مقاله پژوهشی

اثر اوسلتامیویر بر پردردی ناشی از غلظت‌های ناچیز مرفین و تحمل‌زایی به مرفین در مگس سرکه

ملیحه اسکندری[1]، مسعود فریدونی[2]، علی مقیمی[3]

[1] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[2] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[3] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دکتر مسعود فریدونی
E-mail: fereidoni@um.ac.ir

وصول:۹۲/۴/۲۰، اصلاح:۹۲/۶/۹، پذیرش:۹۲/۸/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: مرفین دارای اثرات دوگانه ضددردی و پردردی است که در مگس سرکه دیده شده‌است. از طرفی تجویز مکرر آن باعث ایجاد تحمل به مرفین در پستانداران می‌گردد. تحقیق حاضر به بررسی بروز تحمل به مرفین و اثرات اوسلتامیویر (مهارکننده سیگنالینگ Gs پروتئین ها) در ایجاد تحمل و همچنین پردردی ناشی از غلظت‌های ناچیز مرفین در مگس سرکه، می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش لارو سن ۳ و مگس بالغ تیپ وحشی بکار گرفته شد. به منظور بررسی اثر اوسلتامیویر بر پردردی ناشی از غلظت‌های ناچیز مرفین، اوسلتامیویر (۰/۲ mg/l) و مرفین با غلظت ناچیز به محیط کشت مگس سرکه اضافه شده و پاسخ لارو و بالغ مگس ($n\geq7$) به درد حرارتی به روش *Hot plate* (47°C) و درد شیمیایی ایجاد شده به وسیله کپسایسین و اسیداستیک ۴۰٪ ثبت شد. برای ارزیابی تحمل زایی به مرفین، میزان احساس درد حرارتی لارو با تکرار تجویز مرفین ۰/۱ mg/l و سنجش اثرات ضددردی مرفین ۰/۰۱ mg/l ارزیابی و در بالغین، آزمون مشابهی، با غلظت‌های ۲۰۰ mg/l و ۳۰۰ مرفین انجام شد، همچنین برای بررسی مکانیسم تحمل به مرفین، آزمون با تجویز اوسلتامیویر انجام شد.

یافته‌ها: در مگس سرکه، تحمل زایی به اثرات ضددردی مرفین مشابه پستانداران رخ می‌دهد. نتایج نشان داد که تجویز مکرر مرفین، اثرات ضددردی دارو را در حشره کاهش داد ($p<0.001$). اوسلتامیویر، توانست تحمل به مرفین و پردردی ناشی از مرفین با غلظت‌های ناچیز را، در هر دو مدل درد حرارتی و درد شیمیایی در لارو و بالغ مگس کاهش دهد ($p<0.01$).

نتیجه‌گیری: در مگس سرکه، مشابه جوندگان سیستم‌های اپیوئیدی در تعدیل درد درگیر هستند، از آن جایی که پردردی مرفین با کمک G پروتئین تحریکی انجام می‌شود و اوسلتامیویر به عنوان آنتاگونیست آن می‌تواند این اثر را کاهش دهد، مشاهده اثر اوسلتامیویر در تخفیف تحمل به مرفین، احتمال درگیری G پروتئین تحریکی در بروز تحمل به مرفین را نیز برمی‌انگیزد.

واژه‌های کلیدی: *درد، تحمل، مرفین، اوسلتامیویر (Oseltamivir)، مگس سرکه (Drosophila melanogaster).*

مقدمه

مرفین داروی ارزشمندی است که عمدتاً از آن برای تسکین دردهای حاد و شدید استفاده می‌شود (۱)، مطالعات گوناگون حاکی از آنند که در پستانداران همچون موش صحرایی دوزهای فزاینده مرفین، اثر ضددردی و دوزهای فوق العاده ناچیز آن اثر پردردی دارد (۲). اثر ضددردی این دارو با اثر بر گیرنده‌های اپیوئیدی کوپل شونده با G پروتئین‌ها (۳) و اثر پردردی آن احتمالاً از طریق فعال کردن Gαs اعمال می‌گردد (٤)، اثرات دوگانه مرفین در لارو و بالغ مگس سرکه مشابه پستانداران گزارش شده است و مطالعات نشان داده اند که احساس درد حرارتی و شیمیایی در مگس سرکه، با افزودن مرفین به محیط کشت این حشره تغییر می‌یابد. تحقیقات مؤید آنند که مرفین با غلظت‌های بالاتر از mg/l ۰/۰۱ در لارو و در غلظت‌های بیش از mg/l ۲۰۰ در بالغین اثر بی‌دردی اعمال می‌کند. همچنین مرفین در غلظت‌های فوق‌العاده ناچیز (mg/l ۰/۰۰۰۱) اثر پردردی دارد و احساس درد را افزایش می‌دهد. احتمالاً اثر ضددردی مرفین از طریق گیرنده‌های اپیوئیدی μ در مگس که مشابه گیرنده‌های μ پستانداران است، اعمال می‌گردد (۵). مطالعات پیشین نشان دادند اثرات پردردی مرفین توسط اسلتامیویر (Oseltamivir، مهارکننده سیگنالینگ Gs پروتئین‌ها) مشابه نالوکسان، زدوده می‌شود (٦)، اوسلتامیویر (Tamiflu)، یکی از داروهای ضدویروس شناخته شده‌است که در درمان بیماری‌های ویروسی مانند آنفلوانزا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷)، این ماده قادر به مهار اثرات پردردی اپیوئیدها نیز می‌باشد. زمانی که گیرنده‌های اپیوئیدی پستانداران، به مدت طولانی در معرض اپیوئیدها قرار گیرند، وابستگی و تحمل به اثر بی‌دردی مرفین ایجاد می‌شود. در تحمل اپیوئیدی، اثر ضددردی یک دوز مشخص از مرفین کاهش می‌یابد و برای رسیدن به همان اثر بی‌دردی اولیه باید مرفین در مقادیر بالاتری مصرف گردد (۸). با توجه به شباهت‌های فیزیولوژیک بین مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) و پستانداران و نکات اخلاقی مطرح شده در ارزیابی درد بر روی پستانداران، مگس سرکه به عنوان مدل جانوری مناسبی در بررسی‌های درد و اثرات داروها بجای پستانداران به کار گرفته می‌شود (۹). در روش‌های بررسی درد در مگس سرکه رفتارهای اجتنابی جانور در مقابل محرک‌های آسیب رسان حرارتی، شیمیایی و... قابل اندازه گیری و سنجش است. مطالعات نشان داده‌اند که در مدل درد حرارتی (Hot plate)، افزایش دما و در مدل درد شیمیایی، افزایش غلظت ماده شیمیایی مانند اسیداستیک، باعث افزایش پاسخ دردزا در حشره می‌گردد (۹).

کانال Painless مگس سرکه به عنوان گیرنده هومولوگ کانال‌های وانیلوئیدی پستانداران (۱۰) در نورون های تیپ II (dendritic arborization) در اپیدرم مگس سرکه (۱۱,۱۲) بیان شده و در انتقال درد حرارتی و شیمیایی به مراکز عصبی مربوطه در مغز مگس نقش دارد (۱۳و۵). اطلاعات زیادی در مورد نحوه بروز پردردی ناشی از غلظت‌های ناچیز مرفین در حشرات وجود ندارد. در این تحقیق به منظور بررسی اثر پردردی ناشی از غلظت‌های ناچیز مرفین در محیط کشت مگس سرکه و شباهت‌های احتمالی آن با مکانیسم اثر پردردی دوزهای ناچیز مرفین در پستانداران، از اوسلتامیویر به عنوان مهارکننده سیگنالینگ Gs پروتئین‌ها استفاده گردید و پاسخ مگس سرکه در برابر حرارت و مواد شیمیایی آسیب رسان مانند اسیداستیک، در آزمایشی که اوسلتامیویر و مرفین با غلظت ناچیز همزمان تجویز شدند مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین در این پژوهش، با تکرار تجویز مرفین در محیط کشت لارو و بالغ حشره، بروز پدیده احتمالی تحمل به اثرات بی‌دردی مرفین در مگس سرکه بررسی گردید. نحوه اثر اوسلتامیویر در این آزمایشات، می‌تواند ما را به شناخت عوامل و مکانیسم‌های دخیل در تحمل به اثر بی‌دردی مرفین و همچنین اثر پردردی آن در مگس سرکه و شناخت شباهت‌های مکانیسمی بیشتری

بین این حشره و پستانداران نزدیک‌تر کرده و چنانچه این اثرات در مگس سرکه قابل مقایسه با پستانداران باشد، بتوان ادامه مطالعات مکانیسمی درد و بی‌دردی را در این حشره پیشنهاد نمود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این پژوهش، از لارو سن ۳ و بالغ مگس سرکه تیپ وحشی استفاده شد، حشرات در انکوباتور با دمای ۲۷ °C و داخل ظروف شیشه ای محتوی محیط کشت آگار پرورش داده شدند. برای تهیه محیط کشت آگار از آرد، گلوکز، مخمر، آگار، اسیدآسکوربیک، اسیدپروپیونیک و آب استفاده گردید. بعد از ٦ روز، لارو سن ۳ و در پایان ۱۰ روز، مگس بالغ به منظور آزمایش قابل استفاده است. نظر به داده‌های اولیه، حداقل تعداد مگس یا لارو که به صورت تصادفی از بین نمونه ها انتخاب شده بودند در هر زیر گروه آزمایشی ۷ در نظر گرفته شد.

سنجش درد

به‌منظور سنجش درد حرارتی از Hot plate استفاده گردید که در این روش تعداد حرکات پیچ و تابی لارو و مدت زمان استقرار مگس بالغ روی صفحه داغ (زمان تاخیر) در دمای ٤٧ °C ثبت شد. همچنین برای سنجش درد شیمیایی، تعداد حرکات پیچ و تابی جانور با افزودن ماده شیمیایی آسیب رسان مانند : اسیداستیک یا کپسایسین به محیط کشت آنها ثبت گردید.

گروه‌های آزمایشی

در این مطالعه ابتدا گروه کنترل در نظر گرفته شد. گروه کنترل شامل پنج زیر گروه بود ($n\geq7$) که در آن‌ها حیوانات در معرض غلظت‌های ناچیز مرفین (۰/۰۱ mg/l و ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰) محلول در محیط کشت قرار گرفتند، بدین صورت که متناسب با حجم محیط کشت، مرفین توزین و در محیط کشت حل و غلظت سازی شد ، سپس پاسخ دردی آن‌ها توسط سنجش‌های درد حرارتی و شیمیایی بررسی گردید.

به‌منظور بررسی اثر اوسلتامیویر بر بروز پردردی ناشی از غلظت‌های ناچیز مرفین در لارو مگس سرکه، در گروه آزمایشی اول اوسلتامیویر ۰/۲ mg/l در پنج زیر گروه به همراه هر کدام از غلظت‌های ناچیز مرفین (mg/l ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰) به ظرف‌های محتوی لاروهای مگس سرکه اضافه گردید و سپس پاسخ لاروها به درد حرارتی توسط روش Hot plate سنجش شد. همچنین برای سنجش پاسخ درد شیمیایی در لاروها، دو زیر گروه بزرگ در نظر گرفته شد که به ظرف‌های حاوی محیط کشت آن‌ها همانند سنجش درد حرارتی، اوسلتامیویر به همراه هر یک از غلظت‌های ناچیز مرفین اضافه گردید و سپس به محیط کشت‌های یک زیر گروه بزرگ اسید استیک ٤٠٪ و به دیگری محلول کپسایسین ۰/۰۱ mg/l به عنوان عامل شیمیایی ایجاد کننده درد اضافه شد و تعداد حرکات پیچ و تابی لاروها بررسی گردید.

برای بررسی اثر اوسلتامیویر بر بروز پردردی ناشی از غلظت‌های ناچیز مرفین در مگس سرکه بالغ، گروه آزمایشی دوم با پنج زیر گروه در نظر گرفته شد که اوسلتامیویر ۰/۲ mg/l به همراه هر کدام از غلظت‌های ناچیز مرفین (۰/۰۱ mg/l و ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰) به ظرف‌های محتوی مگس‌های سرکه بالغ اضافه گردید و سپس پاسخ آن‌ها به درد حرارتی توسط روش Hot plate سنجش شد.

برای بررسی پدیده تحمل به اثر بی دردی مرفین در لارو مگس سرکه در گروه آزمایشی سوم، پنج زیر گروه در نظر گرفته شد که به ترتیب در آن‌ها لاروها در محیط کشت خود به مدت ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ ساعت در معرض مرفین با غلظت ۰/۱ mg/l قرار گرفتند پس از آن جهت آزمون درد در حضور مرفین هر کدام از زیر گروه‌ها به مدت نیم ساعت از مرفین با غلظت ۰/۰۱ mg/l محلول در محیط کشت تغذیه کردند و سپس میزان درد حرارتی به روش Hot plate سنجش گردید سپس بار دیگر همین آزمون در حضور اوسلتامیویر ۰/۲ mg/l به عنوان

مهارکننده سیگنالینگ Gs پروتئین‌ها انجام گردید بدین صورت که به محیط کشت هر کدام از پنج زیر گروه علاوه بر مرفین، اوسلتامیویر هم همزمان با آن افزوده شد و پس از آن آزمون درد حرارتی در حضور مرفین mg/l ۰/۰۱ سنجش شد. یافته‌های حاصل از این زیر گروه‌ها با گروه کنترلی مقایسه گردید که در آن، آزمون درد حرارتی روی لاروهایی انجام گرفت که فقط نیم ساعت در معرض مرفین mg/l ۰/۰۱ محلول در محیط کشت خود قرار داشتند.

گروه آزمایشی چهارم نیز جهت بررسی پدیده ی تحمل به اثر بی دردی مرفین در مگس سرکه بالغ در نظر گرفته شد. این گروه نیز شامل پنج زیر گروه بود که در هر کدام از آن‌ها به ترتیب مگس های سرکه بالغ به مدت ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ روز در محیط کشت حاوی مرفین با غلظت mg/l ۲۰۰ قرار گرفتند ، سپس جهت آزمون درد در حضور مرفین هر کدام از زیر گروه‌ها به مدت ۳ ساعت از مرفین با غلظت mg/l ۳۰۰ محلول در محیط کشت تغذیه کردند و پس از آن میزان درد حرارتی به روش Hot plate سنجش گردید سپس بار دیگر همین آزمون در حضور اوسلتامیویر mg/l ۰/۲ به عنوان مهارکننده سیگنالینگ Gs پروتئین‌ها انجام گردید بدین صورت که به محیط کشت هر کدام از پنج زیر گروه علاوه بر مرفین، اوسلتامیویر هم همزمان با آن افزوده شد و آزمون درد حرارتی در حضور مرفین mg/l ۳۰۰ سنجش شد. یافته‌های حاصل از این زیر گروه‌ها با گروه کنترلی مقایسه گردید که در آن آزمون درد حرارتی روی مگس های بالغی انجام گرفت که فقط ۳ ساعت در معرض مرفین mg/l ۳۰۰ محلول در محیط کشت خود قرار داشتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده اند. تجزیه و تحلیل های آماری با نرم افزار GraphPad Prism 5 صورت گرفت. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و میانگین داده‌ها با آزمون $T_{student}$ با حداقل سطح معنی‌داری ($p<0.05$) مقایسه شدند. نمودارها نیز با نرم افزار آماری Microsoft Excel 2007 رسم شدند.

یافته‌ها

اثر اوسلتامیویر **بر پردردی ایجاد شده توسط غلظت‌های ناچیز مرفین طی سنجش درد حرارتی در لارو مگس سرکه:**

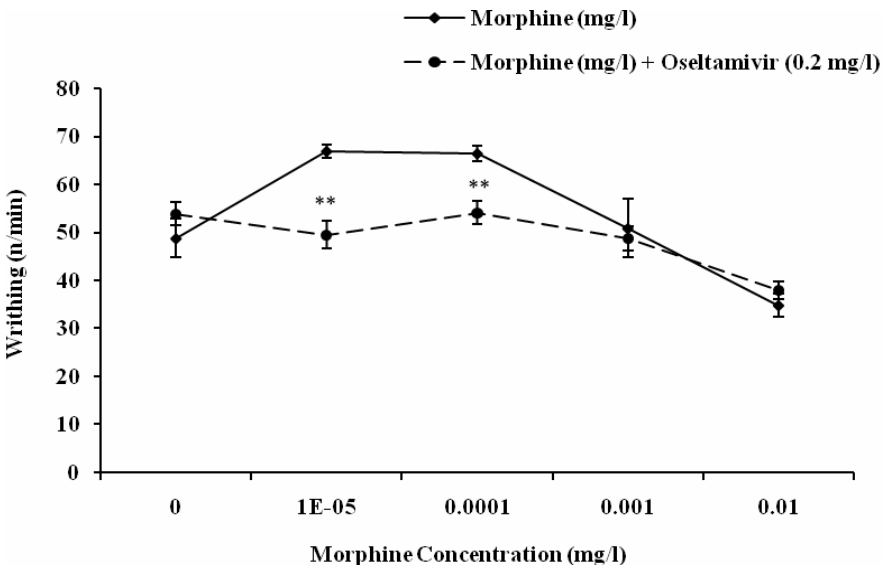
تجویز اوسلتامیویر با غلظت mg/l ۰/۲ در محیط کشت منجر به کاهش معنی‌دار تعداد حرکات لاروها در زیر گروه‌های دریافت کننده مرفین با غلظت mg/l ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۱ طی آزمون درد حرارتی Hot plate گردید ($p<0.01$). اما تجویز اوسلتامیویر و عدم تجویز آن تفاوت معنی‌داری در زیر گروه‌های دریافت کننده غلظت-های mg/l ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ مرفین ایجاد نکرد (شکل ۱A).

اثر اوسلتامیویر بر پردردی ایجاد شده توسط غلظت‌های ناچیز مرفین طی سنجش درد شیمیایی ایجاد شده با اسیداستیک ٤۰ درصد در لارو مگس سرکه :

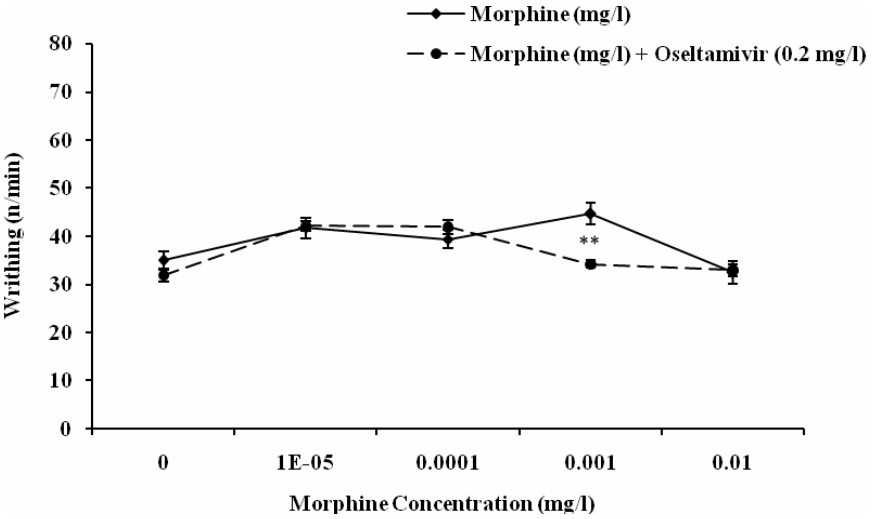
نتایج نشان دادند که تجویز اوسلتامیویر (mg/l ۰/۲) به محیط کشت لارو منجر به کاهش معنی‌داری در تعداد حرکات لاروها در غلظت mg/l ۰/۰۰۱ مرفین در مقایسه با گروه کنترل دریافت کننده فقط مرفین mg/l ۰/۰۰۱ شده‌است ($p<0.01$). اما تعداد حرکات لاروها در اثر درد شیمیایی ناشی از اسید استیک ٤۰٪ در غلظت‌های mg/l ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۱ مرفین تفاوت معنی‌داری در حضور اوسلتامیویر در محیط کشت آن‌ها و یا عدم حضور آن، نشان ندادند (شکل ۱B).

اثر اوسلتامیویر بر پردردی ایجاد شده توسط غلظت‌های ناچیز مرفین طی سنجش درد شیمیایی ایجاد شده با محلول کپسایسین mg/l ۰/۰۱ در لارو مگس سرکه :

یافته‌های حاصل از آزمایش نشان دادند که تجویز اوسلتامیویر (mg/l ۰/۲) به محیط کشت لارو منجر به



شکل ۱A) اثر اوسلتامیویر بر پردردی ایجاد شده توسط غلظت‌های ناچیز مرفین در لارو مگس سرکه طی سنجش درد حرارتی. تجویز اوسلتامیویر (۰/۲ mg/l)، باعث کاهش پردردی ایجاد شده بوسیله غلظت‌های ناچیز مرفین (۰/۰۰۰۱ mg/l و ۰/۰۰۰۰۱) در مقایسه با گروه کنترل (لاروهای دریافت کننده مرفین به تنهایی) شده‌است. نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده است، (**$p<0.01$ در مقایسه با گروه مرفین (mg/l)) و (n=7).

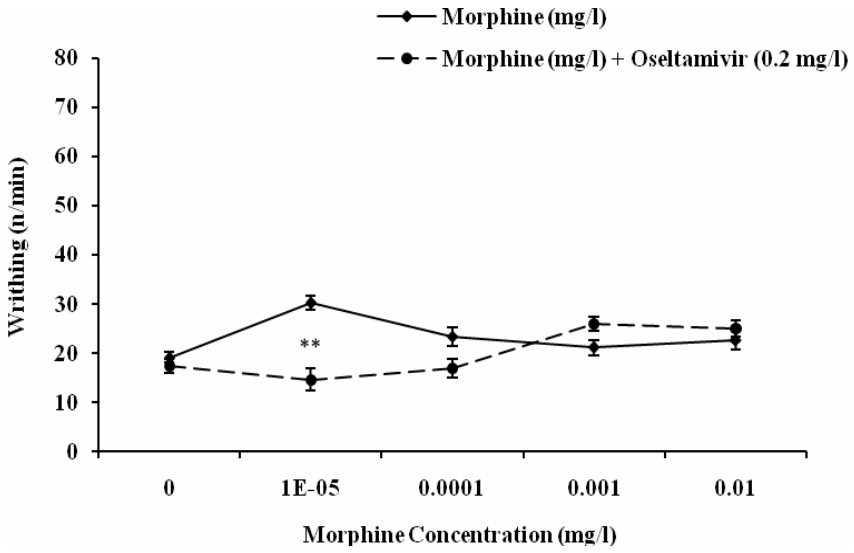


شکل ۱B) اثر اوسلتامیویر بر پردردی ایجاد شده توسط غلظت‌های ناچیز مرفین طی سنجش درد شیمیایی ناشی از اسیداستیک ۴۰٪ در لارو مگس سرکه. تجویز اوسلتامیویر (۰/۲ mg/l) باعث کاهش پردردی ایجاد شده توسط غلظت فوق العاده ناچیز ۰/۰۰۱ mg/l مرفین در مقایسه با گروه کنترل (لاروهای دریافت کننده مرفین به تنهایی) شده است. نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده است، (**$p<0.01$ در مقایسه با گروه مرفین (mg/l)) و (n=7).

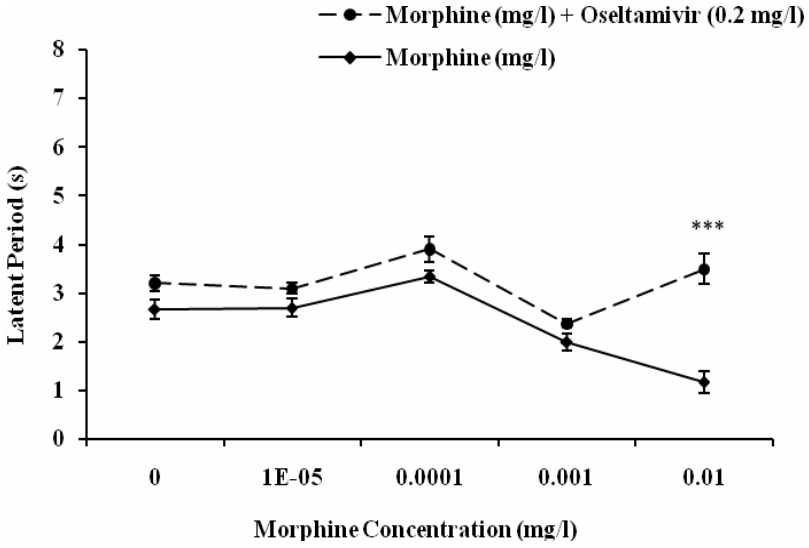
کاهش معنی‌داری در تعداد حرکات لاروها در اثر درد شیمیایی ایجاد شده از محلول کپسایسین در زیر گروه دریافت کننده غلظت ۰/۰۰۰۰۱ mg/l مرفین در مقایسه با گروه کنترل دریافت کننده فقط مرفین ۰/۰۰۰۰۱ mg/l شده است ($p<0.01$). اما تعداد حرکات لاروها در غلظت-های ۰/۰۰۰۱ mg/l، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ مرفین تفاوت معنی-داری در حضور اوسلتامیویر در محیط کشت آن‌ها و یا عدم حضور آن، نشان ندادند (شکل ۱C).

اثر اوسلتامیویر بر پردردی ایجاد شده توسط غلظت‌های ناچیز مرفین طی سنجش درد حرارتی در مگس سرکه بالغ:

تجویز اوسلتامیویر با غلظت ۰/۲ mg/l در محیط



شکل ۱C) اثر اوسلتامیویر بر پردردی ایجاد شده توسط غلظت‌های ناچیز مرفین طی درد شیمیایی ایجاد شده با محلول کپسایسین ۰/۰۱ mg/l در لارو مگس سرکه. تجویز اوسلتامیویر (۰/۲ mg/l) باعث افزایش حرکات پیچ و تابی لارو و بدنبال آن کاهش پردردی ایجاد شده به وسیله غلظت فوق‌العاده ناچیز ۰/۰۰۰۰۱ mg/l مرفین در مقایسه با گروه کنترل (لاروهای دریافت کننده مرفین به تنهایی) شده‌است. نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده است، (**p<0.01 در مقایسه با گروه مرفین (mg/l)) و (n=7).



شکل ۱D) اثر اوسلتامیویر بر پردردی ایجاد شده توسط غلظت‌های ناچیز مرفین طی سنجش درد حرارتی (Hot plate) در مگس بالغ. تجویز اوسلتامیویر (۰/۲ mg/l) باعث کاهش پردردی ایجاد شده به وسیله غلظت ناچیز ۰/۰۱ mg/l مرفین و به دنبال آن افزایش زمان استقرار مگس سرکه بالغ روی صفحه داغ در مقایسه با گروه کنترل (لاروهای دریافت کننده مرفین به تنهایی) شده است. نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده است، (***p<0.001 در مقایسه با گروه مرفین (mg/l)) و (n=10).

کشت منجر به کاهش معنی‌دار مدت زمان استقرار مگس سرکه بالغ روی صفحه داغ در دمای ۴۷ °C در زیر گروه دریافت کننده مرفین با غلظت ۰/۰۱ mg/l طی آزمون درد حرارتی Hot plate گردید ($p<0.01$). اما تجویز اوسلتامیویر و عدم تجویز آن تفاوت معنی‌داری در زیر گروه‌های دریافت کننده غلظت‌های ۰/۰۰۰۰۱ mg/l، ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۱ مرفین ایجاد نکرد (شکل ۱D).

تحمل به اثر بی‌دردی مرفین در لارو مگس سرکه:

نتایج حاصل از آزمون درد حرارتی نشان دادند که بعد از تجویز مرفین (۰/۰۱ mg/l) تعداد حرکات پیچ و

تابی لاروهایی که به ترتیب به مدت ۳، ٤ و ٥ ساعت در معرض مرفین (۰/۱ mg/l) قرار داشتند در مقایسه با لاروهایی که در معرض مرفین در محیط کشت خود نبودند، افزایش یافت ($p<0.01$)، این بدان معنی است که تجویز مزمن مرفین سبب ایجاد تحمل به اثر بی‌دردی مرفین در لاروهای مگس سرکه می‌گردد. همچنین نتایج حاصل از تجویز همزمان اوسلتامیویر (۰/۲ mg/l) به همراه مرفین (۰/۱ mg/l) نشان داد که تجویز اوسلتامیویر و مرفین به صورت مکرر، در مقایسه با تجویز فقط مرفین باعث کاهش اثرات تحمل زایی مرفین شده و تعداد حرکات پیچ و تابی لارو را کاهش می‌دهد ($p<0.05$) (شکل ۲).

تحمل به اثر بی‌دردی مرفین در مگس سرکه بالغ

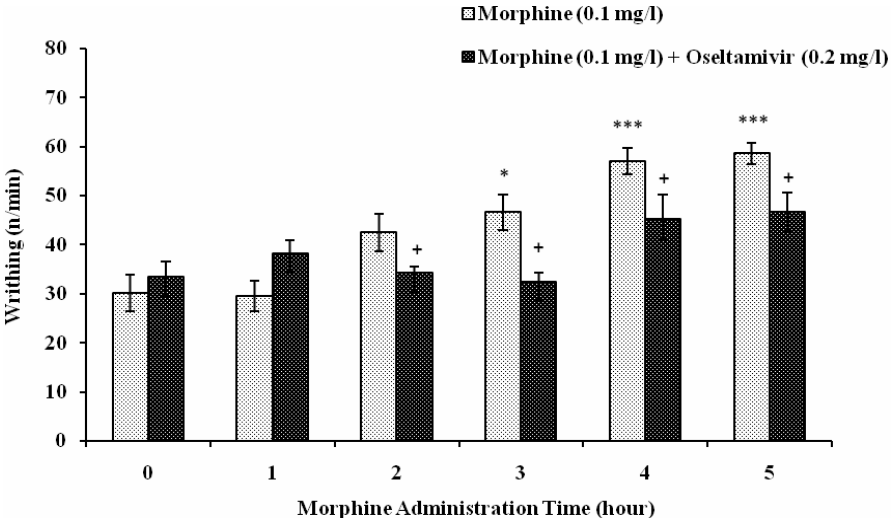
مقایسه نتایج حاصل از آزمون درد حرارتی ناشی از تجویز مرفین (۳۰۰ mg/l)، بین زیر گروه‌هایی از مگس سرکه بالغ که به ترتیب ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ روز متوالی در معرض مرفین (۲۰۰ mg/l) در محیط کشت خود قرار داشتند با زیر گروه بدون دریافت مرفین به صورت مزمن نشان داد اثر ضد دردی مرفین در زیرگروه‌هایی که به صورت مزمن در معرض مرفین قرار داشتند کاهش یافت به طوری که زمان استقرار مگس سرکه بالغ روی Hot plate کاهش یافت ($p<0.001$) که بیانگر تحمل به اثر بی‌دردی مرفین است. همچنین نتایج حاصل از تجویز همزمان اوسلتامیویر (۰/۲ mg/l) به همراه مرفین (۲۰۰ mg/l) نشان داد که تجویز اوسلتامیویر و مرفین به صورت مکرر، در مقایسه با تجویز فقط مرفین باعث کاهش اثرات تحمل زایی مرفین شده و در نتیجه مدت زمان استقرار مگس بالغ روی صفحه داغ افزایش یافت ($p<0.05$) (شکل ۳).

بحث

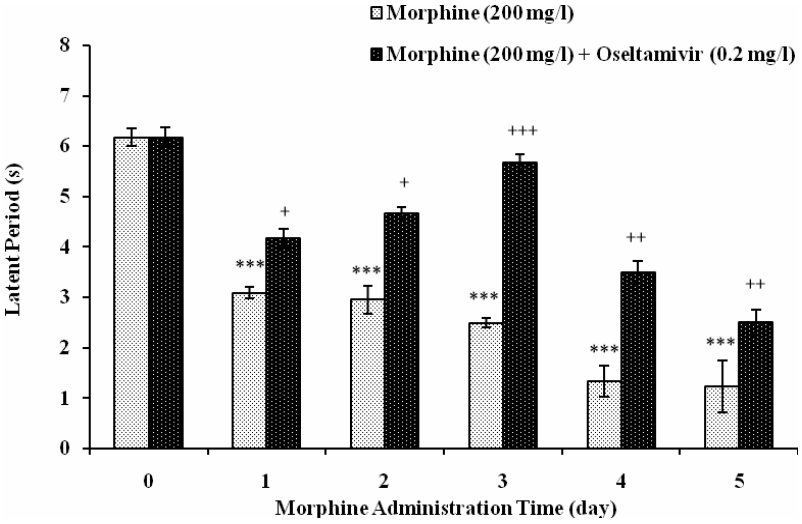
مرفین داروی ضددرد شناخته شده‌ای است که تجویز آن در جوندگان می‌تواند دو اثر بی‌دردی و پردردی (در دوزهای فوق‌العاده ناچیز) را به همراه داشته باشد، در حشرات نیز به طور مشابه اثرات ذکر شده مشاهده شده‌است، افزایش غلظت مرفین در محیط کشت لارو و بالغ مگس سرکه منجر به کاهش احساس درد و درنتیجه کاهش تعداد حرکات پیچ و تابی لارو و افزایش مدت زمان استقرار بالغین روی صفحه داغ در دمای ٤٧ °C یا در برابر مواد شیمیایی آسیب رسان می‌گردد (۹). مشابه پستانداران، اثرات ضددردی مرفین در مگس با فعال شدن گیرنده‌های اپیوئیدی μ در سلول های Schneider-2 (۱۳) و از طریق سیگنالینگ Gs پروتئین‌ها (١٤) اعمال می‌شود. در پستانداران، مرفین در دوزهای فوق‌العاده ناچیز اثرات معکوس داشته و باعث پردردی می‌شود (٤).

در این مطالعه اثرات پردردی مرفین در مدل مگس سرکه به منظور بررسی نحوه ی پاسخ سیستم عصبی مگس به مرفین و شباهت مکانیسم عمل آن با پستانداران مورد بررسی قرار گرفت. در مگس سرکه نیز اثر پردردی مرفین در غلظت‌های بسیار ناچیز مرفین (محدوده ۰/۰۰۰۰۱ mg/l و ۰/۰۰۰۱)، در مدل درد حرارتی و مدل درد شیمیایی ایجاد شده با اسید استیک مشاهده شد (شکل ۱) که می‌تواند خود تأییدی برای ادامه مطالعات مکانیسمی این اثر در حشرات باشد، فرض بر این است که حداقل بخشی از اثر پردردی مرفین در جوندگان مربوط به فعال شدن گیرنده‌های اپیوئیدی، Gαs، پروتئین کیناز C و کانال‌های کلسیمی نوع L پردردی می‌باشد. پردردی مرفین تا حدودی بوسیله اوسلتامیویر (مهار کننده Gs پروتئین‌ها) مهار می‌شود (۱۵). اوسلتامیویر ماده‌ای با خاصیت ضد ویروسی (آنفلوانزا) است که روی ذرات آزاد شده ویروسی اثر گذاشته و باعث مهار عملکرد ویروس ها می‌گردد (۷)، اوسلتامیویر همچنین می‌تواند فعالیت Gs پروتئین‌ها را مهار کند که در جوندگان منجر به کاهش اثر پردردی مرفین بوده است (١٦).

نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز اوسلتامیویر در لارو مگس سرکه، منجر به کاهش اثر پردردی مرفین



شکل ۲) اثر اوسلتامیویر بر روند ایجاد تحمل به اثر بی‌دردی مرفین در لارو مگس سرکه. افزایش زمان (۲ الی ۵ ساعت) تجویز مرفین ۰/۱ mg/l به محیط کشت لارو مگس سرکه منجر به کاهش فزاینده اثر بی دردی ناشی از تجویز حاد مرفین ۰/۰۱ mg/l شده است و تجویز اوسلتامیویر همراه با مرفین به صورت مکرر طی ۲ الی ۵ ساعت اثرات تحمل زایی مرفین را کاهش داده است. نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده است، (***p<0.001 و *p<0.05 در مقایسه با گروه (۰) دریافت کننده فقط مرفین ۰/۰۱ mg/l)، (+p<0.05 در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده مکرر و حاد مرفین به تنهایی) و (n=7).



شکل ۳) افزایش روزهای متوالی تجویز مرفین ۲۰۰ mg/l به محیط کشت مگس سرکه بالغ منجر به کاهش فزاینده اثر بی‌دردی ناشی از تجویز حاد مرفین ۳۰۰ mg/l شده‌است و تجویز اوسلتامیویر همراه با مرفین به صورت مکرر اثرات تحمل زایی مرفین را کاهش داده‌است. نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده‌است، (***p<0.001 در مقایسه با گروه (۰) دریافت کننده فقط مرفین ۳۰۰ mg/l)، (+++p<0.001، ++p<0.01 و +p<0.05 در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده مکرر و حاد مرفین به تنهایی) و (n=10).

(در دوزهای فوق‌العاده ناچیز) در هر دو مدل درد حرارتی (شکل ۱A) و شیمیایی (شکل ۱B و ۱C) می‌شود، در بالغین نیز این اثرات در مدل درد حرارتی مشاهده گردید (شکل ۱D). با توجه به نتایج، می‌توان احتمال داد که در حشرات مرفین پردردی با مکانیسمی مشابه جوندگان عمل نماید. اطلاعات کافی در مورد مکانیسم رفع پردردی ایجاد شده به وسیله دوزهای ناچیز مرفین از طریق تجویز اوسلتامیویر در حشرات وجود ندارد، اما با توجه به شباهت مکانیسم عمل اپیوئیدها از طریق Gs پروتئین‌ها و گیرنده‌های اپیوئیدی در حشرات با پستانداران (۱۷) به نظر می‌رسد این عمل با مکانیسمی مشابه آنچه در پستانداران رخ می‌دهد از طریق بلوک مسیر سیگنالینگ Gs

پروتئین‌ها در حشرات اتفاق بیفتد . در پستانداران ، مکانیسم پردردی ناشی از دوزهای ناچیز مرفین همچنین می‌تواند به صورت غیر حساس‌سازی گیرنده‌های اپیوئیدی و یا حساس‌سازی سیستم عصبی مرکزی (تحریک گیرنده‌های NMDA و تسهیل درد) باشد. این اثرات به وسیله اوسلتامیویر مشابه نالوکسان بهبود می‌یابد (۱۳).

با توجه به این که گیرنده‌های NMDRA1 و NMDRA2 در سیستم عصبی مگس سرکه وجود داشته و آنالوگ گیرنده‌های NMDA پستانداران می‌باشد (٦)، شاید بتوان پردردی ایجاد شده به وسیله دوزهای ناچیز مرفین در مگس را به تسهیل این گیرنده‌ها نسبت داد. گیرنده-های NMDA مانند (NMDRA1 و NMDRA2) در سطوح پایین در مغز مگس، در تمام مناطق مغزی و در سطوح بالا در تعداد کمی از سلول‌های احاطه کننده اجسام ساقه دار بیان می‌شود و بسیاری از مناطق مغزی مانند پروتوسربروم بیان NMDRA1 را دارند (۱۸،۱۹). بنابراین احتمال دارد که تحریک گیرنده‌های NMDA مانند و حساس‌سازی سیستم عصبی مرکزی مگس بتواند باعث بروز پردردی شود.

تکرار تجویز مرفین در پستانداران باعث بروز تحمل به مرفین و کاهش اثرات این دارو می‌شود (۸)، نتایج این مطالعه، نشان داد که مشابه پستانداران، تحمل زایی به مرفین در حشرات نیز رخ می‌دهد. در این پژوهش با تکرار تجویز مرفین، تحمل به اثر بی دردی مرفین ایجاد شده و اثرات ضددردی مرفین کاهش می‌یابد. زمانی که لارو ٤ یا ٥ ساعت در معرض مرفین ۰/۱ mg/l قرار گرفته و سپس مرفین ۰/۰۱ mg/l دریافت نماید و حیوان بالغ ٤ یا ٥ روز در معرض مرفین ۲۰۰ mg/l قرار گرفته و سپس مرفین ۳۰۰ mg/l را دریافت کند، اثرات ضددردی مرفین ۰/۰۱ mg/l در لارو و ۳۰۰ mg/l در مگس بالغ در مقایسه با گروه کنترل در مدل درد حرارتی کاهش می‌یابد. تجویز اوسلتامیویر همراه با مرفین این کاهش اثر را جبران کرده، اثرات ضددردی مرفین و بنابراین تعداد حرکات پیچ و تابی لارو و زمان استقرار بالغ روی صفحه داغ افزایش می‌یابد (شکل ۲ و ۳). زمانی که گیرنده‌های اپیوئیدی در پستانداران به مدت طولانی در معرض اپیوئیدها قرار گیرند، وابستگی و تحمل به اثر بی-دردی مرفین ایجاد می‌شود. تحمل به مرفین می‌تواند به وسیله درونی شدن گیرنده‌های اپیوئیدی μ و متعاقب آن غیر حساس‌سازی گیرنده اپیوئیدی ایجاد شود، به این صورت که به مدت طولانی در معرض اپیوئیدها قرار گرفتن باعث افزایش فسفریلاسیون گیرنده‌ها به وسیله پروتئین کینازها می‌شود (٤).

تحمل می‌تواند نتیجه‌ای از بیان سیستم‌های تسهیلی درد باشد (۲۰). در حشرات مکانیسم دقیق وابستگی به مرفین مشخص نشده است، ولی با توجه به شباهت گیرنده‌های اپیوئیدی در سلول‌های حشرات با پستانداران، به نظر می‌رسد در حشرات وابستگی به مرفین با مکانیسمی مشابه پستانداران به وسیله درونی شدن گیرنده‌های اپیوئیدی μ رخ دهد. در حشرات تا حدودی وابستگی به مرفین در سلول‌های Sf9 بررسی شده است. به نظر می‌رسد که سلول‌های Sf9 حشرات به عنوان مدل مناسبی برای مطالعه وابستگی به اپیوئیدها باشد، سیستم پیامبر ثانویه cAMP، نقش مهمی در وابستگی به اپیوئید داشته و افزایش آن به عنوان علامتی برای وابستگی به مرفین می‌باشد (۲۱،۲۲).

رفع تحمل‌زایی به مرفین به‌وسیله اوسلتامیویر می-تواند تأییدی بر مکانیسم عمل مرفین و تحریک Gαs پروتئین‌ها باشد. عامل مهار کننده پر دردی مرفین احتمالاً باید قادر به مهار تحمل به مرفین نیز باشد که نتایج ما آن را تأیید کرد. پردردی مرفین حداقل در بخشی با کمک G پروتئین تحریکی انجام می‌شود و اوسلتامیویر اثر آن را کاهش می‌دهد. بنابراین مشاهده اثر اوسلتامیویر در تخفیف تحمل به مرفین احتمال درگیری G پروتئین تحریکی در بروز تحمل به مرفین را بر می‌انگیزد.

نتایج این پژوهش نشان دهنده تشابه مکانیسم ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مرفین و هایپرآلژزیای ناشی از غلظت‌های ناچیز مرفین و دخالت G پروتئین تحریکی در هر دو مکانیسم بوده و همچنین مؤید شباهت عملکرد مرفین در مگس سرکه و پستانداران است. با توجه به شباهت‌های فیزیولوژیک مشاهده شده بین مگس سرکه و پستانداران استفاده از این حشره برای بررسی اثرات ضددردی داروها و مطالعات مکانیسمی درد و بی-دردی پیشنهاد می‌شود.

References

1. Anand KJ, Clark AE, Willson DF, Berger J, Meert KL, Zimmerman JJ, Harrison R, Carcillo JA, Newth CJ. Opioid analgesia in mechanically ventilated children: results from the multicenter Measuring Opioid Tolerance Induced by Fentanyl study. Pediatr Crit Care Med. 2013; 14(1): 27-36.
2. Nagi K, Pineyro G. Regulation of opioid receptor signalling: implications for the development of analgesic tolerance. Mol Brain. 2011; 4: 25.
3. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. Anesthesiology. 2011; 115(6): 1363-81.
4. Esmaeili-Mahani S, Shimokawa N, Javan M, Maghsoudi N, Motamedi F, Koibuchi N, Ahmadiani A. Low-dose morphine induces hyperalgesia through activation of G alphas, protein kinase C, and L-type Ca2+ channels in rats. J Neurosci Res. 2008; 86(2): 471-9.
5. Im SH, Galko MJ. Pokes, sunburn, and hot sauce: Drosophila as an emerging model for the biology of nociception. Dev Dyn. 2012; 241(1): 16-26.
6. Galeotti N, Stefano GB, Guarna M, Bianchi E, Ghelardini C. Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. Pain. 2006; 123(3): 294-305.
7. Smee DF, Julander JG, Tarbet EB, Gross M, Nguyen J. Treatment of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus infections in mice with antiviral agents. Antiviral Res. 2012; 96(1): 13-20.
8. Ingram SL, Macey TA, Fossum EN, Morgan MM. Tolerance to repeated morphine administration is associated with increased potency of opioid agonists. Neuropsychopharmacology. 2008; 33(10): 2494-504.
9. Eskandari M, Fereidoni M, Moghimi A. Concentration dependent effect of morphine, aspirin, capsaicin and chili pepper hydro alcoholic extract on thermal and chemical pain model in fruit fly (Drosophila melanogaster). Physiol Pharmacol. 2011; 14(4): 358-71. (Persian)
10. Tominaga M. Molecular mechanisms of trigeminal nociception and sensation of pungency. Chem Senses. 2005; 1:191-2.
11. Chattopadhyay A, Gilstrap AV, Galko MJ. Local and global methods of assessing thermal nociception in Drosophila larvae. J Vis Exp. 2012; (63): e3837.
12. McKemy DD. Temperature sensing across species. Pflugers Arch. 2007; 454(5): 777-91.
13. Crain SM, Shen KF. Neuraminidase inhibitor, oseltamivir blocks GM1 ganglioside-regulated excitatory opioid receptor-mediated hyperalgesia, enhances opioid analgesia and attenuates tolerance in mice. Brain Res. 2004; 995(2): 260-6.
14. Kreienkamp HJ, Larusson HJ, Witte I, Roeder T, Birgul N, Honck HH, Harder S, Ellinghausen G, Buck F, Richter D.. Functional annotation of two orphan G-protein-coupled receptors, Drostar1 and -2, Drosophila melanogaster and their ligands by reverse pharmacology. J Biol Chem. 2002; 277(42): 39937-43.
15. Kalosaka K, Soumaka E, Politis N, Mintzas AC. Thermotolerance and HSP70 expression in the Mediterranean fruit fly Ceratitis capitata. J Insect Physiol. 2009; 55(6): 568-73.
16. Cheng PKC, Leung TWC, Ho ECM, Leung PCK, Ng AYY, Lai MYY, Lim WWL. Oseltamivir- and

amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1). Emerg Infect Dis. 2009; 15(6): 966-8.
17. Zylicz Z, Krajnik M. Opioid-induce hyperalgesia as a problem in pain management. Mechanisms of onset, diagnosis and treatment. Advances in Palliative Medicine. 2007; 6(1): 37-44.
18. Ueda H, Inoue M, Takeshima H, Iwasawa Y. Enhanced spinal nociception receptor expression develops morphine tolerance and dependence. J Neurosci. 2000; 20(20): 7640-7.
19. Nichols CD. Drosophila melanogaster neurobiology neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. Pharmacol Ther. 2006; 112(3): 677-700.
20. Liu ZH–Hua, Jin WQ, Chen XJ, Shen QX,Chi Zhi-Qiang. Binding affinity to and dependence on some opioids in Sf9 insect cells expressing human μ-opioid receptor. Acta Pharmacol Sin. 2003; 24(9): 859-63.
21. Padi SS, Kulkarni SK. Role of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced hyperalgesia in formalin test. Indian J Exp Biol. 2005; 43(1): 53-60.
22. Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2010. Peptides. 2011; 32(12): 2522-52.

Effect of Oseltamivir on hyperalgesia induced by low concentrations of morphine and morphine tolerance in Drosophila melanogaster

Malihe Eskandari., M.Sc
Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Masoud Fereidoni., Ph.D
Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Ali Moghimi., Ph.D
Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received:11/07/2013**, Revised:**31/08/2013**, Accepted:**08/11/2013

Correspondence author:
Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
E-mail: fereidoni@um.ac.ir

Abstract

Introduction: Morphine has been known as a drug with different paradoxical effects, analgesic and hyperalgesic. On the other hand, repeated morphine administration, induces morphine tolerance in mammals. The aim of recent study is investigating tolerance to morphine in Drosophila melanogaster and the effect of Oseltamivir (an inhibitor of G2 receptors) on hyperalgesia induced by low concentrations of morphine and morphine tolerance.

Materials and methods: In this study, stage 3 of larvae and adult state of wild Drosophila melanogaster were used. For evaluating the effect of Oseltamivir on hyperalgesic effect of low concentration Morphine, Oseltamivir (0.2 mg/l) and low concentrations of morphine were added to media culture. Then behavior of larvae and adults to thermal (using Hot plate, 47˚C) and chemical (capsaicin and acetic acid) pain stimulations were recorded. For morphine tolerance experiments in larvae, repeated morphine administration (0.1 and 0.01 mg/l) was done and their response to thermal pain was evaluated. The same method was used in adults but with other doses of morphine (200 and 300 mg/l). Finally to investigate the mechanism of morphine tolerance, Oseltamivir was administered too.

Results: morphine tolerance was occurred in Drosophila melanogaster similar to mammals. Repeated morphine administration diminished anti nociceptive effects of morphine ($p<0.001$). Oseltamivir reduced morphine tolerance and hyperalgesic effects of low concentration morphine in both pain models (thermal and chemical nociception), ($p<0.01$).

Conclusion: opioid systems can involve pain modulation (hyperalgesia and analgesia) in Drosophila like vertebrates. Our results showed inhibition of excitatory G-protein (Gs) by Oseltamivir, inhibit morphine induced hyperalgesia and this is another confirmation for involvement of excitatory G-proteins in morphine induced tolerance.

Keywords: *Pain, Tolerance, Morphine, Oseltamivir, Drosophila melanogaster*