مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و هفتم (۱۳۸۰) شماره ۲ (۱۷۱-۱۶۳)

پاسخ متفاوت موشهای Balb/c به مورفین و نالوکسان روی گلوکز خون

حمیدرضا مؤمنی – دکتر سید محمدعلی شریعت زاده
گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اراک
(دریافت: ۷۹/۱۰/۲ ؛ پذیرش: ۸۰/۳/۹)

چکیده

در این پژوهش تغییرات گلوکز خون حاصل از تزریق دوزهای مختلف مورفین (۵-۱۲۰mg/kg) به صورت زیرجلدی بر روی موشها مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که تزریق مورفین موجب بروز پاسخ هایپوگلیسمی در موش‌ها می‌شود. نتایج این کار با آخرین گزارش‌هائی که اثرات هایپرگلیسمی مورفین را مطرح می‌کنند کاملاً متفاوت می‌باشد و این تفاوت احتمالاً مربوط به نوع و نژاد حیوانی است که مورد استفاده قرارگرفته است. استعمال نالوکسان بصورت داخل صفاقی (۱ mg/kg) پاسخ هایپوگلیسمی موشهای مورد تأثیر بوسیله مورفین (۲۰mg/kg) بصورت زیرجلدی را بطور معنی داری مهار می‌نماید که نشان دهندهٔ تاثیر سیستم اوپیوئید opioid و دخالت گیرنده‌های این سیستم در این پدیده می‌باشد. دلیل هایپوگلیسمی حاصل از تزریق مورفین احتمالاً مربوط به تاثیر سیستم اوپیوئیدی از طریق سیستم‌های عصبی دیگر و تحریک پانکراس و افزایش ترشح انسولین از این غده می‌باشد. پدیده های رفتاری شناخته شده مورفین مثل افزایش فعالیت حرکتی و برافراشتگی دم Straub tail نیز در این نژاد از موشها بطور مشخص بروز کرد و این پاسخها بوسیله نالوکسان مهار شدند.

واژه‌های کلیدی: *نالوکسان – گلوکز خون – هایپوگلیسمی – هایپرگلیسمی*

مقدمه

مورفین یکی از مشتقات فنانترنی آلکالوئیدهای موجود در تریاک می‌باشد که از خاصیت ضد دردی و مخدری برخوردار است. مورفین بعنوان مهمترین آلکالوئید تریاک در نظر گرفته می‌شود که به مقدار زیاد در آن موجود است و عمل تریاک بیشتر مربوط به این آلکالوئید می‌باشد.

بر اساس اعمال فارماکولوژیک گیرنده‌های اوپیوئید در سیستم اعصاب مرکزی و محیطی شناسائی شده‌اند و بصورت μ (مو) δ (دلتا) و κ (کاپا) بیان می‌شوند. در حال حاضر هر سه گیرنده اصلی کلون شده‌اند و زیرگروههائی بصورت μ_1، μ_2، δ_1، δ_2، κ_1، κ_2، κ_3 برای این تقسیم‌بندی عنوان شده است. نالوکسان یکی از آنتاگونیست‌های اختصاصی شبه تریاکی است و از مشتقات مورفین می‌باشد این ماده تمایل نسبتاً شدیدی برای اتصال به گیرنده (مو) دارد و تمایل آن برای پیوند با گیرنده‌های دیگر کمتر است (Katzung, 1998).

تا به حال خواص فارماکولوژیکی زیادی در مورد مورفین در خصوص اثرات ضد دردی، خواب، حافظه، یادگیری، پدیده‌های رفتاری و غیره شناسائی شده است.

برخی شواهد موجود حاکی از اثرات هایپرگلیسمی مورفین در طی تجویز زیر جلدی، داخل صفاقی و داخل وریدی است (Ali, 1995; Johansem *et al.*, 1993; Lux *et al.*, 1988; May *et al.*, 1998; Surwit *et al.*, 1989). اما مطالعه حاضر حاکی از اثرات متفاوت مورفین زیرجلدی روی گلوکز خون موشها می‌باشد. البته شواهدی دال بر اثرات هایپوگلیسمی مورفین داخل نخاعی وجود دارد(Brase, 1990; Brase *et al.*, 1991; Lux *et al.*, 1988).

عقیده کلی بر این است که تریاک اثر سودمندی در بیمارانی که از دیابت ملیتوس Mellitus رنج می‌برند دارد از طرفی بر اساس اظهارات افراد مصرف کننده تریاک، بعد از مصرف آن تمایلی برای مصرف شیرینی در فرد بوجود می‌آید که احتمالاً ناشی از هایپوگلیسمی ناشی از مصرف تریاک در این افراد است. مقایسه نتایج تحقیقات قبلی دیگران که حاکی از اثر هایپرگلیسمی مورفین می‌باشد و این اظهارات، ما را برای مطالعه اثر مورفین بر روی این نژاد از موشها که برای اولین بار صورت می‌گیرد تشویق نمود.

مواد و روشها

موش‌های سفید کوچک از جنس نر و نژاد Balb/c از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. این موشها در اتاق حیوانات در درجه حرارت ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره‌های نور کنترل شده (۱۲ ساعت روشنای ۱۲ ساعت تاریکی) در قفس نگهداری می‌شدند. غذا بصورت آماده و

آب به اندازه کافی در اختیار آنها قرار می‌گرفت. موش‌های مورد آزمایش با میانگین وزنی ۲۷ تا ۳۵ گرم مورد آزمایش قرار می‌گرفتند.

داروهای مصرف شده شامل مورفین سولفات (تهیه شده از شرکت تولید مواد اولیه دارو پخش) بعنوان آگونیست گیرنده‌های اوپیوئیدی و نالوکسان (تهیه شده از شرکت سهامی تولید دارو) بعنوان آنتاگونیست این گیرنده‌ها می‌باشند. این داروها در زمان استفاده به اندازه مصرف در 10ml سالین استریل حل و با دوزهای مورد نظر به حیوانات تزریق می‌شد. تزریق مورفین بصورت زیرجلدی (S.C) و نالوکسان به روش داخل صفاقی (I.P) صورت گرفت.

موش‌های نر مورد آزمایش در گروههای ۸ تایی تقسیم و توسط قفس از اتاق حیوانات به آزمایشگاه انتقال یافته و بعد از گذشت زمان ۱۵ دقیقه به منظور عادت کردن حیوانات با محیط جدید تجربیات آغاز می‌شدند. نمونه‌های خونی در فواصل زمانی مناسب از سینوس چشمی Retro orbital sinus به روش Stone (Stone,1953) توسط میکروپیپت (200µl) قبل از تزریق دارو یا سالین به منظور تعیین سطح پایه‌ای گلوکز و در زمانهای مختلف ۶۰، ۳۰، ۱۲۰، ۱۸۰ دقیقه بعد از تزریق به منظور بررسی اثرات دارو گرفته می‌شد. نمونه‌های خون بدست آمده به لوله‌های محتوی تری‌کلرواستیک اسید انتقال یافته و بدین ترتیب دپروتئینه می‌شدند. لوله‌ها به سانتریفوژ منتقل و سپس مایع صاف شده برای اندازه‌گیری میزان گلوکز خون مورد استفاده قرار می‌گرفت. بدین ترتیب برای اندازه‌گیری گلوکز خون از محلول صاف شده خون تام استفاده گردید و مقدار گلوکز خون در محلول صاف شده به روش ارتوتولوئیدین سنجش می‌شد (Dubowski,1982). مقدار رنگ تولید شده در نمونه‌های مورد آزمایش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil 4400) با طول موج 630nm اندازه‌گیری و با شدت رنگ تولید شده توسط محلول استاندارد گلوکز مقایسه شد. در سراسر تجربیات آب و غذا به اندازه کافی در دسترس حیوانات قرار داشت.

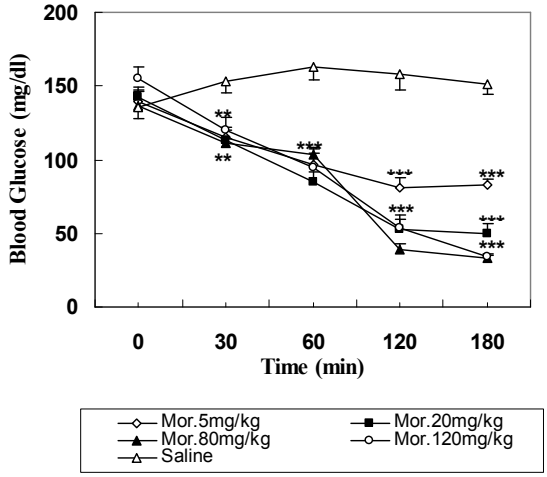
برای بررسی نتایج با استفاده از کامپیوتر و نرم افزار SPSS مقایسه بین گروه‌های مختلف مورد آزمایش انجام شد و سپس از طریق آزمون (Mann-Whitney-U-Wilcoxon Rank Sum) محاسبات آماری بعمل آمد و بین گروههائی که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت آنالیز واریانس دو طرفه انجام شد و ارتباط معنی‌دار بین دوز و زمان و تاثیر متقابل این دو عامل مورد تأیید قرار گرفت ($P\text{-}V<0.01$, $P<0.001$) و در تمام این حالات $\alpha=0.01$ بعنوان مقدار احتمالی خطا در مقادیر در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات مورفین، با تزریق زیرجلدی با دوزهای متفاوت ۲۰، ۸۰، ۱۲۰ mg/kg، ۵ بر روی سطوح گلوکز خون در زمانهای متفاوت با توالی نیم ساعت و یک ساعت تا سه ساعت بعد از تزریق اندازه‌گیری شد و نتایج آنها با گروه کنترل مقایسه گردید. گروه کنترل شامل حیواناتی بودند که فقط مورد تزریق سالین استریل قرار گرفتند.

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده موشهای کنترل که مورد تزریق سالین قرار گرفته‌اند افزایشی را در گلوکز خون نسبت به سطح پایه‌ای (قبل از تزریق) نشان می‌دهند.

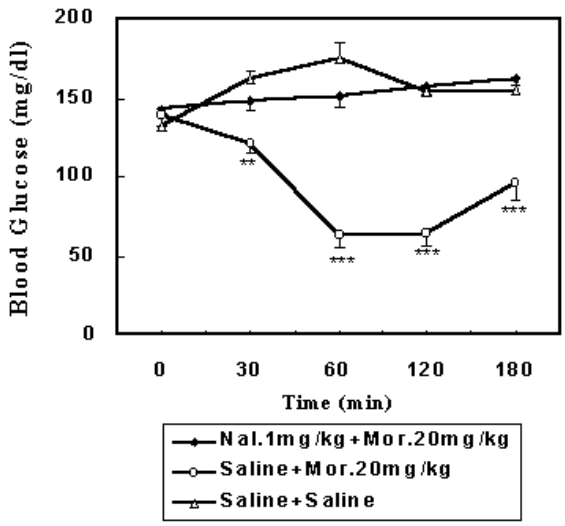
نتایج نشان می‌دهد که تمام دوزهای مورفین سبب هایپوگلیسمی معنی‌داری نسبت به گروه کنترل می‌شود و حداکثر آن حدود ۲ ساعت بعد از تزریق می‌باشد (*شکل* ۱).



شکل*۱- هایپوگلیسمی حاصل از تزریق دوزهای مختلف مورفین(5,20,80,120mg/kg) بصورت زیرجلدی در مقایسه با گروه سالین زیرجلدی. در کلیه زمانهای بعد از تزریق، هایپوگلیسمی ایجاد شده توسط مورفین نسبت به گروه سالین معنی‌دار می‌باشد P<0.001 ** P<0. 01.**

به منظور مشخص نمودن اثر سیستم اوپیوئیدی روی تغییرات گلوکز خون و گیرنده‌های دخیل در این عمل از نالوکسان به عنوان آنتاگونیست مورفین استفاده شد. نالوکسان با دوز ۱ mg/kg بصورت داخل صفاقی ۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین ۲۰mg/kg مورد استفاده قرار

گرفت و سطوح گلوکز خون در زمانهای متفاوت تا ۳ ساعت بعد از تزریق اندازه گیری شد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، نالوکسان بعنوان آنتاگونیست مورفین قادراست اثرات هایپوگلیسمی القا شده بوسیله مورفین را درکلیه زمانها بطور معنی داری مهار نماید.



***شکل۲*- هایپوگلیسمی حاصل از تاثیر سالین داخل صفاقی + مورفین زیرجلدی (20mg/kg) در مقایسه با گروه سالین داخل صفاقی+ سالین زیرجلدی و مهارهایپوگلیسمی حاصل از تاثیر مورفین زیرجلدی (20mg/kg) توسط نالوکسان داخل صفاقی (1mg/kg) در مقایسه با سالین داخل صفاقی+ مورفین زیرجلدی (20mg/kg) *** P< 0.001، ** P< 0. 01 .**

در طی تجربیات برخی از پدیده‌های رفتاری حیوانات مورد بررسی قرار گرفت. با کاربرد دوزهای مختلف مورفین حدود ۱۵ دقیقه بعد از تزریق افزایش فعالیت حرکتی مشخصی بصورت چرخش درون قفس در موشها مشاهده شد. همچنین این موشها رفتار برافراشتگی دم Straub tail را درتمام دوزهای مورد تاثیر نشان می‌دادند. پیش تیمار این موشها توسط نالوکسان می‌تواند افزایش فعالیت حرکتی و همچنین برافراشتگی دم را به طور مشخص مهار نماید.

بحث

نتایج مطالعه حاضردر موش به وضوح اثر هایپوگلیسمی مورفین را با دوزهای مختلف نشان می‌دهد. این نتایج با نتایج تحقیقاتی که دیگران در این زمینه انجام داده‌اند متفاوت است. دلیل پاسخ متفاوت بدست آمده می‌تواند ناشی از نوع نژاد حیوان انتخابی باشد زیرا مشخص شده است که طرز تزریق مورفین و همچنین نژاد حیوان در تغییرات گلوکز خون موثر است (Surwit *et al*.,1989). از آنجا که اثر هایپوگلیسمی مورفین توسط نالوکسان مهار می‌گردد دخالت گیرنده‌های اوپیوئیدی را می‌توان در این امر دخیل دانست و از آنجا که مورفین بعنوان آگونیست گیرنده μ در این سیستم شناخته شده (Bansinath *et al*., 1989) و همچنین این گیرنده بالاترین میل ترکیبی را نسبت به نالوکسان دارد (Katzung, 1998) این احتمال وجود دارد که سیستم اوپیوئیدی از طریق این گیرنده عمل خود را به انجام برساند. مکانیسمی برای اثر هایپوگلیسمی مورفین هنوز به خوبی شناخته نشده است ولی امکان اینکه این اثر از طریق آزاد شدن انسولین از سلولهای بتای پانکراس باشد زیاد است زیرا گزارشهائی مبنی بر افزایش سطح انسولین پلاسما بعد از تزریق مورفین وجود دارد (Johansen *et al*.,1993; Johansen *et al*., 1993; Johansen *et al*., 1992). همچنین مشخص شده است که اثر هایپوگلیسمی داخل نخاعی بطور زیادی ناشی از افزایش جذب گلوکز به وسیله عضلات اسکلتی می‌باشد (Daly,1996).

علاوه بر این از آنجا که نقش سایر سیستم‌های عصبی از جمله دوپامینرژیک، کولینرژیک، سروتونرژیک، هیستامینرژیک و آدرنرژیک در تغییرات گلوکز خون مشخص شده است این احتمال وجود دارد که سیسم اوپیوئید با تداخل عمل با یکی از این سیستم‌های عصبی نقش خود را به انجام برساند بعنوان مثال، مشخص شده است که تحریک رسپتورهای آلفا – آدرنرژیک سبب افزایش ترشح انسولین از سلولهای بتای جزایز پانکراس می‌شود (Nakadate *et al*.,1980; Ostenson and cattane, 1989).

کنترل عصبی بخش درون‌ریز پانکراس توسط porte و Wood در سال ۱۹۷۴ نشان داده شده و مشخص شده است که پانکراس بوسیله شاخه‌ای از عصب واگ عصب دهی می‌شود و تحریک عصب واگ باعث افزایش غلظت انسولین پلاسما می‌گردد (Niijima,1989). از آنجا که مورفین موجب تحریک سیستم پاراسمپاتیک می‌شود (Goodman & Gillman,1996) می‌تواند موجب آزاد شدن و سرانجام افزایش سطح انسولین پلاسما شود و بدین ترتیب موجب هایپوگلیسمی گردد.

هایپرگلیسمی حاصل از تزریق سالین و دوبار تزریق سالین در طی تجربیات نتیجه استرس و تزریق سالین بوده و تاکیدی بر نتایج تحقیقات قبلی است. دلیل آن احتمالاً تحریک سیستم سمپاتوآدرنال و محور هیپوفیز – آدرنال می باشد که منجر به افزایش سطح کاتکولامین‌ها و کورتیزول پلاسما می‌شود (Momeni and Eliassi,1999).

بروز پدیده های رفتاری از جمله افزایش فعالت حرکتی و برافراشتگی دم Straub tail پدیده‌های مشخص و شناخته شده تاثیر مورفین در موشها می باشد (Samini and Dehpour,1999; Talley *et al*.,1999). واکنش برافراشتگی دم در موش ناشی از انقباض عضله Sacrococcygeus dorsalis می‌باشد که با واسطه گیرنده‌های اوپیوئیدی μ_2 ایجاد می‌شود و معیاری در سنجش فعالیت اوپیوئیدی به حساب می‌آید (Samini and Dehpour,1999). نتایج ما در خصوص این پدیده‌های رفتاری تاکیدی بر نتایج تحقیقات دیگران و تائید تاثیر مورفین در ایجاد این پدیده‌ها بر روی این نژاد موش است. از آنجا که این رفتارها با نالوکسان مهار می‌شوند مشخص‌کننده دخالت سیستم اوپیوئیدی می‌باشد.

پیشنهادات

از آنجا که برای ارائه دقیق دلیل هایپوگلیسمی مورفین در این پژوهش نیاز به آزمایشهای دیگری می‌باشد، اندازه‌گیری هورمونهائی از جمله انسولین و گلوکاگون بعد از تأثیر دوزهای مختلف مورفین می‌تواند راهی برای ادامه و تکمیل این تحقیق باشد تا مکانیسم دقیق اثرات هایپوگلیسمی مورفین بخوبی مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بعنوان طرح مصوب شورای پژوهشی دانشگاه اراک می‌باشد و بدینوسیله از گروه زیست شناسی این دانشگاه که در انجام این پروژه ما را یاری نموده اند سپاسگزاری می‌گردد ضمناً از آقایان محمد رفیعی و حمیدرضا مهاجرانی اعضاء هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

Reference

Ali, BH., (1995) *The effect of L-tyrosine on some anti-nociceptive actions of morphine in mice*. Gen Pharmacol. **26**, 407-9

Bansinath, M, Ramabadran, K., Turndorf, H., Puig, M.M., (1989) *Hyperglycemia does not modify the papillary effects of mu and kappa opiate agonists in mice*. J. Ocul. Pharmacol. **5**, 33-43

Brase, DA, Singha, A.K., Estrada, U., Lux, F., Dewy, W.L., (1990) *Hypoglycemia induced by intrathecl opioids in mice*. J. Pharmacol. Exp. Ther **253**, 899-904

Brase, DA., Ward, CR., Tripathi, H.L., Dewy, W.L., (1991) *An insulin-independent mechanism of intrathecal morphine-induced hypoglycemia in mice: mediation through a centeral alpha-2 adrenergic pathway*. J. Pharmacol. Exp. Ther. **257**, 587-94

Daly, ES., (1996) *Effect of intrathecal morphine on blood glucose, glucagon and tissue glycogen in rat*. J. Phar. Belg. **51**, 195-9

Dubowski, KM.,(1962) *An o-toluidine method for body fluid determiation*, Clin. Chem. 215-235

Goodman & Gillman, (1996) *The pharmacological Basis of therapeutics*. Ninth edition (International edition) Mc Grow- Hill company.

Johansen, O., Jorde, R., Tonnesen, T., (1993) *Comparison of the modifying effects of somatostatin and propanolol on mophine-induced changes in glucose, glucagon and insulin levels in fed rats*. Life. Sci. **52**, 141-6

Johansen, O., Tonnesen, T., Jensen, T., Burhol, P.G., Jorde, R., Reikeras, O., (1993) *Morphine and morphine/naloxone modification of glucose*, *glucogon and insulin levels in fasted and fed rats.* Scand. J., Clin., Lab. Invest. **53**, 805-9

Johansen, O., Tnnesen, T., Jensen, T., Jorde, R., Burhol, P.G., Reikeras, O., (1992) *Increments in glucose, glucagon and insulin after morphine in rats*. Life. Sci. **51**, 1237-42

Katzung, BG., (1998) *Basic and clinical pharmacology. seven edition*. A simon & schuster company

Lux,F,. Brase, DA., Dewey, W.L., (1988) *Differential effects of subcutaneous and intrathecal morphine administration on blood glucose in mice*. J.Pharmacol. Exp.Ther. **245**, 187-94

May, CN., Ham, IW., Heslop, K.E., Ston, F.A., Mathias, C., (1988) *Intravenous morphine sympathoardenal outflow in conscious rabbits*. Clin.Sci. **75**, 71-7

Momeni, HR,. Eliassi, A., (1999) *The hyperglycemia of stress in mice*. 14 Th Iranian congress of physiology and pharmacoloyg, P: 98

Nakadate, T., Nakaki, T., (1980) *Adrenergic regulation of blood glucose levels: possible involvement of post synaptic alpha-2 type adrenergic receptors regulation insulin release*. J.Pharmacol. Exp. Ther. **215**, 226-230

Niijima, A., (1989) *Neural mechanisms in the control of blood glucose concentration*. J. Nutr., **119**, 833-840

Ostenson, CG,. Cattane, AG., (1989) *Morphine and enkephalin effects on hypothalamic glucoresponsive neurons*. Brain Res. **185**, 208-212

Samini, M., Dehpour, AR., (1999) *The effect of carbanazepine on morphine-indnced straub tail reaction in mice*. 14th Iranian congress of physiology and pharmacology P: 33

Stone, SH., (1953) Method for obtaining venous bloods from the orbital sinus of the rat and mouse. Science. **119**, 100

Surwit, RS., (1989) Differential glycemic effects of morphine in diabetic and normal mice. Metabolism. **38**, 282-5

Talley, CP., Arankowsky, SG. McCarty, R., Gold, P.E., (1999) *Attenuation of morphine-induced behavioral changes in rodents by D-and L-glucose*. Neurobiol. Learn. Mem.**71**, 62-79