Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱٤ (٤)، ۳۸۹ – ۳۹٦
زمستان ۱۳۸۹

افزایش فعالیت سیناپسی نورون های ماگنوسلولار هسته سوپرااپتیک و سطح پلاسمایی وازوپرسین در اثر تزریق حاد مورفین در رت های نر

میترا یوسف پور[۳و۲و۱]، نیما نادری[۱]، مهیار جان احمدی[۲و۱]، امیر محمد علیزاده[۱]، فرشته معتمدی[۲و۱*]
۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران

دریافت: ۱۵ شهریور ۸۹ پذیرش: ۲ آذر ۸۹

چکیده

مقدمه: نورون های ماگنوسلولار هسته سوپرا اپتیک با تولید و ترشح دو پپتید اکسی توسین و وازوپرسین نقش مهمی را در تنظیم شرایط فیزیولوژیک و یا ایجاد شرایط پاتولوژیک بازی می نمایند. این نورون ها توسط ورودی های عصبی تحریکی و مهاری مختلفی تنظیم می گردند. یکی از گیرنده های موجود در سیناپس های عصبی این هسته، گیرنده های اپیوییدی می باشند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تجویز حاد مورفین بر فعالیت سیناپس های عصبی تحریکی و مهاری این هسته و همچنین میزان ترشح هورمون وازوپرسین در خون بوده است.

روش‌ها: در این مطالعه تکنیک ثبت whole cell patch clamp برای بررسی اثرات تجویز حاد حداقل دوز موثر مورفین (۲۵ میکرو مولار) بر جریانات سریع سیناپسی تحریکی و مهاری (sIPSC و sEPSC) در برشهای مغزی هسته سوپرااپتیک رت های نر (۳-۴ هفته، ۱۰۰-۷۰ گرم) مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر آن با استفاده از تکنیک ELISA سطح پلاسمایی وازوپرسین در نمونه های خون رت های نر بعد از تجویز حاد مورفین (۳۰ میلی گرم/ کیلوگرم، داخل صفاقی) اندازه گیری شد.

یافته‌ها: تجویز مورفین بر نورون های ماگنوسلولار موجب افزایش فرکانس جریان های پس سیناپسی تحریکی خود به خودی (sEPSC) و کاهش فرکانس جریان های پس سیناپسی مهاری خود به خودی (sIPSC) شد. همچنین تجویز داخل صفاقی مورفین موجب افزایش سطح پلاسمایی وازوپرسین گردید. نتایج با $p<0/05$ معنی دار محسوب گردید..

نتیجه‌گیری: این نتایج پیشنهاد می کنند که تجویز حاد مورفین موجب تحریک نورونهای هسته سوپرااپتیک و متعاقب آن افزایش ترشح وازوپرسین می گردد.

واژه‌های کلیدی: هسته سوپرااپتیک، مورفین، انتقالات سیناپسی، وازوپرسین

مقدمه

فعالیت نورون های ماگنو سلولار هسته سوپرااپتیک توسط ورودی های عصبی تحریکی و مهاری مختلفی تنظیم می گردد. عمده ترین ورودی مهاری و تحریکی بر این نورونها به ترتیب گاباارژیک و گلوتاماترژیک هستند [۴,۳, ۱۷, ۱۸]. از طرفی نوروترانسمیترهای متعددی کارایی این ورودی های تحریکی و مهاری را تنظیم می نمایند [۹، ۱۲]. مطالعات نشان داده اند که اپیوییدها در تنظیم فعالیت نورون های ماگنو سلولار

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: motamedi@ams.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

Archive of SID

و ترشح وازوپرسین نقش مهمی بازی می نمایند.

تعداد قابل توجه رسپتورهای مو و کاپا در پایانه های عصبی نورون های هسته سوپرااپتیک وجود دارد[۱۰، ۱۶]. مطالعات نشان داده اند که اپیوییدها می توانند فعالیت نورون های ماگنو سلولار را تحت تاثیر قرار دهند. در یک مطالعه تجویز حاد آگونیست اختصاصی رسپتور کاپا موجب کاهش تخلیه (firing) خود به خودی نورون های SON شده است[۵]. گزارشی دیگر بیان نموده که تجویز حاد آگونیست اختصاصی رسپتورهای اپیوییدی مو موجب کاهش sEPSC گشته اما اثری بر sIPSC نداشته است[۸]. در مورد اثرات تجویز مورفین بر فعالیت نورونهای SON گزارش هایی پیرامون تغییرات فعالیت ومحتوای وازوپرسین در نورون های ماگنوسلولار موجود است [۲، ۱۱]. برخی گزارش ها بیان کننده افزایش مشخص در سطح پلاسمایی وازوپرسین می باشند، در حالیکه برخی هیچگونه افزایشی را نشان نداده اند[۶، ۷، ۱۴، ۱۵، ۲۰].

از آنجایی که تنظیم ترشح وازوپرسین ممکن است در کنترل شرایط فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک موثر باشد در این مطالعه سعی شده تا اثرات تجویز حاد مورفین بر جریانات پس سیناپسی سریع تحریکی و مهاری خود به خودی (sIPSC و sEPSC) در نورون های ماگنو سلولار هسته سوپرااپتیک و سطح پلاسمایی وازوپرسین در رت های نر بررسی گردد.

مواد و روشها

الکتروفیزیولوژی:Patch clamp در این مطالعه از موشهای صحرایی نر (۳-۴ هفته، ۱۰۰-۷۰ گرم) استفاده شده است. موشها در دمای ۲۴-۲۱ درجه سانتی گراد و شرایط استاندارد نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. حیوانات ابتدا توسط اتر بیهوش شده و سر آنها توسط گیوتین جدا شد. سپس مغز حیوان به سرعت خارج شده و به داخل محلول تهیه برش های مغزی که حاوی سدیم کلراید (۸۷ میلی مول)، پتاسیم کلراید (۲/۵ میلی مول)، سدیم هیدروژن فسفات (۱/۲۵ میلی مول)، منیزیم کلراید (۷ میلی مول)، کلسیم کلراید (۰/۵ میلی مول)، سدیم بیکربنات (۲۵ میلی مول)، گلوکز (۲۵ میلی مول) و سوکروز (۷۵ میلی مول) و دمای آن در حدود ۲ درجه سانتیگراد بود منتقل گردید. این محلول پیوسته توسط مخلوط اکسیژن ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ اکسیژن رسانی می گردید. توسط دستگاه میکروتوم برشهای مغزی به قطر ۲۵۰ میکرون که حاوی ناحیه سوپرااپتیک می باشد تهیه و حداقل به مدت ۱ ساعت در محلول ACSF که حاوی سدیم کلراید (۱۲۴ میلی مول)، پتاسیم کلراید (۳ میلی مول)، سدیم هیدروژن فسفات (۲ میلی مول)، منیزیم سولفات (۲ میلی مول)، کلسیم کلراید (۲ میلی مول)، سدیم بیکربنات (۲۶ میلی مول) و گلوکز (۱۰ میلی مول) بود در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده و سپس به یک محفظه ثبت در زیر میکروسکوپ منتقل شدند. نورون های سوپرااپتیک توسط میکروسکوپ مجهز به عدسی شیئی water immersion که به یک دوربین مادون قرمز (IR) متصل شده است مشاهده می شدند. با استفاده از آمپلی فایر مدل B۲۰۰AXOPATCH- پتانسیل سلول برای ثبت sEPSC و sIPSC به ترتیب در ۷۰- و صفر کلامپ شد. در این مطالعه تکنیک whole cell patch clamp به منظور بررسی فعالیت پس سیناپسی سریع نورون-های سوپرااپتیک مورد استفاده قرار گرفت.پیپت شیشه ای از محلولی با ترکیب کلسیم کلراید (۰/۱ میلی مول)، منیزیم کلراید (۲ میلی مول)، EGTA (۱/۱ میلی مول)، HEPES (۱۰ میلی مول)، Na2ATP (۲ میلی مول)، پتاسیم کلراید (۱۴۰ میلی مول) (برای sEPSC) و یا سزیم کلراید (۱۴۰ میلی مول) (برای sIPSC) پر می شد. فرکانس و دامنه (Amplitude) جریان های خود به خودی پس سیناپسی تحریکی و مهاری (sEPSC و sIPSC) اندازه گیری می شد. پس از دسترسی به نورون، از سلول به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه ثبت پایه گرفته شده، سپس نورون در معرض داروها قرار گرفت. در انتهای هر ثبت برای اطمینان از گاباارژیک بودن جریان های سیناپسی مهاری از بی کوکولین ۲۰ میکرو مول (آنتاگونیست گابا‌A) و در مورد جریانات سیناپسی تحریکی گلوتاماتی از AP-5 (۵۰ میکرومول) و CNQX (۱۰ میکرومول) که به ترتیب آنتاگونیست رسپتورهای NMDA و non-NMDA هستند استفاده شد. تمام داروهای مورد استفاده از طریق پرفیوژن ACSF به بافت مغز و نورون ها می رسید. مقاومت نوک پیپت های مورد استفاده ۳-۷ مگااهم بوده و برای ثبت از فیلتر ۱۰ کیلوهرتز استفاده شد. تحت این شرایط از ثبتهایی که در آنها دسترسی به سلول بیش از ۲۰٪ تغییر نکرده بود برای آنالیز

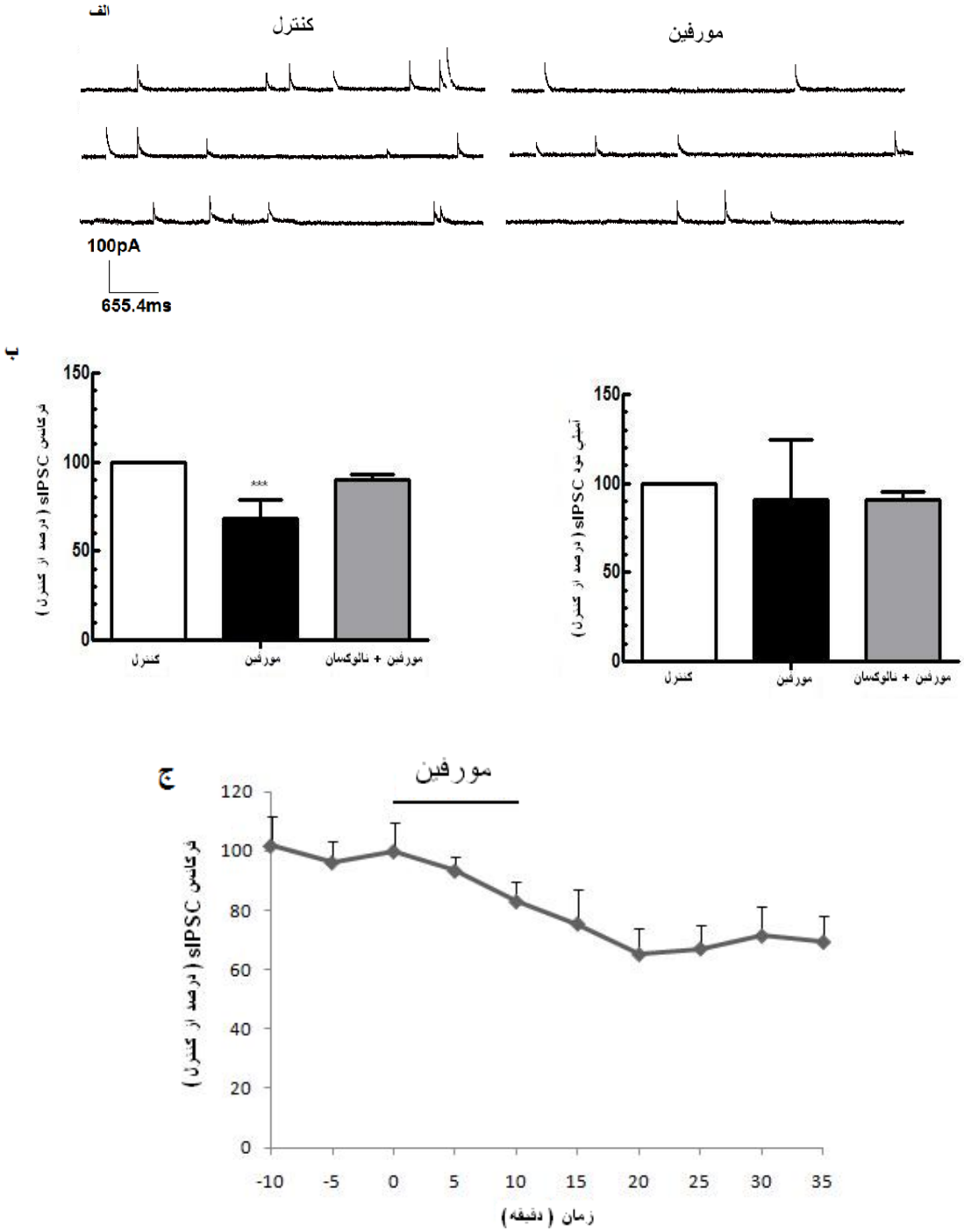
www.SID.ir

Archive of SID

پاسخ استفاده شد.

سنجش هورمونی: به منظور سنجش هورمون آنتی دیورتیک در پلاسمای موش نر صحرایی (۳-۴ هفته، ۱۰۰-۷۰ گرم) از روش زیر استفاده شد:

پس از ۳ تا ۴ ساعت ناشتایی (از مصرف آب جلوگیری نمی شد)، مورفین (۳۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی تزریق شده



شکل۱- الف) نمونه های ثبت فرکانس sIPSC قبل و بعد از تجویز مورفین ، ب) تجویز مورفین (۲۵ µm) موجب کاهش فرکانس sIPSC می شود اما بر آمپلی تود اثری ندارد، تجویز نالوکسان (۵۰ µm) از تاثیر مورفین بر فرکانس جلوگیری می نماید، ج) تغییرات فرکانس sIPSC نورون های ماگنوسلولار در طی ثبت، (n = ۷، ۰/۰۰۱ >p در مقایسه با گروه کنترل) هر ستون بیانگر میانگین ± SEM می باشد. در تمامی شکل ها ۰/۰۰۱ >p و ۰/۰۱>p به ترتیب با *** و** نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

و ۱۵ و ۴۵ دقیقه پس از تزریق مورفین سر حیوان جدا شده و به میزان حداقل نیم میلی لیتر خون تام در میکروتیوب اپندورف ۱/۵ میلی لیتری که حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و آنتی پروتئازهای آپروتینین و PMSF بودند جمع آوری شد. بلافاصله پس از مخلوط نمودن آهسته و کامل خون تام با مواد مذکور، پلاسما به کمک سانتری فیوژ (۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد) جدا شد. پلاسمای مذکور پس از جداسازی در ۲ میکروتیوب ۲۵۰ میکرولیتری تقسیم گردید. نمونه های تقسیم شده در ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایشات ذخیره شدند. میزان هورمون پلاسما با استفاده از روش ELISA اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده ها: جهت بررسی اختلاف میان گروههای مختلف دارویی و کنترل از تستهای آماری t-test، آنالیز واریانس یکطرفه و تست تکمیلی دانت استفاده شد و با $p<0/05$ معنی دار محسوب گردید.

یافته ها

تجویز حداقل دوز موثر مورفین (۲۵ میکرومول) به مدت ۱۰ دقیقه موجب کاهش قابل ملاحظه (۱۰/۵۵ ± ۳۲٪) فرکانس sIPSC ($p<0/001$ ، $n = 7$، شکل ۱) و افزایش معنی دار (۲/۱۸ ± ۱۲۰٪) فرکانس sEPSC ($p<0/001$، $n = 5$ ، شکل ۲) شد اما اثری بر آمپلی تود sIPSC و sEPSC نداشت. تجویز آنتاگونیست گیرنده اپیوییدی نالوکسان (۵۰ میکرومول) به مدت ۱۰ دقیقه قبل از تجویز مورفین از ایجاد اثرات مورفین جلوگیری نمود (شکل ۱و۲).

در مطالعه in vivo تجویز داخل صفاقی مورفین (mg/kg ۳۰) موجب افزایش سطح پلاسمایی وازوپرسین ۴۵ دقیقه پس از تزریق شد ($p<0/01$ ، شکل۳).

بحث

فعالیت نورون های ماگنوسلولار در هسته سوپراپتیک به صورت موثری وابسته به ورودی های سیناپسی است. یکی از مهمترین ورودی های سیناپسی به این هسته ورودی های اپیوییدی است. اثرات ایجاد شده توسط اپیوییدها در هسته سوپرا اپتیک متفاوت و گاه متضاد بوده است که می تواند به فاکتورهای متعددی وابسته باشد. یکی از فاکتورهای موثر در ایجاد این تفاوت ها نوع آگونیست مورد استفاده در تحقیقات است [۱]. مورفین یکی از ترکیبات اپیوییدی است که مصرف آن در موارد پزشکی دارای اهمیت است. تحقیقات در زمینه اثرات مورفین نتایج متفاوتی را به همراه داشته است.

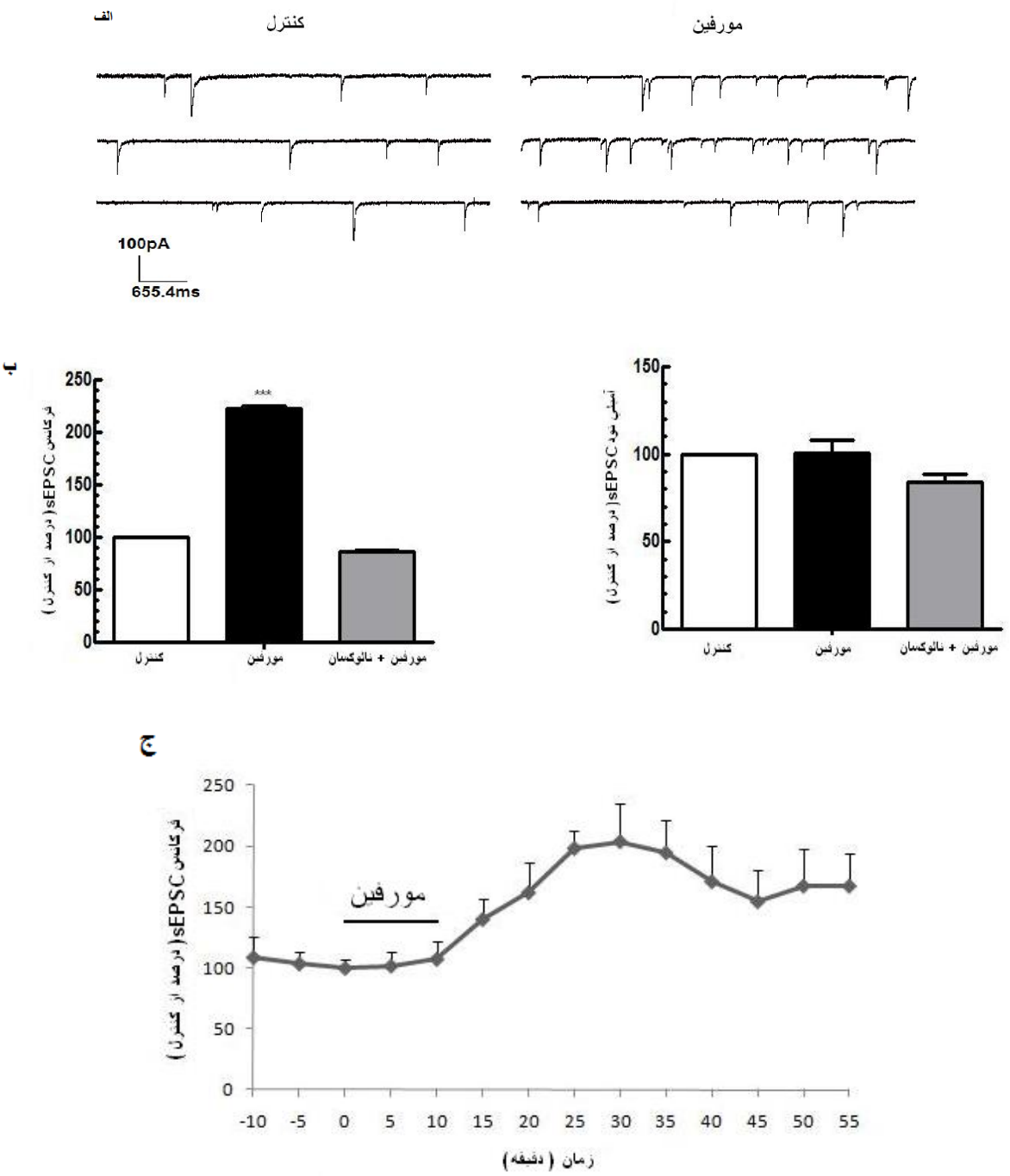
مطالعات نشان داده اند که اثرات تحریکی یا مهاری مورفین بر نورون های ماگنوسلولار وابسته به روش تجویز مورفین (تجویز حاد یا مزمن) متفاوت می باشد. برخی گزارشات بیان نموده اند که تجویز حاد مورفین موجب افزایش بیان وازوپرسین در هسته سوپراپتیک می گردد [۲، ۱۱]. همچنین مطالعات الکتروفیزیولوژیک نشان داده اند که فعال سازی رسپتورهای اپیوییدی (بسته به نوع رسپتور) موجب کاهش و یا افزایش تحریک پذیری نورون های ماگنوسلولار می شوند که این اثرات از طریق جریانات پتاسیمی وابسته به ولتاژ اعمال می گردند[۱۳]. علاوه بر این پیشنهاد شده است که اثرات مورفین بر نورون های ماگنوسلولار وابسته به نوع سلول ها و انتقالات سیناپسی متفاوت می باشند [۸، ۱۹].

در این مطالعه نتایج ثبت های الکتروفیزیولوژی نشان داد که تجویز مورفین (۲۵ µm) موجب کاهش فرکانس sIPSC و افزایش فرکانس sEPSC بدون تغییر در آمپلی تود می شود. این الگوی تغییرات در فرکانس جریانات سیناپسی سریع خود به خودی بدون تغییر در آمپلی تود ممکن است ناشی از اثرات پیش سیناپسی باشد [۸]، اگرچه بررسی های بیشتری نظیر اندازه گیری نسبت پالس های زوجی (paired pulse ratio) برای تایید این ایده لازم است. علاوه بر این، اثرات مورفین بر جریانات سریع سیناپسی تحریکی و مهاری با تجویز نالوکسان (۵۰ µm)، به عنوان یک آنتاگونیست اپیوییدی، مهار می گردد. بنابراین به نظر می رسد که اثرات مورفین در هسته سوپراپتیک از طریق رسپتورهای اپیوییدی میانجی گری می شود.

تفاوت اثر مورفین بر انتها های پیش سیناپسی مهاری یا تحریکی می تواند با نوع رسپتورهای اپیوییدی بیان شده در انتهای سیناپسی و یا مسیرهای سیگنالینگ مختلف داخل سلولی مرتبط باشد. از یک طرف مورفین عمدتا به عنوان آگونیست نسبی رسپتورهای مو در تحقیقات مورد استفاده قرار می گیرد و از طرف دیگر بررسی ها نشان داده اند که

www.SID.ir

Archive of SID



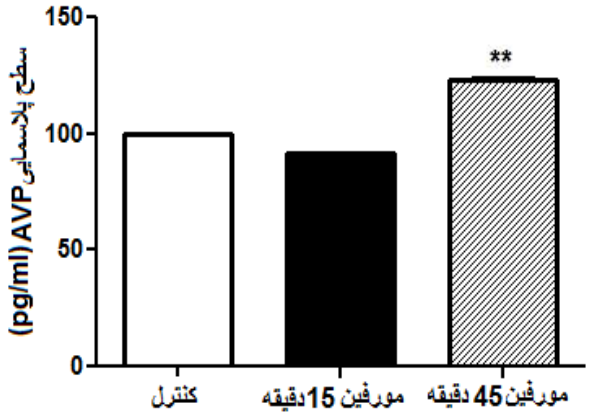
شکل ۲- الف) نمونه های ثبت فرکانس sEPSC قبل و بعد از تجویز مورفین ، ب) تجویز مورفین (۲۵ µm) موجب افزایش فرکانس sEPSC می شود اما بر آمپلی تود اثری ندارد، تجویز نالوکسان (۵۰ µm) از تاثیر مورفین بر فرکانس جلوگیری می نماید، ج) تغییرات فرکانس sEPSC نورون های ماگنوسلولار در طی ثبت، (n= ۵، p< ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل) هر ستون بیانگر میانگین ± SEM می باشد.

رسپتور های مو بسته به نوع سلولی که در آن قرار دارند از طریق پروتیین های G متفاوت، مسیرهای سیگنالینگ متفاوتی را فعال می نمایند [۱]. به این ترتیب تفاوت مشاهده شده بین انتقالات سیناپسی تحریکی و مهاری در این مطالعه می تواند ناشی از تفاوت در مسیرهای سیگنالینگ فعال شده باشد.

از طرف دیگر در مطالعه حاضر یافته های in vivo نشان داده اند که تزریق حاد مورفین به صورت داخل صفاقی، ۴۵ دقیقه بعد از تزریق دارو، موجب افزایش سطح پلاسمایی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- سطح پلاسمایی وازوپرسین ۱۵ و ۴۵ دقیقه بعد از تزریق مورفین. ۴۵ دقیقه بعد از تزریق مورفین(۳۰ mg/kg) افزایش قابل ملاحظه در سطح پلاسمایی وازوپرسین مشاهده شد اما بر سطح پلاسمایی وازوپرسین ۱۵ دقیقه بعد از تزریق اثری نداشت، ($p<۰/۰۱$،$n = ۶$ در مقایسه با گروه کنترل) هر ستون بیانگر میانگین ± SEM می باشد.

وازوپرسین در مقایسه با گروه کنترل می شود.

بنابراین به نظر می رسد کـه افـزایش فرکـانس sEPSC و کاهش فرکانس sIPSC ایجاد شده توسط تجویز حـاد مـورفین می تواند موجب افزایش فعالیت نورون های ماگنوسلولار هسـته سوپرااپتیک و افزایش ترشح وازوپرسین گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین وسیله تشکر و قـدردانی خـود را از مرکـز تحقیقات علوم اعصاب دانشـگاه علـوم پزشـکی شـهید بهشـتی کـه تحقیق حاضر را از نظر مالی حمایت کرده است ابراز می دارند.

References

[1] Bodnar, R.J., Endogenous opiates and behavior, ***Peptides***, 28(12) (2007) 2435-2513.

[2] Chang, S.L., Patel, N.A., Romero, A.A., Thompson, J. and Zadina, J.E., FOS expression induced by interleukin-1 or acute morphine treatment in the rat hypothalamus is attenuated by chronic exposure to morphine, ***Brain Res***, 736(1-2) (1996) 227-36.

[3] Decavel, C. and Van den Pol, A.N., GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus, ***J Comp Neurol***, 302(4) (1990) 1019-37.

[4] El Majdoubi, M., Poulain, D.A. and Theodosis, D.T., Lactation-induced plasticity in the supraoptic nucleus augments axodendritic and axosomatic GABAergic and glutamatergic synapses: an ultrastructural analysis using the disector method, ***Neuroscience***, 80(4) (1997) 1137-47.

[5] Inenaga, K., Nagatomo, T., Nakao, K., Yanaihara, N. and Yamashita H., Kappa-selective agonists decrease postsynaptic potentials and calcium components of action potentials in the supraoptic nucleus of rat hypothalamus in vitro, ***Neuroscience***, 58(2) (1994) 331-40.

[6] Korinek, A.M., Languille, M., Bonnet, F., Thibonnier, M., Sasano, P., Lienhart, A. and Viars, P., Effect of postoperative extradural morphine on AVP secretion, ***Br J Anaesth***, 57(4) (1985) 407-11.

[7] Koyuncuoğlu, H., Berkman, K., Hatipoğlu, I. and Sabuncu, H., Vasopressin release by D-aspartic acid, morphine and prolyl-leucyl-glycinamide (PLG) in DI Brattleboro rats, ***Pharmacol Biochem Behav***, 20(4) (1984) 519-25.

[8] Liu, Q.S., Han, S., Jia, Y.S. and Ju, G., Selective modulation of excitatory transmission by mu-opioid receptor activation in rat supraoptic neurons, ***J Neurophysiol***, 82 (1999) 3000-3005.

[9] Ludwig, M. and Pittman, Q.J., Talking back: dendritic neurotransmitter release, ***Trends Neurosci***, 26 (2003) 255–261.

[10] Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H. and Watson, S.J., Anatomy of CNS opioid receptors,

www.SID.ir

Archive of SID

Trends Neurosci, 11 (1988) 308–314.

[11] Milanés, M.V., Laorden, M.L., Chapleur-Château, M. and Burlet, A., Differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin in discrete brain regions after morphine administration: correlations with hypothalamic noradrenergic activity and pituitary-adrenal response, ***Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol***, 356(5) (1997) 603-10.

[12] Morris, J.F. and Ludwig, M., Magnocellular dendrites: prototypic receiver/transmitters ***J Neuroendocrinol***, 16 (2004) 403–408.

[13] Muller, W., Hallermann, S. and Swandulla, D., Opioidergic modulation of voltage-activated K1currents in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus in rat, ***J Neurophysiol***, 81(1999) 1617-1625.

[14] Philbin, D.M., Wilson, N.E., Sokoloski, J. and Coggins, C., Radioimmunoassay of antidiuretic hormone during morphine anaesthesia, ***Can Anaesth*** Soc J, 23(3) (1976) 290-5.

[15] Robertson, S.A., Hauptman, J.G., Nachreiner, R.F. and Richter, M.A., Effects of acetylpromazine or morphine on urine production in halothane-anesthetized dogs, ***Am J Vet Res***, 62(12) (2001) 1922-7.

[16] Sumner, B.E.H., Coombes, J.E., Pumford, K.M. and Russell, J.A., Opioid subtypes in the supraoptic nucleus and posterior pituitary gland of morphine-tolerant rats, ***Neurosci***, 37 (1990) 635–645.

[17] Van den Pol, A.N., Wuarin, J.P. and Dudek, F.E., Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation, ***Science***, 250(1990) 1276–1278.

[18] Van den Pol, A.N. and Trombley, P.Q., Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission, J Neurosci, 13(1993) 2829–2836.

[19] Wakerley, J.B., Noble, R. and Clarke, G., Effects of morphine and D-Ala, D-Leu enkephalin on the electrical activity of supraoptic neurosecretory cells in vitro, ***Neuroscience***, 10(1) (1983) 73-81.

[20] Wilkens, E.P. and Yates, B.J., Pretreatment with ondansetron blunts plasma vasopressin increases associated with morphine administration in ferrets. ***Anesth Analg***, 101(2005) 1029 –33.

www.SID.ir