

اثر اسید اسکوربیک بر خود تزریقی مرفین در موش صحرائی

محمدحسین اسماعیلی* دکتر حجت ا... علایی** دکتر علی نسیمی** دکتر محمدرضا جعفری** احسان دودانگه***

The effect of ascorbic acid on I.V. self administration of morphine in rats

MH.Esmaili H.Alaei A.Nasimi MR.Japhary E.Dodangeh

Abstract

Background: Ascorbic acid which is an antioxidant vitamin, released from brain glutaminergic neurons and regulates the synaptic action of dopamine and glutamate. Dopaminergic and glutaminergic systems involve in tolerance and dependence on morphine and in morphine withdrawal syndrome.

Objective: In this study the effect of Ascorbic acid on self administration of morphine in rats has been investigated.

Methods: Male rats (250-300 gr) were anaesthetized and implanted with silastic catheters inserted into the right jugular vein. After 5 days the animals were fitted and the external end of the catheter was connected to a syringe-driven pump, then were placed in the self administration apparatus that had two lever (active, passive) for 2 hours every day. Active lever switched on the infusion pump for 10sec, injecting 1ml of saline or saline containing 5 mg/ml of morphine (training period was 10days). In one group of rats (n=6), ascorbic acid (500mg/kg.IP) were injected and its effects on auto-infusion of morphine were assessed.

Findings: Injection of ascorbate (500 mg/kg. IP) prevents the development of tolerance and dependence on morphine in rats.

Conclusion: Ascorbate can antagonized the reinforcing effect of morphine and can be used as an effective pharmacotherapy for morphine abuse specially when used with high dose.

Key words: Ascorbic acid, Morphine, Self administration, Addiction

چکیده

زمینه: اسید اسکوربیک یک ویتامین آنتی اکسیدان است که از انتهای نرون های گلوتامینرژیک مغز آزاد می شود و فعالیت دو سیستم دوپامینرژیک و گلوتامینرژیک را تنظیم می کند، این دو سیستم در وابستگی، تحمل و سندرم ترک اعتیاد دخالت دارند.

هدف: این مطالعه به منظور تعیین اثر اسید اسکوربیک بر خود تزریقی مرفین انجام شد.

مواد و روش ها: بعد از بی هوشی موش های نر (۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) یک کاتتر داخل ورید و داج راست آنها قرار داده می شد و بعد از طی دوران بهبودی (۵ روز) انتهای خارجی کاتتر به سرنگ متصل به پمپ وصل می شد، سپس حیوان برای مدت ۲ ساعت در داخل اتاقک خود تزریقی قرار می گرفت و با هر بار فشار دادن پدال فعال مقدار ۰/۱ میلی لیتر محلول سالین یا مرفین دریافت می کرد (طول دوره خود تزریقی ۱۰ روز بود). در یک گروه از موش ها (۶ سر) اسید اسکوربیک (۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق داخل صفاقی و اثر آن بر خود تزریقی مرفین مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که اسید اسکوربیک از وابستگی و تحمل به مرفین در موش جلوگیری می کند.

نتیجه گیری: اسید اسکوربیک از اثرات تشویقی مرفین جلوگیری می کند و اگر با مقادیر بالا استفاده شود می تواند در درمان معتادان موثر باشد.

کلید واژه ها: اسید اسکوربیک، مرفین، خود تزریقی، اعتیاد

* مربی و عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

** استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

*** دانشجوی دکتری فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۱. مقدمه :

ناحیه تگمنتوم شکمی مغز (Ventral Tegmental Area) به عنوان یکی از دو منبع مهم دوپامینرژیک مغز در خلق و خو و مراحل مختلف اعتیاد دخالت دارد. VTA یکی از نقاط مهمی است که مرفین می تواند از طریق آن رفتارهای وابسته به دوپامین را تشدید کند و تزریق مرفین به داخل این ناحیه باعث ایجاد بی دردی می شود. همچنین گزارش شده است که تزریق داخل سیاهرگی مرفین به حیوان، فعالیت نرون های دوپامینرژیک VTA را به شدت افزایش می دهد و باعث افزایش آزادسازی دوپامین و متابولیت های آن (HVA, Dopac) در هسته اکومینس می شود ولی چنانچه بعد از تزریق مرفین، نالوکسان به صورت دوطرفه در VTA تزریق شود از آزاد شدن دوپامین و متابولیت های آن در هسته اکومینس جلوگیری می کند و فعالیت نرون های دوپامینرژیک VTA را در موش های معتاد به شدت کاهش می دهد.^(۸و۹) شواهد زیادی نشان می دهد که نرون های دوپامینرژیک در مکانیسم های تشویقی اپیوئیدها نقش مهمی دارند؛ چرا که تزریق مرفین به حیوان باعث افزایش فعالیت الکتریکی این نرون ها در هسته اکومینس (NAC) برای مدت طولانی می شود و نیز تحریک گیرنده های میو و دلتا (دو گیرنده مهم مرفین که نقش زیادی در تشویق استفاده از مواد اپیوئیدی دارند) باعث افزایش آزادسازی دوپامین در NAC می شود؛ در حالی که تحریک گیرنده های کاپا که نقش زیادی در اجتناب از مصرف مواد مخدر دارد باعث کاهش آزادسازی دوپامین در NAC می شود.^(۱۰و۱۱)

از طرف دیگر مطالعات نشان می دهد که نرون های نورادرنرژیک لکوس سرلئوس (LC) نقش مهمی در ترک اعتیاد بازی می کنند؛ زیرا تزریق مرفین به حیوان باعث کاهش و مهار فعالیت الکتریکی نرون های LC و تزریق نالوکسان (برای ایجاد ترک اعتیاد) باعث افزایش فعالیت الکتریکی نرون های LC می شود و هم زمان رفتارها و علائم ترک اعتیاد ظاهر می شود.^(۱۱)

هنگام ترک اعتیاد بعد از تزریق نالوکسان غلظت اسیدگلوتامیک و اسید اسپارتیک در LC افزایش چشمگیری پیدا می کند و همزمان علائم ترک اعتیاد بروز می کند. چنانچه آنتاگونیست های گلوتامینرژیک به صورت داخل بطنی یا مستقیم به درون LC تزریق شود، از فعال شدن نرون های LC در موقع ترک اعتیاد و در نتیجه بروز علائم ترک اعتیاد ممانعت می کند.^(۱۲و۱۳)

از طرفی اسیداسکوربیک (ویتامین C) که یک ویتامین محلول در آب است در واکنش های بیوشیمیایی زیادی مشارکت دارد و حتی به تازگی مشخص شده است که این ماده نقش واسطه عصبی دارد. اسیداسکوربیک از انتهای نرون های گلوتامینرژیک در مغز آزاد می شود و فعالیت دو سیستم گلوتامینرژیک و دوپامینرژیک را تا حدود زیادی تنظیم می کند. در ضمن همین دو سیستم میزان آزاد شدن اسیداسکوربیک را به نوبه خود تنظیم می کنند.^(۱۳) گزارش ها نشان می دهد که اسیداسکوربیک با غلظت کم اثرات سیستم گلوتامینرژیک را تشدید می کند (احتمالاً از طریق افزایش میزان آزادسازی) و برعکس با غلظت بالا از طریق مسدود کردن گیرنده های گلوتامینرژیک، اثرات آن را به شدت کاهش می دهد.^(۱۳)

در رابطه با اثر آن بر سیستم دوپامینرژیک گزارش ها نشان می دهد که رفتارهای کلیشه ای که به وسیله آگونیست های دوپامینرژیک از جمله آمفتامین ایجاد می شود، به وسیله اسیداسکوربیک متوقف می شود و همین طور اثرات آنتاگونیست های دوپامینرژیک از جمله هالوپریدول به وسیله این ویتامین تشدید می شود.^(۱۳و۱۷)

نکته قابل توجه این است که اسیداسکوربیک با مقادیر بالا برای سیستم دوپامینرژیک و گلوتامینرژیک حکم آنتاگونیست و با مقادیر کم حکم آگونیست را دارد.

از آنجا که اسیداسکوربیک با مقدار زیاد بر روی دو سیستم گلوتامینرژیک و دوپامینرژیک مغز اثرات آنتاگونیستی دارد و از طرفی این دو سیستم در امر اعتیاد و ترک آن نقش مهمی دارند، احتمال آن زیاد است که

۴۵ میلی گرم به عنوان پاداش در اختیار حیوان قرار می گرفت و همزمان با آن یک لامپ قرمز روشن می شد که سبب تسریع در روند یادگیری می شد. همچنین با هر بار فشار دادن اهرم یک پمپ پرستالتیک به کار افتاده و مقدار ۰/۱ میلی لیتر محلول مرفین سولفات (یا نرمال سالین برای گروه شاهد) با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر در طول مدت ۱۰ ثانیه به داخل کانول گردنی تزریق می شد، ولی با فشار دادن پدال غیرفعال حیوان هیچ پاداشی دریافت نمی کرد. طول دوره گرسنگی قبل از شروع خودتزیقی برای مراحل بعدی به تدریج کاهش می یافت تا این که در روز پنجم عامل گرسنگی به طور کامل حذف می شد. در تمام طول آزمایش تعداد دفعات فشار دادن اهرم به وسیله کامپیوتر ثبت می گردید. (۱۴)

گروه‌های مورد آزمایش عبارت بودند از: گروه شاهد که پس از کانول گذاری با فشار دادن پدال به جای مرفین سولفات نرمال سالین دریافت می کرد؛ گروه معتاد که پس از کانول گذاری با فشار دادن پدال، مرفین سولفات دریافت می کرد و گروه آزمون که همزمان با طی دوره ایجاد اعتیاد، هر روز ۳۰ دقیقه قبل از قرار گرفتن در اطاقک دریافت مرفین، ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن اسیداسکوربیک داخل صفاقی دریافت می کرد. (۱۳)

برای مقایسه تعداد پدال‌های زده شده در هر روز در درون گروه‌ها و بین گروه‌ها از آزمون‌های آماری t و ANOVA استفاده و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

۱. یافته ها :

مقایسه تعداد پدال‌های فعال و غیرفعال زده شده در سه گروه شاهد، مرفین و مرفین به اضافه اسید اسکوربیک نشان داد که تعداد فشار دادن پدال‌های فعال و غیرفعال در گروه شاهد اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارد (نمودار شماره ۱).

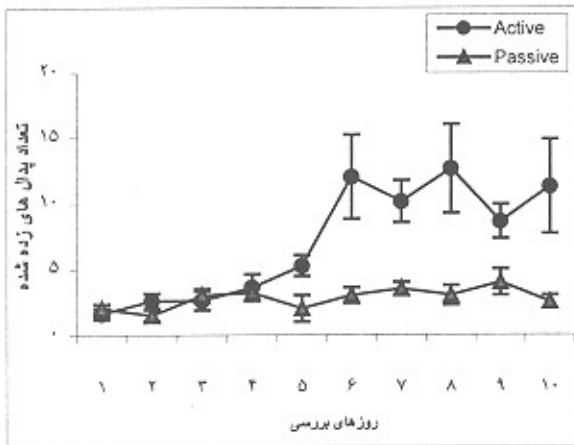
اسیداسکوربیک بتواند در مراحل مختلف اعتیاد به مرفین (تحمل و وابستگی) و ترک آن مؤثر واقع شود. به ویژه، مشخص شده است که اسیداسکوربیک با مقادیر زیاد می تواند درد و میزان مصرف اپیوئیدها را در بیماران سرطانی کاهش دهد. (۱۳ و ۱۴) لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر اسیداسکوربیک بر میزان مصرف مرفین به کمک روش خودتزیقی انجام شد.

۱. مواد و روش‌ها :

این مطالعه در سال ۱۳۸۰ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار به وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم به سه گروه تقسیم شدند و در هر گروه از ۸ تا ۱۰ حیوان استفاده شد. شرایط نگهداری به صورت چرخه شبانه‌روزی با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به همراه غذا و آب کافی در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد بود. برای ارزیابی میزان تمایل به مرفین از روش خودتزیقی (Self administration) در یک دوره ۱۰ روزه استفاده شد. (۱۴)

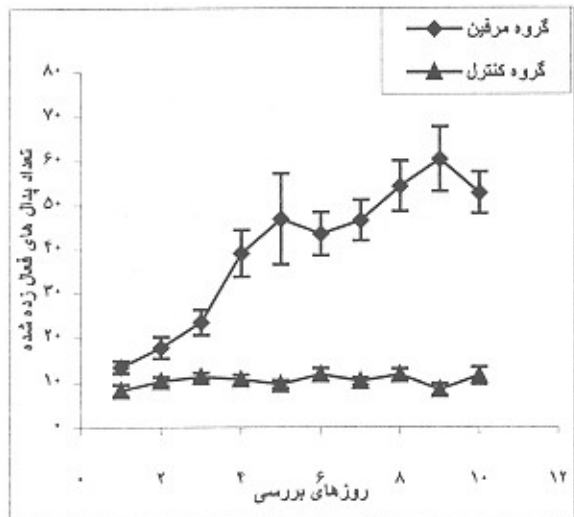
قبل از شروع آزمایش تمام حیوان‌ها با استفاده از کتامین (۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و رمپوان (۱/۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت تزریق داخل صفاقی بی هوش شدند. سپس با ایجاد شکاف کوچکی در ناحیه گردن و مشاهده ورید و داجی سمت راست، کانول لاستیکی با قطر ۲ میلی متر را در جهت قلب وارد ورید کرده و توسط گره ای از نخ سیلک ثابت می شد. بقیه کانول از پوست زیر گردن عبور داده و از پشت سر حیوان خارج می شد. بعد از کانول گذاری و طی دوره بهبودی (۵ روز) موش‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه‌داشته شده و آن‌گاه به مدت ۲ ساعت در روز در اطاقک خود تزریقی قرار داده می شدند. در دو طرف اطاقک دو اهرم (پدال فعال و غیرفعال) قرار داشت که با فشار دادن روی پدال فعال یک تکه غذا به وزن تقریبی

نمودار ۳- مقایسه تعداد پدال های فعال و غیر فعال زده شده در گروه مرفین + اسید اسکوربیک



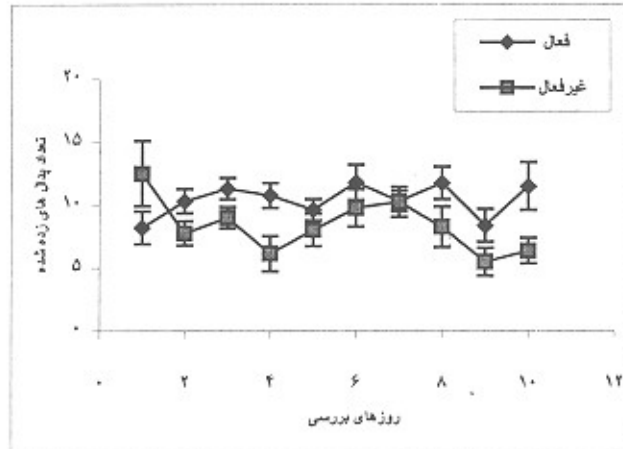
مقایسه تعداد فشار دادن پدال های فعال در بین سه گروه نشان داد تعداد فشار دادن پدال فعال در گروه مرفین بسیار بیشتر از گروه شاهد و اختلاف این دو معنی دار بود (نمودار شماره ۴).

نمودار ۴- مقایسه تعداد پدال های فعال زده شده در گروه مرفین و کنترل

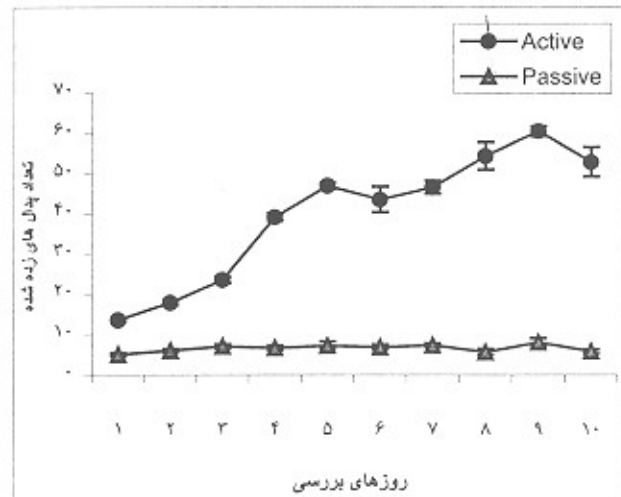


تعداد فشار دادن پدال های فعال در گروه مرفین بسیار بیشتر از گروه مرفین به اضافه اسید اسکوربیک و اختلاف این دو معنی دار بود (نمودار شماره ۵).

نمودار ۱- مقایسه تعداد پدال های فعال و غیر فعال زده شده در گروه کنترل (گروه سالین)



تعداد فشار دادن پدال فعال در گروه مرفین بسیار بیش تر از تعداد فشار دادن پدال غیر فعال و اختلاف بین آنها از نظر آماری معنی دار بود (نمودار شماره ۲).
نمودار ۲- مقایسه تعداد پدال های فعال و غیر فعال زده شده در گروه مرفین



اگرچه در روزهای اول تعداد فشار دادن پدال های فعال و غیر فعال در گروه مرفین به اضافه اسید اسکوربیک اختلاف معنی داری نشان نداد، ولی به تدریج با نزدیک شدن به روزهای آخر مطالعه اختلاف این دو معنی دار شد (نمودار شماره ۳).

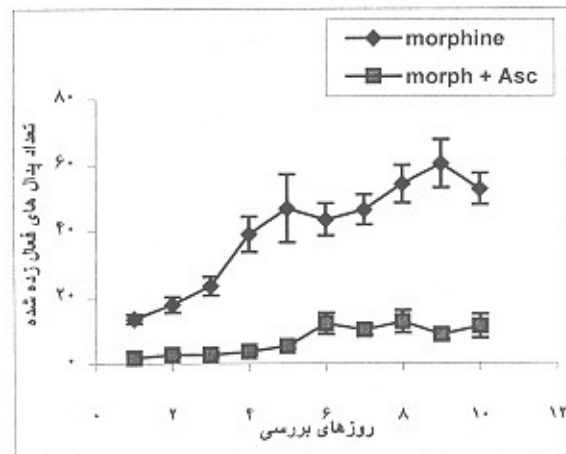
دست آوردن مرفین فشار داد و همین امر باعث اختلاف معنی دار این دو گروه شد.

بحث و نتیجه گیری :

به نظر می رسد اسیداسکوربیک با اثر آنتاگونیستی بر سیستم دوپامینرژیک و گلوتامینرژیک و عوارض جانبی غیر قابل توجه، در درمان معتادان مفید باشد. از این نظر نتایج این مطالعه با نتایج پژوهش‌هایی که نشان دادند در صورت استفاده از آنتاگونیست‌های دوپامینرژیک یا گلوتامینرژیک میزان وابستگی و تحمل به مرفین و در نتیجه میزان خود تزریقی مرفین کاهش می یابد، مطابقت دارد. (۱۵، ۱۰، ۱۴) همین طور با نتایج پژوهش‌هایی که نشان داده‌اند تخریب نورون‌های دوپامینرژیک منتهی به NAC باعث کاهش میزان خود تزریقی مرفین می شود، همخوانی دارد. (۱۶) البته برخی تحقیق‌ها نشان داده‌اند که تخریب نورون‌های دوپامینرژیک منتهی به NAC، بر خود تزریقی هروئین اثر ندارد و حتی مصرف مرفین را در موش افزایش می دهد. (۱۶، ۱۰)

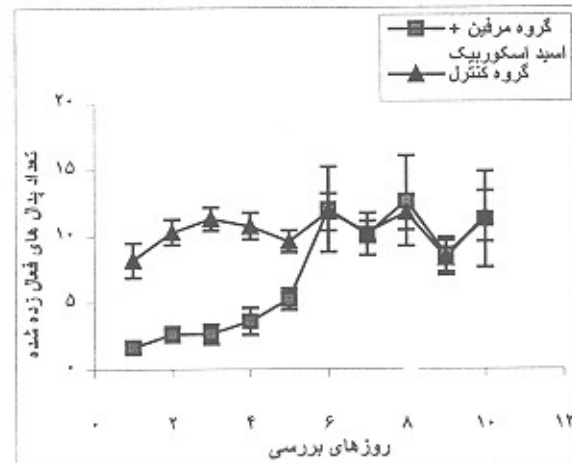
مطالعه حاضر مشابه مطالعه‌هایی است که نشان داده‌اند اسیداسکوربیک در برخی موارد می تواند به عنوان آنتاگونیست دو سیستم دوپامینرژیک و گلوتامینرژیک عمل کند. (۱۳) برخی تحقیق‌ها نشان داده اند که اسیداسکوربیک می تواند درد و میزان نیاز به مرفین را در بیماران سرطانی و همچنین (با مقادیر زیاد) بروز علائم ترک اعتیاد به هروئین را کاهش دهد که نتایج این تحقیق نیز این موارد را تأیید می کند. (۱۳، ۷، ۲) آنچه بیش از همه استنباط می شود این است که اسیداسکوربیک احتمالاً از طریق اثر بر دو سیستم دوپامینرژیک و گلوتامینرژیک میزان نیاز به مرفین را کاهش می‌دهد. هرچند سایر مکانیسم‌های احتمالی مانند جلوگیری از متابولیزه شدن اپیوئیدهای داخلی بدن به وسیله اسیداسکوربیک را نمی‌توان نادیده گرفت و این موضوع احتیاج به تحقیق بیش تر دارد.

نمودار ۵- مقایسه تعداد پدال های فعال زده شده در گروه مرفین و مرفین + اسید اسکوربیک



اگرچه در روزهای اول تعداد فشار دادن پدال فعال در گروه مرفین به اضافه اسیداسکوربیک و گروه شاهد اختلاف معنی داری نشان داد، ولی با نزدیک شدن به روزهای آخر مطالعه این اختلاف از بین رفت (نمودار شماره ۶).

نمودار ۶- مقایسه تعداد پدال های فعال زده شده در گروه کنترل و مرفین + اسید اسکوربیک



این مطالعه نشان داد تزریق داخل صفاقی اسیداسکوربیک به میزان ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن، باعث کاهش تمایل حیوان نسبت به مرفین شد. در نتیجه حیوان تعداد کمتری پدال فعال برای به

۱. مراجع :

1. Aghaghamian GK. Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus ceruleus. *Brian Res* 1994; 636(1): 1026-30
2. Evangelou A. Ascorbic acid effects on withdrawal syndrome of heroin abusers. *In vivo* 2000; 14(2): 636-6
3. Glick SD. Dopaminergic and cholinergic influence on morphine self administration in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1972; 12: 17-24
4. Gonzalez P. Decrease of tolerance to and physical dependence on morphine by glutamate receptor antagonist. *Eur J pharmacol* 1997; 332: 257-62
5. Grant S g. Buprenorphine and morphine produce equivalent increase in extracellular single unit activity of dopamine neurons in the ventral tegmental area in vine. *Synapse* 1994; 16(3): 181-7
6. Herz A. Opioid reward mechanisms a key role in drug abuse. *Cana J Pharmacology* 1998; 76(3): 252-8
7. Johnston PA. Chronic treatment with ascorbic acid inhibites in guina pigs. *Neurosci Lett* 1992; 135(1): 23-78
8. Manning BH. Morphine analgesia in the formalin test evidence for forbraine and midbrain site of action. *Neuroscience* 1994; 63(1): 289-94
9. Marinelli M. Dopamine dependent response to morphine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(13): 7742-7
10. Pettit H. Destruction of dopamine in the nucleus accumbense selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology* 1984; 84: 167-73
11. Rasmussen K. The role the locus ceruleus and NMDA and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 1995; 13(4): 295-300
12. Rasmussen K. Selection AMPA antagonist LY 293558 suppresses morphine withdrawal induce activation of locus ceruleus neurons and behavioral sign of morphine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 1996; 15: 497-505
13. Rebec G. A vitamin as neuromodulator, ascorbic acid release in to the extra cellular fluid of the brain regulate dopaminergic and glutaminergic transmission. *Prog Neurobiol* 1994; 43: 537-65
14. Robert DCS. Drug self administration. *Neurometodes. Human Presinc* 1992; 349-394
15. Smith SC. Haloperidol effects morphine self administration. *Psychol Rep* 1973; (23): 215-21
16. Smith JE. Effect of 6-OHDA lesion of the central medical nucleus accumbens on rat iv self administration. *Pharmacol Biochem Behave* 1985; 23: 843-9
17. Tolbert C. Stereo specific effects of ascorbic acid on D1 and D2 agonist binding. *Life Sci* 1992; 51: 921-30
18. Verma A. Role of D1/D2 dopamine and NMDA receptor in morphine tolerance and dependence in mice. *Eur Neuro Psycho Pharmacology* 1995; 5(2): 81-5