

اثر تزریق زیرجلدی مورفین بر فعالیت نورونهای هسته میخی شکل موش بزرگ آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۱۲/۹

تاریخ پذیرش مقاله : ۸۷/۹/۲

دکتر عباس حق پرست*، امیرمحمد علیزاده*، دکتر فرشته معتمدی*

* مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به مشابهت میان ماده خاکستری دور قناتی و هسته میخی شکل، هم در سطح فراساختاری و هم در سطوح عملی به نظر می رسد که این هسته نیز در بی دردی ناشی از تزریق مورفین نقش داشته باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی فعالیت نورونی هسته میخی شکل و پاسخ دهی آن به تزریق محیطی مورفین طراحی گردیده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه از ۹۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر سفید بالغ نژاد ویستار جهت بررسی الگوی فعالیت نورونی هسته میخی شکل در پاسخ به تزریق سیستمیک مورفین استفاده گردید. نرخ فعالیت نورونی (Firing rate) در چهار گروه: دست نخورده ($n=19$) جهت ثبت فعالیت خودبخودی (پایه)، گروه سالیین ($n=20$)، مورفین ($n=39$) و مورفین + نالوکسان ($n=12$)، پیش و پس از تزریق دارو به روش ثبت تک واحدی خارج سلولی بدست آمد. در هر گروه از Paired T-test استفاده گردید و $P < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که نرخ فعالیت در اکثریت نورونهای هسته میخی شکل پس از تزریق زیرجلدی مورفین ($3/8 \text{ mg/kg}$) کاهش می یابد. فعالیت نورونهای این هسته پس از تزریق مورفین ($6/66 \pm 0/67$ اسپایک بر ثانیه) به صورت معنی داری از فعالیت آنها پیش از تزریق مورفین ($12/47 \pm 1/84$ اسپایک بر ثانیه) و در مقایسه با گروه سالیین ($11/6 \pm 1/58$ اسپایک بر ثانیه) کمتر بود ($P < 0/01$). نرخ فعالیت و الگوی پاسخ دهی نورونهای این هسته پس از تزریق محیطی مورفین به وسیله نالوکسان زیرجلدی (2 mg/kg) معکوس گردید.

نتیجه گیری: بر اساس این شواهد می توان پیشنهاد کرد که تغییر در الگوی فعالیت خودبخودی نورون های هسته میخی شکل در پاسخ به تزریق محیطی مورفین ممکن است ناشی از اثر مستقیم مورفین بر گیرنده های اپیوئیدی موجود در هسته میخی شکل باشد. با این وجود نقش مسیرهای انتقال اطلاعات مربوط به درد و تعدیل کننده درد ناشی از اثرات ضد دردی مورفین نیز می تواند اهمیت داشته باشد. (مجله طبیب

شرق، دوره ۱۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۷، ص ۲۵۳ تا ۲۶۳)

کلید واژه ها: هسته میخی شکل، مورفین، فعالیت نورونی، ثبت تک واحدی، درد، موش بزرگ آزمایشگاهی

مقدمه

مدل های مختلف ایجاد دردهای حاد (آزمون پس کشیدن دم^۱ و صفحه داغ^۲ (۲-۴) و دردهای مزمن (آزمون فرمالین^۳ (۵-۷)، دردهای احشایی^(۸،۹) و دردهای نوروپاتی^(۱۰،۱۱)) است. اما چگونگی عکس العمل نواحی مختلف دستگاه عصبی مرکزی به

مسیرهای تعدیل کننده و مکانیسم های نورونی دخیل در بی دردی ناشی از مورفین در سطوح و ساختارهای مختلف مغزی، متفاوت و در بسیاری از موارد ناشناخته می باشند. به نظر می رسد مکانیسم های دخیل در مغز پیشین نقش مهمی در این زمینه داشته باشند.^(۱) مطالعات گذشته نشان دهنده مکانیسم های مختلف دخیل در اثرات ضددردی القاء شده توسط مورفین در

1. Tail-Flick test
2. Hot-Plate test
3. Formalin test

مشخص نیست که گیرنده های اوپیوئیدی مستقر بر روی نورون ها در هسته فوق در پاسخ به تزریق سیستمیک مورفین، چه نقشی ایفا می کنند. لذا مطالعه حاضر به منظور روشن نمودن پاسخ نورون های هسته میخی شکل در بی دردی ناشی از تجویز مورفین زیرجلدی با استفاده از تکنیک ثبت تک واحدی خارج سلولی^۸ طراحی و اجراء گردید.

روش کار

موش های بزرگ آزمایشگاهی سفید بالغ نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۳۵۰ گرم در حیوانخانه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با شرایط دمایی $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته در قفس هایی با جمعیت ۳ سر و دسترسی آزاد به خوراک موش و آب تازه نگهداری شدند. حیوانات قبل از انجام آزمایشات الکتروفیزیولوژی، حداقل به مدت یک روز تحت مرادده رفتاری با آزمایشگر قرار گرفته و به فرد مذکور خو گرفتند. تمامی آزمایشات فوق با تأییدیه کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و با توجه به راهنمای استفاده و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی منتشر شده توسط انستیتوی ملی سلامت ایالات متحده آمریکا (NIH Publications No. 80-23, revised 1996) انجام گرفت و از هر حیوان تنها یک بار استفاده شد. مورفین سولفات (تماد، ایران) و نالوکسان هیدروکلراید^۹ Sigma بطور جداگانه در نرمال سالین حل شده و به صورت زیرجلدی با حجم ۱ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن تزریق گردیدند. برای تهیه کانول تزریقی از سر سوزن دندانپزشکی شماره ۲۷ استفاده شد. تمامی این آزمایش ها در یک اتاق خلوت با دمای $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ انجام پذیرفتند.

در مطالعه فوق برای بررسی نرخ فعالیت^{۱۰} نورونهای هسته میخی شکل در شرایط پایه و پس از تزریق زیرجلدی مورفین از

تزریق مورفین سیستمیک ناشناخته می باشد. مطالعات رفتاری انجام شده بر اساس تکنیک میکرواینجکشن در مدل های درد حاد و مزمن، مناطقی از جمله نخاع، نواحی شکمی بصل النخاع در مغز پیشین، ماده خاکستری دور قناتی^۴ (PAG) مغز میانی و نواحی خلفی هیپوتالاموس را به عنوان نقاط کلیدی در این زمینه معرفی کرده اند.^(۵،۱۳،۱۴) به نظر می رسد که نواحی دیگری در مغز میانی نیز احتمالاً در بی دردی مورفین نقش دارند. مشابهت میان PAG و هسته میخی شکل^۵ (CnF)، هم در سطح فراساختاری^(۱۴) و هم در سطوح عملی^(۱۵)، مطرح کننده نقش این هسته در بی دردی ناشی از مورفین است.

هسته میخی شکل در ناحیه شکمی جانبی PAG در ناحیه مزانسفال واقع گردیده و بخشی از مسیر پائین رو تعدیل کننده درد می باشد. به علاوه، نورون های هسته CnF به نورونهای هسته سجافی بزرگ^۶ (NRM) عصب دهی می کنند. هسته NRM نقشی کلیدی در اتصال نخاعی مسیر پائین رو تعدیل کننده درد ایفا کرده و در بی دردی ناشی از مورفین بسیار پر اهمیت است. از طرفی ناحیه نوکی بصل النخاع شکمی میانی (RVM)^۷ رابط مهمی برای اتصال نواحی مختلف مغز میانی همچون PAG و CnF در ارتباط با اثرات ضددردی مورفین در نواحی فوق، محسوب می گردد.^(۱۶) مطالعات پیشین همچنین آشکار ساخته اند که هسته CnF^(۱۵،۱۷)، همچون PAG^(۱۳) و NRM^(۱۲،۱۸) نقش واضحی در درد حاد دارد. یک مطالعه رفتاری در آزمایشگاه ما نشان داد که تزریق مورفین به درون هسته میخی شکل به صورت معنی داری سبب کاهش رفتارهای درد حیوان (لیسیدن و تکان دادن پا) در فازهای حاد و مزمن آزمون فرمالین می شود.^(۱۹) مشاهدات بالا حاکی از نقش هسته میخی شکل در فرآیند بی دردی القاء شده توسط مورفین در مدل های مختلف ایجاد درد حاد و مزمن می باشد. با این وجود

8. Extracellular single unit recording

9. Naloxone Hcl

10. Firing rate

4. Periaqueductal gray matter

5. Cuneiformis nucleus

6. Nucleus raphe magnus

7. Ventromedial medulla

۳) در گروه مورفین جمعاً تعداد ۳۹ سر موش مورد آزمایش قرار گرفتند. در این گروه پس از ۱۵ دقیقه ثبت پایه از فعالیت نورونهای هسته میخی شکل، مورفین با دوز مؤثر ۵۰ درصد ($3/8 \text{ mg/kg}$) تزریق و برای مدت ۹۰ دقیقه ثبت به روش تک واحدی خارج سلولی انجام شد.

۴) گروه مورفین + نالوکسان. در این گروه از ۱۲ حیوان ثبت گرفته شد. پس از ۱۵ دقیقه ثبت از فعالیت خودبخودی نورونها، مورفین تزریق گردید و پس از نیم ساعت تزریق زیرجلدی نالوکسان (2 mg/kg) در ناحیه پشت گردن انجام گرفت.

در تمام گروههای فوق پس از دریافت امواج الکتریکی ناشی از فعالیت نورونی توسط میکروالکتروود فلزی و پری آمپلی فایر، امواج الکتریکی به یک آمپلی فایر Bandpass مدل WPI فرستاده و سیگنالهای ثبت شده ۱۰۰۰۰ بار تقویت و جهت حذف پارازیت های ناخواسته (Noise) فیلتر (10 KHZ) - 300 HZ گردیدند. سیگنالهای تقویت شده فیلتری برای نمایش به اوسیلوسکوپ منتقل شده و صدای آنها نیز پس از فیلتر شدن، قابل شنیدن شدند. در مرحله بعد سیگنال ثبتی به دستگاه موج بیز^{۱۶} مدل WPI منتقل گردید و در صورت تعدد امواج مشاهده شده، آزمایشگر اقدام به تعیین حدود دامنه امواج نموده و به وسیله دستگاه موج بیز، محدوده دامنه را به گونه ای تنظیم می کرد که فقط یک موج با دامنه مشخص و ثابت در این محدوده قرار گیرد. با قرار دادن یک پنجره برای دامنه امواج ثبتی، پتانسیل های مورد مطالعه یک واحد نورونی از دیگر نورونهای در حال ثبت با دامنه های متفاوت جدا گردیده و به جمع کننده اطلاعات سیگنالی^{۱۷} انتقال یافت. سیگنالهای جمع آوری شده به صورت on-line برای ثبت Peri-Stimulus Time Histogram و off-line برای دسته بندی اطلاعات ورودی به نرم افزار کامپیوتری تحت Windows فرستاده می شد. در این شرایط میزان و الگوی فعالیت نورونی پیش و پس

روش ثبت تک واحدی خارج سلولی استفاده شد. ۹۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی در این آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. در روز آزمایش، موش ها دست کم نیم ساعت پس از حضور در محیط آزمایشگاه با استفاده از تزریق داخل صفاقی اورتان ($1-1/5 \text{ g/kg}$) بیهوش شدند و پس از تراشیدن موی ناحیه سر و گردن، سر حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت شده و مراحل جراحی و برداشتن پوست و نسوج ناحیه فوقانی سر انجام شد. در مواردی که سطح هوشیاری حیوان رو به فزونی می گذاشت مقادیر تکمیلی اورتان ($0/1 \text{ g/kg}$) برای بالا بردن سطح بیهوشی تزریق می شد. مکان یابی هسته میخی شکل بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون^(۲۰) و با یافتن مختصات نقاط مبدأ (برگما^{۱۱} و لامبدا^{۱۲}) انجام پذیرفته و در نقطه یافت شده ($8/5-7/5$ میلیمتر عقب نسبت به برگما، $1/6-1/9$ میلیمتر در سمت راست و یا چپ خط وسط و $6/5-5/5$ میلیمتر عمق نسبت به سطح جمجمه) سوراخی به شعاع ۲ میلیمتر ایجاد می شد. میکروالکتروود فلزی ($3-7$ مگا اهم مقاومت؛ محصول شرکت هاروارد آمریکا) از جنس تنگستن^{۱۳} پس از برداشتن سخت شامه در محل سوراخ، به آرامی و با کمک یک پیش برنده میکرومتری به سمت هسته مذکور هدایت شد. گروه های آزمونی در این مطالعه، چهار گروه به قرار زیر بودند:

۱) ۱۹ سر موش دست نخورده^{۱۴} به عنوان گروه کنترل برای بدست آوردن فعالیت خودبخودی^{۱۵} نورون های هسته میخی شکل مورد آزمایش قرار گرفتند.

۲) گروه سالین: در این گروه ۲۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی پس از ۱۵ دقیقه ثبت فعالیت پایه، به صورت زیرجلدی سالین (1 ml/kg) دریافت کردند و سپس به مدت ۹۰-۶۰ دقیقه ثبت فعالیت نورونی به عمل آمد.

11. Bregma
12. Lambda
13. Tungsten
14. Intact
15. Spontaneous activity

16. Window discriminator
17. Data acquisition

از تزریق زیرجلدی مورفین، سالین و یا تجویز زیرجلدی نالوکسان در فواصل ۵-۱ دقیقه‌ای برای مدت ۹۰-۶۰ دقیقه بررسی گردید.

در این مطالعه در مجموع نرخ فعالیت ثبت شده از ۹۰ نوروں هسته میخی شکل (از هر حیوان فقط یک سلول)، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در پایان هر آزمایش، جهت تأیید بافت شناسی^{۱۸}، از شدت جریان ثابت (DC) مارکر آمپلی فایر WPI استفاده گردید و پس از پرفیوژن قلبی توسط فرمالین، سر حیوان جدا و مغز در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. پس از سفت شدن نسج مغزی برشهای ۱۰۰-۵۰ میکرونی تهیه و محل ثبت تأیید گردید (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار Graph pad Prism® ver. 5.0 انجام گرفت. داده های مربوط به نرخ فعالیت نورونی به عنوان تنها کمیت ثبت شده در این مطالعه به صورت میانگین \pm اشتباه معیار میانگین^{۱۹} (Mean \pm SEM) بیان گردیده است. جهت بررسی اثر تزریق مورفین، سالین و یا نالوکسان بر فعالیت نورونی هسته CnF قبل از تزریق و در فواصل ۵ دقیقه ای به مدت ۹۰-۶۰ دقیقه از ابتدای تزریق، در گروههای کنترل سالین و آزمونی (مورفین و نالوکسان)، از آزمون آماری آنالیز واریانس^{۲۰} (ANOVA) یک طرفه مدل Completely randomized استفاده گردید. جهت بررسی درون گروهی زمانهای متفاوت با یکدیگر از ANOVA مدل Repeated measures و در صورت معنی داری از پس آزمون توکی (Tukey) استفاده شد. جهت بررسی درون گروهی میانگین نرخ فعالیت نورونی، پیش و پس از تزریق دارو (مورفین، سالین و نالوکسان) در هر گروه از Student T-test مدل Paired استفاده گردید. جهت بررسی میانگین نرخ فعالیت نورونی بین دو گروه در یک مرحله (پیش یا پس از تزریق دارو از Student t-test مدل Unpaired استفاده شد. اختلاف داده

ها با احتمال کمتر از ($P < 0.05$) به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

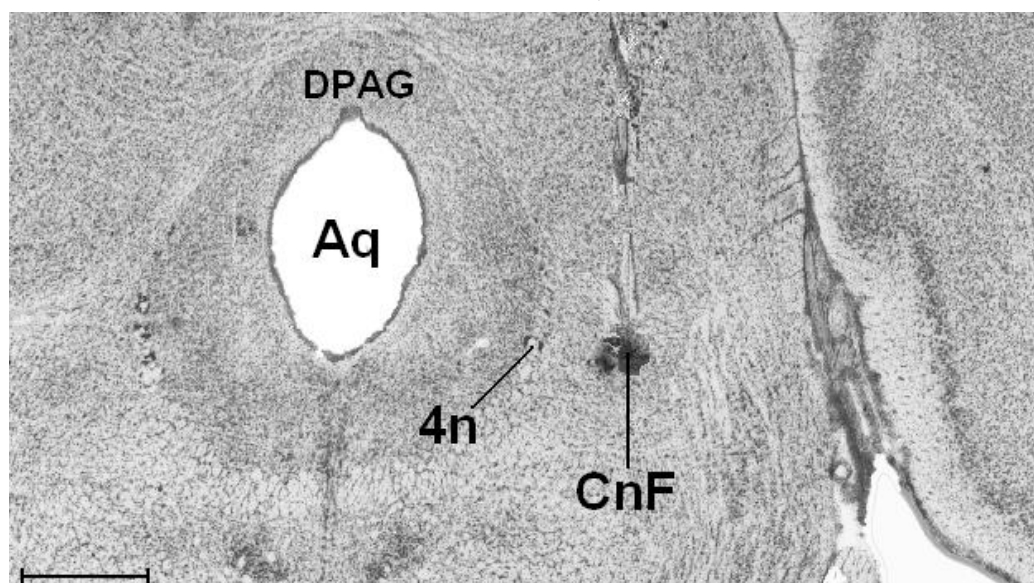
از ۱۹ نوروں گروه اول پس از بررسی پایداری روند ثبت الکتریکی آنها (۱۰ تا ۲۰ دقیقه)، ثبت فعالیت پایه به عمل آمد که به عنوان معیار و مرجع فعالیت طبیعی نورونهای هسته CnF در طول یک ساعت مدنظر قرار گرفت. میانگین نرخ فعالیت پایه در نورونهای فوق در طول یک ساعت $0.93 \pm 12/05$ اسپایک در ثانیه (شکل ۲) بود. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که اختلاف معنی داری در میان هیچ یک از نقاط ۵ دقیقه‌ای ثبت پایه در طول زمان یک ساعته وجود نداشت. از طرفی، نتایج در این مرحله نشان داد که فعالیت خودبخودی نورونهای هسته CnF در برخی از موارد کمتر از یک اسپایک در ثانیه (۰/۷۸) و در مواردی بیش از ۳۷ اسپایک در ثانیه (۳۷/۴) بوده است. در مطالعه فوق نورونهای این هسته غالباً اسپایکهایی با شکل موج دو فازی نشان دادند که پهنای این امواج بین ۱/۲ تا ۳/۴ میلی ثانیه و دامنه ۷۰۰-۱۰۰ میکروولت بود. اکثریت نورونهای هسته میخی شکل (۶۷/۵٪) بسامد تحریکی بین ۱۲-۱۰ اسپایک بر ثانیه داشتند. لازم به ذکر است که ۱۸ درصد نوروں های این هسته دارای نرخ فعالیت پایه بالاتر و حدود ۱۴/۵ درصد از نورونها نرخ فعالیتی کمتر از ۱۰ اسپایک بر ثانیه داشتند.

در گروه سوم پس از پایداری فعالیت نورونی (۱۵-۳۰ دقیقه) و ثبت فعالیت پایه به مدت ۱۵ دقیقه، مورفین به صورت زیرجلدی با دوز ۳/۸ میلیگرم به ازای کیلوگرم وزن موش تجویز و حتی الامکان به مدت ۹۰ دقیقه فعالیت نورونی ثبت گردید (شکل ۳-۳A). در این مرحله از ۳۹ نوروں ثبت به عمل آمد و بارزترین اثر مورفین کاهش فعالیت الکتریکی نورونهای هسته میخی شکل بود. شکل ۳-۳B، میانگین فعالیت نورونهای این هسته را پیش و پس از تزریق مورفین در طول ۱۰۵ دقیقه (۱۵ دقیقه ثبت پایه و ۹۰ دقیقه ثبت الکتریکی پس از تزریق مورفین)

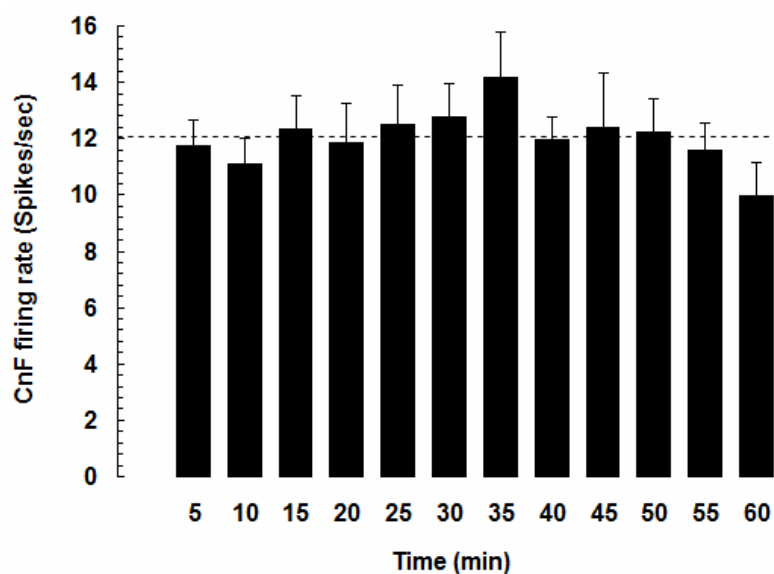
18. Histological verification
19. Standard error of mean
20. Analysis of Variance

به ذکر است که تجزیه و تحلیل آماری نشان داده است که فعالیت نورونهای هسته میخی شکل پس از تزریق مورفین ($6/66 \pm 0/67$ اسپایک بر ثانیه) به صورت معنی داری کمتر از فعالیت آنها در مقایسه با گروه سالین ($11/6 \pm 1/58$ اسپایک بر ثانیه) بود ($P < 0/01$). در حالی که تفاوت معنی داری در نرخ فعالیت نورونهای این گروه، پیش از تزریق مورفین ($12/47 \pm 1/84$ اسپایک بر ثانیه) در مقایسه با نرخ فعالیت نورونی پیش از تزریق سالین ($11/87 \pm 1/25$ اسپایک بر ثانیه) و نرخ فعالیت در گروه کنترل ($12/05 \pm 0/93$ اسپایک بر ثانیه) مشاهده نشد. آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که میانگین نرخ فعالیت نورونهای هسته میخی شکل پس از تزریق مورفین در مقایسه با فعالیت پایه، فعالیت نورونی گروه سالین و گروهی از حیوانات که نالوکسان دریافت کرده بودند، به طور معنی داری کاهش یافته است. ($P = 0/0036$)

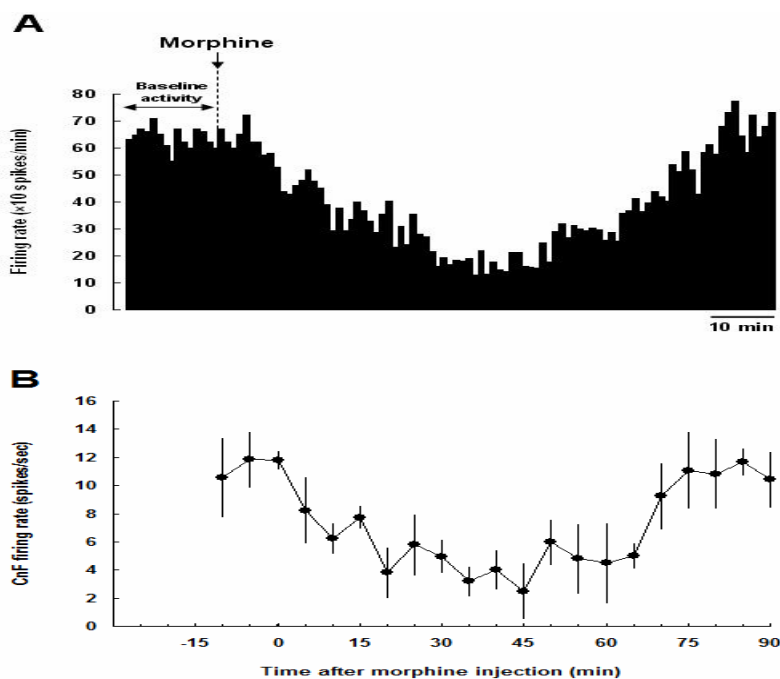
نشان می دهد. در این آزمایش، شروع اثر مورفین بین ۸ تا ۱۹ دقیقه و بیشینه اثر این ماده ۲۱ تا ۵۲ دقیقه پس از تزریق مشاهده شد (شکل ۴). به علاوه، درصد بازدارندگی در اکثریت نورونها بیش از ۶۰ درصد بود درحالیکه در ۹ نورون تغییرات کمتری در فعالیت الکتریکی نورونها پس از تزریق مورفین، رخ داد. بیشینه توان بازدارندگی مورفین بر فعالیت نورونهای هسته CnF در حدود $89/8 \pm 5/76$ درصد و میانگین آن در این مطالعه $47/5 \pm 7/7$ درصد بود. از طرفی در گروه سالین به عنوان گروه کنترل هیچ گونه تغییر معنی داری پیش و پس از تزریق در فعالیت الکتریکی نورونهای هسته CnF مشاهده نشد. در گروه چهارم، تزریق زیرجلدی نالوکسان (2 mg/kg)، نیم ساعت پس از تزریق مورفین توانست تقریباً بلافاصله (حدود ۲ دقیقه پس از تزریق) اثر مهار مورفین بر فعالیت نورونی را به صورت نسبی (۲ نورون) و یا به شکلی کامل (۱۰ نورون) معکوس نماید. لازم



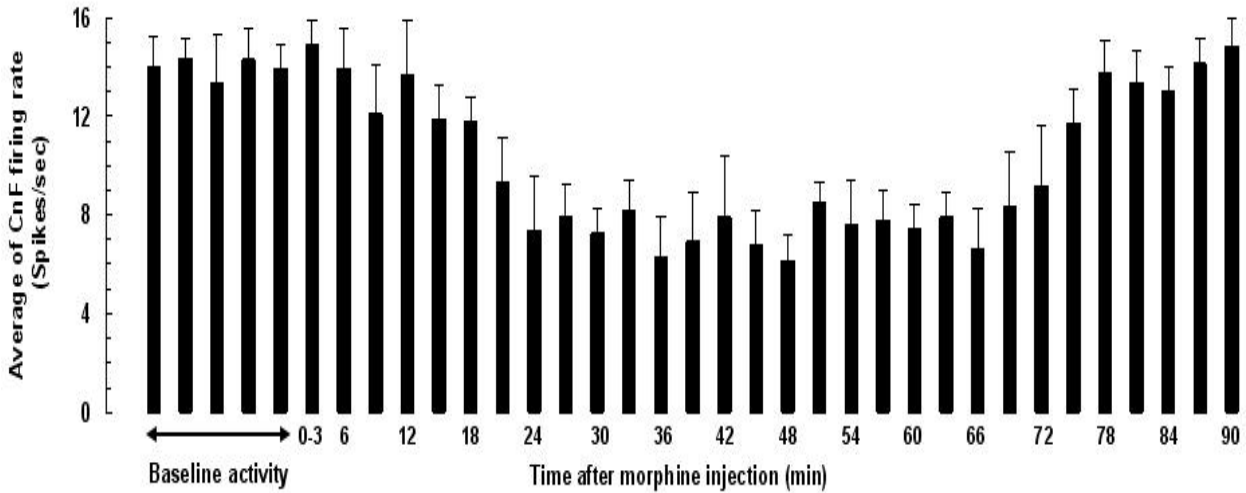
نمودار ۱. فتومیکروگراف از یک نمونه مقطع نامیه ثبت گرفته شده از هسته میخی شکل موش بزرگ آزمایشگاهی. در این تصویر، مملی که به روش تفریب الکتریکی نشان گذاری شده است، نامیه ای است که نوک الکتروود در آنها قرار داشته و فعالیت نورونی آن ثبت گردیده است. این مقطع عرضی بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (۲۰۰۵)، در فاصله ۸/۳ میلیمتر نسبت به برگما و ۱/۷ میلیمتر در یک سمت فم وسط قرار دارد. 4n: عصب زوج چهارم مغزی، Aq: قنات سیلویوس، CnF: هسته میخی شکل، DPAG: بفش پشته ماده فاکستری دور قناتی. مقیاس وامد: ۷۵۰ میکرومتر



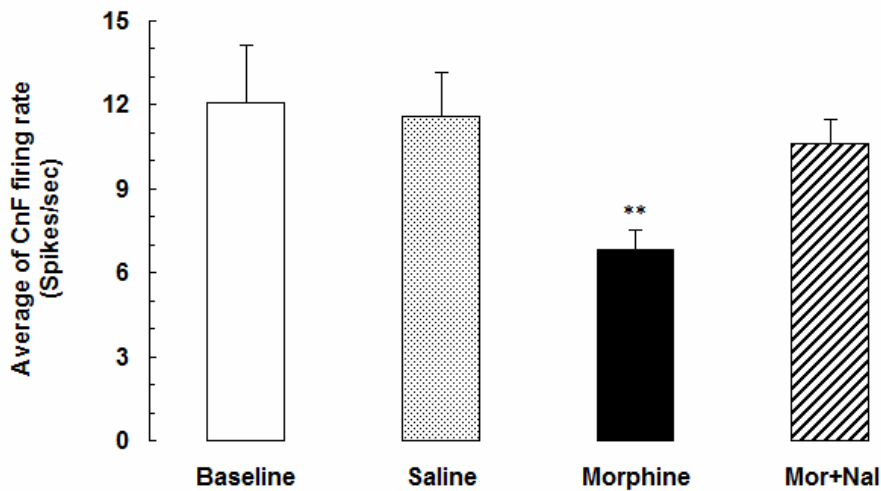
نمودار ۲. میانگین نرخ فعالیت پایه نورونهای هسته میخی شکل در فواصل ۵ دقیقه‌ای برای مدت یک ساعت در موش های بزرگ آزمایشگاهی کنترل (n=۱۹). خط ممتد بیانگر میانگین نرخ فعالیت پایه بوده و هر نقطه زمانی مربوط به ۱۴ تا ۱۹ نورون است.



نمودار ۳. (A) یک نمونه الگوی پاسخ دهی نورونی در هسته میخی شکل به مورفین زیرجلدی در فاصل ۹۰ دقیقه ثبت تک وامدی خارج سلولی. (B) میانگین نرخ فعالیت نورونهای هسته میخی شکل، پیش و پس از تزریق زیرجلدی مورفین (n=۳۹) در فواصل ۵ دقیقه‌ای.



نمودار ۴. اثر تزریق زیرجلدی مورفین بر فعالیت نورونهای هسته میخی شکل. میانگین نرخ فعالیت نورونهای هسته میخی شکل مناسبه شده در فواصل ۳ دقیقه‌ای برای مدت ۹۰ دقیقه پس از تزریق زیرجلدی مورفین در ۲۷ تا ۳۹ نورون در هر نقطه زمانی از ۳۲-۳۹ سر موش بزرگ آزمایشگاهی. پانزده دقیقه پس از ثبت پایه، مورفین به روش زیرجلدی تزریق گردید. اثر مورفین پس از مدت ۶۰-۷۵ دقیقه کاهش یافت که می‌تواند به دلیل مدت زمان اثر آن باشد.



نمودار ۵. میانگین نرخ فعالیت نورونهای هسته میخی شکل در گروههای کنترل و آزمون. در گروهی که ۳۰ دقیقه پس از تزریق زیرجلدی مورفین و نالوکسان زیرجلدی دریافت کرده بودند (مورفین + نالوکسان)، اثر کاهش مورفین بر نرخ فعالیت نورونی هسته میخی شکل به طور معکوسی به نرخ فعالیت پایه بازگردانده شد. $P < 0.01^{**}$

بحث

این مطالعه نشان داد که تجویز سیستمیک مورفین باعث کاهش قابل توجهی در فعالیت خودبخودی نورونهای هسته میخی شکل می‌شود. داده‌های حاضر در کنار شواهدی که گویای همین اثر مورفین در صورت تزریق مستقیم به درون هسته

این مطالعه برای نخستین بار به بررسی پاسخ‌های نورونی هسته میخی شکل در پاسخ به تزریق سیستمیک (زیرجلدی) مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی نریهوش با استفاده از روش ثبت تک واحدی خارج سلولی پرداخته است.

در نهایت، نتایج مطالعات ما حاکی از آن است که مهار فعالیت خودبخودی نوروئهای هسته CnF در اثر مورفین می تواند به علت فعال شدن گیرنده های اوپیوئیدی در این ناحیه و یا سیستم های ضد درد درونزاد در نواحی دیگر سیستم عصبی مرکزی که ورودیهایی به هسته میخی شکل دارند، رخ داده باشد و یا اینکه به صورت غیر مستقیم و به دلیل فعال کردن مسیرهای پائین رو تعدیل کننده که ورودی های نخاعی را مهار می کنند باشد. ما گمان می کنیم که انتقالات اوپیوئیدرژیک در هسته میخی شکل موش بزرگ آزمایشگاهی نقش مهمی در ایجاد بی دردی مورفین بر عهده داشته باشند.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید که بدین وسیله از حمایت های مادی و معنوی آن مرکز سپاسگزاری می شود.

میخی شکل، انجام آزمون پس کشیدن دم^(۱۷) و آزمون فرمالین^(۱۹) هستند، حاکی از عملکرد هسته CnF به عنوان یکی از نقاط دخیل در اثرات ضد درد ناشی از مورفین برای کاهش دردهای حاد و مزمن می باشند. احتمال دیگری نیز در این زمینه مطرح است؛ شاید مورفین عملکرد خود را در ناحیه دیگری از دستگاه عصبی مرکزی انجام داده و این عمل سبب رهائش اوپیوئیدهای درونزا در هسته میخی شکل و باعث بی دردی ناشی از مورفین شود.^(۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۲) به علاوه هسته میخی شکل ورودی هایی را از هسته های RVM و PAG دریافت می کند^(۲۳-۲۵) و نقش نواحی فوق در اثرات ضد درد مورفین در آزمون پس کشیدن دم و آزمون فرمالین^(۲۲، ۲۶، ۲۷) نشان داده شده است. به نظر می رسد این یافته ها در زمینه بازدارندگی فعالیت نوروئهای CnF به وسیله مورفین، با توضیحات بالا در مورد اثر ضد درد این ماده در این نواحی، همخوانی داشته باشد. اما اینکه چگونه این نواحی برای القای اثر بی دردی تزریق مورفین سیستمیک با یکدیگر وارد تعامل می شوند، روشن نبوده و به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

References

1. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci.* 1984;7:309-38.
2. Chow LH, Huang EY, Ho ST, et al. Dextromethorphan potentiates morphine-induced antinociception at both spinal and supraspinal sites but is not related to the descending serotonergic or adrenergic pathways. *J Biomed Sci.* 2004;11:717-25.
3. Svokos K, Nalwalk JW, Leurs R, et al. A role for spinal, but not supraspinal, alpha(2) adrenergic receptors in the actions of impropgan, a powerful, non-opioid analgesic. *Brain Res.* 2001;923:12-9.
4. Wesolowska A, Young S, Dukat M. MD-354 potentiates the antinociceptive effect of clonidine in the mouse tail-flick but not hot-plate assay. *Eur J Pharmacol.* 2004;495:129-36.
5. Manning BH, Morgan MJ, Franklin KB. Morphine analgesia in the formalin test: evidence for forebrain and midbrain sites of action. *Neuroscience.* 1994;63:289-94.

6. Morgan MJ, Franklin KB. 6-Hydroxydopamine lesions of the ventral tegmentum abolish D-amphetamine and morphine analgesia in the formalin test but not in the tail flick test. *Brain Res.* 1990;519:144-9.
7. Zhao M, Li Q, Tang JS. The effects of microinjection of morphine into thalamic nucleus submedialis on formalin-evoked nociceptive responses of neurons in the rat spinal dorsal horn. *Neurosci Lett.* 2006;401:103-7.
8. Friedrich AE, Gebhart GF. Effects of spinal cholecystinin receptor antagonists on morphine antinociception in a model of visceral pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292:538-44.
9. Ji Y, Murphy AZ, Traub RJ. Sex differences in morphine-induced analgesia of visceral pain are supraspinally and peripherally mediated. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291:307-14.
10. Ossipov MH, Lai J, Malan TP, et al. Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;909:12-24.
11. Yamamoto T, Sakashita Y. Differential effects of intrathecally administered morphine and its interaction with cholecystinin-B antagonist on thermal hyperalgesia following two models of experimental mononeuropathy in the rat. *Anesthesiology.* 1999;90:1382-91.
12. Dickenson AH, Oliveras JL, Besson J M. Role of the nucleus raphe magnus in opiate analgesia as studied by the microinjection technique in the rat. *Brain Res.* 1979;170:95-111.
13. Mohrland JS, Gebhart GF. Effects of focal electrical stimulation and morphine microinjection in the periaqueductal gray of the rat mesencephalon on neuronal activity in the medullary reticular formation. *Brain Res.* 1980;201:23-37.
14. Gioia M, Bianchi R. Ultrastructural study of the nucleus Cuneiformis in the cat. *J Hirnforsch.* 1987;28:375-83.
15. Haghparast A, Gheitani I P, Lashgari R. Involvement of glutamatergic receptors in the nucleus cuneiformis in modulating morphine-induced antinociception in rats. *Eur J Pain.* 2007;11:855-62.
16. Pan ZZ, Fields HL. Endogenous opioid-mediated inhibition of putative pain-modulating neurons in rat rostral ventromedial medulla. *Neuroscience.* 1996;74:855-62.
17. Haghparast A, Soltani-Hekmat A, Khani A, et al. Role of glutamatergic receptors located in the nucleus raphe magnus on antinociceptive effect of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis of rat. *Neurosci Lett.* 2007;427:44-9.
18. Du HJ, Kitahata LM, Thalhammer JG, et al. Inhibition of nociceptive neuronal responses in the cat's spinal dorsal horn by electrical stimulation and morphine microinjection in nucleus raphe magnus. *Pain.* 1984;19:249-57.

19. Haghparast A, Esmaeili A. Effects of morphine and lidocaine administration into the cuneiformis nucleus of rats on acute and chronic pain modulation by formalin test. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2007;14(1):5-12.
20. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego. 2005; 40-144.
21. Beitz AJ. The nuclei of origin of brain stem enkephalin and substance P projections to the rodent nucleus raphe magnus. *Neuroscience*. 1982; 7:2753-68.
22. Spinella M, Cooper M L, Bodnar R J. Excitatory amino acid antagonists in the rostral ventromedial medulla inhibit mesencephalic morphine analgesia in rats. *Pain*. 1996;64:545-52.
23. Richter RC, Behbehani MM. Evidence for glutamic acid as a possible neurotransmitter between the mesencephalic nucleus cuneiformis and the medullary nucleus raphe magnus in the lightly anesthetized rat. *Brain Res*. 1991;544:279-86.
24. Zemlan FP, Behbehani MM. Afferent projections to the nucleus cuneiformis in the rat. *Neurosci Lett*. 1984;52:103-9.
25. Zemlan FP, Behbehani MM. Nucleus cuneiformis and pain modulation: anatomy and behavioral pharmacology. *Brain Res*. 1988;453:89-102.
26. Gilbert AK, Franklin KB. The role of descending fibers from the rostral ventromedial medulla in opioid analgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002;449:75-84.
27. Puig S, Rivot JP, Besson JM. Effect of subcutaneous administration of the chemical algogen formalin, on 5-HT metabolism in the nucleus raphe magnus and the medullary dorsal horn: a voltammetric study in freely moving rats. *Brain Res*. 1992;590:250-4.

Effect of Subcutaneous Morphine Injection on Neuronal Activity in the Nucleus Cuneiformis of Rat

Haghpourast A, PhD*; Alizadeh A.M, BSc*; Motamedi F, PhD*

Received: 28 /Feb/2008

Accepted: 22/Nov /2008

Background: *The similarities between periaqueductal gray matter and the nucleus cuneiformis in both ultrastructural and functional levels suggest that this nucleus may play an important role in the morphine-induced analgesia. This study was designed to determine neuronal activity and responsiveness to peripheral morphine administration in the nucleus cuneiformis of rat.*

Materials and Methods: *In this study, neural activity of cuneiform neurons in response to peripheral administration of morphine was recorded by extracellular single unit recording technique. Firing rate of neurons was recorded in four groups: intact group (n=19) to determine the spontaneous (baseline) activity, saline group (n=20), morphine group (n=39) and morphine + naloxone group (n=12), before and after drug administration.*

Results: *Our findings showed that the firing rate in majority of cuneiform neurons decreased after morphine (3.8 mg/kg; SC) administration. Activity of neurons (n=39) in the cuneiform neurons was reduced significantly ($P<0.01$) after morphine injection (6.66 ± 0.67 spike/sec) in comparison with pre-injection time (12.47 ± 1.84 spike/sec) and the saline group (11.6 ± 1.58 spike/sec). The firing rate and response pattern of many of neurons in response to peripheral application of morphine were reversed after naloxone injection (2 mg/kg; SC) in this nucleus.*

Conclusion: *Based on the above findings, we suggest that the changes of activity pattern in spontaneous activity of cuneiform neurons in response to peripheral administration of morphine maybe resulted from direct action of morphine on opioid receptors in the nucleus cuneiformis. Nevertheless, the role of pain transmission and modulation pathways are still important in the antinociceptive effect of morphine as well.*

KEY WORDS: *Nucleus cuneiformis; Morphine; Neural activity; Single unit recording; Pain; Rat*

*Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.