نقش گیرنده A_1 آدنوزینی در فعالیت الکتریکی نورونهای هسته پاراژیگانتوسلولاریس در موشهای صحرایی نر معتاد

محسن خلیلی .Ph.D ☆✞، محمدرضا واعظ مهدوی .Ph.D☆

☆دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

✞آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۷۴۳۵-۱۴۱۴۴، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

پست الکترونیک: Email:najafabady@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۹/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۳/۲/۱۳

* **هدف:** بررسی نقش گیرنده های A_1 آدنوزینی نورونهای هسته پاراژیگانتوسلولاریس بر فعالیت الکتریکی این نورونها در موشهای کنترل و معتاد

* **مواد و روشها:** حیوانات مورد مطالعه به دو گروه کنترل و وابسته به مورفین تقسیم شدند (در هر گروه n=۳۶). در گروه وابسته حیوانات سولفات مورفین را از طریق آب آشامیدنی به مدت ۲۱ روز دریافت می کردند. سپس حیوانات هر دوگروه به منظور ثبت فعالیت الکتریکی از نورونهای هسته PGi در دستگاه استریوتاکس قرار گرفته و توسط میکرومانیپولیتور یک عدد میکروپیپت ثبات شیشه ای در کنار یک نورون هسته PGi قرار می گرفت. فعالیت الکتریکی نورون به دستگاه تقویت کننده خارج سلولی و سپس به اوسیلوسکوپ هدایت می شد. با استفاده از یک دستگاه Window discriminator فعالیت الکتریکی نورون از زمینه اوسیلوسکوپ جدا شده و وارد برنامه آنالیز کننده کامپیوتری PSTH می گردید. فعالیت نورون حدوداً بعد از ۳۰ دقیقه ثبت از نورون حالت ثابت پیدا می کرد. با اعمال داروهای آگونیست و آنتاگونیست گیرنده A_1 اثر آنها بر فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi (فرکانس در ثانیه) اندازه گیری می شد.

* **یافته ها:** با به کارگیری آگونیست اختصاصی گیرنده A_1، سیکلوهگزیل آدنوزین (.i.p ;μM ۲۰۰) به داخل هسته PGi دردو گروه کنترل و معتاد فعالیت الکتریکی این هسته به مقدار معنی داری کاهش پیدا می کند، به طوری که این کاهش فالیت در گروه معتاد (۳/۴±۵۲/۵ درصد) بارزتر از گروه کنترل بود (۳/۱±۳۵/۲ درصد). همچنین حدود ۱۸-۱۰ دقیقه بعد از به کار گیری ۸- فنیل تئوفیلین (.i.p ;mg/kg ۱۰) به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده A_1 آدنوزینی یک افزایش در فعالیت الکتریکی هسته PGi مشاهده شد که این اثر در گروه معتاد (٪۲/۵±۳۹/۳) مشخص تر از گروه کنترل بود (۲/۲±۲۷/۲ درصد). در آزمایشهای تکمیلی سیکلوهگزیل آدنوزین (CHA) در گروهی از موشها به کار رفت که قبلاً کافئین (.i.p ;mg/kg ۵۰) را دریافت کرده بودند. نتیجه نشان داد که CHA در حضور کافئین به عنوان آنتاگونیست عمومی گیرنده‌های آدنوزینی اثر بارزی بر فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi ندارد.

* **نتیجه گیری:** نتایج به دست آمده نشان داد که یک افزایش حساسیت در گیرنده‌های A_1 آدنوزینی در موشهای صحرایی نر معتاد به مورفین به وجود می‌آید که این افزایش حساسیت سبب تغییر الگوی فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi در طی وابستگی و سندرم ترک می گردد.

گل واژگان: آدنوزین، مورفین، هسته پاراژیگانتوسلولاریس، کافئین، ۸-فنیل تئوفیلین، سیکلوهگزیل آدنوزین، ثبت تک واحدی

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۴۳-۱۳۸

مقدمه

تحقیقات نشان داده است مصرف مورفین دارای چندین عارضه ازجمله مقاومت، وابستگی و سندرم ترک می‌باشد (۱). در مورد مکانیسم این پدیده‌ها نظرات مختلف ارائه شده است (۲، ۳)، اما مکانیسم دقیق این علائم به خصوص در مورد سندرم ترک هنوز ناشناخته باقی مانده است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که فعالیت هسته PGi نقش اساسی در پدیده سندرم ترک دارد (۴، ۵، ۶). طی پدیده سندرم ترک این هسته

با آزاد کردن اسیدآمینه‌های تحریکی در هسته لوکوس سرولئوس (LC)، منجر به بالا رفتن فعالیت این هسته می‌شود (۷، ۸، ۹)، اما بر عکس طی وابستگی فعالیت PGi و به موازات آن فعالیت هسته LC کاهش می‌یابد (۲).

بسیاری از مطالعات یک ارتباط دو جانبه بین آدنوزین و رسپتورهای اوپیوئیدی گزارش کرده‌اند (۱۰، ۱۱، ۱۲). این دو سیستم از طریق مسیر سیگنالینگ مشترک cAMP اعمال اثر می‌کنند (۱۳).

همچنین نشان داده شده است که آنالوگهای آدنوزینی در درمان وابستگی به مورفین کاربرد دارند (۱۰)، چنانچه این آنالوگها باعث تخفیف علائم سندرم ترک مورفین شده در صورتی که کافئین به عنوان آنتاگونیست رسپتورهای آدنوزینی سبب تشدید این علائم می‌گردد (۱۴، ۱۵). از جنبه الکتروفیزیولوژیکی، در مطالعهٔ قبلی انجام شده در آزمایشگاه ما نشان داده شد که اعمال آدنوزین و کافئین به ترتیب سبب کاهش و افزایش معنی‌داری در فعالیت نورونهای هسته PGi در موشهای معتاد به مورفین در طی مرحله سندرم ترک می‌گردد. با توجه به این یافته که فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi به ترتیب در طی مراحل وابستگی و سندرم ترک کاهش و افزایش معنی‌دار پیدا می‌کند (۲)، و اینکه مصرف آدنوزین اثر بارزی در کاهش فعالیت نورونهای این هسته در طی سندرم ترک دارد (۱۶)، مطالعه اخیر جهت بررسی اثر آدنوزین از طریق تغییر گیرنده A_1 در هسته PGi طراحی گردیده است.

مواد و روشها

حیوانات

موشهای صحرایی نر از جنس NMRI در محدوده وزنی ۳۸۰-۳۵۰ گرم به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. در هر قفس چهار موش قرار گرفته و به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. گروه کنترل (n=۳۶) سوکروز ۳درصد در آب خوراکی دریافت می‌کردند و در گروه وابسته (n=۳۶) مورفین سولفات و سوکروز ۳ درصد مصرف شد. هر گروه به سه زیر گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند. در زیر گروه اول N- سیکلوهگزیل آدنوزین (CHA) به داخل هسته PGi تزریق می‌شد. در زیر گروه دوم ۸-فنیل تئوفیلین بصورت داخل صفاقی تزریق گردید. در زیر گروه سوم بعد از تزریق داخل صفاقی کافئین، CHA به داخل هسته PGi تزریق می‌شد.

داروها

سولفات مورفین (تماد، ایران) و کافئین در آب مقطر حل می‌شدند. ۸- فنیل تئوفیلین (سیگما، آمریکا) به وسیله اتیلن دی آمین به صورت محلول در آمده و سپس برای تزریق داخل صفاقی به کمک آب مقطر رقیق می‌گشت. سیکلوهگزیل آدنوزین (سیگما، آمریکا) در داخل مایع مغزی نخاعی (Artificial cerebrospinal fluid, ACSF) حل می‌شد. محتویات مایع مغزی نخاعی (برحسب میلی مول) شامل ترکیبات زیر بود. NaCl;۱۲۴، KCl;۵، $MgCl_2$;۲، $NaHCO_3$;۲۶، $CaCl_2$;۲، KH_2PO_4;۱/۲۵، D-glucose;۱۰.

تجویز مزمن مورفین

غلظت مورفین مورد استفاده در آب آشامیدنی در طی ۲۱ روز مصرف، به ترتیب زیر بود. برای روزهای اول و دوم ۰/۱، برای روزهای سوم و چهارم ۰/۲، برای روزهای پنجم و ششم mg/ml ۰/۳، سپس در ۱۵ روز باقی‌مانده موشها دوز mg/ml ۰/۴ را دریافت می‌کردند (۱۷).

روش ثبت از هسته PGi و جمع آوری داده‌ها

در ابتدا حیوانات به وسیله اورتان (g/kg; i.p. ۱/۲) بیهوش می‌شدند. سپس بعد از تراکوتومی در دستگاه استریوتاکس قرار می‌گرفتند (Narishige، ژاپن). دمای بدن آنها به کمک پتوی گرم کننده نزدیک ۳۶/۸-۳۵/۵ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته می‌شد. به منظور ثبت از هسته PGi یک سوراخ با قطر ۲میلی‌متر بر روی جمجمه در بالای هسته PGi با مختصات mm ۱۱/۹۶-۱۱/۶۵ درخلف برگما و ۱/۶-۱/۷mm در جوانب خط وسط بر اساس اطلس پاکزینوس ایجاد می‌شد (۱۸). برای تزریق در داخل هسته PGi یک کانول راهنما بر روی هسته PGi با زاویه ۳۰ درجه از الکترود ثبات (عمود)، با مختصات ۵/۷میلی‌متر به طرف خلف نقطه سوراخ شده و ۱۰/۳میلی‌متر به طرف عمق جمجمه ایمپلنت می‌شد. تجهیزات تزریق شامل یک سوزن میکروواینجکتور متصل به سرنگ هامیلتون بود که از طریق کانول راهنما وارد هسته PGi می‌شد. با قرار گرفتن میکروالکترود شیشه‌ای پر شده از پونتامین آبی (۲درصد) به همراه سدیم استات (M ۰/۵) در کنار نورونهای هسته PGi، ثبت خارج سلولی انجام می‌گرفت. برای قرار دادن میکروالکترود شیشه‌ای ثبات در کنار نورونهای هسته PGi از یک عدد میکرومانیپولاتور (Narishige، ژاپن) قرار گرفته بر روی دستگاه استریوتاکس استفاده شد (mm ۱۰/۱-۹/۶ از سطح جمجمه به طرف عمق). ثبت نورونی از طریق الکترود شیشه‌ای ثبات به میکروالکترود آمپلی‌فیر (WPI، آمریکا) و از آنجا به اوسیلوسکوپ وارد می‌شد. همزمان یک دستگاه بلندگو صدای فعالیت نورون را بخش می‌کرد. با جدا کردن فعالیت نورون به کمک دستگاه Window discriminator (WPI) از زمینه اوسیلوسکوپ و هدایت آن به کامپیوتر، داده‌ها که تعداد فرکانس نورون در واحد زمان می‌باشد در برنامه کامپیوتری PSTH ذخیره می‌شد.

آنالیز داده‌ها

بعد از تثبیت فعالیت نورون (min ۳۰-۲۰) فعالیت خودبه‌خودی نورون قبل و بعد از تزریق دارو به عنوان داده در نظر گرفته شد. بعد از

تزریق دارو فعالیت الکتریکی نورون تا بازگشت این فعالیت به حالت اولیه ادامه می‌یافت. تغییر فعالیت نورونی هسته PGi بعد از تزریق دارو به عنوان اثر دارو در نظر گرفته می‌شد (شکل ۳-۱).

داده‌ها بر اساس Mean±S.E.M در نظر گرفته شد و درصد تغییرات به کمک فرمول (میانگین قبل از تزریق/میانگین قبل از تزریق - میانگین بعد از تزریق) محاسبه گردید. مقایسه بین گروههای کنترل و معتاد به کمک Unpaired t-test انجام شد و P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

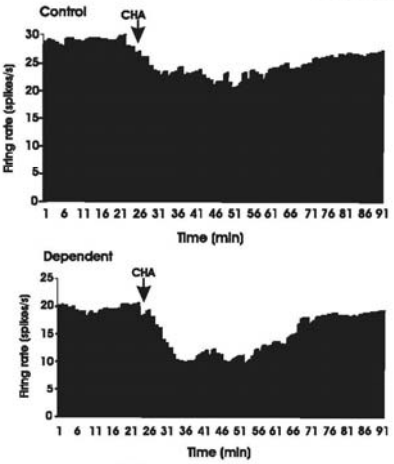
تایید بافت شناسی

در پایان هر آزمایش به دنبال تزریق بافر فرمالین-فسفات ۱۰درصد، سالین ۰/۹درصد بدرون قلب پرفیوز می‌شد. سپس مغز موشها جدا و پس از برش‌گیری به کمک پارافین (۱۰ میکرومتر) با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی می‌گردید. جایگاه ثبت الکتریکی به کمک رنگ‌دانه پوتنامین آبی موجود در داخل الکترود ثبت علامت‌گذاری می‌شد. نهایتاً جایگاههای ثبت با مقایسه با اطلس پاکزینوس و واتسون (۱۸) تایید می‌گردید. داده‌های گزارش شده از موشهایی است که محل ثبت آنها در هسته PGi تایید شده است.

یافته‌ها

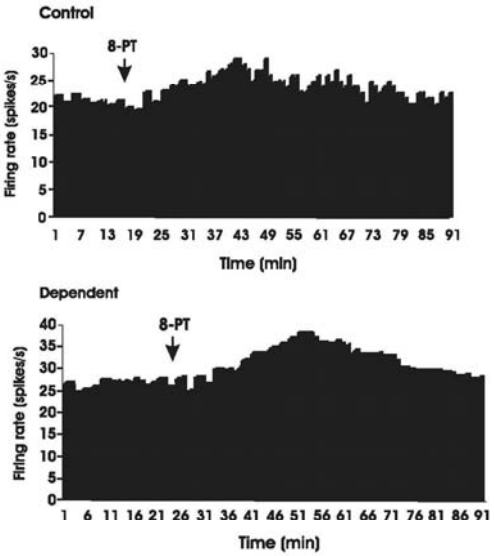
اثر سیکلوهگزیل آدنوزین (CHA) بر فعالیت پایه نورونهای هسته PGi

در شکل ۱ اثر CHA به عنوان آگونیست اختصاصی گیرنده A_1 آدنوزینی بر فعالیت نورونهای هسته PGi در گروههای کنترل و معتاد نشان داده شده است.

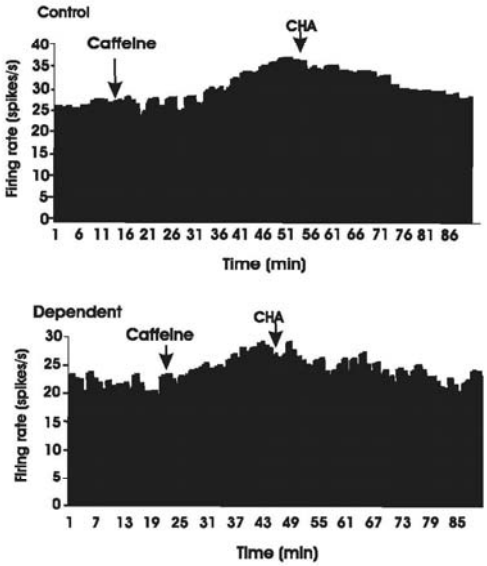


شکل ۱: الگوی فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi در دو گروه کنترل و معتاد، قبل و بعد از تزریق داخل هسته‌ای سیکلوهگزیل آدنوزین (۲۰۰ μM). به دنبال تزریق سیکلوهگزیل آدنوزین فعالیت این نورونها در دو گروه کنترل و معتاد کاهش یافته است. این کاهش فعالیت در گروه کنترل (۳/۱±۳۵/۲ ٪) به شکل معنی‌داری کمتر از گروه معتاد (۳/۵±۵۲/۵ ٪) بود (n=۱۲ در هر گروه، P<۰/۰۵).

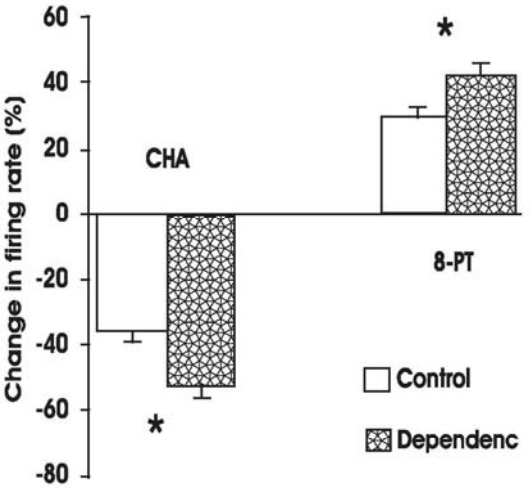
فعالیت نورونهای هسته PGi در گروههای کنترل و معتاد در اثر اعمال CHA کاهش معنی‌دار پیدا کرده است (P<۰/۵)، به طوری که این کاهش در گروه معتاد (۳/۴± ۵۲/۵ ٪) بارزتر و مشخص‌تر از گروه کنترل (۳/۱±۳۵/۲ ٪) می‌باشد (شکل ۴).



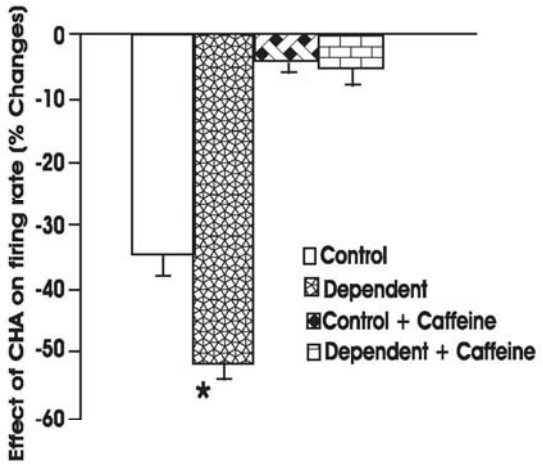
شکل ۲: الگوی فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi در دو گروه کنترل و معتاد، قبل و بعد از تزریق داخل صفاقی ۸-فنیل تئوفیلین (۱۰ mg/kg). تزریق این دارو سبب افزایش معنی‌دار فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi در گروه معتاد نسبت به گروه کنترل گردید (n=۱۲ در هر گروه، P<۰/۰۵).



شکل ۳: فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi، به دنبال تزریق سیکلوهگزیل آدنوزین در موشهایی که از قبل کافئین (۵۰ mg/kg; i.p.) را دریافت کرده‌اند. در این حالت تغییر معنی‌داری در فعالیت الکتریکی نورونها مشاهده نگردید (n=۱۲ در هر گروه، P<۰/۰۵).



شکل ۴: مقایسه اثر سیکلوهگزیل آدنوزین و ۸-فنیل تئوفیلین بر فعالیت الکتریکی پایه نورونهای هسته PGi. همان طور که ستونها نشان می‌دهند (Mean±S.E.M) فعالیت این نورونها به طور معنی داری توسط سیکلوهگزیل آدنوزین کاهش و به دنبال تزریق ۸-فنیل تئوفیلین افزایش یافته است (n=۱۲ در هر گروه، P<۰/۰۵).



شکل ۵: مقایسه اثر سیکلوهگزیل آدنوزین در موشهای پیش درمان شده با داروی کافئین (۵۰ mg/kg; i.p) در گروههای کنترل و معتاد. همان طور که شکل نشان می دهد (Mean±S.E.M) بلوک گیرنده های آدنوزین از تاثیر سیکلوهگزیل آدنوزین بر فعالیت الکتریکی نورونها جلوگیری کرده است (n=۱۲ در هر گروه، P<۰/۰۵).

اثر ۸-فنیل تئوفیلین (۸-PT) بر فعالیت نورونهای هسته PGi

به دنبال تزریق ۸-PT فعالیت پایه نورونهای هسته PGi در دو گروه کنترل و معتاد افزایش پیدا می کند (شکل ۲). همان‌طور که در شکل شماره ۴ نشان داده می‌شود این افزایش فعالیت در گروه وابسته (۲/۵±۳۹/۳ درصد) نسبت به گروه کنترل (۲/۱±۲۷/۲ درصد) معنی‌دارتر می‌باشد (P<۰/۵).

تاثیر CHA بر فعالیت نورونهای هسته PGi در موشهای درمان شده با کافئین

پس از بلوک گیرنده‌های آدنوزین به کمک کافئین (۵۰ mg/kg; i.p)، CHA در داخل هسته PGi تزریق می‌شد. همان طور که در شکل ۳ و ۵ نشان داده می‌شود CHA در این شرایط توانایی تغییر معنی‌دار فعالیت الکتریکی نورونهای هسته PGi را ندارد.

بحث

به منظور کاهش استرس حیوانات و تزریق مورفین، جهت معتاد کردن موشها، مورفین به آب آشامیدنی آنها اضافه شد. در این روش مصرف مورفین بر اساس نیاز حیوان بوده و تقریباً به وابستگی در انسان شباهت بیشتری دارد (۱۹).

نورونهای هسته PGi که در این مطالعه فعالیت الکتریکی آنها ثبت شده است بر طبق مشاهده Ennis و همکارانش (۲۰) دارای فرکانس فعالیت بالا و بر اساس گزارش Rasmussen و همکارانش (۳) مسئول وابستگی به مورفین است. در تحقیق حاضر اعمال آگونیست اختصاصی گیرنده A_1 آدنوزینی یعنی CHA به داخل هسته PGi سبب کاهش مشخص فعالیت الکتریکی نورونهای این هسته در موشهای وابسته به مورفین گردید.

در توجیه این نتیجه گزارشات متعددی در ارتباط متقابل دو سیستم آدنوزینی و اوپیوئیدی (۱۱، ۱۲) ارائه شده است. توانایی بروز رفتارهای سندرم ترک در موشهای وابسته به آنالوگهای آدنوزینی توسط آنتاگونیستهای اوپیوئیدی و همچنین بروز این رفتارها توسط آنتاگونیستهای آدنوزینی در موشهای معتاد به مورفین توسط Aley و همکارانش گزارش شده است (۲۱).

از طرفی کاهش فعالیت نورونهای هسته PGi در طی وابستگی و تنظیم افزایشی گیرنده های A_1 آدنوزینی در این دوره و از طرفی افزایش فعالیت این نورونها در طی سندرم ترک، پیشنهاد می کند که احتمالاً نتایج الکتروفیزیولوژیک با CHA مربوط به افزایش حساسیت یا تنظیم افزایشی گیرنده های A_1 در هسته PGi باشد.

به همین ترتیب افزایش معنی دار نورونهای هسته PGi در موشهای معتاد به دنبال تزریق آنتاگونیستهای اختصاصی گیرنده A_1 آدنوزینی، ۸-فنیل تئوفیلین هم احتمالاً به تغییر فعالیت گیرنده A_1 در هسته PGi مرتبط است.

در تایید نتایج ذکر شده آزمایشات ما با

CHA به دنبال بلوک گیرنده های آدنوزینی بوسیله کافئین و عدم تاثیر CHA در این حالت موید این نکته است که مهمترین گیرنده آدنوزینی درگیر در تغییر فعالیت الکتریکی هسته PGi در طی وابستگی و سندرم ترک گیرنده A_1 باشد.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که تغییر حساسیت گیرنده های A_1 آدنوزینی نورونهای هسته PGi در طی مصرف طولانی مورفین احتمالاً مسئول فعالیت پایین این نورونها در طی وابستگی و افزایش فعالیت این آنها در طی سندرم ترک است.

References

1. Rasmussen K, Beitner DB, Krystal JH, Aghajanian GK, Nestler EJ: Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological and biochemical correlates. J. Neurosci. 1990; 10: 2308-
2. Haghparast A, Semnanian S and Fathollahi Y: Morphine tolerance and dependence in the nucleus paragigantocellularis: Single unit recording study in vivo. Brain Res. 1998; 814: 71-77
3. 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: 346-350
4. Cedarbaum JM, Aghajanian GK: Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. J Comp Neurol 1978; 178: 1-6
5. Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M: Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retograde and antrograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin. Neuroscience. 1993, 65: 128-138
6. Ennis M, Aston-Jones G: Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. J. Neurosci. 1988; 8: 3644-3657
7. Akaoka H, Aston-Jones G: Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. J. Neurosci. 1991; 11: 3830-3839
8. Maldonado R, Koob GF: Destruction of the locus coeruleus decrease physical signs of opiate withdrawal. Brain Res 1993;605: 128-138
9. Punch LJ, Self DW, Nestler EJ, Taylor JR: Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors on microinfusion of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus coeruleus or periaqueductal gray. J Neurosci 1997; 17: 8520-8527
10. Dionyssopoulos T, Hope W, Coupar IM: Effect of adenosine analogues on the expression of opiate withdrawal in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 1992; 42: 201-206
11. Michalska E, Male D: Agonist and antagonists of adenosine receptors and morphine withdrawal syndrome in rats. Pol. J Pharmacol 1993; 45: 1-9
12. Zarrindast MR, Naghipour B, Roushan-Zamir F, Shafaghi B: Effect of adenosine receptor agents on the expression of morphine withdrawal in mice. Eur. J Pharmacol 1997; 369: 17-22
13. Salles KS, Colasanti BK, Craig CR, Thomas JA: Involvement of brain cyclic AMP in the acute and chronic effect of morphine in the rat. Pharmacol 1978; 17: 128-137
14. Ahlijanian MK, Takemori AE: Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine - tolerant and - dependent mice. J Pharmacol ExpTher 1986; 236: 615-620
15. Kaplan GB, Leite-Morris KA, Sears MT: Alteration of adenosine A1 receptors in morphine dependence. Brain Res. 1994; 657: 347-350
16. Khalili M, Semnanian S, Fathollahi Y: Caffeine increase paragigantocellularis neuronal firing rate and induces withdrawal signs in morphine-dependent rats. E J Pharmacol 2001; 412: 239-245
17. Bernstein MA, Welch SP: Effect of spinal versus supraspinal administration of cyclic nucleotide - dependent protein kinase inhibition on morphine tolerance in mice. Drug Alcohol Depend 1997; 41: 41-46
18. Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press Orlando:1986
19. Badavy AA, Evans CM: Production of tolerance and physical dependence in the rat by simple administration of morphine in drinking water. Br J Pharmacol 1982; 75: 485-491
20. Ennis M, Astone-Jones G: Two physiologically distinct population of neurons in the ventrolateral medulla innervate the locus coeruleus. Brain Res 1987; 425: 275-282

21. Aley KO, Green PG, Levine JD: Opioid and adenosine peripheral antinociception are subject to tolerance and withdrawal. J Neurosci.1995; 15: 8031-8038