

Changes in the Gene Expression of β_1 and β_2 Integrins Following Development of Tolerance to Analgesic Effect of Morphine in Rats

Jamal Ghorbi, M.Sc.¹, Mohammad Javan, Ph.D.^{1*}, Vahid Sheibani, Ph.D.²

1. Physiology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Physiology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Email: mjavan@modares.ac.ir

Received: 6/Apr/2009, Accepted: 23/Jun/2009

Abstract

Objective: Considering the inhibitory effect of integrin-activity modulator (manganese) on the development of morphine tolerance; in this study we have tried to assess the effect of chronic administration of both morphine and manganese on the expression levels of β_1 and β_2 integrins in the dorsal horn of the lumbar spinal cord.

Materials and Methods: Morphine tolerance was induced by intrathecal injection of morphine, 15 $\mu\text{g}/\text{rat}$ twice a day for five days. In order to study the effect of manganese on tolerance development; we injected manganese alone or in combination with morphine. The analgesic effect of morphine was assessed by using the tail flick test. Semi-quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to assess the expression levels of β_1 and β_2 integrins.

Results: As assessed on day 6, five days administration of morphine significantly increased the expression levels of integrins β_1 and β_2 . Combined administration of morphine and manganese, which inhibited morphine tolerance, prevented the effect of morphine on integrins' expression.

Conclusion: Increased expression of integrins may be due to direct effect of chronic morphine or a negative feedback that resulted from the potent inhibitory effect of morphine on integrins' activity. It seems that the activating of integrins via manganese in the presence of morphine can reverse feedback and consequently the effect of chronic administration of morphine on β_1 and β_2 integrins' and expression. Our findings suggest a role for intracellular matrix molecules in the development of morphine tolerance and possibly other forms of synaptic plasticity.

Keywords: Morphine, Gene Expression, Integrins, Manganese, Synaptic Plasticity

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 448-455

تغییر در بیان ژن اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ به دنبال تکوین تحمل به اثر ضددردی مورفین در موش‌های صحرایی نر

جمال قربی^۱ M.Sc.، محمد جوان^{۱*} Ph.D.، وحید شیبانی^۲ Ph.D.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، تهران، ایران

۲. دانشگاه علوم پزشکی کرمان، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، کرمان، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

پست الکترونیک: Email: mjavan@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۱/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲

چکیده

*** هدف:** بررسی امکان تغییر میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ به دنبال تجویز مکرر مورفین و در حضور منگنز، به عنوان فعال کننده اینتگرین‌ها و مهار کننده تحمل در بخش کمری نخاع

*** مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی جهت القای تحمل به مورفین، ۱۵ میکروگرم مورفین دو بار در روز به مدت پنج روز به شیوه داخل نخاعی به موش‌های صحرایی نر بالغ تزریق شد. برای بررسی اثر کاتیون منگنز، ۱۵ دقیقه قبل از مورفین، منگنز (۲۰ نانومول/موش) به صورت داخل نخاعی تجویز گردید. اثر ضددردی مورفین توسط آزمون Tail Flick سنجیده شد. برای برآورد تغییرات بیان ژن‌های اینتگرین بتا ۱ و بتا ۲ در نخاع کمری روش نیمه کمی Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) به کار گرفته شد. از ژن بتا اکتین به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد.

*** یافته‌ها:** نتایج نشان داد که تجویز مکرر مورفین می‌تواند موجب افزایش سطح mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری شود. تجویز کاتیون منگنز قادر به مهار کردن روند ایجاد تحمل به اثر ضددردی مورفین بود. همچنین تزریق هم‌زمان منگنز و مورفین از تغییر میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری ممانعت نمود.

*** نتیجه‌گیری:** افزایش میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ می‌تواند ناشی از دو علت: افزایش مستقیم بیان توسط مورفین و یا فیدبک ناشی از مهار اینتگرین‌ها توسط مصرف مکرر مورفین باشد. به نظر می‌رسد منگنز با فعال کردن اینتگرین‌ها و مخالفت با اثرات مهارتی اپیوئیدها روی اینتگرین‌ها، تا حدودی از اثرات ناخواسته اپیوئیدها از قبیل تحمل و افزایش میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ ممانعت نموده است. این یافته‌ها نقش احتمالی ماتریکس خارج سلولی را در ایجاد تحمل به مورفین و سایر انواع شکل‌پذیری سیناپسی مطرح می‌سازد.

*** کلیدواژگان:** مورفین، بیان ژن، اینتگرین، منگنز، شکل‌پذیری سیناپسی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۴، زمستان ۸۸، صفحات: ۴۵۵-۴۴۸

مقدمه

اپیوئیدها از دیرباز برای ایجاد بی‌دردی استفاده شده‌اند، اما تجویز طولانی مدت آنها دارای اثرات جانبی قابل توجهی مانند تحمل و وابستگی است. با ایجاد تحمل برای رسیدن به اثر بی‌دردی اولیه، لازم است دارو در مقادیر بالاتر مصرف گردد (۱).

اصطلاح اینتگرین برای اولین بار در مقاله‌ای مروری به کار رفت تا خانواده‌ای از گیرنده‌های هترومریک سطح سلولی را توصیف کند که ماتریکس خارج سلولی را به اسکلت داخل سلولی متصل می‌نمایند (۲). تا کنون ۸ اینتگرین بتا و ۱۸ اینتگرین آلفا که حداقل ۲۴ هتروداپمر بتا/آلفا را تشکیل می‌دهند، شناسایی شده‌اند (۳). اینتگرین‌ها نقش‌های کلیدی مانند: شرکت در تولید سیناپس، انتقال سیناپسی و شکل‌گیری حافظه، در سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System; CNS) ایفا می‌کنند. اما مکانیسم دقیق عمل آنها ناشناخته است (۴). اینتگرین‌ها به ویژه در نواحی سیناپسی فراوان هستند (۵). در سیناپس‌های CNS خانواده اینتگرین‌ها به عنوان واسطه‌های چسباندن سلولی عمل می‌کنند (۵). جایی که آنها در گسترش سیناپسی، حفظ و تجدید اسکلت سلولی (که در فعالیت سیناپسی شرکت می‌کنند) نقش دارند (۴).

اینتگرین‌ها به عنوان متالوپروتئین‌ها مطرح هستند. در هر هتروداپمر اینتگرین ۳-۵ جایگاه اتصال به کاتیون‌های دو ظرفیتی وجود دارد. اتصال این کاتیون‌ها اثرات قوی بر عملکرد اینتگرین دارد (۲). برای بسیاری از اینتگرین‌ها کاتیون منگنز می‌تواند موجب تغییر شکل فضایی شود که با افزایش تمایل اتصال به لیگاند همراه است (۶). شواهد موجود احتمال تغییر در عملکرد اینتگرین‌ها با مصرف مکرر مورفین را مطرح می‌کند که این تغییر ممکن است در ایجاد تحمل به مورفین نقش داشته باشد. به طور خلاصه تکوین تحمل به اثر ضددردی اپیوئیدها با چندین فرایند سلولی همراه است که از جمله آنها می‌توان به افزایش نیتریک اکساید (Nitric Oxide; NO)، پروتئین کیناز (Protein Kinase C; PKC) و پروتئین کیناز وابسته به کلسیم-کالمودولین (Calcium Calmodulin Dependent Protein Kinase Type 2;) (CaMKII) اشاره کرد. هر سه مولکول به گونه‌ای اثرات مهار کننده‌ای بر فعال شدن اینتگرین‌ها دارند (۷-۱۱). بنابراین شاید کاتیون منگنز با فعال کردن اینتگرین‌ها و جبران اثرات مهارتی اپیوئیدها (از طریق افزایش PKC، NO و CaMKII) بر اینتگرین‌ها بتواند تا حدودی از اثرات ناخواسته اپیوئیدها از قبیل تکوین تحمل جلوگیری کند. مطالعه قبلی اثر مهار کننده فعالیت اینتگرین‌ها را بر تکوین تحمل نشان داد (۱۲). طبق

سوراخ کوچکی ایجاد شد تا منجر به خروج مایع مغزی- نخاعی گردد که نشانه‌ای از دسترسی به فضای زیر عنکبوتیه بود. یک لوله پلی اتیلن ۱۰ به طول ۱۱ سانتی‌متر آماده و ۸ سانتی‌متر آن به آرامی در فضای زیر عنکبوتیه به طرف قطعه کمربندی نخاع پیش برده شد. لوله پلی اتیلن قبل از استفاده، به وسیله اتانول ۷۰ درصد استریل و کاملاً با سالیین استریل شسته شد. موش‌های صحرایی دارای کانول تغییر معنی داری را در زمان تاخیر Tail Flick نشان ندادند و زمان تاخیر قبل از دارو برای آنها مانند حیوانات بدون کانول در محدوده ۳ تا ۴ ثانیه بود. ۳ سانتی‌متر از لوله خارج از نخاع قرار گرفت و برای تزریق دارو استفاده شد. در هیچ یک از حیوانات بعد از کانول‌گذاری نقص حرکتی دیده نشد. دارو یا سالیین به صورت داخل نخاعی در حجم ۱۰ میکرولیتر تزریق شد.

القای تحمل به مورفین

از تزریق مکرر مورفین به صورت داخل نخاعی با دوز ۱۵ میکروگرم/موش (در حجم ۱۰ میکرولیتر) دو بار در روز (صبح و عصر) به مدت ۵ روز برای القای تحمل به مورفین استفاده شد (۱۸). برای ارزیابی تحمل ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق برای القای تحمل (روز ششم) حیوانات یک دوز دیگر مورفین داخل نخاعی (۱۵ میکروگرم/موش) دریافت کردند و اثر ضددردی آن با استفاده از آزمون Tail Flick (۱۹) ارزیابی شد.

برای بررسی اثر مهار کاتیون منگنز بر تکوین تحمل به مورفین، گروه اول از موش‌های صحرایی ۱۰ میکرولیتر/موش سالیین و ۱۵ دقیقه بعد از آن ۱۵ میکروگرم/موش مورفین را به صورت داخل نخاعی دریافت کردند. گروه دوم ۱۵ میکروگرم/موش مورفین داخل نخاعی را ۱۵ دقیقه بعد از تزریق ۲۰ نانومول/موش کاتیون منگنز دریافت کردند. دو گروه کنترل دیگر نیز مورد استفاده قرار گرفت، در یک گروه از حیوانات، سالیین داخل نخاعی (۱۰ میکرولیتر/موش) ۱۵ دقیقه بعد از تزریق داخل نخاعی کاتیون منگنز و در گروه بعد دو دوز سالیین با فاصله ۱۵ دقیقه تزریق شد. این روند به مدت ۵ روز تکرار می‌شد. در روز ششم (۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق روز پنجم)، زمان تاخیر آزمون Tail Flick قبل و بعد از تزریق دوز ۱۵ میکروگرم/موش مورفین اندازه‌گیری و سپس درصد ضد دردی مورفین با مقایسه درصد MPE Maximum Possible Effect محاسبه شد. میزان تحمل به اثر تاخیر در گروه تیمار شده با سالیین مکرر ارزیابی شد.

سنجش میزان بی‌دردی

۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق برای القای تحمل (روز ششم) حیوانات یک دوز دیگر مورفین (۱۵ میکروگرم/موش) دریافت کردند و اثر ضددردی آن با استفاده از آزمون Tail Flick (۱۹) ارزیابی شد. سنجش میزان بی‌دردی قبل از تزریق مورفین و ۱۵ دقیقه بعد از تزریق مورفین با سالیین ۰/۹ درصد (گروه کنترل) انجام گرفت. در هر مورد زمان تاخیر برای کشیدن دم، دو یا سه بار با فواصل یک دقیقه‌ای اندازه‌گیری شد و میانگین آن به عنوان زمان تاخیر قبل (Base Line: BL) و یا بعد (Tail-flick Latency; TL) از مصرف دارو استفاده شد. شدت نور دستگاه طوری تنظیم شد که زمان تاخیر پایه بین ۳ تا ۴ ثانیه باشد. برای جلوگیری از صدمه بافت، تابش نور پس از ۸ ثانیه قطع می‌شد (Cut-off Time). برای مقایسه تغییرات زمان تاخیر آزمون Tail-Flick در گروه‌های مختلف با کمک فرمول زیر، در هر مورد درصد بی‌دردی از حد اکثر بیدردی ممکن (MPE%) محاسبه شد (۲۰).

$$\% \text{ MPE} = \left[\frac{\text{TL} - \text{BL}}{\text{Cut-off Time} - \text{BL}} \right] \times 100$$

گزارش‌هایی دخالت مکانیزم‌های وابسته به بیان ژن در تکوین تحمل و در بروز اثرات عوامل موثر بر روند تحمل نشان داده شده است (۱۶-۱۳). با توجه به فراوانی بیان اینتگرین‌ها در محل سیناپس‌ها و اثر فعالیت آنها بر تکوین تحمل، در این مطالعه سعی شده است نقش تغییرات احتمالی بیان اینتگرین‌ها در تحمل به مورفین به عنوان مدلی از شکل‌پذیری سیناپسی بررسی شود.

در این مطالعه به منظور بررسی نقش احتمالی تغییر در عملکرد اینتگرین‌ها در تکوین تحمل به اثر ضددردی مورفین، میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ به دنبال تجویز مکرر مورفین در بخش کمربندی نخاع بررسی شده است. همچنین به منظور بررسی ارتباط بین میزان تکوین تحمل و بیان ژن اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲، میزان بیان این دو ژن در حضور کاتیون منگنز به تنهایی و به همراه مورفین بررسی شد. به دلیل اینکه سد خونی - مغزی مانعی برای ورود مقادیر دلخواه دارو به CNS است، برای پرهیز از اثرات وسیع داروها در مصرف سیستمیک، از تزریق داخل نخاعی و موضعی مورفین و منگنز استفاده شد.

مواد و روش‌ها حیوانات

به منظور بررسی این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۲۰-۱۸۰ گرم که تصادفی در گروه‌های حداقل شش تایی قرار گرفتند، استفاده شد. حیوانات، محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند و در شرایط کنترل شده نوری و گرمایی نگهداری می‌شدند (۱۲) ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ساعت ۷ صبح بود. برای تمام آزمایش‌ها، موش‌های صحرایی دو نوبت (صبح و عصر) با دارو تیمار و آزمایش می‌شدند. برای تزریقات داخل نخاعی، بعد از کانول‌گذاری، جداگانه نگهداری می‌شدند و به آنها اجازه داده می‌شد تا به مدت ۴۸ ساعت قبل از تیمار با دارو بهبود یابند. جهت پرهیز از القای استرس، حیوانات قبل از آزمایش دست‌آموز می‌شدند و هر حیوان تنها یک بار مورد آزمایش قرار می‌گرفت. پروتکل‌های بین‌المللی برای کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد تا درد و آزار حیوانات به حداقل برسد که این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس تایید شد.

مواد

مورفین سولفات (شرکت تمار، ایران) در سالیین (۰/۹ درصد) حل شده و به صورت داخل نخاعی (i.t.) در حجم ۱۰ میکرولیتر/موش (با دوز ۱۵ میکروگرم/موش) تزریق می‌شد. کلرید منگنز (مرک) نیز به صورت داخل نخاعی و در حجم ۱۰ میکرولیتر (۲۰ نانومول/موش) تزریق شد. غلظت کاتیون منگنز استفاده شده در این مطالعه کمی بالاتر از غلظت این کاتیون در مایع مغزی نخاعی (میکروگرم/لیتر ۱/۵-۰/۸) بود تا بتواند موجب فعالیت بیشتر اینتگرین‌ها شود.

تزریق داخل نخاعی

تزریق داخل نخاعی بر اساس روش یاکش و ردی (۱۷) انجام گرفت. بدین منظور حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. سر حیوان در دستگاه استریوتاگس جهت انجام جراحی ثابت شد. یک برش کوچک به طول ۲ سانتی‌متر از بین گوش‌ها به طرف پایین ایجاد و عضلات گردنی کنار زده شد و به آرامی از روی تیغه اکسی پیتال جمجمه آزاد شدند. وسط غشای اطلس - اکسی پیتال

بررسی بیان ژن

در گروه‌های مختلف مورد استفاده، ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق برای القای تحمل (روز ششم)، سر حیوانات قطع شد. پس از استخراج طناب نخاعی، بخش خلفی نخاع کم‌ری فوری جدا و در نیتروژن مایع نگهداری شد. کل RNA سلولی به وسیله روش فنول-کلروفرم (۲۱) و با استفاده از معرف RT⁺RNX* (سیناژن-ایران) جدا شد. برای بررسی میزان بیان ژن از روش PCR نیمه کمی استفاده شد (۲۲). به طور خلاصه واکنش RT با استفاده از پرایمر Oligo-dT و آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV (فرمنتاز) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. واکنش‌های PCR برای مطالعه بیان ژن در نمونه‌های به دست آمده از هر موش صحرایی آماده شد. هر واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای پیش‌رو و معکوس اختصاصی برای ژن‌های بتا‌اکتین (به عنوان استاندارد داخلی)، اینتگرین بتا ۱ و بتا ۲ انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR برای تکثیر بخشی از ژن‌های مورد مطالعه

نام ژن	نوع پرایمر	3- توالی پرایمر - 5'
بتا-اکتین	پیش‌رو	CCCAGAGCAAGAGAGGCATC
	پس‌رو	CTCAGGAGGAGCAATGATCT
اینترگرین بتا ۱	پیش‌رو	GAGTGTGTCTGTGGACAGTGTG
	پس‌رو	GTCTCCACAACATGCACGTGAG
اینترگرین بتا ۲	پیش‌رو	TGTGGACGACGATCGAGAGTGT
	پس‌رو	AAGCTGGGGCCACCTTTACTGA

DNA پلیمرز Taq (سیناژن، ایران) برای تکثیر DNA استفاده شد و واکنش PCR پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ سیکل با چرخه دمایی (۶۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه در ۵۷ درجه سانتی گراد و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد) دنبال شد. آخرین سیکل با یک مرحله انکوباسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه دنبال شد. تمام پارامترهای واکنش طوری تنظیم شد که رابطه‌ای خطی میان تعداد سیکل‌های PCR و مقدار محصول PCR و همچنین رابطه خطی میان مقدار اولیه cDNA الگو و مقدار محصول PCR برقرار بود. براساس نتایج به دست آمده از این آزمایشات، ۳۰ سیکل PCR برای آنالیز نمونه‌ها استفاده شد. محصولات PCR متعاقباً روی ژل آگاروز ۱ درصد آنالیز شد (Roche، آلمان). دانسیته باندها توسط نرم‌افزار Lab works اندازه‌گیری شد (UV Doc، انگلیس).

تجزیه و تحلیل آماری

تفاوت آماری بین زمان تاخیر در آزمون Tail-Flick در قبل و بعد از مصرف دارو با آزمون Paired t test مقایسه شد. برای مقایسه دانسیته باندها و میزان اثر بی‌دردی در گروه‌های مختلف از آزمون t-test و یا آنالیز واریانس (NOVA) یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون Tukey استفاده شد. هر گروه شامل نمونه‌های به دست آمده از ۶ حیوان بود (n=۶). نتایج به صورت میانگین Mean ± SEM (خطای معیار میانگین) ارائه شده‌اند. p < ۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی‌دار بودن مورد استفاده قرار گرفت.

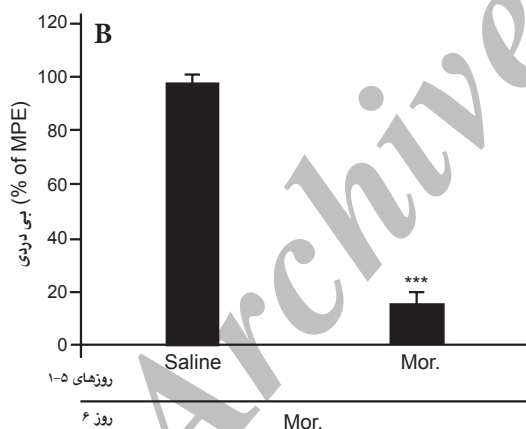
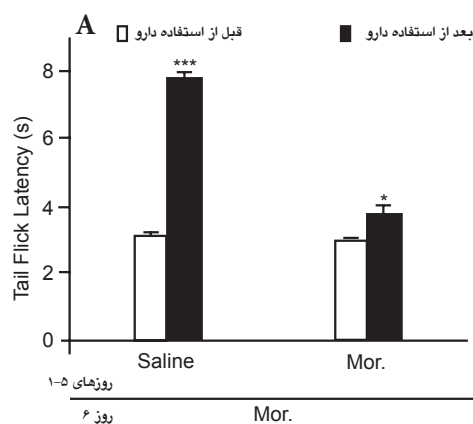
یافته‌ها

آزمون تحمل به اثر ضد‌دردی مورفین

در این آزمون دو گروه از حیوانات مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه

اول طی پنج روز، دو بار در روز (صبح و عصر)، مورفین داخل نخاعی با دوز ۱۵ میکروگرم/موش (در حجم ۱۰ میکرولیتر) تزریق شد. در گروه دوم با الگوی مشابه هر بار ۱۰ میکرولیتر سالین به صورت داخل نخاعی تزریق شد. صبح روز ششم تزریق مورفین با دوز ۱۵ میکروگرم/موش در هر گروه انجام شد و اثر ضد‌دردی آن با آزمون Tail Flick سنجش شد.

تزریق مورفین در گروهی که قبلاً به مدت پنج روز سالین دریافت کرده بود، باعث ایجاد بی‌دردی کامل شد (MPE=۱۰۰) (% (p < ۰/۰۱)، در حالی که تجویز همان دوز از مورفین در گروهی که قبلاً به مدت پنج روز مورفین دریافت کرده بود، بی‌دردی کمی را ایجاد کرد (MPE=۱۴) (% (p < ۰/۰۵). میزان بی‌دردی در دو گروه اختلاف معنی‌داری داشت (p < ۰/۰۰۱) (نمودار ۱).



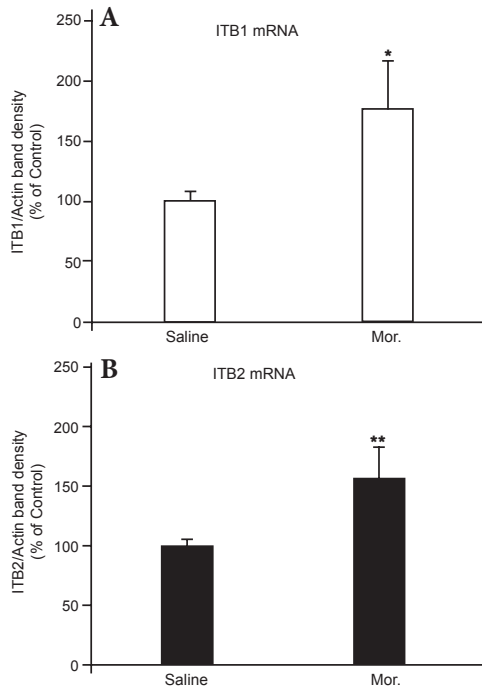
نمودار ۱: کاهش اثر ضد‌دردی مورفین به دنبال استفاده داخل نخاعی و مکرر آن (ایجاد تحمل). A: تغییرات زمان تاخیر در آزمون Tail Flick. B: تغییرات میزان درصد بی‌دردی از حد اکثر بی‌دردی ممکن. مصرف مکرر مورفین با دوز ۱۵ میکروگرم / موش به صورت داخل نخاعی روزی دوبار و به مدت پنج روز باعث کاهش اثر بی‌دردی همان دوز در روز ششم و به عبارتی تکوین تحمل نسبت به اثر ضد‌دردی مورفین گردید در حالی که در گروه دریافت‌کننده سالین مکرر، مورفین بی‌دردی شدیدی (۱۰۰ درصد) ایجاد کرد. Pre-drug: n=۶, *p < ۰/۰۵, ***p < ۰/۰۰۱. زمان تاخیر آزمون Tail Flick قبل از تزریق مورفین در روز ۶، Post-drug: زمان تاخیر آزمون Tail Flick پس از تزریق مورفین در روز ۶، Mor: مورفین، نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است.

نتایج آزمایش

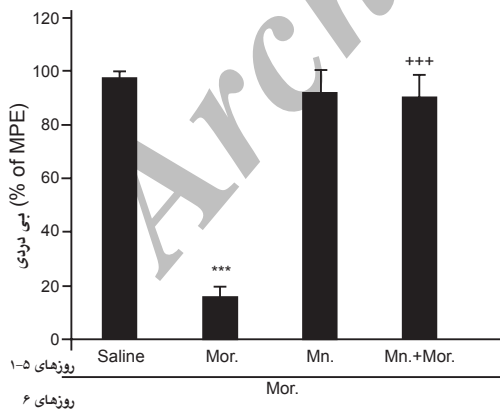
(Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

با وجود اینکه اندازه قطعات تکثیر شده در واکنش

(۱۰ میکرولیتر/موش) و یا کاتیون منگنز (۲۰ نانومول/موش) را به مدت پنج روز دریافت کردند، در روز ششم در پاسخ به دوز مشابه مورفین بی‌دردی تقریباً کاملی (در هر دو مورد $>92\%$ MPE) ایجاد شد (نمودار ۳).

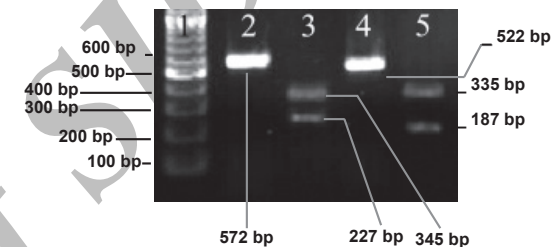


نمودار ۳: میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمربندی به دنبال تجویز مکرر مورفین. تاثیر پنج روزه تزریق داخل نخاعی سالین و مورفین، بر میزان بیان ژن‌های اینتگرین بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمربندی موش صحرایی در شکل دیده می‌شود. مورفین نسبت به گروه سالین باعث افزایش قابل توجه در میزان بیان ژن‌های اینتگرین بتا ۱ (A) و بتا ۲ (B) شده است. ITB1: اینتگرین بتا ۱، ITB2: اینتگرین بتا ۲، Mor: مورفین، $p < 0.01$ و $p < 0.05$ * نسبت به گروه سالین، $n=6$. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است.



نمودار ۴: اثر مصرف مکرر کاتیون منگنز بر تشکیل تحمل به اثر ضددردی مورفین. مصرف مکرر مورفین به مدت پنج روز داخل نخاعی با دوز ۱۵ میکروگرم/موش به مدت پنج روز باعث کاهش میزان بی‌دردی ناشی از همان دوز مورفین در روز ششم گردید، در صورتی که در گروه‌هایی که فقط سالین با حجم ۱۰ میکرولیتر، کاتیون منگنز با دوز (۲۰ نانومول/موش) یا تزریق توأم کاتیون منگنز + مورفین به مدت پنج روز گرفتند، در روز ششم همین دوز مورفین بی‌دردی قابل ملاحظه‌ای ایجاد کرد. $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه سالین، $p > 0.001$ +++ در مقایسه با گروه Mor. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است، Mn: کاتیون منگنز، Mor: مورفین.

PCR برابر با اندازه مورد نظر (بر اساس موقعیت پرایمرهای طراحی شده) برای اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ بود، به منظور اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده در واکنش PCR، از روش RFLP استفاده شد. در این روش آنزیم‌های محدود کننده (برش دهنده) ترادف خاصی از رشته DNA را شناسایی کرده و آن را برش می‌دهد. در این مطالعه هضم آنزیمی بر محصولات تکثیر شده نشان داد که آنزیم Bgl II محصول تکثیر شده از cDNA مربوط به اینتگرین بتا ۱ را - که ۵۷۲ جفت باز داشت - مطابق انتظار به دو قطعه به طول‌های ۳۴۵ و ۲۲۷ جفت باز و آنزیم BamHI محصول تکثیر شده از cDNA مربوط به اینتگرین بتا ۲ - که ۵۲۲ جفت باز داشت - مطابق انتظار به دو قطعه به طول‌های ۳۳۵ و ۱۸۷ جفت باز شکست و بدین‌وسیله صحت واکنش PCR تایید گردید (شکل ۱). صحت توالی قطعه تکثیر شده برای ژن بتا۱کین در مطالعات قبلی گزارش شده است (۱۳).



شکل ۱: طرح الکتروفورزی هضم محصول PCR مربوط به cDNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ روی ژل آگارز ۱ درصد. قطعه تکثیری برای اینتگرین بتا ۱ با آنزیم Bgl II و برای اینتگرین بتا ۲ با آنزیم BamHI هضم شد. هضم با آنزیم Bgl II محصول تکثیر شده از cDNA مربوط به اینتگرین بتا ۱ دو قطعه به طول‌های ۳۴۵ و ۲۲۷ جفت باز و هضم با آنزیم BamHI محصول تکثیر شده برای cDNA مربوط به اینتگرین بتا ۲ دو قطعه به طول‌های ۳۳۵ و ۱۸۷ نشان داد که مطابق انتظار بودند. این نتیجه تاییدی بر هویت صحیح قطعه تکثیر شده با PCR می‌باشد. ITB1: اینتگرین بتا ۱، ITB2: اینتگرین بتا ۲، RLFP: محصول واکنش هضم آنزیمی (RFLP).

اثر تجویز مکرر مورفین بر میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲

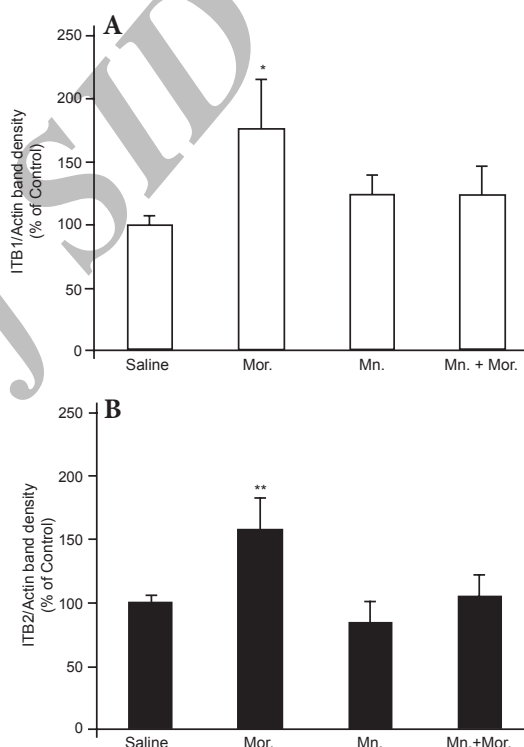
به دنبال ۵ روز مصرف مکرر مورفین، بیان ژن‌های مورد نظر در روز ششم مورد بررسی قرار گرفت. مصرف مکرر مورفین داخل نخاعی (۱۵ میکروگرم/موش) به مدت پنج روز میزان mRNA اینتگرین بتا ۱ را در ۱۶ ساعت پس از آخرین تزریق (روز ششم) به میزان ۷۷ ($p < 0.05$) درصد و میزان mRNA اینتگرین بتا ۲ را به میزان ۵۷ ($p < 0.01$) درصد افزایش داد (نمودار ۲).

بررسی اثر کاتیون منگنز بر ایجاد تحمل به اثر ضددردی مورفین

این آزمایش به منظور بررسی علت تغییر در بیان ژن اینتگرین‌ها انجام شد تا مشخص شود این افزایش نتیجه اثر مستقیم مورفین یا فیدبک ناشی از مهار اینتگرین‌ها توسط مورفین می‌باشد. در موش‌های صحرایی که به مدت پنج روز مورفین داخل نخاعی با دوز ۱۵ میکروگرم/موش دریافت کرده بودند، در روز ششم تحمل معنی‌داری نسبت به مورفین با دوز مشابه دیده شد ($p < 0.001$). در گروهی از حیوانات که کاتیون منگنز را به صورت داخل نخاعی به مدت پنج روز، هر روز قبل از مورفین دریافت نمودند، تزریق مورفین با دوز قبلی در روز ششم بی‌دردی شدیدتری نسبت به گروه دریافت کننده مورفین مکرر ایجاد کرد ($p < 0.001$). در گروه‌هایی که فقط سالین

اثر تجویز مکرر منگنز بر میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲

همان‌طور که نشان داده شد، مصرف مکرر مورفین داخل نخاعی (۱۵ میکروگرم/موش) به مدت پنج روز میزان mRNA اینتگرین بتا ۱ و میزان mRNA اینتگرین بتا ۲ را افزایش داد. در این مرحله از تحقیق اثر تجویز مکرر کاتیون منگنز با دوز ۲۰ نانومول/موش، به تنهایی و یا همراه مورفین بررسی شد. به دنبال تجویز هم‌زمان کاتیون منگنز و مورفین نسبت به گروه سالیین تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های اینتگرین بتا ۱ و بتا ۲ دیده نشد. کاتیون منگنز به تنهایی نیز موجب تغییر معنی‌دار بیان mRNA اینتگرین بتا ۱ و اینتگرین بتا ۲ نگردید (نمودار ۴).



نمودار ۴: میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری به دنبال تجویز مکرر کاتیون منگنز. تاثیر پنج روز تزریق داخل نخاعی مورفین، کاتیون منگنز و همچنین تزریق هم‌زمان کاتیون منگنز + مورفین بر میزان بیان ژن‌های اینتگرین بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری موش صحرایی در شکل دیده می‌شود. تجویز هم‌زمان کاتیون منگنز و مورفین نسبت به گروه سالیین باعث تغییر معنی‌دار میزان بیان ژن‌های اینتگرین بتا ۱ (A) و بتا ۲ (B) نشده است. کاتیون منگنز به تنهایی تغییری در mRNA اینتگرین بتا ۱ (A) و اینتگرین بتا ۲ (B) ایجاد نکرد. * $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ نسبت به گروه سالیین، $n = 6$. ITB=۱: اینتگرین بتا ۱، ITB=۲: اینتگرین بتا ۲، Mn: کاتیون منگنز، Mor: مورفین، نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است.

بحث

در این مطالعه برای القای تحمل به اثر ضددردی مورفین از تزریق داخل نخاعی آن به میزان ۱۵ میکروگرم/موش دو بار در روز به مدت پنج روز (۸ صبح و ۶ عصر) استفاده شد. نتایج به دست آمده حاکی از کاهش معنی‌دار اثر ضددردی مورفین در این گروه از حیوانات در

روز ششم بود و نشان داد که مصرف مکرر مورفین با الگوی مذکور قادر است نسبت به اثر ضددردی همان دوز مورفین تحمل ایجاد نماید (نمودار ۱).

تحقیق حاضر نشان داد مورفین می‌تواند موجب افزایش در میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع کمری شود (نمودار ۲). تزریق کاتیون منگنز به صورت داخل نخاعی مانع از ایجاد تحمل به مورفین در بخش خلفی نخاع کمری می‌شود (نمودار ۳) و در نهایت در حضور منگنز تنها و منگنز همراه مورفین تغییر بارزی در بیان ژن‌های مذکور دیده نمی‌شود (نمودار ۴). علاوه بر این، در گروه‌هایی که کاتیون منگنز را با الگوی مذکور دریافت کرده بودند، مورفین با دوز ۱۵ میکروگرم/موش در روز ششم باعث ایجاد بی‌دردی بارزی شد که نشان می‌دهد تجویز مکرر کاتیون منگنز در الگوی مورد استفاده در این مطالعه باعث ایجاد تحمل متقابل به اثر ضددردی مورفین نمی‌گردد (نمودار ۲).

انجام واکنش‌های RFLP بر محصولات تکثیر شده برای ژن‌های اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ نشان داد که طول قطعات حاصل برابر طول‌های مورد انتظار بود و بدین ترتیب صحت توالی‌های تکثیر شده تایید گردید. استفاده از واکنش هضم آنزیمی یا RFLP برای تشخیص قطعات تکثیر شده تاییدی محکم است (۲۳).

در مجموع، نتایج مربوط به بهینه‌سازی کمیته‌های PCR نشان داد که انجام PCR با ۳۰ سیکل، میزان cDNA ورودی ۳ میکرولیتر و دمای اتصال پرایمر ۵۷ درجه سانتی‌گراد، در حدی است که اولاً توسط رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل رویت زیر نور UV می‌باشد و ثانیاً با این میزان تکثیر به حد اشباع نمی‌رسد. پارامترهای مربوط به عکس‌برداری مانند اندازه دیافراگم و مدت اکتساب نور از دوربین برای هر عکس (Acquisition Time) نیز همواره برای تمام نمونه‌ها ثابت بود.

در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است که مورفین (به صورت داخل نخاعی) موجب افزایش mRNA اینتگرین $\alpha 1$ می‌شود (۲۴). افزایش میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ می‌تواند دو علت داشته باشد: افزایش مستقیم بیان توسط مورفین (یعنی این احتمال وجود دارد که تکوین تحمل به اثر ضددردی مورفین موجب افزایش میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ شود) و یا اینکه فیدبک ناشی از مهار اینتگرین توسط مورفین مکرر، علت افزایش mRNA اینتگرین‌ها باشد.

برای آزمودن دو علت مطرح شده آزمایشی طراحی شد که در آن هم‌زمان با تجویز مورفین، اینتگرین‌ها نیز فعال شوند. بدین منظور، در گروهی از حیوانات، توام با مورفین، کاتیون منگنز نیز به صورت داخل نخاعی (برای فعال کردن اینتگرین‌ها) تجویز شد. نتایج این آزمایش نشان داد که کاتیون منگنز موجب مهار تحمل به اثر ضددردی مورفین می‌شود. بر اساس مطالعات قبلی، ایجاد تحمل به اثر ضددردی اپیویدها با چندین فرآیند سلولی همراه است که از جمله آنها می‌توان به افزایش PKC، NO، و CaMKII اشاره کرد. شواهدی وجود دارد که هر سه این مولکول‌ها به گونه‌ای اثرات مهار کننده بر فعال شدن اینتگرین‌ها دارند (۱۱-۷). بنابراین شاید بتوان پیشنهاد کرد که کاتیون منگنز با فعال کردن اینتگرین‌ها و مخالفت با اثرات مهار کننده‌ای اپیویدها بر اینتگرین‌ها، می‌تواند تا حدودی از اثرات ناخواسته اپیویدها از قبیل تحمل‌جویی جلوگیری کند. در نتیجه به نظر می‌رسد که افزایش میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ به دلیل فیدبک ناشی از مهار اینتگرین‌ها توسط مورفین مکرر می‌باشد.

کاتیون منگنز موجب افزایش بیان ژن اینتگرین آلفا ۳ می‌شود

کولامین‌ها (۱۵، ۱۶) و تغییر عملکرد کانال‌های کلسیمی (۴۱، ۴۲) مشخص شود.

در این مطالعه، میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی لومبار نخاع به دنبال تجویز مکرر کاتیون منگنز و تجویز توام آنها با مورفین بررسی شد و نتایج نشان داد در حالی که مورفین باعث افزایش میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ می‌شود، کاتیون منگنز که خود اثر مهاری روی تحمل نشان داده است به تنهایی و در مصرف توام با مورفین بر میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ اثر معنی‌داری ندارد. به عبارت دیگر منگنز با فعال نگهداشتن اینتگرین‌ها در حضور مورفین علاوه بر مهار تحمل از فیدبک ناشی از مهار اینتگرین توسط مورفین ممانعت و از افزایش بیان آن جلوگیری می‌کند. به نظر می‌رسد علاوه بر مکانیزم‌های پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی، ماتریکس خارج سلولی نیز می‌تواند در ایجاد پلاستیسیته سیناپسی نقش مهمی داشته باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر در مجموع نشان داد مورفین می‌تواند موجب تغییراتی در میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ شود. مورفین مکرر موجب افزایش میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ در بخش خلفی نخاع لومبار می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که فعال کردن اینتگرین‌ها به وسیله تجویز موضعی کاتیون منگنز موجب مهار تحمل به اثر ضد درد مورفین می‌شود و از تغییر بیان ژن اینتگرین‌ها توسط مورفین ممانعت می‌کند. در نتیجه می‌توان پیشنهاد کرد که افزایش میزان mRNA اینتگرین‌های بتا ۱ و بتا ۲ به دنبال مصرف مکرر مورفین ناشی از فیدبک حاصل از مهار اینتگرین‌ها در این شرایط می‌باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه‌های این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است که بدین وسیله از تمامی پرسنل محترم آن قدردانی می‌شود.

References

1. Foley KM. Opioids. *Neurol Clin.* 1993; 11: 503-522.
2. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftusi J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 2000; 275: 21785-21788.
3. Berg KA, Gustavo Z, Hargreaves KM, Clarke WP, Milam SB. Integrins regulate opioid receptor signaling in trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience.* 2007; 144: 889-897.
4. Watson PMD, Humphries M J, Relton J, Rothwell NJ. Integrin-binding RGD peptides induce rapid intracellular calcium increases and MAPK signaling in cortical neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 2007; 34: 147-154.
5. Nishimura SL, Boylen KP, Einheber S, Milner TA, Ramos DM, Pytela R. Synaptic and glial localization of the integrin [alpha]v[beta]8 in mouse and rat brain. *Brain Res.* 1998; 791: 271-282.
6. Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. The regulation of integrin function by Ca²⁺. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1498: 91-98.
7. Banick PD, Chen Q, Thom SR. Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *J Cell Physiol.* 1997; 172: 12-24.

(۲۵). این کاتیون بیان طیف وسیعی از ژن‌های در آستروسیت‌ها است که از جمله بیان اینتگرین CD48، 3α، فاکتور رشد اپیدرمال (Epidermal Growth Factor; EGF)، پروتئین مهاری کیناز وابسته به کلسیم-کالمودلین و تنظیم کننده G پروتئین‌ها را افزایش می‌دهد. حذف سوپراکسید به وسیله Superoxide Dismutase (SOD) (که عملکرد طبیعی آن وابسته به کاتیون منگنز است) پردردی وساطت شده با N-methyl D-aspartate (NMDA) را از بین می‌برد (۲۶). کاتیون منگنز فعال کننده موثر اینتگرین‌ها است (۳۲-۲۷) و از میان کاتیون‌های دو ظرفیتی بیشترین اثر را بر فعال شدن اینتگرین‌ها دارد (۲۷). کاتیون منگنز با دامنه خارج سلولی اینتگرین‌ها متصل شده و موجب فعال شدن آن می‌شود (۲۹، ۳۵-۳۳). زیرواحد α اینتگرین دارای ناحیه اتصال شونده به یون فلزی است که می‌تواند به طور بارزی اتصال اینتگرین را به مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی (Extracellular Matrix; ECM) تحت تاثیر قرار دهد (۳۶). کاتیون منگنز موجب رشد نورونی می‌شود که به وسیله β₁ اینتگرین وساطت می‌شود و αv اینتگرین‌ها نقش بارزی در این رشد نورونی دارند (۳۳). همچنین کاتیون منگنز به وسیله تنظیم اتصال گیرنده اینتگرین به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، نقش مهمی را در تمایز سلولی دارد (۳۷). به نظر می‌رسد کاتیون منگنز با فعال کردن اینتگرین‌ها موجب افزایش قدرت اتصالات غشایی در سیناپس‌ها و تمرکز گیرنده‌های غشایی مانند گیرنده‌های اپیویدی و کانال‌های یونی در سیناپس‌ها می‌شود و بدین وسیله کارآیی سیناپس را افزایش می‌دهند و از طرفی با تنظیم الگوی پراکندگی گیرنده‌های اپیویدی و متمرکز کردن آنها در سیناپس‌ها، می‌توانند کارآیی این گیرنده‌ها را در سیناپس‌ها افزایش دهند.

مطالعات بیشتری لازم است تا چگونگی تداخل فعالیت و بیان افزایش یافته اینتگرین‌ها با مکانیزم‌های سلولی مولکولی تحمل مانند افزایش سطوح cAMP (۳۸، ۳۹)، افزایش فعالیت PKC و گیرنده‌های NMDA (۳۹)، تغییر در بیان پروتئین‌های G (۴۰)، تغییر متابولیسم کته

8. Massimo C, Pasquale M, Antonietta RM, Giovanni M, Ermenegildo S, Bruno A. Nitric oxide inhibits neutrophil adhesion during experimental extracorporeal circulation. *Anesthesiology.* 1998; 89: 443-448.
9. Fan GH, Wang LZ, Qiu HC, Ma L, Pei G. Inhibition of calcium/calmodulin dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Mol Pharmacol.* 1999; 56: 39-45.
10. Lavaska J, Whelan RDH, Watso R. PKCε controls the traffic of β1 integrins in motile cells. *EMBO J.* 2002; 21: 3608-3819.
11. Heinzen EL, Pollack GM. Pharmacodynamics of morphine-induced neuronal nitric oxide production and antinociceptive tolerance development. *Brain Res.* 2004; 1023: 175-184.
12. Gorbi J, Javan M, Sheibani V, Satarian L, Zarebko-han A. Possible role for integrins in the development of tolerance to the analgesic effect of morphine in male rats. *Physiol Pharmacol.* 2007; 11: 115-122.
13. Javan M, Ahmadiani A, Motamadi F, Kazemi B. Changes in G proteins genes expression in rat lumbar spinal cord support the inhibitory effect of chronic pain on the development of tolerance to morphine analgesia. *Neurosci Res.* 2005; 53: 250-256.
14. Javan M, Kazemi B, Ahmadiani A, Motamedi F. Dex-

- amethasone mimics the inhibitory effect of chronic pain on the development of tolerance to morphine analgesia and compensates for morphine induced changes in G proteins gene expression. *Brain Res.* 2006; 1104: 73-79.
15. Satarian L, Javan M, Fathollahi Y. Epinephrine inhibits analgesic tolerance to intrathecal administered morphine and increases the expression of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II α . *Neurosci Lett.* 2008; 430: 213-217.
16. Satarian L, Javan M, Motamedi F. Changes in gene expression level of enzymes involved in biosynthesis and degradation of catecholamines following chronic administration of morphine in rats. *Physiol Pharmacol.* 2008; 12: 14-21.
17. Yaksh TL, Ruddy TA. Chronic catheterization of the spinal sub-arachnoid space. *Physiol Biochem Behav.* 1976; 17: 1031-1036.
18. Granados-Soto V, Kalcheva I, Hua XY, Newton A, Yaksh TL. Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. *Pain* 2000; 85: 395-404.
19. D'Amour FE, Smith DL. A method for determination loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Therap.* 1941; 72: 74-79.
20. Harris LS, Pierson AK. Some narcotic antagonists in the benzomorphan series. *J Pharmacol Exp Ther.* 1964; 143: 141-148.
21. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in Molecular Biology.* New York: Wiley; 2002; 4(1-4): 6.
22. Marone M, Mozzetti S, Ritis DD, Pierelli L, Scambia G. Semi-quantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced.* 2001; 3: 19-25.
23. Chetsawang B, Casalotti SO, Phansuwan-Pujito P, Kotchabhakdi N, Govitrapong P. Gene expression of opioid receptors and G-Proteins in pineal glands. *Biochem Biophys Res Comm.* 1999; 262: 775-780.
24. Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. Transcriptional and translational regulation of glial activation by morphine in a rodent model of neuropathic pain. *J Pharmacol Exp. Therap.* 2005; 313: 1239-1247.
25. Sengupta A, Mense SM, Lan C, Zhou M, Mauro RE, Kellerman L, Bentsman G, et al. Gene expression profiling of human primary astrocytes exposed to manganese chloride indicates selective effects on several functions of the cells. *Neurotoxicology.* 2007; 28: 478-489.
26. Muscoli C, Mollace V, Wheatley J, Masini E. Superoxide-mediated nitration of spinal manganese superoxide dismutase: a novel pathway in N-methyl-D-aspartate-mediated hyperalgesia. *Pain.* 2004; 111: 96-103.
27. Mould AP, Garratt AN, Puzon-Mclanughlin W, Takada Y, Humphries MJ. Regulation of integrin function: evidence that bivalent-cation-induced conformational changes lead to the unmasking of ligand-binding sites within integrin $\alpha 5\beta 1$. *Biochem J.* 1998; 331: 821-828.
28. Ivins JK, Yurchenco PD, Lander AD. Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J Neurosci.* 2000; 20: 6551-6560.
29. Takagi J, Erickson HP, Springer TA. C-terminal opening mimics inside-out activation of integrin $\alpha 5\beta 1$. *Nature Struct. Biol.* 2001; 8: 412-416.
30. Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science.* 2002; 296: 151-155.
31. Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol.* 2003; 160: 781-779.
32. Fujimoto TT, Katsutani S, Shimomura T, Fujimura K. Thrombospondin-bound integrin-associated protein (CD47) physically and functionally modifies integrin $\alpha IIb\beta 3$ by its extracellular domain. *J Biol Chem.* 2003; 278: 26655-26665.
33. Lein P, Gallagher PJ, Amodeo J, Howie H, Roth JA. Manganese induces neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation of αV integrins. *Brain Res.* 2000; 885: 220-230.
34. Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemos.* 2003; 1: 1642-1654.
35. Adair BD, Xiong JP, Maddock C, Goodman SL, Arnaout MA, Yeager M. Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin $\alpha V\beta 3$ in a complex with fibronectin. *J Cell Biol.* 2005; 168: 1109-1117.
36. Roth JA, Horbinski C, Higgins D, Lein P, Garrick MD. Mechanisms of manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death and cell differentiation. *Neurotoxicology.* 2002; 23: 147-157.
37. Reichardt LF, Tomaselli KJ. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Neuroscience.* 1991; 14: 531-570.
38. Hassanpour Ezati M, Semnani S, Fatollahi Y, Nadermanesh H, Altarihi T. Evaluation of Adaptive Changes in the Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) of the Paragigantocellularis Nucleus Neuron Nucleus in Morphine Dependent Rats Using NMR Spectroscopy. *Yakhte;* 2005; 7: 132-139.
39. Williams JT, McDonald JC, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptation mediating opioid dependence. *Physiol Rev.* 2001; 81: 299-343.
40. Javan M, Ahmadiani A, Motamedi F, Hazemi B. The Role of $G\alpha i/o$ and $G\beta$ Protein Gene Expression In Chronic Morphine Induced Tolerance to Analgesia in Rat Lumbar Spinal Cord. *Yakhteh.* 2003; 5: 165-170.
41. Asadi S, Javan M, Ahmadiani A, Sanati MH. Alternative Splicing in the Synaptic Protein Interaction Site of Rat $Ca(v)2.2$ ($\alpha 1B$) Calcium Channels: Changes Induced by Chronic Inflammatory Pain. *J. Mol. Neurosci.* 2009; 39: 40-48.
42. Esmaeili-Mahani S, Fereidoni M, Javan M, Maghsoudi N, Motamedi F, Ahmadiani A. Nifedipine suppresses morphine-induced thermal hyperalgesia: evidence for the role of corticosterone. *Eur J Pharmacol.* 2007; 567: 95-101.