دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته علوم جانوری- فیزیولوژی

تداخل سیستم نیتریک اکساید با قدرت مرفین در *Paramecium caudatum*

Interaction of Nitric Oxide System to Morphine Potency in *Paramecium caudatum*

اساتید راهنما:

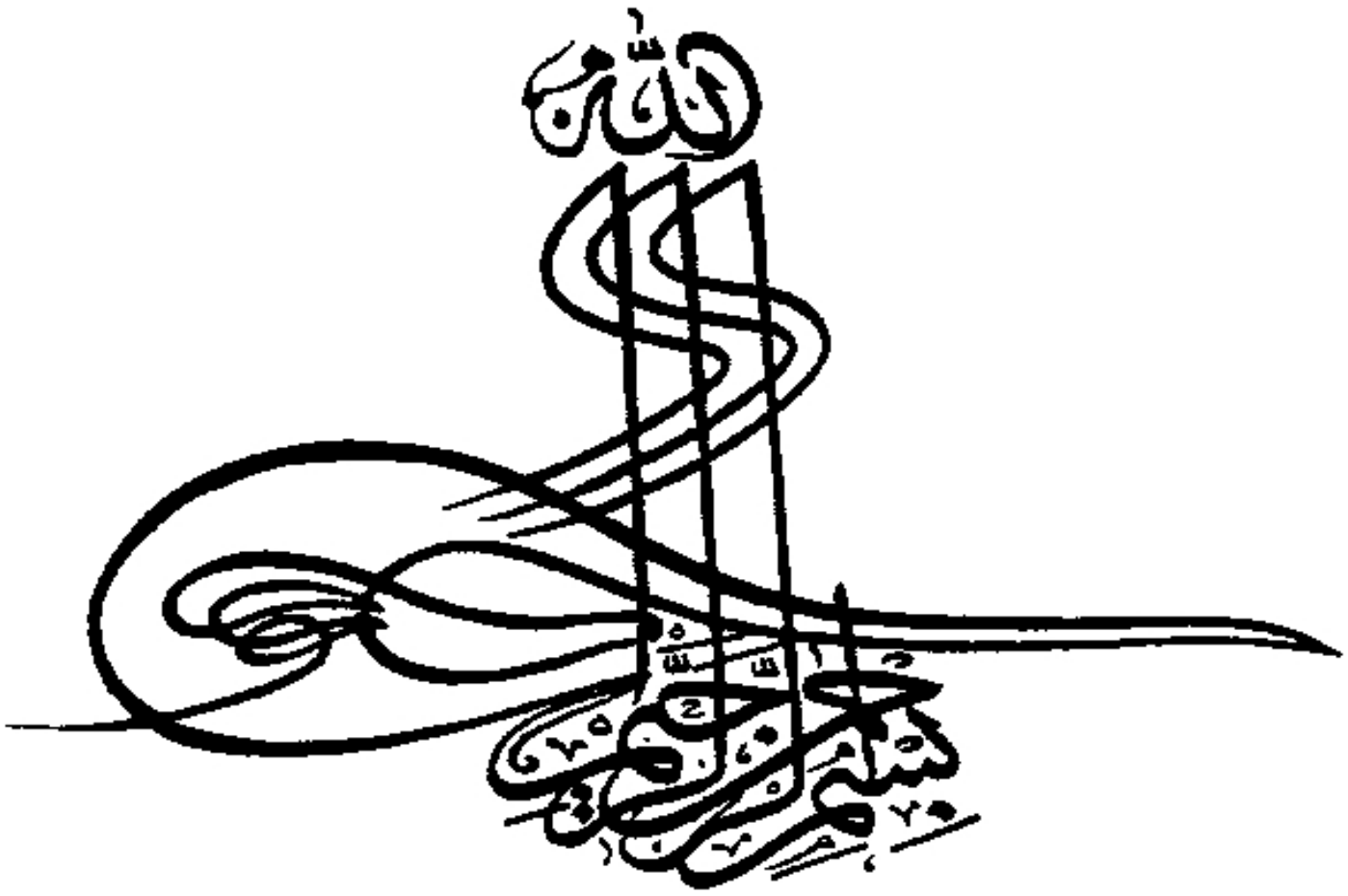
دکتر منیژه کرمی

دکتر بهرام کاظمی

دانشجو:

سید سجاد شاهرخی

اسفند ۱۳۸۹



تشکر و قدردانی

خداوند سبحان را بی نهایت سپاس، همانا اوست که ساعتی اندیشیدن را بر سالها عبادت برتری داده و قلم عالمان را برتر از خون شهیدان راهش قرار داده، اکنون که از دریای بیکران معرفتش قطره‌ای به من ارزانی داشته تا با اتکال به ذات اقدسش گامی کوچک در راه علم و دانش بردارم، بر خود لازم می‌دانم تا از کلیه اساتید و دوستان که در این راه مرا یاری نموده‌اند مراتب تشکر و امتنان خود را ابراز نمایم.

از اساتید راهنما، سرکار خانم دکتر منیژه کرمی و جناب آقای دکتر بهرام کاظمی و همچنین اساتید داور این پایان‌نامه کمال تشکر را دارم.

فهرست مطالب

چکیده ۱

I: پیشگفتار ۲

II: مقدمه ۳

II-۱: جانورشناسی *Paramecium* ٤

II-۱-۱: فیزیولوژی اعمال حیاتی..... ۴

II-۱-۲: جایگاه ***Paramecium*** در رده بندی جانوری ۸

II-۱-۳: رفتار حرکتی در تک یاختگان ۹

II-۱-۴: مکانیسم‌های حرکتی مژه داران..... ۱۰

II-۲: فارماکولوژی مرفین..... ۱۱

II-۲-۱: معرفی مرفین..... ۱۱

II-۲-۲: پپتیدهای اپیوئیدی درونزاد..... ۱۱

II-۲-۳ :گیرنده‌های اپیوئیدی..... ۱۲

II-۲-۴: فارماکوکینتیک مرفین..... ۱۵

II-۲-۵: فارماکودینامیک مرفین..... ۱۵

II-۲-۶: تحمل و وابستگی..... ۱۶

II-۲-۷: قدرت دارویی.....۱۶

II-۲-۸: ارتباط دوز- پاسخ.....۱۷

II-۳: سیستم نیتریک اکساید (NO).....۱۸

II-۳-۱: نیتریک اکساید(NO).....۱۸

II-۳-۲: اسید آمینه L-arginine ۲۰

II-۳-۳: آنزیم Arginase.....۲۲

II-۳-۴: آنزیم نیتریک اکساید سینتاز (NOS).....۲۳

II-۳-۵: اصول کلی روش هیستو شیمیایی NADPH-diaphorase.....۲۵

III: مواد و روشها.....۲۷

III-۱: مواد مورد استفاده ۲۸

III-۲: جمع آوری نمونه وتهیه محیط کشت.....۲۸

III-۲-۱:تهیه محیط کشت طبیعی.....۲۸

III-۲-۲: تهیه محیط کشت مصنوعی.....۲۸

III-۲-۳: تنظیم pH و دمای محیط کشت.....۲۹

III-۳:مطالعات رفتاری

.....۳۰

III-۳-۱: تلقیح به جانور تک‌یاخته‌ای در محیط کشت..... ۳۰

III-۳-۲: بررسی رفتار(شمارش) جانور تک‌یاخته‌ای پس از تزریق..... ۳۰

III-٤: مطالعات سیتو شیمیایی..... ۳۲

III-۴-۱: پروتکل مراحل اجرای تکنیک NADPH- diaphorase..... ۳۲

III-٥:تجزیه وتحلیل

آماری..... ۳٤

IV: نتایج ۳٥

IV-۱: شواهد رفتاری

..... ۳۷

IV-۱-۱: **پاسخ Morphine** ۳۷

IV-۱-۲: **پاسخ ال- آرژینین(L- arginine)** ۳۹

IV-۱-۳: **پاسخ L-NAME** ۴۱

IV-۱-۴: **پاسخ مشترک مرفین و ال- آرژینین (L- arg+۲µg Morphine)** ۴۳

IV-۱-۵: **پاسخ مشترک L- NAME + ٤µg L- arg + ۲µg Morphine** ۴۵

IV-۱-۶: **پاسخ مشترک مرفین و نالوکسان (Naloxone + ۲µg Morphine)** ۴۷

IV-۲: شواهد سیتولوژیک..... ٤٩

V: بحث..... ٥٠

VI: نتیجه‌گیری..... ٥٤

VI-۱: نتیجه‌گیری در سطح فارماکولوژیک ٥٥

VI-۲: نتیجه‌گیری در سطح ملکولی..... ٥٦

VII: پیشنهادات ٥٨

VII-۱: پیشنهاد در سطح فارماکولوژیک ٥٩

VII-۲: پیشنهاد در سطح ملکولی ٦٠

VII-۲-۱: شناسایی ژن رسپتور μ در *Paramecium caudatum*..... ۶۰

VII-۲-۲: شناسایی ژن آنزیم NOS در *Paramecium caudatum*..... ۶۰

VIII:منابع..... ٦١

چکیده انگلیسی.....٦٦

چکیده:

مقدمه: مطالعات بسیاری برای نشان دادن نقش نیتریک اکساید (NO) در بیان اثرات داروئی مرفین در مهره داران صورت گرفته است، اما شواهد کافی برای این مساله در بی مهرگان پست وجود ندارد. در این پژوهش نقش NO در بیان قدرت مرفین (Morphine potency) در یک جانور تک‌یاخته‌ای با نام علمی *Paramecium caudatum* برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: نمونه های حیوانی پس از جداسازی از محیط طبیعی و تائید گونه در آزمایشگاه با کشت طبیعی تهیه شده از خیسانده یونجه و کشت مصنوعی مخمر که به کمک افزاینده‌های معدنی و آلی غنی گردید، پرورش داده شد. برای تلقیح داروها ابتدا یک میلی لیتر از محیط کشت خالص شده حاوی حیوان به لام سلول شمار Sedgwick-Rafter اضافه شد و دارو در حجم ۱µl توسط سرنگ همیلتون به نقطه خاصی از سلول شمار تحت میدان دید لنز شیئی ۴X از میکوسکوپ نوری اضافه شد. مقادیر مختلف مرفین (۱-۶۰ µg/µl) به شرح فوق تلقیح و طی فواصل زمانی مختلف (۰ -۱۸۰ sec) اثر آن گزارش گردید. ال- آرژینین (۱-۸ µg/µl) به عنوان پیش ساز NO قبل از دوز موثر مرفین (۲ µg/µl) تلقیح شد و برای نشان دادن تداخل NO، آنزیم مولد آن به کمک پیش تجویز L-NAME مهار گردید. همچنین برای نشان دادن دخالت گیرنده‌های اپیوئیدی در اثرات سیگنالینگ مرفین از Naloxone استفاده شد. فعالیت سیستم NO با بکارگیری روش سیتو شیمیایی NADPH-diaphorase مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه های شاهد به جای داروها، آب مقطر اضافه شد.

یافته ها: سلول های *P. caudatum* تحت تاثیر مرفین به حالت مجتمع (Aggregated)، در نقطه ای که تلقیح دارو انجام شد، درآمدند و بیشترین حالت تجمع نیز تحت دوز نسبتا" پائین (۲ µg/µl) مشاهده شد. ال-آرژینین اثر مثبت بر این فرایند داشت ($p<۰.۰۰۱$) در حالیکه با پیش تجویز L-NAME این اثرات متوقف گردید. Naloxoneنیز بر اثر دارو تاثیر مهاری داشت. در مواردی که عوامل سیستم NO بکار گرفته شد، تغییر فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سینتاز(**N**itric **O**xide **S**ynthase) با استفاده از تکنیک NADPH-diaphorase در *P.caudatum* نشان داده شد.

نتیجه گیری: یکی از اثرات داروئی مرفین در مدل حیوانی تک‌یاخته‌ای بروز تجمع سلولی است و نتایج فوق نشان می دهد که سیستم NO با سیستم اپیوئیدی در *P. caudatum* در این راستا تداخل دارد. از طرف دیگر با توجه به پاسخ تقویتی ال-آرژینین بر دوز موثر مرفین، این یافته می تواند در راستای کاهش اثرات جانبی مرفین (در بیماران تحت درمان با مرفین) و مسائل مربوط به اقتصاد دارویی ارزشمند باشد.

واژگان کلیدی: *Paramecium caudatum* ، قدرت دارویی مرفین، نیتریک اکساید، ال آرژینین.

I: پیشگفتار:

نیتریک اکساید سینتاز(**N**itric **O**xid **S**ynthase) آنزیم بیوسنتز کنندهٔ ملکول کوچک و گازی شکل نیتریک اکساید(**N**itric **O**xide) است، که اولین بار در ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال پستانداران شرح داده شد، و امروزه لااقل سه ایزوفرم اصلی($NOS_{۱}$, $NOS_{۲}$, $NOS_{۳}$) از این آنزیم در پستانداران معرفی شده است. [۷,۲۹]

اما در رابطه با این مسأله در جانوران بی‌مهره پست شواهد کافی در دست نیست. به طور مثال در*Ascaris suum* (نوعی نماتد) به تأثیر مرفین در تولید NO اشاراتی شده است [۴۰]. همچنین اطلاعات قبلی در رابطه با تأثیر مواد اپیوئیدی مانند مرفین و β- اندورفین (با کاربردهای بسیار مهم فارماکولوژیک) در برخی مژه داران مانند: *Paramecium, Stentor* و *Tetrahymena* در سطح بیوشیمیایی و ملکولی بیانگر تاثیر این مواد، تحت تداخل با رسپتورهای اپیوئیدی و G– پروتئین ها در این دسته از جانوران می باشد [۲۴,۲۵].

با گستردگی عمل NO در سلسله جانوری، دور از انتظار نخواهد بود اگر عامل مذکور در تک یاختگان نیز عملکرد مؤثری در تمامی فرآیندهای حیاتی داشته باشد، زیرا در *Paramecium caudatum* بیو ملکول های هدف NO مانند گوانیلیل سیکلاز [۲۲]، کانال پتاسیم و کانال کلسیمی دریچه دار وابسته به ولتاژ [۳۶,۳۳,۳۲,۱۸]، کالمودولین [۸] (یکی از پروتئین های لازم برای فعالیت آنزیم NOS) و یک پروتئین با وزن ۱۵۵ kDa [۲۳]. (که بسیار شبیه به آنزیم $NOS_{۱}$ پستانداران می باشد) به دست آمده است.

قدرت دارویی (Drug Potency) مواد مخدر مانند مرفین، β– اندورفین و ... یکی از مشخصه های بارز این مواد است [۶,۳۵]، در حالیکه بسیاری از محققین افزایش NO را علت اصلی تاثیر بر یادگیری و حافظه و ضد درد بودن مواد اپیوئیدی (به ویژه مرفین) در مهره داران می دانند [۳۱,۱۰,۲۱,۳۹].

با توجه به اینکه این مسأله در بی مهرگان، بخصوص جانوران تک‌یاخته‌ای، به وضوح تبیین نشده است، دراین پژوهش فرآیند قدرت مرفین (Morphine Potency) در یک جانور تک‌یاخته‌ای با نام علمی ***Paramecium caudatum*** بررسی شد، و تداخل NO با این فرآیند، به طور رفتاری و سیتو شیمیایی مورد مطالعه قرار گرفت.

II:مقدمه

II-۱: جانور شناسی *Paramecium*:

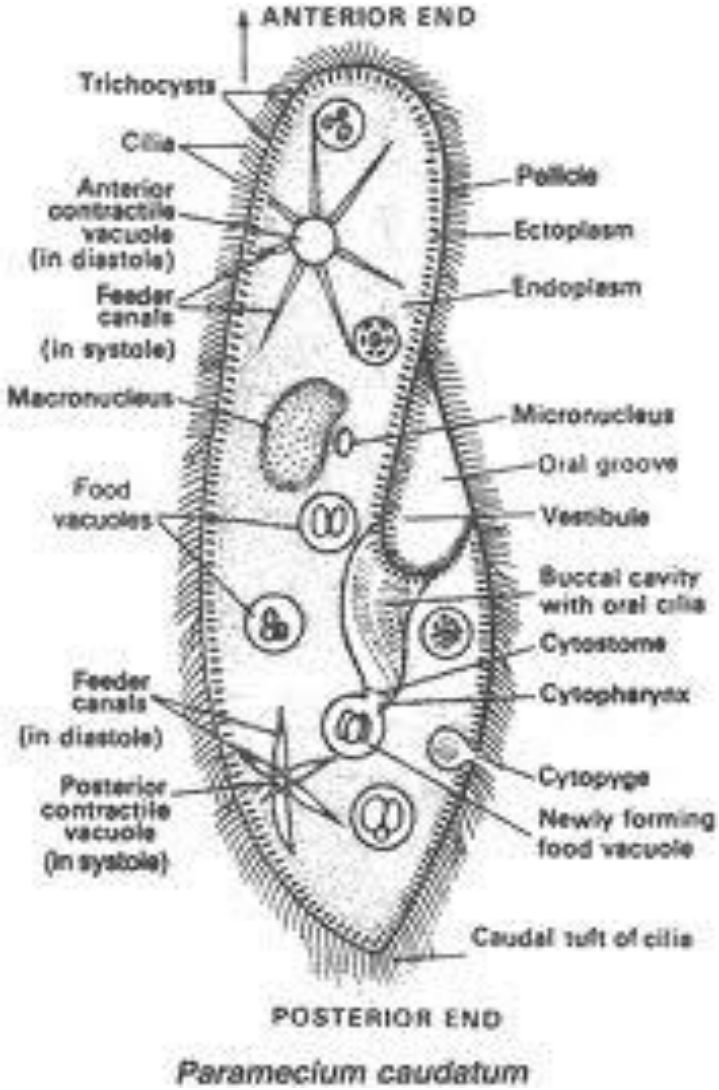
جانوران تک‌یاخته‌ای گروهی ازموجودات زنده جانور مانند هستند که فقط از یک سلول ساخته شده‌اند. یک گروه بزرگ از این جانوران را مژه‌داران تشکیل می‌دهند، که در خاک، مرداب‌ها، دریاچه‌ها و چشمه‌ها پراکنده‌اند. یک جنس معروف از مژه‌داران، *Paramecium* نام دارد. گونه‌های مختلف این جنس ساکن آب های شیرین اند و در مکان های مملو از گیاهان در حال فساد و سرشار از باکتری به وفور یافت می‌شوند. اعضای جنس *Paramecium* دارای پراکنش جهانی هستند. زیستگاه‌های آبی کوچکی که این جانوران در آنها یافت می‌شوند، گاهی خشک می‌شوند، ولی کیست بستن در آنها شناخته نشده است. اندازه گونه‌های مختلف *Paramecium* متفاوت است و ساختمان، شکل و رنگ آنها تا حدودی با یکدیگر تفاوت دارد[۱].

II-۱-۱: فیزیولوژی اعمال حیاتی

عوامل محیطی از قبیل دما، غذا و pH روی اندازه، شکل و تعداد *Paramecium* تأثیر زیادی دارد. اعضای جنس *Paramecium* دارای حرکت مارپیچی بسیار سریع در خلاف جهت عقربه‌های ساعت هستند و به هنگام برخورد با ذرات خارجی، مسیر خود را سریعا" عوض می‌کنند. حرکت مژه‌های موجود در سطح بدن این جانوران بسیار هماهنگ و از الگوی نا همزمانی (metachronization) برخوردار می‌باشد، به طوری که زنش هر مژه یکی پس از دیگری صورت می‌گیرد. در سطح بدن *Paramecium*، برجستگی‌ها و فرورفتگی‌هایی به چشم می‌خورد که باعث شده تا سطح بدن حیوان ناهموار به نظر آید، از هر یک از فرورفتگی های سطح بدن این جانور یک یا چند مژه (که تعداد آنها بر حسب گونه و منطقه‌ای که مژه از آن خارج می شود، متفاوت است) خارج می شود. علاوه بر پلیکل که خارجی ترین لایه پوششی سطح بدنش به حساب می آید ، دو غشای دیگر نیز بدن حیوان را می پوشاند که حد فاصل این دو غشاء، سیستم آلوئولی (alveoli) به صورت بسته های غشایی شکل گرفته است. قاعده هر مژه توسط یک آلوئول (alveolus) احاطه شده که مژه را حمایت می‌کند. هر مژه، از یک جسم پایه (Kinetosome) مستقر در زیر غشای خارجی (پلیکل) منشاء می گیرد. در کنار این جسم پایه شبکه‌ای سه بعدی از میکروتوبول‌ها که ضخیم ترین آن ها

دسته مخطط موسوم به kinetodesma است و سایر اجزای فیبری، اجسام مجاور پایه (که محل انجام پینوسیتوزند)، trichocysts (که اندامک های پرتاب شونده و دارای نقش دفاعی هستند) و میتوکندری‌های بزرگ را نیز می‌توان مشاهده کرد. فیبرهای مخطط (kinetodesma) و سایر ساختارهای میکروتوبولی هر مژه را به طور واحد یک Kinetid در نظر گرفته، و هر ردیف از Kinetidها را Kineti و مجموعه Kinetiها را Kinetum می‌نامند. هر یک از trichocyst ها به محض تحریک شدن، رشته نخ مانند و چسبنده‌ای از جنس مواد پروتئینی ترشح می‌نماید. به نظر می‌رسد که رشته‌های ایجاد شده توسط trichocyst ها در *Paramecium* بیشتر نقش قلاب را به هنگام تغذیه جانور عهده دار باشند. در *Paramecium* مژه‌ها علاوه بر حرکت، در تغذیه جانور نقش دارند. در قاعده یک شیار دهانی که در یک طرف بدن واقع شده، دهان (cytostome) قرار دارد. حرکات مژه‌های کناره شیار دهانی موجب جریان آب همراه با مواد غذایی در این ناحیه می‌شود، و مواد غذایی که شامل باکتری‌ها و سایر موجودات و ذرات خارجی می‌باشند، وارد دهان (cytostome) شده و توده غذایی جذب شده پس از عبور از این قسمت، به طرف قاعده دهان (cytostome) می‌رود. البته تا اینجا منفذی برای ورود ذرات غذایی به دورن سلول تدارک دیده نشده است بلکه جریان آب همراه مواد مغذی با حرکت توده ای Bulk Movement به ناحیه‌ای به نام حلق (cytopharynx) واقع در انتهای دهان (cytostome) می رسد که واجد دستجاتی از میکرو توبول‌ها می باشد. مواد غذایی در انتهای حلق یا گلوی حیوان به طریقه **فاگوسیتوز** جذب شده و در این ناحیه وارد واکوئل‌های غذایی شده و سپس واکوئل‌ها همراه با جریان سیتوپلاسمی، در داخل سیتوپلاسم به حرکت در می‌آیند. شیره واکوئل‌های غذایی در ابتدا خاصیت اسیدی دارد ولی به تدریج با گوارش مواد غذایی در درون واکوئل، این شیره خاصیت قلیایی پیدا می‌کند. مواد غیر قابل هضم در ناحیه معینی از سلول که اصطلاحاً مخرج سلولی (cytopyge) نامیده می‌شود، از سیتوپلاسم خارج می‌شوند. (شکل۱). در *Paramecium* آب اضافی سلول به کمک واکوئل‌های انقباضی (ضربان دار) خارج می‌شود، مکانیسم این عمل در *Paramecium* نسبت به تک یاخته‌های دیگر، پیچیده‌تر است. در *Paramecium* واکوئل‌های انقباضی دو عدد بوده و به عنوان اندامک های داخلی سلول در دو انتهای بدن واقع شده‌اند و دارای خاصیت دیاستول و سیستول می باشند. هر واکوئل انقباضی توسط یک مجموعه مجاری شعاعی (که خود از مجموعه‌ای از لوله‌های بسیار ریز و منشعب تشکیل شده‌اند) به وجود آمده است. مجاری شعاعی واکوئل‌ها در جهات مختلف در درون سیتوپلاسم امتداد یافته‌اند. هر واکوئل انقباضی از طریق منفذ مشخصی به خارج راه دارد. (شکل۱).

یکی از خصوصیات مژه‌داران داشتن دو نوع هسته است که هر دو به هنگام تقسیم سلول، تقسیم می‌شوند، یکی از این هسته‌ها که هسته کوچک (micronucleus) نام دارد، دارای ۲n کروموزوم می‌باشد. در جریان تقسیم سلول، کروموزوم‌های هسته کوچک مضاعف و تقسیم میوزرا انجام می دهند. این هسته حاوی اطلاعات ژنتیکی است و حتی می‌تواند مولد هسته بزرگ (macronucleus) نیز باشد. هسته بزرگ یا رویشی نقشی در تولید مثل جنسی ندارد. عمل این هسته دخالت در متابولیسم، کنترل تمایز سلولی و بالاخره کنترل بیان ژن می‌باشد. هسته مذکور در جریان تولید مثل غیر جنسی به طریقه آمیتوز در فرآیند تقسیم مشارکت دارد. تعداد هسته بزرگ در *Paramecium* یک عدد می‌باشد ولی تعداد هسته کوچک که بسیار ریزتر از هسته بزرگ است، در گونه‌های مختلف *Paramecium* متفاوت است. به عنوان مثال تعداد هسته کوچک در *P. aurelia* دو عدد و در *P. caudatum* یک عدد می‌باشد که این یک هسته کوچک در کنار هسته بزرگ قرار گرفته است [۱]، که گونه اخیر به دلیل شباهت ظاهری به جای پای انسان *Paramecium caudatum* نام دارد، که نمونه مورد مطالعه در این پژوهش می‌باشد. از دلایل انتخاب این حیوان به عنوان مدل تحقیقاتی می توان به قدرت تکثیر بالا، اندازه نسبتاً بزرگ (۳۰۰- ۱۸۰میکرون) ، قابل دسترس بودن در محیط و راحت بودن‌کشت و تکثیر در آزمایشگاه اشاره کرد. (شکل۱).



شکل۱- تصویر شماتیک *Paramecium caudatum* [۱]

II-۱-۲: جایگاه *Paramecium* در رده بندی جانوری:

جایگاه *P. caudatum* در رده‌بندی جانوری به شرح زیر می باشد [۱].

Kingdom: **Animalia**

Sub kingdom: **Protozoa**

Phylum: **Ciliophora**

Class: **Oligohymenophorea**

Sub class: **Hymenostomatia**

Order: **Hymenostomatida**

Sub order: **Peniculina**

Family: **Paramecidae**

Genus: ***Paramecium***

Species: ***Paramecium caudatum***

II-۱-۳: رفتار حرکتی در تک یاختگان:

عملی که از طریق آن یک ارگانیسم ارتباط فعالانه‌ای با محیط اطراف خود برقرار می‌کند، **رفتار** نامیده می‌شود، به عبارت دیگر، محرک‌ها (stimuli)، واکنش‌ها (Reactive Behavior) را در پی دارند. در محیط‌های طبیعی، محرک‌ها می‌توانند از نوع مکانیکی، شیمیایی، نوری یا حرارتی باشند. در تک‌یاختگان دریافت یک محرک و پاسخ به آن، در داخل همان یک سلول اتفاق می‌افتد. پاسخ در بیشتر مواقع یک واکنش حرکتی (Taxis) می‌باشد، که می‌تواند در اثر پاسخ به یک محرک شیمیایی (Chemotaxis)، یک محرک نوری (Phototaxis) یا سایر محرک‌ها باشد. به طور کلی یک واکنش حرکتی (Taxis) یا به صورت بی تفاوت (Phobic) یا جهت دار می‌باشد (Topic)، که البته واکنش حرکتی جهتدار (Topic) یا در جهت منبع تحریک می‌باشد (Positive Topotaxis) و یا در خلاف جهت منبع تحریک می‌باشد (Negative Topotaxis)[۳۴]. محرک‌های شیمیایی بدون شک برای تک یاختگان دارای اهمیت وافری هستند، زیرا در حالتی که حرکت (Chemotaxis) ایجاد می‌شود، گرادیان منتشری از یک ماده شیمیایی می‌تواند یک حرکت Phobic یا یک حرکت Topic ایجاد کند. تجربه نشان داده است که بسیاری از تک یاختگان با حرکت Topic مثبت و منفی نسبت به مواد شیمیایی معینی واکنش نشان می‌دهند. به طور مثال در دامنه pH برابر با ۴/۵–۴ سرعت حرکت *P.caudatum* به بیشترین حد خود می‌رسد. همچنین این تک سلولی نسبت به الکل و محلول های اسیدی حرکت Topic منفی از خود نشان می‌دهد، البته این حیوان زمانیکه مقداری مواد اسیدی از خود دفع می کند نسبت به محلول های اسیدی رقیق حرکت Topic مثبت نشان می دهد[۱۴]. در این پژوهش واکنش Chemotaxis در *P.caudatum* نسبت به مواد شیمیایی مانند **Naloxone** ,**Morphine** ,**L-Arginine** و **N^G**-nitro-**L**-**A**rginine **M**ethyl **E**ster(**L-NAME**) در دوزهای مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

$$\left.\begin{matrix}\text{Positive Topotaxis}\\ \text{Negative Topotaxis}\end{matrix}\right\}\ \left.\begin{matrix}Phobic\\ \text{Topic}\end{matrix}\right\} Taxis$$

II-۱-٤: مکانیسم های حرکتی مژه‌داران:

مژه‌دارانی مانند *Tetrahymena* و *Paramecium* از جمله ارگانیسم‌هایی هستند که برای بررسی و تجزیه و تحلیل حرکت مژه‌ها مورد مطالعه قرار می‌گیرند. فعالیت صدها مژه، مسئول حرکت این مژکداران در داخل آب می‌باشد. تقریباً حدود یک قرن پیش واکنش حرکتی برگشتی *Paramecium* در هنگام برخورد با یک مانع مورد مطالعه قرار گرفت [۲۰]. سال ها بعد مشخص شد که این پاسخ زمانی ایجاد می شودکه کانال‌های کلسیمی حساس به ولتاژ مستقر در غشاء مژک باز می‌شود و ورود کلسیم به درون ماتریکس مژک امکان پذیر می گردد [۱۱]. مطالعات فراساختاری نشان داده است که مژک‌های متحرک متشکل از یک آکسونم با ساختار میکروتوبولی دارای آرایش ۲+۹ می‌باشند[۳۰] ،که با غشاء مژکی احاطه شده اند، این غشاء مژکی حاصل گسترش غشاء سلولی می‌باشد، و در برگیرنده رسپتورها و کانال هایی برای انتقال پیام‌های محیطی به مژک است [۱۲]. پیک های ثانویه مانند Ca^{2+} و AMP حلقوی (cAMP) و همچنین ملکول‌های سیگنالینگ با تأثیر بر روی پروتئین‌های مژکی باعث تغییر در عملکرد زنش مژک‌ها می‌شوند. cAMP با فسفریلاسیون پروتئین شماره ۲۹ زنجیره سبک بازوی خارجی Dynein در کمپلکس اکسونم باعث افزایش فرکانس زنش مژه‌ها در *Paramecium* می‌شود [۱۶] . اما غلظت بالای Ca^{2+} موجب دفسفریلاسیون پروتئین مذکورشده و باعث مهار حرکت مژکها می‌شود [۱۶،۵].

II-۲: فارماکولوژی مرفین:

II-۲-۱: معرفی مرفین:

تخمدان‌های نارس گیاه خشخاش منبع تریاک خام است که با برش دادن آنها شیره سفیدی از آن ها خارج می‌شود. این ماده پس از آنکه مدتی در معرض هوا قرار گیرد به یک صمغ قهوه‌ای رنگ تبدیل می‌شود که همان تریاک خام است و حاوی چندین آلکالوئید است که اصلی‌ترین آنها مرفین می‌باشد، و با غلظت ۱۰% در آن وجود دارد. واژه مرفین از لغت یونانی (Morpheus) به معنای "خدای رؤیا" اقتباس شده است. مرفین سردسته آگونیست‌های اپیوئیدی است و از مدت ها قبل به عنوان بر طرف کننده درد حاد، شناخته شده است. امروزه ساختار شیمیائی مرفین کاملا" شناخته شده (شکل۲) و این ماده به عنوان شاخصی برای بررسی فعالیت ضد درد تمام داروها محسوب می‌شود. این داروها مجموعاً تحت عنوان **''ضد دردهای اپیوئیدی''** شناخته می‌شوند و همگی از مشتقات طبیعی و یا نیمه مصنوعی آلکالوئیدهای تریاک به حساب می آیند. داروهای شبه اپیوئیدی (که فعالیت آنها با آنتاگونیست غیر انتخابی نالوکسان مهار می‌شود) و همچنین چندین پپتید درونزاد (که با چندیدن زیرگونه از گیرنده‌های اپیوئید تعامل می‌کنند و با نام عمومی Opiates معرفی می شوند) نیز در این مجموعه دسته بندی می شوند[۳۵].

II-۲-۲: پپتیدهای اپیوئیدی درونزاد :

به دنبال کشف گیرنده‌های اپیوئیدی در مغز و تعیین خصوصیات و ویژگی های فارماکولوژیک آنها، معلوم شد که مرفین و نالوکسان به ترتیب آگونیست و آنتاگونیست این گیرنده‌ها هستند. بدیهی است این گیرنده‌ها که بسیار تخصصی عمل می‌کنند، نباید صرفاً در ارتباط با مصرف آلکالوئیدهای خارجی (Exogenous) عمل کنند، بر این اساس چنین نتیجه گیری شد که لیگاند طبیعی این گیرنده‌ها احتمالاً مواد شبه مرفین درونزاد (Endogenous) هستند. هم اکنون سه گروه از پپتیدهای شبه مرفین درونزاد (که قبلاً آندورفین نامیده می‌شدند) شناسایی و توصیف شده‌اند، که عبارتند از **انکفالین ها**، **بتا-آندورفین** و **دینورفین‌ها**. انکفالین‌ها از مغز استخراج شده و دو نوع پنتاپپتید هستند که اختلاف آنها در اسید آمینه انتهایی آنها می‌باشد، به طوری که اگر اسید آمینه انتهایی، لوسین باشد به آن لو- انکفالین (Leu-enkephalin) و اگر اسید آمینه انتهایی متیونین باشد به آن مت- انکفالین (met-enkephalin) می‌گویند. این دو

پپتید از پیشساز پروتئینی بزرگتری به وجود می‌آیند، که حاصل ژن پروانکفالین می‌باشد. گروه دیگر از مواد شبه مرفین درونزاد را آندورفین‌ها تشکیل می‌دهند، که از غده هیپوفیز استخراج شده است. بتا–آندورفین، پپتیدی بزرگتر از انکفالین هاست. و یکی از محصولات حاصل از تجزیه پیش ساز پروتئینی پرواپیوملانوکورتین(POMC) می‌باشد که این پروتئین پیش ساز حاصل ژن پرواپیوملانوکورتین می‌باشد. همچنین از ژن مذکور و در نتیجه پیش ساز پروتئینی آن هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) نیز در هیپوفیز به وجود می‌آید، و بالاخره گروه سوم یعنی دینورفین‌ها از پیش ساز پروتئینی ژن دینورفین مشتق می‌شوند، دینورفین‌ها ابتدا از هیپوفیز خلفی استخراج شدند و سپس با روش‌های ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های مناطقی از هیپوتالاموس و شبکه میانتریک روده نیز مورد شناسایی قرار گرفتند. در هیپوفیز، دینورفین فقط در نوروهیپوفیز یافت می‌شوند. سه گروه پپتیدهای شبه اپیوئیدی فوق، با وجود تفاوت در طول، همگی در تتراپپتید Tyr-Gly-Gly-Phe مشترک هستند. هر چند که این سه گروه که به وسیله سه ژن اپیوئیدی کد می‌شوند، دارای توزیع متفاوتی در CNS هستند، ولی اعضای هر گروه در مناطقی از سسیتم عصبی که در ارتباط با پردازش یا تنظیم درد هستند، تولید می‌شوند. انکفالین‌ها هم در جایگاه گیرنده μ (mu) و هم در جایگاه گیرندهδ (delta) فعال هستند، ولی میل ترکیبی انکفالین‌ها به گیرنده δ اندکی بیش از μ(mu) می‌باشد. تحقیقات فعلی بر این متمرکزند که آیا آندورفین‌ها به صورت انتخابی زیرگونه‌های گیرنده μ را فعال می‌کنند یا خیر، و بالاخره دینورفین‌ها برای جایگاه گیرنده κ (Kappa) نسبتاً اختصاصی عمل می‌کند[۳۵].

II-۲-۳ :گیرنده‌های اپیوئیدی:

آگونیست‌های اپیوئید، بی‌دردی را با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی جفت شده با پروتئین G تولید می‌کنند. این گیرنده‌ها عمدتاً در مناطقی از مغز و نخاع که درگیر انتقال و تنظیم درد هستند، قرار دارند. سه دسته اصلی از گیرنده‌های اپیوئیدی در مناطق گوناگون دستگاه عصبی و در بافت‌های دیگر شناسایی شده‌اند، دسته‌های اصلی گیرنده‌ها عبارتند از:

۱- μ(mu) ۲- δ(delta) و ۳- κ(Kappa) .