

بررسی اثر اعتیادآور مورفین روی قشر مغز موش صحرایی آزمایشگاهی با بکارگیری فن استریولوژی

بهناز شوهانی*، دکتر عبدالرحمن دزفولیان**، فهیمه محمدقاسمی***، حمیدرضا محمودزاده نایب****

چکیده

مورفین علاوه بر تأثیر بر روی تمام دستگاههای بدن، بیشترین تأثیر را بر روی سیستم عصبی دارد، بدین لحاظ در سال ۱۳۷۸ مطالعه‌ای با هدف تعیین و بررسی اثر اعتیاد آور مورفین بر روی مغز موش صحرایی نر آزمایشگاهی انجام شد. در این مطالعه به روش موردی شاهدی، ۳۰ رأس موش صحرایی نر از نژاد N-MARI بصورت تصادفی انتخاب و به سه گروه ده‌تایی تقسیم شدند، به گروه آزمایش ترکیب مورفین و نرمال سالین با دوز افزایشی 5-25mg/kg هر ۱۲ ساعت یکبار، به مدت ۵ روز و بصورت زیرجلدی تزریق شد. به گروه شاهد اول همزمان با گروه آزمایش، نرمال سالین با حجم معادل و یکسان تزریق شد و به گروه شاهد دوم دارویی تجویز نشد. ۱۲ ساعت پس از آخرین تزریق، حیوانات را بیهوش کرده، مغزها بدقت از جمجمه خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، مغزها در آگار ۷٪ قالب‌گیری و سپس با دستگاه ماکروتوم ابداعی برشهای یک میلی‌متری در جهت کورونال تهیه شد. با روش Cavalieri حجم قشر مغز محاسبه گردید. حجم قشر مغز در گروههای آزمایش، شاهد یک و شاهد دو به ترتیب، ۶۲۴/۶۳، ۶۱۳/۷۶، ۵۹۹/۶۴ میلی‌متر مکعب بدست آمد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که مورفین تغییری در حجم قشر مغز ایجاد نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: استریولوژی، حجم، قشر مغز، مورفین

مقدمه

شبه‌تریاک اثرات جانبی نامطلوب و توان بالقوه‌ای برای ایجاد اعتیاد دارند، اما قترنهاست که در علم پزشکی کاربرد دارویی دارند. مورفین یکی از شاخص‌ترین ترکیبات شبه‌تریاک است که آکالوئید اصلی تریاک بوده و هر وئین از استیلاسیون آن بدست می‌آید. مشخصه اصلی

اعتیاد به مواد شبه‌تریاک، این پدیده مخرب و خانمانسوز جوامع بشری که سالانه افراد زیادی بخصوص جوانان را در کام خود فرو می‌کشد، امروزه بصورت یک معضل و آفت جهانی در آمده و بنیان فرهنگی، اقتصادی، اجتماعی و ملی هر کشوری را تهدید می‌کند. علی‌رغم آنکه مواد

* - کارشناس ارشد بافت‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایلام

** - عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

*** - دانشجوی دکتری بافت‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

مورفین و نرمال سالین با دوز افزایشی 5-25mg/kg دو بار در روز (هر ۱۲ ساعت یکبار) بمدت پنج روز به صورت زیرجلدی تزریق شد [۱۵]. به گروه شاهد اول، نرمال سالین باحجمی معادل محلول مورفین روزی دوبار به مدت پنج روز از طریق زیرجلدی تزریق گردید و گروه شاهد دو هیچ دارویی دریافت نکرد.

برای اطمینان از معتاد بودن حیوانات در یک مطالعه آزمایشی^(۱)، علائم سندرم محرومیت^(۲) مورد مطالعه قرار گرفت. به این ترتیب که دوازده ساعت پس از تزریق آخرین دوز مورفین در روز پنجم، نالوکسان به میزان 5mg/kg بصورت داخل صفاقی تزریق و به مدت سی دقیقه علائم قطع مصرف دارو در حیوانات بررسی شد [۱۵،۳]. علائم مشاهده شده عبارت بودند از: پرش برف با بالا، بلند شدن روی دویا، حالت جویدن، کشیدن شکم روی زمین در حین راه رفتن، افتادگی پلک ها، سیخ شدن موها و اسهال. دوازده ساعت پس از آخرین تزریق حیوانات را بیهوش کرده و پس از کنار زدن استخوانهای سقف و قاعده جمجمه، مغزها بدقت خارج و با نرمال سالین شستشو داده شدند. سپس با ترازوی دیزیتالی، وزن مغزها اندازه گیری و طول قدامی - خلفی، جهت تعیین تعداد برشها با کولیس مشخص گردید. سپس نمونه ها در محلول فرمالین فسفات بافر شده ۱۰٪ گذاشته شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، نمونه ها از داخل محلول فرمالین خارج و با نرمال سالین شستشو داده و سپس در محلول آگار ۷٪ قالب گیری شدند. پس از اطمینان از سفت شدن قالبها، با استفاده از دستگاه ماکروتوم ابداعی و چاقوی هیستوپاتولوژی، برشهایی در جهت کورونال از قدام به

مورفین کاهش تدریجی تأثیر آن و به عبارتی ایجاد تحمل و همچنین وابستگی روانی و فیزیکی به داروست [۱۵،۸،۱]. با وجود اینکه بیشترین اثر مورفین روی مغز می باشد، اما صرفاً مقدار کمی از آن به مغز می رسد. عملکرد مورفین بر روی سیستم اعصاب مرکزی بدو صورت می باشد: یکی اثرات فوری که باعث ایجاد تغییراتی در رفتار و آگاهی فرد می شود و دیگری اثرات طولانی مدت این مواد بر روی ساختمان و یا هورمونها و آنزیمهای سلولی که در ایجاد تحمل و وابستگی نقش دارند [۲]. تاکنون مطالعات زیادی در رابطه با تأثیر مورفین بر روی سیستم عصبی صورت گرفته اما از نظر کمی تحقیقات زیادی انجام نشده است. برای اندازه گیری حجم از روش Cavalieri که یکی از فنون استریولوژی می باشد، استفاده شده است. استریولوژی علمی است که با استفاده از قوانین ریاضی، آمار و هندسه کمیت های ساختمانی سه بعدی مانند حجم، سطح، طول، تعداد کل، تعداد در واحد حجم و... را با شمارشهای ساده ای که از تصاویر دو بعدی بدست می آید، محاسبه و تعیین می نماید [۱۴]. در مطالعه کنونی سعی شده است تا اثر اعتیاد آور مورفین بر روی حجم قشر مغز موش صحرایی بررسی شود.

مواد و روشها

در این مطالعه به صورت موردی شاهدی تعداد ۳۰ رأس موش صحرایی نر سه ماهه از نژاد N-MARI و در محدوده وزنی ۱۳۰-۱۰۰ گرم انتخاب شدند. حیوانات بصورت تصادفی به سه گروه ده تایی؛ شاهد یک، شاهد دو و آزمایش تقسیم شدند. به گروه آزمایش ترکیب

1- Pilot Study

2- Withdrawal Syndrom

یافته های پژوهش

تعداد کل نقاط شمارش شده در قشر مغز برای هر نمونه محاسبه و حجم قشر مغز در هر نمونه بر طبق فرمول مذکور محاسبه گردید (جدول ۱). همچنین ضریب خطای مربوط به حجم قشر مغز در هر نمونه بطور جداگانه حساب شد (جدول ۱). سپس میانگین خطای معیار حجم قشر مغز در هر سه گروه محاسبه و با هم مقایسه شدند. میانگین خطای معیار قشر مغز در گروه آزمایش، شاهد اول و شاهد دوم به ترتیب $17/928$ b $624/629$ ، $613/763$ b $24/572$ و $16/014$ b $599/645$ بدست آمد. تغییرات حجمی قشر مغز در گروه های آزمایش، شاهد یک و شاهد دو با هم مقایسه و بصورت نمودار رسم گردید که تفاوت معنی داری بین گروه ها مشاهده نشد ($P < 0/05$).

خلف با ضخامت یک میلی متر از مغز تهیه گردید. این برشها با رعایت ترتیب آنها، بر روی یک صفحه شفاف^(۱) منتقل شدند. برای بررسیهای استریولوژیکی، یک شبکه اندازه گیری نقطه ای^(۲) بطور کاملاً تصادفی بر روی برشهای بدست آمده انداخته شد (تصویر شماره ۱). سپس در هر برش تعداد نقاطی از شبکه اندازه گیری نقطه ای که با قشر مغز تلاقی داشتند بدقت شمارش گردید (P) و تعداد نقاط شمارش شده در تمام برشهای مربوط به یک مغز با هم جمع شدند ($\sum P$) [۱۰، ۷، ۶، ۵].

برای محاسبه حجم به روش Cavalieri از فرمول زیر استفاده شد [۱۰].

$$V = \sum P \times a(p) \times t$$

V = حجم

$\sum P$ = مجموع نقاط

$a(p)$ = محدوده هر نقطه از شبکه

t = ضخامت برش

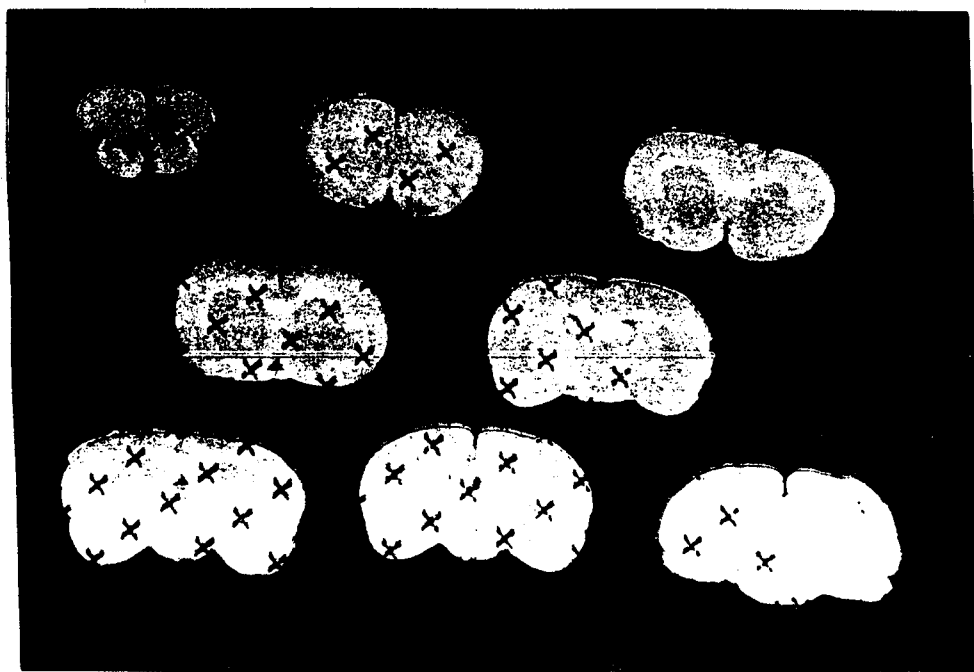
برای تعیین میزان دقت شمارشگر در شمارش نقاط قسمت مورد نظر باید ضریب خطای^(۳) حجم محاسبه شود. ضریب خطای حجم در حد کمتر از ۰/۰۵ یک معیار عالی برای شمارش محسوب می شود [۱۰، ۹، ۵].

جهت تحلیل آماری از نرم افزار SPSS استفاده شد. به منظور مقایسه حجم قشر مغز در گروه های شاهد یک، شاهد دو و آزمایش از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید.

- 1- Transparency
- 2- Test grid
- 3-Coefficient of error

جدول ۱. نقاط شمارش شده در قشر مغز برای هر نمونه، حجم محاسبه شده (mm³) و ضریب خطای آن

| شماره حیوان | گروه شاهد دوم | | | گروه شاهد اول | | | گروه آزمایش | | |
|-------------|---------------|--------------|--------------------|---------------|--------------|--------------------|-------------|--------------|--------------------|
| | ضریب خطا | حجم قشر (mm) | تعداد کل نقاط (ΣP) | ضریب خطا | حجم قشر (mm) | تعداد کل نقاط (ΣP) | ضریب خطا | حجم قشر (mm) | تعداد کل نقاط (ΣP) |
| ۱ | ۰/۰۴۲۰۶ | ۶۱۹/۲۰ | ۵۷ | ۰/۰۶۴۷۸ | ۴۸۸/۸۴ | ۴۵ | ۰/۰۳۵ | ۷۳۸/۶۹ | ۶۸ |
| ۲ | ۰/۰۴۲۷۶ | ۶۵۱/۷۹ | ۶۰ | ۰/۰۵۰۲۱ | ۵۷۵/۷۴ | ۵۳ | ۰/۰۳۸۲۱ | ۵۹۷/۴۷ | ۵۵ |
| ۳ | ۰/۰۳۶۳۳ | ۵۱۰/۵۷ | ۴۷ | ۰/۰۳۴۸۱ | ۵۹۷/۴۷ | ۵۵ | ۰/۰۱۲۷۳ | ۶۳۰/۰۶ | ۵۸ |
| ۴ | ۰/۰۳۰۲۷ | ۶۳۰/۰۶ | ۵۸ | ۰/۰۳۳۵۴ | ۶۴۰/۹۲ | ۵۹ | ۰/۰۴۱۷ | ۶۶۲/۶۵ | ۶۱ |
| ۵ | ۰/۰۴۹۵۷ | ۵۸۶/۶۱ | ۵۴ | ۰/۰۳۰۰۴ | ۶۸۴/۳۷ | ۶۳ | ۰/۰۳۷۸ | ۶۰۸/۳۳ | ۵۶ |
| ۶ | ۰/۰۳۴۸۱ | ۵۹۷/۴۷ | ۵۵ | ۰/۰۵۳۴۵ | ۵۸۶/۶۱ | ۵۴ | ۰/۰۴۸۱ | ۵۸۶/۶۱ | ۵۴ |
| ۷ | ۰/۰۴۶۱۳ | ۶۹۱/۲۰ | ۵۷ | ۰/۰۳۲۶۵ | ۵۴۳/۱۵ | ۵۰ | ۰/۰۴۴۶ | ۵۲۱/۴۳ | ۴۸ |
| ۸ | ۰/۰۴۱۸۰۴ | ۶۴۰/۹۲ | ۵۹ | ۰/۰۲۷۸۳ | ۷۳۸/۶۹ | ۶۸ | ۰/۰۳۲۴۴ | ۶۶۲/۶۵ | ۶۱ |
| ۹ | ۰/۰۳۰۸۹ | ۵۱۰/۵۷ | ۴۷ | ۰/۰۴۳۵۱ | ۷۰۶/۱۰ | ۶۵ | ۰/۰۳۷۵۵ | ۶۱۹/۲۰ | ۵۷ |
| ۱۰ | ۰/۰۲۴۸۸ | ۶۳۰/۰۶ | ۵۸ | ۰/۰۴۳۹۱ | ۵۷۵/۷۴ | ۵۳ | ۰/۰۲۹۰۹ | ۶۱۹/۲۰ | ۵۷ |



تصویر شماره ۱. برشهای مغزی و نحوه قرارگیری تصادفی شبکه اندازه گیری نقطه ای بر روی آن.

بحث و نتیجه گیری

مورفین بر روی حجم قشر مغز موش صحرایی نر بررسی شد. میانگین حجم قشر مغز در گروههای آزمایش، شاهد اول و شاهد دوم به ترتیب ۶۲۴/۶۲۹، ۶۱۳/۷۶۳ و ۵۹۹/۶۴۵ بدست آمد. از نظر آماری اختلاف معنی داری بین گروهها وجود نداشت و لذا تغییری در حجم قشر مغز در اثر مورفین مشاهده نگردید.

علاوه بر عدم دسترسی به مدارکی دال بر انجام مطالعات کمی در رابطه با تأثیر مورفین بر قشر مغز، مدارک زیادی در مورد مطالعات پاتولوژیکی اثر مورفین بر قشر مغز در دست نمی باشد. استین مارتین و همکاران (۱۹۹۹) گزارش دادند که مورفین، تولید سلولهای نوروگلیال را بصورت وابسته به دوز کاهش می دهد [۱۲]. نتایج مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی نشان می دهد که مصرف مورفین با دوز بالا و مدت زمان طولانی، باعث تغییراتی در ساختمانهای ویژه مغز می شود [۱۱]. با توجه به این مسئله که در مطالعه کنونی تغییری در حجم قشر مغز مشاهده نشد، می توان نتیجه گرفت که احتمالاً مصرف مورفین در کوتاه مدت تأثیری بر حجم قشر مغز ندارد، اما از آنجا که علائم سندرم محرومیت ناشی از قطع دارو در حیوانات مشاهده گردید، نتیجه گیری قطعی در این زمینه نیاز به بررسیهای بیشتری دارد.

تمام ساختمانهای زیستی سه بعدی می باشند، اما هنوز هم تمام تصاویر میکروسکوپی که در تجزیه و تحلیل بکار برده می شوند دو بعدی هستند، لذا تمام تجزیه و تحلیلها بدون خطا نمی باشند. برای بالابردن کیفیت اطلاعات و کم کردن تعداد داده ها، روشهای جدیدی مورد نیاز می باشد که روشهای استریولوژی و سائیلی دقیق، ساده و کارآمد هستند که با استفاده از داده های بدست آمده از ساختمانهای جزئی، اطلاعاتی را در مورد ساختمانهای میکروسکوپی و ماکروسکوپی سه بعدی ارائه می دهند. در مطالعه حاضر برای تعیین و اندازه گیری حجم به جای روش معمول «جابجایی مایع» از فن دقیق و کارآمد Cavalieri استفاده شده است. زیرا روش جابجایی مایع، روش دقیق و صحیحی نبوده و حجم قشر مغز بطور مجزا که در این پژوهش مدنظر بود را نمی توان با روش جابجایی مایع اندازه گرفت [۵].

دوناس^(۱) و همکاران (۱۹۹۸) حجم فضای CSF^(۲) را در افراد معتاد به مواد شبه تریاک با روش Cavalieri اندازه گرفته و گزارش دادند که حجم فضای CSF در مردان معتاد به مواد اویپوئیدی افزایش یافته است [۴]. تئو^(۳) و همکاران (۱۹۹۳) نیز افزایش واضحی را در حجم غده هیپوفیز مردان معتاد به مواد اویپوئیدی مشاهده کردند [۱۳]. پزاواس^(۴) و همکاران (۱۹۹۸) گزارش دادند که حجم قشر مغز و بطن های در افراد معتاد کاهش یافته است، این محققین برای اندازه گیری حجم از روش Cavalieri استفاده کردند [۱۱]. در مطالعه کنونی اثر

1- Donas

2- Cerebro Spinal fluid

3- Teoh

4- Pezawas

References

- 1- Barchfeld c.c, Medzinradsky F. , Receptor - mediated stimulation of brain GTPase by opiates in normal and dependent rats, *J.Biochem. Biophys. Res. Common*, 1984, 121:641-648.
- 2- Blasig J.Herz A, et al, Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and Quantification of the precipitated withdrawal rats, syndrome 24:1915-1918 in *J.Psychopharmacology*, 1975:
- 3- Busquets X.,Ventayol P.,Naloxone-Percipitated withdrawal in morphine-dependent rats increases the expression of alpha 2-adrenoceptor mRNA in brain , *Brain-Res-Mod.*,1997 Apr;45(1):154-8
- 4- Donas P.,Van roos D.et al., Enlarged cerebrospinal fluid spaces in opiate-dependent male patients:A stereological CT study, *J. Neuropsychobiology*, 1998;38:80-83.
- 5- Dezfullian AR.,Microscopical application of design based stereological methods in histopathology and toxic-pathology, Pho thesis, the university of liverpool,1995.
- 6- Gundersen H.J.G.,Jensen E.B., Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections, *Journal of microscopy*,1985;138:127-42.
- 7- Gundersen H.J.G., Bendtsen T.F., Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis, *APMIS*, 1988;46:379-394.
- 8- Katzung B.G., Basic & clinical pharmacology, 7th edition, Appelton & lange,california, 1998, 490-514.
- 9- Mayhew TM.,A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure, *Journal of neurocytology*, 1992;21:313-328.
- 10-Michel R.P.,Cruz-orive L m., Application of the cavalieri: Principle and vertical sections method to lung:estimation of volume and pleural surface area, *J. microscopy*,1988;150(pt 2): 117-36.
- 11- Pezawas LM.,Fischer G.,Cerebral CT findings in male opioid-dependent patients: stereological, planimetric and linear measurments, *psychiatry Res.*, 1988,83(3): 139-47.
- 12- Stiene-Martin A.,Gurwell JA.,Morphine alters astrocyte growth in primary cultures of mouse glial cell, *Brain Res.*, 1991, 60 (1): 1-7 .
- 13- Teoh sk., et.al, Pituitary volume in men With concurrent heroin and cocaine dependence, *J. clin. endocrinol. Metab.*, 1993, 76 (6): 1529-32
- 14- Vesterby a.,star volume in bone research, A histomorphometric analysis of trabecular bone structure usiny vertical section, *Anat. Res.*, 1993,235: 325-334.
- 15- Windh R.T., little p.j, the ontogeny of mu opiate tolerance and dependance in rat: antinociceptive and biochemical studies *J. pharmacol- Exp- ther*, 1995; jun, 273 (3):1361-74.

Using the stereological technique to evaluate the addictive effects of morphine on the Volume of cerebral cortex of male rats

Shohani B, Dezfolian A (PhD), Mohammad Ghasemi F (MSc), Mahmood Zadeh Saghed H (PhD)

ABSTRACT:

also Besides morphines broad effects on the body systems, its most prominent effect is on the nervous system. This study was performed in to determine the addictive effects of morphine on the brain of male rats in 1999. In this research, 30 N-MARI male rats were randomly selected and divided in three groups of tens. The test group was injected with an increasing dose regimen of morphine-saline solution for 5 days (5-25 mg/kg, BID) subcutaneously. The same dose of normal saline was used for the control group simultaneously. No injection was done on the control group after the last injection, the animals were deeply anaes the tized, then the brains were removed carefully the Skull and put in 10% formaline Solution. After 48 hrs, the brains were embedded in a 7% agar. Then 1 mm coronal Slices were prepared by inventor macrotome. Afterward, using cavalieri principles, the volume of cerebral cortex was calculated. The volumes of the cerebral cortex in the test group, control group I and control group 2 were 624 63, 613/76, 599/64 mm³ respectively. The finding proved no significant effect of morphine on the volume of cerebral cortex in rats.

Key words : Stereology, volume, cerebral cortex, morphine.