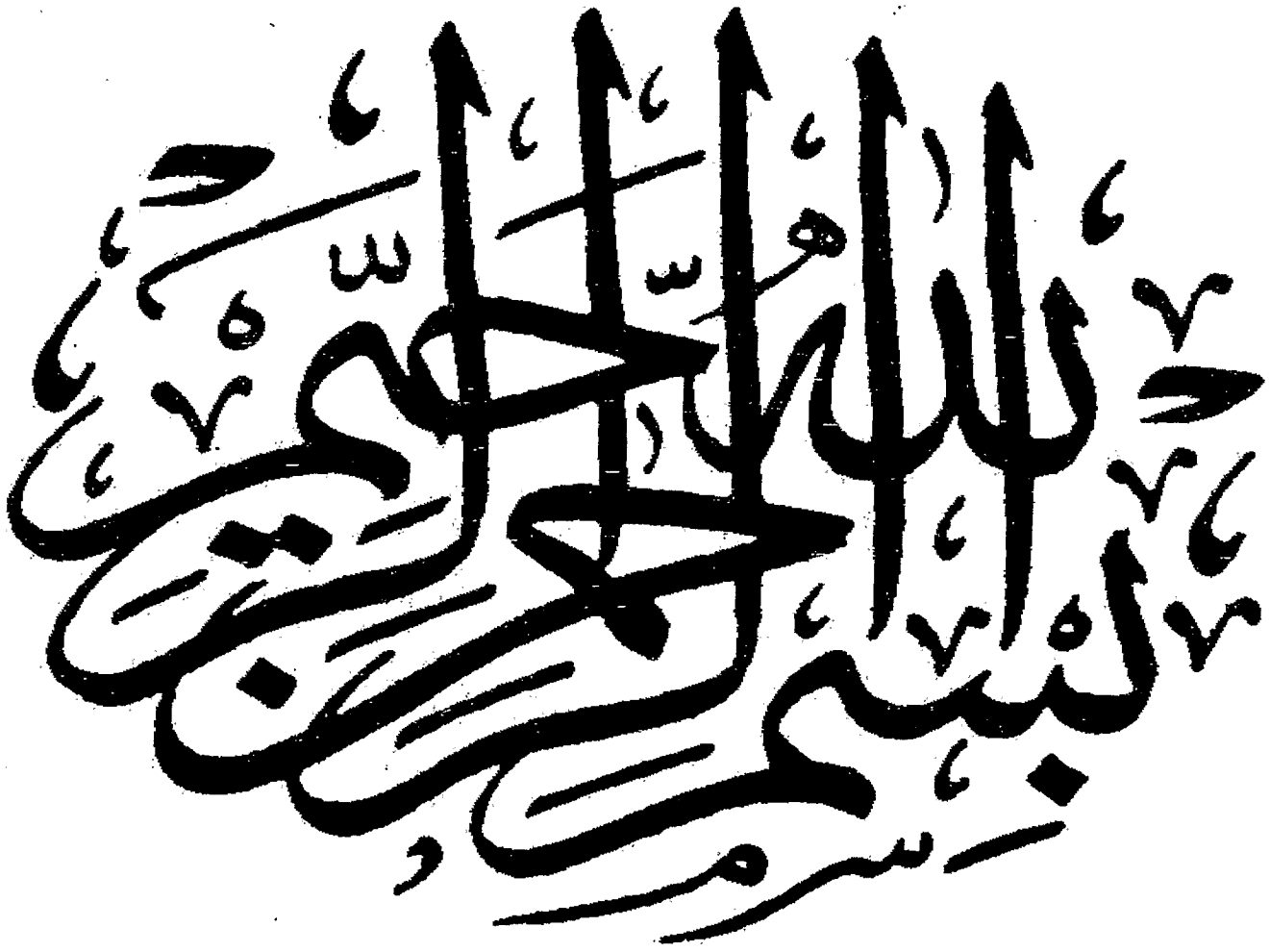


٩٠٤٦٠

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده پزشکی

رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته فیزیولوژی

عنوان موضوع

بررسی اثر استرس مزمن برمسیرسیگنالینگ پروتئین G و تغییر در بیان برخی تنظیم کننده های سیگنالینگ پروتئین G

نگارش

مسعود فریدونی

اساتید راهنما

دکتر ابوالحسن احمدیانی- دکتر سعید سمنانیان

استاد مشاور

دکتر محمد جوان

خرداد ۱۳۸۶

۱۳۸۶/۷/۱۹

۹۵۴۶۰

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم / آقای **مسعود فریدونی** رساله واحدی خود را با عنوان: «**بررسی اثر استرس مزمن بر مسیر سیگنالینگ پروتئین G و تغییر در بیان برخی تنظیم کننده های سیگنالینگ پروتئین G**» در تاریخ ۸۶/۳/۲۷ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	**آقای دکتر ابوالحسن احمدیانی**	استاد	
۲- استاد راهنمای دوم	**آقای دکتر سعید سمنانیان**	استاد	
۳- استاد مشاور اول	**آقای دکتر محمد جوان**	استادیار	
۴- استاد مشاور دوم			
۵- استاد ناظر	**آقای دکتر سهراب حاجی زاده**	دانشیار	
۶- استاد ناظر	**آقای دکتر محمد سیاح**	دانشیار	
۷- استاد ناظر	**خانم دکتر افسانه الیاسی**	دانشیار	
۸- استاد ناظر	**آقای دکتر سیدجواد میرنجفی زاده**	دانشیار	
نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	**آقای دکتر سیدجواد میرنجفی زاده**	دانشیار	

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

چکیده

دوزهای بسیار ناچیز (ULD) مرفین در موش صحرایی هایپرآلژزیا (پردردی) القاء می کنند که از طریق مسیر سیگنالینگ پروتئین Gs میانجیگری می شود. مهار مسیر Gs تحمل به بیدردی مرفین در دوزهای معمول را مهار می کند. استرس مزمن (مکرر) نیز می تواند تحمل به بیدردی مرفین را مهار کند. لذا این احتمال وجود دارد که استرس مزمن بر مسیر سیگنالینک Gs اثر بگذارد. در این تحقیق اثر استرس مزمن بر سیگنالینگ Gs (هایپرآلژزیای ULD مرفین) و میزان بیان ژنی کنترل کننده های سیگنالینگ Gs و Gi/o (به ترتیب RGS2 و RGS4) بررسی شد. استرس بی دردی (آنالژزیا) و هایپرآلژزیا القاء می کند و مکانیسمهایی هم برای آنها پیشنهاد شده است، اما در تحقیق حاضر احتمال فعالیت مسیر سیگنالینگ Gs در بروز هایپرآلژزیای استرس، نقش محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال (HPA)، و تغییر در بیان ژنی RGS2 و RGS4 در اثرات ذکر شده برای استرس مزمن، مورد بررسی قرار گرفته است.

استرس شنای اجباری (۵ دقیقه در روز، در آب C ° ۱±۲۰) در رتهای نر بالغ (۲۳۰-۱۸۰ گرم) نژاد ویستار بکار گرفته شد. از روش(T.F) Tail Flick برای سنجش آستانه درد، استفاده شد. آستانه درد ساعات مختلف پس از جلسات استرس و پس از تجویز مرفین (۱ µg/kg i.p.) مورد سنجش واقع شد. این آزمایشها در گروه های آدرنالکتومی (ADX) و شم بطور کامل تکرار شد. در گروهی دیگر به جای استرس، دگزامتازون (۲ mg/kg i.p.) بکار گرفته شد. از اسلتامیویر (۱ mg/kg i.p.) برای بلوک سیگنالینگ Gs استفاده شد. نیمه پشتی نخاع کمری برای بررسی بیان ژن RGS2 و RGS4 در مقایسه با بیان ژن بتا- اکتین، با تکنیک RT-PCR نیمه کمی مورد استفاده قرار گرفت.

استرس بمدت یک ساعت بیدردی القاء نمود ($p<0.001$) که از ساعت سوم به بعد به پر دردی مبدل گردید ($p<0.05$). با تکرار استرس، ضمن القاء تحمل به آنالژزیای استرس، افزایش تدریجی در هایپرآلژزیای آن ۲٤ ساعت پس از هر جلسه استرس نیز پدید آمد($p<0.001$) . اما در همین زمان استرس مزمن باعث شد که دوز بسیار ناچیز مرفین نه فقط اثر هایپرآلژزیک بروز نداده بلکه یک اثر کاهنده در هایپرآلژزیای استرس مزمن نیز القاء نماید ($p<0.01$). تجویز حاد و مزمن اسلتامیویر .1mg/kg i.p نتوانست هایپرآلژزیای ناشی از استرس شنای اجباری را مهار کند.

دگزامتازون نیم ساعت بعد از تجویز منجر به هایپرآلژزیا شد($p<0.001$) که تا ۲٤ ساعت نیز ادامه داشت ($p<0.01$) . تکرار تجویز آن در روزهای بعد منجر به افزایش هایپرآلژزیا شد($p<0.001$) اما اثر مهاری بر هایپرآلژزیای مرفین نداشت. درحیوانات ADX، آنالژزیای استرس حتی ۲٤ ساعت پس از استرس دوام یافت ($p<0.01$). تکرار استرس درحیواناتADX در مقایسه با گروه شم، نه

فقط تحمل ناچیزی در آنالژزیای استرس القاءکرده بود بلکه در هیچ یک از پنج جلسه نیز نتوانست باعث القاء هایپرآلژزیا گردد. استرس مزمن در حیوان ADX نیز قادر به مهـار هایپرآلژزیـای ULD مرفین نبود.

ULD مرفین، ۳۰ دقیقه بعد از تجویز بیان RGS2 را ۵۰٪ افزایش داد ($p<0.05$). استرس مزمن ۲٤ ساعت پس از آخرین جلسه بیـان RGS2 را ۱۲۰٪ افـزایش داد ($p<0.05$) امـا تغییـری در بیـان RGS4 بوجود نیاورد. تجویز مزمن دگزامتازون به جای استرس تغییری در بیان RGS2 نداد اما بیان RGS4 را ٤۳٪ کاهش داد($p<0.05$). در حیوانات ADX استرس مزمن بربیان RGS2 و RGS4 بی اثر بود.

به نظر میرسد فعالیت گلوکوکورتیکوئیدهای آدرنال در بروز هایپرآلژزیای ناشی از اسـترس و القـاء تحمل به آنالژزیای ناشی از استرس نقش داشته باشد. احتمالا تحریک سیگنالینگ Gs نمی تواند به عنوان مسیر القاء هایپرآلژزیای ناشی از استرس مطرح باشد. احتمالا استرس مزمن بایـد بـه نحـوی واجد اثر منفی بر مسیر سیگنالینگ Gs باشد که آنرا قادر ساخته هایپرآلژزیای ناشی از ULD مرفین را مهار نماید. افزایش اندک در بیان RGS2 ناشی از ULD مـرفین تاییـدی مجـدد بـر بکـارگیری مسیر Gs در بروز هایپرآلژزیا مرفین فراهم می آورد. افزایش بیان RGS2 می توانـد چگـونگی اثـر استرس مزمن درمهار سیگنالینگ Gs (مهار هایپرآلژزیای ULD مرفین) را توضیح دهد. عدم تغییـر بیان RGS2 در حضور دگزامتازون مزمن فقدان اثر مهاری بر سیگنالینگ Gs و ناتوانی آن در مهـار اثر هایپرآلژزیک ULD مرفین را توجیه می نماید. بـرای گـروه ADX، توضـیح اخیـر بـرای عـدم توانایی استرس مزمن در مهار اثر هایپرآلژزیک ULD مرفین و سیگنالینگ Gs قابل طرح است. لذا برای اثر مهاری استرس مزمن بر سیگنالینگ Gs به فعالیت کل محور HPA نیاز اسـت. شـاید ایـن اثر منفی استرس بر مسیر سیگنالینگ Gs ، به عنوان مکانیـسمی بـرای بخـشی از عملکـرد مهـاری استرس مزمن بر تحمل به آنالژزیای مرفین قابل طرح باشد.

کلمات کلیدی: استرس شنای اجباری، هایپرآلژزیا (پردردی)، آنالژزیا (بی دردی)،
Oseltamivir ،Hypothalamus Pituitary Adrenal axis

تقدیم به

همسر صبورم افسانه

و

فرزندان مهربانم نیکو و علی

به

مادر و پدر گرامیم

و به

تمامی معلمان و اساتید بزرگوارم در همه ی دوره های آموزشی

و سپاس ویژه از

استاد گرانقدر و ژرف اندیش و نیک خواه جناب آقای دکتر احمدیانی

استاد فرزانه جناب آقای دکتر سمنانیان

و برادر عزیزم جناب آقای دکتر جوان

و تشکر از

همه اساتید بزرگوار و دانشمندم در بخش فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس ، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، بخشهای فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

همیاری و هم اندیشی همکلاسی های اندیشمندم و دانشجویان گرامی بخشهای فوق.

کارکنان محترم بخش فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، بخشهای فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

فهرست

فهرست ۱

چکیده ۵

فصل اول (بیان مسئله) ۷

فصل دوم (کلیات) ۱۳

۲-۱- بیولوژی استرس ۱۵

۲-۱-۱- نوروآناتومی و فیزیولوژی استرس ۱۵

۲-۱-۲- سیستم Sympathetic-Adrenomedulary (SAM) ۱۶

۲-۱-۳- محور سیستم لیمبیک- هیپوتالاموس- هیپو فیز- قشر فوق کلیوی ۱۷

۲-۱-٤- نقش CRH در پاسخهای استرسی ۲۰

۲-۱-۵- استرس و اضطراب ۲۱

۲-۱-٦- استرس و افسردگی ۲۲

۲-۱-۷- مدلی تجربی از استرس-اضطراب-افسردگی ۲۳

۲-۱-۸- استرس، حافظه و تولید نورونهای جدید ۲۳

۲-۱-۹- سایر اثرات استرس ۲۵

۲-۲- بیولوژی درد ۲٦

۲-۲-۱- فیزیولوژی درد ۲۷

۲-۲-۲- تبدیل تحریک آسیب رسان به سیگنال در گیرنده آسیب ۲۸

۲-۲-۳- انواع درد (طبقه بندی) ۳۰

۲-۲-۳-۱- درد التهابی ۳۱

۲-۲-۳-۲- درد نوروپاتیک ۳۱

۲-۲-۳-۳- درد عملکردی ۳۱

۲-۲-٤- مکانیسمهای افزایش حساسیت در درد ۳۱

۲-۲-٤-٤- کاهش عملکرد مهاری: ۳٦

۲-۲-۵- مکانیسمهای مرکزی کنترل درد ۳٦

۲-۲-٦- بیولوژی ملکولی درد ۳۸

۲-۳- تحمل ٤۱

۲-۳-۱ گیرنده های NMDA ٤۱

۲-۳-۲- دینورفین نخاعی ٤۲

۲-۳-۳- گیرنده δ در تولرانس ٤۲

۲-۳-٤- پپتیدهای ضد اپیوئیدی ٤۳

۲-۳-۵- فسفریلاسیون گیرنده/تنظیم منفی ٤٣
۲-۳-٦- پیش فعالی آدنیلات سیکلاز (AC) ٤٣
۲-٤- پردردی یا هیپرآلژزی ناشی از مورفین ٤٤
۲-٤-۱- نقش GM_1 در تحمل و هایپرآلژزیای مرفین ٤٥
۲-۵- پروتئینهای G : ٤٧
۲-۵-۱- مسیر Gs : ٥٠
۲-۵-۲- مسیر Gi/o : ٥٠
۲-۵-۳- مسیر Gq : ٥١
۲-٦- پروتئینهای تنظیم کننده انتقال پیام پروتئین G ٥١
۲-٦-۱- پیش بینی وجود RGS ها ٥١
۲-٦-۲- اکتشاف RGS ها ٥٢
۲-٦-۳- عملکرد پروتئینهای RGS ٥٢
۲-٦-٤- ساختار و طبقه بندی پروتئینهای RGS ٥٣
۲-٦-۵- برهمکنش RGS ها با GPCR ها و سایرافکتورها ٥٣
۲-٦-٦- برهمکنش بین پروتئینهای RGS و افکتورهای پروتئین G ٥٤
۲-٦-۹- پروتئینهای RGS و cGMP ٥٥
۲-٦-۱۰- پروتئینهای RGS و فسفولیپاز Cβ (PLCβ) ٥٦
۲-٦-۱۱- پروتئینهای RGS و انواع کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ ٥٦
۲-٦-۱۲- پروتئینهای RGS و سایر پروتئین ها ٥٦
۲-٦-۱۳- RGS ها به عنوان اهداف دارویی ٥٧
فصل سوم (مواد و روشها) ٦٠
۳-۱- وسایل و تجهیزات مورد استفاده ٦١
۳-۲- مواد مورد استفاده ٦٢
۳-۳- حیوانات ٦٢
۳-٤- آزمون TAIL-FLICK ٦٢
۳-۵- استرس شنای اجباری: ٦٣
۳-٦- جراحی آدرنالکتومی ADX ٦٣
۳-۷- اندازه گیری سطح کورتیکواسترون پلاسما ٦٤
۳-۸- روش برسی تغییرات بیان RGS2 و RGS4 ..... ٦٤
۳-۸-۱- استخراج نخاع ٦٤
۳-۸-۲- استخراج RNA ٦٥
۳-۸-۳- پروتکل استخراج RNA ٦٦

۳-۸-٤- واکنش آنزیم نسخه برداری معکوس یا Reverse Transcriptase (RT) ٦٦
۳-۸-٥- پروتکل انجام واکنش RT برای سنتز cDNA از mRNA ٦٨
۳-۸-٦- PCR (Polymerase Chain Reaction) ٦٨
۳-۸-۷- طراحی پرایمر ۷۱
۳-۸-۸- الکتروفورز نمونه ها ۷۳
۳-۸-۹- پروتکل الکتروفورز روی ژل آگارز ۷٤
۳-۸-۱۰- RFLP ۷٥
۳-۸-۱۱- تعیین توالی Sequencing ۷٦
۳-۹- گروه های آزمایشی ۷٦
۳-۹-۱- آزمایشات هورمونی و رفتاری ۷٦
۳-۹-۲- گروه های آزمایشات ملکولی ۷۹
۳-۱۰- تجزیه و تحلیل آماری ۸۰
فصل چهارم (نتایج) ۸۱
٤-۱- اثر استرس بر فعالیت محور HPA ۸۲
٤-۲- بررسی اثرات وابسته به زمان و تکرار استرس بر آستانه درد ۸۳
٤-۳- بررسی تداخل سیگنالینگ پروتئین Gs در هایپرآلژزیای ناشی از استرس ۸٤
٤-٤- نقش محور HPA در اثرات استرس بر آستانه درد ۸٦
٤-٤-۱- اثر دگزامتازون بر آستانه درد ۸٦
٤-٤-۲- اثر تجویز حاد اسلتامیوپر ، بر هایپرآلژزیای ناشی از دگزامتازون ۸۷
٤-٤-۳- بررسی اثراسترس مزمن بر آستانه درد در حیوانات ADX ۸۸
٤-٥- اثر استرس منفرد یا تکراری بر هایپرآلژزیای ناشی از مرفین (سیگنالینگ پروتئین Gs) ۹۳
٤-٦- نقش محور HPA در اثرات استرس بر هایپرآلژزیای ناشی از مرفین ۹۷
٤-۷- نتایج آزمایشات ملکولی ۹۸
٤-۷-۱- رابطه میزان محصول با تعداد سیکل در واکنش PCR ۹۸
٤-۷-۲- رابطه میزان محصول با میزان cDNA در واکنش PCR ۹۸
٤-۷-۳- نتایج واکنشهای RFLP ۱۰۰
٤-۷-٤- نتایج تعیین توالی Sequencing ۱۰۱
٤-۷-٥- اثر استرس مزمن بر بیان ژنهای مورد مطالعه ۱۰۲
٤-۷-٦- اثر تجویز دگزامتازون به جای استرس بر بیان ژنهای مورد مطالعه ۱۰۳
٤-۷-۷- اثر برداشتن آدرنال بر بیان ژنهای مورد مطالعه پس از ریکاوری ۱۰٤
٤-۷-۸- اثر استرس مزمن در حیوان آدرنالکتومی شده بر بیان ژنهای مورد مطالعه ۱۰٥
٤-۷-۹- اثر استرس مزمن در گروه شم آدرنالکتومی، بر بیان ژنهای مورد مطالعه ۱۰٦

٤-٧-١٠- اثر دوز فوق العاده ناچیز مرفین بر بیان ژنهای مورد مطالعه ١٠٧

فصل پنجم (بحث) ١٠٨

٥-١- بحثی بر داده های بررسی های هورمونی و ر فتاری ١٠٩

٥-١-١- بحثی بر اثرات استرس منفرد و مکرر بر آستانه درد ١١٠

٥-١-٢- بحثی بر تداخل سیگنالینگ پروتئین Gs در هایپرآلژزیای ناشی از استرس ١١١

٥-١-٣- بحثی بر نقش محور HPA در اثرات استرس بر آستانه درد ١١٢

٥-١-٤- بحثی بر اثرات وابسته به زمان و تکرار استرس بر آستانه درد در حیوانات ADX ١١٣

٥-١-٥- بحثی بر اثر استرس منفرد یا تکراری بر هایپرآلژزیای ناشی از مرفین (سیگنالینگ پروتئین Gs) .. ١١٤

٥-١-٦- بحثی بر نقش محور HPA در اثر استرس بر هایپرآلژزیای ناشی از مرفین ١١٦

٥-١-٧- بحثی بر سر یک تناقض ١١٨

٥-٢- بحثی پیرامون کیفیت سنجش میزان بیان ژن پروتئینهای RGS2 و RGS4 ..... ١١٩

٥-٣- بحثی بر داده های آزمایشات ملکولی ١٢١

٥-٣-١- بحثی بر اثر استرس بر سیگنالینگ پروتئین G ١٢٢

٥-٣-٢- بحثی بر تجویز دگزامتازون به جای استرس بر بیان ژن ١٢٣

٥-٣-٣- بحثی بر اثر برداشتن آدرنال بر بیان ژن پس از بهبودی از عمل جراحی ١٢٤

٥-٣-٤- بحثی بر اثر استرس مزمن در حیوان آدرنالکتومی شده در مقایسه با شم بر بیان ژن ١٢٤

٥-٣-٥- بحثی بر اثر دوز بسیار ناچیز مرفین بر سیگنالینگ G پروتئین ١٢٦

٥-٤- نتیجه گیری ١٢٧

٥-٥- پیشنهادها ١٢٨

منابع ١٢٩

فصل اول

(بیان مسئله)

کم شدن توان یک دارو با مصرف مکرر آن تحمل یا تولرانس نامیده می شود [۱]. استرس مزمن میتواند از ایجاد تحمل به اثر آنالژزیک مرفین جلوگیری نماید [۲-٤]. استرس حاد آنالژزیک است [٥-۷] اما عوامل استرسی مزمن آسیب رسان [۸-۱۰]، یا استرسهای مزمن غیر آسیب رسان قادرند از بروز تحمل به اثر ضد دردی مرفین پیشگیری نمایند [۱۱،٤-۱۳]. در موشهای صحرایی سویه Lewis که فاقد پاسخ محور HPA به استرس هستند ، درد القا شده با فرمالین قادر به مهار روند ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین نیست. لذا فعالیت محورHPA در ایجاد این اثر استرس از اهمیت ویژه ای برخوردار است [۹].

مرفین نظیر تعدادی دیگر از اپیوئیدها دارای اثر دوگانه تحریکی و مهاری بر روی فعالیت سلولهای عصبی است [۱٤-۱٦]، این ماده در دوزهای معمول، یک آنالژزیک است اما دوزهای فوق العاده ناچیز آن (ULD)، درمحدوده های µg/kg ۱، اثر هایپر آلژزیک بروز می دهد [۱٥] . بطور *in vitro* فعال شدن گیرنده های اپیوئیدی با دوزهای خیلی ناچیز آگونیست سبب تغییر در روند سیگنالینگ گیرنده، و بروز اثرات تحریکی بر فعالیت نورونی می شود که یک مورد آن بروز هایپرآلژزیا است [۱۷-۱۹]. احتمال داده میشودکه مکانیسمهای ایجاد تحمل به اثر آنالژزیای مرفین و هایپرآلژزیای ناشی از بکار بردن دوزهای بسیار اندک آگونیست های اپیوئیدی تا حدودی مشترک باشند [۲۰،۲۱].

در بسیاری از سلولهای سیستم عصبی اثرات مهاری و ضد دردی مرفین بوسیله گیرنده اپیوییدی جفت شونده به پروتئینهای Gi/o صورت می پذیرد [۲۲-۲٤] درحالیکه که اثر هایپر آلژزیک ULD مرفین از طریق جفت شدن گیرنده اپیوئیدی با پروتئین Gs صورت می گیرد [۱٤،۱۹،۲٥]. لذا گیرنده های اپیوئیدی همزمان بر هردو مسیر Gi/o و Gs اثر می گذارند. در دوزهای معمول مرفین، اثر تحریکی بوسیله اثر قویتر مهاری آن پوشیده می شود، اما در غلظتهای فوق العاده ناچیز مرفین به دلیل افت شدید اثر مهاری، این پوشیدگی به شدت کاهش می یابد و اثر تحریکی و هایپرآلژزیا بروز می کند [۱٦،۲٦،۲۷].

مکانیسمهای متعددی در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها بررسی شده اند از جمله:

تغییر در بیان پروتئین های مختلف تنظیم عملکرد پروتیین های G (RGS) [۲۸-۳۰]، افزایش عملکرد آدنیلیل سیکلاز و پروتئین کیناز وابسته به cAMP (PKA)، پروتئین کیناز C (PKC)، [۳۱]، تغییر در بیان زیرواحدهای پروتیین G نظیر Gα یا Gαz [۸،۳۲] و بطور کلی تغییرات پلاستیک و سازش متقابل در مدارهای نورونی [۲٤].

تحریک مزمن سیگنالینگ Gs در ایجاد تحمل به آنالژزیای مرفین نقش دارد زیرا مهار آن مثلا توسط اسلتامیویر توانسته از ایجاد تحمل حین تجویز مزمن مرفین پیشگیری نماید. [۲٦،۲۷،۳۳].

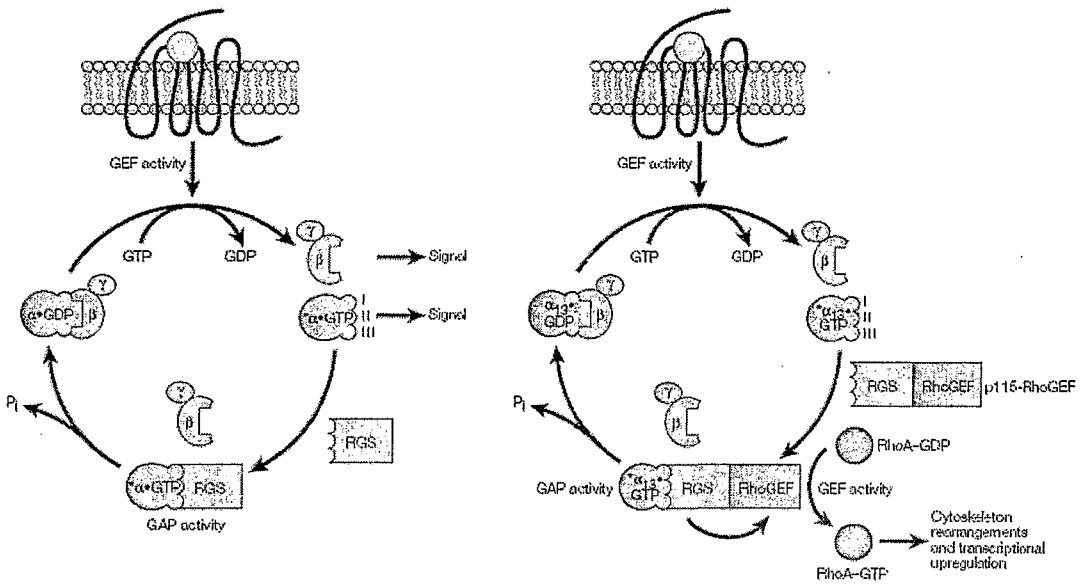
با توجه به این که مهار سیگنالینگ Gs می تواند ایجاد تحمل را حین استفاده مزمن از مرفین در دوزهای مرسوم مهار کند و استرس مزمن نیز می تواند از بروز تحمل پیشگیری کند، این فرضیه را می توان مطرح کرد که شاید استرس مزمن با مهارسیگنالینگ Gs این عمل خود را انجام می دهد. با توجه به اینکه یکی از مکانیسم های اصلی بروز هایپرآلژزیای مرفین سیگنالینگ Gs می باشد، هر عاملی که بتواند از این اثر جلوگیری نماید ممکن است به نوعی روی سیگنالینگ Gs اثر مهاری اعمال نماید. لذا در این پژوهش، هایپرآلژزیای ناشی از دوز بسیار ناچیز مرفین به عنوان یک ابزار in vivo برای بررسی تداخل با مسیر سیگنالینگ Gs مورد استفاده قرار گرفته است. به عنوان مثال اگر استرس مزمن (مکرر) بتواند از بروز هایپرآلژزیای ناشی از تجویز دوزهای بسیار اندک مرفین جلوگیری نماید، به نوعی اثر مهاری بر مسیر سیگنالینگ Gs داشته است.

برای این منظور لازم است اثر یک استرس غیر آسیب رسان و مزمن، که مشخصا باعث فعالیت محور HPA می شود را بر هایپر آلژزیای ناشی از مورفین بررسی نمود. ابتدا باید اثر خود استرس مزمن بر آستانه احساس درد بررسی و روشن شود. همچنین مناسب به نظر میرسد نقش محور HPA در بروز اثرات ایجاد شده احتمالی، بررسی گردد.

استرس مزمن از طریق فعالیت محورHPA منجر به بروز تغییراتی در بیان ژنها می شود [۳٤]، بویژه تغییراتی که در ارتباط با کورتیزول و اثرات ژنومیک آن مطرح هستند [۳۵]. ازطرفی عملکرد گیرندهای هورمون رها کننده کورتیکوتروپین (CRH)، که در بسیاری از نقاط CNS شناسائی شده اند، وابسته به پروتئین هایG است و می توانند منجر به بروز تغییراتی در نورونها شوند [۳٦-۳۹]. در مجموع این احتمال وجود دارد که استرس بتواند از طریق ایجاد تغییرات هترولوگ در بیان برخی ژنها با بروز تغییرات پلاستیک ناشی از تحمل به مرفین مخالفت نماید.

یک گروه از ژنهای مهم که در پلاستیسیته نورونی نقش دارند اعضاء خانواده پروتئینی تنظیم کننده سیگنالینگ پروتئینهای G (RGS) می باشند، که سرعت بیان آنها با فاکتورهای نسخه برداری مهم c-fos وc-jun قابل مقایسه است [۳۰] و از آنجایی که پدیده تحمل با تغییرات پلاستیک نورونی همراه است [۲٤] اهمیت و کارکرد RGS ها در این ایجاد تغییرات پلاستیک نرونی و همچنین در بیماریهای مرتبط با استرس مثل اضطراب به میزان زیادی مورد بررسی قرار گرفته است [٤۰،٤۱].

همانگونه که در شکل۱-۱ دیده می شود این پروتئینها اغلب خاصیت GTPase پروتئینهای G تریمری را سرعت بخشیده (GAP) و زمان سیگنالینگ گیرنده جفت شونده به پروتئین G را کوتاهتر می کنند (شکل ۱-۱ سمت چپ) [٤۲-٤٤].



شکل۱-۱) عملکرد پروتئینهای RGS ، اغلب خاصیت GTPase پروتئینهای G تریمری را سرعت می بخشند (GAP) (شکل چپ) زیرا گذر از حالت اتصال زیر واحد α پروتئین G به GTP (فرم فعال) را به فرم متصل به GDP (فرم غیر فعال) تسریع می نمایند (Neubig and Siderovski, 2002)

اعضاء خانواده RGS در مکانیسمهای تولید تحمل به اپیوئیدها، هایپرآلژزیا و درد نوروپاتیک مورد بررسی قرار گرفته است [۲۹،٤٥،٤٦]. مصرف مزمن اپیوئیدها منجر به تغییر در سطح برخی RGS ها شده و فقدان آنها در موشهای سوری، ایجاد تحمل و علایم وابستگی را دچار وقفه نموده است [٤٧].

نکته جالب توجه در مورد RGS ها این است که موقعیت ژنومیک برخی از آنها در نزدیکی موقعیت ژنومیک گیرنده های میو و کاپای اپیوئیدیست و احتمال ارتباط عملکردی آنها با یکدیگر را مطرح می کند. علاوه بر تسریع اختتام سیگنالینگ اپیوئیدی، شواهدی مبنی بر تداخل RGS ها در روند غیر حساس شدن، اینترنالیزاسیون، استفاده مجدد (Recycling) و تجزیه (Degradation) گیرنده وجود دارد و به عنوان یک رابط احتمالی بین تحمل حاد و تحمل مزمن مطرح شده اند [٤٦].

RGS4 با تسریع فعالیت GTPase پروتئین Gi/o زمان سیگنالینگ مهاری اپیوئیدی را کاهش می دهد و لذا افزایش بیان آن می تواند به تحمل اپیوئیدی بیانجامد. افزایش بیان RGS4 ، غیرفعال شدن جریان یونی پتاسیم ناشی از سیگنالینگ اپیوئیدی (GIRK) را تسریع نموده است. RGS4 در درد نوروپاتیک تا ۲۳۰ درصد افزایش بیان نشان داده است [۲۹،٤٥،٤٦]. سیگنالینگ اپیوئیدی میو و

کاپا در سلولهای محیط کشت و بافتهای عصبی مغز منجر به افزایش بیان ژن و عملکرد RGS4 می شود، این یافته یک مکانیسم فیدبک منفی را نشان می دهد [٤٦].

شواهدی مبنی بر اثر استرس و گلوکوکورتیکوئید ها بربیان RGS4 برای القاء تغییرات درفعالیت سلولهای عصبی PVN در هیپوتالاموس ، هیپوفیز و LC بدست آمده است. بر این مبنا، بیان RGS4 در هیپوتالاموس و هیپوفیز در اثر گلوکوکورتیکوئیدها حین استرس مزمن کاهش یافته، بنابر این سیگنالینگ پروتئینGi/o تشدید شده و کاهش عملکرد cAMP را موجب می شود ومثلا قادر است اثر CRF که از طریق سیگنالینگ Gs و افزایش فعالیت cAMP بروز می کند را کاهش دهد که خود مکانیسمی برای اثر فیدبک منفی کورتیزول بر هیپوفیز فراهم می کند [٣٤].

اکثر قریب به اتفاق اعضای خانواده RGS بر سیگنالینگ Gi/o مؤثر هستند اما نوع RGS2 مستقیما در کاهش سیگنالینگ Gs و فعالیت انواع ٣، ٥ و ٦ آنزیم آدنیلیل سیکلاز دارای اهمیت است [٤١،٤٨-٥٠]. نشان داده شده که RGS2 در جواب به سیگنالهای تحریکی مولد پلاستیسیته نورونهای مغز به سرعت دچار تنظیم افزایشی می شود [٣٠] و معلوم شده که RGS2 به همراه RGS4 نه فقط در سیگنالینگ حاد اپیوئیدی بلکه به عنوان یک مدولاتور عملی در ایجاد تحمل نقش دارند [٤٦]. از طرفی حذف این ژن بصورت حیوانات ترانس ژنیک منجر به تغییراتی در رفتارهای استرسی می شود [٤٠،٤٤].

همانگونه که مطرح شد نظر به سیگنالینگ مهاری و ضد دردی اپیوئیدها از طریق Gi/o و اثر تحریکی و هایپرآلژزیک آنها از طریق Gs، احتمال قوی دخالت مسیر Gs در ایجاد تحمل و تغییرات پلاستیک نورونها و با توجه به اهمیت RGS4 و RGS2 (به ترتیب) در سیگنالینگهای Gi/oو Gs و پلاستیسته نورونی و اثر عوامل استرسی بر تغییر بیان ژنی RGS ها، به نظرمی رسد که اولاً، اثر تجویز دوزهای فوق العاده ناچیز مورفین با اثر هایپرآلژزیک طولانی مدت خود، باعث تغییردر بیان ژن RGS ها بویژه RGS4 و RGS2 در جهت تعدیل سیگنالینگ تحریکی پروتئینهای G ایجاد شود؛ ثانیاً، بخشی از اثر احتمالی استرس مزمن بر مهار تحمل، با تغییرات تنظیمی در بیان ژنی RGS ها بویژه RGS4 و RGS2 اما اینبار درجهت افزایش سیگنالینگ مهاری و کاهش سیگنالینگ تحریکی پروتئینهای G همراه باشد.

اپیوئیدها با اثر بر مسیر انتقال درد بویژه دریچه های کنترل آن، مانند قطعه کمری نخاع و بویژه پروژکشن نورونهای رله کننده درد در بخش پشتی نخاع باعث مهار درد می گردند [٥١] و تحمل به اثر ضد دردی و یا مهار این تحمل بدلیل استرس ناشی از درد مزمن با تغییراتی در این مسیر همراه بوده است [٨،٥٢] منطقی است که اثرات ناشی از استرس مزمن بر بیان عوامل تنظیمی پروتئینهای G جفت شونده به گیرنده های اپیوئیدی نیز در این مکان مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

با توجه به مطالب ذکر شده اهداف مطالعه حاضر مشتمل هستند بر:

۱) بررسی اثر استرس مزمن بر آستانه درد.

۲) مقایسه مکانیسم اثر احتمالی استرس مزمن بر آستانه درد و هایپرآلژزیای ناشی از ULD مرفین.

۳) بررسی نقش محور HPA در بروز اثرات احتمالی استرس مزمن بر آستانه درد.

٤) بررسی احتمال مداخله استرس مزمن با هایپرآلژزیای ناشی از دوز فوق العاده ناچیز مورفین.

٥) بررسی نقش محور HPA در بروز اثر احتمالی استرس مزمن بر هایپرآلژزیای ناشی از دوز فوق العاده ناچیز مورفین (سیگنالینگ Gs).

٦) بررسی تغییر در بیان ژن RGS2 دراثر استرس مزمن و لذا احتمال مداخله ملکولی استرس مزمن بر سیگنالینگ Gs در بخش پشتی نخاع کمری موش صحرایی.

۷) بررسی تغییر در بیان ژن RGS4 دراثر استرس مزمن و لذا احتمال مداخله ملکولی استرس مزمن بر سیگنالینگ Gi/o در بخش پشتی نخاع کمری موش صحرایی.

۸) بررسی احتمال تاثیر ملکولی تجویز دوز فوق العاده ناچیز مورفین بر سیگنالینگ Gs از طریق تغییر در بیان ژن RGS2 در بخش پشتی نخاع کمری موش صحرایی.

۹) بررسی احتمال تاثیر ملکولی تجویز دوز فوق العاده ناچیز مورفین بر سیگنالینگ Gi/o از طریق تغییر در بیان ژن RGS4 در بخش پشتی نخاع کمری موش صحرایی.

فصل دوم

(کلیات)

پیش گفتار

سازمان بهداشت جهانی از ۱۵ سال پیش، مورفین را به‌عنوان درمان انتخابی مولد دیدردی برای دردهای متوسط تا شدید سرطانی توصیه نمود. اما عوارض ناشی از مصرف طولانی با مورفین نظیر تحمل و وابستگیهای جسمی روانی، کاربرد این داروها را محدود نموده است. تحمل و هایپرآلژزیا نیز به‌عنوان نمودهایی از Plasticity هستند. چنانچه مشخص شده، Plasticity واژه‌ای است برای تغییرات تثبیت شده در سیستم عصبی. تغییرات در ساختمان نورونی، ارتباطات بین نورونی و تبدیلات کمی و کیفی نوروترانسمیترها، گیرنده‌ها و کانال‌های یونی منجر به تغییر عملکرد نورون‌ها در مسیر های عصبی منجمله درد می‌شود و حتی می‌توانند مثلا به‌طور ناخواسته در جهت کاهش عملکرد سیستم درونی مهاری درد (Body's own pain inhibition) در بدن عمل کرده و باعث افزایش درد گردد. Plasticity ایجادشده می‌تواند باعث طیفی از تغییرات کوتاه‌مدت از چند دقیقه تا ساعت و یا تغییرات درازمدت و حتی دایمی گردد [۵۳].

بیولوژی تحمل در بسیاری وجوه مشابه مکانیسم‌های تولید و استمرار دردهای پاتولوژیک می‌باشد [۳،۵۳].

عوامل استرسی مزمن و آسیب رسان همچون خود درد [۸،۹]، استرسهای مزمن غیر آسیب رسان نظیرانواع تنشهای روانی مثل مشاهده مستقیم زجر دیدن هم نوعان یا شنای اجباری حیوان، محدودیت حرکتی، و نظایر آن نیز قادرند از بروز تحمل به اثر آنالژزیای مورفین پیشگیری نمایند. یافتن مکانیسمی که استرس قادر است بکمک آن تغییرات پلاستیک را در بروز تحمل را در جهت مهار آن تغییر دهد، ضمن روشن تر نمودن فیزیولوژی استرس ممکن است کاربردهای قابل توجهی در توسعه بکارگیری اپیوئیدها در درمان دردها داشته باشد.

برای ورود به موضوع پژوهش حاضر در ارتباط با بررسی اثر استرس مزمن بر سیگنالینگ پروتئینهای G (که در بیولوژی القاء هایپرآلژزیا توسط مرفین و بروز تحمل نیز مطرح می باشند [٥٤])، به کلیاتی در ارتباط با بیولوژی استرس، درد، اپیوئیدها، هایپرآلژزیا اپیوئیدی، تحمل، برخی از عوامل ملکولی مربوطه و بویژه تنظیم کننده های فعالیت آنزیمی پروتئینهای G (RGS) ها می پردازیم.