[Article in Persian] Physiology and Pharmacology Vol. 10, Summer 2006, 107-114.

Study on the possible similar mechanism of ultra low dose-induced hyperalgesia and development of tolerance to analgesia in male rats: an study based on the role of Gs signaling pathway

Shohreh Movahedi[1,2], Mohammad Javan[3] and Abolhassan Ahmadiani[1*]

[1]Neuroscience Research Center, Shaheed Beheshti Univ. Med. Sci., Tehran, Iran.

[2]Dept. Rheumatology, Rheumatology Research Center, Shariati Hosp., School of Medicine, Tehran Univ. Med. Sci., Tehran, Iran.

[3]Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares Univ., Tehran, Iran.

Archive of SID

Abstract

Introduction: Ultra low dose (ULD) morphine induces hyperalgesia which is mediated by excitatory Gs-coupled opioid receptors. This study was designed to investigate the development of tolerance to hyperalgesic effect of morphine. Also we attempt to seek possible similarity, in view of Gs proteins, between hyperalgesic effect of ULD and hyperalgesic effect after tolerance to HD.

Method: Male Wistar rats weighing 180-220 g were used. All injections were given intra peritoneally. For tolerance induction animals received ULD or HD for 5 days and at the 6th day tail flick test was performed before and 30 min after morphine administration. Effect of pretreatment with ULD on analgesic tolerance was assessed by injection of ULD before HD in 5 consecutive days then TF record was done after HD injection on 6th day. Time interval between injections was 15 minutes. Cross tolerance assay was measured by recording the response to a specified dose in 6th day after 5 days treatment with another dose. Oseltamivir, as a GM1 ganglioside inhibitor, was used for inhibition of Gs signaling. .

Results: Our results showed that: 1) tolerance was established after chronic injection of ultra low dose (ULD) of morphine. 2) Pre-treatment by ULD reduced tolerance to therapeutic dose of morphine. 3) Cross tolerance to analgesia was observed after chronic administration of ULD. 4) Combination therapy with oseltamivir blocked hyperalgesia; reduced analgesic tolerance and attenuated the development of tolerance to hyperalgesic effect of morphine.

Conclusion: The results showed the partially common mechanism for development of tolerance to hyperalgesic and analgesic effect of morphine. Signaling through Gs proteins seems to be a common pathway.

Keywords: Tolerance, Morphine, Hyperalgesia, Analgesia, Gs proteins, Oseltamivir**.**

* Corresponding Author Email: aahmadiani@yahoo.com

www.SID.ir

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵

بررسی امکان شباهت مکانیسمی اثر هیپرآلژزیک دوزهای بسیار اندک و تحمل به اثر آنالژزیک مرفین با تاکید بر نقش مسیر نشانه پردازی پروتئینهای Gs در موش های صحرایی

شهره موحدی[۱و۲]، محمد جوان[۳] و ابوالحسن احمدیانی[۱*]
۱- مرکز تحقیقات علوم اعصاب ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران.
۲- بخش روماتولوژی، مرکز تحقیقات روماتولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

دریافت: اسفند ۱۳۸۴ ویرایش نهایی: مرداد ۱۳۸۵ پذیرش: شهریور ۱۳۸۵

چکیده

مقدمه: تحمل به بیدردی حاصل از تجویز دوز درمانی مرفین high dose (HD) و نقش پروتئینهای G تحریکی در آن در مطالعات قبلی گزارش شده است. در مطالعه حاضر امکان ایجاد تحمل به هیپرآلژزی ناشی از دوزهای بسیار اندک مرفین ultra low dose (ULD) و شباهت آن با تحمل به اثر ضد دردی مرفین بویژه نقش مسیر نشانه پردازی Gs در این دو فرایند مورد بررسی قرار گرفته است.

روشها: در همه گروههای آزمایشی از موش صحرایی نژاد Wistar در محدوده وزنی ۱۵۰-۱۸۰ استفاده شد و همه تزریقات داخل صفاقی بود. برای ایجاد تحمل تجویزHD و یا ULD به مدت ۵ روز انجام شد و روز ششم از آزمون tail-flick (TF) در ۱۵ دقیقه و ۳۰ دقیقه بعد از تجویز دارو جهت اندازه گیری آستانه درد حرارتی استفاده شد. برای بررسی اثر پیش درمانی ULD در ایجاد تحمل به HD تجویز ۵ روزه ULD به فاصله ۱۵ دقیقه طی ۵ روز متوالی صورت گرفت و روز ششم پاسخ به HD اندازه گیری شد. بررسی تحمل متقابل با تجویز یک دوز طی ۵ روز اول و آزمون TF در پاسخ به دوز دیگر در روز ششم صورت گرفت. برای مهار مسیر نشانه پردازی Gs از داروی oseltamivir استفاده شد. درهمه موارد توام درمانی، آزمون (TF) ۳۰ دقیقه پس از آخرین تجویز انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که: ۱- تجویز مزمن ULD باعث ایجاد تحمل به اثر هیپرآلژزیک آن می شود ۲- تجویز مرفین ULD قبل از مرفین HD باعث کاهش شدت تحمل به HD می شود. ۳- کاربرد مزمن ULD باعث کاهش اثر ضد دردی مرفین HD می شود ۴- از طرف دیگر مصرف همزمان oseltamivir (1 mg/kg/i.p.) هم بلوک کننده هیپرآلژزی حاد ناشی از مرفین ULD و هم بلوک کننده تحمل به اثر دوزهای بالای مرفین می باشد و تحمل به اثر ضد دردی مرفین را نیزکاهش می دهد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده تشابه نسبی مکانیزم تحمل به اثرات هیپرآلژزیک و ضد دردی مرفین بود و دخالت مسیر نشانه پردازی Gs در این پدیده ها را نشان داد. شناخت مسیرهای دخیل در تحمل به هیپرآلژزی مرفین نیازمند مطالعات دیگری است.

واژه های کلیدی: تولرانس، مرفین، هیپرآلژزی، آنالژزی، پروتئین G تحریکی، اوسلتامیویر.

مقدمه

نخستین بار طی مطالعه الکتروفیزیولوژیک نورونهای گانگلیون ریشه خلفی نخاع، اثر هیپرآلجزیک دوزهای اندک مرفین نشان داده شد (Shen and Crain 1989). این مطالعات همچنین نشان داد که اثر هیپرآلجزیک مرفین توسط گیرنده های کوپل شده با پروتیین G تحریکی (Gs) وساطت می گردد. این روند عکس اثر دوزهای ضد درد معمولی مرفین است که توسط گیرنده های پروتیین G مهاری (Gi) وساطت می شود [۱]. بعبارت دیگر گیرنده اپیوییدی بسته به غلظت آگونیست خود می تواند به پروتئین Gi و یا پروتیین Gs جفت گردد و باعث آنالجزی یا هیپرآلجزی گردد. از طرف دیگر جفت شدن گیرنده اپیوییدی به پروتیین Gsکه در حضور غلظتهای اندک مرفین صورت می گیرد، به گانگلیوزید

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:
aahmadiani@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

GM1وابسته است[۵،۶و۲۹].

تحمل به اثر ضد دردی مرفین یکی از عوامل محدود کننده کاربرد درمانی آن در کنترل دردهای شدید می باشد[۲۱]. پیشنهاد شده است که روند بروز تحمل به اثرات ضد دردی مرفین و بروز هیپرآلجزی ناشی از دوزهای اندک آن دارای نقاط مشترک قابل توجهی می باشند. تولید اپیوئیدهای درونزاد با دخالت اتورسپتورهای اپیوئیدی با تمایل بالا [۷،۱۵،۱۷و۲۳]، ایجاد هترودایمر گیرنده های میو/دلتا [۳و۱۳]، دخالت سیستم پیامرسان ثانویه AC/cAMP/PKA [۲۱]، افزایش فعالیت گلیکوزیل ترانسفراز وابسته به cAMP/PKA [۱] و در نتیجه افزایش میزان گانگلیوزید GM1 از جمله نقاط اشتراک می باشند. Shen و Crainنشان دادند که آستانه غلظت دینورفین برای اعمال اثر افزایشی بر طول دوره پتانسیل عمل در نورونهای گانگلیون ریشه خلفی نخاع در حضور غلظت های اندک GM1 کاهش می یابد، در حالیکه این اثر در حضور سایر گانگلیوزیدها و گلیکولیپیدها دیده نمی شود [۸]. نورونهای تیمار شده با GM1 ، همچنین حساسیت بیشتری به اثر تحریکی آگونیست های اپیوئیدی نشان می دهند [۲۹،۶].

در مطالعه حاضر سعی شده است تا اولاً امکان ایجاد تحمل به اثر هیپرآلجزیک مرفین بررسی شده و ثانیاً با توجه به گزارشهای موجود در خصوص برخی نقاط اشتراک بین مسیر ایجاد تحمل به اثر ضد دردی و مسیر بروز اثر هیپرآلجزیک دوزهای اندک آن، احتمال تداخل مسیرهای ایجاد تحمل به اثر هیپرآلجزیک و تحمل به اثر ضد دردی مرفین مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین نقش احتمالی فعالیت مسیر Gs در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

حیوانات

در این تحقیق از موش های بزرگ آزمایشگاهی نژاد Wistar با میانگین وزنی ۲۲۰-۱۸۰ گرم استفاده شد. حیوانات در دسته های ۶تایی در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتیگراد با دسترسی به آب و غذای کافی نگهداری می شدند. هر گروه آزمایشی شامل ۶ سر حیوان بود.

داروها

داروهای مورد استفاده عبارت بودند از مرفین سولفات (Temad, Iran) و oseltamivir Hoffman la Roch) Germany). در گروههای کنترل حیوانات به جای داروهای فوق، نرمال سالین دریافت نمودند.

سنجش اثرات هیپرآلجزیک و یا ضد دردی مرفین

برای برآورد اثر هیپرآلجزیک و یا ضد دردی مرفین از آزمون Tail-flick استفاده می شد. زمان تاخیر پایه (BL) قبل از مصرف مرفین اندازه گیری می گردید. در هر بار اندازه گیری میانگین ۳ مرتبه ثبت به فاصله ۱ دقیقه منظور می شد. شدت نور به گونه ای تنظیم شده بود که مقدار BL در بازه ۶-۴ ثانیه قرار گیرد که این شدت معادل ۵ می باشد. زمان cut off ۱۰ ثانیه در نظر گرفته شد. زمان تاخیر پس از مصرف دوزهای مختلف مرفین .i.p در زمانهایی که در هر آزمایش نشان داده شده است، اندازه گیری می گردید. در موارد لازم درصد بی دردی ایجاد شده از حداکثر اثر بی دردی ممکن(%MPE) طبق فرمول زیر محاسبه می شد. (TL متوسط زمان تاخیر پس از مصرف مرفین می باشد)

$$\% MPE= [(TL-BL)/(10-BL)]\times 100$$

بررسی اثر پیش درمانی با دوز اندک مرفین بر ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین

در این بخش دو گروه آزمایشی مورد مطالعه قرار گرفت:

گروه اول به مدت ۵ روز (روزهای ۱ تا ۵) سالین و مرفین ۱۵میلیگرم/کیلوگرم (با فاصله ۱۵ دقیقه) و گروه دوم در روزهای ۱ تا ۵ مرفین ۱میکروگرم/کیلوگرم و مرفین ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم (با فاصله ۱۵ دقیقه) دریافت نمودند .پاسخ حیوانات هر دو گروه در روز۶ (۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق در روز ۵) به مرفین ۱۵میلیگرم/کیلوگرم با آزمون Tail- Flick مورد ارزیابی قرار گرفت.

ایجاد تحمل به اثرات هیپرآلجزیک و یا ضد دردی مرفین

برای مشاهده امکان ایجاد تحمل به اثر هیپرآلجزیک مرفین در دوز بسیار اندک، از تزریق روزانه دوز ۱ میکروگرم/کیلوگرم مرفین داخل صفاقی به مدت ۶ روز متوالی استفاده شد. تحمل به اثر ضد دردی مرفین با تزریق روزانه ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین به صورت i.p و به مدت ۶ روز متوالی صورت گرفت.

بررسی امکان تداخل مسیرهای ایجاد تحمل به اثرات ضد دردی و هیپرآلجزیک مرفین

بدین منظور از گروه های آزمایشی زیر استفاده شد:

۱ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز دوز ۱ میلی لیتر/کیلوگرم سالین داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به مرفین ۱ میکروگرم/کیلوگرم با آزمون Tail-Flick ارزیابی شد.

۲ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز دوز ۱ میکروگرم/کیلوگرم مرفین داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به مرفین ۱ میکروگرم/کیلوگرم با آزمون Tail-Flick ارزیابی شد.

۳ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز مرفین ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به مرفین ۱ میکروگرم/کیلوگرم با آزمون Tail-Flick ارزیابی شد.

۴ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز دوز ۱ میلی لیتر/کیلوگرم سالین داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین با آزمون Tail-Flick ارزیابی شد.

Archive of SID
www.SID.ir

۵ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز دوز ۱ میکروگرم/کیلوگرم مرفین داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین با آزمون Tail-Flick ارزیابی شد.
۶ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین با آزمون Tail-Flick ارزیابی شد.

بررسی نقش احتمالی پروتئین Gs در روند ایجاد تحمل به اثرات ضد دردی مرفین

بدین منظور از گروه های آزمایشی زیر استفاده شد:
۱ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز به فاصله ۱۵ دقیقه دو دوز ۱ میلی لیتر/کیلوگرم سالین داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به دوز ۱۵میلیگرم/کیلوگرم مرفین با آزمونTail-Flick ارزیابی شد.
۲ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز به فاصله ۱۵ دقیقه ابتدا سالین و سپس دوز ۱۵میلیگرم/کیلوگرم مرفین داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به دوز ۱۵میلیگرم/کیلوگرم مرفین با آزمون Tail-Flick ارزیابی شد.
۳ – حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز به فاصله ۱۵ دقیقه ابتدا دوز ۱میلیگرم/کیلوگرم oseltamivir و سپس دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین داخل صفاقی دریافت نمودند و روز ششم پاسخ آنها به دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین با آزمون Tail-Flick ارزیابی شد.

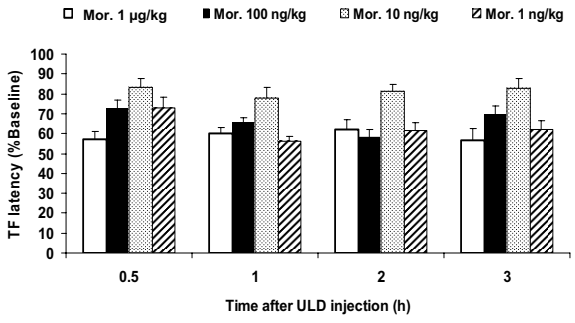
تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به صورت SEM ± میانگین ارائه شده اند. تفاوت آماری بین زمان تاخیر درآزمون Tail-flick در قبل و بعد از مصرف دارو با آزمون Paired student t-Test برآورد شده است. تفاوت بین میانگین اثر بی دردی از حداکثر اثر ممکن در گروههای مختلف با کمک آزمون یک طرفه ANOVA و به دنبال آن آزمون Tukey برآورد می شد. $P<۰/۰۵$ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن مورد استفاده قرار گرفته است.

نتایج

اثرهیپرآلجزیک دوزهای بسیار اندک مرفین

اثر هیپرآلجزیک دوزهای مرفین در بازه 1 µg/kg تا 1 ng/kg در طی سی دقیقه تا سه ساعت پس از تزریق مورد بررسی قرار گرفت. دوزهای مختلف باعث کاهش معنی دار زمان تأخیر در آزمون Tail- Flick شدند. اثر هیپر آلجزیک نیم ساعت پس از تزریق دوز اندک مرفین آغاز گردید و این اثر معنی دار در طی سه ساعت پس از تزریق (به استثنای دوز 10 ng/kg) تداوم یافت ($P<۰/۰۵$) هیپرآلجزی نیم ساعت پس از تزریق به حداکثر رسیده بود وآشکار ترین هیپرآلجزی

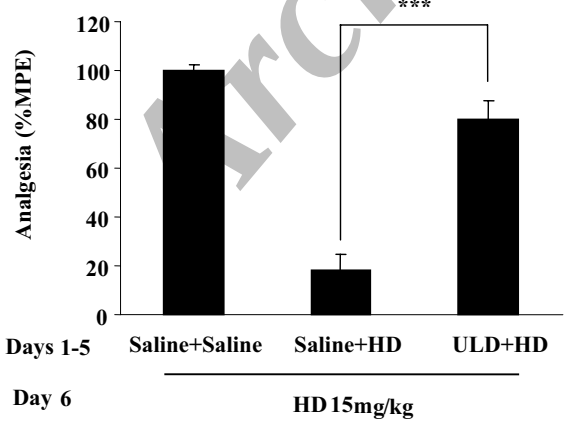


شکل۱ – بار گراف دوز–پاسخ در تزریق مرفین داخل صفاقی در بازه ۱µg/kg-۱ng/k، تا ۳ ساعت پس از تزریق. بیشترین هیپرآلژزی مربوط به دوز ۱µg/kg به فاصله نیم ساعت پس از تزریق است و تنها در این دوز پاسخ هیپرآلژزیک کمترین نوسان را در طول ۳ ساعت دارد. روند طولی پاسخ رفتاری در سایر دوزهای اندک از الگوی خاصی پیروی نمی کند. میزان پاسخ هیپرآلژزیک در محدوده ۸۰ –۶۰ آستانه نرمال متغیر است.

در مورد دوز 1 µg/kg مشاهده شد (شکل ۱). بنابراین در آزمایشات بعد، از این دوز به عنوان دوز بسیار اندک و از زمان سی دقیقه برای ثبت زمان تأخیر استفاده شد.

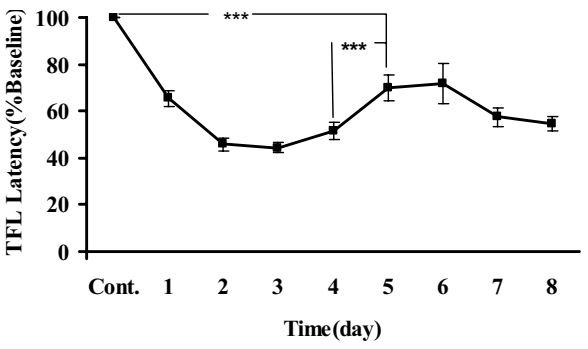
اثر پیش درمانی با دوز اندک مرفین بر ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین

تزریق توأم مرفین ۱ میکروگرم/کیلوگرم و مرفین ۱۵میلیگرم/کیلوگرم (با فاصله ۱۵ دقیقه) در روزهای ۱ تا ۵ باعث گردید تا پاسخ بی دردی حیوانات به مرفین ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم در روز ۶ در مقایسه با حیواناتی که روزهای ۱تا ۵ سالین و مرفین ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم دریافت نموده بودند، به طور معنی داری افزایش یابد (شکل ۲). بنابراین به نظر می رسد پیش درمانی با دوز اندک مرفین روند ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین را به تأخیر می‌اندازد.

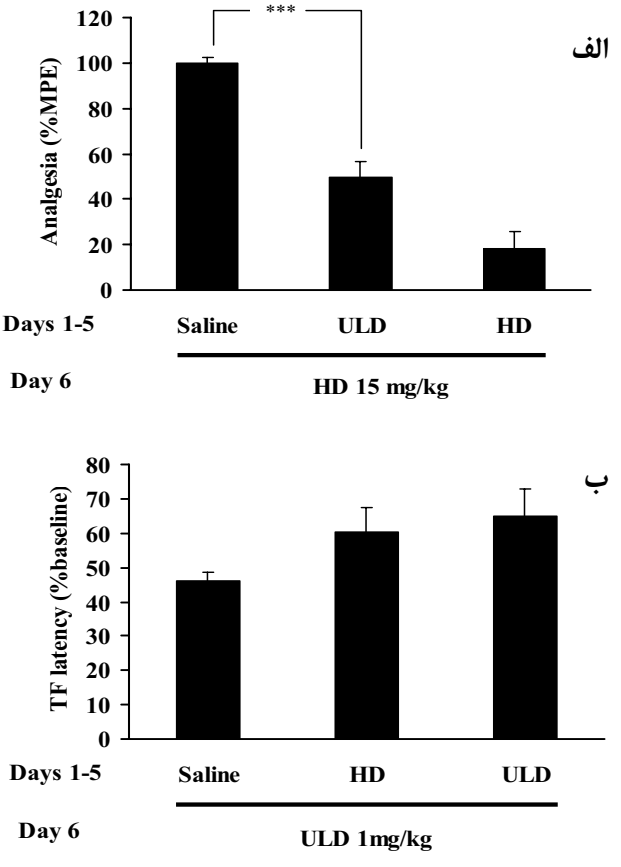


شکل۲– نمودار مقایسه ای پاسخ به دوز بالای مرفین پس از هم درمانی مرفین درمانی با مرفین بسیار اندک یا مرفین درمانی با سالین. همراهی دوز بسیار اندک با دوز درمانی میزان تولرانس به آنالژزی دوز درمانی را کاهش می دهد هر چند این میزان را به آستانه نمی رساند($p<0.001$). مرفین بسیار اندک مسئول بخشی از تولرانس به آنالژزی است که به علت فعالیت مسیر نشانه پردازی Gs است. بخش دیگر تولرانس از مسیر نشانه پردازی Gi و احتمالا سایر پروتئین های تنظیمی غشایی صورت می گیرد.

Archive of SID
www.SID.ir

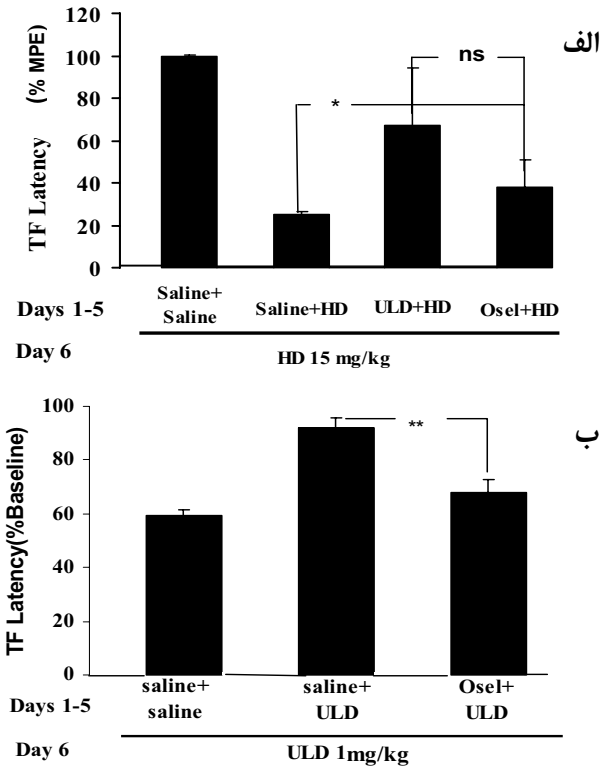


شکل۳ – نمودار دوز–پاسخ در تزریق مزمن µg/kg ۱ مرفین از راه داخل صفاقی. تولرانس به هیپرآلژزی در روزهای ۶–۵ با رسیدن میزان پاسخ رفتاری به ۷۰ ٪ آستانه رخ می دهد($p<0.001$). هرچند تولرانس به هیپرآلژزی نسبی است و پاسخ رفتاری را به حد آستانه نمی رساند($p<0.01$). در حالی که تولرانس به دوز درمانی مرفین پاسخ رفتاری را نه تنها به آستانه می رساند بلکه ایجاد هیپرآلژزی نیز می نماید. بنابراین حاصل تولرانس به آنالژزی ، هیپرآلژزی است هر چند حاصل تولرانس به هیپرآلژزی، آنالژزی نمی باشد. ***=$p<0.001$



شکل۴– الف– پاسخ رفتاری به دوز درمانی مرفین پس از پیش درمانی یا عدم پیش درمانی با دوز بسیار اندک. دوز بسیار اندک باعث کاهش نسبی تولرانس به آنالژزی تا حد ۵۰ ٪ می شود یا به عبارتی غیر حساس سازی Gs مسئول تنها نیمی از تولرانس به آنالژزی است (***=$p<0.001$).

ب– پاسخ رفتاری به دوز بسیار اندک مرفین پس از پیش درمانی یا عدم پیش درمانی با دوز بالای مرفین. پیش درمانی بادوز بالای مرفین باعث کاهش هیپرآلژزی دوز اندک می گردد. (بار گراف ها معرف میانگین±خطای استاندارد می باشد).



شکل۵– الف– بارگراف مقایسه ای پاسخ به هم درمانی دوز بالای مرفین و oseltamivir با سایر هم درمانی ها. هم درمانی با oseltamivir باعث شکل گیری حدود ۳۰ ٪ تولرانس می شود این میزان به طور معنی داری کمتر از تولرانس ناشی از هم درمانی مزمن دوز درمانی با سالین است($p<0.05$) . بنابراین تولرانس نسبی در همراهی oseltamivir نیز وجود دارد ولی این تولرانس دو برابر بیشتر از تولرانس ناشی از هم درمانی مرفین درمانی و مرفین بسیار اندک است. بنابراین تحریک Gs بیش از مهار آن تولرانس را می شکند.

ب– بارگراف مقایسه ای پاسخ به هم درمانی دوز بسیار اندک و oseltamivir و یا سالین. هم درمانی با oseltamivir از شکل گیری تولرانس به هیپرآلژزی پیشگیری می کند؛چنانچه مشاهده می شود توام درمانی با oseltamivir باعث کاهش معنی دار ۲۰ ٪ تحمل به هیپرآلژزی ناشی از مصرف مزمن دوز بسیار اندک می گردد. (ns=non significant ,**=$p<0.01$,*=$p<0.5$, بارگراف ها معرف میانگین±انحراف معیار است)

ایجاد تحمل به اثر هیپرآلجزیک مرفین

تزریق روزانه µg/kg 1 تا روز چهارم با ایجاد هیپرآلجزی همراه بود اما در روزهای پنجم و ششم اثر هیپرآلجزیک مرفین کاهش معنی داری را نشان داد هر چند زمان تأخیر آزمون Tail-flick به میزان پایه(BL) برنگشت. این نتایج نشان دهنده بروز تحمل در روزهای ۵ و ۶ پس از مصرف دوز اندک مرفین است (شکل ۳).

تداخل مسیرهای ایجاد تحمل به اثرات ضد دردی و هیپرآلجزیک مرفین

با توجه به بروز تحمل به اثر هیپرآلجزیک مرفین، این سؤال مطرح بود که آیا مکانیزم ایجاد این نوع تحمل با مکانیزم ایجاد تحمل به اثر ضد درد آن حداقل در بخشی از مسیر مشترک می باشد؟ بدین منظور پاسخ دهی به دوز ضد درد مرفین پس از القای تحمل به دوز

هیپرآلجزیک آن مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴ الف). تزریق مرفین ۱میکروگرم/کیلوگرم در روزهای ۱ تا ۵ باعث گردید تا پاسخ ضد دردی حیوانات به مرفین ۱۵میلیگرم/کیلوگرم در روز ۶ در مقایسه با حیواناتی که روزهای ۱ تا ۵ سالین دریافت نموده بودند، به طور معنی داری کمتر باشد. بنابراین به نظر می رسد ایجاد تحمل به اثر هیپرآلجزیک مرفین باعث کاهش اثر ضد دردی ناشی از دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین در روز ششم (تحمل به اثر ضد دردی) می گردد.

به طور متقابل پاسخ دهی به دوز اندک مرفین پس از القای تحمل به دوز ضد درد آن مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴ ب). تزریق مرفین ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم در روزهای ۱ تا ۵ باعث گردید تا پاسخ هیپرآلجزیک حیوانات به مرفین ۱ میکروگرم/کیلوگرم در روز ۶ در مقایسه با حیواناتی که روزهای ۱ تا ۵ سالین دریافت نموده بودند، به طور معنی داری کمتر باشد. بنابراین به نظر می رسد ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین باعث کاهش اثر هیپرآلجزیک ناشی از دوز بسیار اندک مرفین در روز ششم (تحمل به اثر هیپرآلجزیک) می گردد.

نقش احتمالی پروتئین Gs در روند ایجاد تحمل به اثرات ضد دردی مرفین

از آنجا که به نظر رسید ایجاد تحمل به اثر هیپرآلجزیک مرفین باعث تحمل به اثر ضد دردی نیز می گردد، در این بخش از تحقیق نقش احتمالی پروتئین Gs در روند ایجاد تحمل به اثرات ضد دردی مرفین مورد کنکاش واقع گردید (شکل ۵- الف). حیواناتی که به مدت ۵ روز، هر روز به فاصله ۱۵ دقیقه ابتدا دوز ۱ میلیگرم/کیلوگرمOseltamivir و سپس دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین داخل صفاقی دریافت نمودند پاسخ ضد درد آنها به مرفین ۱۵ میلی گرم/کیلوگرم در روز ۶ در مقایسه با حیواناتی که روزهای ۱تا ۵ هر روز به فاصله ۱۵ دقیقه ابتدا سالین و سپس دوز ۱۵ میلیگرم/کیلوگرم مرفین دریافت نموده بودند، تفاوت معنی داری داشت. به این معنا که اوسلتامیویر به عنوان مهارگر Gs در تحمل به آنالژزی موثر بود.

بحث

یافته های تحقیقاتی متعددی از اثر هیپرآلژزیک دوزهای اندک آگونیستهای نسبی گیرنده های اپیوئیدی حکایت دارد. این اثر هیپرآلژزیک گفته می شود که ناشی از فعال شدن مسیر نشانه پردازی (signaling)پروتئین Gs می باشد که در حضور غلظت های اندک مرفین با گیرنده های اپیوئیدی کوپل شده با Gs قادر به ایجاد هیپرآلژزی می باشند[۲۵،۹،۴-۲۳]. در مطالعه حاضر نیز آنگونه که در شکل ۱ آمده بود، دوزهای اندک مرفین بویژه دوز 1μg/kg مرفین در فاصله زمانی ۰/۵ تا ۳ ساعت پس از کاربرد، ایجاد هیپرآلژزی بارزی نمود. بر این اساس در سایر آزمایشات به منظور مطالعه امکان ایجاد تحمل و تحمل متقابل با دوزهای آنالژزیک مرفین از دوز 1μg/kg مرفین به عنوان دوز فعال کننده مسیر Gs و ایجاد کننده هیپرآلژزی استفاده گردید.

با توجه به توانایی دوزهای اندک مرفین در فعال نمودن مسیرGs این باور وجود داردکه در حضور دوزهای معمول و ضد درد مرفین نیز علاوه بر فعالیت مسیرGi/o، مسیر Gs نیز فعال است امّا باتوجه به غالب بودن اثر فعالیت مسیرGi/o، دوزهای معمول ایجاد بی دردی می نمایند. هر چند گفته می شود فعالیت هر دو مسیر Gs و Gi/o در بروز تحمل به اثر ضددردی مرفین مؤثر است، هنوز این سوال باقی است که نقش کدام مسیر کلیدی است؟ برای پاسخ به این سوال در این مطالعه سعی نمودیم تا میزان فعالیت دو مسیر مذکور که به دنبال مصرف دوز ضد درد مرفین فعال می شوند را با افزایش سهم یکی از آنها دستکاری نماییم و اثر آن را بر بروز تحمل به اثر ضد دردی مرفین بررسی نماییم. بدین منظور به مدت پنج روز و هر روز ۱۵ دقیقه قبل از کاربرد دوز ضد درد مرفین، دوز اندک و فعال کننده Gs استفاده می شد تا با فعال کردن انحصاری مسیر Gs سهم نشانه پردازی Gs از مجموع فعالیت های مسیر های Gs و Gi/o افزایش یابد. نتایج نشان داد که این گونه مداخله در نشانه پردازی مسیر های Gs و Gi/o باعث کند تر شدن روند ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین می گردد. به عبارت دیگر کاهش سهم فعالیت روزانه Gi/o به نفع افزایش فعالیت Gs روند تحمل را به تاخیر می اندازد و نقش برتر فعالیت مسیر Gi/o در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین را پیشنهاد می کند.

در بخش دیگری از این مطالعه به بررسی این سوال پرداختیم که آیا اساسا به اثر هیپرآلژزیک مرفین نیز تحمل ایجاد می گردد؟ بدین منظور دوز 1μg/kg مرفین به طور مکرر در روزهای متوالی استفاده شد و اثر هیپرآلژزیک آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر هیپرآلژزیک مرفین در روزهای پنجم و ششم پس از شروع تزریق آن به طور معنی داری کاهش می یابد که نشان دهنده ایجاد تحمل به اثر هیپرآلژزیک مرفین در روزهای پنجم وششم پس از شروع تزریق دوز اندک مرفین است. با ادامه تزریق دوز اندک مرفین در روزهای هفتم و هشتم مجددا اثر هیپرآلژزیک دوز اندک مرفین افزایش یافت که حاکی از کوتاه مدت بودن تحمل ایجاد شده می باشد. این آزمایش با توجه به نتیجه به دست آمده سه بار تکرار گردید (هر بار n=6) و هر بار تحمل گذرا در روزهای پنجم و ششم ایجاد گردید. هر چند در حال حاضر با نتایج موجود توضیح دقیقی برای گذرا بودن تحمل نمی توان ارائه نمود و روشن شدن علت گذرا بودن آن نیاز به مطالعات گسترده بعدی دارد, در ادامه این مطالعه تنها سعی نمودیم مسئله ایجاد تحمل مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور تلاش شد تا احتمال ایجاد تحمل متقابل به دنبال مصرف مزمن دوز اندک و دوز ضد درد مرفین مطالعه شود. نتایج نشان داد که مصرف مزمن دوز اندک مرفین به مدت ۵ روز باعث می شود در روز ششم دوز معمول و ضد درد مرفین (15mg/kg) نسبت به گروه دریافت کننده سالین در روزهای یک تا پنج بی دردی کمتری را ایجاد می نماید. به عبارت دیگر مصرف مزمن دوز اندک باعث ایجاد تحمل به دوز ضد درد گردید. البته این تحمل به اندازه تحمل ایجاد شده توسط مصرف مزمن دوز ضد درد نبود. ایجاد این تحمل

Archive of SID
www.SID.ir

متقابل بیانگر این نکته است که برخی از مکانیسم های دخیل در ایجاد تحمل به دوز ضد درد مرفین به دنبال مصرف دوزهای اندک مرفین نیز فعال می گردند و بدین ترتیب یک اشتراک نسبی در مسیرهای ایجاد تحمل به اثر ضد دردی و اثر هیپرآلژزیک پیشنهاد می گردد. در یک آزمایش مکمل نشان داده شد که مصرف مزمن دوز ضد درد به مدت ۵روز نیز متقابلا میتواند حدود نود درصد از کل تحمل ایجاد شده به اثر هیپرآلژزیک مرفین را ایجاد نماید(شکل ۴ب) در عین حال که تفاوت معنی داری با هیپرآلژزی ندارد که البته با متد های حساستر شاید بتوان این تفاوت را از نظر آماری آشکار نمود. نتایج این آزمایش نیز اشتراک مسیر های ایجاد تحمل به دو اثر ضد درد و هیپرآلژزیک مرفین را نشان می دهد. بر این اساس شاید بتوان مکانیسم هایی مانند عدم کوپل شدن گیرنده با پروتئین G [۳۰،۱۶] افزایش سطح فعالیت PKC [۳۰،۲۲] و PKA و تغییر در حساسیت آدنیلیل سیکلازها [۲۷،۲۱،۱۴،۱۱]، افزایش تولید NO [۱۹،۱۸] و تغییر بیان برخی ژنها از جمله پروتئین های G [۲۶-۲۶،۲۰،۴]، و عوامل تنظیمی [۱۰] را که در مسیر ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین دخیلند در ایجاد تحمل به اثر هیپرآلژزیک نیز دخیل دانست. اما از آنجا که در توأم درمانی دوز اندک و دوز درمانی 15mg/kg مرفین اثر هیپرآلژزیک دوز اندک مستقل تا پایان ۷ روز وجود داشت، به نظر می رسد که در هم درمانی دوزهای بالا و اندک مرفین Gsهمچنان فعال است و یا به عبارت دیگر فعالیت تحریکی Gs از زیر ماسک مهاری Gi آشکار می گردد; آشکار شدن نقش Gs در مطالعات مختلف به اشکال مختلف تعبیر شده است: اول شیفت تدریجی گیرنده از Gi به Gs [۲۳] و دوم غیر حساس شدن مسیرGi توسط فعالیت پروتئین های تنظیم کننده نظیرGRK [۳۱،۲۸،۲]. این پروتئین های تنظیم کننده قاعدتا نباید مسیر Gs را غیر فعال نمایند تا اثرات تحریکی نشانه پردازیGs بتواند آشکار گردد. بنابراین تحمل به اثر بی دردی، ناشی از فعالیت مزمن هر دو مسیر Gi/o و Gs می باشد. بر این اساس این انتظار وجود دارد که مصرف مزمن دوز اندک مرفین تنها بخشی از تحمل ایجاد شده به اثر ضد درد مرفین را ایجاد نماید و از ایجاد بخشی از تحمل که نتیجه انحصاری غیر حساس شدن تدریجی مسیرGi/o می باشد، باز ماند. نتایج این مطالعه نیز نشان داد که پیش درمانی مزمن دوز اندک باعث ایجاد تحمل معنی دار به اثر ضد دردی مرفین می شود اما این میزان تحمل به طور معنی داری کمتر از تحمل ایجاد شده توسط مصرف مزمن دوز ضد درد می باشد که شاید بتوان این میزان تفاوت را به تحمل منحصر به فعال شدن مزمن و غیر حساس شدن مسیر Gi/o گیرنده های اپیوئیدی نسبت داد. عدم تفاوت معنی دار هیپرآلژزی دوز اندک در حیواناتی که قبلا ۵ روز دوز اندک و یا دوز ضد درد مرفین دریافت نموده اند به این دلیل است که در هر دو نوع مصرف مرفین مسیر Gs به طور مزمن فعال می شود و فعال شدن مزمن Gs دلیل تحمل به اثر هیپرآلژزیک مرفین می باشد.

مصرف مزمن آگونیست نسبی گیرنده های کوپل شونده با پروتئین های G از جمله گیرنده های اپیوئیدی با فعال شدن پروتئین کیناز گیرنده های کوپل شده با پروتئین های G (GRKs) باعث کاهش حساسیت گیرنده و ورود آن به مسیر های تنظیم کاهشی و ذخیره شدن در درون سلول می شود. مصرف مزمن مرفین با دوز ضد درد یا هیپرآلژزیک در این مطالعه با فعال نمودن مزمن گیرنده های اپیوئیدی کوپل شده با پروتئین های Gi/o و یا Gs باعث فعال شدن GRKs و کاهش حساسیت و یا تعداد گیرنده های اپیوئید می شود و کوپل شدن آنها را با پروتئین های G کاهش می دهد و تحمل متقابل را توجیه می نماید. به عبارت دیگر فعال شدن GRKs توسط هر یک از مسیر هایGs و یا Gi/o با توجه به اشتراک گیرنده برای هر دو مسیر بی دردی و هیپرآلژزی می تواند با غیر حساس کردن گیرنده باعث ایجاد تحمل به هر دو اثر متضاد مرفین شود. از طرف دیگر نیز با توجه به این که تنها نقطه مشترک در مسیر نشانه پردازی مسئول آنالژزی و هیپرآلژزی مرفین همان اتصال لیگاند به گیرنده و فعال سازی گیرنده می باشد، شاید بتوان علت اصلی بخش مشترک تحمل به دو اثر را همان کاهش حساسیت گیرنده Gi/o در اثر فعال شدن GRKs دانست و البته بخش دیگر تحمل را باید در تاثیر سایر مکانیسم های تنظیمی بر مسیر Gs دانست . یکی از این مکانیسم های تنظیمی افزایش Gm1 گانگلیوزید بر اثر فعالیت گلیکوزیل ترانسفراز وابسته به فعالیت آدنیلات سیکلاز است[۱].

مطالعات بیشتری لازم است تا بتوان توضیح کاملتری برای ایجاد تحمل به اثر هیپرآلژزیک مرفین و به ویژه گذرا بودن آن ارائه نمود. ولی آنچه مسلم است اینکه مسیر Gs به عنوان یک مسیرprogressively sensitizedکه در مصرف مزمن مرفین درمانی توسط Crain وShen پیشنهاد شده بود [۱۰] در مصرف مزمن دوز بسیار اندک مرفین تدریجا desensitized می شود. بنابراین آنچه در مسیر تولرانس به بیدردی و تولرانس به هیپرآلژزی متفاوت و دینامیک می باشد مسیر نشانه پردازی Gsمی باشد که باید به عنوان یک چالش در رویکردهای درمانی مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

این نتایج همچنین پیشنهاد می کند که فعال شدن مسیر Gs به دنبال مصرف دوز ضد درد مرفین مسئول بخشی از تحمل ایجاد شده به آن می باشد. این نکته با توجه ویژه به این مسأله است که مرفین به کار رفته در دوزهای ضد درد پس از پیشرفت روند متابولیسم در خون کاهش می یابد و عملا به یک دوز اندک هیپرآلژزیک تبدیل می شود که تنها مسیر Gs را فعال می کند. به عبارت دیگر به نظر می رسد چنانچه همزمان با مصرف دوز ضد درد مرفین مسیر نشانه پردازی Gs را بلوک نمائیم، تحمل کمتری به اثر ضد دردی مرفین ایجاد گردد. برای آزمون این فرضیه در گروهی از حیوانات همواره قبل از مصرف دوز ضد درد از oseltamivir به عنوان مهار کننده کوپل شدن گیرنده به پروتئین Gsاستفاده گردید تا نقش احتمالی نشانه پردازی Gs در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی حذف شود. نتایج نشان داد که oseltamivir تحمل به اثر ضد دردی مرفین را کاهش می دهد. ولی این کاهش در مقایسه با مهار تحمل همزمان با فعالیت Gs در گروه آزمایشی توأم درمانی دوز اندک و بالا کوچک است(شکل ۵ الف). پس oseltamivir از شکل

Archive of SID

www.SID.ir

گیری تولرانس به آنالژزی و هیپرآلژزی به طور نسبی جلوگیری می کند (شکل ۵ ب). دو احتمال برای این نسبی بودن اثر قابل طرح است.اول این که نقش Gs در ایجاد تحمل بارز نیست و احتمال دوم عدم توانایی oseltamivir با الگوی به کار رفته در مهار مسیر Gs می باشد.

به نظر می رسد oseltamivir با غلظت به کار رفته در ابتدا مسیر Gsرا مهار می کند ولی با کاهش غلظت آن با متابولیزاسیون دیگر قادر به مهار مسیر Gs نمی باشد به ویژه آنکه در این زمان مرفین نیز در اثر کاهش غلظت عملا به یک دوز هیپرآلژزیک تبدیل شده است و تنها مسیر Gs را فعال می نماید. در هر حال این فرضیه که هر دوز ضد درد مرفین در اثر متابولیزاسیون به یک دوز هیپر آلژزیک تبدیل می شود و با فعال کردن انحصاری مسیر Gs به ایجاد تحمل به اثر ضد دردی خود کمک می نماید با داده های حاضر قابل رد یا اثبات نمی باشد و برای صحت و سقم آن نیاز به آزمایشات بعدی دارد.

منابع

[1] Avidor-Reiss T, Bayewitch M, Levy R, Matus LN, Neuo I, Vogel Z, Adenylylcyclase super sensitization in μ-opioid receptor-transfected Chinese hamster ovary cells following chronic opioid treatment. ***J Biol Chem*** 270 (1995) 29732-29738.

[2] Bohn, LM., Lefkowitz, RJ, Gainetdinov RR, Peppel, K, Caron MG, Lin FT, Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. **Science** 286 (1999) 2495-2498.

[3] Celerier E, Laulin J-P, Larcher Agnes, Le Moal M, Simonnet G, Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats. ***Brain Res*** 847 (1999) 18-25.

[4] Chakrabarti S, River M, Yan S-Z, Tang W-J, Gintzler AR, Chronic morphine augments GBY/GSα stimulation of adenylyl cyclase: relevance to opioid tolerance. ***Mol Pharmacol*** 54 (1998) 655-662.

[5] Crain SM, Shen KF, After chronic opioid exposure sensory neurons become supersensitive to the excitatory effects of opioid agonists and antagonists as occurs after acute elevation of GM, ganglioside. ***Brain Res*** 575 (1992) 13-24.

[6] Crain SM, Shen KF, Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled,GM1 ganglioside-regulated opioid receptor function**.** ***Trends Pharmacol Sci*** 19 (1998) 358-365.

[7] Crain SM, Shen K-F, Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/ dependence during chronic co-treatment. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 92 (1995) 10540-10544.

[8] Crain SM, Shen KF, GM1 ganglioside-induced modulation of opioid receptor-mediated functions**.** ***Ann NY Acad Sci*** 845 (1998 a) 106-125.

[9] Crain SM, Shen K-F, Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/ dependence during chronic cotreatment. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 92. (1995) 10540-10544.

[10] Crain SM, Shen K-F, Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance, dependence liability. ***Pain*** 84 (2000) 121-131.

[11] Cruciani RA, Dvorkin B, Morris SA, Crain SM, Makman M, Direct coupling of opioid receptors to both Gs and Gi proteins in F11 neuroblastoma X sensory neuron hybrid cells. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 90 (1993) 3019-3023.

[12] Jaffe JH, Martine WR. In: Goodman and Gilman's pharmacological Basis of Therapeutics. ***Opioid analgesics and antagonists*** 8th ed. New York, Pergamon press, 1990, p. 485-521.

[13] Kest B, Mc Lemore G, Kao B, Inturvisi CE, The competitive alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-Propionate receptor antagonist LY293558 attenuate and reverses analgesic tolerance to morphine but not to delta or kappa opioids. ***J Pharmacol Exp Ther*** 283 (1997) 1249-1255.

[14] Makman MH, Dvorkin B, Crain SM, Modulation of adenylate cyclase activity of mouse spinal cord-ganglion explants by opioids, serotonin and pertussis toxin. ***Brain Res*** (1988) 445303-445313.

[15] Mayer DJ, Mao J, Holts J, Price Donald D, Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 96 (1999) 7731-7736.

Archive of SID
www.SID.ir

[16] Mayer DJ, Mao J, Holts J, Price Donald D, Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 96 (1999) 7731-7736.

[17] McLachlan EM, Janig W, Devor M, Michaelis M, Peripheral Nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglion. ***Nature*** 363 (1993) 543-546.

[18] Meller ST, Gebhart GF, Nitric oxide(NO) and nociceptive processing in the spinal cord. ***Pain*** 52 (1993) 127-36.

[19] Meller ST, Gebhart GF, Spinal mediators of hyperalgesia. ***Drugs*** 47 (1994) 10-20.

[20] Javan M, Ahmadiani A, Motamadi F, Kazemi K, 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*** 53 (2005) 250–256.

[21] Scheideler MA, Dawson G, Direct demonstration of the activation of UDP-N- acetylgalactosamine[GM3] N- acetylgalactosaminil transferase cyclic AMP. ***J Neuro Chem*** 46 (1986) 1639-1643.

[22] Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M, Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance***. Proc Natl Acad Sci USA*** 72 (1975) 3092-3096.

[23] Shen KF and Crain SM, Dual opioid modulation of the action potential duration of mouse dorsal root ganglion neurons in culture. ***Brain Res*** 491 (1989) 227-242.

[24] Shen K-F, Crain SM, Ultra-low doses of naltrexone or etorphine increase morphine's antinociceptive potency and attenuate tolerance-dependence in mice. ***Brain Res.*** 757 (1997) 176-190.

[25] Shen KF and Crain SM, Dual opioid modulation of the action potential duration of mouse dorsal root ganglion neurons in culture. ***Brain Res*** 491 (1989) 227-242.

[26] Standifer KM, Rossi GC, Pasternak GW, Differential blockade of opioid analgesia by antisenseODN's directed against various G-protein α subunits. ***Mol Pharm*** 50 (1996) 293-8.

[27] Terwillinger RZ, Beitner-Johnson D, Sevarinno KA, Crain SM, Nestler EJ, A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. ***Brain Res*** 548 (1991) 100-110.

[28] Whistler JL, Von Zastrow M, Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by β-arrestine. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 95 (1998) 9914-9.

[29] Wu G, Lu ZH, Tzongjer R'D JW, Howells K, Christoffers K, Ledeen RW, The role of GM1 gangliosid in regulating excitatory opioid effects. ***Ann NY Acad Sci*** 845 (1998) 126-138.

[30] Zeitz KP, Malmberg AB, Gilbert Heather, Basbaum AI, Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKCY mutant mice. ***Pain*** 94 (2001) 245-253.

[31] Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PL, Caron MG. Role for G protein-coupled receptor responsiveness. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 95 (1998) 7157-62.

متن کامل این مقاله از طریق وب سایت مجله قابل دسترسی است www.phypha.ir/ppj

Archive of SID

www.SID.ir