

کاهش سطح گلوتامات در کورتکس و ناحیه کمری نخاع موش صحرایی: یک مکانیسم احتمالی اثر ماینوسایکلین در کاهش تحمل به اثرات ضددردی مورفین

اسماعیل ایزدپناه^۱، محبوب نعمتی^۲، محمد چرخ‌پور^۳، کامبیز حسن‌زاده^۴

۱- دکتری فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲- دانشیار شیمی مواد غذایی و آب شناسی پزشکی، گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- استادیار فارماکولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (مؤلف مسؤول)

تلفن: ۰۸۷۱-۶۱۳۱۴۰۱، kambizhassanzadeh@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: تجویز مزمن اپیوئیدها منجر به بروز تحمل به اثرات ضد درد می‌شود. با وجود تحقیقات فراوان در این زمینه، هنوز مکانیسم سلولی دقیق دخیل در تحمل و وابستگی به اپیوئیدها به خوبی روشن نشده است. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که پیام‌دهی گلوتاماترژیک و مسیر نیتریک اکساید - NMDA (N-methyl D-aspartate) در تحمل القاء شده توسط مورفین نقش مهمی ایفا می‌کنند. بنابراین هدف عمده این مطالعه ارزیابی اثرات تزریق داخل بطن مغزی (ICV) ماینوسایکلین (یک تتراسایکلین نسل دوم) بر تحمل و افزایش سطح گلوتامات متعاقب مصرف مورفین در کورتکس مغز و ناحیه کمری نخاع رت بود. **روش بررسی:** گروه‌های مختلف مورد مطالعه یا مورفین (داخل صفاقی) به همراه آب مقطر (داخل بطن مغزی) یا مورفین به اضافه دوزهای مختلف ماینوسایکلین (داخل بطن مغزی) یا ماینوسایکلین را به تنهایی در هر روز دریافت می‌کردند. میزان احساس درد با استفاده از دستگاه Hotplate مورد بررسی قرار می‌گرفت. غلظت گلوتامات در هر دو ناحیه به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاکی از آن بود که تزریق داخل بطن مغزی ماینوسایکلین، تحمل القاء شده توسط مورفین را در دوزهای $\mu\text{l/rat}$ $240, 120, 60$ و سطح گلوتامات را در قشر مغز در دوزهای $\mu\text{g}/10 \mu\text{l/rat}$ $240, 120, 60$ و در ناحیه کمری نخاع در دوزهای $\mu\text{g}/10 \mu\text{l/rat}$ $240, 120$ کاهش داد.

نتیجه‌گیری: تجویز مرکزی ماینوسایکلین، افزایش گلوتامات القاء شده توسط مورفین در کورتکس و ناحیه کمری نخاع را کاهش می‌دهد. این اثر می‌تواند یک مکانیسم احتمالی برای تأثیر ماینوسایکلین روی تحمل القاء شده بوسیله مورفین باشد.

کلیدواژه‌ها: مورفین، ماینوسایکلین، گلوتامات، تحمل، داخل بطن مغزی

وصول مقاله: ۸۹/۴/۱۵ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۶/۱۵ پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۵

مقدمه

اپیوئیدها به عنوان یکی از بهترین گروه‌های دارویی جهت کاهش دردهای شدید حاد و مزمن همچنان به طور وسیع به کار گرفته می‌شوند. اما مشکل عمده‌ای که برای مصرف طولانی مدت اپیوئیدها وجود دارد مسأله بروز تحمل و به دنبال آن بروز وابستگی به آنها می‌باشد. وابستگی و تحمل به مورفین خصوصاً اثرات ضددردی مورفین یکی از مشکلات و عوامل محدود کننده مصرف این داروها در بیماران مبتلا به دردهای حاد و

مزمّن است. مطالعات مختلف در زمینه داروها و عواملی که بتوانند تحمل و وابستگی به اپیوئیدها را کاهش دهند، صورت گرفته است و همگی بیان کننده این هستند که جهت کاهش این پدیده‌ها شناخت مکانیسم‌های دخیل در تحمل و وابستگی ضروری است (۱ و ۲).

یکی از مهمترین شاخه‌های مطالعه در نوروفارماکولوژی بررسی مکانیسم‌های بروز تحمل به اپیوئیدها و یافتن راه‌هایی برای جلوگیری و یا به تعویق انداختن آن می‌باشد که در صورت توانایی جلوگیری از بروز این پدیده، کاربرد کلینیکی این داروها افزایش خواهد یافت. بطور قطع از بین مکانیسم‌های درگیر در پدیده تحمل به ترکیبات اپیوئیدی، سیستم نوروترانسمیتری گلوتامات، نیتریک اکساید و گیرنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی خصوصاً گیرنده‌های NMDA از جایگاه مهمی برخوردارند (۶-۳). فعال شدن گیرنده‌های اپیوئیدی منجر به ورود کلسیم به داخل سلول، افزایش فعالیت نیتریک اکساید سنتاز (NOS) و افزایش تولید نیتریک اکساید (NO) می‌شود. نیتریک اکساید منجر به افزایش آزاد شدن گلوتامات از نورون‌های پیش سیناپسی می‌شود و این افزایش سطح گلوتامات خود منجر به سمیت در سلول‌های عصبی می‌گردد (۹-۷ و ۳).

آزاد شدن پس سیناپسی NO در پی فعال شدن گیرنده NMDA آغازگر آزاد شدن گلوتامات از نورون پیش سیناپسی است. یعنی NO به عنوان یک ناقل عصبی به صورت فیدبک مثبت منجر به آزاد سازی بیشتر گلوتامات می‌شود (۸ و ۷). افزایش تولید نیتریک اکساید در بدن از طریق مکانیسم‌های زیر و نیز به واسطه افزایش Ca^{2+} داخل سلولی سبب افزایش تحمل و وابستگی به اپیوئیدها می‌شود. این مکانیسم‌ها شامل: آزاد شدن

گلوتامات از قسمت پیش سیناپسی (۷ و ۳)، افزایش گوانوزین مونوفسفات حلقوی (cGMP) (۷ و ۳)، فعال سازی پروتئین کیناز C (PKC) (۵) و تولید پراکسی نیتريت (ONOO-) می‌باشند (۷).

نیتریک اکساید تولید شده از طریق مکانیسم‌های فوق‌الذکر در نهایت منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی و افزایش تحریک پذیری سلول و در نتیجه افزایش حساسیت به درد، اینترنالیزاسیون و تنظیم کاهشی گیرنده‌های اپیوئیدی، فسفریلاسیون برخی پروتئین‌های کلیدی و مهار پاسخ‌های فیزیولوژیک شده که در نهایت همه این عوامل منجر به کاهش اثرگذاری مورفین بر سلول شده و تحمل و وابستگی به مورفین را افزایش می‌دهد (۸ و ۷).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ماینوسایکلین و مشتقات نیمه صناعی دیگر تتراسایکلین، باعث ایجاد اثرات نوروپروتکتیو در مقابل ایسکمی مغزی در موش صحرایی شده‌اند (۱۱ و ۱۰). در این مطالعات اثر نوروپروتکتیو ماینوسایکلین با کاهش فعالیت NOS همراه بوده است (۱۲). از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که ماینوسایکلین می‌تواند توسط بلوک کانال‌های کلسیم ولتاژی، آزاد شدن گلوتامات و افزایش سطح یون کلسیم را در نورون‌های هیپوکامپ کاهش دهد (۱۳).

با توجه به مطالب فوق در رابطه با ماینوسایکلین، در مطالعه حاضر اثر این دارو بر تحمل به اثرات ضددردی و افزایش گلوتامات ناشی از مصرف مورفین در دو ناحیه کورتکس و نخاع رت مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی حیوانات

مطالعه حاضر به صورت تجربی و در ۱۳ گروه (شامل ۱۰۶ سر) انجام شد. در این مطالعه موش‌های صحرایی (رت) نر نژاد ویستار (مؤسسه رازی، تهران، ایران) در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. آنها در یک اتاق در درجه حرارت کنترل شده 25 ± 2 درجه سانتیگراد با دوره‌های تاریکی روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شده و به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. تمام آزمایشات براساس پروتکل راهنمای مراقبت و کاربرد حیوانات آزمایشگاهی (نشریه شماره ۸۵۲۳ مؤسسه ملی بهداشت، تجدید نظر شده در سال ۱۹۸۵) انجام شد و مورد تایید کمیته اخلاق در تحقیق دانشگاه علوم پزشکی تبریز قرار گرفته‌اند.

گروه‌های مورد مطالعه

این مطالعه در دو بخش ارزیابی رفتاری و اندازه‌گیری سطح گلوتامات در نواحی کورتکس و نخاع انجام شد.

گروه‌های رفتاری (۸ سر در هر گروه) به قرار زیر بود و آزمایشات تا آنجا ادامه می‌یافت که تفاوت معنی‌داری در اثر ضد دردی بین گروه‌های درمانی و گروه سالین در هر روز وجود نداشته باشد.

- گروه دریافت‌کننده سالین به صورت داخل صفاقی (جهت مقایسه با گروه دریافت‌کننده مورفین)
- گروه دریافت‌کننده سالین به صورت داخل بطن مغزی (جهت مقایسه با اثر ضد دردی مؤثرترین دوز ماینوسایکلین)

- گروه دریافت‌کننده مورفین به صورت داخل صفاقی + آب مقطر به صورت داخل بطن مغزی (گروه کنترل)

- گروه‌های دریافت‌کننده مورفین به صورت داخل صفاقی + دوزهای مختلف ماینوسایکلین ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$)
(۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰) به صورت داخل بطن مغزی.

- گروه دریافت‌کننده ماینوسایکلین ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$)
(۱۲۰) به تنهایی به صورت داخل بطن مغزی (جهت ارزیابی اثر ضد دردی مؤثرترین دوز ماینوسایکلین در کاهش تحمل مورفین).

جهت ارزیابی سطح گلوتامات در نواحی کورتکس و نخاع در گروه‌های مورد مطالعه (۶ سر در هر گروه) ۲ ساعت بعد از تزریق حامل یا دارو در روز نهم (یک روز بعد از کامل شدن تحمل در گروه کنترل)، نمونه‌های بافتی جدا گردید.

گروه‌ها جهت ارزیابی سطح گلوتامات به قرار زیر بودند:

- گروه دریافت‌کننده سالین به صورت داخل صفاقی + آب مقطر به صورت داخل بطن مغزی (جهت مقایسه با گروه دریافت‌کننده مورفین)

- گروه دریافت‌کننده مورفین به صورت داخل صفاقی + آب مقطر به صورت داخل بطن مغزی (گروه کنترل)

- گروه‌های دریافت‌کننده مورفین به صورت داخل صفاقی + دوزهای مختلف ماینوسایکلین ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$)
(۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰) به صورت داخل بطن مغزی.

- گروه دریافت‌کننده ماینوسایکلین ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$)
(۱۲۰) به تنهایی به صورت داخل بطن مغزی.

کانال‌گذاری داخل بطن مغزی (ICV)

موش‌ها توسط سدیم پنتوباریتال (مرکب آلمان) (50 mg/kg , IP) بیهوش شدند و تحت عمل جراحی یک سرسوزن (gauge: ۲۳) در داخل بطن جانبی مغز به مختصات (۰/۸ - میلی‌متر خلفی، ۱/۳ - میلی‌متر لاترال و

۳/۵ میلی متر شکمی به نسبت نقطه برگما) بر اساس نقشه پاکسینوس کار گذاشته شد (۱۴). سپس یک سرسوزن دندانپزشکی (gauge: ۳۰) در داخل کانال راهنما (سرسوزن قبلی) قرار داده شد تا از آلودگی و گرفتگی کانال جلوگیری شود. بعد از جراحی و قبل از شروع آزمایشات یک دوره بهبودی ۷ روزه برای هر حیوان در نظر گرفته شد. طی دوره بهبودی حیوانات به محیط آزمایش نظیر انتقال به اتاق آزمایش، حمل کردن، وزن کشی و قرار دادن در روی صفحه دستگاه Hotplate بمدت یک دقیقه، عادت داده شدند. و در همه گروه‌ها، آزمایش بعد از یک دوره بهبود ۷ روزه شروع شد.

تأیید صحت محل کانال

در پایان همه آزمایشات رفتاری، ۵ µl محلول متیلن بلو به داخل کانال تزریق گردید و حیوانات با دوز بالای اتر و بدنبال آن جدا کردن سر کشته شدند. مغز هر حیوان خارج گردیده و برش داده شد تا جایگزینی کانال‌ها و توزیع متیلن بلو در حفره‌های بطن مغز تأیید گردد. فقط اطلاعات مربوط به حیواناتی که توزیع یکنواخت متیلن بلو در حفره‌ها را نشان دادند، برای تحلیل آماری مورد استفاده قرار گرفت. روی هم رفته نتایج مربوط به شش حیوان نادیده گرفته شد زیرا که جایگزینی کانال راهنما در آنها مورد تأیید قرار نگرفت.

درمان دارویی

سولفات مورفین (سیگما آلد ریچ، آلمان) روزانه ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش در آب دوبار تقطیر حل شده و با استفاده از سرنگ انسولین تزریق داخل صفاقی صورت می گرفت. نرمال سالین یا ماینوسایکلین (۲۴۰ µg/۱۰, ۶۰, ۱۲۰) در نرمال سالین ۰/۹٪ حل شده و با استفاده از سرنگ همپلتون تزریق داخل بطن مغزی

صورت می گرفت. حجم تزریق ۱۰ µl و با سرعت دقیقه/۱۰ µl برای هر موش انجام می شد.

تشخیص احساس درد

احساس درد با استفاده از دستگاه hotplate اندازه گیری می شد. اثر دردزایی با استفاده از تست hotplate وقتی ثبت می گردید که موش پای عقب خود را می لیسید. یک حداکثر تأخیر زمانی ۴۰ ثانیه‌ای برای جلوگیری از آسیب بافتی در نظر گرفته می شد. اثر دردزایی تست hotplate بعنوان درصد حداکثر اثر ممکن (%MPE) با استفاده از رابطه زیر بیان گردید.

$$MPE = [(TL - BL) / \text{Cut-off Time} - BL] \times 100\%$$

BL: Base line

TL: Latency time

Base line برای هر موش یک بار در روز، قبل از تزریق روزانه مورفین تعیین می گردید. بعد از ۲۰ دقیقه داروها تزریق می شدند و Latency time، ۱۰ دقیقه بعد از تزریق دارو یا حامل (۳۰ دقیقه بعد از تزریق مورفین) اندازه گیری شده سپس %MPE برای آن روز محاسبه می شد. آزمایشات تا آنجا ادامه می یافت که تفاوت معنی داری در %MPE بین گروه‌های درمانی و گروه سالین در هر روز وجود نداشته باشد.

ارزیابی اثرات کلی تسکین درد

برای ارزیابی اثرات کلی تسکین درد و مقایسه اثرات آزمون رفتاری، سطح زیر منحنی (AUC) برای منحنی %MPE محاسبه گردید. به منظور محاسبه AUC از قانون دوزنقه استفاده شد.

آماده سازی بافت

برای اندازه گیری غلظت گلوتامات، همه حیوانات (۶ سر در هر گروه) تحت رژیم درمانی یکسان با گروه‌های رفتاری قرار گرفتند. در روز نهم (یک روز بعد از کامل شدن تحمل در گروه کنترل)، ۲ ساعت بعد

نمونه‌ها با پیک‌های استاندارد محاسبه و مقادیر به صورت پیکومول بر ۱۰۰ میلی گرم پروتئین بیان شدند (۱۵).

آنالیز آماری

داده‌های بخش رفتاری به صورت میانگین $\pm$ SEM/MPE٪ برای ۸ موش در هر گروه بیان شده است. به منظور یافتن روز کامل شدن تحمل و برای مقایسه MPE٪ بین گروه سالین و گروه‌های درمانی در هر روز از Student's t-test بهره گرفته شد. آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و بدنبال آن آزمون تعقیبی Tukey's برای تحلیل آماری در مقایسه چندگانه مورد استفاده قرار گرفت. در همه تحلیل‌ها مقادیر $p < ۰/۰۵$ و $p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۰۱$ حاکی از تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین برای آن روز است. داده‌های AUC و نتایج بدست آمده از HPLC با استفاده از تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

بررسی اثر ماینوسایکلین بر تحمل به اثرات ضددردی مورفین

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد؛ روز کامل شدن تحمل برای گروه کنترل، روز ۸ می‌باشد. ماینوسایکلین در دوزهای (۶۰، ۱۲۰ $\mu\text{g}/۱۰ \mu\text{l}$) توانسته است روز کامل شدن تحمل را به مدت ۴ روز به تعویق بیندازد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۱$). در مورد دوز (۲۴۰ $\mu\text{g}/۱۰ \mu\text{l}$) ماینوسایکلین روز کامل شدن تحمل را به طور معنی‌داری از روز ۸ به روز ۱۳ به تعویق انداخت ($p < ۰/۰۰۱$).

از تزریق حامل یا دارو، حیوانات با پنتوباریتال کشته شدند و کورتکس و ناحیه کمری نخاع سریعاً جدا گردید.

آنالیز نوروترانسمیتر گلوتامات با HPLC

برای بررسی نوروترانسمیتر گلوتامات از HPLC استفاده شد. نمونه‌های بافتی هموژنیزه شده و تست تعیین میزان پروتئین انجام شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ شتاب ثقل سانتریفیوژ شد. دستگاه HPLC مدل KNAUER ساخت کشور آلمان بود. سیستم شامل یک پمپ چهار واحدی، یک دتکتور فلورسنت (FLD) RF-551 و یک نمونه‌گیر اتوماتیک (Spark, Triatlon) بود که بوسیله نرم افزار Chromgate کنترل می‌شد. ستون آنالیز استفاده شده از نوع Hypersil ODS (۴×۲۵۰ میلی‌متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتری بود) با فاز معکوس در دمای اطاق بود. برای جدایی کروماتوگرافیک، فاز متحرک از ۸٪ استونیتریل در ۱۲/۵ میلی مولار بافر فسفات با pH=۷/۲، با یک مشتق اسید آمینه گلوتامات (O-phthalaldehyde) تشکیل شده بود که با یک جریان گرادیانت یک میلی‌لیتر بر دقیقه به مدت ۸ دقیقه و ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه شسته می‌شد. ردیابی با طول موج‌های ۳۳۰ و ۴۶۰ نانومتر به ترتیب به عنوان طول موج‌های تحریک و نشر انجام شد. اسید گلوتامیک به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های ۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ۶ و ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید گلوتامیک به دستگاه HPLC تزریق شد و منحنی کالیبراسیون رسم گردید. محلول ۲/۵٪ مایع رویی در آب مقطر برای جداسازی و تعیین گلوتامات استفاده شد. میزان گلوتامات از مقایسه پیک‌های بدست آمده از

بررسی اثر ضددردی ماینوسایکلین

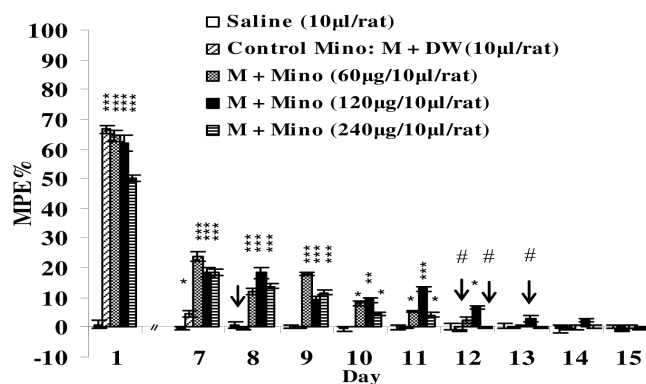
همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌گردد ماینوسایکلین با مؤثرترین دوز در کاهش تحمل به اثرات ضددردی مورفین ($120 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$)، اثر ضددردی معنی‌داری به لحاظ آماری نداشت.

ارزیابی اثر ضد دردی تام مورفین در گروه کنترل و گروه‌های درمانی

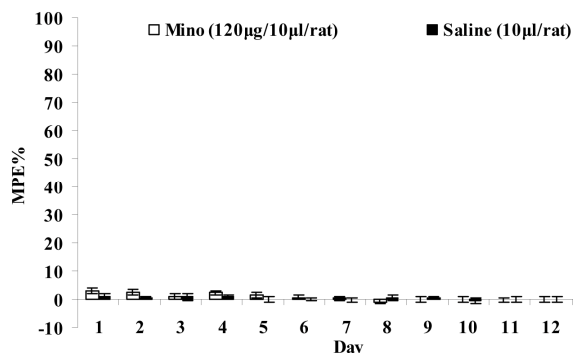
همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است سطح زیر منحنی (AUC) بیشترین اثر ممکن (MPE%) برای هر گروه در مدت ۱۳ روز محاسبه شده است. تفاوت بین گروه‌های درمانی ماینوسایکلین با گروه کنترل (سالین+مورفین) با آنالیز آماری ANOVA یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey's بررسی شد. نتایج نشان دادند که سطح زیر منحنی MPE% در گروه کنترل با گروه‌های درمانی ماینوسایکلین ($60, 120, 240 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$) اختلاف معنی‌داری ($p < 0.001$) دارد که نشان دهنده افزایش اثرات ضد دردی مورفین در تجویز همزمان با دوزهای مختلف ماینوسایکلین است.

ارزیابی اثر ماینوسایکلین بر غلظت گلوتامات در کورتکس و ناحیه کمری نخاع حیوانات تحت درمان با مورفین

نتایج جدول ۲ و ۳ نشان داد که تجویز مورفین (10 mg/kg , ip) به مدت ۹ روز به طور معنی‌داری منجر به افزایش غلظت گلوتامات در کورتکس و ناحیه کمری نخاع موش صحرایی شد ($p < 0.001$). همچنین نتایج نشان دادند که تزریق داخل بطن مغزی دوزهای مختلف ماینوسایکلین ($60, 120, 240 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$) به همراه مورفین از افزایش غلظت گلوتامات بواسطه مورفین در کورتکس مغز جلوگیری نموده که در مقایسه با گروه کنترل (سالین+مورفین) تفاوت معنی‌داری ($p < 0.001$) نشان داد. اما ماینوسایکلین فقط در دوز ($120, 240 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$) توانست از افزایش غلظت گلوتامات در ناحیه کمری نخاع ناشی از مورفین جلوگیری نماید.



نمودار ۱. اثر ضد دردی تجویز روزانه مورفین (10 میلی گرم بر کیلوگرم به صورت IP) به همراه آب مقطر (10 میکرولیتر ICV) یا نرمال سالین (10 میکرولیتر ICV). تحمل به اثر ضد دردی مورفین در روز هشتم زمانی که بین حداکثر اثر ممکن (MPE%) در گروه‌های کنترل و سالین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، کامل شد. هر ستون نشان دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار MPE% در ۸ رت می‌باشد. در همه تحلیل‌ها مقادیر p کمتر از 0.05 معنی‌دار در نظر گرفته می‌شد. $p < 0.05$ و $p < 0.01$ و $p < 0.001$ حاکی از تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین برای آن روز است. $p < 0.001$ # در مقایسه با گروه کنترل (مورفین + آب مقطر) می‌باشد. فلش نشان دهنده روز کامل شدن تحمل می‌باشد. Mino=minocycline, DW=distilled water, M=morphine.



نمودار ۲: مقایسه اثر ضد درد موثرترین دوز ماینوسایکلین (۱۲۰ µg/۱۰ µl/rat) در کاهش تحمل به اثرات ضد درد مورفین نسبت به سالین (۱۰ µl/rat). هر ستون بیانگر میانگین $\pm$ SEM برای ۸ موش صحرایی می باشد. Mino = Minocycline

جدول ۱.۱ اثر ضد درد کلی مورفین در گروه های کنترل و درمان در طی ۱۳ روز

درمان	سطح زیر منحنی (AUC)	SEM
مورفین + آب مقطر	۱۷۷/۵	۴/۲
مورفین + ماینوسایکلین (۶۰ µg/۱۰ µl/rat)	*۶۶۴/۷	۷/۳
مورفین + ماینوسایکلین (۱۲۰ µg/۱۰ µl/rat)	*۶۸۹/۳	۲/۶
مورفین + ماینوسایکلین (۲۴۰ µg/۱۰ µl/rat)	*۶۴۳/۷	۲/۹

ناحیه زیر منحنی (AUC) نمودار %MPE برای هر گروه به مدت ۱۳ روز محاسبه شد. $P < ۰/۰۵$ در همه گروه ها معنی دار در نظر گرفته شد. $p < ۰/۰۵$ * نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل (مورفین + آب مقطر)

جدول ۲: مقایسه غلظت گلو تامات در ناحیه کورتکس موش صحرایی در مصرف رژیم های درمانی مختلف

غلظت گلو تامات (ng/g protein)	غلظت گلو تامات (ng/g protein)
(cv) ۱۰۰	(cv) ۱۰۰
* ۱۰۰	(cv) ۱۰۰
* ۱۰۰	(cv) ۱۰۰
* ۱۰۰	(cv) ۱۰۰
* ۱۰۰	(cv) ۱۰۰
* ۱۰۰	(cv) ۱۰۰

هر داده نمایانگر میانگین $\pm$ SEM برای ۶ موش است. به منظور ارزیابی اختلاف معنی دار آماری از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. $p < ۰/۰۰۱$ *** در مقایسه با گروه کنترل (مورفین + آب مقطر) می باشد.

جدول ۳: مقایسه غلظت گلوتامات در ناحیه کمری نخاع موش صحرایی در مصرف رژیمهای درمانی مختلف

($\mu\text{mol} / 100 \text{ mg protein}$)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$

هر داده نمایانگر میانگین² SEM برای ۶ موش است. به منظور ارزیابی اختلاف معنی دار آماری از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد.

مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. $p < 0/01$ و $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل (مورفین + آب مقطر) می باشد.

بحث

نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان دادند که تزریق داخل بطن مغزی ماینوسایکلین از افزایش گلوتامات القاء شده توسط مورفین جلوگیری می کند. این اثر به نظر می رسد در کاهش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین ناشی از ماینوسایکلین یک نقش کلیدی داشته باشد.

مطالعات پیشین نشان داده اند که مصرف مزمن اپیوئیدها منجر به تحمل به اثرات ضد دردی می شود و نیاز به افزایش دوز، برای ایجاد همان اثرات ضد دردی قبلی را ایجاد می کند. مکانیسم های نورویولوژیک تحمل به اپیوئیدها بسیار پیچیده و تا حدودی ناشناخته اند. شواهد نشان داده اند که رسپتورهای گلوتامات (NMDA) در پلاستیسیته ناشی از مصرف مزمن اپیوئیدها نقش دارند (۱۹-۱۶). این نظریه توسط Trujillo و همکاران پیشنهاد شد. آنها نشان دادند که آنتاگونیست های رسپتورهای NMDA تحمل به اثرات ضد دردی مورفین را کاهش می دهند. نتایج مطالعات رفتاری ما و دیگران نشان می دهند که دسته وسیعی از

آنتاگونیست های رسپتورهای NMDA از تحمل به اثرات ضد دردی مورفین پیشگیری می کنند (۲۲-۱۶). مطالعات پیشین نشان داده اند که فعال شدن رسپتورهای NMDA منجر به ورود کلسیم به داخل سلول و افزایش غلظت Ca^{2+} داخل سلولی می شود که خود منجر به اثرات متعددی شامل: تسهیل فعالیت کلسیم کالمودولین کیناز II (CaMkII) (۲۳)، تنظیم فیدبک مثبت فعالیت پروتئین کیناز C (PKC) (۱۹) و فعال شدن نیتریک اکساید سنتاز (NOS) می شود (۵۶). نیتریک اکساید با افزایش آزاد سازی گلوتامات از نورون های پیش سیناپسی و همچنین مهار ترانسپورترهای گلوتامات سبب القاء سمیت سلولی می گردد.

ماینوسایکلین مشتق نیمه صناعی تتراسایکلین است که اثرات نوروپروتکتیو قابل ملاحظه ای در آسیب های نورونی در مدل های حیوانی نشان داده است (۲۷-۲۴) و (۱۲) مطالعات نشان داده اند که ماینوسایکلین دارای اثرات متعددی می باشد که شامل: کاهش فعالیت NOS و ایجاد اثرات نوروپروتکتیو (۱۲)، تأثیرات نوروپروتکتیو به واسطه دخالت این دارو در مسیرهای

داخل سلولی از جمله اثرات آنتی اکسیدانی (۲۸)، اثرات بلوگری روی فاکتورها و پاسخ‌های التهابی (۲۹) و مهار آزادسازی فاکتورهای تسهیل کننده آپوپتوزیس مثل Bax و Bak و Bid و ... از سیتوکروم C و غشاء میتوکندری و در نتیجه جلوگیری از اثرات مهاری این فاکتورها روی BCL-2 و در نتیجه افزایش بیان BCL-2 و جلوگیری از آپوپتوزیس است (۳۰).

نتایج مطالعات ما نشان دادند که مصرف مزمن مورفین به مدت ۸ روز سبب بروز تحمل به اثرات ضد دردی آن می‌شود. ماینوسایکلین ($10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$) توانست تحمل به اثرات ضد دردی مورفین را به مدت ۵ روز و در دوزهای ($60, 240 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$) تحمل به اثرات ضد دردی را از روز ۸ به روز ۱۲ به تعویق بیندازد. از طرفی اثرات تام ضد دردی مورفین (سطح زیر منحنی MPE) به طور معنی‌داری در گروه‌های درمانی افزایش پیدا کرد. اگرچه اختلاف معنی‌داری بین اثر دوزهای مختلف ماینوسایکلین وجود نداشت، دوز $120 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$ مؤثرترین دوز در کاهش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین بود.

در بخش دیگری از نتایج مشاهده شد که تجویز دوزهای مختلف ماینوسایکلین به تنهایی اثرات ضد دردی معنی‌داری ندارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر ماینوسایکلین در کاهش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین به خاطر اثرات ضد دردی خود ماینوسایکلین نمی‌باشد. در تأیید نتایج حاصل از تأثیر ماینوسایکلین در مطالعه اخیر، Mika و همکاران نشان داده‌اند که تجویز سیستمیک ماینوسایکلین سبب کاهش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین می‌شود. آنها مکانیسم اثر ماینوسایکلین را به کاهش فعالیت میکروگلیاها ارتباط دادند.

از طرفی مشخص شده است که پایانه‌های گلوتاماترژیک در نواحی وسیعی از CNS از جمله کورتکس مغز، هیپوکامپوس، آمیگدال، تالاموس و هیپوتالاموس، مخچه، هسته زیتونی تحتانی و نخاع یافت می‌شوند و گلوتامات یک نوروترانسمیتر تحریکی مهم CNS است که نقش‌های مهمی در فرآیندهای عصبی همچون انتقال سریع سیناپسی و پلاستی سیتی نورونی دارد. سیگنالینگ گلوتاماترژیک نه تنها در CNS بلکه در PNS و بافت‌های غیر عصبی هم به اثبات رسیده است (۳۱). همچنین مشخص شده است که فعال شدن مکرر یا مداوم کانال‌های دریچه‌دار گلوتاماتی ممکن است باعث دژنراسیون نورونی در بیماریهای نورودژنراتیو، سکتة مغزی و صرع شود. گلوتامات و اسیدهای آمینه مرتبط با آن، عمده ترین نوروترانسمیترهای تحریکی در مغز هستند که بوسیله حدود ۴۰٪ سیناپسها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۲). بنابراین هر عاملی که میزان گلوتامات را به عنوان یک نوروترانسمیتر مهم در نواحی فوق تغییر دهد، می‌تواند در روندهای مختلف رفتاری تأثیر داشته باشد.

بررسی‌های اخیر به روشنی بیان می‌کنند که ماینوسایکلین آزاد سازی گلوتامات را در ناحیه هیپوکامپ مهار می‌کند و به تبع آن سطح Ca^{2+} و تحریک نورون‌های تحت مطالعه کم شده و از مرگ سلولی به واسطه افزایش Ca^{2+} جلوگیری می‌کند. این کاهش تحریک سلولی به همراه کاهش آزادسازی گلوتامات توجه مناسبی برای اثرات سیتوپروتکتیو ماینوسایکلین می‌باشد (۳۳).

در بخش دیگری از مطالعه، نشان داده شد که مصرف مزمن مورفین، سطح گلوتامات در کورتکس و ناحیه کمری نخاع را افزایش می‌دهد. این نتایج با

مطالعات دیگری نشان داده‌اند که فعال شدن گیرنده‌های NMDA باعث فعال شدن سلول‌های میکروگلیال می‌شود که این سلول‌ها در مرگ سلولی دخالت دارند و ماینوسایکلین با مهار تکثیر سلول‌های میکروگلیال و اثرات ضد التهابی که دارد، از اثر سیتوتوکسیک فعال شدن NMDA جلوگیری می‌کند (۱۲).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق داخل بطن مغزی دوزهای مختلف ماینوسایکلین موجب کاهش تحمل به اثرات ضددردی مورفین می‌شود و مکانیسم آن را می‌توان به تأثیر ماینوسایکلین بر غلظت گلوتامات در نواحی مختلف CNS از جمله کورتکس و نخاع نسبت داد.

تشکر و قدردانی

این طرح مصوب مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد و نویسندگان مقاله بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسؤولین این مرکز اعلام می‌دارند.

یافته‌های حاصل از مطالعه قبلی ما که در آن تجویز مورفین به مدت ۸ روز سطح گلوتامات را در نواحی فوق افزایش داده بود، هم خوانی دارد (۳۴).

در مطالعه حاضر دوزهای مختلف ماینوسایکلین ($240 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$, 120 , 60) به همراه مورفین از افزایش غلظت گلوتامات بواسطه مورفین در کورتکس جلوگیری کرده و سطح گلوتامات در این ناحیه را به طور معنی‌داری کاهش داد. هر چند که غلظت تام گلوتامات در بافت متناسب با میزان نوروتوکسیسیته القاء شده به واسطه آن نیست، اما نتایج مطالعات ما مؤید یافته‌های پیشین (۳۷-۳۵ و ۱۹-۱۶) که نشان داده بودند، مورفین سبب افزایش غلظت گلوتامات در CNS می‌شود، می‌باشد.

در بخش دیگری از مطالعه، مشاهده شد که ماینوسایکلین ($240 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{rat}$, 120) به همراه مورفین از افزایش غلظت گلوتامات بواسطه مورفین در ناحیه کمری نخاع جلوگیری می‌کند. تفاوت تأثیر دوزهای مختلف ماینوسایکلین در کورتکس و نخاع، احتمالاً به علت موقعیت این دو ناحیه نسبت به محل تزریق می‌باشد. چرا که در تزریق ICV مقادیر کمتری از دارو به نخاع نسبت به کورتکس رسیده است.

References

1. Mayer Dj, Mao J. Mechanisms of opioid tolerance current view of cellular mechanisms. Pain Forum 1999; 8: 14-18.
2. Leonard AS, Hell jW. Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. J. Biology Chem 1997; 272: 12107-12115.
3. Wei-Mng Lue, Mie-Tsu Su, Wei-Bin Lin, Pao-Luh Tao. The role of the nitric oxide in the development of morphine tolerance in rat hippocampal slices. European Journal of Pharmacology 1999; 383: 129-135.
4. Montague PR, Gancayco CD, Winn M J, Marchase RB, Friedlander M J. Role of NO production in NMDA receptor mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. Sciences 1994; 263-273.
5. Pasternak GW, Kolesnikov YA, Babey AM. Perspectives on the N-Methyl-D-spartate/ Nitric Oxide Cascade and Opioid Tolerance. Neuropsychopharmacology 1995; 13:309-313.
6. Eri L.Heinzen, Early M.Pollack. Pharmacodynamics of morphine-induced neuronal Nitric Oxide production and antinociceptive tolerance development. Brain Research 2004; 1023: 175-184.

7. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology 9th ed. Mc Growhill: New York 2004. p: 403-410,626-647.
8. Adams ML, Kalicki JM, Meyer ER, Cicero TJ. Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by nitric oxide synthases inhibitor, N-nitro-L-Arginine methyl ester. *Life Sciences* 1993; 52:245-249.
9. Cha EY, Harris JR. Nitroglycerin inhibits the development of morphine tolerance and dependence in rats. *Pharmacology. Biochemistry and Behavior* 2003; 74:551-557.
10. Yrja N J, Keina R n, Pellikka M, Kfelt T H, Koistinaho J. Etracyclines inhibit microglia activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Aca Sciences* 1998; 95:157-169.
11. Yrja NJ, Tikka, Keina Nen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sciences* 1999; 96:13496-13500.
12. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-Methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting, microglia. *J Immunology* 2001; 166: 7527-7533.
13. González JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernandez-Gomez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandía L, and et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2007 Nov; 26: 2481-95.
14. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. Academic Press: London, 1998.
15. Nemati M, Oveisi M R, Abdollahi H and Sabzevari O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34: 485-492.
16. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 1991; 251:85-7.
17. Trujillo KA. Effects of non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on opiate tolerance and physical dependence. *Neuropsychopharmacol* 1995; 13: 301-7.
18. Trujillo KA. The neurobiology of opiate tolerance, dependence and sensitization: Mechanisms of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *Neurotox Res* 2002; 4: 373-391.
19. Mao J. NMDA and opioid receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res Rev* 1999; 30: 289-304.
20. Habibi-Asl B, Hassanzadeh K. Effects of ketamine and midazolam on morphine induced dependence and tolerance in mice. *DARU* 2004; 12: 101-5.
21. Habibi-Asl B, Hassanzadeh K, Moosazadeh S. Effects of ketamine and magnesium on morphine induced tolerance and dependence in mice. *DARU* 2005; 13: 110-5.
22. Habibi-Asl B, Hassanzadeh K, Khezri E Mohammadi S. Evaluation the effects of dextromethorphan and midazolam on morphine induced tolerance and dependence in mice. *Pak J Biol Sci* 2008; 11: 1690-95.
23. Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M, et al. the human μ -opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium / calmodulation – dependent kinase and protein kinase C. *J Neurosci* 1995; 15:2396-2406.
24. Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E. Minocycline inhibits caspase-independent and-dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 10483-87.
25. Zhu S, Stasvrovskaya IG, Drozda M, Kim BYS, Ona V, Li M, and et al. Minocycline inhibits cytochrome C release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 2002; 417: 74-8.
26. Hunter CL, Quintero EM, Gilstrap L, Bhat NR, Granholm A. Minocycline protects basal forebrain cholinergic neurons from mu p75-saporin immunotoxic lesioning. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 3305-16.
27. He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cell after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 2001; 909: 187-193.

28. Kraus RL, Pasiweczny R, Lariosa WK, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline, neuroprotection in an oxidative stress and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem* 2005; 94: 819-827.
29. Stirling DP, Khodarahmi K, Steeves JD, Tetzlaff W. Minocycline as neuroprotective agent. *Neuroscientist* 2005; 11:308-322.
30. Wang J, Wei Q, Wang CY, William DM, David CH, Dong Z. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biology Chem* 2004; 279:19948-19954.
31. Moriyama Y, Yamamoto A. Glutamatergic chemical transmission: look! Here, there, and anywhere. *J Biochem* 2004; 135: 155-63.
32. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-95.
33. Gonzalez JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernandez-Gomez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandía L, et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 2481-2495.
34. Hassanzadeh K, Habibi-asl B, Roshangar L, Nemati M, Ansarin M, Farajnia S. Intracerebroventricular administration of riluzole prevents morphine-induced apoptosis in the rat lumbar spinal cord. *Pharmacol Rep* 2010; 62:664-673.
35. Bobula B, Hess G. Effects of morphine and methadone treatments on glutamatergic transmission in rat frontal cortex. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 1192-1197.
36. Inturrisi CE. Preclinical evidence for a role of glutamatergic systems in opioid tolerance and dependence. *Semin Neurosci* 1997; 9: 110-119.
37. Wang SJ, Wang KY, Wang WC. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 2004; 125:191-201.