

اثر تزریق کلونیدین به درون هسته پاراژیگانتوسلولاریس جانبی بر علائم قطع مصرف مرفین در موش صحرائی نر وابسته به مرفین

هادی فتحی مقدم^۱، مهناز کسمتی^۲، حسین محمدپور کارگر^۳

خلاصه

سابقه و هدف: هسته پاراژیگانتوسلولاریس (LPGi) در بصل النخاع قرار داشته و در اعمال مختلف فیزیولوژیک نقش دارد. در پژوهش حاضر به بررسی اثر تزریق کلونیدین به درون هسته پاراژیگانتوسلولاریس بر سندرم ترک مرفین پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: بعد از اعمال جراحی و کانول گذاری در هسته LPGi، وابستگی به مرفین طی چهار روز و هر روز دوبار به ترتیب ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم مرفین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. جهت القای سندرم ترک در روز پنجم از هیدروکلرایدنالوکسان نیم ساعت بعد از تزریق آخرین دوز مرفین استفاده شد. علائم ترک مانند افتادگی پلک، لرزپاهای جلویی، دندان قروچه، جویدن Grooming و Wet dog shakes به مدت نیم ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در گروه‌های دریافت کننده کلونیدین، با دوزهای یک و یا دو میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر محلول کلونیدین (به عنوان آگونیست آلفا-۲ آدرنوسپتور) پنج دقیقه قبل از تزریق نالوکسان به طور دو طرفه به هسته پاراژیگانتوسلولاریس جانبی تزریق گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کلونیدین علائم افتادگی پلک، جویدن، لرزپای جلویی را کاهش می‌دهد ولی بر سایر علائم مورد بررسی، شامل دندان قروچه، Grooming و Wet dog shakes اثری ندارد.

نتیجه گیری: بدین ترتیب می‌توان گفت که یکی از مراکزی که کلونیدین می‌تواند اثر خود را در تغییر علائم ترک اعمال نماید، هسته پاراژیگانتوسلولاریس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کلونیدین، هسته پاراژیگانتوسلولاریس، سندرم ترک، مرفین

۱- استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اهواز (نویسنده مسئول)

۲- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز

۳- مربی گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی دامغان

مقدمه

اعتیاد به مواد مخدر یکی از مهمترین مسائل اجتماعی بشر را تشکیل می‌دهد. شناخت دقیق وابستگی به مواد مخدر، جهت مبارزه با آن ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات گسترده در این زمینه نشان داده است که هسته‌های مغزی و سیستم‌های نوروترانسمیتری مختلف در این امر دخالت دارند. ناحیه شکمی جانبی بصل النخاع شامل هسته‌های مهمی از قبیل هسته پاراژینگانتوسولولاریس جانبی (LPGi) و رافه مگنوس می‌باشد، هسته پاراژینگانتوسولولاریس در اعمال فیزیولوژیکی مختلفی مانند درد، تنظیم تنفس و فعالیت جنسی نقش دارد [۹]. مهمترین خروجی این هسته به هسته لوکوس سرولوئوس (LC) می‌رود [۱۲]. هسته LC یکی از مراکز عمده آدرنرژیک مغزی می‌باشد که حدود ۵۰٪ از سیستم آدرنرژیک مغزی را تشکیل می‌دهد [۳]. این هسته در اعمالی مانند حافظه، بیداری، درک درد و اضطراب نقش دارد [۲]. LC یک هسته تحریکی سمپاتیکی در مغز بوده و تحریکاتی که پاسخ سمپاتیکی را ایجاد می‌کند از این ناحیه میانجی‌گری می‌شود [۵]. مطالعات نشان داده است که تحریک الکتریکی هسته LPGi می‌تواند باعث ایجاد رفتارهای مشابه علایم ترک مرفین شود [۱۸]. فعالیت هسته پاراژینگانتوسولولاریس در حیوان‌های وابسته به مرفین کاهش می‌یابد [۱۳]. هم‌چنین مطالعات نشان داده اند که با تزریق نالوکسان به این هسته در حیوان‌های معتاد، فعالیت الکتریکی آن افزایش یافته و هم‌زمان با آن، فعالیت الکتریکی لوکوس سرولوئوس نیز افزایش می‌یابد [۲۵]. هسته LC در سندرم قطع مصرف مرفین نیز نقش مهمی ایفا می‌کند [۱۱]. گزارش شده است که فعالیت این هسته هنگام سندرم ترک^۱ افزایش پیدا می‌کند. آگونیست‌های گیرنده آلفا-۲، مانند کلونیدین در کاهش علایم ترک بکار می‌روند [۱۵]. کلونیدین با اثر بر CNS باعث کاهش فعالیت سمپاتیکی و افزایش پاراسمپاتیکی

می‌شود [۱۵]. این دارو دارای نیمه عمر ۸ الی ۱۲ ساعت می‌باشد و از سد خونی-مغزی به راحتی عبور می‌کند و وارد مغز می‌شود. کلونیدین باعث کاهش آزادسازی نورآدرنالین در CNS می‌شود [۱۶]. مطالعات نشان داده است که کلونیدین می‌تواند در دوزهای بالا بر گیرنده‌های آدرنرژیک آلفا-۱ اثر گذاشته و باعث افزایش فشار خون شود [۱۲]. تحقیقات دیگر نشان داده است که کلونیدین از طریق عمده‌ترین مرکز آدرنرژیک مغزی یعنی LC اثر خود را اعمال می‌کند [۲۶]. این هسته دارای تراکم بالای گیرنده آلفا-۲ [۶] و هم‌چنین گیرنده‌های اپیوئیدی می‌باشد [۴]. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تزریق کلونیدین به LC نمی‌تواند برخی علائم از جمله تعداد پرش را تحت تأثیر قرار دهد [۷]. بنابراین به نظر می‌رسد که گیرنده‌های آلفا-۲ سایر نواحی سیستم عصبی مرکزی نیز در بروز علائم سندرم ترک دخالت دارند. در تحقیق حاضر اثر تزریق کلونیدین به درون هسته پاراژینگانتوسولولاریس بر علایم قطع مصرف مرفین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

حیوان‌ها: در این مطالعه تجربی، از ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد N-MARI با وزن 180 ± 20 گرم استفاده گردید. حیوانات تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشتند. حیوانات در گروه‌های ۷ تایی و دردمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و دسترسی آزادانه به آب و غذای مخصوص داشتند.

داروها: در این تحقیق از سولفات مرفین (شرکت تولید دارو)، هیدروکلراید نالوکسان (۲ میل‌گرم بر کیلوگرم)، کتامین (ساخت آلفاسان هلند)، رامپون (Xylazine) ۲٪ (ساخت شرکت جانل ایرلند) با دوز ۲ و ۴ میکروگرم در میکرولیتر و کلونیدین کلراید (ساخت شرکت سیباگایکی هلند) استفاده شد. کلونیدین برای تزریق به داخل هسته پاراژینگانتوسولولاریس در مایع مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF) حل شد. ACSF شامل:

1- Withdrawal Syndrome

به داخل هسته پارازیگانتوسولولاریس جانبی بطور دو طرفه تزریق شده و علائم ترک به مدت نیم ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی بافت‌شناسی و تحلیل آماری: بعد از مشاهدات رفتاری برای پی‌بردن به محل دقیق تزریق، محلول متیلن بلو تزریق شد و بعد از کشتن حیوان‌ها، مغز آنها در فرمالین ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت فیکس گردید. بعد از این مدت مغز برش داده شده و محل تزریق با اطلس پاکسینوس و واتسون [۱۴] مقایسه شد. در صورت عدم تطابق داده‌های هر حیوان حذف می‌گردید. داده‌ها توسط نرم‌افزار Spss و روش آنالیز واریانس یکطرفه مورد ارزیابی قرار گرفت داده‌ها به صورت Mean±SEM نشان داده شده‌اند. $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

برای بررسی سندرم قطع مصرف مرفین، علائم افتادگی پلک، لرزپاهای جلویی، دندان قرچه، جویدن، Grooming و Wet dog shakes مورد بررسی قرار گرفت.

(الف) - علامت افتادگی پلک: همان طوری که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، تزریق کلونیدین به داخل هسته پارازیگانتوسولولاریس جانبی باعث افزایش زمان افتادگی پلک در دوز ۴ میکروگرم در میکرولیتر ($p < 0/02$) نسبت به گروه شاهد گردید. (ب) - علامت لرزپاهای جلویی:

با توجه به نمودار ۲، تزریق کلونیدین توانست در دوزهای ۲ و ۴ میکروگرم در میکرولیتر باعث کاهش معنی‌داری ($p < 0/04$) در بروز این رفتار نسبت به گروه کنترل شد.

(ج) - تعداد دندان قروچه: نمودار ۳ نشان می‌دهد که تزریق کلونیدین به هسته پارازیگانتوسولولاریس جانبی نتوانست اثر معنی‌داری بر تعداد دندان قروچه ایجاد کند.

کلورسدیم ۷/۶۱۱۵ گرم، کلرور پتانسیم ۰/۲۹۸ گرم، کلرور منیزیم ۰/۴۰۶۶ گرم، بی‌کربنات کلسیم ۰/۲۲۱۹ گرم، پتانسیم دی‌هیدروژن فسفات ۰/۱۶۳۳ گرم و گلوکز ۲ گرم که در یک لیتر آب مقطر حل شده و به pH طبیعی بدن (۷/۴) رسانده شد [۱۴]. حیوانات توسط مخلوط کتامین ۱۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و رامپون ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم که به داخل صفاق تزریق می‌شد بی‌هوش شدند. برای کانول‌گذاری از دستگاه استرئوتاگس (ساخت آمریکا) استفاده شد. مختصات هسته $D=12/12$ LPGi و $L= \pm 1/6$ و $AP= 5/74$ بر حسب میلی‌متر تعیین و کانول راهنما به فاصله ۲ میلی‌متر بالاتر از هسته و با زاویه ۳۰ درجه قرار داده شد [۱۴]. به حیوانات اجازه داده شد که یک دوره بهبودی ۷ روزه را بعد از جراحی طی کنند. بعد از طی این دوره، حیوان به مرفین معتاد می‌شد. طریقه اعتیاد به این صورت بود که هر حیوان هر روز ۲ نوبت (۸ صبح و ۸ عصر) به مدت ۴ روز به ترتیب دوزهای ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مرفین را به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند. در روز پنجم تک دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شد. ۲۵ دقیقه بعد از دریافت آخرین دوز مرفین حیوانات به سه گروه تقسیم شدند.

۱- گروه شاهد: گروهی که تنها ۰/۵ میکرولیتر ACSF به درون هسته پارازیگانتوسولولاریس آنها تزریق شد.

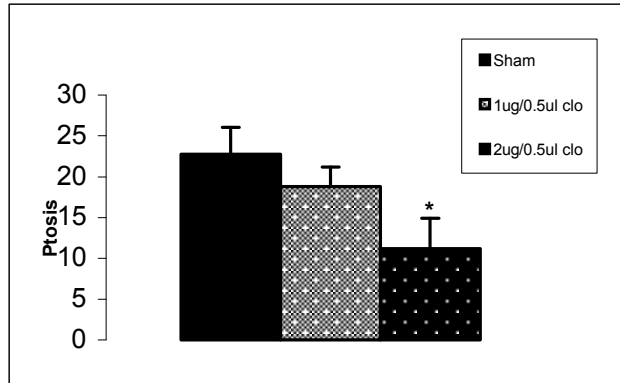
۲- گروه دریافت‌کننده کلونیدین: دو میکروگرم در میکرولیتر محلول کلونیدین به صورت تزریق درون هسته LPGi دریافت کردند.

۳- گروه دریافت‌کننده کلونیدین: ۰/۵ میکرولیتر محلول کلونیدین ۴ میکروگرم در میکرولیتر به صورت تزریق درون هسته LPGi دریافت کردند.

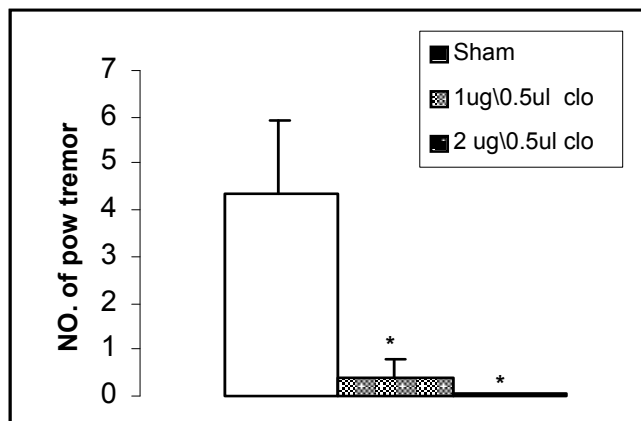
بعد از نیم ساعت، نالوکسان در دوز ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی تزریق گردید. ۵ دقیقه قبل از تزریق نالوکسان، کلونیدین حل شده در ACSF

(م) - علامت **Wet dog shakes**: همانطور که در نمودار ۵ مشاهده می‌شود، تزریق کلونیدین به داخل هسته پارازیگانتوسلولاریس جانبی نتوانست اثر معنی‌داری در تعداد **Wet dog shakes** ایجاد کند.

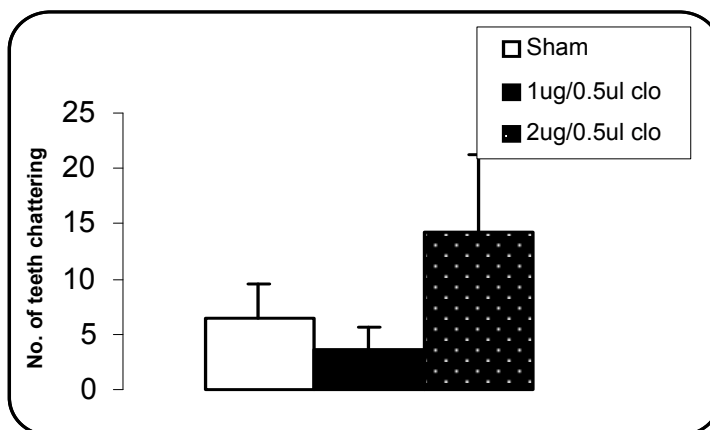
(د) - تعداد **Grooming**: با توجه به نمودار ۴، تزریق کلونیدین به داخل هسته پارازیگانتوسلولاریس جانبی نتوانست اثر معنی‌داری در تعداد **Grooming** ایجاد نماید.



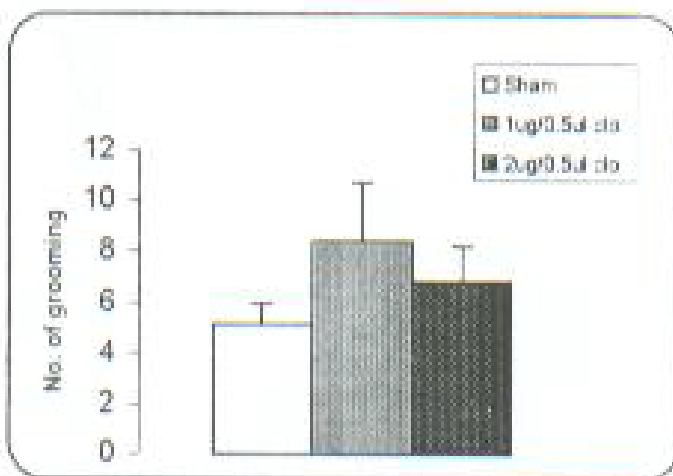
نمودار ۱: اثر تزریق کلونیدین به داخل هسته پارازیگانتوسلولاریس زمان افتادگی پلک (دقیقه) در موش‌های صحرایی کنترل و دریافت‌کننده کلونیدین
* اختلاف معنی‌دار بین دوز ۲ میکروگرم بر ۰/۵ میکرولیتر در مقایسه با گروه شاهد ($p < 0.02$)



نمودار ۲: اثر تزریق کلونیدین به داخل **LPGi** بر تعداد لرز پاهای جلویی: * تزریق کلونیدین نتوانست در دوزهای ۲ و ۴ میکروگرم در میکرولیتر باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.04$) در بروز این رفتار نسبت به گروه کنترل شود.

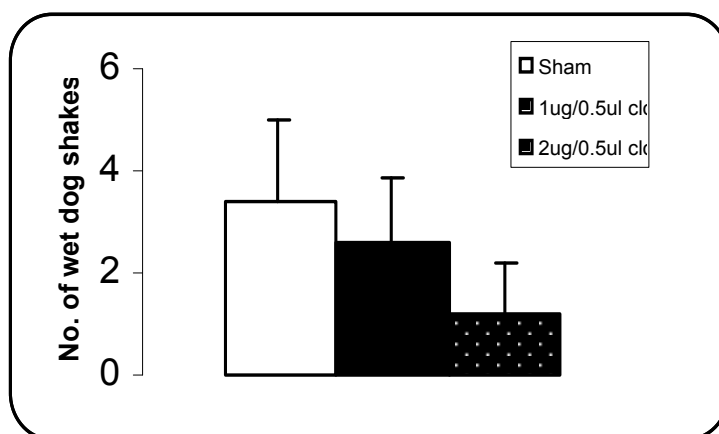


نمودار ۳: اثر تزریق کلونیدین به داخل LPGi بر تعداد دندان قروچه:



نمودار ۴: اثر تزریق کلونیدین به داخل LPGi بر تعداد Grooming:

نمودار ۵: اثر تزریق کلونیدین به داخل LPGi بر تعداد Wet dog shakes:



نمودار ۵: اثر تزریق کلونیدین به داخل LPGi بر تعداد Wet dog shakes.

بحث

عوامل زیادی در بروز وابستگی به مرفین و سندرم ترک آن دخیل هستند. هنگام بروز علائم ترک، فعالیت هسته پارازیگانتوسولولاریس و لوکوس سرولوئوس افزایش پیدا می‌کند [۲۳]. هسته پارازیگانتوسولولاریس، ارتباط همگرایی بین فعالیت سمپاتیک و فعالیت هسته لوکوس سرولوئوس ایجاد می‌کند. گفته می‌شود که این هسته به عنوان ناحیه‌ای کلیدی برای جمع‌بندی و هماهنگ کردن فعالیت سمپاتیکی عمل می‌کند [۸].

در پژوهش پیشین نشان دادیم که تخریب هسته LPGi باعث افزایش وابستگی به مرفین در آزمون ترجیح مکانی شرطی شده می‌شود [۸]. بررسی‌های انجام شده نشان داده است که انتقالات نورآدرنالین مغزی نقش مهمی در ایجاد سندرم ترک ایفا می‌کنند [۱۷]. در مطالعات نشان داده شده است که در طول زمان وابستگی به مرفین، رهایش نوروترانسمیترهایی مانند نور اپی‌نفرین کاهش می‌یابد در حالی که هنگام ایجاد سندرم ترک فعالیت سیستم نورآدرنرژیک مغزی افزایش پیدا می‌کند [۱، ۱۷]. کلونیدین به عنوان آگونیست گیرنده‌های آلفا-۲، موجب کاهش خروجی سیستم سمپاتیک می‌شود به عبارت دیگر مانع از ترشح نوراپی‌نفرین از انتهای نورون‌های آدرنرژیک می‌گردد [۲۰]. تزریق کلونیدین به هسته لوکوسرولوئوس باعث کاهش علائم ترک می‌گردد، ولی برخی از علائم از جمله پرش تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد [۱۱]، که بیانگر دخالت سیستم آدرنرژیک سایر مناطق عصبی می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که مهمترین خروجی تحریکی، از هسته پارازیگانتوسولولاریس به هسته لوکوس سرولوئوس بوده و این ارتباط مهمترین محل برای رفتارهای سندرم ترک

می‌باشد [۲۰]. بنابراین به نظر می‌رسد که کلونیدین با کاهش نوراپی‌نفرین در هسته پارازیگانتوسولولاریس و احتمالاً با کاهش ورودی‌های تحریکی به لوکوس سرولوئوس را موجب، برخی علائم سندرم ترک را کاهش داده است. برای کاهش برخی از علائم ترک توسط کلونیدین [۱۵]، می‌توان دو احتمال مطرح کرد: احتمال اول اینست که کلونیدین با فعال کردن گیرنده‌های آلفا-۲ در هسته پارازیگانتوسولولاریس و کاهش فعالیت این هسته، باعث کاهش فعالیت هسته‌های مرتبط با آن مثل لوکوس سرولوئوس می‌شود. در چندین مطالعه دیگر نشان داده شده تزریق کلونیدین باعث کاهش انتقالات سیناپسی و همچنین کاهش فعالیت الکتریکی نورون‌ها در هسته‌های گوناگونی مانند هسته مرکزی آمیگدال، هسته رافه بزرگ و لوکوس سرولوئوس می‌شود [۱۵، ۲۵]. احتمال دوم این است که کلونیدین توانسته است از طریق سایر نوروترانسمیترها و گیرنده‌ها علائم سندرم ترک را کاهش دهد. گیرنده‌های NMDA نقش مهمی در وابستگی به مرفین دارند [۲۱]. کلونیدین می‌تواند باعث کاهش فعالیت نورون‌های دارای رسپتور NMDA گردد [۲۲]. به نظر می‌رسد که کاهش فعالیت این نورونها، در کاهش علائم ترک مؤثر باشد [۲۴]. بدین ترتیب می‌توان گفت که یکی از مراکزی که کلونیدین می‌تواند اثر خود را در تغییر علائم ترک اعمال نماید هسته پارازیگانتوسولولاریس می‌باشد که ارتباطات زیادی با هسته‌های دیگر دارد لذا به نظر می‌رسد کلونیدین با کاهش انتقالات نوروترانسمیتری در این هسته و کاهش این هسته و در نتیجه، سایر هسته‌های مرتبط می‌تواند بروز برخی از علائم را کاهش دهد.

- [1] Aantaa R, Scheinin M: Alpha-2 adrenergic agents in anaesthesia. *Acta Anaes.* 1993; 37(5): 3-15.
- [2] Anika A, Gordon B: The role of opioid receptor in morphine withdrawal in infant rat. *Develop_ mental Brain Res.* 2000; 124: 73-80.
- [3] Berridge CW, Waterhouse BD: The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev.* 2003; 42(1): 33-84
- [4] Christie MJ: Mechanisms of opioid actions on neurons of the locus coeruleus. *Prog Brain Res.* 1991; 88: 197-205.
- [5] Connor M, Ohiristie MD: Opioid receptor signaling mechanism. *Clin Exp Pharm.* 1999; 26: 493-499.
- [6] Davies MF, Tsui JY, Flannery JA, Li X, DeLorey TM, Hoffman BB: Augmentation of the noradrenergic system in alpha-2 adrenergic receptor deficient mice: anatomical changes associated with enhanced fear memory. *Brain Res.* 2003;986(1-2):157-65.
- [7] Esposito E, Kruszewska A, Ossowska G, Samanin R: Noradrenergic and behavioural effects of naloxone injected in the locus coeruleus of morphine-dependent rats and their control by clonidine. *Psychopharmacology (Berl).* 1987; 93(3): 393-6.
- [8] Fathi-Moghadam H, Kesmati M, Mohammad Pour Kargar H: Effect of nucleus paragigantocellularis lateralis lesion on the conditioned place preference in the presence and absence of clonidine. *Proceeding of the Physiological Society J. Physiol.* 2003; 548P, 124P.
- [9] GiL L, Gomez LE, Duran L, Cueva R: Muscarinic mediation of uretho-genital reflex in spinal cord–transected rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 67(2):215-223.
- [10] Handerson G, Hughes J, Losterlitz H: A new example of a morphine- sensitive neuro- effector junction: adrenergic to transmission in vas deferans. *Brain Res Rev.* 1984; 7: 69-101.
- [11] James R, Theresa A: Distribution of α 2 agonist binding site in the rat and human central nervous system: Analysis of some functional anatomic correlates of the pharmacologic effects of clonidine and related adrenergic agents. *Brain Research Review.* 1984; 7:69-101.
- [12] 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(1-2):72-84.
- [13] Khalili M, Semnanian S, Fathollahi Y: Caffeine increases paragigantocellularis neuronal firing rate and induces withdrawal signs in morphine-dependent rats. *Eur J Pharmacol.* 2001; 412(3):239-45.
- [14] Khalili M, Semnanian S, Fatollahi y: The effect of Adnosine and caffeine on paragigantocellularis nucleus neurons in morphine dependent rats. *Physiol. Pharmacol. J (Iran).* 2000;4(1):29-37.
- [15] Maze M, Tranquilli W: Adrenoceptor agonists: defining the role in clinical anesthesia. *Anesthesiology.* 1991; 74(3):585-605.
- [16] Nader ND, Ignatowski TA, Kurek CJ, Knight PR, Spengler RN: Clonidine

- suppresses plasma and cerebrospinal fluid concentrations of TNF-alpha during the perioperative period. *Anesth Analg.* 2001;93(2):363-9.
- [17] Nakai T, Hayashi M, Ichihara K, Wakabayashi H, Hoshi K: Noradrenaline release in rat locus coeruleus is regulated by both opioid and alpha-2 adrenoceptors. *Pharmacol Res.* 2002; 45(5):407-12.
- [18] Niansen LIU, Robin W: Electrical stimulation of nucleus paragigantocellularis induces opioid withdrawal-like behaviors in the rat. *Phrm Bioch Behav.* 1999; 62(2): 263-271.
- [19] Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. 2 Ed., Academic Press Inc., San Diego, California, 1986; 63-67.
- [20] Rasmussen K, Aghajanian GK: Withdrawal- induced activation of locus coeruleus neurons in opiate-dependent rats: Attenuation by lesions of the nucleus paragigantocellularis. *Brain Res.* 1989; 505(2):346-350.
- [21] Rasmussen K: The role of the locus coeruleus and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology.* 1995; 13(4):295-300
- [22] Rasmussen K: Afferent effects on locus coeruleus in opiate withdrawal. *Prog Brain Res.* 1991; 88:207-16.
- [23] Van Bockstaele EJ: Morphological substrates underlying opioid. Ephinephrine and Y- amino butiric acid inhibitory action in the rat LC. *Brain Res.* 1999; 47:1-15.
- [24] Zarrindast MR, Farzin D: Nicotine attenuates naloxone induced jumping behavior in morphine dependent mice. *Pharm.* 1996; 298:1-6.
- [25] Zhang KM, Wang XM, Mokha SS: Alpha-2 adrenoceptors mediate NMDA-evoked responses of neurons in super ficial and deeper dorsal horn of medulla. *J Neurophysiol.* 1998; 80(4): 2210-2214.
- [26] Szabo B, Fritz T, Wedzony K: Effects of imidazoline antihypertensive drugs on sympathetic tone and noradrenaline release in the prefrontal cortex. *Br J Pharmacol.* 2001; 134(2): 295-304.