد محرومیت ناشی از تزریق نالوکسان (n=۶)

نمودار سه (A) مشخص می‌نماید که در موشهای غیر وابسته به مورفین تزریق داخل هسته‌ای حلال باعث تغییر معنی‌دار فعالیت نورونهای هسته PGI نگردیده است، ولی دوز ۱۰ میکرومول رولپیرام سبب افزایش معنی‌دار فعالیت نورونهای هسته PGI شده است ($P < 0/05$). مقایسه آماری میانگین فعالیت نورونها (n=۷) نشان می‌دهد که نورونهای هسته PGI قبل از تزریق حلال دارای فعالیت پایه $19/16 \pm 4/4$ اسپایک در ثانیه، پس از تزریق حلال $10/03$ درصد DMSO+ACSF فعالیت آنها $18/51 \pm 4/04$ اسپایک در ثانیه و بعد از تزریق رولپیرام ۱۰ میکرومول فعالیت آنها ۱۵/۲ درصد افزایش یافته و به مقدار $21/07 \pm 4/46$ اسپایک در ثانیه رسید. اثر دارو از ۶/۳ دقیقه بعد از تزریق دارو شروع شده و به مدت ۵/۶ دقیقه ادامه داشت. بعد از گذشت ۱۱/۹ دقیقه از تزریق دارو به سطح فعالیت قبل از تزریق بازگشت.

بررسی تزریق داخل هسته‌ای ۱۰ میکرومول رولپیرام بر فعالیت پایه نورونهای هسته PGI در موشهای وابسته به مورفین

همچنان که در نتایج نشان داده شده نمودار سه (B) مشخص می‌گردد که در موشهای وابسته به مورفین تزریق داخل هسته‌ای حلال $10/03$ درصد DMSO+ ACSF باعث تغییر معنی‌دار فعالیت نورونهای هسته PGI نشده ولی دوز ۱۰ میکرومول رولپیرام سبب کاهش معنی‌دار فعالیت نورونهای هسته PGI شده است ($P < 0/05$). مقایسه آماری میانگین فعالیت نورونها (n=۶) نشان می‌دهد که نورونهای هسته PGI قبل از تزریق حلال دارای فعالیت پایه $19/17 \pm 4/1$ اسپایک در ثانیه، پس از تزریق حلال فعالیت آنها $18/81 \pm 4$ اسپایک در ثانیه و بعد از تزریق رولپیرام فعالیت آنها ۴۷ درصد کاهش یافته و به

فسفات ۱۰ درصد از طریق قلب تزریق می‌شدند. به دنبال آن مغز حیوان از حجمه خارج شده و در محلول فرمالین فسفات تا مرحله برش گیری نگهداری می‌شد.

روش ارزیابی علایم رفتاری بعد از تزریق داخل هسته‌ای رولپیرام

برای تزریق داروی رولپیرام، حیوان پس از بیهوشی در دستگاه استریوتاکسی قرار می‌گرفت، کانولهای تزریق و راهنما در هسته پارازیگانتوسلولاریس تعبیه شد. بعد از اتمام جراحی حیوان دوره بهبودی را طی می‌کرد و پس از دوره بهبودی، ماده مزبور به درون هسته PGI در موش که آزادانه حرکت می‌کرد تزریق شد. برای هر حیوان در این قسمت رفتارهای مشاهده شده سندرم محرومیت ناشی از تزریق درون هسته‌ای رولپیرام شمارش و تغییر رفتارها نسبت به گروههای کنترل ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده از داده‌ها در برنامه آماری GB-stat مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و بین داده‌ها تستهای t-test، One-way ANOVA و One-way ANOVA with Tukey's protected t-test انجام شد.

یافته‌ها

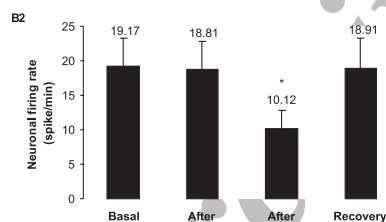
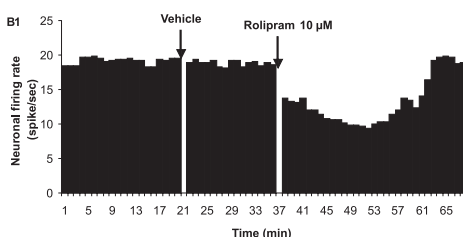
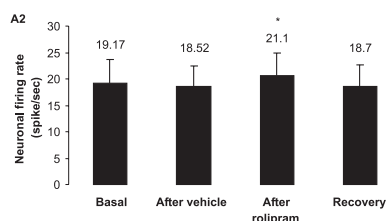
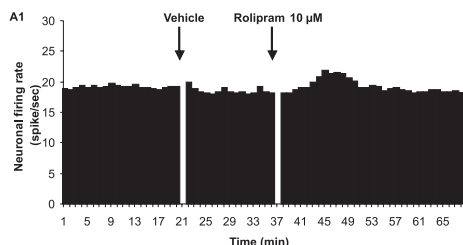
ارزیابی علایم رفتاری سندرم محرومیت ناشی از تزریق نالوکسان در گروههای مختلف موشهای مورد آزمایش همچنان که از نتایج حاصل از نمودار یک استنتاج می‌شود موشهای تحت تیمار مورفین با تزریق نالوکسان علایم محرومیت از مورفین را نشان می‌دهند در حالی که تزریق نالوکسان در موشهای گروه غیروابسته به مورفین تغییر رفتاری ایجاد نمی‌کرد.

اثر تزریق رولپیرام (۱/۰، ۱ و ۱۰ میکرومول) بر فعالیت پایه نورونهای هسته PGI در گروه غیروابسته به مورفین

همان طور که از نتایج نمایش داده شده در نمودار دو استنتاج می‌شود در موشهای غیر وابسته به مورفین تزریق داخل هسته‌ای حلال $10/03$ درصد DMSO+ACSF و غلظت ۰/۱ و ۱ میکرومول رولپیرام باعث تغییر معنی‌دار فعالیت نورونهای هسته PGI نشد ($P > 0/05$).

نمودار دو (A)، مقایسه آماری میانگین فعالیت نورونها (n=۵) نشان می‌دهد که نورونهای هسته PGI قبل از تزریق حلال دارای فعالیت پایه معادل $22/6 \pm 0/52$ اسپایک در ثانیه، پس از تزریق حلال فعالیت آنها $22/12 \pm 4/98$ اسپایک در ثانیه و بعد از تزریق رولپیرام ۰/۱ میکرومول به $21/96 \pm 5$ اسپایک در ثانیه رسید و در شکل دو (B) نورونهای هسته PGI قبل از تزریق حلال دارای فعالیت پایه $10/71 \pm 3/25$ اسپایک در

($P < 0.005$). همچنین میانگین درصد تغییرات پاسخ در گروه غیروابسته به مورفین $15/2 \pm 3/7$ افزایش و در گروه وابسته به مورفین $47/2 \pm 5/6$ کاهش یافت که اختلاف معنی داری با هم دارند ($P < 0.005$).

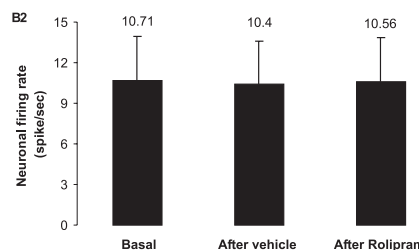
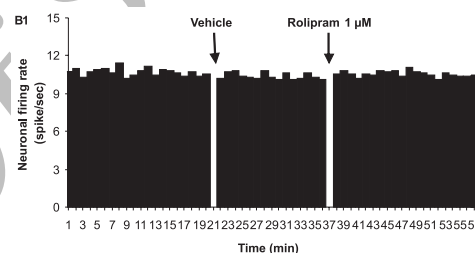
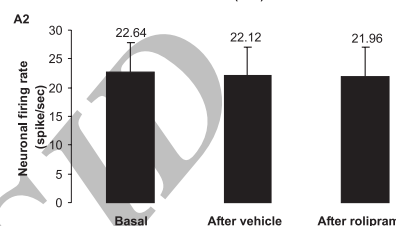
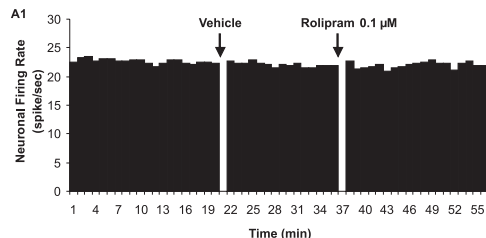


نمودار ۳: اثر تزریق داخل هسته‌ای ۱۰ میکرومول رولپیرام روی فعالیت پایه نورونهای هسته PGI در موشهای وابسته (A) و غیروابسته (B) به مورفین. نمودار میانگین PSTH فعالیت نورونهای هسته PGI قبل از تزریق حلال (۰/۰۰۳ درصد DMSO+ACSF)، بعد از تزریق حلال، بعد از تزریق دارو و دوره بازگشت به حالت پایه، A2: مقایسه آماری فعالیت نورونهای هسته PGI در دوره‌های منکور ($n=5$, values are mean \pm SEM, $student\ t\text{-test}$, $**p < 0.05$). نمودار میانگین PSTH فعالیت نورونهای هسته PGI قبل از تزریق حلال (۰/۰۰۳ درصد DMSO+ACSF)، بعد از تزریق حلال، بعد از تزریق دارو و دوره بازگشت به حالت پایه، B2: مقایسه آماری فعالیت نورونهای هسته PGI در دوره‌های منکور ($n=5$, student t-test $p < 0.05$, values are mean \pm SEM).

بررسی علایم رفتاری در موشهای غیروابسته و وابسته به مورفین بعد از تزریق داخل هسته‌ای رولپیرام (۱۰ میکرومول)

همان طور که در نمودار پنج (A) مشاهده می‌شود ۳۳/۳ درصد

مقدار $10/12 \pm 2/7$ اسپایک در ثانیه رسید. اثر دارو از ۳ دقیقه بعد از تزریق دارو شروع شده و به مدت ۱۹ دقیقه ادامه داشت. بعد از گذشت ۲۲ دقیقه از تزریق، دارو به سطح فعالیت قبل از تزریق بازگشت.



نمودار ۲: اثر تزریق داخل هسته‌ای ۱ و ۰/۱ میکرومول رولپیرام روی فعالیت پایه نورونهای هسته PGI در موشهای غیروابسته به مورفین. A1: نمودار میانگین PSTH فعالیت نورونهای هسته PGI قبل از تزریق حلال (۰/۰۰۳ درصد DMSO+ACSF)، بعد از تزریق حلال و بعد از تزریق دارو. A2: مقایسه آماری فعالیت نورونهای هسته PGI در سه دوره منکور ($n=5$, values are mean \pm SEM). نمودار میانگین PSTH فعالیت نورونهای هسته PGI قبل از تزریق حلال (۰/۰۰۳ درصد DMSO+ACSF)، بعد از تزریق حلال و بعد از تزریق دارو. B2: مقایسه آماری فعالیت نورونهای هسته PGI در سه دوره منکور ($n=7$, values are mean \pm SEM).

مقایسه اثر رولپیرام (۱۰ میکرومول) بر مدت زمان پاسخ و درصد تغییر فعالیت نورونهای هسته PGI در موشهای غیروابسته و وابسته به مورفین

با توجه به نمودار چهار مقدار میانگین مدت زمان پاسخ به رولپیرام (۱۰ میکرومول) در گروه غیروابسته به مورفین $5/6 \pm 1/6$ و در گروه وابسته به مورفین $19 \pm 1/7$ دقیقه است که اختلاف معنی داری با هم دارند

بررسی تاثیر تزریق داخل هسته‌ای رولیپرام (۱۰ میکرومول) بر بروز علائم رفتاری سندرم محرومیت ناشی از تزریق نالوکسان در موشهای وابسته به مورفین

در گروهی از موشهای وابسته به مورفین پس از پایان تزریق داخل هسته‌ای حلال (۰/۰۳ درصد DMSO+ ACSF) علائم رفتاری سندرم محرومیت ناشی از تزریق نالوکسان تا یک ساعت ثبت شد. در گروه دیگر از موشهای وابسته نیز پس از پایان تزریق داخل هسته‌ای رولیپرام (۱۰ میکرومول) علائم رفتارهای سندرم محرومیت ناشی از تزریق نالوکسان تا یک ساعت ثبت شد. درصد بروز رفتارها در شکل پنج (B) مشاهده می‌شود. همانطور که در نمودار مشاهده می‌شود رولیپرام سبب کاهش درصد بروز رفتارهای ناشی از تزریق نالوکسان در موشهای وابسته به مورفین می‌شود.

بحث

در این تحقیق ما از رولیپرام که مهارکننده اختصاصی فسفودی استراز نوع ۴ است به منظور بررسی وجود تغییر در مسیر cAMP در نورونهای هسته PGI موشهای وابسته به مورفین نسبت به موشهای غیروابسته به مورفین استفاده کردیم. آزمایشها شامل دو بخش بود: یک بخش مربوط به آزمایشهای الکتروفیزیولوژیک و بخش دیگر آزمایشهای رفتاری. تزریق موضعی ۱۰ میکرومول رولیپرام به داخل هسته PGI در موشهای غیر وابسته به مورفین سبب افزایش ۱۵/۲ درصدی فعالیت این نورونها به مدت ۵/۶ دقیقه شد.

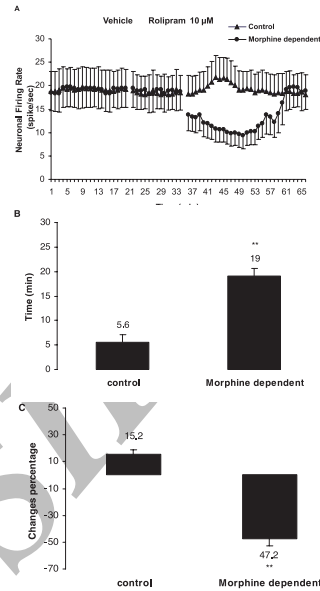
همین دوز در موشهای وابسته به مورفین سبب کاهش ۴۷/۲ درصدی به مدت ۱۹ دقیقه شد. در بخش آزمایشهای رفتاری با توجه به تاثیر معنی دار رولیپرام ۱۰ میکرومول بر فعالیت پایه نورونهای هسته PGI از این دوز استفاده گردید.

بعد از تزریق داخل هسته PGI، در تعدادی از موشهای غیروابسته به مورفین جویدن و دندان قروچه و در تعدادی از موشهای وابسته به مورفین انزال و به خود پیچیدن طی ۶۰ دقیقه اول بعد از تزریق مشاهده شد. در موشهای وابسته به مورفین زمانی که رولیپرام (داخل هسته PGI) قبل از نالوکسان (زیر جلدی) به کار برده شده در مقایسه با هنگامی که نالوکسان (زیر جلدی) به تنهایی استفاده می‌شود، کاهش چشمگیری در بروز علائم رفتاری سندرم محرومیت دیده می‌شود.

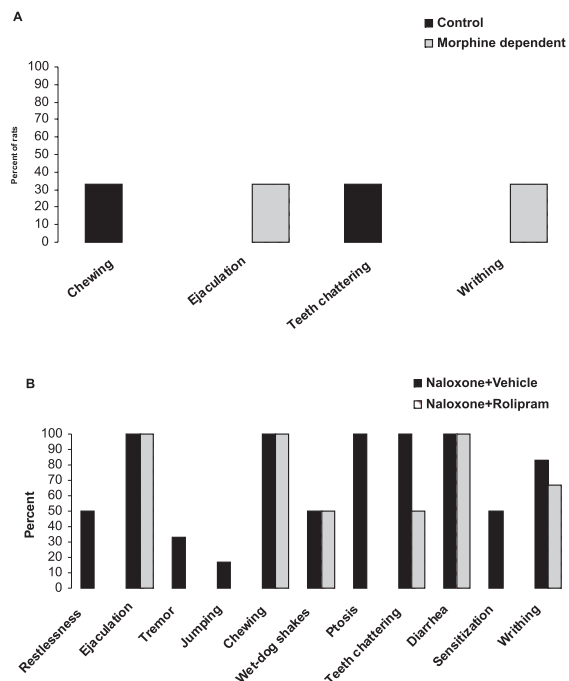
یافته‌های موجود نشان دهنده تفاوت در پاسخدهی نورونهای هسته PGI به رولیپرام در دو گروه موشهای وابسته به مورفین نسبت به موشهای غیروابسته به مورفین است. با توجه به این که رولیپرام سبب جلوگیری از تجزیه cAMP می‌شود، لذا این احتمال وجود دارد که تغییرات مسیر cAMP در نورونهای هسته PGI موشهای وابسته به مورفین ایجاد شده است.

در مطالعاتی که بر روی سلولهای U937 انجام یافته مشخص شده است که ۱۰ میکرومول رولیپرام سبب مهار کامل فعالیت فسفودی استراز نوع ۴ می‌شود و ۰/۱ میکرومول رولیپرام سبب مهار ۵۰ درصدی فعالیت این آنزیم می‌گردد (۲۴). در مطالعات مختلف برای

موشهای غیروابسته به مورفین جویدن و دندان قروچه را در ۶۰ دقیقه اول بعد از تزریق نشان دادند. در حالی که ۳۳/۳ درصد گروه وابسته به مورفین به خود پیچیدن و انزال را نشان دادند.



نمودار ۴: میانگین فعالیت پایه نورونهای هسته PGI بعد از تزریق داخل هسته‌ای حلال (۰/۰۳ درصد DMSO+ACSف) و ۱۰ میکرومول رولیپرام (A). نمودار میانگین مدت زمان پاسخ (B) و میانگین درصد تغییرات فعالیت (C) نورونهای هسته PGI در دو گروه موشهای وابسته و غیروابسته به مورفین به دنبال تزریق رولیپرام (۱۰ میکرومول) (student t-test **p<.005, values are mean ± SEM)



نمودار ۵: درصد مشاهده شده علائم رفتاری در گروه موشهای وابسته به مورفین و غیروابسته به مورفین در طول ۶۰ دقیقه بعد از تزریق رولیپرام (۱۰ میکرومول) داخل هسته PGI. B: تزریق همزمان نالوکسان + حلال (۰/۰۳ درصد DMSO+ ACSF) و نالوکسان + رولیپرام (۱۰ میکرومول) n=۶

سبب کاهش ۷۵/۲۶ درصدی به مدت ۴۷/۲۵ دقیقه می‌شود (۱۹). در مشاهدات ما نیز بالا بردن مقدار cAMP توسط مهار هیدرولیز آن به واسطه فسفو دی استراز نوع ۴ در موشهای غیر وابسته به مورفین سبب افزایش فعالیت و در موشهای وابسته به مورفین سبب کاهش فعالیت شد که با نتایج اژدری و همکاران هم‌سویی دارند. با توجه به تاثیر معنی‌دار رولپیرام ۱۰ میکرومول بر فعالیت پایه نورونهای هسته PGI از این دوز در آزمایشهای رفتاری نیز استفاده کردیم. گزارش شده است که مهارکننده‌های فسفو دی استراز نظیر تیوفیلین، کافئین و فورسکولین در موشهای غیر وابسته به مورفین سبب بروز رفتارهایی نظیر رفتارهای سندرم محرومیت از مورفین و در موشهای وابسته به مورفین سبب تشدید علائم سندرم محرومیت القایی توسط نالوکسان شده‌اند (۱۰). همچنین به نظر می‌رسد که برای بروز علائم رفتاری سندرم محرومیت مقدار cAMP باید به یک مقدار آستانه برسد (۱۰).

Liu و همکاران و Rockold و همکاران با تحریک الکتریکی هسته PGI باعث بروز علائم سندرم محرومیت از قبیل سر پا ایستادن، رفتار جستجوگرانه، دندان قروچه، لرزش سگ خیس، لرزش اندامها و وضعیت غیرطبیعی در موشهای غیر وابسته به مورفین شدند. این رفتارها وابسته به ولتاژ تحریکات بودند (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر تحریک هسته PGI سبب تضعیف علائم سندرم محرومیت شد.

ما نیز با تزریق موضعی رولپیرام در موشهای غیر وابسته به مورفین دندان قروچه و جویدن را مشاهده کردیم. با تزریق موضعی آن در موشهای وابسته به مورفین انزال و به خود پیچیدن مشاهده گردید.

همان‌طور که گفته شد شاید برای بروز رفتارهای سندرم محرومیت مقدار cAMP باید به یک حد آستانه برسد. ما حدس می‌زنیم که تزریق موضعی رولپیرام به داخل PGI نتوانسته است مقدار cAMP را آنقدر بالا ببرد تا بقیه رفتارها مشاهده شود.

در آزمایشهای رفتاری دیگری که انجام شد مشخص گردید که تزریق موضعی رولپیرام به داخل هسته PGI سبب کاهش شدید رفتارهای سندرم محرومیت ناشی از نالوکسان می‌شود، که هم‌سو با نتایج آزمایشهای الکتروفیزیولوژیک است. بنابراین وجود این مشاهدات نیز بر درگیری هسته PGI در بروز علائم سندرم محرومیت دلالت می‌کند. با این حال مشخص نیست که نقش تغییرات cAMP در ایجاد وابستگی به اپیوئیدها در کدام ناحیه مغز بارزتر است که به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز است.

حذف فعالیت فسفودی استرازی این آنزیم از دوز ۱۰ میکرومول رولپیرام استفاده کرده‌اند (۲۵، ۲۶).

در سندرم محرومیت مقدار cAMP حتی ممکن است تا بیش از دو برابر مقدار کنترل افزایش یابد. گزارش شده است که برخی مهارکننده‌های غیراختصاصی فسفو دی استراز نظیر تیوفیلین، کافئین و فورسکولین در موشهای غیر وابسته به مورفین سبب بروز رفتارهایی نظیر رفتارهای سندرم محرومیت از مورفین و در موشهای وابسته به مورفین سبب تشدید علائم سندرم محرومیت القایی توسط نالوکسان شده‌اند (۱۰).

در سلولهای NG-1۰۸ (نوعی سلول عصبی در محیط کشت) نشان داده شده که درمان حاد با مورفین و دیگر اپیاتها فعالیت آدنیل سیکلاز را مهار کرده و سبب کاهش مقدار cAMP می‌شود. با استفاده مکرر از مورفین در این سلولها فعالیت آدنیل سیکلاز و مقدار cAMP به سطح کنترل برمی‌گردد. در زمان سندرم محرومیت افزایش مقدار cAMP به بالاتر از کنترل می‌رسد. فعالیت آدنیل سیکلاز در پاسخ به مهار آن توسط تحریک مزمن گیرنده‌های اپیوئیدی تنظیم افزایشی پیدا می‌کند. بنابراین مهار موقتی فعالیت آدنیل سیکلاز ممکن است در ایجاد وابستگی به مورفین مهم باشد. به دلیل وجود این شواهد Nestler فرضیه cAMP را برای اعتیاد به اپیاتها، وابستگی و سندرم محرومیت پیشنهاد کرد (۱۳، ۲۷).

Takayoshi Mamia و همکاران گزارش نمودند، که مهار موقتی فعالیت آدنیل سیکلاز بدو در معرض قرارگیری به اپیاتها یک مرحله ضروری برای ایجاد وابستگی به آنهاست. زیرا زمانی که از این مهار موقتی توسط تزریق همزمان و مزمن رولپیرام با اپیاتها، جلوگیری به عمل می‌آید، به طور معنی‌داری شدت علائم سندرم محرومیت القایی توسط نالوکسان کاهش می‌یابد. در آزمایشهای دیگر آنها رولپیرام را به صورت حاد بعد از ایجاد وابستگی و نیم ساعت قبل از تزریق نالوکسان به کار برده و مشاهده کردند که تزریق حاد آن اثری بر سندرم محرومیت القایی توسط نالوکسان ندارد. آنها اندازه‌گیری مقدار cAMP را در قشر مغز و تالاموس انجام می‌دادند. با توجه به این مشاهدات پیشنهاد کردند که رولپیرام می‌تواند یک داروی مفید برای کاهش وابستگی به مورفین باشد (۱۰). اژدری و همکاران در مطالعات خود نشان دادند که تزریق موضعی فورسکولین (۱/۱ میکرومول) به داخل هسته PGI در موشهای غیر وابسته به مورفین سبب افزایش ۱۷/۲ درصدی فعالیت این نورونها به مدت ۱۰/۶ دقیقه، و در موشهای وابسته به مورفین



References

1. Williams JT, Macdonald JC, Manzoni O: Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 2001; 81:299-343
2. 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
3. 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

4. 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

5. 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

6. 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's Arch Pharmacol* 1995; 352: 565–575

7. 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

8. 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

9. 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; 17: 7789–7790

10. Mamiya T, Noda Y, Ren X, Hamdy M, Furukawa S, Kameyama T, Yamada K, Nabeshima T: Involvement of cyclic AMP systems in morphine physical dependence in mice: prevention of development of morphine dependence by rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor. *Brit J Pharmacol* 2001; 132: 1111–1117

11. Lourenco CM, Houle S, Wilson AA, Dasilva JN: Characterization of R-[11C]rolipram for PET imaging of phosphodiesterase-4: in vivo binding, metabolism, and dosimetry studies in rats. *Nucl Med Biol* 2001; 28: 347–358

12. Itoh T, Tokumura M, Abe K: Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE- binding activity and BDNF level in learned helplessness rats. *EJP* 2004; 498(1-3):135-42

13. Barad M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H, Kandel E: Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-term potentiation and improve memory. *PNAS* 1998; 95: 15020-25

14. Saiepour MH, Semnani S, Fathollahi Y: Occurrence of morphine tolerance and dependence in the nucleus Paragigantocellularis neurons. *Eur J Pharmacol* 2001; 411(1-2): 85-92

15. 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

16. 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

17. 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

18. 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

۱۹. اژدری زرمهری حسن، سمنانیان سعید، فتح‌الهی یعقوب، قادری پاکدل فیروز: پاسخ‌دهی نورونهای هسته پاراژینگانتوسلولاریس به فورسکولین در موش صحرائی وابسته به مورفین. نشریه پزشکی یاخته ۱۳۸۳، سال ۶، شماره ۲۴، صفحه ۱۹۴–۲۰۱

20. Auidor-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

21. 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

22. Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd edition Academic Press 1986; 62-68

۲۳. 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 ۳۹–۵

24. MacKenzie SJ, Houslay MD: Action of rolipram on specific PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms and on the phosphorylation of cAMP-response-element-binding protein(CREB) and p38 mitogen-activated protein(MAP)

kinase in U937 monocytic cells. *Biochem J* 2000; 347: 571-578

25. Alzheimer C, Sutor B, Bruggencate GT: Disinhibition of hippocampal CA3 neurons induced by suppression of an adenosine A1 receptor-mediated inhibitory tonus: pre- and post synaptic components. *Neuroscience* 1993; 57: 565-575

26. Geoffroy V, Fouque F, Nivet V, Clot JP, Lugnier C,

Desbuquois B, Benelli C: Activation of a cGMP-stimulated cAMP phosphodiesterase by protein kinase C in a liver Golgi-endosomal fraction. *Eur J Biochem* 1999; 259: 892-900

27. Nguyen PV, Woo NH: Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP dependent protein kinases. *Prog Neurobiol* 2003; 71: 401-437



Archive of SID