نقش اورکسین در فعالیت گیرنده گابا A طی محرومیت از مورفین در نورون‌های هسته لوکوس سرولئوس موش صحرایی

مهناز داودی[۱]، حسین عزیزی[۲]، سید جواد میرنجفی‌زاده[۳]، سعید سمنانیان[۳*]

۱. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۲

چکیده

زمینه و هدف نوروپپتید اورکسین در هیپوتالاموس جانبی ساخته می‌شود و از طریق گیرنده نوع ۱ اورکسین (OX1R) در سندرم محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان درگیر است. هسته لوکوس سرولئوس (LC) یک ناحیه حساس مغزی برای بروز جنبه‌های حرکتی سندرم محرومیت از مورفین است. سیستم گاباارژیک و اورکسینرژیک در ایجاد وابستگی فیزیکی ناشی از مصرف مورفین درگیر هستند. در این مطالعه اثر اورکسینA بر عملکرد سیستم مهاری گاباارژیک در نورون‌های هسته LC در بروز علائم سندرم محرومیت، ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar (۱۴-۲۱روزه) استفاده شد. برای ایجاد وابستگی در حیوانات از مورفین (20 mg/kg, i.p. 1/0 ml; i.p.) روزانه به مدت هفت روز انجام گرفت، سپس با استفاده از تکنیک ثبتwhole-cell patch clamp اثر اورکسین بر جریان‌های مهاری پس‌سیناپسی (IPSCs) خودبه‌خودی و برانگیخته گابا A در نورون‌های هسته LC بررسی گردید.

یافته‌ها داده‌ها نشان دادند که اورکسینA از طریق گیرنده‌های نوع ۱، در حضور نالوکسان، نوعی اثر مهاری بر عملکرد سیستم گاباارژیک دارد. تجویز اورکسینA باعث کاهش دامنه جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری برانگیخته (eISPCs) شد. همچنین اورکسین A در حضور نالوکسان اثری بر دامنه جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری خودبه‌خودی (sIPSCs) اعمال نکرد در حالی که موجب کاهش فرکانس این جریان‌ها گردید.

نتیجه‌گیری این یافته‌ها نشان دادند که ممکن است اورکسین A از طریق گیرنده‌های نوع ۱، در حضور نالوکسان اثر مهاری بر فعالیت سیستم گاباارژیک در نورون‌های LC داشته باشد. به نظر می‌رسد اورکسین A، به عنوان فاکتوری خارجی عمل می‌کند یا می‌تواند با اثر بر دیگر فاکتورهای خارجی مانند جریان های گاباارژیک نقش مهمی را در محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان را ایفا کند. همچنین این یافته‌ها نشان دادند که ممکن است اورکسین A از طریق گیرنده‌های نوع ۱، در کاهش فعالیت گیرنده گابا A در بروز سندرم محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان سهیم باشد.

کلیدواژه‌ها:
اورکسین، گیرنده نوع ۱ اورکسین، گیرنده گابا A، لوکوس‌سرولئوس، سندرم محرومیت از مورفین.

۱. مقدمه

مورفین، یک داروی اوپیوئیدی ضد درد است که فعالیت‌های نورونی را از طریق فعال شدن گیرنده‌های مو-اپیوئیدی، تعدیل می‌کند. تجویز مزمن مورفین، وابستگی به دارو را ایجاد می‌کند؛ به طوری که توقف ناگهانی، یا قطع درمان یا

* **نویسندهٔ مسئول: سعید سمنانیان**
نشانی: گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۲۰
رایانامه: ssemnan@modares.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0002-8987-3291
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0001-9806-3496

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۷، شمارهٔ ۵، آذر و دی ۱۳۹۹، ص ۶۳۹-۶۲۹
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

استفاده از آنتاگونیست مو-اپیوئیدی، سندرم محرومیت اپیوئیدی حاد را ایجاد می‌کند. وابستگی به اوپیوئیدها با علائم سندرم محرومیت، ارتباط دارد[۳-۱]. هسته لوکوس سرولئوس یکی از حساس‌ترین مکان‌ها برای بروز علائم محرومیت ناشی از مصرف اپیات‌ها می‌باشد [۷-۴]. افزایش فعالیت نورون‌های هسته LC طی ایجاد سندرم محرومیت، در بروز علائم محرومیت، نقش مهمی ایفا می‌کند [۸-۷]. از نظر زمانی، افزایش شلیک نورونی با رفتارهای محرومیت، مطابقت دارد. نورون‌های LC با فعالیت شلیک خودبه‌خودی مشخص می‌شوند که به نوبه خود توسط تعدادی از انتقال‌دهنده‌های عصبی و نوروپپتیدها تعدیل می‌شوند [۸].

اورکسین، نوعی نوروپپتید هیپوتالاموسی است [۹] که به طور مستقیم از طریق گیرنده نوع ۱ خود، تحریک‌پذیری نورون‌های هسته LC را افزایش می‌دهد [۱۱, ۱۰]. اورکسین، نقش مهمی در وابستگی فیزیکی به مورفین و بروز علائم فیزیکی محرومیت دارد [۱۲،۱۳].

میانجی عصبی گابا، از مهارکننده‌های اصلی در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد [۱۴] که نقش مهمی در ایجاد وابستگی فیزیکی ناشی از مصرف مورفین و محرومیت از مورفین به عهده دارد. منبع اصلی ورودی گاباارژیک به هسته LC که هسته پره‌پوزیتوس هایپوگلوسی است. شلیک پتانسیل، عمل هسته LC را از طریق فعال کردن گیرنده‌های پیش و پس‌سیناپسی گابا A مهار می‌کند [۱۵]. هسته LC پایانه‌های اینترنورون‌های گاباارژیک را در پیش و پس‌سیناپس خود دریافت می‌کند [۱۶]. افزایش در فعالیت ساقه مغز و نورون‌های نورآدرنرژیک هسته LC یکی از فاکتورهای عمده برای بروز علائم ترک مواد اوپیوئیدی شمرده می‌شود و فعالیت این نورون‌ها تحت فعالیت مهاری سیستم گاباارژیک است [۱۸, ۱۷].

شواهد نشان می‌دهد انتقال سیناپسی بین سیستم گاباارژیک و اورکسینرژیک در تشکیلات مشبک، باعث پیشبرد هوشیاری در موش صحرایی می‌شود [۲۱-۱۹]. همچنین اورکسین در هسته دور قناتی خاکستری با مهار رهایش گابا، باعث کاهش جریان‌های گیرنده گابا Aمی‌شود [۲۳ , ۲۲]. در حیوانات فاقد اورکسین یا گیرنده آن، تجویز مزمن مواد اپیوئیدی، وابستگی فیزیکی کمی ایجاد می‌کند و علائم محرومیت از اپیوئید کاهش می‌یابد؛ بنابراین به نظر می‌رسد فعالیت متقابل عواملی نظیر مورفین، اورکسین و گابا، در ایجاد سندرم محرومیت ناشی از مصرف مورفین در نورون‌های نورآدرنرژیک هسته LC مشارکت دارند. در این مطالعه برای اولین‌بار در مورد مکانیسم اثر اورکسین A بر فعالیت‌های مهاری پس‌سیناپسی ناشی از نورون‌های گاباارژیک در هسته LC در موش‌های وابسته به مورفین در بروز سندرم محرومیت، مطالعاتی انجام شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. حیوانات

در این پژوهش، از موش‌های صحرایی نوزاد، نژاد Wistar، با محدوده سنی ۲۱-۱۴ روزه استفاده شده است. موش‌های مورد استفاده از مؤسسه انستیتوپاستور ایران تهیه شد. شرایط نوری حیوانات به طور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی رعایت می‌شد (شروع روشنایی ساعت ۷ صبح). آب و غذا برای حیوانات به طور آزاد وجود داشت. رطوبت، تابع شرایط رطوبتی هوای آزاد بود. همه آزمایش‌ها مطابق با دستورالعمل کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

۲.۲. ایجاد وابستگی در موش‌های نوزاد

موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی مورفین (ml 1/0 mg/kg, 20) روزانه به مدت هفت روز به صورت مزمن وابسته شدند [۲۴]. برای اطمینان از ایجاد وابستگی، در تعدادی از موش‌ها در روز آخر (۲ ساعت پس از تزریق مورفین)، نالوکسان (ml 1/0 mg/kg, 3) تزریق شد و علائم سندرم محرومیت در یک دوره زمانی ۲۵ دقیقه‌ای در حالی که حیوان در یک قفس شفاف با ابعاد ۳۰ سانتی‌متر قطر و ۵۰ سانتی‌متر ارتفاع قرار گرفته بود، شمارش شدند. علائم جسمی در این موش‌ها شامل: حرکت سر، حرکت دادن پای عقبی بدون راه رفتن، چرخیدن به دور خود، کشیدن بدن، تولید صدا کردن بود [۲۵].

۳.۲. تهیه برش‌های مغزی

موش‌های صحرایی با اتر بیهوش شدند و بلافاصله سر آنها جدا شد و داخل محلول برش‌گیری سرد (C °۴-۰) و کربوژنه (۹۵٪ O_2 و ۵٪ CO_2) به مدت یک دقیقه غوطه‌ور شد. دو یا سه برش مغزی افقی ۳۰۰ میکرونی حاوی نورون‌های هسته LC در محلول برش‌گیری سرد و کربوژنه نگهداری می‌شد. سپس برش‌های مغزی به محفظه گیبس منتقل گردید و به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در محلول برش‌گیری استاندارد کربوژنه با دمای C °۳۵ اینکوبه شد و سپس تا حین ثبت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس برش مغزی به محفظه ثبت، منتقل شد و در آنجا به کمک یک پمپ پریستالتیک توسط محلول خارج سلولی

کربوژنه با سرعت ۲-۱ میلی‌لیتر در دقیقه پرفیوز شد. محلول خارج سلولی حاوی (Mm): NaCl 125، KCl 3، $NaH2PO_4$ 1.25، $NaHCO_3$ 25، D-Glucose 10، L-Ascorbic Acid 0.4، $CaCl_2$ 2، $MgCl_2$ 1.3 بود (PH=۷/۴ و اسمولاریته آن mOsm ۲۹۵-۲۸۵). محلول برش‌گیری، حاوی همین ترکیبات بود، فقط برای کاهش فعالیت سلولی، غلظت کلسیم در آن کمتر بود و برای محافظت سلولی، سوکروز جایگزین کلریدسدیم شد (Mm): Sucrose 213، KCl 2.6، $NaH2PO_4$ 1.23، $NaHCO_3$ 26، L-Ascorbic Acid 0.4، D-Glucose 2، $CaCl_2$ 0.1، $MgCl_2$ 2 (PH=۷/۴ و اسمولاریته آن mOsm ۳۰۵-۲۹۵). زمانی که تهیه برش و ثبت از حیوان وابسته به مورفین انجام می‌گرفت، مورفین (۵ µM) به محلول برش‌گیری و محلول خارج سلولی اضافه گردید.

۴.۲. تهیه الکترود و محلول داخل سلولی

در پیپت‌های شیشه‌ای از جنس بوروسیلیکات با مقاومت حدود ۶MΩ-۳ با استفاده از کِشنده میکروالکترود (Sutter instrument, P-97) تهیه شدند. الکترود ثبت با محلول داخل سلولی پر شد. ترکیب محلول داخل پیپت برای ثبت جریان‌های مهاری شامل (Mm): CsCl 140، HEPES 10، $CaCl_2$ 1، $MgCl_2$ 2، ATPMg 2، EGTA 10، NaGTP 2 و QX-314 1 بود. در تهیه این محلول ابتدا PH محلول داخل سلولی را با استفاده از CsOH به ۷/۳ رسانده، سپس اسمولاریته محلول داخل الکترود، با افزودن تدریجی آب مقطر به محدوده mOsm ۲۹۵-۲۸۵ رسانده شد. هنگام ثبت، یک الکترود Ag/AgCl در محلول داخل پیپت قرار گرفت که ارتباط آن را به‌واسطه Head stage با آمپلی‌فایر Multiclamp 700B برقرار کند.

۵.۲. ثبت Whole cell patch clamp

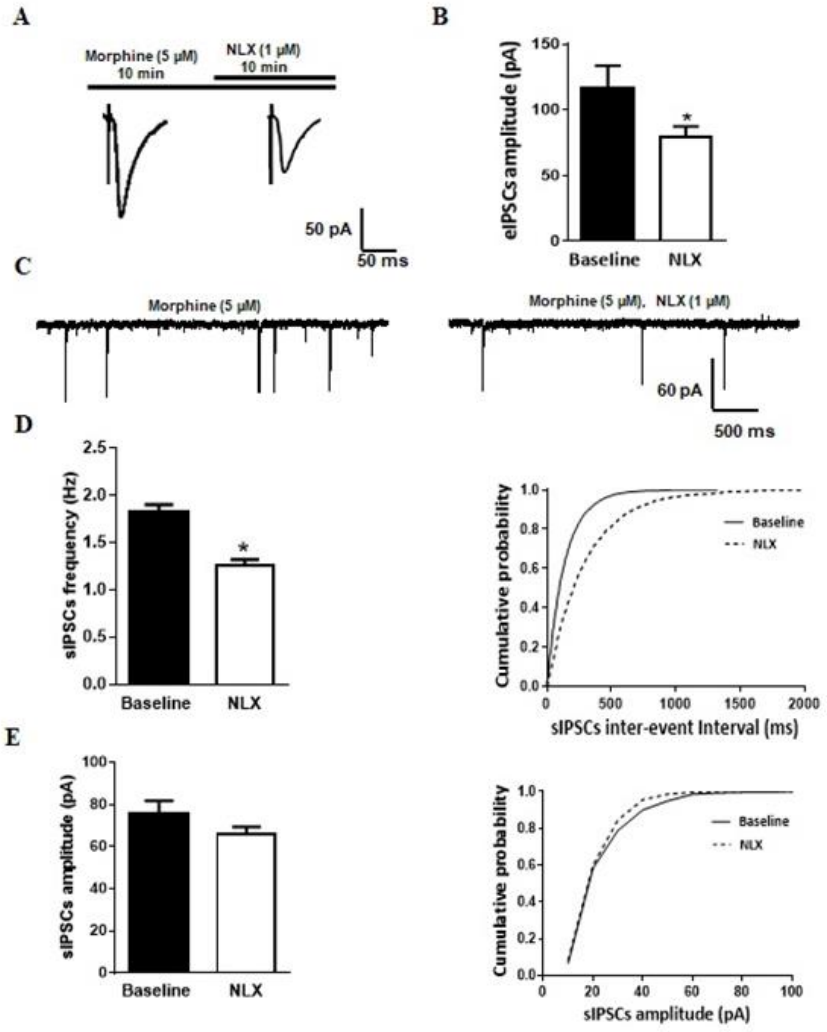
برای ثبت جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری خودبه‌خودی از نورون‌های هسته LC، در شرایط ولتاژ کلمپ، ثبت بدون وقفه به مدت ۵ دقیقه به عنوان ثبت پایه انجام شد. این ثبت‌ها در حضور CNQX (۱۰ میکرومولار) و AP5 (۵۰ میکرومولار) آنتاگونیست گیرنده‌های AMPA و NMDA انجام گرفت. اعمال بیکوکولین (۱۵ µM) آنتاگونیست گیرنده گابا A سبب حذف این جریان گردید. در مرحله بعد، سلول به مدت ۱۰ دقیقه در معرض اورکسین A با غلظت ۱۰۰ نانومولار قرار گرفت، سپس مجدداً ثبت sIPSCs انجام شد [۲۷, ۲۴] . در ثبت‌ها از شدت تحریک ۱۰۰ تا ۶۰۰ میکروآمپر استفاده شد. برای هر بار ثبت eIPSC، ۸ بار تحریک با فرکانس ۰/۱ هرتز اعمال شد و میانگین این ۸ پاسخ به‌عنوان eIPSC سلول مورد آنالیز قرار گرفت. اعمال بیکوکولین (۲۰ µM) آنتاگونیست گیرنده گابا A سبب حذف این جریان گردید.

۶.۲. آنالیز داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۷، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در بخش آنالیز داده‌ها ابتدا به منظور ارزیابی توزیع نرمال از آزمون Bartlett استفاده شد. در مواردی که توزیع نرمال وجود داشت داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (Repeated Measure ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و از آزمون Student-Newman-Keuls برای تعیین گروه‌های دارای اختلاف استفاده شد. در مواردی که تنها دو گروه مقایسه می‌شدند از Paired two-tailed Student's t-test استفاده می‌شد. $P<0.05$ ملاک معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌های آزمایش در نظر گرفته شده و مقادیر به دست آمده به‌صورت (میانگین ± خطای استاندارد) گزارش شده‌است.

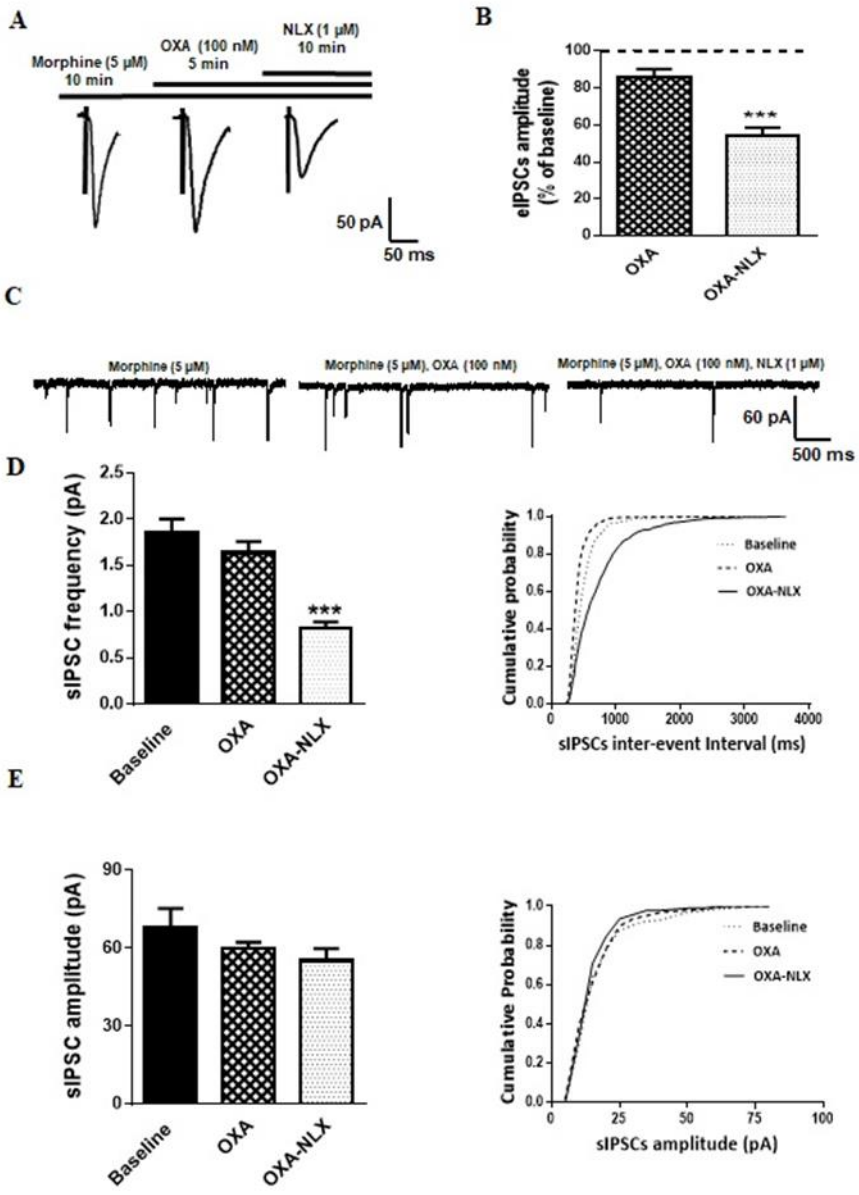
۳. یافته‌های پژوهش

در دامنه eIPSCs نورون‌های هسته LC در شرایط ثبت پایه، در حضور CNQX (۲۰ میکرومولار) وAP5 (۵۰ میکرومولار) آنتاگونیست گیرنده‌های AMPA و NMDA در پتانسیل نگهدارنده 70 mV- انجام گرفت. دامنه eIPSCs برای نورون‌های LC موش‌های گروه وابسته به مورفین در ثبت پایه و در حضور نالوکسان از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید (شکل ۱). برای بررسی اینکه آیا این اثر با مکانیزم‌های پیش یا پس‌سیناپسی مداخله می‌شود، تأثیر نالوکسان بر فرکانس و دامنه IPSCs های خودبه‌خودی در نورون های LCمورد بررسی قرار گرفت. دامنه sIPSCs برای نورون‌های LC موش‌های گروه وابسته به مورفین در ثبت پایه و در حضور نالوکسان از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل۱۳-۳). همچنین فرکانس وقوع sIPSCs در نورون‌ها اندازه‌گیری شد. اگرچه از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری در میزان دامنه sIPSCs نورون‌ها در حالت ثبت پایه مشاهده نشد ولی کاهش چشمگیری در فرکانس در حضور نالوکسان مشاهده شد (شکل۱۳-۳). انحراف به راست منحنی فراوانی تجمعی فاصله بین وقوع جریان‌های sIPSCs نشان داد که در موش‌های وابسته، محرومیت از مورفین پاسخ‌دهی گیرنده‌های گابا A را در نورون‌های هسته LC کاهش می‌دهد.



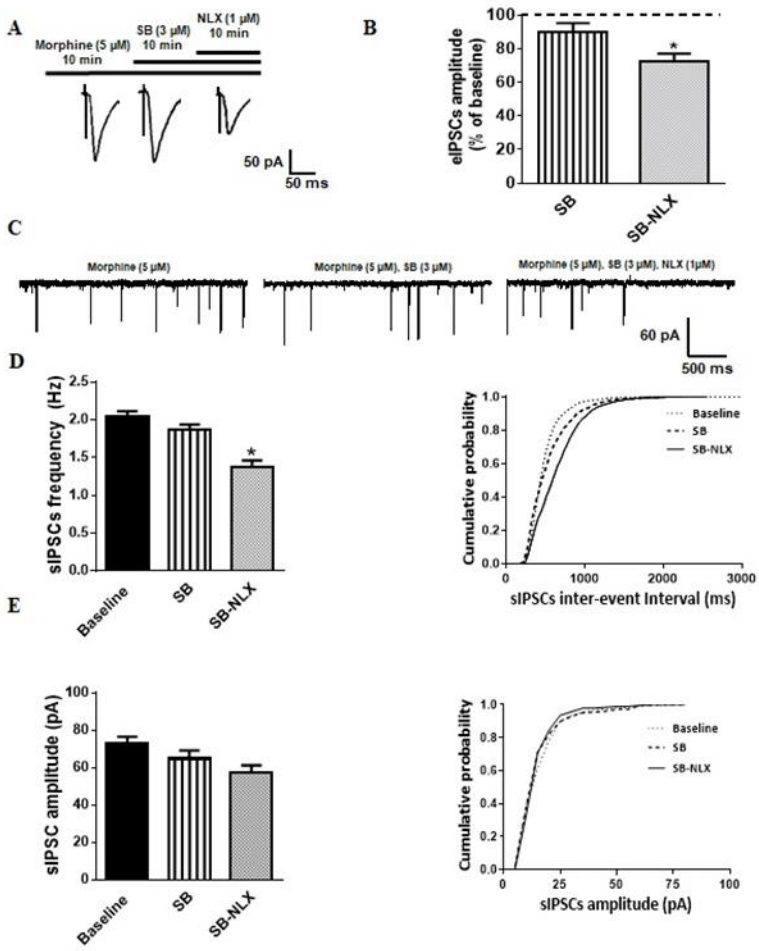
شکل۱. تأثیر نالوکسان بر جریان‌های مهاری پس‌سیناپسی (IPSCs) گابا Aدر نورون‌های LC موش‌های وابسته به مورفین. (A). نمونه ثبت جریان‌های مهاری برانگیخته eIPSCs (B). مقایسه دامنه، قبل و بعد از اعمال نالوکسان (NLX) ثبت پایه کاهش معنی‌داری در دامنه eIPSCs نشان داد (Paired two-tailed Student's t-test, #P<0.05, n=8/4). (C). نمونه ثبت جریان‌های مهاری خودبه‌خودی IPSCs . (D) اثر نالوکسان بر فرکانس (E). اثر نالوکسان بر دامنه جریان‌های مهاری خودبه‌خودی sIPSCs.

در بخش بعدی، اثر اورکسین A بر IPSCs ناشی از گیرنده‌های گابا A در موش‌های وابسته به مورفین بررسی شد. نتایج نشان دادند که از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری در دامنه eIPSCs نورون‌های این موش‌ها در حضور اورکسین A نسبت به ثبت پایه وجود ندارد. اما دامنه eIPSCs بعد از اعمال اورکسین A در حضور نالوکسان به طور معنی‌داری کاهش یافت (P۰/۰۰۱>) (شکل ۳). علاوه بر این، اورکسین A فرکانس جریان‌های پس‌سیناپسی خودبه‌خودی مهاری (sIPSCs) را در نورون‌های LC کاهش داد اما بر دامنه جریان‌های پس‌سیناپسی خودبه‌خودی بی‌اثر بود. انحراف به راست منحنی فراوانی تجمعی فاصله بین وقوع جریان‌های sIPSCs نشان داد که در موش‌های وابسته، اورکسین A پاسخ‌دهی گیرنده‌های گابا A را در نورون‌های هسته LC در شرایط محرومیت از مورفین کاهش می‌دهد. فرکانس وقوع sIPSCs ها قبل از تجویز اورکسین A و پس از ۱۰ دقیقه تجویز اورکسین A (۱۰۰ نانومولار) تفاوت معناداری نداشت اما اورکسین A به طور معنی‌داری فرکانس sIPSCs را در حضور نالوکسان کاهش داد.



شکل ۲. اثر اورکسین A بر دامنه IPSC در نورون‌های LC موش‌های وابسته به مورفین در حضور نالوکسان. (A-B) نمونه ثبت اثر اورکسین A و مقایسه اثر اورکسین با ثبت پایه که کاهش معنی‌داری بر جریان‌های مهاری برانگیخته eIPSCs ندارد، در حالیکه پیش‌تیمار با اورکسین A در حضور نالوکسان (NLX) باعث کاهش eIPSCs در مقایسه با ثبت پایه گردید (C) . (Repeated measures ANOVA, Student– Newman–Keuls test, *** P <0.001, n=8/5) نمونه ثبت اثر اورکسین A(۱۰۰ نانومولار) بر فرکانس (D) و دامنه جریان‌های مهاری خودبه‌خودی sIPSCs (E) . بر sIPSC. اثر اورکسین

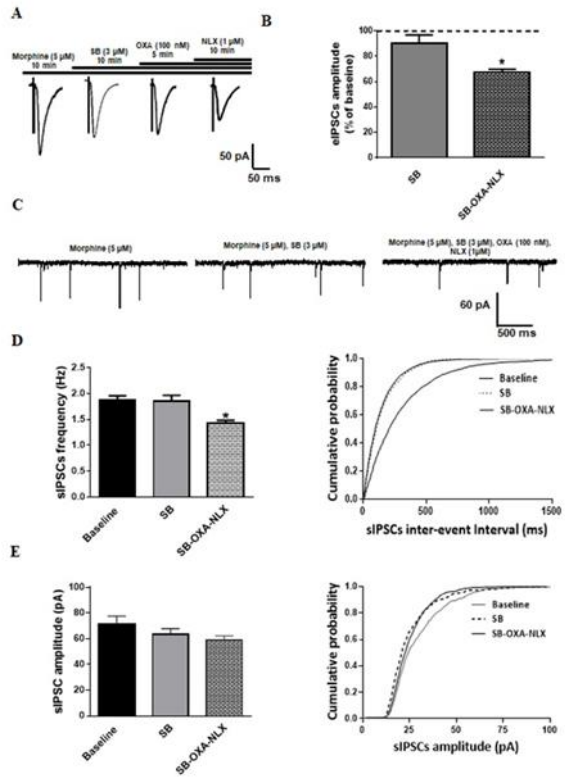
در گروهی از نورون‌های LC برای اینکه نشان دهیم تغییرات IPSCs ناشی از گیرنده‌های نوع یک اورکسین A است، تأثیر SB-334867 در دوز (۳ میکرومولار) به مدت ۱۰ دقیقه بر دامنه و فرکانس IPSCs در حضور نالوکسان ثبت شد. SB-334867 تأثیر معنی‌داری بر دامنه eIPSCs در نورون‌های LC موش‌های وابسته به مورفین در مقایسه با ثبت پایه نداشت، در حالی که این دارو در حضور نالوکسان، کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۳-۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که SB-334867 به تنهایی تأثیری بر جریان‌های مهاری گابا ندارد. همچنین با توجه به اینکه خود SB-334867 تأثیر معنی‌داری بر روی دامنه و فرکانس sIPSCs در حضور نالوکسان نداشت؛ بنابراین می‌توان گفت که اورکسین A اثر خود را از طریق گیرنده‌های OX1R اعمال می‌کند (شکل ۳).



شکل ۳. تأثیر SB-334867 بر دامنه IPSCs در نورون‌های LC موش‌های وابسته به مورفین در حضور نالوکسان. (A). اثر SB-334867 بر نمونه ثبت eIPSCs. (B). تیمار SB-334867 تأثیر معنی‌داری بر eIPSCs در مقایسه با ثبت پایه نداشت، در حالی که در حضور نالوکسان (NLX) باعث کاهش جریان‌های مهاری برانگیخته eIPSCs در مقایسه با ثبت پایه گردید (C). (Repeated measures ANOVA, Student – Newman–Keuls test, *P <0.05, **P <0.01, n=8/3) نمونه ثبت اثر SB-334867 بر جریان‌های مهاری خودبه‌خودی sIPSCs. (D, E).

داروی SB-334867 در حضور نالوکسان اثر کاهشی اورکسین A بر دامنه eIPSCs را در نورون‌های LC از بین برد. در گروهی از نورون‌های LC برای اینکه نشان دهیم تغییرات eIPSCs ناشی از گیرنده‌های نوع یک اورکسین A است، اثر اورکسین A در حضور SB-334867 بر دامنه eIPSCs نورون‌های LC ثبت گرفته شد، مقایسه آماری تفاوتی را بین ثبت پایه جریان‌های پس‌سیناپسی برانگیخته با ثبت این جریان‌ها در حضور SB-334867 نشان نداد. همچنین داروی SB-334867 (۳ میکرومولار) زمانی که ۱۰ دقیقه قبل از اورکسین A به اسلایس اعمال شد، نتوانست اثر کاهشی اورکسین A بر دامنه این جریان‌ها را در مقایسه با ثبت پایه از بین ببرد. ولی در حضور نالوکسان، اورکسین A روی اسلایس‌های شامل SB-334867 باعث کاهش دامنه جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری گردید. بنابراین می‌توان گفت که اورکسین A اثر خود را از طریق گیرنده‌های OX1R اعمال می‌کند (شکل ۴).

همچنین فرکانس وقوع sIPSCها برای نورون‌های LC موش‌های وابسته به مورفین در ثبت پایه نسبت به ثبت جریان با اعمال SB-334867 و اورکسین A از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در میزان فرکانس sIPSCs مشاهده نشد ولی ثبت همین جریان‌ها در حضور نالوکسان از نظر آماری کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۴). انحراف به راست منحنی فراوانی تجمعی فاصله بین فرکانس وقوع جریان‌های sIPSCs نشان داد که در موش‌های وابسته، مهارگر اورکسین A اثر تقویتی اورکسین A بر کاهش جریان گیرنده گابا A را در شرایط محرومیت از مورفین از بین می‌برد.



شکل ۴. تأثیر SB-334867 (SB) و اورکسین Aبر دامنه جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری برانگیخته (eIPSC) و خودبه‌خودی (sIPSC) در نورون‌های LC موش‌های وابسته به مورفین در حضور نالوکسان. (A) نمونه ثبت جریان‌های .(B). eIPSCsپیش‌تیمار SB-334867 بر (D). .eIPSCsپیش‌تیمار SB-334867 در حضور اورکسین A بر فرکانس eIPSCs در مقایسه با ثبت پایه و پیش‌تیمار (E) .SB-334867. پیش‌تیمار SB-334867 در حضور اورکسین A بر دامنه eIPSCs در مقایسه با ثبت پایه و پیش‌تیمار SB-334867.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

داده‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که اورکسین A می‌تواند باعث کاهش دامنه جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری گابا شود. مهار اثر کاهشی SB-334867 بر دامنه جریان‌های مهاری گابا تأییدکننده پاسخ‌های وابسته به گیرنده‌های OX1R در این ناحیه است. محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان، سبب کاهش معنی‌داری در دامنه جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری برانگیخته (eIPSC) نورون‌های LC موش‌های وابسته به مورفین شد. در حالی که محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان، سبب تفاوت معنی‌دار در دامنه جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری خودبه‌خودی (sIPSC) نورون‌های LC موش‌های وابسته به مورفین نشد؛ با این حال کاهش معنی‌داری در فرکانس sIPSCs ایجاد کرد. این نتیجه در راستای نتایج مطالعاتی است که نشان دادند میزان رهایش گابا در طول تأثیر نالوکسان در موش‌های وابسته به مورفین در هسته LC کاهش می‌یابد [۱۱]. علاوه بر این، برخی دیگر از پژوهشگران اشاره کردند که در موش‌های وابسته به مورفین، بروز سندرم محرومیت موجب کاهش سطح میانجی گابا در مخچه و افزایش غلظت آن در هیپوتالاموس می‌گردد [۲۸, ۲۹]. ویلیامز و همکارانش نشان دادند که رهایش درون‌زاد آدنوزین به صورت پیش‌سیناپسی آزادسازی گابا را طی سندرم محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان، کاهش می‌دهد [۳۰]. بنابراین این امکان وجود دارد که تزریق نالوکسان منجر به کاهش فعالیت نورون‌های گاباارژیک، کاهش فعالیت آنزیم GAD و در نهایت، کاهش احتمالی رهایش گابا در موش‌های وابسته به مورفین می‌گردد. برخلاف نتایج به دست آمده از این مطالعه، پژوهشی که روی ناحیه ونتروتگمنتال انجام شده است نشان می‌دهد که جریان‌های گاباارژیکی در طی سندرم محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان افزایش می‌یابند [۳۱]. هر چند این نکته نباید فراموش شود، با توجه به مطالعه مولکولی و ایمونوهیستوشیمی استون جونز و همکارانش،

تفاوت‌های بسیار زیادی در بیان ژن در هسته LC و ناحیه ونتروتگمنتال در پاسخ به مورفین مزمن وجود دارد [۳۲]. همچنین اطلاعات محدودی در مورد نقل و انتقال سیناپسی سیستم گاباارژیکی در شرایط مصرف حاد و مزمن مورفین وجود دارد.

در قسمت بعدی مطالعه اورکسین A جریان‌های پس‌سیناپسی مهاری برانگیخته ناشی از گیرنده‌های گابا A در نورون‌های هسته LC در حضور نالوکسان به طور معنی‌داری کاهش داد. داده‌های ما در این بخش نشان می‌دهند که اثر اورکسین در راستای کاهش کارایی سیناپس‌های مهاری در نورون‌های هسته LC می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که نالوکسان حتی به تنهایی هم می‌تواند کاهش معنی‌داری در دامنه eIPSCs حاصل از گیرنده‌های گابا A در نورون‌های هسته LC موش‌های وابسته به مورفین ایجاد کند، بدون اینکه نیازی به حضور اورکسین باشد. به عبارتی دیگر کاهش دامنه eIPSCs حاصل از گیرنده‌های گابا A در نورون‌های هسته LC موش‌های وابسته به مورفین در محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان هم از طریق مسیرهای اورکسینرژیک و مسیرهای غیراورکسینرژیک انجام می‌شود.

همچنین اورکسین A سبب کاهش معنی‌داری در فرکانس sIPSCs در نورون‌های هسته LC موش‌های وابسته به مورفین می‌شود ولی روی دامنه sIPSCs در این نورون‌ها تأثیری ندارد. عدم‌تأثیر نوروپپتید اورکسین A بر دامنه جریان‌های مهاری خودبه‌خودی بیانگر آن است که احتمالاً رهایش میانجی گابا از پایانه‌های پیش‌سیناپسی تغییر کرده است و نشان می‌دهد که اثر اورکسین بر جریان‌های مهاری به صورت پیش‌سیناپسی اتفاق می‌افتد. در مجموع، در مطالعه حاضر می‌توان نقش پیش‌سیناپسی را در تقویت کارایی سیناپس منطقی دانست، چون یکی از دلایل احتمالی افزایش فرکانس sIPSCs می‌تواند افزایش محتوای کوانتایی رهایش میانجی گابا در هر وزیکول باشد. هرچند تأیید یا رد قطعی این پدیده نیازمند مطالعات بیشتری است. اما آنچه واضح است نقش نورون پیش‌سیناپسی در میانجی کردن اثر اورکسین A در کاهش انتقالات سیناپسی مهاری است که در موش‌های وابسته به مورفین در حضور نالوکسان قابل مشاهده است.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این نوروپپتید احتمال رهایش میانجی گابا از نورون‌های پیش‌سیناپسی هسته LC را تغییر می‌دهد. از طرفی یافته‌ها نشان می‌دهند که اورکسین A تأثیر معنی‌داری بر دامنه sIPSCs ندارد. این نتیجه نیز مؤید این مطلب است که تغییر فرکانس رهایش میانجی از پایانه‌های نورونی به صورت پیش‌سیناپسی است؛ زیرا همان‌طور که در داده‌های sIPSCs قابل مشاهده است، دامنه sIPSCs ها پس از اعمال اورکسین A افزایش نیافته است. ارزیابی انحراف به راست منحنی فراوانی تجمعی فاصله بین فرکانس وقوع جریان‌های sIPSCs نشان می‌دهد که در موش‌های وابسته به مورفین اورکسین A، پاسخ‌دهی گیرنده‌های گابا A در نورون‌های هسته LC در محرومیت از مورفین القایی با نالوکسان کاهش می‌یابد. شاید از جمع این یافته‌ها بتوان نتیجه گرفت که اثر اورکسین بر کاهش کارایی سیناپس‌های مهاری در نورون‌های هسته LC به صورت پیش‌سیناپسی است و حداقل در شرایط آزمایشی ما اثر پس‌سیناپسی نمی‌گذارد. این مطالعه با گزارش‌هایی هماهنگ است که نشان داده‌اند، اورکسین A با فعال کردن OX1R باعث بیوسنتر اندوکانابینوئیدها از طریق فعال کردن مسیر فسفولیپاز C می‌شود و در نهایت اندوکانابینوئیدها با انتشار به طور پس‌گرا به سمت پیش‌سیناپس باعث کاهش انتقالات سیناپسی میانجی عصبی گابا می‌گردد [۳۴]. احتمالاً یکی از اهمیت‌های فیزیولوژیکی آن این است که وجود این مهار باعث می‌شود که افزایش فعالیت نورون‌های LC در اثر ترشح طولانی‌مدت اورکسین A کاهش می‌یابد و یک مدار فیدبکی ایجاد می‌کند که سلول را از افزایش فعالیت زیاد محافظت می‌کند.

همچنین این امکان وجود دارد که اورکسین با فعال کردن پروتئین کینازها، کلسیم داخل سلولی را افزایش می‌دهد و موجب افزایش فعالیت کانال‌های کلسیمی پیش‌سیناپسی می‌شود، سپس اورکسین A با فعال کردن OX1R باعث بیوسنتر اندوکانابینوئیدها از طریق فعال کردن PLC می‌شود و در نهایت اندوکانابینوئیدها با انتشار به طور پس‌گرا به سمت پیش‌سیناپس باعث کاهش انتقالات سیناپسی میانجی عصبی گابا می‌گردند [۳۶، ۳۵]. روی‌هم‌رفته، به نظر می‌رسد در فرایند وابستگی به مورفین، احتمالاً اثرات متقابل نوروپپتید اورکسین و گابا نقش عمده در شکل‌پذیری سیناپسی نورون‌های هسته LC و همچنین بروز علائم سندرم محرومیت داشته باشند. احتمالاً نوروپپتید اورکسین از طریق گیرنده‌های نوع ۱ اورکسین در هسته LC، خود به عنوان فاکتوری خارجی در هسته LC عمل می‌کند یا می‌تواند بر فاکتورهای خارجی دیگری مانند

گابا و گلوتامات در این هسته تأثیر بگذارد و به این صورت در فرایند وابستگی و بروز علائم محرومیت اوپیاتی، تأثیرگذار باشد. نتایج این مطالعات می‌توانند به درک بیشتر مکانیسم‌های به وجود آمدن وابستگی به اوپیوئیدها کمک کنند. همچنین به دلیل آشکار شدن اهمیت سیستم اورکسینرژیک مغز در ایجاد وابستگی به مواد، گیرنده‌های اورکسینرژیک می‌توانند اهداف خوبی برای توسعه داروهایی که عوارض درازمدت استفاده درمانی اوپیوئیدها، مانند وابستگی را مهار کنند، باشند. برای درک بهتر اینکه آیا مکانیسم‌های پیش یا پس‌سیناپسی در کاهش جریان‌های مهاری پس‌سیناپسی ناشی از اورکسین نقش دارند یا خیر، بهتر است که تأثیر اورکسین A بر نسبت جفت پالس (Paired Puls Ratio; PPR) جریان‌های مهاری ارزیابی گردد. این پدیده، بیانگر نوعی شکل‌پذیری سیناپسی گذرا و وابسته به عملکرد نورون پیش سیناپسی می‌باشد [۳۷]. علاوه بر این، بررسی تأثیر تزریق آنتاگونیست اورکسین A بر سندرم محرومیت از مورفین در حضور آگونیست گیرنده اندوکانابینوئیدی و همچنین بررسی تأثیر اورکسین در اثر غیرفعال‌سازی هسته پره پوزیتوس هایپوگلوسی بر سندرم محرومیت از مورفین می‌تواند دیدگاه روشن‌تری پیش روی ما قرار دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و ستاد توسعه علوم و فناوری‌های شناختی، صورت پذیرفته است. بدین وسیله، مجریان از حمایت این مراکز، کمال تشکر را دارند.

References

[1]. Chen Y. Jiang Y. Yue W. Zhou Y. Lu L. Ma L. Chronic, but not acute morphine treatment, up-regulates alpha-Ca2+/calmodulin dependent protein kinase II gene expression in rat brain. Neurochem Res. 2008; 33(10):2092-8.

[2]. De Vries TJ. Neural Systems Underlying Opiate Addiction. J Neurosci 2002; 22 (9) 3321–3325.

[3]. Taylor JR. Elsworth JD. Garcia EJ. Grant SJ. Roth RH. Redmond DE Jr. Clonidine infusions into the locus coeruleus attenuate behavioral and neurochemical changes associated with naloxone-precipitated withdrawal. Psychopharmacology (Berl). 1988; 96 (1):121-34.

[4]. Vijayashankar N. Brody HA. A quantitative study of the pigmented neurons in the nuclei locus coeruleus and subcoeruleus in man as related to aging. J Neuropathol Exp Neurol 1979; 38(5): 490-497.

[5]. Riahi E. Mirzaii-Dizgah I. Karimian SM. Sadeghipour HR. Dehpour AR. Attenuation of morphine withdrawal signs by a GABAB receptor agonist in the locus coeruleus of rats. Behav Brain Res. 2009; 196 (1):11-4.

[6]. Aghajanian GK. Central noradrenergic neurons: a locus for the functional interplay between alpha-2 adrenoceptors and opiate receptors. J Clin Psychiatry 1982; 43:20-4.

[7]. Maldonado R. Koob GF. Destruction of the locus coeruleus decreases physical signs of opiate withdrawal. Brain Res. 1993; 605 (1):128-38.

[8]. Maldonado R. Stinus L. Gold LH. Koob GF. Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. J Pharmacol Exp Ther. 1992; 261(2):669-77.

[9]. Georgescu D. Zachariou V. Barrot M. Mieda M. Willie JT. Eisch AJ. Yanagisawa M. Nestler EJ. DiLeone RJ. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. J Neurosci. 2003 Apr 15;23 (8):3106-11.

[10]. Liu RJ. van den Pol AN. Aghajanian GK. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. J Neurosci 2002; 22 (21): 9453-64.

[11]. Georgescu D. Zachariou V. Barrot M. Mieda M. Willie JT. Eisch AJ. Yanagisawa M. Nestler EJ. DiLeone RJ. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. J Neurosci 2003; 23 (8): 3106-11.

[12]. Zhou Y. Bendor J. Hofmann L. Randesi M. Ho A. Kreek MJ. Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. J Endocrinol 2006; 191(1):137-45.

[13]. Azizi H, Mirnajafi-Zadeh J, Rohampour K, Semnanian S (2010) Antagonism of orexin type 1 receptors in the locus coeruleus attenuates signs of naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. Neurosci Lett 482: 255–259.

[14]. Macey DJ. Froestl W. Koob GF. Markou A. Both GABA(B) receptor agonist and antagonists decreased brain stimulation reward in the rat. Neuropharmacology. 2001; 40(5):676-85.

[15]. Rasmussen K. Fuller RW. Stockton ME. Perry KW. Swinford RM. Ornstein PL. NMDA receptor antagonists suppress behaviors but not norepinephrine turnover or locus coeruleus unit activity induced by opiate withdrawal. Eur J Pharmacol. 1991 May 2;197(1):9-16.

[16]. Hellsten KS. Sinkkonen ST. Hyde TM. Kleinman JE. Särkioja T. Maksimow A. Uusi-Oukari M. Korpi ER. Human locus coeruleus neurons express the GABA(A) receptor gamma2 subunit gene and produce benzodiazepine binding. Neurosci Lett 2010; 477 (2):77-81.

[17]. Cao JL. Ding HL. Zhang LC. Duan SM. Zeng YM. Pretreatment with midazolam suppresses morphine withdrawal response in mice and rats. Acta Pharmacol Sin. 2002 Aug;23(8):685-90.

[18]. Zarrindast M. Effects of GABAergic system on naloxone-induced jumping in morphine-dependent mice. 1999;129–133.

[19]. Brevig HN. Watson CJ. Lydic R. Baghdoyan HA. Hypocretin and GABA interact in the pontine reticular

formation to increase wakefulness. Sleep 2010; 33(10):1285-93.

[20]. Burdakov D. Liss B. Ashcroft FM. Orexin excites GABAergic neurons of the arcuate nucleus by activating the sodium-calcium exchanger. J Neurosci. 2003; 23(12):4951-7.

[21]. Korotkova TM. Eriksson KS. Haas HL. Brown RE. Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin in vitro. Regul Pept. 2002; 104(1-3):83-9.

[22]. Martin G. Fabre V. Siggins GR. de Lecea L. Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens. Regul Pept. 2002; 104(1-3):111-7.

[23]. Dergacheva O. Bateman R. Byrne P. Mendelowitz D. Orexinergic modulation of GABAergic neurotransmission to cardiac vagal neurons in the brain stem nucleus ambiguus changes during development. Neuroscience. 2012; 209:12-20.

[24]. Kaeidi A. Azizi H. Javan M. S. Ahmadi-Soleimani SM. Fathollahi Y. Semnanian S. Direct Facilitatory Role of Paragigantocellularis Neurons in Opiate Withdrawal-Induced Hyperactivity of Rat Locus Coeruleus Neurons: An In Vitro Study. PLoS One. 2015; 10 (7): 1-16.

[25]. Caffe AR. Van Leeven FW. Buijs RM. de Vries GJ. Cerrad M. Coexistence of vasopressin, neurophysin, and noradrenaline immunoreactivity in medium-sized cells of the locus coeruleus and subcoerulues in the rat. Brain Res 1985; 338, 160-164.

[26]. Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? Neurosci 1976; 1(4): 239-48.

[27]. Rohampour K, Azizi H, Fathollahi Y, Semnanian S (2017) Peripheral nerve injury potentiates excitatory synaptic transmission in locus coeruleus neurons. Brain Research Bulletin 130: 112-117.

[28]. Tzeng SF. Ho IK. Acute and continuous morphine administration on the Y-aminobutyric acid system in the mouse. Prog NeuroPsychopharmacol 1978; 2: 55-64.

[29]. Volicer L. Pur SK, Choma P. Cyclic GMP and GABA levels in rat striatum and cerebellum during morphine withdrawal: effect of apomorphine. Neuropharmacol 1977; 16: 791-794.

[30]. Bonci A. Williams JT. Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. J. Neurosci. 1997; 17 (2): 796-803.

[31]. Ennis M. Astone-Jones G. Activation of locus coeruleus from nucleus Paragigantocellularis: A new excitatory amino acid pathway in brain. J Neurosci 1988; 8: 3644-3657.

[32]. Horvath G. Endomorphin-1 andendomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous mu-opioid receptor agonists. Pharmacol Ther 2000; 88 (3): 437-63.

[33]. Ho YC, Lee HJ, Tung LW, Liao YY, Fu SY, Teng SF, Liao HT, Mackie K, Chiou LC (2011) Activation of orexin 1 receptors in the periaqueductal gray of male ratsleads to antinociception via retrograde endocannabinoid (2-arachidonoylglycerol)-induced disinhibition. J Neurosci 31: 14600–14610.

[34]. Yoshida T. Uchigashima M. Yamasaki M. Katona I. Yamazaki M. Sakimura K. Kano M, Yoshioka M. Watanabe M. Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108 (7): 3059-64.

[35]. Ludanyi A. Hu SS. Yamazaki M. Tanimura A. Piomelli D. Watanabe M. Kano M. Sakimura K. Magloczky Z. Mackie K. Freund TF. Katona I. Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. Neuroscience 2011; 174: 50-63.

[36]. Ohno-Shosaku T. Tsubokawa H. Mizushima I. Yoneda N. Zimmer A. Kano M. Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses J Neurosci. 2002; 22(10): 3864-72.

[37]. Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. Annu Rev Physiol 64:355–405.

The role of orexin on GABAA receptor activity during morphine withdrawal syndrome in rat locus coeruleus neurons

Mahnaz Davoudi[1], Hossein Azizi[2], Javad Mirnajafi-Zadeh[3], Saeed Semnanian[3]*

1. Ph.D student, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: The neuropeptide orexin is synthetized in the lateral hypothalamus (LH) and is involved in naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome via orexin type 1 receptors (OX1R). Locus coeruleus (LC) is a sensitive site for the expression of somatic aspects of morphine withdrawal. The orexinergic and GABA-A-ergic systems are involved in morphine withdrawal syndrome. In this study, the effect of OX1R at the LC neurones on GABA-A-ergic inhibitory system activity in morphine withdrawal syndrome was investigated.

Materials and Methods: Male Wistar rats (14-21 days) were made dependent on morphine (20 mg/kg, i.p., for 7 days). Then the effect of orexin-A on spontaneous and evoked inhibitory post synaptic currents in LC neurons using whole-cell patch clamp recordings was assessed.

Results: The findings of this study indicated that orexin-A through OX1R in the presence of naloxone may induce an inhibitory effect on GABAergic system in the LC neurons. It seems that the orexin-A administration decreased the eIPSCs amplitude in LC neurons. Orexin-A decreased spontaneous sIPSCs frequency of LC neurons, but did not change the sIPSCs amplitude in the presence of naloxone.

Conclusion: These findings implicated evidence that orexin-A via OX1R may participate in expression of naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome through decreasing of $GABA_A$ receptor activity.

Received: 2019/05/02
Accepted: 2019/06/12

Keywords: Orexin, Orexin type 1 receptor, GABAA receptor, Locus coeruleus, Naloxone morphine withdrawal.