

# ارزیابی تغییرات سازشی آدنوزین منوفسفات حلقوی در هسته پارازیگانتوسولولاریس موش صحرائی به دنبال وابستگی و محرومیت از مورفین با استفاده از طیف نگاری NMR

مجید حسن پورعزتی <sup>✉</sup> M.Sc.، سعید سمنانیان <sup>✉</sup> Ph.D.، یعقوب فتح الهی <sup>✉</sup> Ph.D.، حسین نادری منش <sup>✉</sup> Ph.D.، تقی الطریحی <sup>✉</sup> Ph.D.

<sup>✉</sup> دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

<sup>✉</sup> دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم، گروه فیزیک

<sup>✉</sup> دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه آناتومی

<sup>✉</sup> آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

**پست الکترونیک: Email:ssemnan@modares.ac.ir**

## مکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱/۱۵، پذیرش مقاله: ۸۴/۸/۱۴

**\* هدف:** بررسی تغییرات متابولیت‌های مختلف سلولی و تولید آدنوزین منوفسفات حلقوی (cAMP) در پاسخ به تحریک آدنیلیل سیکلاز به دنبال وابستگی به مورفین در هسته پارازیگانتوسولولاریس (PGi) موش صحرائی  
**\* مواد و روش‌ها:** برش‌هایی به ضخامت ۳/۵ میلی‌متر از محل هسته PGi مغز موش وابسته به مورفین و کنترل (درهریک از گروه‌ها n=۵) تهیه شد. این برش‌ها در یک حمام بافتی تحت تاثیر فورسکولین (۵۰ میکرومول) IBMX+ (۵۰۰ میکرومول) قرار گرفتند. پس از استخراج عصاره بافتی به روش اسید پرکلریک، میزان ATP، cAMP و فسفوکراتین (Pcr) توسط روش <sup>31</sup>P-NMR و میزان اسید لاکتیک، آلانین، تورین، گابا، گلوتامات، گلوتامین و N-استیل اسپاراتات توسط روش <sup>1</sup>H-NMR در آن اندازه‌گیری شد.

**\* یافته‌ها:** در موش‌های وابسته به مورفین محتوی cAMP در پاسخ به فورسکولین و IBMX در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵، t-test) را نشان داد و محتوی ATP، Pcr، اسید لاکتیک و آلانین از میان ۹ ترکیب اشاره شده در بالا در گروه‌های وابسته در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵، t-test) را نشان داد.

**\* نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تنظیم افزایشی cAMP ناشی از تغییر در فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز یکی از مکانیسم‌های اصلی بیولوژیکی پدیده وابستگی و محرومیت از مورفین را در یاخته‌های عصبی هسته PGi شکل می‌دهد. همچنین وابستگی به مورفین در این حالت هیچ‌گونه تخریب غشایی یا مرگ یاخته عصبی را در سلول‌های این هسته سبب نشده اما تغییرات متابولیکی چشم‌گیری به دنبال وابستگی به مورفین در یاخته عصبی این هسته به وقوع پیوسته است.

**کلیدواژگان:** آدنوزین منوفسفات حلقوی، هسته پارازیگانتوسولولاریس، وابستگی به مورفین، فورسکولین

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هفتم، شماره ۳، پاییز ۸۴، صفحات ۱۳۹-۱۳۲

## مقدمه

هسته پارازیگانتوسولولاریس (Paragigantocellularis) هسته نسبتاً بزرگ به ابعاد ۱×۱×۳ میلی‌متر در ناحیه شکمی-طرفی بصل‌النخاع است (۱). شواهد بسیاری ارائه شده‌اند که این هسته یک ناحیه مهم در ساقه مغز است که علاوه بر این که در بروز اثرات قلبی-عروقی و تنفسی به واسطه فعال شدن سیستم سمپاتیک نقش بازی می‌کند، در مکانیسم بی‌دردی مرکزی نیز دخیل است (۲). پدیده وابستگی و تحمل (Dependence and tolerance) به مورفین در یاخته‌های عصبی هسته PGi توسط روش ثبت الکتروفیزیولوژیک در حالت In Vivo نشان داده شده است (۳). همچنین گزارش شده که تحریک الکتریکی یاخته‌های عصبی این هسته علائمی مشابه با تزریق نالوکسان (Naloxone) به موش‌های وابسته، در موش‌های غیر وابسته به مورفین و به هوش به وجود می‌آورد (۴). این هسته آوران‌های گلوتاماترژیک و

گاباثرژیک بسیاری را به هسته آبی (Locus Coeruleus) ارسال می‌کند (۵). هسته آبی (LC) جزئی از مدار پاداش در مغز بوده و در پدیده محرومیت از مورفین نقش بسیار مهمی را بازی می‌کند (۶). مشخص شده است که ره‌اشدن این دو ناقل عصبی در LC نقش مهمی را در ایجاد علائم الکتروفیزیولوژیک و رفتاری وابستگی و محرومیت از مورفین بازی می‌کنند (۷). از دیدگاه سلولی، افزایش بیش از حد cAMP به دنبال تجویز نالوکسان به عنوان یکی از تحولات و علائم درون سلولی در نورون‌ها جهت توجیه یافته‌های رفتاری و الکتروفیزیولوژیک نتیجه شده از تغییر در فعالیت نورون‌ها به دنبال القای محرومیت از مورفین در نظر گرفته شده و اصطلاحاً به این پدیده "cAMP Upregulation" گفته می‌شود (۸). میزان cAMP درون سلولی خود تحت کنترل دو نوع از آنزیم‌ها است: آدنیلیل سیکلازها (Adenylyl Cyclases) و فسفو دی استرازها

سولفوکساید (DMSO) حل شدند و سپس توسط ACSF به حجم رسانده شدند. غلظت DMSO در محلول‌های نهایی مورد مصرف از ۰/۰۳ درصد بیشتر نبود. این غلظت هیچ تاثیری بر روی محتوای فسفات‌های بافتی و فعالیت الکتریکی یاخته‌های عصبی PGI نداشت (اطلاعات ارایه نشده‌اند). تمامی داروها به صورت حل شده در محلول ASCF و از طریق مشروب نمودن حمام بافتی به نمونه‌ها اعمال شدند.

#### ج) روش ایجاد وابستگی به مورفین

در این پژوهش با استفاده از افزودن مورفین به آب آشامیدنی، وابستگی به مورفین در موش‌ها به وجود آمد. بدین ترتیب که آب آشامیدنی علاوه بر سوکروز به میزان ۴۰ گرم در لیتر از روز شروع هر ۴۸ ساعت به ترتیب حاوی مقادیر افزایشی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ میلی گرم در میلی لیتر مورفین بود. در ادامه از روز ششم تا روزهای ۲۱ الی ۲۵ از محلول ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر مورفین استفاده شد.

متوسط مصرف محلول مورفین هر موش ۴۸ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز بود. غذا و محلول مورفین به طور آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت و هر گروه شامل ۵ موش بود. مورفین یک ماده حساس به نور است، برای جلوگیری از تاثیر نور بر محلول مورفین، از ظروف تیره استفاده شد. در پایان دوره تجویز مورفین، به صورت تصادفی ۲۰ درصد از موش‌های انتخاب و به آن‌ها نالوکسان ۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیرجلدی تزریق شد. تعداد هر یک از علائم رفتاری محرومیت از مورفین شامل: لرزش بدن مشابه با یک سگ خیس (Wet dog shake)، اسهال، افتادگی پلکها، دندان قروچه، لرزش پنجه‌ها و تحریک پذیری بالا به هنگام لمس، به مدت ۹۰ دقیقه بعد از پایان تزریق ثبت شد.

#### د) روش تهیه برش بافتی ضخیم از مغز برای مطالعه In Vitro

برای تهیه قطعه بافتی مورد نظر از روش استاندارد دانشمندی به نام نای و همکاران با کمی تغییر استفاده شد (۱۶). موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی کلرات هیدرات ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بی‌هوش شدند. پس از جدا کردن سر و برش پوست سر و جمجمه حیوان، مغز سریعاً و به طور کامل به داخل پتری‌دیشی محتوی ASCF کربوژنه سرد (۴ درجه سانتی گراد) به فرمول:

124 NaCl, 30 glucose, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 KCl

(به واحد میلی مول) pH 7.4 منتقل شد. پس از جدا کردن نیم کره‌های مغزی و مخچه از ساقه مغز، قطعه‌ای از ساقه مغز به طول ۳/۵ میلی متر از محل خروج زوج هفتم عصب مغزی به سمت نخاع (با در نظر گرفتن تمامی نکات درج شده در اطلس مغز موش پاکسی نوز (۱۷)) و با مشاهده مستقیم خود قطعه بافتی زیر میکروسکوپ لوپ (انتخاب (شکل ۱)) و به حمام بافتی با حجم ۴ میلی لیتر که محتوی ASCF کربوژنه گرم (۲۹ درجه سانتی گراد) بود منتقل شد. سرعت جریان ASCF مشروب کننده این حمام ۴ میلی لیتر در دقیقه بود.

(Phosphodiesterases). به این ترتیب تغییر در پاسخ یک یا هر دوی این آنزیم‌ها می‌تواند مبنایی برای ایجاد پدیده افزایش بیش از حد cAMP به هنگام القای سندرم محرومیت باشد. دانشمندان برای سنجش تغییرات فعالیت آنزیم آدنسیل سیکلاز از ترکیب فورسکولین (Forskolin) که یک تحریک کننده عمومی و مستقیم آدنسیل سیکلازها (ACs) همراه با یک مهارگر عمومی فسفودی استراز (PDEi) چون ایزوبوتیل متیل گزانتین (IBMX) استفاده می‌کنند، این مدل جهت سنجش تغییر در فعالیت آنزیم آدنسیل سیکلاز در شرایط مختلف کاربرد دارد (۹). گزارش شده است که فورسکولین با ایجاد تغییر در میزان cAMP و دیگر ترکیبات درون سلولی برشلیک یاخته‌های عصبی هسته LC به دنبال وابستگی به مورفین تاثیر می‌گذارد (۱۰). با توجه به ارتباط cAMP با ترکیباتی چون ATP و PCR که به ترتیب به عنوان سوستر و واسطه انرژی در سلول نقش بازی می‌کنند و اهمیت مطالعه متابولیت‌های دیگر چون لاکتات و آلانین در روشن شدن وضعیت متابولیسم در سلول‌های گلوکوما ترژیک (۱۱، ۱۲) و این که گزارشاتی مبنی بر وجود تغییرات متابولیکی در متابولیت‌های مغزی به دنبال وابستگی به مورفین وجود دارد (۱۳). علاوه بر این مطالعه برخی از این ترکیبات چون N-استیل اسپاراتات و تورین همراه با بررسی تغییرات cAMP می‌تواند در تعیین وضعیت سلامت یاخته‌های عصبی نیز بسیار حایز اهمیت باشد (۱۴). در مقایسه با دیگر روش‌های رایج اندازه گیری cAMP، روشی چون اسپکتروسکوپی NMR می‌تواند تمامی ترکیبات فوق و بسیاری از ترکیبات دیگر را بسته به نیاز محقق هم‌زمان در یک نمونه اندازه گیری کند (۱۵). بدین ترتیب در این مطالعه اثر وابستگی به مورفین بر محتوی cAMP در هسته PGI بررسی و با به کارگیری دو ترکیب فورسکولین و IBMX تلاش می‌شود شد تا محل این تحول در مسیر ساخت یا تخریب cAMP در درون سلول مشخص شود در نهایت این که وضعیت سوخت و ساز یاخته‌های عصبی هسته PGI در چنین حالتی با بررسی متابولیت‌های دیگر مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### الف) حیوان آزمایشگاهی

در این آزمایش از موش‌های صحرایی سفید و نر (به وزن ۱۲۰-۸۰ گرم) تهیه شده از انستیتو رازی تهران استفاده شد. هر کدام از گروه‌ها مورد مطالعه در NMR شامل ۵ موش بودند، در واقع در این پژوهش، تعداد موش‌های کل مورد آزمایش بیشتر بود، زیرا از هر قفس نگهداری ۲۰ درصد از موش‌های وابسته به مورفین انتخاب و برای محرز شدن وابستگی به مورفین تحت تجویز نالوکسان قرار گرفتند.

##### ب) داروها

داروهای فورسکولین، IBMX و نالوکسان هیدروکلراید همگی از شرکت سیگما (Sigma) و مورفین سولفات از شرکت تمداد ایران تهیه شدند. تمامی داروها با غلظت نهایی مورد نیاز در ACSF حل و تجویز شدند. سه داروی اول ابتدا به صورت محلول استوک در دی متیل

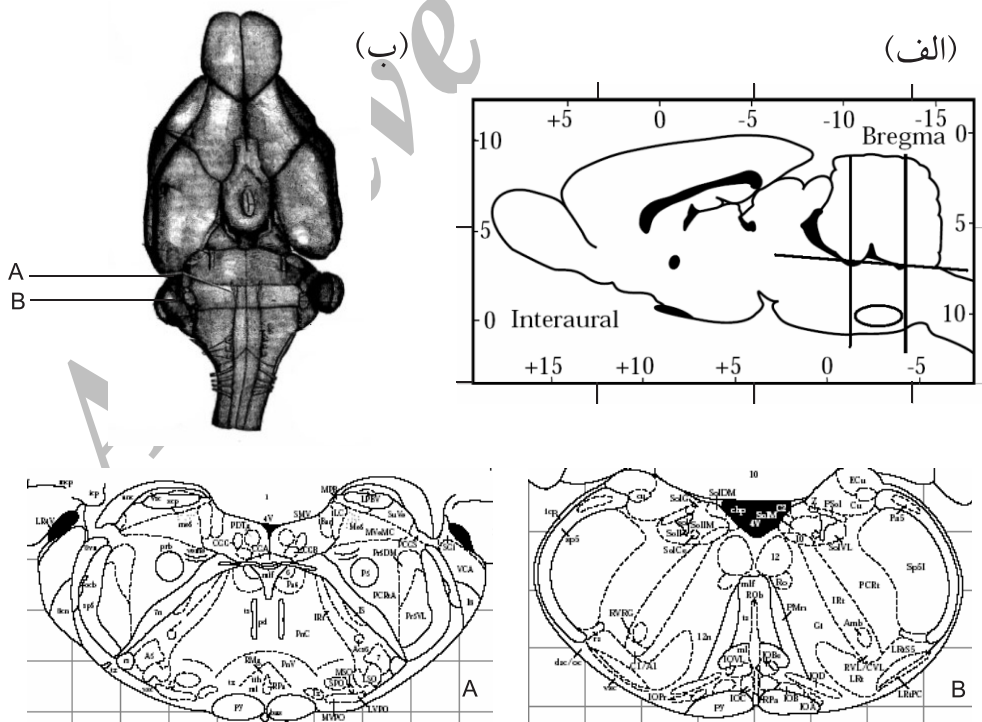
در این آزمایش با به کار گیری  $^{31}\text{P-NMR}$ ، علاوه بر سنجش ATP؛ cAMP و PCR نیز جهت تعیین وضعیت متابولیسم انرژی سلولی اندازه گیری شدند. به کار گیری روش  $^1\text{H-NMR}$  نیز اطلاعات جالبی را در رابطه با تغییرات محتوی گلوتامات و گابا که ناقل های عصبی حایز اهمیت در PGI هستند و لاکتات و آلانین به عنوان موادی که متابولیت های حد واسط در چرخه انرژی در یاخته های عصبی محسوب می شوند (۱۸) و N استیل اسپاراتات و تورین که به کمک آن ها می توان پی به وضعیت سلامت یاخته های عصبی برد؛ فراهم کرد (۱۹). برخی از ترکیباتی که در بالا اشاره شدند چون N استیل اسپاراتات و تورین، گلوتامات و کولین حساس ترین مارکرها برای سنجش تفاوت جزئی بین نقاط مختلف مغز هستند (۲۰). به همین دلیل روش NMR که قادر به سنجش این ترکیبات است، برای سنجش این ترکیبات انتخاب شد. برای انجام طیف گیری پودر حاصل از استخراج در ۰/۵ میلی لیتر  $\text{D}_2\text{O}$  حل شد. طیف گیری به کمک دستگاه NMR مدل Bruker AM-400 انجام گرفت. از هر نمونه در روش  $^{31}\text{P-NMRI}$ ، با پالس ۴۵ درجه و زمان تاخیر ۲ ثانیه همراه با به کارگیری Composite Pulse Proton Decoupling با ۷۰۰۰ اسکن از نمونه ها طیف گرفته شد. در تمامی مدت طیف گیری دمای نمونه در ۴ درج سانتی گراد ثابت بود. پیک ها بر اساس شیفت شیمیایی آنها نسبت به محلول  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ، ۸۵ درصد شناسایی و نسبت به اسیدارتو فسفوریک (۰/۱ درصد) انتگرال گیری شدند (شکل ۲).

ه) استخراج عصاره مغزی به روش اسید پرکلریک

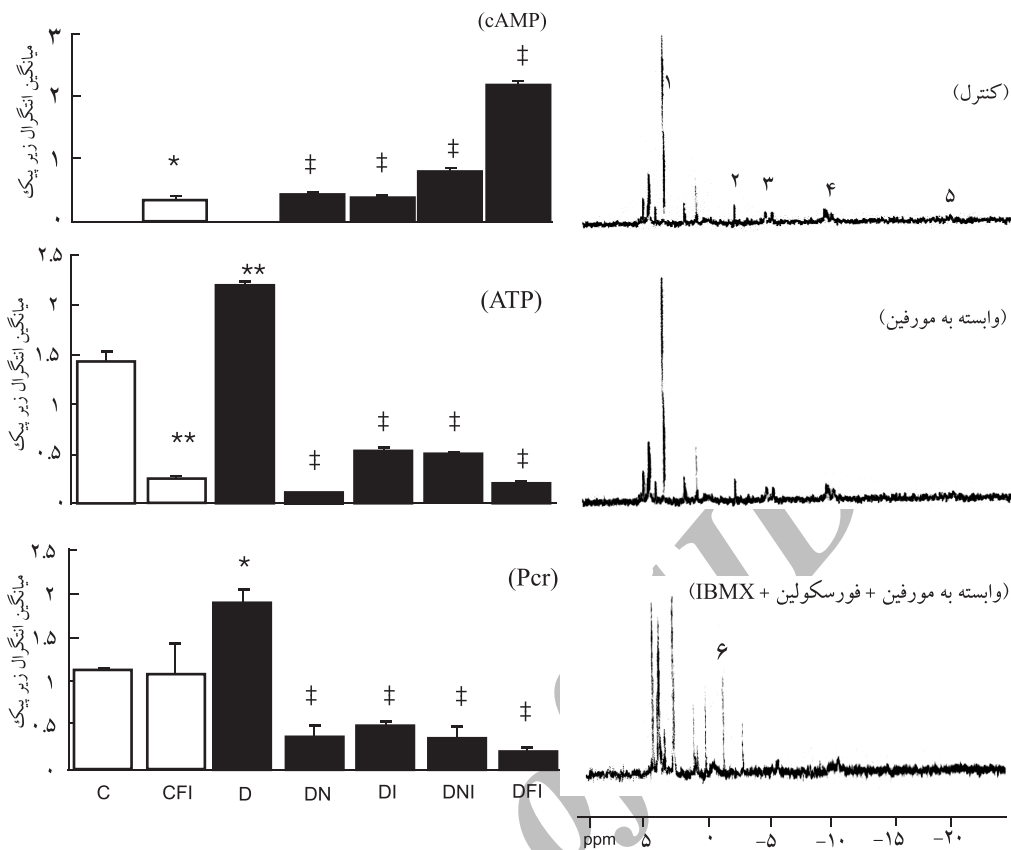
تمامی نمونه ها به روش اسید پرکلریک استخراج شدند. قطعه بافتی پس از این که تحت تاثیر داروهای مختلف قرار گرفت؛ به سرعت از حمام بافتی خارج، خشک و وزن شده و در مجاورت ازت مایع منجمد و به صورت پودر در آمد. محلول اسید پرکلریک ۶۰ درصد به نسبت ۰/۲۵ درصد حجم به وزن بافت در مجاورت ازت مایع منجمد و پودر شده و با پودر بافت مغزی منجمد کاملاً مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل در سانتریفوژ فریز دار دردمای ۴ سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه با شتاب ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. مایع فوقانی نمونه ها جدا شده و pH آن توسط KOH (۳ نرمال) در حدود ۱۰ تا ۱۰/۵ تنظیم شد. برای حذف یون های فلزی موجود در محلول، محلول از ستون Chelex ۱۰۰ عبور داده و توسط دستگاه لئوفیلز کننده، خشک و پودر حاصل تا زمان سنجش در یخچال ۷۰- سانتی گراد نگهداری شدند.

و) سنجش توسط NMR

از بین روش های زیادی که اغلب از طریق ترکیبات نشان دار میزان cAMP را اندازه گیری می کنند، NMR دارای این مزیت است که می تواند بدون نیاز به استفاده از روش های ردیابی وابسته به آنتی بادی و ترکیبات نشان دار رادیو اکتیو، علاوه بر اندازه گیری cAMP تعداد زیادی از متابولیت های درون سلولی را به طور همزمان در یک نمونه اندازه گیری کند.  $^1\text{H-NMR}$  و  $^{31}\text{P-NMR}$  دو روش متعارف سنجش توسط NMR هستند.



شکل ۱: نحوه تهیه قطعه بافتی حاوی هسته پارازیگانتوسولولاریس بر اساس اطلس مغز موش (Paxinos): (الف) نمایش برش طولی از مغز و خطوطی برش گیری، (ب) تصویر از سطح شکمی مغز که محل خروج عصب هفتم مغزی (A) و حد فاصل محدوده طولی هسته را با حروف انگلیسی نشان می دهد، (B). برش های عرضی از ناحیه A و B که نشان دهنده قبل و بعد از محدوده هسته PGI نشان داده شده اند.



شکل ۲: ستون راست طیف‌های  $^{31}\text{P-NMR}$  در گروه کنترل (الف)، وابسته به مورفین (ب) و وابسته به مورفین تحت تاثیر فورسکولین + IBMX (پ) را نشان می‌دهد. شماره پیک‌ها به ترتیب عبارتند از: (۱) اسید فسفریک (۲) فسفوکراتین (۳) فسفو گاما مولکول آدنوزین تری فسفات (۴) فسفر آلفا مولکول آدنوزین تری فسفات (۵) فسفر بتا مولکول آدنوزین تری فسفات (۶) آدنوزین منوفسفات حلقوی؛ منحنی‌های ستونی سمت چپ به ترتیب: تغییرات cAMP (ج) و ATP (ج) و فسفوکراتین (چ) در عصاره هسته PGI را پس از تجویز فورسکولین (F)، ایزوبوتیل متیل گرانانتین (ا)، نالوکسان (N) در گروه کنترل (C) و وابسته به مورفین (D) را نشان می‌دهد،  $P < 0.05^*$  و  $P < 0.01^{**}$  گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های دیگر  $P < 0.05^{\ddagger}$  گروه وابسته به مورفین در مقایسه با گروه‌های دیگر وابسته به مورفین است (n=5, T-test).

طیف‌گیری شد. نکاتی که برای شناسایی پیک‌های NMR باید رعایت شوند مطابق با دستور العمل شناسایی پیک‌ها بر اساس مقاله دانشمندی به نام تبالت و همکاران (۲۲) رعایت شدند.

#### ز) روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

ابتدا پیک‌های مورد نظر این تحقیق مورد شناسایی دقیق قرار گرفتند. برای این کار هم به مقالاتی که ترکیبات مشابه را با روش مشابه اندازه‌گیری کرده بودند مراجعه شد و هم در مورد ATP اندازه‌گیری مشابهی در این دانشگاه صورت گرفته بود که شناسایی آن را راحت‌تر می‌کرد (اطلاعات به چاپ نرسیده است) سپس سطح زیر هر پیک برای هر یک از ترکیبات مورد نظر نسبت به مرجع محاسبه شد. میانگین و SEM سطح زیر پیک برای هر یک از گروه‌های ۵ تایی محاسبه شد. (شکل ۲ و ۳) و به صورت منحنی ستونی در شکل ۲ و ۳ نمایش داده شده‌اند. با توجه به این که آزمون (Koolmogrov-Smirnof) توزیع نرمال داده را نشان داده است، کلیه گروه‌ها ابتدا مورد ANOVA دو طرفه قرار گرفتند و در ادامه بین گروه‌ها آزمون T-test صورت گرفت

برای تشخیص پیک cAMP به طور جداگانه از cAMP خالص طیف گرفته شد و محل شیفت cAMP در ناحیه  $-1/5\text{ppm}$  مشخص شد، که با محل پیک cAMP در عصاره‌های بافتی مطابقت داشت. پیک ATP قبلاً در آزمایشگاه NMR دانشگاه تربیت مدرس با افزودن ATP خالص به محلول مورد شناسایی قرار گرفته است (اطلاعات به چاپ نرسیده است). یکی از محاسن استفاده از NMR این است که با روشن شدن موقعیت دقیق یک ترکیب در یک طیف می‌توان به کمک آن و قرار دادن آن ترکیب در موقعیت استاندارد قید شده‌اش در مقالات و رعایت pH عصاره، بقیه ترکیبات همان عصاره را شناسایی کرد (۲۱). در روش  $^1\text{H-NMR}$  با پالس ۹۰ درجه و سیکل‌های ۸ ثانیه‌ای ۱۶ اسکن از نمونه‌ها طیف گرفته شد. شیفتهای شیمیایی همه پیک‌ها نسبت به پیک شاخص واقع شده در  $3/63\text{ppm}$  سنجیده شد، این پیک در تمامی حالت دارای میزان ثابتی در عصاره مغزی بود (۱۵) و در آزمایش ما نیز عملاً میزان آن ثابت بود و به عنوان شاخص برای انتگرال‌گیری انتخاب شد (شکل ۳). در ضمن برای شناسایی قطعی پیک‌ها روش  $^1\text{H-NMR}$  به عصاره آلانین و گلوتامین خالص افزوده و

همچنین بر اثر این تجویز به طور معنی دار یک کاهش ظهیرمان در محتوی ATP در گروه کنترل (۸۱ درصد) و وابسته (۹۱ درصد) مشاهده شد (شکل ۲). محتوی ATP در گروه‌های وابسته در پاسخ به نالوکسان (۹۴/۱ درصد)، IBMX (۷۶/۲ درصد) و نالوکسان+ IBMX (۷۸/۲ درصد) به طور معنی دار ( $P < 0/05$ ) نسبت به حالت عدم تجویز این داروها کاهش یافت. نسبت افزایش CAMP به کاهش ATP ( $\Delta\text{cAMP}/\Delta\text{ATP}$ )، به دنبال ایجاد وابستگی به مورفین در پاسخ به فورسکولین+ IBMX، ۲/۱۳ است. بدین ترتیب افزایش در تولید CAMP به موازات کاهش در محتوی ATP است. علاوه بر این محتوی PCr نیز به دنبال تجویز فورسکولین+ IBMX در موش‌های کنترل (۸۵/۹ درصد) و وابسته (۵۶/۴ درصد) به طور معنی دار کاهش نشان داد (شکل ۲).

تغییرات دیگر ترکیبات فعال سلولی (روش  $^1\text{H-NMR}$ )

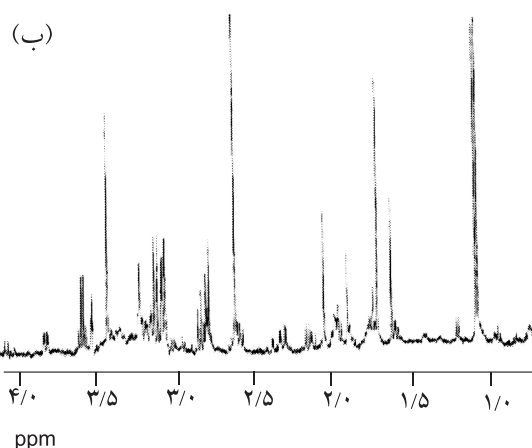
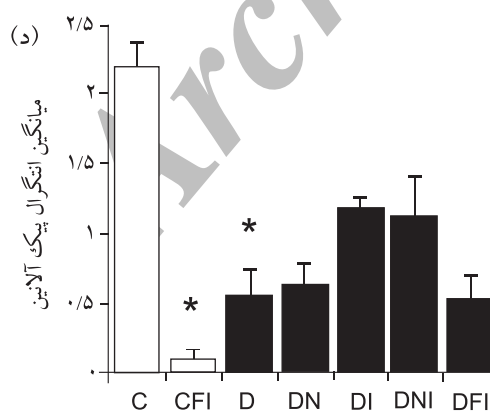
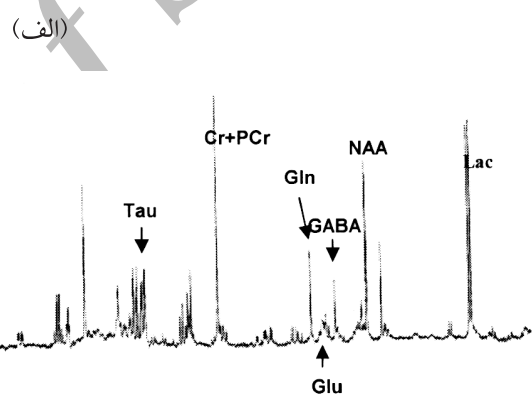
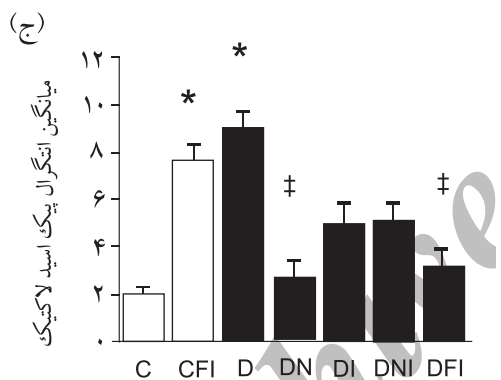
محتوی N استیل اسپارتات، فسفوکراتین-کراتین، اسید لاکتیک، آلانین، تورین، گابا، گلوتامات، گلوتامین توسط روش  $^1\text{H-NMR}$  به طور هم‌زمان اندازه‌گیری شد.

و گروه‌ها که دارای تفاوتی با  $P < 0/05$  بودند معنی دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

تغییرات cAMP و دیگر ترکیبات فسفردار (روش  $^{31}\text{P-NMR}$ )

سطح زیر هر پیک در NMR معادل با غلظت هر ترکیب در نظر گرفته می‌شود. به دنبال تجویز ۵۰ میکرومول فورسکولین + ۵۰۰ میکرومول IBMX به مدت ۲۰ دقیقه منحنی محتوی CAMP در طیف  $^{31}\text{P-NMR}$  گروه کنترل و وابسته ظاهر شد (شکل ۲). همچنین پیک، CAMP در گروه‌های وابسته به دنبال تجویز ۱۰ میکرومول نالوکسان به تنهایی و یا با ۵۰۰ میکرومول IBMX ظاهر شد ( $P < 0/05$ ). در تمامی گروه‌ها از این غلظت‌ها استفاده شد. تولید CAMP در موش‌های وابسته بعد از تجویز فورسکولین+ IBMX در مقایسه با کنترل (۸۴/۷ درصد) به طور معنی دار پاسخ بیشتری را ایجاد کرد (شکل ۲). تجویز IBMX به میزان (۳۶ درصد) و نالوکسان به میزان (۴۰/۴ درصد) به تنهایی یا توأم (۷۵/۶ درصد) محتوی CAMP را در موش‌های وابسته به طور معنی دار افزایش دادند.



شکل ۳: در ستون سمت راست طیف‌های  $^1\text{H-NMR}$  ثبت شده از عصاره استخراجی از گروه کنترل (الف) و وابسته به مورفین (ب) و ستون سمت چپ دو منحنی ستونی مربوط به تغییرات اسید لاکتیک (ج) و آلانین (د) به دنبال تجویز فورسکولین (F) و ایزوبوتیل متیل گرانترین (I) و یا تجویز توأمی از آن‌ها و به دنبال نالوکسان (N) نشان می‌دهد. علائم اختصاری عبارتند از: Lac اسید لاکتیک، Ala آلانین، NAA ان استیل اسپارتات، GABA گاما آمینو بوتیریک اسید، Glu گلوتامات، گلوتامین، Gln گلوتامین، PCr+Cr فسفوکراتین، Tau تورین. \* نشان  $P < 0/05$  معنی داری در مقایسه با کنترل و † نشان دهنده  $P < 0/05$  معنی داری در مقایسه با گروه وابسته به مورفین است.

ATP درون سلولی است. ما در عمل بیش از دو برابر افزایش در این نسبت را به دنبال وابستگی به مورفین تحت اثر توام فورسکولین و IBMX مشاهده کردیم. بدین ترتیب مشخص شد که به میزان کافی ATP در اختیار سلول بوده است و بخش عمده‌ای از ATP سلول به cAMP تبدیل شده است. ولی میزان ATP از حد خطرناک برای سلول پایین تر نیامده است. در تایید این موضوع نیز گزارشی مبنی بر افزایش متابولیسم انرژی مغز به دنبال القای سندرم محرومیت در انسان وجود دارد (۲۶). بدین ترتیب این یافته‌ها می‌توانند گواهی بر تغییر در متابولیسم انرژی باشند.

فسفوکراتین یکی دیگر از ترکیبات فسفات‌دار پر انرژی سلول است که در ارتباط مستقیم با ATP است. گزارش شده است که به دنبال تجویز فورسکولین میزان این ترکیب در سلول کاهش پیدا می‌کند و به نظر می‌رسد بخشی از شارژ مجدد ATP سلولی توسط PCr فراهم می‌شود (۲۷) و بدین ترتیب نیاز افزایش یافته سلول به ATP برای ساخت cAMP از این مسیر فراهم می‌شود. همچنین میزان PCr در مغز کودکانی که در دوران جنینی در معرض کوکائین بوده‌اند نیز پایین‌تر از همسالان طبیعی آنها گزارش شده است (۲۸).

یافته‌های ما نیز نشان داد که PCr تحت اثر تحریکی فورسکولین+ IBMX کاهش پیدا می‌کند و این پدیده پس از وابستگی به مورفین تشدید می‌گردد که نشانه افزایش نیاز سلول به فسفات‌های پرانرژی در این حالت است. یک وضعیت مشابه از تغییرات نیز در میزان فسفات‌های پرانرژی مغز در معنادان به انواع مختلفی از داروهای وابستگی‌زا گزارش شده است (۲۹). بدین ترتیب به طور کلی می‌توان گفت که به دنبال وابستگی به مورفین در مقایسه با حالت کنترل میزان تولید ATP افزایش می‌یابد و برای حفظ این سطح بالا از ATP ترکیبات پرانرژی دیگری چون PCr می‌توانند برای شارژ مجدد ADP به ATP مورد استفاده سلول قرار گیرند. اما با تحریک ساخت cAMP به صورت مستقیم توسط فورسکولین و یا به طور غیر مستقیم توسط نالوکسان بخش عمده‌ای از این ترکیبات صرف ساخت cAMP می‌گردند. نکته دیگری که جلب توجه می‌کند این است که تجویز توام فورسکولین و IBMX از نظر متابولیسمی روندی مشابه با سندرم محرومیت ایجاد می‌کند و این امر نتایج مدل تجویز توام فورسکولین و IBMX را از این دیدگاه نیز، علاوه بر افزایش سنتز cAMP، به سندرم محرومیت از مورفین مشابه می‌سازد.

آلانین و اسیدلاکتیک دو متابولیتی بودند که، از میان ۷ ترکیب اندازه‌گیری شده توسط  $^1\text{H-NMR}$  پس از وابستگی به مورفین میزان آنها تغییر پیدا کرد. این ترکیبات به این دلیل انتخاب شدند که بیشترین ارتباط را با عملکردهای نورونی، نورون‌های گلوتاماترژیک دارا هستند. عدم تغییر در گلوتامات و گابا به معنی عدم تغییر در محتوای ناقل‌های عصبی مورد اندازه‌گیری در ناحیه PGi بوده و می‌تواند به عنوان وجود یک تعادل بین ساخت و رها شدن این ناقل‌های عصبی در این هسته در نظر گرفته شود. تغییرات در محتوای تورین و N-استیل اسپاراتات به معنی ایجاد مرگ یاخته‌های عصبی یا تخریب یاخته‌های عصبی یا تغییر

بعد از تجویز داروهای فوق هیچ تغییر معنی‌داری در محتوی هیچ کدام از ترکیبات N استیل اسپاراتات، فسفوکراتین-کراتین، تورین، گابا، گلوتامین، گلوتامات در هیچ کدام از گروه‌ها مشاهده نشد. تجویز فورسکولین+ IBMX محتوی اسیدلاکتیک را در گروه کنترل به شدت به طور معنی‌دار افزایش داد ( $p < 0.01$ ). به طور مشابه به دنبال وابستگی به مورفین نیز محتوی اسیدلاکتیک افزایشی معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) نشان داد (شکل ۳). اما تجویز فورسکولین+ IBMX یا نالوکسان به تنهایی محتوی اسیدلاکتیک را در مقایسه با گروه وابسته به طور معنی‌دار کاهش داد. ( $p < 0.05$ ).

به دنبال تجویز نالوکسان+ IBMX یا IBMX به تنهایی هیچ تغییر در محتوی اسیدلاکتیک گروه‌های وابسته ایجاد نشد. محتوی آلانین افت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را پس از تجویز فورسکولین+ IBMX در گروه کنترل نشان داد (شکل ۳).

تجویز فورسکولین+ IBMX، نالوکسان یا نالوکسان+ IBMX هیچ تغییر معنی‌داری را در محتوی آلانین در مقایسه با گروه وابسته به مورفین سبب نشد.

## بحث

اولین یافته این تحقیق مشاهده افزایش در حساسیت آدنیل سیکلایز در پاسخ به دوزهای مشابه از فورسکولین+ IBMX و تولید بیش از حد cAMP به دنبال وابستگی به مورفین در مقایسه با کنترل بود. تغییرات مشابه در میزان حساسیت آدنیل سیکلایز در پاسخ به فورسکولین پس از وابستگی به نیکوتین (۲۳) و مورفین (۲۴) در دیگر نواحی مغزی گزارش شده است. بدین ترتیب به نظر می‌رسد مدل تنظیم افزایشی در مسیر cAMP که در رابطه با هسته LC و برخی نواحی دیگر مغزی مطرح است در رابطه با هسته PGi نیز صدق می‌کند (۲۵). همچنین میزان ATP به دنبال وابستگی به مورفین افزایش یافت که گواهی بیشتر آن به هنگام وابستگی به مورفین است. تجویز فورسکولین+ IBMX، نالوکسان و نالوکسان+ IBMX باعث کاهش ATP به میزان کنترل شد. به احتمال زیاد این امر گویای این نکته است که قسمت عمده‌ای از این افزایش در تولید ATP تحت تحریک فورسکولین به cAMP تبدیل شده است. با توجه به افزایش محتوی ATP به نظر می‌رسد که تغییر در میزان cAMP نمی‌تواند در حالت وابسته به مورفین تحت اثر محدودیت در میزان سوپسترا قرار گیرد. نکته دیگری که می‌توان به عنوان یک فرضیه مطرح کرد این است که در حالت وابسته به مورفین که ساخت cAMP در مقایسه با حالت کنترل به شدت در پاسخ به محرک با دوز مشابه تشدید شده است. شاید نورون‌ها با به کارگیری این ترفند افزایشی در تولید پایه ATP ثبات ATP درون سلولی را به هنگام تحریک سنتز cAMP حفظ می‌کنند و از اثرات حاصل از افت ATP به هر دلیل بر سلول جلوگیری می‌کنند. برای آزمون این فرضیه نسبت تغییرات cAMP به ATP پس از تجویز فورسکولین+ IBMX ( $\Delta\text{cAMP}/\Delta\text{ATP}$ ) محاسبه شد. افزایش در این نسبت به معنی تبدیل قسمت عمده ATP به cAMP است (۲۱) و همچنین عدم افت شدید

نورون‌ها وجود دارد (۳۱). نتایج ما نشان داد در اثر تحریک ساخت CAMP توسط فورسکولین IBMX+ میزان اسید لاکتیک در حالت کنترل افزایش پیدا می‌کند در صورتی که این تحریک منجر به کاهش ساخت آن در حالت وابسته می‌گردد. همچنین میزان آلانین به دنبال تحریک ساخت CAMP توسط فورسکولین IBMX+ در حالت کنترل شدیدتر از حالت وابسته است. این امر گویای یک تحول کلی متابولیسمی به خصوص در نورون‌های گلوتامات ارژیک و گابا‌ترژیک ناحیه PGI به دنبال وابستگی به مورفین است (۱۲).

### نتیجه گیری

بدین ترتیب نتایج این تحقیق ضمن ارائه شواهدی مبنی بر تغییر در میزان حساسیت سیستم تولید CAMP و تنظیم افزایشی آن در اثر تغییر در حساسیت آدنیلیل سیکلاز در هسته PGI به دنبال وابستگی به مورفین شواهدی را دال بر تغییرات متابولیسمی به واسطه وابستگی به مورفین ارائه می‌کند.

در فعالیت میتوکندری‌ها توسط محققین در نظر گرفته می‌شود (۳۰). بدین ترتیب با توجه به نتایج مامشخص شد که در این آزمایش وابستگی و یا محرومیت از مورفین هیچ تخریب یاخته عصبی یا اثر مخرب بر فرآیندهای تولید انرژی در میتوکندری‌ها ایجاد نکرده است در ضمن با توجه به اینکه میزان N-استیل اسپارتات به عنوان معرفی از Bioavailability یاخته عصبی در نظر گرفته می‌شود (۱۴) و میزان آن در حالت مختلف در این آزمایش تغییر نکرده است دلیلی بر کارآمدی سیستم تهیه و نگهداری برش‌های مغزی در طول کل دوره آزمایش نیز هست. اما مشابه با یافته‌های ما در حالت In Vitro، کاهش مشابهی در اسید لاکتیک و آلانین آندوژن مغز موش پس از وابستگی به مورفین گزارش شده است (۱۳). مدارک زیادی دال بر وجود یک ارتباط فیزیولوژیک بین این دو ترکیب و فعالیت یاخته‌های عصبی گلوتاماترژیک و گابا‌ترژیک از یک سو و سلول‌های نروگلیا از سوی دیگر وجود دارد، بدین شکل که یک چرخه آلانین-لاکتات بین یاخته‌های عصبی و آستروسیت‌ها برای فراهم کردن نیازهای متابولیسمی



### References

- Andrezik JA, Chan-Palay V, Palay SL: The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Conformation and cytology. *Anat Embryol*, 1981; 161: 355-371
- Johnson AD, Peoples J, Stornetta RL, Van Bockstaele EJ: Opioid circuits originating from the nucleus paragigantocellularis and their potential role in opiate withdrawal. *Brain Res*, 2002; 955: 72-84
- Saiepour MH, Semnani S, Fathollahi Y: Occurrence of morphine tolerance and dependence in the nucleus paragigantocellularis neurons. *Eur J Pharmacol*, 2001; 411: 85-92
- Rockhold, RW, Liu, N, Coleman, D, Commiskey, S, Shook, J, Ho, IK: The nucleus paragigantocellularis and opiate withdrawal-like behavior. *J Biomed Sci*, 2000; 7:270-276
- Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M: Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neurosci*, 1995; 65: 119-160
- Rasmussen K: The role of the locus coeruleus and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacol*, 1995;13: 295-300
- Rasmussen K, Aghajanian GK: Withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons in opiate-dependent rats: attenuation by lesion of the nucleus paragigantocellularis. *Brain Res*, 1989; 505: 346-350
- Nestler EJ: Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addic*, 2001;10: 201-217
- Ballanyi Ie, Lalley PM, Hoch B and Richter DW: cAMP-dependent reversal of opioid- and prostaglandin mediated depression of the isolated respiratory network.
- Melia KR, Rasmussen K, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ, Duman RS: Coordinate regulation of the cyclic AMP system with firing rate and expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus: effects of chronic stress and drug treatments. *J Neurochem*, 1992; 58: 494-502
- Tsacopoulos M, Metabolic signaling between neurons and glial cells: a short review. *J Physiol (Paris)*, 2002; 96: 283-288
- Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS: Differential roles of alanine in GABAergic and glutamatergic neurons. *Neurochem Int*, 2003; 43: 311-315
- Serres S, Bezancon E, Franconi JM, Merle M: Ex vivo NMR study of lactate metabolism in rat brain under various depressed states. *J Neurosci Res*, 2005; 79:19-25
- Arnold DL, De Stefano N, Matthews PM, Trapp BD: N-acetylaspartate: usefulness as an indicator of viable neuronal tissue. *Ann Neurol*, 2001; 50: 823-825
- Sokol M, Przybyszewski WM, Matlas B: Investigation

of metabolic changes in irradiated rat brain tissue by means of  $^1\text{H}$  NMR in vitro relaxation study. *Solid State Nuc Magn Reson*, 2004; 25: 53-60

16. Ny L, Grundemar L: Inhibition of stimulated cyclic AMP production by multiple neuropeptide Y receptors in the rat brainstem. *Neurosci Lett*, 1997; 221:113-116.

17. Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed., Academic Press, New York.

18. Ames A: CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Rev*, 2000; 34: 42-68

19. Nordahi TE, Salo R, Possin K, Gibson DR, Flynn N, Leamon M, Galloway GP, Pfefferbaum A, Spielman DM, Adalsteinsson E, Sullivan EV: Low N-acetyl- aspartate and high choline in the anterior cingulum of recently abstinent metamphetamine-dependent subjects :a preliminary proton MRS study. *Psychi Res Neuroimag*, 2002; 116: 43-52

20. Tkac I, Rao R, Georgieff MK, Gruetter R: Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by in vivo  $^1\text{H}$ - NMR spectroscopy. *Mag Reson Med*, 2003; 50: 24-32

21. Degani H, DeJordy JO, Salomon Y: stimulation of cAMP and phosphomonoester production by melanotropin in melanoma cells:  $^{31}\text{P}$ NMR studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 1506-1510

22. Thebault MT, Kervarec N, Pichon R, Nonnotte G, LeGal Y: A  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance study of the hydrothermal vent tube worm *riftia pachyptila*. *Biochem* 1999; 322: 537-541

23. Slotkin TA, McCook EC, Lappi SE, Seidler FJ: Altered development of basal and forskolin-stimulated adenylylase activity in brain regions of rats exposed to nicotine prenatally. *Brain Res Dev Brain Res*, 1992; 68: 233-239

24. Fang F, Wang Q, Cao Q, LiuJ: Changes of AC/cAMP system and phosphorylation regulation of adenylylase activity in brain regions from morphine-dependent mice. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2000; 22: 14-9

25. 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

26. Daghli MR, Nutt DJ: Brain imaging studies in human addicts. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2003; 13: 453-458.

27. Goger MI, Login IS, Fernandez EJ, Grisham CM:  $^{31}\text{P}$  NMR investigation of energy metabolism in perfused MMQ cells. *Magn Reson Med*, 1994; 32: 584-591

28. Smith LM, Chang L, Yonekura ML, Gilbride K, Kuo J, Poland RE, Walot I, Ernst T: Brain proton magnetic resonance spectroscopy and imaging in children exposed to cocaine in utero. *Pediatrics*, 2001; 107: 227-231

29. Kaufman MJ, Pollack MH, Villafuerte RA, Kukes TJ, Rose SL, Mendelson JH, Cohen BM, Renshaw Pf: Cerebral phosphorus metabolites in abnormalities in opiate-dependent polydrug abusers in methadone maintenance. *Psychiatry Res Neuroimaging section*, 1999; 90: 143-152

30. Petroff OA, Errante LD, Kim JH, Spencer DD, N-acetylaspartate, total creatine and myo-inositol in the epileptogenic human hippocampus. *Neurol*, 2003; 60: 1646-1651

31. Bouzier-Sore AK, Serres AK, Canioni P, Merle M: Lactate involvement in neuron-glia metabolic interaction:  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy contribution. *Biochimie*, 2003; 85: 841-848

