دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته علوم جانوری– گرایش فیزیولوژی

عنوان:

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

استادان راهنما:

دکتر منیژه کرمی

دکتر بهرام کاظمی

دانشجو:

سیده سمانه معزی

شهریور ۱۳۹۱

تقدیر و تشکر

سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

چگونه سپاس گویم مهربانی و لطف استادانم را که سرشار از عشق و یقین هستند. چگونه سپاس گویم تأثیر علم آموزی‌شان را که چراغ روشن هدایت را بر کلبه‌ی محقر وجودم فروزان ساخته‌اند. آری در مقابل این همه عظمت و شکوه آن‌ها مرا نه توان سپاس است و نه کلام وصف.

با تقدیر و تشکر شایسته از استاد فرهیخته و فرزانه سرکارخانم دکتر منیژه کرمی و آقای دکتر بهرام کاظمی که با نکته های دلاویز و گفته‌های بلند ، صحیفه‌های سخن را علم پرور نمود و همواره راهنما و راه گشای نگارنده در اتمام و اکمال پایان نامه بوده است.

تقدیم با بوسه بر دستان پدر و مادرم:

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نسبیم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آن‌ها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار ، مایه هستی ام بوده‌اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند....

پیشکشی ناچیز به:

این اثر تلاش در جوانیم را به آستان ملائک پاسبان حضرت شیخ الائمه امام صادق(ع) و حاضر غایبمان، حضرت صاحب الزمان(عج) پیش کش می نمایم.

همچنین تقدیم می دارم به رهبر عزیز و بزرگوارم، حضرت امام خامنه ای (مدظله العالی)

دادار عالم و آدم، سرور و سالارم را همواره سالم و مسرور سازد.

مصلحت دید من آنست که یاران همه کار
بگذارند و خم طره ی یاری گیرند

فهرست مطالب شماره صفحه:

پیشگفتار.....۱

فصل اول:مقدمه ۲

۱-۱: جانور شناسی*Paramecium* ۳

۱-۱-۱: فیزیولوژی اعمال حیاتی ۳

۱-۱-۲: جایگاه *Paramecium caudatum* در رده بندی جانوری ۶

۱-۱-۳: رفتار حرکتی در تک یاختگان ۷

۱-۱-۴: مکانیسم های حرکتی مژه داران ۸

۱-۲: فارموکولوژی نالوکسان ۱۰

۱-۲-۱: معرفی نالوکسان ۱۰

۱-۲-۲: فارماکوکینتیک نالوکسان ۱۱

۱-۲-۳: فارماکودینامیک نالوکسان ۱۳

۱-۲-۴: پپتیید های اپیوییدی درونزاد ۱۴

۱-۲-۵: گیرنده های اپیوئیدی ۱۶

۱-۲-۶: تحمل (Tolerance)، وابستگی (Dependence) و اعتیاد (Addiction) ۱۷

۱-۲-۷: قدرت دارویی (Drug potency) ۱۸

۱-۲-۸: شواهدی مبنی بر عملکرد سیستم اپیوئیدی در سلسله جانوری ۱۹

۱-۳: سیستم Nitric Oxide ۱۹

۱-۳-۱: نیتریک اکساید (NO) ۲۰

۱-۳-۲: L-arginine ۲۲

۱-۳-۳: L-NAME ۲۴

۱-۳-۴: Arginase ۲۵

۱-۳-۵: آنزیم Nitric Oxide Synthase (NOS) ۲۷

۱-۴: متیلن بلو (Methylene blue) ۲۸

۱-۵: سولفات منیزیم ۲۹

۱-۶: هدف ۳۰

فصل دوم: مواد و روش ها ۳۱

۲-۱: مواد مورد استفاده ۳۲

۲-۲: جمع آوری نمونه حیوانی و تائید گونه و تهیه محیط کشت ۳۲

۲-۲-۱: تهیه محیط کشت طبیعی ۳۲

۲-۲-۲: تهیه محیط کشت مصنوعی ۳۳

۲-۲-۳: تنظیم pH و دمای محیط کشت ۳۳

۴-۲-۲: نحوه شمارش جمعیت سلولی *P. caudatum* ۳۳

۳-۲: مطالعات رفتاری ۳۴

۱-۳-۲: تلقیح دارو به محیط کشت نمونه تک یاخته ای ۳۴

۲-۳-۲: بررسی رفتار (شمارش) جانور تک یاخته ای پس از تلقیح ۳۴

۴-۲: تجزیه و تحلیل آماری ۳۶

فصل سوم: نتایج ۳۷

۱-۳: شواهد رفتاری ۳۸

۱-۱-۳: پاسخ Naloxone ۳۸

۲-۱-۳: اثر تلقیح L-arginine بر پاسخ نالوکسان ۴۰

۳-۱-۳: اثر تلقیح L-NAME بر پاسخ مشترک نالوکسان و L-arginine ۴۱

۴-۱-۳: اثر تلقیح متیلن بلو بر پاسخ مشترک Naloxone و L-arginine ۴۲

۵-۱-۳: اثر تلقیح سولفات منیزیم بر پاسخ مشترک Naloxone و L-arginine ۴۳

فصل چهارم: بحث ۴۴

پیشنهادات ۵۰

منابع ۵۱

چکیده انگلیسی ۶۷

فهرست اشکال و جداول: شماره صفحه:

شکل ۱-۱: پاسخ فرار در *Paramecium* ۹

شکل ۱-۲: تصویر شماتیک از نالوکسان هیدروکلرید و اکسی مرفون ۱۲

شکل ۱-۳: مسیر سنتز نیتریک اکساید ۲۰

شکل ۱-۴: مسیر سیگنالینگ NO/ cGMP ۲۱

شکل ۱-۵: مسیرهای عملکردی L-arginine ۲۳

شکل ۱-۶: تصویر شماتیک از L-NAME ۲۴

شکل ۱-۷: مسیر های فعالیت آنزیم آرژیناز ۲۶

شکل ۱-۸: ساختار شیمیایی متیلن بلو ۲۸

شکل ۳-۱: منحنی تعداد سلول های *P.caudatum* تحت ۴x ۳۹

شکل ۳-۲: نمودار دوز- پاسخ نالوکسان ۳۹

شکل ۳-۳: نمودار دوز- پاسخ Naloxone +L-arginine ۴۰

شکل ۳-۴: نمودار دوز- پاسخ L-NAME + L-arginine+ Naloxone ۴۱

شکل ۳-۵: نمودار دوز- پاسخ L-arginine + Naloxone + Methylene blue ۴۲

شکل ۳-۶: نمودار دوز- پاسخ Naloxone + L-arginine + MgSO4 ..... ۴۳

چکیده:

قرار گرفتن در معرض مواد مخدر، به طور گسترده‌ای در پستانداران آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. اما، این روند در مدل حیوانی تک سلولی تجربه نشده است .در این مطالعه قرار گرفتن در معرض داروی نالوکسان در *Paramecium caudatum* مورد بررسی قرار گرفت. این میکروارگانیسم در خیسانده یونجه و محیط‌های مصنوعی کشت داده شد. برای اجرای پروتوکل تلقیح دارویی ابتدا ml ۱ از محیط کشت اختصاصی به لام سدویک- رافتر اضافه شد. سپس دارو در حجم µl ۱ به داخل لام تلقیح گردید. نقطه تلقیح دارو تحت بزرگنمایی ۴X میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفت. اثرات دوزهای مختلف نالوکسان (۰/۰۵-۰/۴ µg/µl) طی فواصل زمانی (۰-۱۸۰sec) به صورت تعداد سلول/ منظر ثبت شد و ثانیه ۶۰ ام که در آن رفتار فرار حیوانات نسبت به نالوکسان بطور نسبی تضعیف شده بود، برای ادامه بررسی‌ها انتخاب گردید. نمونه‌های کنترل آب مقطر (۱ میکرولیتر) دریافت کردند. پیش تلقیح L- آرژینین (۱-۸ µg/µl)، محرک سیستم نیتریک اکساید، و L-NAME (N^G-Nitro L-arginine Methyl ester)، مهارگر این سیستم، تجویز شد. به منظور مطالعه مسیرهای انتقال سیگنال، مهار مسیر cGMP و توقف کانال‌های کلسیم با بکارگیری پیش تلقیح متیلن بلو و سولفات منیزیم دنبال شد. داده‌ها با آنالیز واریانس ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برابر نتایج میکروارگانیسم مورد نظر، *P. caudatum*، در مقایسه با آب مقطر در مواجه با نالوکسان رفتار گریز و فرار را احراز کرد ($p<0.0001$). و تلقیح L- آرژینین (۱-۸ µg/µl) پیش از تلقیح نالوکسان رفتار فرار را تقویت کرد، گرچه پیش تلقیح L-NAME موجب مهار این واکنش گردید. توقف مسیر سیگنالینگ cGMP و کانال کلسیم نیز همین نتیجه را داشت. نالوکسان به عنوان رقیب اصلی مرفین ممکن است محرک لازم را به این سلول‌ها از طریق مسیرهایی که در روند تجمع و فرار دخیل هستند سیگنال نماید. پاسخ فرار *P. caudatum* به عنوان عکس‌العمل موجود میکروسکوپی نسبت به داروی مخدر می‌تواند راه‌گشای شناخت مکانیسم‌های مولکولی و سلولی اعتیاد به مواد مخدر باشد.

کلمات کلیدی: *Paramecium caudatum*، نیتریک اکساید، نالوکسان، فرار

پیشگفتار:

نشان داده شده است که *Paramecium* چندین هدف از مولکول نیتریک اکساید از جمله گوانیلیل سیکلاز، کانال‌های پتاسیم و کلسیم دریچه‌دار وابسته به ولتاژ را بیان می‌کند (۱۲۷-۱۲۲). برای نیتریک اکساید در *Paramecium caudatum* در رابطه با تنظیم دما (Thermoregulation) و رشد شواهدی به دست آمده است (۱۲۷).

بسیاری از محققین افزایش نیتریک اکساید را علت مستقیم یا غیر مستقیم تأثیر مواد اپیوئیدی و به ویژه مرفین در مهره داران می‌دانند (۱۸۰-۱۷۷). در رابطه با این جریان در مدل‌های بی مهره شواهد کافی در دست نیست و به طور مثال به تأثیر مرفین در تولید نیتریک اکساید در *Ascuris suum* (نوعی نماتود) اشاراتی شده است (۱۸۱). بر اساس مطالعات قبلی این تیم تداخل مرفین با سیستم نیتریک اکساید در فرایندهای حیاتی برخی تک‌یاختگان بسیار محتمل است. هم‌چنین شواهد کافی از تداخل سیستم نیتریک اکساید با مرفین در *Paramecium caudatum* در دست می‌باشد (۳). در رابطه با تاثیر مواد اپیوئیدی مانند β اندورفین و مرفین (به عنوان یک ماده اپیوئیدی با نقش بسیار مهم فارماکولوژیک) در برخی مژه داران مانند *Paramecium*، *Stentor* و *Tetrahymena* نیز اطلاعات قبلی (۷۵) در دست است که یافته‌های مولکولی آن‌ها بیانگر حضور رسپتورهای اپیوئیدی و G پروتئین‌ها در این جانوران بی مهره تک سلولی می-باشد. در رابطه با نقش مخدر اصلی در نمایش قدرت مواد (Drug potency) یافته‌هایی در دست است و حتی اثرات مرفین در مدل شرطی سازی در این گونه مورد مطالعه قرار گرفته است. از آن جا که نالوکسان رقیب بی‌نظیر مرفین در القای اثراتی است که به واسطه گیرنده‌های اپیوئیدی وساطت می‌شود (۶۵)، برآنیم که قدرت این ماده را در *P. caudatum* به همان روشی که در خصوص مرفین اجرا شد (۳) مورد بررسی قرار داده و یافته‌های حاصل را تحت مقایسه قرار دهیم. زیرا قابلیت داروها تحت مشخصه ای با عنوان قدرت دارویی از همه مشخصه‌های دیگر بارزتر است (۶۶).

فصل اول

مقدمه

۱-۱: جانور شناسی *Paramecium*

پروتوزوآها، موجودات زنده یوکاریوتیک و اساسا تک یاخته ای هستند. یکی از تخصص یافته‌ترین گروه پروتوزوآها، مژه داران می‌باشند که معمولا به صورت انفرادی و آزاد شناگر هستند و در آب‌های شور و شیرین یافت می‌شوند. یکی از جنس‌های مژه داران *Paramecium* می‌باشد که در مکان‌های مملو از گیاهان در حال فساد و سرشار از باکتری به وفور یافت می‌شود. در این تحقیق از یک گونه *Paramecium* به نام *Paramecium caudatum* استفاده شده است (۱).

۱-۱-۱: فیزیولوژی اعمال حیاتی

Paramecium ها دارای اندازه و شکل‌های متنوعی هستند که معمولا با چشم غیر مسلح قابل رؤیت می‌باشند. شکل و اندازه آن‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف از جمله حرارت، غذا، دما و pH می‌باشد. شکل بدن این موجود به واسطه وجود پلیکل، حالتی ثابت دارد. سیتوپلاسم آن شامل دو بخش اندوپلاسم و اکتوپلاسم

می‌باشد، که اندوپلاسم دانه‌دار و نیمه مایع است و در مقابل دارای اکتوپلاسم شفاف و متراکم می‌باشد. اکتوپلاسم توسط پلیکل پوشیده شده و حاوی اندامک‌ها یا اجزاء پرتاب شونده (تریکوسیست ها)، مژه‌ها و اجزاء رشته ای می‌باشد. مژه‌ها زوائد سیتوپلاسمی ظریف کوتاهی هستند که تمام سطح بدن را پوشانده و برای حرکت و کسب غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند. مژه‌های پوشاننده بدن به صورت ردیف‌های طولی به نام کاینتی‌ها مرتب شده‌اند. هر مژه دارای مرکزی است که از میکروتوبول‌های پایدار تشکیل شده و از ذره پایه‌ای موجود در سیتوپلاسم شروع به رشد می‌کند. این جسم مرکز سازمان دهی مژه است. مژه داران از این اندامک‌ها نه فقط برای حرکت بلکه برای جمع آوری ذرات غذایی استفاده می‌کنند. در سطح شکمی *Paramecium* یک شیار دهانی قرار گرفته است که به دهان سلولی منتهی می‌گردد. دهان به حلق و حلق به بخشی که اصطلاحا مری نامیده می‌شود راه دارد. حرکت مژه‌های کناره شیار دهانی موجب جریان آب همراه با مواد غذایی در این ناحیه می‌شود. از طرف دیگر ساختارهای مژکی موجود در دیواره حلق، مواد غذایی را به

طرف مری هدایت می‌کنند تا به شکل بسته‌های کوچک به پروتوپلاسم راه یابند. مواد غیر قابل جذب هم از طریق مخرج سلولی از سیتوپلاسم خارج می شوند. در *Paramecium* آب اضافی سلول به کمک واکوئل‌های انقباضی (ضربان دار) خارج می‌شود که این اجزاء به عنوان اندامک‌های تنظیم‌کننده فشار اسمزی و دفع در دو انتهای سلول قرار دارند و دارای خاصیت سیستول و دیاستول می‌باشند. هر واکوئل انقباضی توسط یک مجموعه مجاری شعاعی مشروب می‌شود که در جهات مختلف در درون سیتوپلاسم امتداد یافته‌اند. این اندامک در *Paramecium* از طریق این مجاری یا کانال‌ها پر می‌شود و به حداکثر حجم یا اندازه (انبساط) دست می‌یابد، سپس به طور ناگهانی و یک مرتبه فشرده می‌شود (انقباض) و محتویات آن از طریق منفذی که مستقیما در بالای آن قرار دارد، به بیرون تخلیه می‌شود. واکوئل‌های انقباضی علاوه بر نقش تنظیم کنندگی، در دفع مواد زائد حاصل از متابولیسم نیز نقش دارند (۱).

یکی از خصوصیات مژه داران داشتن دو نوع هسته با اندازه، ظاهر و عمل متفاوت است که در اندوپلاسم قرار دارند. ریز هسته در فرورفتگی طرفی درشت هسته کلیه ای شکل که تقریبا در مرکز بدن واقع است، قرار دارد. درشت هسته معمولا به طریق آمیتوز تقسیم می‌گردد. ریز هسته بسیار کوچکتر و در *Paramecium caudatum* فشرده تر از درشت هسته می‌باشد. تعداد ریز هسته در گونه‌های مختلف *Paramecium* متفاوت است. در نمونه تحت مطالعه یک عدد از هر یک از هسته‌ها یافت می‌شود (۱).

تکثیر سلولی در *Paramecium* به دو روش غیرجنسی و جنسی می‌باشد که تکثیر غیر جنسی معمولا از طریق تقسیم دوتایی عرضی انجام می‌شود که در آن ابتدا ریز هسته به روش میتوز تقسیم می‌شود و هسته‌های حاصل به قطبین مخالف می‌روند. سپس درشت هسته به روش آمیتوز تقسیم می‌گردد و سرانجام سیتوپلاسم به طور عرضی نصف می‌شود. اجزاء بدن جانور قبلا همانند سازی می‌نمایند و بعد از تقسیم، یکی از یاخته‌ها حلق اولیه را صاحب می‌شود و دیگری آن را ایجاد می‌کند. این نوع تقسیم در شرایط مساعد روزانه ۴-۱ بار اتفاق می‌افتد و هر تقسیم حدود دو ساعت به طول می انجامد (۱).

تولید مثل جنسی در *Paramecium* عمدتا به روش الحاق انجام می‌شود که در این روند ابتدا دو *Paramecium* با یکدیگر تماس یافته، سپس درشت هسته‌هایشان حذف شده و ریز هسته‌هایشان تقسیم می‌شود. در اثر تقسیم میوز ریز هسته در هر فرد، چهار ریز هسته ایجاد می‌شود که فقط یکی باقی مانده و بقیه از بین می‌روند. ریز هسته باقی مانده به طریق میتوز تقسیم می‌گردد. یکی از ریز هسته‌های حاصل از میتوز در هر فرد به فرد مقابل جابه جا می‌شود. ریز هسته‌ها مزدوج شده و دو فرد از هم جدا می‌شوند. بعد از آن هسته موجود در هر سلول چند بار تقسیم میتوتیک شده و اغلب چهار یا هشت هسته ایجاد می‌نماید که فقط یکی از آن‌ها به همان صورت دیپلوئید باقی می‌ماند و بقیه پس از امتزاج، درشت هسته پلی‌پلوئید را می سازند. این میکروارگانیسم معمولا بعد از فرایند الحاق یک تقسیم غیر جنسی را دنبال می‌کند و بنابراین در پایان روند تقسیمی که به آن پرداخته شد عملا چهار یاخته دختری ایجاد می شود (۱).

دلایل استفاده از *Paramecium* در این تحقیق موارد زیر می‌باشد:

۱- *Paramecium* به عنوان یک مدل جهت مطالعه شیمی پایه انتقال سیگنال استفاده شده است (۴،۵،۶).

۲- توانایی آنها در پاسخ رفتاری به محرک‌های محیطی مختلف (۷).

۳- *Paramecium* به عنوان یک مدل جهت مطالعه‌ی تحریک پذیری غشاء و رفتار موتور حسی در ارگانیسم‌های تک سلولی استفاده شده است (۷).

۴- قدرت تکثیر بالا، اندازه نسبتا بزرگ (۳۰۰-۱۸۰ میکرون)، قابل دسترس بودن در محیط و راحت بودن کشت و تکثیر آن‌ها در آزمایشگاه (۲).

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

جایگاه*P .caudatum* در رده بندی جانوری به شرح زیر می‌باشد (۱).

Kingdom	Animalia
Subkingdom	Protozoa
Phylum	Ciliophora
Class	Oligohymenophorea
Subclass	Hymenostomatia
Order	Hymenostomatida
Suborder	Peniculina
Family	Paramecidae
Genus:	*Paramecium*
Species:	*Paramecium caudatum*

۳-۱-۱: رفتار حرکتی در تک یاختگان:

عملی که از طریق آن یک ارگانیسم ارتباط فعالانه ای با محیط اطراف خود برقرار می‌کند، رفتار نامیده می‌شود.

Paramecium به عنوان یک پروتوزوآی مژه دار و متحرک آب شیرین به انواع تحریکات محیطی، پاسخ‌های رفتاری می‌دهد (۶-۴). گرچه مژه داران جریانات عصبی شبیه به متازوآها ندارند، اما قادر به جمع-آوری تحریکات و ایجاد پاسخ حرکتی مناسب هستند. غشاء پلاسمایی ارگانیسم‌های تک سلولی قادر به دریافت حس‌ها، جمع بندی سیگنال گیرنده‌ها و کنترل منابع حرکتی می‌باشند. بنابراین عنصر ضروری برای سیستم حسی و حرکتی متازوآدر پروتوزوآ نیز وجود دارد. حرکت *Paramecium* ها وابسته به حرکت مژه-هایی است که توسط رفتار الکتریکی غشاء سلولی کنترل می‌شود (۸،۹). معکوس شدن مژه‌ها در ارتباط با دپلاریزاسیون غشاء است (۱۰،۱۱). در مقابل، زنش مژه‌ها در جهت نرمال (حرکت رو به جلو)، با هایپرپلاریزاسیون غشاء همراه است (۱۳). *Paramecium* هم چنین می تواند در برابر محرک‌های مختلف مانند محرک‌های شیمیایی، حرارتی، لامسه، جاذبه و نور پاسخ‌های رفتاری نشان دهد (۱۸-۱۳).

کنترل فعالیت مژه‌ها تحت پتانسیل عمل است که مشابه با عملکرد سلول‌های تحریک پذیر در ارگانیسم‌های پیشرفته تر عمل می‌کند (۱۹). فعالیت پتانسیل عمل به وسیله فعال شدن کانال‌های کلسیم وابسته به ولتاژ که در غشاء مژه‌ها وجود دارند، تولید می‌شود و منجر به جریان کلسیم به درون غشاء می-گردد (۲۰،۲۱). در نهایت افزایش غلظت کلسیم درون سلولی منجر به تغییر جهت حرکت و شناگری رو به عقب می‌شود.

۴-۱-۱: مکانیسم های حرکتی مژه داران:

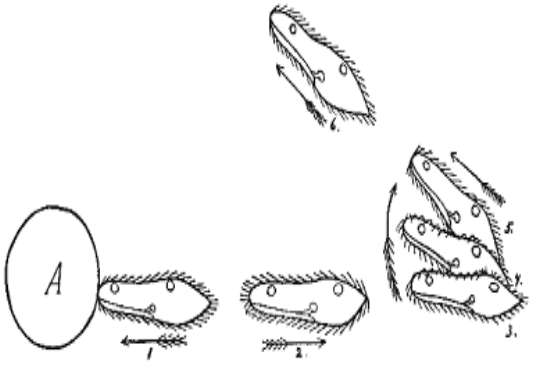
مکانیسم مکانوشیمیایی در زنش تاژک‌ها و مژک‌ها شامل لغزش میکروتوبول‌ها توسط ATP (۲۴-۲۲) است که به واسطه فعالیت ATPase دااینئن تولید می‌شود. علاوه بر این مکانیسم پایه، cAMP (۲۷-۲۶-۲۵) و Ca (۲۸،۲۹) هم به عنوان واسطه‌های اولیه، در حرکت غشای آکسونم شناخته شده اند.

رفتار شناگری در *Paramecium* تحت کنترل و جریان‌های یونی در مقابل غشاء است که به وسیله انواع محرک‌ها القاء می شود (۷). مژه های *Paramecium* در ارتباط با کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ هستند که در غشاء مژه‌ها قرار دارند (۲۹). به علاوه در مژه‌ها تمام ترکیبات بیوشیمیایی نوکلئوتیدهای حلقوی شامل آدنیلیل سیکلاز (AC) و گوانیلیل سیکلاز (GC) شناسایی شده است (۳۰). این آنزیم‌ها ممکن است در انتخاب مولکول‌های هدف درون سلولی برای تحریک سیگنال‌های یونی مرتبط با فرایندهایی مانند تغییر در سرعت و جهت حرکت شناگری، تنظیم جریان‌های یونی، حساسیت و سازگاری دخالت داشته باشند.

از آن‌جا که کلسیم عامل اصلی ایجاد کننده پتانسیل عمل در *Paramecium* می‌باشد، نقش اصلی در کنترل تحریک پذیری غشاء و رفتار شناگری دارد. و اثرات خود را از طریق پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم از جمله کالمودولین اعمال می‌کند (۳۱). وجود کالمودولین در مژه‌ها (۳۲،۳۳) و تاژک‌ها (۳۴،۳۵) به اثبات رسیده است. مطالعات بیوشیمیایی و فارماکولوژی در *Paramecium* نشان داده‌اند که کالمودولین فعالیت گوانیلیل سیکلاز را تحریک می‌کند که افزایش فعالیت آن ممکن است با وقایع تحریکی متنوعی همراه باشد و منجر به رفتار شناگری شود (۳۱).

یکی از رفتارهای شناگری در *Paramecium*، پاسخ فرار (avoiding response) است، که در اثر برخورد یک سلول *Paramecium* به مانع موجب تحریک مکانیکی قسمت قدامی سلول می‌شود. پیامد این تحریک القاء کانال‌های کلسیمی حساس مکانیکی در غشاء سلول است که منجر به دپلاریزاسیون سلول می-شود (۳۶،۳۷). این دپلاریزاسیون منجر به افزایش ورود کلسیم به مژه‌ها از طر یق فعالیت کانال‌های کلسیم

حساس به ولتاژ در غشاء مژه‌ها می‌گردد (۳۹،۳۸،۲۰). Nakaoka و Ooi (۴۰) نشان دادند که cAMP معکوس شدن مژه‌ها به واسطه کلسیم را مهار می‌کند. شواهدی دیگر از جداسازی یک پروتئین KDa ۲۹ از بازوی خارجی داینئین وجود دارد که فسفریلاسیون آن وابسته به ca و cAMP می‌باشد (۴۳-۴۱). و نشان داده شده که cAMP نه تنها معکوس شدن مژه‌ها به وسیله کلسیم را مهار می‌کنند، بلکه فسفریلاسیون پروتئین KDa ۲۹ آکسونم را هم مهار می‌کند (۴۴). این شواهد نشان می‌دهد که این پروتئین ممکن است در معکوس شدن زنش مژه‌ها اثراتی داشته باشد.



شکل ۲-۱: پاسخ فرار در *Paramecium* (۴۴)

۲-۱: فارموکولوژی نالوکسان:

۱-۲-۱: معرفی نالوکسان:

نالوکسان هیدروکلرید (نارکان) به عنوان عامل انتخابی در مهار علائم و نشانه‌های مصرف بیش از حد مواد مخدر تمایزیافته است. نالوکسان برخلاف اجداد خود یعنی لوالورفان و نالورفین به عنوان آنتاگونیست رقابتی نسبتا خالص عمل می‌کند (۴۶). در مقابل لوالورفان و نالورفین آنتاگونیست خالص نیستند و دارای خواص آگونیستی قطعی از جمله کاهش تنفس هستند (۴۷). اثرات متفاوت نالوکسان و نالورفین در ارتباط با عملکرد مختلف این ترکیبات در سه نوع از رسپتورهای موجود در CNS می باشد (۵۳-۴۸). Martin و همکارانش بر اساس آزمایش‌های انجام شده بر روی حیوانات مفهوم سه نوع از رسپتورهای اپیوییدی μ ، κ وσ راپیشنهاد دادند (۷۲،۴۹). نالورفین و لوالورفان بر روی رسپتور μ خواص آنتاگونیستی دارند و خواص آگونیستی خود را در دو رسپتور دیگر نشان می‌دهند. در مقابل، نالوکسان در هر سه رسپتور خاصیت آنتاگونیستی دارد (۴۷). آگونیست و آنتاگونیست‌های نارکوتیک دررسپتورهای مختلف اثرات متفاوتی دارند (۴۶).