دانشگاه تربیت معلم

دانشکده علوم-گروه زیست شناسی

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته فیزیولوژی جانوری

عنوان:

بررسی اثر متقابل سیستم های دوپامینرژیک و گابائرژیک بر اخذ اب در موشهای نر بالغ نژاد ویستار حساس شده به مورفین

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر شهربانو عریان

استاد مشاور:

سرکار خانم دکتر رامش احمدی

نگارش:

مونا خزائی

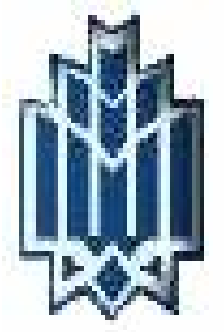
1388

مقدمه

مواد و روش ها

نتایج

بحث و نتیجه گیری



Tarbiat Moallem University

Faculty Of Science, Department Of Biology

Thesis submitted for degree of master of

Science in Animale Physiology

Title:

The Intraction of GABAergic and Dopaminergic System on Water Intake In Morphine Induced Sensitized Male Wistar rats

Supervisor:
Dr.sh.oryan

Advisor:
Dr.r.Ahmadi

By:
Mona khazaiy

Jan 2010

تقدیر وتشکر

سپاس و ستایش خدایی را که مرا فرصت بودن داد و رخصت آموختن. خدایی که در سایه عنایتش انجام این پژوهش میسر گردید.

در اینجا لازم است از کلیه اساتید و بزرگوارانی که در طول دوران تحصیل همواره اینجانب را مورد لطف و راهنمایی قرار داده اند تشکر وقدر دانی نمایم.

مراتب سپاس و قدر دانی خود را به محضر استاد بزرگوار و ارجمندم سرکار خانم دکتر عریان که اینجانب افتخار شاگردی ایشان را داشته ام و در مدت تحصیل به عنوان استاد راهنما و مدیر گروه زیست شناسی زحمات فراوانی را متقبل گردیده اند و همواره رهنمودهای ایشان راه گشایم بوده است ، تقدیم می نمایم.

از سرکار خانم دکتر احمدی که مشاورت تحقیق حاضر را عهده دار گردیده اند تشکر و قدر دانی می نمایم.

از جناب آقای دکتر نبیونی که زحمت داوری این پایان نامه را پذیرفته اند ، تشکر و سپاسگزاری می نمایم.

از جناب آقای دکتر باباپور که زحمت داوری این پایان نامه را پذیرفته اند ، کمال تشکر و سپاسگزاری را می نمایم.

از مسئول مهربان گروه زیست شناسی، سرکار خانم فلاح؛ که دلسوزانه راه گشای مشکلات بودندکمال تشکر و سپاسگزاری را می نمایم.

از دوستان عزیزم ،خانم لیلا شریفی و افسانه رئوفی ، که لحظات خوشی را در کنارشان تجربه کردم و از راهنمایی هایشان بهره گرفتم، تشکر وقدر دانی می نمایم.

از پدر و مادر و برادران عزیزم که در طول مدت تحصیل همواره مورد حمایت های آنان بوده ام تشکر و قدردانی می نمایم.

در پایان از خانم زهره شریف خدایی، مرضیه شیرازی و آقای مشکانی که در انجام این پروژه اینجانب را یاری کرده اند کمال تشکر و قدر دانی را می نمایم.

چکیده

تشنگی و اشتها به نمک پدیده های مهمی هستند که به پستانداران برای تنظیم کردن اسمولاریته پلاسما، حجم خون و فشار خون کمک می کنند. تشنگی ترکیبی از مکانیسم های تنظیمی است که هومئوستازی مایعات بدن را ثابت نگه می دارد و در نهایت برای بقا ضروری است. اندام های دور بطنی CVOs ، هسته پره اپتیک میانی (Mnpo) و بافت های ناحیه قدامی شکمی بطن سوم در لامینا ترمینالیس (AV3V) از نظر آناتومیکی برای تنظیم تشنگی ، ارتباطات گسترده ای با هیپوتالاموس ، سیستم لیمبیک و ساقه مغز دارند.

در این تحقیق واکنش متقابل سیستم های دوپامینرژیک و گابائرژیک بر اخذ آب در موش های صحرایی نر نژاد ویستار سالم و حساس شده به مورفین مورد مطالعه قرار گرفته است. برای تیمار درون بطنی در حیوان سالم یک کانول راهنما در بطن جانبی سمت راست موش های صحرایی بالغ با محدوده وزنی 250- 200 گرم قرار گرفت. بعد از دوره نقاهت حیوانات به مدت 24 ساعت از آب محروم شدند ، سپس داروها تزریق شده و میزان نوشیدن آب به مدت 1ساعت در این حیوانات مورد بررسی قرار گرفت. در مورد حیوان حساس شده به مورفین ، پس از دوره نقاهت ، حیوان در ابتدا به مورفین حساس شده و بعد از 24 ساعت محرومیت از آب ، داروها تزریق و میزان اخذ آب به مدت یک ساعت در این حیوانات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که تزریق درون بطنی بروموکریپتین (۱۰µg/rat) آگونیست گیرنده D2 دوپامینی، بیکوکولین (۱µg/rat) آنتاگونیست گیرنده GABAA و تزریق زیر جلدی مورفین (5mg/kg) بطور معنی داری توانستند میزان اخذ آب را در رت های محروم از آب افزایش دهند در حالیکه تزریق درون بطنی کلرپرومازین (40 µg/rat) آنتاگونیست گیرنده D2 دوپامینی و موسیمول (0/1 µg/rat) آگونیست گیرنده GABAA میزان اخذ آب را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند.

برهم کنش بین دو سیستم دوپامینرژیک-گابائرژیک نشان داد که تزریق بروموکریپتین ، 15 دقیقه پس از تزریق موسیمول توانست بطور معنی داری میزان اخذ آب را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد، در حالیکه تزریق کلرپرومازین و بیکوکولین ، اثر معنی داری بر اخذ آب در مقایسه با گروه کنترل نداشت.

برهم کنش بین سیستم های اوپیوئیدرژیک-دوپامینرژیک و اپیوئیدرژیک-گابائرژیک نشان دادند که تزریق درون بطنی بروموکریپتین و موسیمول در موش های حساس شده به مورفین توانست بطور معنی داری میزان اخذ آب را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهد، در حالیکه تزریق بیکوکولین در موش های حساس شده به مورفین توانست بطور معنی داری میزان اخذ آب را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد، ولی کلرپرومازین در موش های حساس شده به مورفین اثر معنی داری را بر اخذ آب در مقایسه با گروه کنترل نداشت.

با توجه به داده های بدست آمده بین دو سیستم دوپامینرژیک – گابائرژیک (تزریق بروموکریپتین 15 دقیقه پس از تزریق موسیمول)، بین دو سیستم اوپیوئیدرژیک –دوپامینرژیک (تزریق درون بطنی بروموکریپتین در موش های حساس شده به مورفین) و همچنین بین دوسیستم اوپیوئیدرژیک – گابائرژیک (تزریق درون بطنی موسیمول و بیکوکولین هر یک به تنهایی در موش های حساس شده به مورفین) پیشنهاد می شود که سیستم های دوپامینرژیک و گابائرژیک و اپیوئیدرژیک با یکدیگر دارای واکنش متقابل در مکانیسم نوشیدن واخذ آب می باشند.

عنوان

تقدیر و تشکر ..... د

چکیده فارسی ..... ر

فصل اول : مقدمه

1-1 تقسیم بندی مایعات بدن 1

1-1-1 مایع داخل سلولی 1

1-1-2 مایع خارج سلولی 1

2-1 تشنگی 1

1-2-1 مکانیسم نوشیدن 4

2-2-1 نوشیدن توسط اسمولاریته بافتی و حجم سرخرگی کنترل می شود 4

3-2-1 کنترل حجمی آزادسازی وازوپرسین 5

3-1 مورفین 6

1-3-1 گیرنده های اپیوئیدی 7

1-1-3-1 گیرنده μ 7

2-1-3-1 گیرنده κ 7

2-3-1 اعمال سلولی اپیوئیدها 8

3-3-1 اثرات اپیوئیدها بر اندام ها 9

4-1 دوپامین 9

1-4-1 گیرنده دوپامینی 9
1-4-2 گیرنده دوپامینی در سیستم عصبی مرکزی 10
1-4-3 سیستم دوپامینی در مغز 11
1-4-4 سیستم دوپامینی و اخذ آب 12
1-4-5 سنتز دوپامین 12
1-4-6 مکانیسم عمل دوپامین 14
1-4-6-1 مسیرهای دوپامینی 15
1-4-7 ساختار شیمیایی بروموکریپتین آگونیست گیرنده D2 16
1-4-8 ساختار شیمیایی کلرپرومازین آنتاگونیست گیرنده D2 17
1-5 گابا آمینوبوتیریک اسید 18
1-5-1 سنتز گابا 18
1-5-2 بازجذب گابا 18
1-5-3 سنتز و متابولیسم گابا 19
1-5-4 گیرنده گابا 20
1-5-4-1 گیرنده $GABA_A$ 20
1-5-4-1-1 آگونیست و آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ 23
1-5-4-1-2 توزیع گیرنده $GABA_A$ 24
1-5-4-2 گیرنده $GABA_B$ 24
1-5-4-2-1 آگونیست و آنتاگونیست گیرنده 25
1-5-4-3 گیرنده $GABA_C$ 25

1-5-4-4 اثرات فیزیولوژیکی GABA 26

1-5- 5 مسیر گابائرژیک در مغز 26

فصل دوم: مواد و روش ها

2-1 حیوانات مورد آزمایش 27

2-2 مواد و لوازم 27

2- 3 داروها 28

2-4 ساخت کانول راهنما و تزریق 29

2-5 کانول گذاری 29

2-6-1 نحوه تزریق داروها در موش های سالم 33

2-6-2 نحوه تزریق داروها در موش های حساس شده به مورفین 33

2-7 گروه های تجربی مورد مطالعه 33

2-8 تعیین حجم آب اخذ شده 36

2-9 بررسی برش های بافتی به منظور تعیین موقعیت محل دقیق تزریق 37

2-10 آنالیز آماری 38

فصل سوم: نتایج

3-1 نتایج تاثیر تزریق زیر جلدی مورفین ، جهت حساس شدن به مورفین بر روی اخذ آب در موش ها 39

3-2 نتایج تاثیر تزریق درون بطنی دوزهای مختلف بروموکریپتین 40

3-3 نتایج تاثیر تزریق درون بطنی دوزهای مختلف کلرپرومازین 41

4-3 نتایج تاثیر تزریق درون بطنی دوزهای مختلف موسیمول.....42

5-3 نتایج تاثیر تزریق درون بطنی پروپیلن گلیکول 43

6-3 نتایج تاثیر تزریق درون بطنی دوزهای مختلف بیکوکولین.....44

7-3 نتایج تاثیر واکنش متقابل موسیمول و بروموکریپتین در موش های سالم.....45

8-3 نتایج تاثیر واکنش متقابل بیکوکولین و کلرپرومازین در موش های سالم 46

9-3 نتایج تاثیر تزریق درون بطنی بروموکریپتین در موش های حساس شده به مورفین 47

10-3نتایج تاثیر تزریق درون بطنی کلرپرومازین در موش های حساس شده به مورفین.....48

11-3 نتایج تاثیر تزریق درون بطنی موسیمول در موش های حساس شده به مورفین 49

12-3 نتایج تاثیر تزریق درون بطنی بیکوکولین در موش های حساس شده به مورفین.....50

13-3 نتایج تاثیر واکنش متقابل موسیمول و بروموکریپتین در موش های حساس شده به مورفین 51

14-3 نتایج تاثیر واکنش متقابل بیکوکولین و کلرپرومازین در موش های حساس شده به مورفین 52

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

1-4 اثر مورفین بر اخذ آب 55

2-4 اثر بروموکریپتین وکلرپرومازین آگونیست و آنتاگونیست های گیرنده D2 بر اخذ آب 57

3-4 اثر بروموکریپتین و کلرپرومازین آگونیست و آنتاگونیست های گیرنده D2 در موش های

حساس شده به مورفین بر اخذ آب 59
4-4 اثر موسیمول و بیکوکولین آگونیست و آنتاگونیست گیرنده GABAA بر اخذ آب 60
5-4 اثر واکنش متقابل موسیمول و بروموکریپتین بر اخذ آب 63
6-4 اثر موسیمول در موش های حساس شده به مورفین بر اخذ آب 64
7-4 اثر بیکوکولین در موش های حساس شده به مورفین بر اخذ آب 65
نتیجه گیری کلی.....66
8-4 پیشنهادات 67
منابع 68

1-1-تقسیم بندی مایعات بدن

مایعات بدن به دو بخش عمده تقسیم می شود : مایع خارج سلولی و مایع داخل سلولی.

مایع خارج سلولی به مایع میان بافتی و پلاسمای خون تقسیم می شود (Burrel et al .,1992). البته بخش کوچک دیگری از مایع هم وجود دارد که به مایع ترا سلولی Transcellular fluid معروف است. این بخش شامل مایعات درون فضاهای سینوویال، صفاقی، پریکاردی، داخل چشمی و مایع مغزی نخاعی است (Denton et al ., 1999).

1-1-1- مایع داخل سلولی

به مجموعه مایعات داخل سلول ها، مایع داخل سلولی گفته می شود. در واقع ترکیب مایعات سلولی به صورت قابل توجهی حتی در حیوانات مختلف (از ابتدایی ترین میکروارگانیسم ها تا انسان) به هم شبیه است. بنابراین مجموع مایعات داخل سلولی در تمام سلول های مختلف به صورت یک بخش بزرگ مایعات در نظر گرفته می شود (Fitzsimons , 1998).

1-1-2- مایع خارج سلولی

به مجموعه تمام مایعات بیرون از سلول ها مایع خارج سلولی می گویند. دو بخش عمده مایع خارج سلولی عبارتند از مایع میان بافتی که حدود3/4 مایع خارج سلولی را تشکیل می دهد و پلاسما که حدود1/4 مایع خارج سلولی را تشکیل می دهد (Thrasher et al ., 1999) .

1-2- تشنگی

تشنگی احساسی است که انسان و حیوانات را تحریک به نوشیدن می کند و ترکیبی از مکانیسم های تنظیمی است که هومئوستازی مایعات بدن را ثابت نگه می دارد و در نهایت برای بقا ضروری است (Mckinley et al ., 2004). تشنگی رفتاری است که برای تنظیم اسمولاریته پلاسما ، حجم و فشار خون به حیوان کمک می کند (Magrani et al ., 2004). زمانی که بدن آب از دست می دهد ، معمولا مایع داخل و خارج سلولی از بین می رود و فضاهای داخل و خارج سلولی از آب تهی

می شوند و یکسری پاسخ های جبران کننده شروع می شود، این پاسخ ها شامل ترشح وازوپرسین، تحریک سیستم رنین- آنژیوتانسین- آلدوسترون ، فعالیت سیستم سمپاتیک و کاهش دفع کلیوی آب و مواد محلول است. اگر چه چنین مکانیسم های جبرانی برای حیوانات مفید هستند، اما نمی تواند حجم مایعات بدن را به میزان پایه برگردانند به همین علت از دست رفتن مایعات بدن ، دوباره باید جبران شود. درنتیجه تشنگی ، رفتاری است که موجود را وادار به نوشیدن آب می کند و برای متناسب کردن پاسخ های فیزیولوژیکی که حجم و ترکیب مایعات بدن را ثابت نگه می دارند مهم است (Mckinley et al ., 2004).

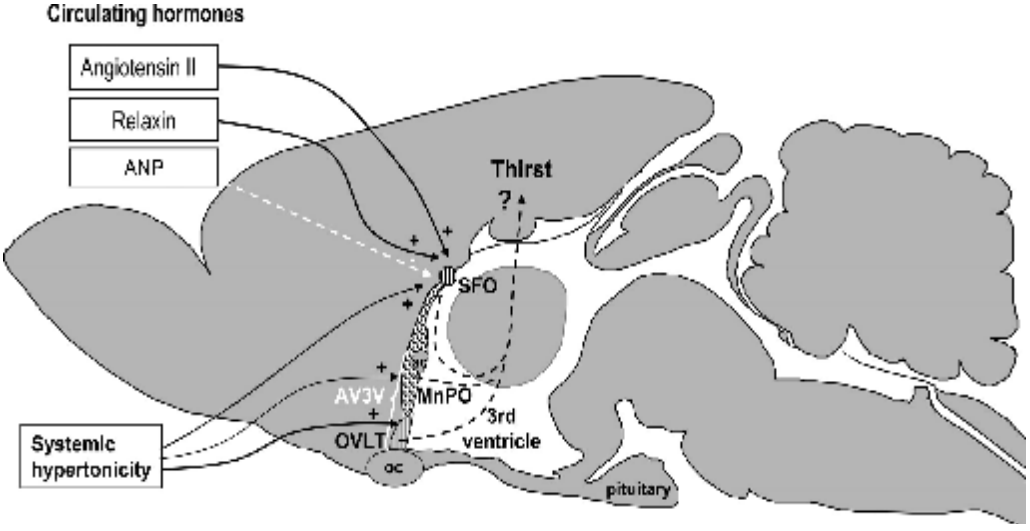
تنظیم هومئوستازی مایعات بدن برای حفظ حیات ضروری است. به هم خوردن تعادل مایعات بدن ، هنگامی که غلظت الکترولیت های خارج سلولی افزایش می یابد یا زمانیکه حجم مایعات خارج سلولی کاهش می یابد، رخ می دهد. برای اصلاح کاهش مایعات بدن که به هنگام hypovolemia رخ می دهد ، حیوان به جذب آب و الکترولیت ها نیازمند است (Derek Daniels et al ., 2007).

مطالعات نشان می دهد که دو نوع تشنگی وجود دارد : 1- تشنگی اسمزی : این نوع تشنگی زمانی بوجود می آید که غلظت مایع میان بافتی افزایش یابد، این افزایش غلظت منجر به خروج آب از سلول ها می شود ، بنابراین سلول ها از نظر حجمی کوچک می گردند.

2- تشنگی حجمی: این نوع تشنگی زمانی ایجاد می شود که حجم پلاسمای خون کاهش یابد (Carlson , 1998).

شواهد نشان می دهد که بافت دیواره قدامی بطن سوم AV3V (Antro ventral third ventricle) در تشنگی دخالت دارد. همچنین نورون هایی در ناحیهSFO (Subfornical Organ) ، OVLT (Organum Vasculosum lamina Terminalis) وجود دارند که جایگاه حساس اسمورسپتورها هستند. SFO وOVLT دو اندام دور بطنی هستند که فاقد سد خونی - مغزی می باشند و در دیواره قدامی بطن سوم قرار گرفته اند (Andersson , 1978).

مطالعات در موش ها نشان داده که ناحیه Mnpo (Median preoptic nucleus) در لامینا ترمینالیس نقش مهمی در تشنگی در پاسخ به سیگنال های هورمونی و اسموتیکی دارد. و آوران هایی از SFO و OVLT به این هسته رله می شوند این ناحیه غنی از رسپتورهایAT_1 (آنژیوتانسین II) می باشد (Johnson et al.,1997 ; Salvia et al .,1995) شکل (1-1). و همچنین از نواحی دیگر مغزی و سایر نقاط بدن مثل Area postrema (AP) و سیستم باب کبدی، آوران هایی دریافت می کند. لامیناترمینالیس ناحیه ای از مغز است که تحریکات را از گردش خون مثل هایپر تونیسیته پلاسما یا هورمون هایی مثل ریلاکسین و آنژیوتانسین دریافت می کند. نواحی جانبی هیپوتالاموس، هسته Paraventricular هیپوتالاموس ، Periaqueductal gray همگی مناطقی هستند که آوران های عصبی از لامینا ترمینالیس دریافت نموده و به عنوان مناطقی که در ایجاد تشنگی شرکت می کنند مطرح شده اند (Mckinley et al., 2004). همچنین مناطق قدامی و خلفی هیپوتالاموس، هیپوکمپ پشتی و شکمی، بخش میانی تالاموس ، بطن های جانبی در ایجاد تشنگی نقش بازی می کنند (Denton et al ., 1999)،شکل(1-1)



شکل (1- 1) منا طق و مسیرهای دخیل در تشنگی (Mckinley et al ., 2004)

1-2- 1- مکانیسم نوشیدن

سیگنال های نورونی وارده از تاثیرات هورمونی و اسمزی همگی وارد ناحیه SFO شده و از آنجا وارد هسته Mnpo می شود، همچنین ورودی های آوران از بارورسپتور های قلبی عروقی به مغز از طریق اعصاب جمجمه ای پراجکت می شوند و به هسته NTS (Tracteus Solitarius) منتهی می شوند که در نهایت سیگنال های ایجاد شده از این هسته وارد Mnpo می شود. Mnpo اطلاعات را جمع آوری نموده و از طریق اتصالات وابران خود با سایر قسمت های مغز، نوشیدن و ترشح وازوپرسین را کنترل می کند (Gland Ritter., 1982).

1-2-2- نوشیدن توسط اسمولاریته بافتی وحجم سرخرگی کنترل می شود :

هیپوتالاموس نقش تنظیم تعادل آب را بر عهده دارد که این عمل را از طریق هورمون هایی نظیر آنتی دیورتیک هورمون انجام می دهد. Fitzsimons در سال 1998 این گونه بیان می کند که اگر یکی از این متغیرها تغییر کند سیگنال هایی که مربوط به این متغیرها هستند باعث ایجاد یکسری مکانیسم ها در مغز می شوند که رفتار نوشیدن را کنترل می کنند. این اعمال از طریق فیبرهای آورانی صورت می گیرد که از رسپتور های محیطی می آیند، یا حاصل فعالیت هورمون بر رسپتورهای ویژه خود می باشد که در مغز جای دارند. این آوران ها مکانیسم های فیزیولوژیکی را که سبب حفظ آب می شوند، کنترل می کنند (Anderson et al ., 2002).

سیگنال های فیدبکی برای حجم سرخرگی در نقاط محدودی در دستگاه گردش خون قرار دارند که این مناطق نقاطی هستند که فشار خون در آنجا پایین است مانند دهلیز راست و دیواره های نزدیک سیاهرگهای بزرگ. تغییرات حجمی بزرگ نیز می توانند روی بارورسپتورهای سرخرگی موجود در کمان آئورتی و سینوس کاروتید تاثیر بگذارند، که این سیگنال ها باعث شروع نوشیدن می شوند. کاهش حجم خون می تواند باعث افزایش ترشح رنین از کلیه شوند. رنین یک آنزیم پروتئولیتیک است که می تواند آنژیوتانسینوژن را به آنژیوتانسین I تبدیل کند که آنژیوتانسین I هم هیدرولیز شده

و به آنژیوتانسین II تبدیل می شود (Caston et al ., 2001). آنژیوتانسین II سبب فرآیند نوشیدن می شود که با سه عمل فیزیولوژیکی می تواند کمبود آب را جبران کند:

1- Vasoconstriction

2-افزایش ترشح آلدوسترون

3-افزایش ترشح وازوپرسین (Smet , 2003)

1-2-3-کنترل حجمی آزاد سازی وازوپرسین

در واقع آزاد سازی AVP از انتهای نورون های نوروسکرتری ماگنوسلولار هیپوتالاموس در هیپوفیز به واسطه بارورسپتورهای محیطی ، رسپتورهای حجمی قلبی- ریوی و غلظت ANG II موجود در گردش خون تنظیم می شود (Renaud , 1996 ; Thrasher , 1994). سیگنال های ایجاد شده از طریق مسیرهای آوران به واسطه افکتورهای مختلف باعث تحریک این سلول های ترشح کننده AVP می شود (Renaud , 1996). افزایش فشار آرتریول ها باعث فعال کردن بارورسپتورها می شود، که این ها با نورون های GABAergic مهار کننده نورون های نوروسکرتری همراه می شوند. ایمپالس های نورونی آمده از رسپتورهای کشیده شده موجود در دهلیز چپ ، قوس آئورت و سینوس کاروتید باعث مهار آزاد سازی AVP می شود (Bisset et al., 1988). بارورسپتورهای موجود در دهلیز و بطن از طریق تغییر حجم خون و رسپتورهای موجود در قوس آئورت و سینوس کاروتید از طریق تغییر در فشار خون تولید سیگنال های عصبی می کنند. این پیامها از طریق نورونهای واگی و گلوموفارینژیال به NTS (Nucleus Tracteus Solitarius) موجود در ساقه مغز رفته و از آنجا از طریق مسیرهای چند سیناپسی به نورون های ماگنوسلولار موجود در PVN و SON می روند (Duan et al ., 1997).