



نقش نیتریک اکساید در اختلالات گوارشی ناشی از تجویز تریاک در موش سوری

امین دبیلی نصرآبادی^۱، حسینعلی عرب^۲، سیداحمد فاطمی اردستانی^۲، حسین حسن پور^۳^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲ گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۳ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

doi 10.22059/jvr.2018.266794.2855

تاریخ دریافت: ۱۸ دی ماه ۱۳۹۸، تاریخ پذیرش: ۱۷ اسفند ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه مطالعه: بین فعالیت اوبیوئیدها و نیتریک اکساید در تنظیم حرکات روده ارتباط وجود دارد.**هدف:** بررسی نقش نیتریک اکساید در اختلالات گوارشی تریاک در موش.

روش کار: تعداد ۳۶ موش نر بالغ در شش گروه درمانی برای ۵ روز متوالی با دوزهای افزایشی: (۱) تریاک (۰/۶، ۰/۵، ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲ میلی گرم/۳۰ گرم/روز)، (۲) N-نیترو-L-آرژینین متیل استر (L-NAME) (۰/۲، ۰/۱۵، ۰/۱۰، ۰/۷۵، ۰/۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز)، (۳) ال-آرژینین (۲۰-۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز)، (۴) تریاک+L-NAME، (۵) تریاک+ال-آرژینین و (۶) آب مقطر تیمار شدند. در پایان تیمار، محوطه بطنی باز شد و قطعاتی از دئودنوم و قولون ابتدایی برای تعیین بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز (NOS) و نیتريت بافتی، برداشته شد. همچنین قطعات حلقوی از قسمت‌های مختلف روده کوچک و بزرگ جدا شدند و برای ارزیابی حرکات به سامانه ارگان مجزا، انتقال یافتند. برای اندازه‌گیری بیان ژن NOS از RT-PCR استفاده شد. علاوه بر این، تعداد ۳۰ حیوان برای سنجش انتقال مواد در روده کوچک با ترکیب زغال‌چوب+صمغ، گاوژ شدند.

نتایج: تریاک سبب کاهش دامنه انقباضات در دوازدهه و ایلئوم شد، اما فرکانس انقباضات در دوازدهه و قولون میانی را افزایش داد ($P < 0.05$). تریاک همچنین باعث افزایش بیان ژن NOS القایی، نورونی و اندوتلیالی را در قولون ابتدایی افزایش شد، درحالی‌که سبب کاهش بیان ژن NOS نورونی و اندوتلیالی در دئودنوم شد ($P < 0.05$). همچنین، انتقال زغال‌چوب+صمغ در گروه دریافت‌کننده تریاک، به میزان ۱۹/۹ درصد در روده کوچک کاهش یافت، درحالی‌که ال-آرژینین، این پیشروی را در روده کوچک افزایش و L-NAME آن را کاهش داد.

نتیجه‌گیری نهایی: تریاک سبب ایجاد اسپاسم عضلات صاف و در نتیجه کاهش حرکات روده می‌شود. تغییرات بیان ژن NOS ممکن است یک مکانیسم جبرانی در برابر اختلالات گوارشی ناشی از مصرف تریاک باشد.

کلمات کلیدی: تریاک، نیتریک اکساید، موش سوری، روده، عضو مجزا

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: حسینعلی عرب، گروه علوم زیستی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: harab@ut.ac.ir

مقدمه

تخلیه ناقص محتویات دستگاه گوارش از عواقب معمول اختلالات روده‌ای ناشی از مصرف مواد مخدر می‌باشد (۹،۷). بیوسنتز شایع‌ترین اختلالات دستگاه گوارش است که به طور گسترده‌ای در میان بیماران دریافت‌کننده اوبیوئیدها دیده می‌شود (۷،۱۳). اوبیوئیدهای خارجی سبب کاهش حرکات بخش‌های مختلف دستگاه گوارش، از جمله روده کوچک و روده بزرگ می‌شوند (۸،۱۳). مطالعات نشان می‌دهد که

از دوران باستان تریاک و سایر اوبیوئیدهای مشتق شده از آن به عنوان مؤثرترین داروهای ضد درد برای انجام اعمال جراحی شناخته شده‌اند، اما استفاده از این ترکیبات با عوارض جانبی متفاوتی از جمله اختلال در عملکرد دستگاه گوارش همراه است و می‌تواند مصرف آن را در بیماران محدود کند (۱۴،۲۱). شواهد حاکی است که تأخیر در تخلیه معده، افزایش بیماری ریفلاکس معده، مدفوع خشک، احتباس گاز و

مواد و روش کار

حیوانات و گروه های تیمار: برای انجام این مطالعه از ۶۶ موش نر بالغ نژاد Balb C دارای محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط نوری ثابت (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی)، دمای اتاق با دسترسی آزاد به آب و مواد غذایی کافی قرار داشتند. دستورالعمل پژوهش حاضر بر اساس مفاهیم اخلاقی اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، طراحی و پیروی شد. حیوانات در قفس های استاندارد مخصوص موش سوری در مکان بهداشتی و تمیز نگهداری می شدند. حیوانات بر اساس نوع درمان به صورت تصادفی برای دو بخش آزمایشات برون تنی و درون تنی استفاده شدند. برای انجام آزمایشات برون تنی تعداد ۳۶ موش به شش گروه ۶ تایی و برای آزمایشات اندازه گیری زمان انتقال مواد در طول روده گوارش، به شش گروه ۵ تایی تقسیم شدند.

نحوه تیمار حیوانات در گروه های آزمایشی بخش اول آزمایش به شرح زیر بوده است:

گروه ۱) حیوانات با دوزهای افزایشی تریاک به میزان ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵ و ۰/۳ میلی لیتر، که هر میلی لیتر حاوی ۲ میلی گرم تریاک بود و بازای هر ۳۰ گرم وزن بدن موش، یکبار در روز و به مدت ۵ روز از راه داخل صفاقی تیمار شدند. تریاک از ستاد فرماندهی پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجای جمهوری اسلامی ایران به صورت رسمی تهیه گردید.

گروه ۲): در این گروه، ال-نیم (L-NAME، سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا) با دوز افزایشی ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن حیوان، یکبار در روز و به مدت ۵ روز، به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

گروه ۳): حیوانات از ماده ال-آرژینین (سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا) با دوز افزایشی ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن حیوان، روزانه به مدت ۵ روز داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه ۴): به حیوانات این گروه، ترکیب تریاک+L-NAME را با روش و دوزهای اعلام شده در گروه های قبلی، تزریق شد.

گروه ۵) در این گروه حیوانات ترکیب تریاک+ال-آرژینین را با همان روش و دوزهای اعلام شده در گروه های قبلی دریافت کردند

گروه ۶) به حیوانات این گروه که به عنوان کنترل انتخاب شده بودند، آب مقطر استریل با حجم افزایشی ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵ و ۰/۳ میلی لیتر روزانه یک بار به صورت داخل صفاقی و به مدت ۵ روز متوالی دریافت کردند.

نیتریک اکساید می تواند در ایجاد عوارض جانبی مواد مخدر در دستگاه گوارش دخیل باشد (۳،۲۳).

نیتریک اکساید (NO) یک ملکول گازی شکل ساده است که از اسید آمینه ال-آرژینین ساخته می شود. خانواده آنزیمی که مسئول بیوسنتز نیتریک اکساید است، به نیتریک اکساید سینتاز (NOS) معروف است که دارای سه ایزوفرم نورونی (nNOS)، القایی (iNOS) و اندوتلیالی (eNOS) می باشد. انواع مختلفی از مهار کننده های NOS وجود دارند که می توانند تولید این گاز را در بدن مهار کنند، که از جمله می توان به آنالوگ های ال-آرژینین اشاره نمود. از آنالوگ های ال-آرژینین می توان N-نیترو-L-آرژینین متیل استر (L-NAME) را نام برد که به شکل رقابتی با ال-آرژینین، فعالیت های آنزیم های NOS را مهار می کنند (۱۱). نیتریک اکساید از واسطه های مهم فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک در موجودات زنده می باشد که نقش گسترده ای در فرآیندهای طبیعی بدن ایفا می کند (۱۷). این ماده در دستگاه گوارش حضور فعالی دارد و به عنوان یک انتقال دهنده عصبی مهمی نقش مهمی در تنظیم حرکات قسمت های مختلف لوله گوارش بر عهده دارد (۳۰).

مطالعات زیادی، ارتباط و همبستگی بین مسیرهای وابسته به NO و سیستم اویپوئیدی در تنظیم فعالیت های جنسی و مقاربت، فعالیت های قلبی و عروقی، فعالیت های دستگاه گوارش و تحمل و وابستگی به مواد مخدر را نشان داده اند (۱۸،۲۸). عوارض ناشی از اویپوئیدها در قسمت های مختلف دستگاه گوارش، متفاوت است. این ماده، علاوه بر مهار حرکات خود به خودی روده ها، سبب توقف حرکات دستگاه گوارش و ایجاد اسپاسم تونیک در روده انسان و سایر گونه ها می شود. این اثر مهار کننده حرکات و کاهش قدرت عضلانی روده، ممکن است ناشی از کاهش تولید یا آزاد شدن نیتریک اکساید از عصب های مهاری (۱۳) و فعال شدن مستقیم گیرنده های اویپوئید در سلول های عضلانی باشد (۸،۲۵). انقباض عضلات حلقوی ایلئوم موش سوری ناشی از تجویز مورفین با مهار آزادسازی نیتریک اکساید از اعصاب دستگاه گوارش همراه بوده است (۱۵)، مطالعات همچنین نشان می دهد که گیرنده تازه کشف شده ی μ_3 اویپوئیدی، در سنتز NO دخالت دارد (۴،۱۰). علیرغم ارتباطات مشاهده شده بین اویپوئیدها و نیتریک اکساید در دستگاه گوارش، هنوز مشخص نیست که چگونه نیتریک اکساید در فرآیندهای مولکولی با اویپوئیدها تعامل دارد. در مطالعه حاضر، نقش NO در اختلالات حرکتی روده ای ناشی از تریاک و ارتباط آن با تغییر انتقال مواد با واسطه اویپوئیدها در روده، بررسی شده است.

ابتدا به مدت ۶۰ دقیقه به نمونه‌ها فرصت داده شد تا به مرحله تعادل برسند که در این مدت محلول کربس هر ۱۵ دقیقه یک‌بار تعویض گردید. بعد از برقراری تعادل، انقباضات به مدت ۱۰ دقیقه ثبت شد. میانگین تواتر انقباضات هر قطعه بر حسب تعداد انقباضات در ۲۰ ثانیه محاسبه شد. میانگین دامنه انقباضات نیز با اخذ میانگین از اختلاف بیشینه (ناشی از پتاسیم کلراید) و کمینه کشش (ناشی از پالس الکتریکی) قطعات روده مجزا محاسبه شد. برای ارزیابی میزان پاسخ‌دهی سیستم غیرآدرنرژیک-غیرکولینرژیک روده از تحریک میدان الکتریکی به وسیله‌ی سامانه تحریک میدان الکتریکی (شرکت نیرو محرکه، آمریکا) بهره گرفته شد. بدین منظور، ابتدا قطعات بافتی توسط آتروپین سولفات با غلظت‌های 10^{-6} مولار برای روده کوچک و 10^{-7} مولار برای روده بزرگ، پروپرانولول هیدروکلراید با غلظت 10^{-5} مولار برای روده کوچک و 10^{-6} مولار برای روده بزرگ، فنتول آمین 10^{-5} مولار برای روده کوچک و 10^{-7} مولار برای روده بزرگ، به مدت ۱۰ دقیقه پیش تیمار شدند (سیگما آلد ریچ، ایالات متحده آمریکا). سپس یک انقباض حداکثری با پتاسیم کلراید در غلظت 10^{-4} مولار برای روده‌ها و 10^{-5} مولار برای قولون ایجاد شد. هنگامی که پاسخ انقباضی به کفه رسید، تحریک میدان الکتریکی ($50V$)، ۱۰ هزارم ثانیه با تأخیر ۳ ms هزارم ثانیه، ۸ هرتز برای ۱۰ ثانیه) با قرار دادن الکترودهایی در دو سمت بافت مجزا در داخل حمام بافت، انجام شد. غلظت‌های آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های به کار رفته در این پژوهش، براساس EC_{50} بدست آمده از تکرار آزمایشات اولیه، محاسبه شد (۱،۱۵،۱۸).

اندازه‌گیری مقدار نیتريت در سرم و بافت: اندازه‌گیری نیتريت

به منظور تعیین مقدار NO آزاد شده در خون و بافت روده به روش گریس انجام شد. در این روش ابتدا نیترات سرم توسط کادمیوم به نیتريت تبدیل شد، سپس میزان نیتريت کل اندازه‌گیری گردید. به منظور جدا کردن پروتئین از سرم، نمونه‌ها ابتدا با سولفات روی و سپس با سود مخلوط و سانتیفیوژ شد. سپس مایع روی برداشته شد و با 120 میلی لیتر بافر گلیسین مخلوط شد. پس از اضافه کردن کادمیوم گرانول به محلول، ۵ دقیقه تکان داده و بعد از بیرون آوردن گرانول کادمیوم از محلول، 150 میلی لیتر سولفانیل آمین و 150 میلی لیتر معرف گریس به آن اضافه گردید. برای تعیین مقدار نیتريت موجود، از دستگاه الایزا ریدر (مدل ۶۳۰۵، انگلستان) استفاده شد. با قرائت میزان جذب نوری نمونه‌های در طول موج 540 نانومتر میزان نیتريت مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری میزان NO بافت‌های جدا شده بر حسب میکرومول بر میلی گرم پروتئین تام، ابتدا بافت جدا شده با دستگاه اولتراسوند (شرکت فناوری ایرانیان پژوهش نصر)، لیز

به منظور اطمینان از ایجاد وابستگی، چند حیوان به طور تصادفی انتخاب شدند، سپس به آن‌ها 2 میلی گرم نالوکسان (سیگما آلد ریچ، ایالات متحده آمریکا) به ازای هر موش بصورت داخل صفاقی، تزریق شد. بروز علائم سندرم ترک در این حیوانات نشان دهنده ایجاد وابستگی بود (۲۹).

در بخش اندازه‌گیری زمان عبور مواد ترکیبی از زغال فعال (شرکت نوریت هلند) و صمغ عربی (سیگما آلد ریچ، ایالات متحده آمریکا) به به میزان 100 میلی گرم از هر ترکیب و در حجم یک میلی لیتر به موش‌های تحت درمان داخل معده گاوژ شد.

نمونه برداری: در پایان درمان، تمام حیوانات در گروه‌های مختلف

تیمار با استفاده از ماده هوش بر ایزوفلوران (سیگما آلد ریچ، ایالات متحده آمریکا) بیهوش شدند و سپس به روش مرگ آسان کشته شدند. بلافاصله از قلب آن‌ها به میزان $1-0.5$ میلی لیتر خون، اخذ شد و سپس محوطه شکمی باز شد و لوله گوارش حیوانات جدا و بیرون آورده شد. پس از شست و شوی روده و جداسازی بافت‌های همبند همراه آن‌ها، قطعاتی از دئودنوم، ژژنوم، ایلئوم، قولون ابتدایی (۱ سانتی‌متر بعد از سکوم)، قولون میانی، قولون انتهایی (۱ سانتی متر بالای مقعد)، برای بررسی فعالیت‌های حرکتی لوله گوارش جدا و به محلول کربس انتقال داده شد و تا انجام آزمایش در یخچال 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. قسمتی از بافت‌های نام برده شده برای اندازه‌گیری نیتريت بافت و اندازه‌گیری بیان ژن NOS از بدن حیوان جدا و ابتدا به تانک ازت مایع و سپس به فریزر -70 درجه سانتی‌گراد منتقل گردید و تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد. خون‌های اخذ شده از قلب نیز بلافاصله به مدت 10 دقیقه با دور 4000 در دقیقه، سانتیفیوژ و سرم حاصل در فریزر -70 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ثبت حرکات بافت ایزوله بدنال تیمارهای دارویی: قطعات ایزوله

به طول 1 سانتی‌متر از دئودنوم، ژژنوم، ایلئوم، قولون ابتدایی، قولون میانی، قولون انتهایی در جهت فیبرهای عضلات صاف طولی در داخل حمام بافتی حاوی محلول کربس-هنسلیت 37 درجه سانتی‌گراد (شامل 120 میلی مولار کلرید سدیم، $5/9$ میلی مولار کلرید پتاسیم، $1/2$ میلی مولار کلرید منیزیم، $1/2$ میلی مولار فسفات سدیم، 15 میلی مولار بی‌کربنات سدیم، 11 میلی مولار گلوکز و $1/8$ میلی مولار کلرید کلسیم) که با گاز کربون 95 درصد اکسیژن و 5 درصد دی اکسید کربن) هوادهی می‌شد، معلق گردیدند و به یک مبدل نیرو متصل شدند. بافت‌ها تحت $1-0.5$ گرم کشش قرار گرفتند و خروجی فعالیت مکانیکی بافت ایزوله با استفاده از سیستم پاور لب (آدم اینسترومنتز، استرالیا) تقویت و توسط ثبت کننده کامپیوتری ثبت شد.

میکروتیوب، حجم مخلوط با اضافه کردن آب مقطر یونیزه، به ۱۰ ماکرولیتزر رسانده شد، و سپس در دستگاه ترموسایکل (روتورژن کیو مدل ۶۰۰۰، ساخت شرکت کیاژن، ایالات متحده آمریکا) قرار داده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های Real time-PCR از نرم افزار LinRegPCR ویرایش ۲۰۱۲ به منظور محاسبه‌ی میزان راندمان یا بهره‌وری برای هر ژن، استفاده شد (۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۲۵ تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه‌ی میانگین تواتر و دامنه انقباضات و سنجش نیتريت از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و ضریب همبستگی پیرسون، با در نظر گرفتن اختلاف معنی‌دار پنج صدم، استفاده شد. داده‌های مربوط به بیان ژن پس از محاسبه نسبت بیان ژن‌ها، با آزمون آماری یک طرفه ANOVA و تست تکمیلی Tukey، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در صورت وقوع سطح معنی‌داری کمتر از ($P < 0.05$) اختلاف معنی‌دار تلقی شد. تمام نتایج به صورت $Mean \pm SD$ و در نمودارها Error bars: 95%CL درج گردید (۱۱، ۱۵، ۱۸، ۲۴).

نتایج

اثرات تریاک بر حرکات بافت روده ایزوله و نقش NO: داده‌های مربوط به دامنه و فرکانس انقباضات عضله صاف روده‌ها در جدول ۱ آنالیز شده است. همان‌طوری که جدول نشان می‌دهد، تریاک به طور معنی‌داری سبب کاهش دامنه انقباضات بر حسب گرم در دوازدهه (از $75/8 \pm 18/7$ به $20/6 \pm 83/1$ به $11/2 \pm 48/1$ ، $P < 0.01$) و ایلئوم (از $14/5 \pm 50/1$ ، $P < 0.05$) شد. اما دامنه انقباضات در گروه تریاک+ال-آرژینین به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) در ایلئوم موش‌های تحت درمان نسبت به گروه تریاک، افزایش داشته است. تجویز L-NAME به همراه تریاک، سبب کاهش دامنه انقباضات در بافت‌های جمع آوری شده از قولون انتهایی شد (از $29/4 \pm 66/4$ به $63 \pm 142/9$). همچنین، تریاک سبب افزایش معنی‌دار فرکانس انقباضات در بافت‌های جمع آوری شده از دوازدهه (از $533/3 \pm 61/1$ به $93/3 \pm 634/3$ ، $P < 0.05$) و قولون میانی (از $196/9 \pm 66/2$ به $235/9 \pm 480/3$ ، $P < 0.01$) شد. اما این اثر با تجویز ال-آرژینین در قولون میانی (از $235/9 \pm 480/3$ به $40/9 \pm 152/3$ ، $P < 0.01$) و قولون انتهایی (از $277/2 \pm 272/6$ به $30/3 \pm 144/8$ ، $P < 0.05$) کاهش یافت.

و به مایع بافتی تبدیل شد. سپس تمام مراحل بالا بجز مخلوط کردن و شستشوی محلول بافتی با کادمیوم، تکرار گردید. همچنین پروتئین تام هر نمونه بافتی با استفاده از روش بردفورد اندازه‌گیری شد. تمام ترکیبات و داروهای مورد استفاده از شرکت سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا تهیه شد (۱۱).

اندازه‌گیری زمان عبور مواد از روده کوچک: مقدار مخلوط اعلام شده از زغال فعال (شرکت نوریت هلند) و صمغ عربی (سیگما آلدریج، ایالات متحده آمریکا) به موش‌های تحت درمان داخل معده گاوژا شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، حیوانات با مرگ آسان کشته شدند، سپس، لوله گوارش از معده تا سکوم بیرون آورده شد و به صورت عمودی در روی سطح صاف، آویزان شد. فاصله‌ای که زغال به همراه غذا از معده در طول روده‌ی کوچک طی کرده، نسبت به کل طول روده کوچک برای هر موش جداگانه اندازه‌گیری و ثبت شد. سپس، با استفاده از فرمول زیر درصد حرکت مواد در روده‌ی کوچک مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۴).

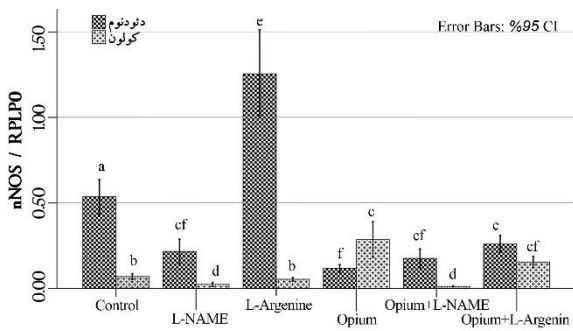
$100 \times \text{طول کل روده کوچک} / \text{میزان پیشرفت زغال و صمغ} =$

درصد جابه‌جایی مواد

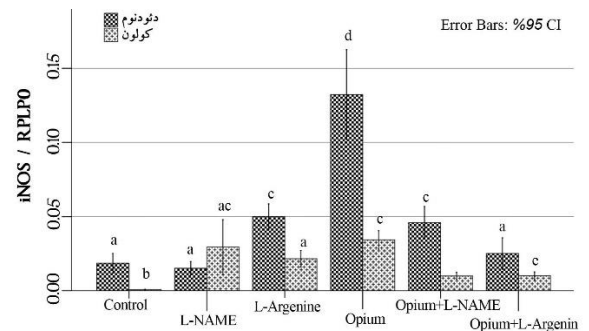
اندازه‌گیری بیان ژن NOS: برای استخراج RNA تام از بافت‌های دئودنوم و قولون ابتدایی از کیت استخراج RNA (کیت سیناژن، ایران) مطابق با دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد. سپس با استفاده از RNA استخراج شده برای تولید cDNA از کیت مخصوص سنتز cDNA (شرکت کیاژن، Cat No: RR820L، ایالات متحده آمریکا) مطابق با دستورالعمل مربوطه، استفاده گردید. محلول نهایی حاوی DNA جهت آزمایشات بعدی، در دمای -20 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پرایمرهای مورد نظر با استفاده از نرم افزار Primer Blast قابل دسترس در شبکه اینترنت NCBI، طراحی شد. پرایمرها بعد از طراحی، با کل ژنوم حیوان (موش سوری) مورد مقایسه قرار گرفت، تا بدین وسیله از اختصاصات پرایمرها برای نواحی مکمل خود اطمینان حاصل شود. برای هر نمونه حاوی DNA حاصل از مرحله قبل، ابتدا ۵ ماکرولیتزر رنگ اینترکاله Syber-Green (محصول شرکت بیوتکنولوژی تاکارا، ژاپن، RR820 L) در داخل میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری، ریخته شد. سپس پرایمرهای اختصاصی Forward و Reverse مربوط به ژن‌های eNOS، iNOS، و nNOS که ۰/۶ ماکرولیتزر از پرایمر ۰/۶ ماکرولیتزر از cDNA استخراج شده بود، به محلول اضافه شد. بعد از مخلوط کردن مواد فوق در

جدول ۱. فعالیت مکانیکی بافت ایزوله با دو شاخص دامنه انقباضات بر حسب گرم و فرکانس آن بر حسب هرتز در قطعات ایزوله دئودنوم، ژوژنوم، ایلئوم، قولون ابتدایی، میانی و انتهایی موش سوری از حیوانات تحت درمان با آب مقطر، تریاک، تریاک+ال-آرژینین، ال-آرژینین، تریاک+L-NAME و L-NAME داده‌ها به صورت Mean±SD، بیان شده است و حروف الفبای غیرمشابه بین گروه‌های درمانی در ردیف‌های افقی، اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) را بین گروه‌ها نشان می‌دهد. تعداد نمونه در هر گروه‌ها برابر عدد ۶ بوده است.

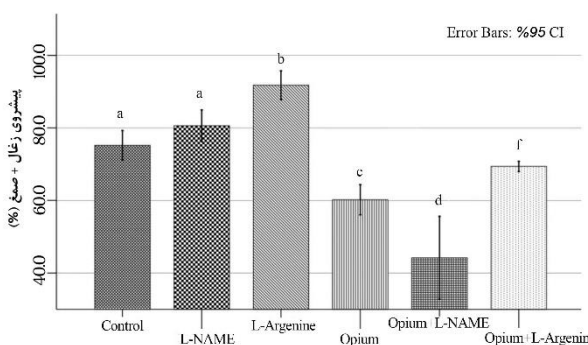
گروه‌های درمانی	آب مقطر	تریاک	تریاک+ال-آرژینین	ال-آرژینین	تریاک+ال-نیم	ال-نیم
دئودنوم	دامنه	۸۳/۱±۲۰/۶ ^{ad}	۴۸/۱±۱۱/۳ ^b	۹۵/۶±۲۵/۴ ^{ac}	۱۱۶/۷±۱۷/۹ ^c	۵۸/۴±۱۷/۹ ^{bd}
	فرکانس	۵۳۳/۳±۶۱/۱ ^a	۶۳۴/۳±۹۳/۳ ^b	۶۰۴/۷±۳۹/۱ ^{ab}	۵۹۴/۳±۱۰۶/۷ ^{ab}	۶۰۳/۳±۳۲/۸ ^{ab}
ژوژنوم	دامنه	۵۸/۲±۱۸/۵ ^a	۵۲/۹±۹/۱ ^a	۶۷/۱±۱۵/۳ ^{ad}	۲۷/۲±۷/۸ ^{cd}	۵۹/۳±۷/۶ ^{ad}
	فرکانس	۵۹۸/۶±۷۹/۸ ^a	۵۳۷/۲±۲۶/۹ ^{ab}	۴۹۷/۸±۶۲/۵ ^{ab}	۵۳۶±۱۰۰/۳ ^{ab}	۴۹۱/۹±۹۵/۹ ^b
ایلئوم	دامنه	۷۵/۸±۱۸/۷ ^b	۵۰/۱±۱۴/۵ ^a	۶۶/۳±۱۴/۴ ^{ab}	۹۰/۲±۳۰ ^b	۵۶/۹±۱۲ ^{ab}
	فرکانس	۵۴۸/۱±۹۹/۸ ^a	۴۸۰/۴±۱۵۲ ^a	۴۷۶/۴±۹۱ ^a	۴۶۷/۴±۱۰۳/۷ ^a	۵۱۳/۶±۷۸/۱ ^a
قولون ابتدایی	دامنه	۳۲۵/۳±۶۷/۳ ^{ac}	۳۳۴/۹±۶۸/۴ ^{ac}	۴۱۲/۸±۱۵۳ ^{ab}	۵۳۹/۳±۲۲۵/۸ ^b	۲۴۳/۸±۹۳/۶ ^{cd}
	فرکانس	۲۰۱/۳±۶۹/۹ ^{ab}	۱۵۰/۳±۶۱/۹ ^a	۲۹۱/۶±۱۳۶/۹ ^{bc}	۳۴۱/۹±۸۲/۳ ^b	۱۹۶/۳±۶۱/۱ ^{ac}
قولون میانی	دامنه	۳۳۳/۹±۱۱۱/۱ ^{ac}	۲۹۶/۱±۹۱ ^{ac}	۳۶۱/۹±۱۵۶/۶ ^a	۵۳۳/۸±۱۸۳ ^b	۲۰۳/۶±۵۸/۵ ^c
	فرکانس	۱۹۶/۹±۶۶/۳ ^a	۴۸۰/۳±۲۳۵/۹ ^b	۱۵۲/۳±۴۰/۹ ^a	۶۷۱/۲±۲۶۴/۴ ^d	۲۸۴/۷±۷۶/۶ ^a
قولون انتهایی	دامنه	۲۹۰/۴±۶۶/۴ ^a	۳۵۰/۲±۱۵۲/۱ ^a	۳۸۹/۱±۱۲۴/۹ ^a	۳۹۱/۶±۱۱۳ ^a	۱۴۲/۹±۶۳ ^b
	فرکانس	۱۹۶/۹±۳۵/۵ ^{ab}	۲۷۲/۶±۷۷/۲ ^{ac}	۱۴۴/۸±۳۰/۳ ^b	۲۷۴/۸±۱۰۸/۸ ^c	۱۷۹/۸±۳۵/۷ ^b



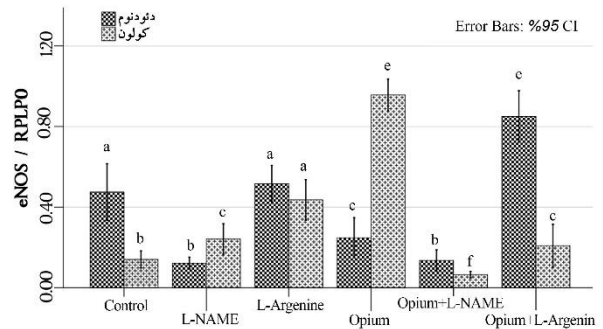
نمودار ۲. بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز نورونی (nNOS) در بافت‌های دئودنوم و قولون ابتدایی موش سوری در گروه‌های مختلف آزمایش را نشان می‌دهد، حروف الفبای غیر یکسان تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) را بین گروه‌ها نشان می‌دهد (تعداد نمونه در هر گروه ۶ عدد است).



نمودار ۱. بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS) در بافت‌های دئودنوم و قولون ابتدایی موش سوری در گروه‌های مختلف آزمایش را نشان می‌دهد، حروف الفبای غیر یکسان تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) را بین گروه‌ها نشان می‌دهد (تعداد نمونه در هر گروه ۶ عدد است).



نمودار ۴. میزان سطح نیتریت در بافت دئودنوم و قولون ابتدایی موش‌های سوری در گروه‌های مختلف آزمایش را نشان می‌دهد، حروف الفبای غیر یکسان تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) را بین گروه‌ها نشان می‌دهد (تعداد نمونه در هر گروه ۶ عدد است).



نمودار ۳. بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در بافت‌های دئودنوم و قولون ابتدایی موش سوری در گروه‌های مختلف آزمایش را نشان می‌دهد، حروف الفبای غیر یکسان تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) را بین گروه‌ها نشان می‌دهد (تعداد نمونه در هر گروه ۶ عدد است).

داده‌های بیان ژن nNOS در بافت‌های دئودنوم و قولون ابتدایی موش‌های سوری درمان شده با تریاک و دیگر مواد تست شده، در نمودار ۲ قابل مشاهده است.

میزان بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS):

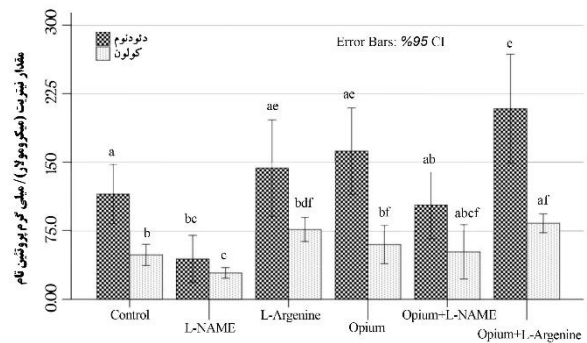
میزان بیان ژن eNOS در بافت دئودنوم گروه درمان شده با تریاک، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد ($P < 0.01$)، ال-آرژینین ($P < 0.001$)، تریاک+ال-آرژینین ($P < 0.001$)، نشان داد. این کاهش در بیان ژن eNOS همچنین، در گروه تریاک+L-NAME در سطح معنی‌داری ($P < 0.001$) از گروه شاهد، ال-آرژینین و تریاک+ال-آرژینین نیز نشان داده شد. اما، بیان ژن این آنزیم، در بافت قولون ابتدایی گروه درمان شده با تریاک به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) از بقیه گروه‌ها بیشتر بوده است. تغییرات مربوط به بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در بافت‌های دئودنوم و قولون ابتدایی موش سوری در نمودار ۳ قابل مشاهده است.

میزان تغییرات نیتریک اکساید در سرم و بافت‌های روده: نتایج

این مطالعه نشان داد که میزان نیتریت در سرم گروه‌های تحت درمان با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت، اما میزان نیتریت اندازه‌گیری شده در بافت‌های گروه‌های مختلف درمانی، با یکدیگر اختلاف داشتند. تغییرات سطح نیتریت بافت‌های لوله گوارش موش‌های درمان شده با تریاک و دیگر مواد تجویز شده، در نمودار ۴ قابل مشاهده است. همان‌طوری‌که این نمودار نشان می‌دهد، میزان نیتریت بافتی در دئودنوم گروه درمان شده با تریاک به طور معنی‌داری با گروه‌های L-NAME ($P < 0.001$) و تریاک+L-NAME ($P < 0.05$) اختلاف داشته، اما با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین، میزان نیتریت در گروه درمان شده با تریاک+ال-آرژینین از گروه‌های شاهد، L-NAME ($P < 0.001$) و تریاک+L-NAME ($P < 0.01$) بیشتر بوده است، همان‌طور که میزان نیتریت بافت قولون در گروه دریافت‌کننده تریاک، از گروه درمانی L-NAME، بیشتر بود ($P < 0.05$)، اما با گروه‌های شاهد و ال-آرژینین، تفاوت معنی‌داری نداشت.

میزان پیشروی زغال+صمغ در روده موش سوری: خلاصه

آنالیز، مطالعه مرتبط با اندازه‌گیری درصد پیشروی زغال+صمغ در روده گروه‌های مختلف آزمایشی در نمودار ۵ نشان داده شده است. همان‌طوری‌که این نمودار نشان می‌دهد، میزان پیشروی ترکیب زغال+صمغ در روده‌ی کوچک موش‌های دریافت‌کننده تریاک، کاهش معنی‌داری ($P < 0.001$) در مقایسه با گروه‌های شاهد، L-



نمودار ۵. درصد پیشروی زغال+صمغ در روده کوچک را بین گروه‌ها نشان می‌دهد. حروف الفبای غیر یکسان تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) را بین گروه‌ها نشان می‌دهد (تعداد نمونه در هر گروه ۵ عدد است).

میزان بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS): نتایج

این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن iNOS در دئودنوم گروه دریافت‌کننده تریاک از گروه‌های دریافت‌کننده آب مقطر، L-NAME، ال-آرژینین، تریاک+L-NAME و تریاک+ال-آرژینین بیشتر بوده است ($P < 0.001$). همچنین، میزان بیان ژن در گروه تریاک+L-NAME از گروه شاهد ($P < 0.05$) و L-NAME ($P < 0.01$) نیز بیشتر بوده است. درحالی‌که این افزایش بیان ژن iNOS، را هم در بافت قولون ابتدایی حیوانات دریافت‌کننده تریاک نسبت به گروه شاهد، تریاک+L-NAME و تریاک+ال-آرژینین، در سطح معنی‌داری ($P < 0.001$) شاهد بودیم. آنالیز آماری داده‌های مربوط به نسبت بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS) به بیان ژن کنترل داخلی (RPLP0 Ribosomal protein lateral stalk subunit P0)، در بافت دئودنوم و قولون ابتدایی موش سوری، در نمودار ۱ قابل مشاهده است.

میزان بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز نورونی (nNOS):

میزان بیان ژن nNOS در بافت دئودنوم در گروه درمان شده تریاک نسبت به گروه درمان شده با آب مقطر و ال-آرژینین کمتر بوده است ($P < 0.001$). این بیان در گروه دریافت‌کننده تریاک+L-NAME نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده آب مقطر و ال-آرژینین نیز کمتر بوده است ($P < 0.001$). همچنین، بیان ژن در بافت‌های روده گروه درمان شده با تریاک+ال-آرژینین از گروه شاهد و درمان شده با ال-آرژینین در سطح معنی‌داری ($P < 0.001$) کمتر بود. اما در بافت قولون، میزان بیان ژن در گروه درمان شده با تریاک، به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) از بقیه گروه‌ها بیشتر بوده است. این افزایش بیان ژن را در گروه درمانی تریاک+ال-آرژینین نسبت به گروه شاهد ($P < 0.05$)، L-NAME ($P < 0.001$)، ال-آرژینین ($P < 0.01$) و تریاک+L-NAME ($P < 0.001$) نیز شاهد بوده‌ایم. آنالیز آماری

معنی داری را نشان نمی‌دهد، هرچند که میزان بیان ژن NOS نورونی و اندوتلیالی در دئودنوم و قولون از بیان ژن NOS القایی بیشتر بود.

مطالعات نشان می‌دهند که اوبیویدها و نیتریک اکساید در تنظیم فعالیت‌های دستگاه گوارش با یکدیگر مرتبط هستند (۲۸). نقش نیتریک اکساید به عنوان یک عامل کلیدی و مهم در مسیرهای پیام‌رسانی فعالیت‌های مختلف دستگاه گوارش از جمله شل شدگی و انقباض عضلات صاف، گزارش شده است (۳۰). در مطالعه‌ای، Iwata و همکاران در سال ۲۰۰۷، گزارش کردند که مورفین از طریق گیرنده‌های اوبیویدی μ سبب انقباض عضله حلقوی ایلئوم در موش سوری می‌شود که این انقباض می‌تواند با آزاد شدن نیتریک اکساید از اعصاب سیستم غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک (نیتروژیک) ارتباط داشته باشد (۱۵). لذا این احتمال وجود دارد که اثرات سوء ناشی از اوبیویدها می‌تواند به علت اختلال در تولید یا عملکرد نیتریک اکساید در بافت‌های لوله گوارش باشد (۲۰). تحقیقات Calignano و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان داد که بیوست ناشی از اوبیویدها می‌تواند به علت اثرات انقباضی آن بر عضله حلقوی روده‌ها باشد (۶). بدین لحاظ می‌توان گفت که اختلال ایجاد شده در حرکات گوارشی توسط اوبیویدها، ممکن است از طریق ایجاد اسپاسم تونیک در روده انسان یا سایر گونه‌های حیوانی باشد. بدین صورت که افزایش انقباضات روده ناشی از مواد مخدر ممکن است به دنبال کاهش آزادسازی نیتریک اکساید از نورون‌های مهاری در دستگاه گوارش (۵،۱۶) و یا از طریق فعال‌سازی مستقیم گیرنده‌های اوبیویدی سلول‌های عضلانی باشد (۲۵). در گزارش Ono و همکاران در سال ۲۰۱۴ آمده که مورفین با القای انقباض در لوله گوارش موش سوری، سبب بیوست می‌شود. آن‌ها در مطالعه بالینی خود دریافتند که رکتوم و قولون انتهایی به عنوان دو جایگاه مؤثر برای ایجاد بیوست، دارای بیشترین انقباض در مواجهه با مورفین بود که با تجویز مهارکننده سنتز NO یعنی L-NAME، این انقباضی ناشی از مورفین تشدید شد. در حالیکه تجویز ال-آرژینین، سبب کاهش این انقباضات شد (۲۳). در مطالعه مروری Shah و همکاران در سال ۲۰۰۴ آمده است که نیتریک اکساید و ال-آرژینین سبب کاهش حرکات و افزایش زمان تخلیه معده در شرایط فیزیولوژیک می‌شوند، ولی مهارکننده‌های NOS، سبب افزایش میزان تخلیه معده و افزایش فعالیت‌های حرکتی روده‌ها می‌شوند (۲۷). اما Hellström و Ljung در سال ۱۹۹۶ اعلام کردند که مهار سنتز نیتریک اکساید بوسیله L-NAME، منجر به اختلال حرکات روده کوچک و طولانی شدن انتقال مواد و بیوست می‌شود (۱۲). در مطالعات دیگری نشان داده شده که تجویز مهارکننده

NAME و ال-آرژینین، داشته است. اما تجویز ال-آرژینین به همراه تریاک به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) باعث مهار کاهش پیشروی ترکیب زغال+صمغ در روده موش‌ها شد. اما میزان حرکت زغال+صمغ در روده‌های موش‌های دریافت‌کننده تریاک+L-NAME نسبت به گروه آزمایشی L-NAME و ال-آرژینین، به طور معنی‌داری کاهش داشته است ($P < 0.001$).

بحث

هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش نیتریک اکساید در اختلالات حرکتی لوله گوارش ناشی از مصرف تریاک در موش‌های وابسته شده به تریاک بوده است. نتایج این مطالعه نشان داد که دامنه انقباضات و میزان شل شدگی عضلات صاف روده بعد از ایجاد پالس الکتریکی در گروه درمان شده با تریاک در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌داری داشته است. اما با تجویز اسید آمینه ال-آرژینین که به عنوان پیش‌ساز NO شناخته شده است سبب مهار این کاهش گردید، در حالیکه، تجویز مهارکننده تولید NO، یعنی L-NAME میزان کاهش را افزایش داد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری فرکانس انقباضات قسمت‌های مختلف روده نشان داد که در گروه دریافت‌کننده تریاک میزان این شاخص حرکتی افزایش داشته است که این تغییرات با تجویز ال-آرژینین مهار شد ولی با مصرف داروی L-NAME میزان آن بیشتر شد. میزان این تغییرات در دامنه و فرکانس قولون بیشتر از روده کوچک بوده است. این مطالعه همچنین حاکی است که مصرف تریاک باعث کاهش پیشروی ترکیب زغال+صمغ در روده می‌شود که مصرف ال-آرژینین می‌تواند میزان پیشروی را افزایش ولی L-NAME آن را کاهش دهد. تعیین مقدار متابولیت نیتریک اکساید یعنی نیتريت که شاخصی برای تولید NO در سرم و بافت‌های روده موش‌های تحت درمان است، نشان داد که میزان تولید این متابولیت در بافت دئودنوم موش‌های دریافت‌کننده تریاک بیشتر از بافت قولون بوده اما میزان آن در گروه‌های مختلف درمانی، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. اما مصرف همزمان ال-آرژینین با تریاک سبب افزایش میزان این متابولیت در بافت روده شد. این در حالی است که بیان ژن NOS القایی در گروه دریافت‌کننده تریاک در بافت قولون و دئودنوم افزایش داشته است. اما میزان بیان ژن NOS نورونی و اندوتلیالی در بافت دئودنوم کاهش و در بافت قولون افزایش داشته است. این مشاهدات حاکی است که علی‌رغم وجود کاهش در میزان بیان ژن NOS نورونی و اندوتلیالی، میزان NO آزاد شده در روده حیوانات دریافت‌کننده تریاک نسبت به گروه شاهد، تغییرات

شبه اسپاسم در می‌آورد و از روند طبیعی خود خارج می‌شود. این تغییر رفتار انقباضی روده‌ها، سبب کاهش میزان پیشروی ترکیب زغال+صمغ در دستگاه گوارش موش شده است. در همین راستا، نتایج نشان داد که میزان نیتریک اکساید آزاد شده در بافت دئودنوم بیشتر از بافت قولون بوده است که این می‌تواند به دلیل استقرار سلول‌های عصبی و شبکه عصبی میانتریک و اورباخ در بافت روده‌ی کوچک باشد. اما تغییرات دامنه و فرکانس در قولون بیشتر از روده کوچک بود که قوی‌تر بودن عضلات قولون و قدرت انقباضی بیشتر آن نسبت به روده کوچک، می‌تواند دلیلی بر این مشاهدات باشد. با وجود کاهش میزان بیان ژن NOS نورونی و اندوتلیالی در دئودنوم، میزان نیتریک اکساید آزاد شده در این قسمت از لوله گوارش حیوانات دریافت کننده تریاک، تغییرات معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان داده نشد. اما چون بیان ژن NOS القایی، نورونی و اندوتلیالی در قولون افزایش یافته بود، می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات بیان ژن NOS می‌تواند یک سیستم جبرانی برای مقابله با اختلال ایجاد شده در فرآیند طبیعی حرکات گوارشی و اسپاسم عضلانی ناشی از تریاک باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری و راهنمایی‌های دو تن از دانش‌آموختگان دوره دکتری تخصصی فارماکولوژی آقایان دکتر صمد محمدزاده و دکتر سیدرضا هاشمی، تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از آقای هاشم فرخ‌بال، تکنیسین و آقای غلامرضا شمس، کارشناس گروه علوم زیستی مقایسه‌ای به خاطر کمک‌هایشان در اجرای پروژه تحقیقاتی مرتبط با این مقاله، سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان مقاله حاضر، تعارض در منافع گزارش نشده است.

نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME) باعث تحریک فرکانس سیکل حرکتی در معده و روده‌ی خرگوش در محیط برون‌تنی شده است، همچنین تجویز داخل‌رگی این ماده، سبب افزایش انقباضات روده کوچک و کاهش حرکات روده در محیط درون‌تنی در سگ، رت، جوجه و گوسفند شده است (۲۶).

شواهد حاکی است که مورفین موجب تغییرات رفتاری تغذیه‌ای از جمله افزایش تحرکات حیوان و اخذ غذا در موش سوری می‌شود. در حالی که مصرف ال-آرژینین باعث افزایش اثرات تحریک فعالیت ناشی از مورفین (افزایش تحرکات و اخذ غذا) می‌شود، اما تجویز داروی L-NAME، این اثرات را کاهش می‌دهد (۶). مطالعه Bhargava و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان داد که مصرف طولانی مورفین باعث افزایش فعالیت NOS نورونی در برخی از مناطق مغز می‌شود (۲). درمان‌های کوتاه مدت با مورفین سبب افزایش NOS و کلسیم داخل سلولی در مخچه موش سوری شده است که با نالوکسان قابل برگشت می‌باشد (۴). گیرنده اوپیوئیدی μ_3 بین ترکیبات اوپیوئیدی و نیتریک اکساید ارتباط برقرار می‌کند. این گیرنده که در سلول‌های معده پستانداران گسترش فراوانی دارد برای آلکالوئیدهای اوپیوئیدی انتخابی عمل می‌کند و حساسیت زیادی نسبت به پپتیدهای مخدر ندارد (۴،۲۸). اوپیوئیدها با مهار کانال‌های کلسیم و متعاقب آن افزایش فعالیت آدنیلات سیکلاز، بر آزادسازی نیتریک اکساید اثر گذار هستند (۲۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تریاک با تغییر در فعالیت دامنه و فرکانس انقباضات ماهیچه صاف روده، سبب افزایش انقباض عضله صاف و ایجاد اسپاسم عضلانی در روده‌های موش سوری می‌شود که میزان این تغییرات در قولون شدیدتر از روده کوچک می‌باشد. بین انقباض عضله صاف و ایجاد اسپاسم عضلانی و میزان پیشروی ترکیب زغال+صمغ در روده موش‌های سوری درمان شده با تریاک، ارتباط مستقیمی وجود داشته است. به نظر می‌رسد افزایش تعداد انقباضات در واحد زمان، حرکات خودبه‌خودی عضلات صاف روده را به حالت

References

1. Arab, H. A., Muhammadnejad, S., Faghihi, S. M., Hassanpour, H., Muhammadnejad, A. (2014). Effects of nitric oxide modulating activities on development of enteric nervous system mediated gut motility in chick embryo model. *J Biosci*, 39(5), 835-848. <https://doi.org/10.1007/s12038-014-9474-4> PMID: 25431412.
2. Bhargava, H. N. (1995). Attenuation of tolerance to, and physical dependence on, morphine in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. *Gen Pharmacol*, 26(5), 1049-1053. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)00271-N](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)00271-N) PMID: 7557249.
3. Brennan, M. J. (2013). The effect of opioid therapy on endocrine function. *Am J Med*, 126(3), S12-S18. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.12.001> PMID: 23414717.
4. Cadet, P., Mantione, K. J., Zhu, W., Kream, R. M., Sheehan, M., Stefano, G. B. (2007). A functionally coupled μ_3 -like opiate receptor/nitric oxide regulatory pathway in human multi-lineage progenitor cells. *J Immunol*, 179(9), 5839-5844. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5839>.

5. Calignano, A., Moncada, S., Di Rosa, M. (1991) Endogenous nitric oxide modulates morphine-induced constipation. *Biochem Biophys Res Commun*, 181(2), 889-893. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91274-g](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91274-g) PMID: 1755865.
6. Calignano, A., Persico, P., Mancuso, F., Sorrentino, L. (1993). Endogenous nitric oxide modulates morphine-induced changes in locomotion and food intake in mice. *Eur J Pharmacol*, 231(3), 415-419. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90118-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90118-2)
7. Camilleri, M., Drossman, D., Becker, G., Webster, L., Davies, A., Mawe, G. (2014). Emerging treatments in neurogastroenterology: A multidisciplinary working group consensus statement on opioid-induced constipation. *Neurogastroenterol Motil*, 26(10), 1386-1395. <https://doi.org/10.1111/nmo.12417>. PMID: 25164154
8. Chen, W., Chung, H.-H., Cheng, J.-T. (2012). Opiate-induced constipation related to activation of small intestine opioid μ 2-receptors. *World J Gastroenterol*, 18(12), 1391. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i12.1391> PMID: 22493554
9. Coyne, K. S., LoCasale, R. J., Datto, C. J., Sexton, C. C., Yeomans, K., Tack, J. (2014). Opioid-induced constipation in patients with chronic noncancer pain in the USA, Canada, Germany, and the UK: descriptive analysis of baseline patient-reported outcomes and retrospective chart review. *Clinicoecon Outcomes Res*, 6, 269. <https://doi.org/10.2147/CEOR.S61602> PMID: 24904217
10. Farzi, A., Halicka, J., Mayerhofer, R., Fröhlich, E. E., Tatzl, E., Holzer, P. (2015). Toll-like receptor 4 contributes to the inhibitory effect of morphine on colonic motility in vitro and in vivo. *Sci Rep*, 5, 9499. <https://doi.org/10.1038/srep09499>, PMID: 25962524.
11. Hassanpour, H., Nikoukar, Z., Nasiri, L., Bahadoran, S. (2015). Differential gene expression of three nitric oxide synthases is consistent with increased nitric oxide in the hindbrain of broilers with cold-induced pulmonary hypertension. *Br Poult Sci*, 56(4), 436-442. <https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1058920> PMID: 26053227
12. Hellström, P., Ljung, T. (1996). Nitroergic inhibition of migrating myoelectric complex in the rat is mediated by vasoactive intestinal peptide. *J Neurogastroenterol Motil*, 8(4), 299-306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.1996.tb00268.x>
13. Holzer, P. (2014). Pharmacology of opioids and their effects on gastrointestinal function. *Am J Gastroenterol*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.1038/ajgsup.2014.4>
14. Hooten, W. M., Lamer, T. J., Twyner, C. (2015). Opioid-induced hyperalgesia in community-dwelling adults with chronic pain. *Pain*, 156(6), 1145. <https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000170>, PMID: 25815431
15. Iwata, H., Tsuchiya, S., Nakamura, T., Yano, S. (2007). Morphine leads to contraction of the ileal circular muscle via inhibition of the nitroergic pathway in mice. *Eur J pharmacol*, 574(1), 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.029>
16. Lénárd Jr, L., Halmai, V., Barthó, L. (1999). Morphine contracts the guinea pig ileal circular muscle by interfering with a nitric oxide mediated tonic inhibition. *Digestion*, 60(6), 562-566. <https://doi.org/10.1159/000007707> PMID: 10545727
17. Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120(3), 227-23. PMID: 8273987
18. Majeed, N., Przewłocka, B., Machelska, H., Przewłocki, R. (1994). Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Neuropharmacology*, 33(2), 189-192. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)90006](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)90006) PMID: 7518573
19. Mashimo, H., Goyal, R. (1999). Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol*, 277 (3), 745-750. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.4.G745> PMID: 10516139
20. Namirani, K., Samini, M., Mehr, S. E., Gaskari, S. A., Rastegar, H., Homayoun, H., Dehpour, A. R. (2001). Mesenteric vascular bed responsiveness in bile duct-ligated rats: roles of opioid and nitric oxide systems. *Eur J pharmacol*, 423(2-3), 185-193. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01091-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01091-3) PMID: 11448484
21. Nelson, A. D., Camilleri, M. (2016). Opioid-induced constipation: advances and clinical guidance. *Ther Adv Chronic Dis*, 7(2), 121-134. <https://doi.org/10.1177/2040622315627801> PMID: 26977281
22. Nieto-Fernandez, F. E., Mattocks, D., Cavani, F., Salzet, M., Stefano, G. B. (1999). Morphine coupling to invertebrate immunocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients. *Comp Biochem Physiol B*, 123(3), 295-299. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00074-7) PMID: 10481258
23. Ono, H., Nakamura, A., Matsumoto, K., Horie, S., Sakaguchi, G., Kanemasa, T. (2014). Circular muscle contraction in the mice rectum plays a key role in morphine-induced constipation. *Neurogastroenterol Motil*, 26(10), 1396-1407. <https://doi.org/10.1111/nmo.12443> PMID: 25257923
24. Osinski, M. A., Brown, D. R. (2000). Orphanin FQ/nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function, *Peptides*, 21(7), 999-1005. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(00\)00240-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(00)00240-0) PMID: 10998534.
25. Poonyachoti, S., Portoghesi, P. S., Brown, D. R. (2001). Characterization of opioid receptors modulating neurogenic contractions of circular muscle from porcine ileum and evidence that δ - and κ -opioid receptors are coexpressed in myenteric neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(1), 69-77. PMID: 11259529
26. Romanski, K. W. (2009). Mechanisms controlling the gastrointestinal migrating motor complex. *J Pre Clin Clin Res*, 3(1), 11-19. <https://doi.org/10.5056/jnm.2012.18.3.246> PMID: 22837872
27. Shah, V., Lyford, G., Gores, G., Farrugia, G. (2004). Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 126(3), 903-913. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.046> PMID: 14988844
28. Stefano, G., Zhu, W., Cadet, P., Bilfinger, T., Mantione, K. (2004). Morphine enhances nitric oxide release. *J Physiol Pharmacol*, 55(1), 279-288. PMID: 15082884
29. Tack, J., Corsetti, M. (2014). Naloxegol for the treatment of opioid-induced constipation. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 8(8), 855-861. <https://doi.org/10.1586/17474124.2014.939629> PMID: 25220391
30. Takahashi, T. (2003). Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol*, 38(5), 421-430. <https://doi.org/10.1007/s00535-003-1094>, PMID: 12768383.