بررسی اثر کینین بر فعالیت ضد دردی مورفین در آزمون فرمالین در موش

۱۳۷۹۸۱

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
دانشکده پزشکی شهید بابایی
پایان نامه جهت دریافت دکترای حرفه ای پزشکی عمومی

عنوان:

# بررسی اثر کینین بر فعالیت ضد دردی مورفین در آزمون فرمالین در موش

استاد راهنما:
دکتر مرجان نصیری اصل

استاد مشاور:
دکتر فرزانه زمان سلطانی

۱۳۸۹/۳/۱۷

نگارش:
باندرانایکه عماری

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

شماره پایان نامه: ۷۸۳
سال تحصیلی: ۸۹-۱۳۸۸

۱۳۷۹۸۱

**تقدیم به آستان مقدس پروردگارم**

خدایا مرا سزاوار راهی دیده‌ای پر از تلاطم و سختی

هر لحظه امکان لغزش ...

و هر ثانیه امکان خطایم است.

خداوندا ره بس تاریک و پر فراز و نشیب

نگویم دستم گیر، دست مرا گرفته‌ای

رها نکن!

ای مهربان‌ترین! یاریم کن تا طبیبی، انسان باشم

نه انسانی، طبیب.

اکنون که در آستانه اتمام دوره مقدس پزشکی هستم، بسیار هراسانم و بیش از پیش محتاج تو

دل به تو می‌سپارم، مرا آنی به خود وامگذار که راهی‌ست بی‌پایان و من بی‌تو بس ناتوان.

# تقدیر و تشکر

برخود لازم می‌دانم از زحمات ارزنده اساتید گرامی

**سرکار خانم دکتر مرجان نصیری**

**سرکار خانم دکتر فرزانه زمان سلطان**

به جهت راهنمایی‌های ارزنده‌شان تشکر نمایم.

*****

همچنین از کلیه اساتید ارجمندی که از دانش آنها در طی دوران تحصیل بهره فراوان برده‌ام، سپاسگزاری می‌نمایم.

*****

امیدوارم آموخته‌هایم را در زندگی چنان بکار گیرم که در خور شاگردی اساتیدی چون شما باشم.

## تقدیم به مادرم

که عشق را در نگاهش هر دم احساس می‌کنم

و در تمام لحظات، دلم از حس وجودش روشن می‌گردد.

****

## تقدیم به روح پاک پدر بزرگوارم

که بزرگ اندیشیدن را به من آموخت.

**و تقدیم به**

درخت سرو زندگیم، تکیه‌گاهم و امید لحظه‌های سخت تنهایی‌ام؛ **همسرم**

آقای دکتر علیرضا افشار فرد

****

**و یگانه برادر عزیزم**

آقای دکتر عبدالناصر عماری

که هر چه دارم از اوست.

****

**خواهر نازنینم**

سارای عزیز

****

**و تقدیم به خانواده همسرم؛**

که همیشه مایه‌ی دلگرمی و شادی‌اند.

## چکیده فارسی

**مقدمه:** در این مطالعه اثرات بیدردی کینین، مهار کننده کانال های gap junction، بر فعالیت ضد دردی مورفین در آزمون درد فرمالین مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** ۲۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد به صورت زیر جلدی به کف پای راست موش تزریق گردید و سپس حیوان در مدت زمان ۵ دقیقه اول بعد از تزریق (فار اول) و ۵۰-۱۵ دقیقه بعد از تزریق به مدت ۳۵ دقیقه (فاز دوم) از نظر لیسیدن کف پا مورد مشاهده قرار گرفت و میانگین مدت زمان لیسیدن در هر دو فاز برای هر گروه مورد آزمایش ثبت گردید. گروه اول، ۱۰ سر موش به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و تنها سالین ۲۰ دقیقه قبل از فرمالین تزریق گردید. گروه دوم، سوم و چهارم مورفین در دوزهای mg/kg ۱/۵، ۳ و ٦ انتخاب شد و ۲۰ دقیقه قبل از فرمالین تزریق گردید. ٤ گروه بعدی کینین با دوزهای متفاوت (mg/kg ۸۰-۱۰)۵۰ دقیقه و مورفین در یک دوز ثابت ۲۰ دقیقه قبل از فرمالین تزریق گردید.

**نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که کینین در حضور مورفین در هر دو مرحله از آزمون بیدردی فرمالین اثرات ضد دردی وابسته به دوز داشته و تقویت اثرات بیدری مورفین در سطوح مختلف دوز آن مشاهده گردید اما ایجاد این اثر توسط دوزهای بالای کینین در حضور دوزهای پایین تر مورفین، خصوصا در فاز دوم معنی دار بود.

**نتیجه نهایی:** از مجموع نتایج به نظر می یاید که کینین نقش مهمی را در افزایش ایجاد بیدردی مورفین در آزمون فرمالین ایجاد می کند.

# فهرست مطالب


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| چکیده | ٦ |
| فهرست جداول و نمودارها | ٨ |
| **فصل اول** | **٩** |
| مقدمه | ١٠ |
| **فصل دوم** | **٣١** |
| بررسی متون | ٣٢ |
| آزمون های درد | ٣٤ |
| **فصل سوم** | **٤١** |
| مواد و روش ها | ٤٢ |
| **فصل چهارم** | **٤٤** |
| یافته ها و نتایج | ٤٥ |
| **فصل پنجم** | **٥١** |
| بحث و نتیجه گیری | ٥٢ |
| پیشنهادات | ٥٦ |
| **منابع** | **٥٧** |
| **پیوست** | **٦٥** |

# فهرست جداول و نمودارها و اشکال

عنوان | صفحه

جدول ۱-۱- مقایسه خصوصیات سیناپس‌های الکتریکی و شیمیایی ۱۱
شکل ۱-۱- تصویر شماتیک کانال‌های gap-junction ۱٤
شکل ۱-۲- نمایش شماتیک همی‌کانال‌های جفت‌شده ۱۷
جدول ۱-۲- انواع mRNAs مربوط به کانکسین بیان شده در سیستم عصبی پستانداران ۱۹
شکل ۱-۳- درخت خانوادگی کانکسین ۲۰
شکل ۱-٤- دیاگرام تصویر کانکسین‌های بیان شده در سلول‌های عصبی و گلیال ۲۱
شکل ۱-۵- وضعیت قرارگیری کانال‌های gap junction در میان لایه‌های سلول شوآن ۲۸
شکل ۱-الف- بررسی مدت زمان لیسیدن پا در حضور دوزهای متفاوت از مورفین در مقایسه با سالین در فاز اول آزمون فرمالین ٤۵
شکل ۱-ب- بررسی مدت زمان لیسیدن پا در حضور دوزهای متفاوت از مورفین در مقایسه با سالین در فاز دوم آزمون فرمالین ٤٦
شکل ۲- الف- بررسی مدت زمان لیسیدن پا در حضور دوزهای متفاوت از مورفین و کینین در فاز اول آزمون فرمالین ٤۷
شکل ۲- ب- بررسی مدت زمان لیسیدن پا در حضور دوزهای متفاوت از مورفین و کینین در فاز دوم آزمون فرمالین ٤۹

# فصل اول:

# مقدمه و بیان مسئله

## مقدمه

مفهوم سیناپس- ناحیهٔ خاصی از یک نرون، که با نرون دیگر ارتباط پیدا می‌کند. این توصیف نخستین‌بار با مطالعه بافت‌شناسی از طریق میکروسکوپ نوری مطرح گردید (۱)

## انواع سیناپس

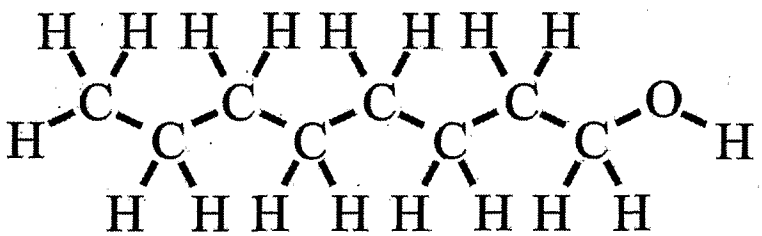
بعد از پیشرفت در تکنیک‌های الکتروفیزیولوژی در دههٔ ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ دو نوع انتقال برای ناقلین شیمیایی مشخص گردید. با وجود آن که در اغلب سیناپس‌ها، سیناپس شیمیایی وجود دارد، ولی در تعدادی از سیناپس‌ها تنها، سیناپس الکتریکی وجود دارد. بعد از ایجاد پیشرفت در دیدن با میکروسکوپ الکترونی، تفاوت‌های ساختمانی در دو نوع سیناپس مشخص گردید. در سیناپس شیمیایی، نرون‌ها توسط یک فضای کوچک، به نام شکاف سیناپسی (Synaptic cleft) جدا می‌گردند و هیچ گونه ارتباطی میان سیتوپلاسم یک سلول، با سلول مجاور وجود ندارد. حال آن که در سیناپس‌های الکتریکی سیتوپلاسم دو سلول مجاور، با کمک کانال‌های gap junction با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند. در جدول ۱-۱ خصوصیات مهم این دو نوع سیناپس، خلاصه شده است (۱).

**جدول ۱-۱: مقایسهٔ خصوصیات سیناپس‌های الکتریکی و شیمیایی (۱)(kandel ER et al-2000).**

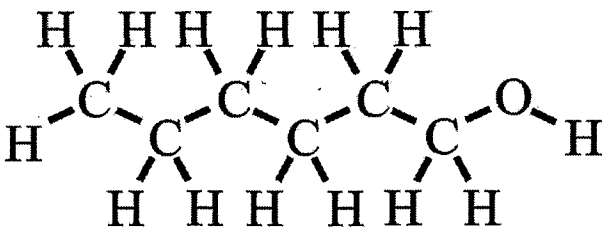
| | سیناپس الکتریکی | سیناپس شیمیایی |
|---|---|---|
| فاصلهٔ میان غشاء پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی | ۳/۵ نانومتر | ۴۰-۲۰ نانومتر |
| ارتباط سیتوپلاسمی میان سلول های پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی | ارتباط وجود دارد | ارتباط وجود ندارد |
| اجزاء اختصاصی | کانال‌های gap junction | پیش‌سیناپس: وزیکول‌ها و نقاط فعال<br>پس‌سیناپس: گیرنده ها |
| ماده انتقالی | جریان یون | ناقل شیمیایی |
| تأخیر سیناپسی | وجود ندارد | معمولاً ۵-۱ میلی‌ثانیه می‌باشد (حداقل ۰/۳ میلی‌ثانیه) |

**عوامل مهارکنندهٔ کانال‌های gap junction (۲)**

الکل‌های با زنجیرهٔ طولانی نظیر هپتانل و اکتانل

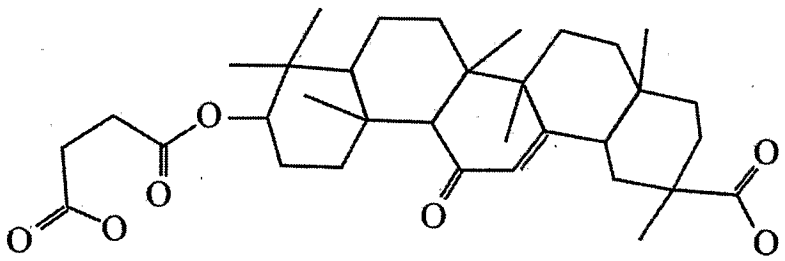


**اکتانل**



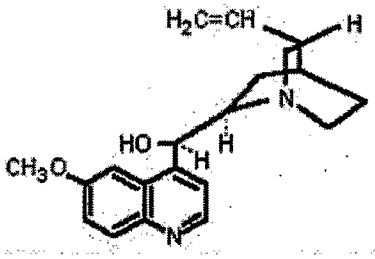
**هپتانل**

مشتقات گلیسریتینیک اسید نظیر کربنوکسولون

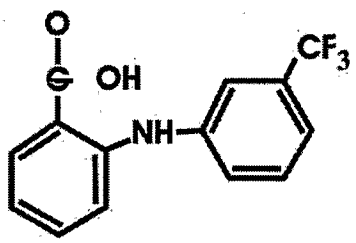


**کربنوکسولون**

کینین



فنامات ها نظیر فلوفنامیک اسید



## Gap junctions چیست؟

Gap junctions مناطق اختصاصی از غشاهای سلولی که ارتباط میان سلول های همسایه را برقرار می‌کنند. Gap junctions ها از کانال‌های پروتئینی تشکیل شده‌اند که اجازهٔ عبور یون‌ها و مولکول‌های کوچک (وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون) را میان سلول ها، به صورت غیر فعال می‌دهد (شکل ۱-۱). این کانال‌ها ارتباط میان سلول ها را به منظور برقراری تعادل برای یون‌های تنظیم کنندهٔ حیاتی و مولکول‌های کوچک (نظیر کلسیم و cAMP و گلوتاتیون)، نظیر مواد پیش‌ساز ماکرومولکول (آمینو اسیدها، قندها، نوکلئوئیدها) فراهم می‌کنند (۳).

## کانال‌های gap junction و ویژگی کلی آنها

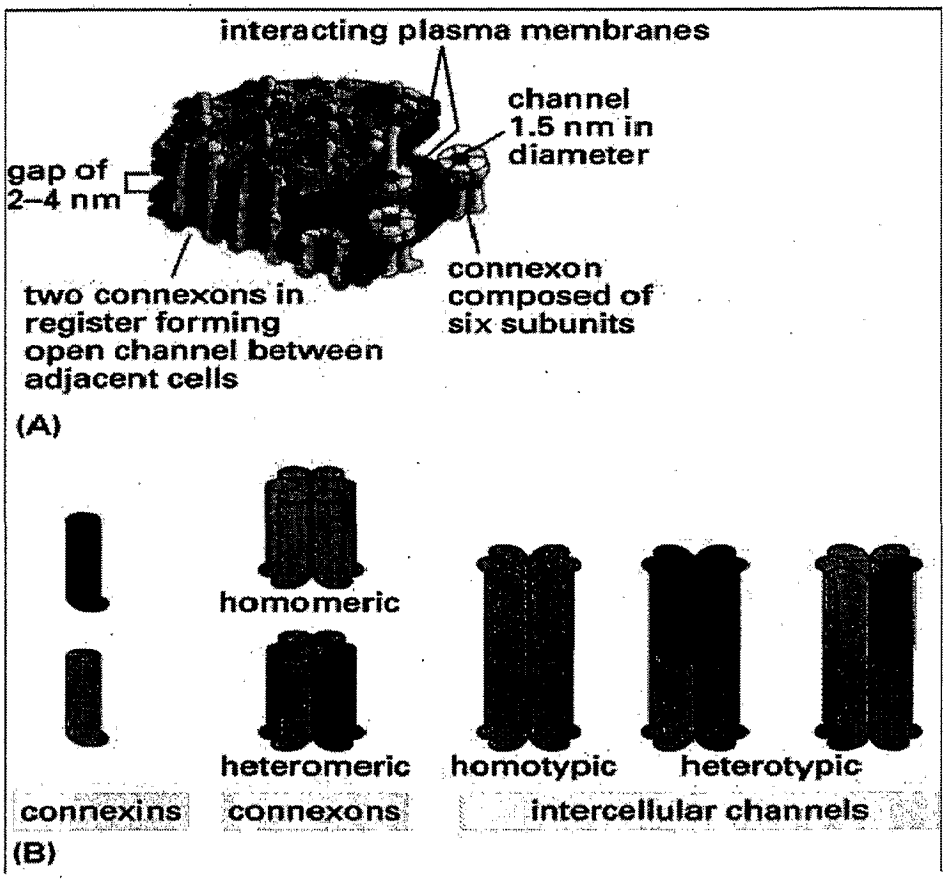
واژه کانال‌های gap junction نخستین بار توسط آقایان Revel و Karnovsky با مطالعه بر روی ساختمان میان سلول‌های قلب و کبد موش در سال ۱۹٦۷ مطرح گردید (٤). به دنبال آن کشف آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای پروتئین‌های کانال‌های gap junction و همچنین کلونینگ مولکول‌های این کانکسین‌ها صورت گرفت. امروزه با وجود تکنیک‌های مختلف انواع این کانال‌ها در بافت‌های مختلف، از جمله مغز مشخص گردیده‌اند و مطالعات فیزیولوژیکی برای یافتن تغییرات ناشی از موتاسیون‌ها در بیماری‌های ژنتیکی مختلف صورت گرفته است (۵).

کانال‌های gap junction در انواع مختلفی از سلول‌های پستانداران یافت می‌شوند که البته چند استثناء وجود دارد. در اریتروسیت‌های در حال گردش و اسپرماتوزوئیدها وجود ندارند. از طریق این کانال‌ها، تبادل مستقیم یون‌ها ، متابولیت‌ها و پیامبرهای ثانویه نظیر ($Ca^{+2}$, $IP_3$, cAMP, ATP) میان

نرون‌ها صورت می‌گیرد. تبادل چنین مولکول‌های پیامبر میان سلول‌های گلیال[1] یا میان نرون‌ها و سلول‌های گلیال، مسیرهای کوتاه مدت و طولانی مدت انتقال پیام را در مغز فراهم می‌سازد(٦).

خانواده کانکسین‌ها کاملاً همولوگ هستند و در حدود ۵۰٪ از توالی آمینواسیدهای شناخته شده یکسان بوده و از الگوی متنوع توزیع در بافت‌ها تبعیت می‌کنند.

یک سلول می‌تواند بیش از یک نوع کانکسین را از نظر ژنتیکی بیان کند. علاوه بر این کانکسون‌ها (همی‌کانال‌ها) ممکن است به صورت‌های زیر باشند:




**شکل ۱-۱:** کانال‌های gap junction به صورت مجموعه‌ای از کانال‌های بین سلولی بوده که از ۱۲ جزء (پروتئین‌های کانکسین) تشکیل شده است. هر شش کانکسین، یک کانکسون یا همی کانال را

تشکیل می‌دهد که ارتباط میان سلول‌های کوپل شده به یکدیگر را برقرار می‌سازد (۷).

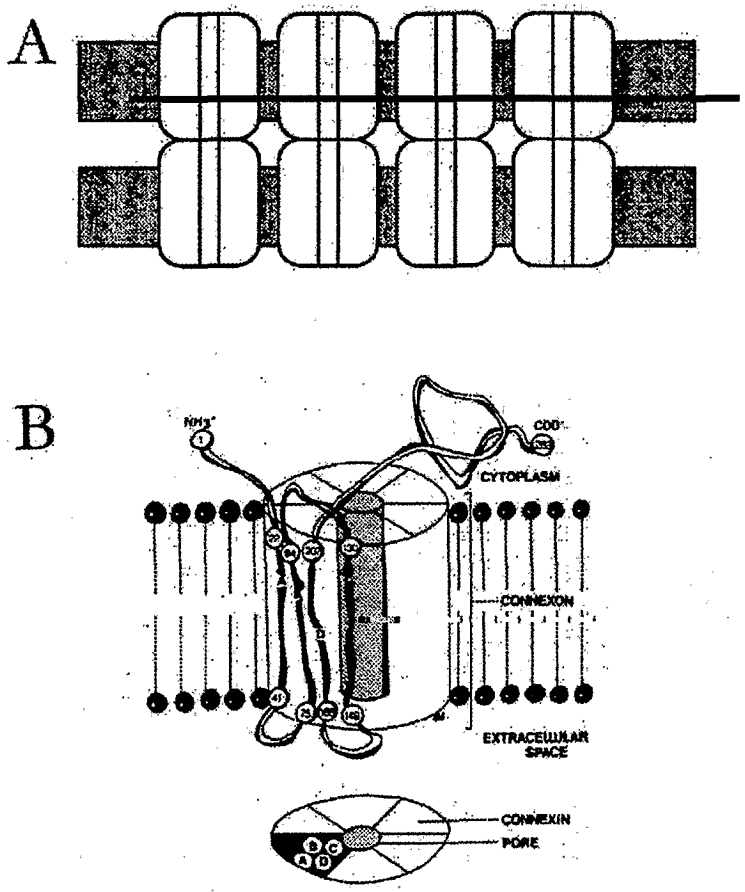
در یک سلول تحریک پذیر، این کانال ها به عنوان یک سیناپس الکتریکی، توانایی انتقال سریع ایمپالس‌های الکتریکی را میان سلول ها فراهم می سازند. این کانال در هماهنگ سازی فعالیت الکتریکی (و افزایش جریان) در عضلات صاف قلبی و جریان های خروجی نرونی حائز اهمیت می باشند. همچنین این کانال‌های دارای توانایی در انتقال سریع اطلاعات میان نرون های پیش سیناپسی و پس سیناپسی در رفتارهای گریزی نظیر حرکت سریع دم در Cray Fish می باشند. از سوی دیگر ایجاد این هماهنگی در هنگام اگزوسیتوز در سلولهای اندوکرین نظیر جزایر لانگرهانس به چشم می خورد.

این کانال ها در ایجاد شرایط بافری غلظت پتاسیم خارج سلولی در مغز دخالت دارند: بدنبال فعالیت نرونی و افزایش پتاسیم خارج سلولی، پتاسیم از طریق برداشت سلول گلیال از محیط برداشته شده و سپس از طریق انتقال آن از راه کانال های gap junction از یک سلول گلیال به سلول دیگر، سرانجام به سوی مویرگ ها هدایت می گردد. همچنین کانال های gap junction، نقش مهمی را در کنترل رشد سلولی، تمایز و رشد جنینی بر عهده دارند (۸). با توجه به عملکردهای مختلف این کانال ها، شگفت آور نخواهد بود که موتاسیون در ژن های مربوط به پروتئین های این کانال ها سبب بیماری ها مختلف نظیر نروپاتی محیطی، رشد غیر طبیعی قلب و ناشنوایی مادرزادی می گردد.

### تنوع مولکولی کانال های gap junction

در پستانداران پروتئین‌های gap junction توسط ۱۳ ژن کلون شده ساخته می‌شود (۹، ۱۰) و انتظار می‌رود دست کم تعداد کمتری از ژن‌ها به این مجموعه اضافه گردد. به طور کلی هر gap junction از دو کانال یکسان (کانکسون) تشکیل شده‌اند که هر کانال در یک سلول قرار دارد. هر کانال یکسان (همی

کانال) شامل هگزامری از کانکسین بوده و در کانکسین ترمینال کربوکسیل و آمین در ناحیهٔ سیتوپلاسمیک سلول واقع بوده و هر مولکول کانکسین از ٤ دامین پیچ خورده α-هلیکس عبور کرده از غشاء، تشکیل شده است (۱۱) (شکل ۱-۲). بخش عبوری هر کانکسین از غشاء از چهار قطعه M1 ، M2 ، M3 و M4 تشکیل شده است و هر دو دامین آمینی (NT domain) و کربوکسیلی (CT domain) در بخش سیتوپلاسمی کانال واقع است. لوپ‌های خارج سلولی $C_1$ و $C_2$ از نظر ساختمانی با سه سیستئین در هر لوپ همراه می‌باشد که در تمام ۱۲ کانکسین شناخته شده این وضعیت مشخص شده است (۱۱). چهار دامین عبور کرده از غشاء با حروف بزرگ مشخص شده‌اند. دامینC عبور کرده از غشاء به دلیل آن که ماهیت آمفی فاتیک دارد، در خط مرزی منفذ کانال قرار دارد. ترمینال کربوکسی و آمینی کانکسین در ناحیه سیتوپلاسمیک غشاء پلاسمایی قرار دارد (۱۲).




**شکل ۱-۲:** نمایش شماتیک از همی کانال‌های جفت شده (A) از تجمع gap junction. (B) تصویر توپولوژیکی از یک مولکول کانکسین در غشاء پلاسمایی. قسمت پائین شکل (B) نمایش مقطع عرضی کانال همراه با قرارگیری کانکسین‌های هگزامر را در اطراف منفذ کانال نمایش می‌دهد (۱۲).

در توالی ژنی کانکسین‌ها بیشترین هومولوژی در مورد اعضاء ژن‌های آن، مربوط به نواحی پیچ خورده غشاء و لوپ خارج سلولی است و هومولوژی لوپ خارج سلولی توجیه کننده این است که چرا همی‌کانال‌های تشکیل شده در بسیاری از انواع کانکسین‌ها توانایی جفت شدن با یکدیگر را دارند.

تا کنون، ۱۵ کانکسین در جوندگان شناسایی شده است که احتمالاً این تعداد کانکسین در انسان هم وجود دارد. در پستانداران:

گروه I ($\beta$) از کانکسین‌ها شامل : Cx26 ، Cx30 ، Cx30.3 ، Cx31 ، Cx31.1 و Cx32 .

گروه II ($\alpha$) از کانکسین‌ها شامل : Cx33 ، Cx37، Cx40 ، Cx43، Cx45 ، Cx46 ، Cx50 و Cx57 که اخیراً مطرح شده است (۱۳).

علاوه بر این Cx36 به عنوان جدیدترین نوع کانکسین در مغز پستانداران شناسایی شده است و به عنوان گروه جدید کانکسین‌ها به صورت گروه III ($\gamma$) مطرح شده است (۱٤).

تمام پروتئین‌های مربوط به کانکسین‌ها به استثناء Cx36 توسط یک خانواده از ژن‌ها که دارای یک ساختمان مشترک هستند، کد می‌گردند. تمام کانکسین‌ها، از جمله Cx36 از نظر توپولوژی غشایی شبیه یکدیگر هستند. ۸ کانکسین در مغز بیان ژنی داشته که با استفاده از آنتی بادی یا پروب‌های RNA شناخته شده‌اند (۱۵) (جدول ۱-۲).

**جدول ۱-۲:** انواع mRNAs مربوط به کانکسین بیان شده در سیستم عصبی پستانداران، کانکسین‌ها بر اساس وزن مولکولی پروتئینی که توسط cDNA کد می‌گردد، نامگذاری شده‌اند (۱۲) (Dermatizel R-1998).

RNA کبد (Cx32،Cx26) ، RNA قلب (Cx40، Cx45، Cx43) ، RNA ریه (Cx37).

a: در محیط کشت استروسیت‌ها[۲] یافت شده‌اند.

b: Cx30 به مقدار زیاد در تمام قسمت‌های مغز هموژن شده بیان می‌شود.

| | Cortex | Cerebellum | Hippocampus | Brain Stem | Spinal Cord |
|---|---|---|---|---|---|
| Cx32 | + | + | + | + + | + + + |
| Cx26 | + | + + | + | + | + |
| Cx43 | + + | + + | + + | + + | + + |
| Cx40 | 0/+ | + | 0/+ | 0/+ | 0/+ |
| Cx45 | +/0 | + + | + | +/0 | +/0 |
| Cx37 | + | + | + | + | + |
| Cx33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cx46[a] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cx50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cx30[b] | | | | | |

نواحی بیان ژنی نشانگر تنوع سلولی و در عین حال همراه با همپوشانی این نواحی است (جدول ۱-۲). از مقایسه توالی‌های پروتئین یا DNA دو دسته مجزا در کانکسین‌ها را می‌توان تمایز داد که هر گروه به طور تقریبی در ارتباط با سایر اعضاء گروه دیگر می‌باشد.

از وجود دو دسته از کانکسین‌ها به پیدایش یک دوپلیکاسیون[۳] ژنی در تکامل اولیه کانال‌های gap junction می‌توان پی برد. گروه I یا خانواده β از دسته کانکسین‌ها که همولوژی بسیاری به Cx32 کبدی دارند.گروهII یا خانوادهٔ α که درجه بالاتری از همولوژی را نسبت به Cx43 قلبی‌دارند(شکل۱-۳).