Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:03 IRST on Sunday February 25th 2018

مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هشتم، شماره اول، بهار ۱۳۸۸، ۱۸-۱۱

کالمودولین اثرات ضددردی مورفین را در موش‌های صحرایی تقویت می‌کند

افروز آذرنگ[۱]، علی شمسی‌زاده[۲]، وحید شیبانی[۳]، سعید عزیزالهی[۱]، غلامرضا سپهری[۴]، محمد الله‌توکلی[۵]، محمدابراهیم رضوانی[۵]، مهدی محمودی[۶]

دریافت مقاله: ۸۷/٤/۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۷/۱۱/۱٦ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۷/۱۱/۲٦ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲٦

چکیده

زمینه و هدف: کالمودولین در مسیر سیگنالینگ مربوط به گیرنده‌های اپیوییدی دخیل است. هدف این مطالعه، بررسی اثر تزریق مزمن درون بطنی داروی W-7 که یک مهارکننده اختصاصی پروتئین کالمودولین است بر ایجاد تحمل به مورفین بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۷۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. ابتدا با استفاده از دستگاه استرئوتاکس و مختصات بطن طرفی مغز بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون کانول‌گذاری جهت حیوان انجام شد و یک هفته برای بهبودی به حیوان فرصت داده شد. حیوانات مورفین را به صورت داخل صفاقی با مقدار روزانه ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۸ روز دریافت کردند. ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین با انجام آزمون Tail-Flick در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۸ ارزیابی شد. داروی W-7 به صورت درون بطنی با مقادیر ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکرومول به ازای هر موش، ۱۰ دقیقه قبل از تجویز مورفین استفاده شد. در روزهایی که تست Tail-Flick انجام می‌شد داروی W-7 بعد از انجام آزمون تجویز گردید.

یافته‌ها: تزریق مورفین به مدت ۸ روز سبب ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین شد. تجویز داروی W-7 به صورت روزانه به مدت ۸ روز در مقدار ۰/۲۵ میکرومول به ازای هر موش نتوانست مانع بروز تحمل به اثرات ضددردی مورفین شود ولی مقادیر بالاتر W-7 (۰/۵ و ۱ میکرومول به ازای هر موش) به طور معنی‌داری سبب مهار ایجاد تحمل شد.

نتیجه‌گیری: تجویز داخل بطنی W-7 به صورت مزمن موجب جلوگیری از بروز تحمل به اثرات ضددردی مورفین گردید. نتایج حاضر نشان‌دهنده نقش پروتئین کالمودولین و مسیرهای وابسته به آن در روند ایجاد تحمل به اثرات ضددری مورفین در پی تجویز مکرر این داروست.

واژه‌های کلیدی: کالمودولین، تحمل، مورفین، W-7

۱- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۲- (نویسنده مسؤول) استادیار گروه آموزشی فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۲۴۰۰۳، فاکس: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۹۰۲، پست الکترونیکی: ashamsi@rums.ac.ir
۳- استادیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۴- استاد گروه آموزشی فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۵- استادیار گروه آموزشی فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۶- دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:03 IRST on Sunday February 25th 2018

مقدمه

ضددردهای اوپیوییدی از جمله مورفین به طور گسترده در کنترل درد به کار برده می‌شوند. تجویز مزمن سبب ایجاد تحمل به اثرات ضددردی می‌گردد که کاربرد بالینی آن‌ها را محدود می‌سازد. تحمل به صورت کاهش اثربخشی دارو در پی تجویز مزمن آن دارو تعریف می‌شود که در صورت ایجاد تحمل برای ایجاد اثرات ضددردی مطلوب به مقادیر بیشتر دارو نیاز است [۳-۱]. سازوکارهای دخیل در ایجاد تحمل به طور دقیق و کامل شناسایی نشده‌اند.

کالمودولین پروتئین اصلی متصل‌شونده به کلسیم است که به مقدار زیاد در دستگاه عصبی مرکزی یافت می‌شود [۴]. کالمودولین در بسیاری از اعمال سلولی از طریق فعال کردن آنزیم‌های وابسته به کالمودولین دخالت می‌کند. هم‌چنین فعالیت بسیاری از کانال‌های یونی، پمپ غشایی کلسیم و آزادسازی نوروترانسمیترها را تنظیم می‌کند [۶-۵].

شواهدی در دست است که مسیرهای وابسته به کلسیم-کالمودولین در ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین نقش دارند. گزارش شده است که افزایش غلظت گیرنده‌های اوپیوییدی که به دنبال تجویز نالوکسان ایجاد می‌شود با افزایش محتوای کالمودولین متصل به غشاء سلول همراهی دارد. این مطلب نشان می‌دهد گیرنده‌های اوپیوییدی و کالمودولین تحت تنظیم سیستم‌های هماهنگ‌کننده یکسانی هستند [۷]. Wang و همکاران گزارش نمودند که کالمودولین فعال شدن آنزیم کلسیم-کالمودولین پروتئین کیناز II را در سلول‌های تحریک شده با مورفین تسهیل می‌کند [۸]. Fan و همکاران نشان دادند که مهار پروتئین کیناز II در هیپوکمپ باعث کاهش وابستگی به مورفین می‌شود [۹]. هم‌چنین نشان داده شده است که تجویز حاد مهارکننده پروتئین کیناز II در نخاع، تحمل ایجاد شده به اثرات ضددردی مورفین را کاهش می‌دهد [۱۰].

از سوی دیگر داروهای اوپیوییدی در تنظیم محتوای کلسیم و کالمودولین داخل سلول نقش دارند. تجویز مورفین سبب توزیع مجدد کالمودولین در میان ساختمان‌های مختلف سلول می‌شود [۷]. هم‌چنین مورفین از طریق پروتئین کیناز II باعث کاهش حساسیت (desensitization) گیرنده‌های اپیوییدی μ می‌شود [۱۱]. از طریق اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فسفودی‌استراز cAMP حلقوی مشخص شده است که در جریان تجویز مزمن مورفین، محتوای کالمودولین در مغز موش صحرایی افزایش می‌یابد [۱۳-۱۲] اما نقش این افزایش در ایجاد عوارض ناشی از مصرف مزمن مورفین از جمله ایجاد تحمل نامشخص است. با توجه به این که نقش کالمودولین موجود در مغز در بروز اثرات ضددردی و بروز تحمل به مورفین به طور دقیق مشخص نشده است لذا مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر تزریق داخل بطنی W-7 (مهار کننده اختصاصی کالمودولین) بر فرآیند ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی (experimental) از ۷۵ رأس موش صحرایی نر از نژاد ویستار و با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که به صورت تصادفی انتخاب شدند استفاده گردید. موش‌های صحرایی از مرکز نگهداری حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه شدند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

داروها: ماده (N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphtalenesulfonamide) W-7 از شرکت Alexis تهیه شد و در DMSO (Dimethyl Sulfoxide) ۱۰۰٪ حل

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:03 IRST on Sunday February 25th 2018

گردید. مقادیر مختلف دارو (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکرومول به ازای هر موش) با حجم ۱۰ میکرولیتر در عرض یک دقیقه در بطن جانبی تزریق گردید. داروی مورفین هیدروکلراید از شرکت دارویی ایران تهیه گردید و در زمان مصرف در سرم فیزیولوژیک حل شد و مورد استفاده قرار گرفت.

روش آماده کردن حیوان برای تزریق W-7 در بطن جانبی مغز: ابتدا حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی مخلوط زیلازین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کتامین ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس سر حیوان در دستگاه استرئوتاکس ثابت و یک برش طولی از قسمت ابتدایی به طرف انتهایی جمجمه داده شد. دستگاه استرئوتاکس بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون بر روی مختصات بطن طرفی مغز (۱ میلی‌متر به سمت عقب نسبت به برگما، ۱/۵ میلی‌متر در سمت چپ خط وسط و عمق ۳ میلی‌متر از سطح سخت‌شامه جمجمه) تنظیم شد. یک کانول شماره ۲۲ در بطن جانبی مغز قرار گرفت و با استفاده از خمیر دندان‌پزشکی ثابت گردید. دهانه کانول با استفاده از مفتول فلزی مناسب جهت جلوگیری از عفونت و نشت احتمالی مایع مغزی نخاعی (CSF) مسدود گردید، یک هفته به حیوان جهت بهبودی فرصت داده شد و سپس آزمایشات انجام گرفت [۱۴].

سنجش میزان تحمل: برای مطالعه اثر ضددردی مورفین از آزمون Tail-Flick استفاده شد. به طور خلاصه در هر حیوان قبل از تزریق داروها زمان تأخیری پس‌کشیدن دم (معیار اثر ضددردی مورفین) متعاقب تاباندن نور با شدت ۷ بر ثلث میانی دم حیوان با استفاده از دستگاه Tail-Flick (ساخت کشورآمریکا) ۳ بار و با فاصله ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. میانگین این زمان‌ها به عنوان زمان تأخیری پایه (basal latency) ثبت گردید. در فاصله زمانی مشخص بعد از تزریق مورفین زمان پاسخ‌دهی به نور مجدداً ۳ بار و با فاصله ۱ دقیقه اندازه‌گیری و تحت عنوان زمان تأخیری در گروه درمانی (experimental latency) ثبت شد. حداکثر زمان نوردهی (cut off time) برابر ۱۵ ثانیه تعیین شد تا از آسیب بافتی جلوگیری شود [۱۵]. حداکثر اثر ضددردی [(MPE (maximal possible effect] بر اساس زمان‌های تأخیری پایه و درمانی بر اساس فرمول زیر بصورت درصد بیان شد:

$$MPE= \frac{\text{experimental latency- basal latency}}{\text{15-basal latency}} \times 100$$

روش ایجاد تحمل به مورفین: برای القاء تحمل، مورفین به صورت داخل صفاقی یک نوبت در روز به میزان ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۸ روز به حیوانات تزریق می‌شد. پیشرفت تحمل به خاصیت ضددردی این دوز از مورفین در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۸ با استفاده از تست Tail-Flick قبل و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق مورفین سنجیده شد. داروی W-7 (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکرومول به ازای هر موش) به صورت داخل بطنی ۱۰ دقیقه قبل از تزریق مورفین به کار می‌رفت ولی در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۸ ابتدا تزریق مورفین و تست Tail-Flick انجام می‌گرفت و سپس W-7 تزریق می‌شد [۱۶].

گروه‌های مورد آزمایش: در این تحقیق ۸ گروه موش صحرایی کانول‌گذاری شده مورد آزمایش قرار گرفتند و هر گروه شامل ۸-۶ سر حیوان بود:

۱- موش‌های دریافت‌کننده سرم فیزیولوژیک داخل صفاقی به مدت ۸ روز، ۲- موش‌های دریافت‌کننده مورفین داخل صفاقی به مدت ۸ روز، ۳- موش‌های دریافت‌کننده مورفین داخل صفاقی وDMSO (حلال W-7) داخل بطنی به مدت ۸ روز، ۴- موش‌های دریافت‌کننده سرم فیزیولوژیک داخل صفاقی و DMSO (حلال W-7) داخل بطنی به مدت ۸ روز، ۵- موش‌های دریافت‌کننده سرم فیزیولوژیک داخل صفاقی و W-7 (۱ میکرومول به ازای هر موش) داخل بطنی به مدت ۸ روز،

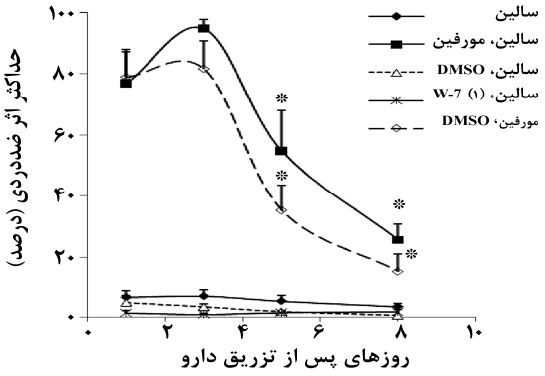
Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:03 IRST on Sunday February 25th 2018

۶،۷،۸- موش‌های دریافت‌کننده مورفین داخل صفاقی و مقادیر مختلف W-7 (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکرومول به ازای هر موش) داخل بطنی به مدت ۸ روز.

روش آماری: داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار نشان داده شدند. اختلاف حداکثر اثر ضددردی در گروه‌های مختلف و در زمان‌های متفاوت با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه بررسی شد. از آزمون آنالیز واریانس تکراری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در زمان‌های مختلف در یک گروه آزمایشی استفاده شد. تمامی داده‌ها با $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

تجویز داخل صفاقی مورفین (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۸ روز سبب ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین شد به طوری که میزان MPE روزهای پنجم و هشتم به ترتیب ۴۵٪ و ۳۰٪ بود که در مقایسه با میزان MPE روز اول (۸۰٪) در این گروه تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد ($p<۰/۰۵$ نمودار ۱).

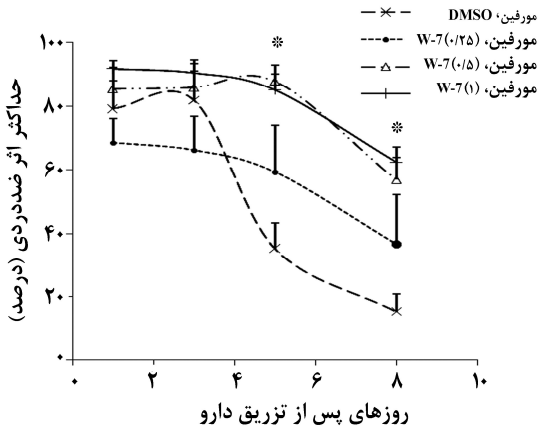


نمودار ۱- ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین در پی تجویز مزمن این دارو در موش صحرایی.

داده‌ها به صورت میانگین± خطای معیار نشان داده شده‌اند.

**** اختلاف معنی‌دار بین حداکثر اثر ضد دردی روز اول با روز پنجم و هشتم در گروه دریافت‌کننده مورفین و گروه مورفین به همراه DMSO (Repeated Measure ANOVA, p<۰/۰۵) (n=۶-۸).***

در این بخش از مطالعه ابتدا تأثیر تجویز داخل بطنی DMSO (به عنوان حلال W-7) بر ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین بررسی شد همان طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود در موش‌های دریافت‌کننده DMSO به همراه مورفین به صورت درون بطنی، تحمل به مورفین ایجاد شد که هیچ اختلاف معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده مورفین به تنهایی نداشت ($p>۰/۰۵$). سپس اثر تجویز مزمن درون بطنی مقادیر مختلف W-7 بر ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان MPE روز هشتم در گروه دریافت‌کننده W-7 (مقدار ۰/۲۵ میکرومول به ازای هر موش به همراه مورفین داخل صفاقی) ۳۵٪ بود که در مقایسه با میزان MPE روز هشتم گروه مورفین + DMSO (۲۰٪) افزایش پیدا کرده است. تفاوت معنی‌داری بین MPE روز هشتم در این دو گروه مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$ نمودار ۲). MPE روز پنجم و هشتم در گروه دریافت‌کننده مقدار ۰/۵ میکرومول به ازای هر موش داروی W-7 به همراه مورفین داخل صفاقی به ترتیب ۹۰٪ و ۶۲٪ بود که افزایش معنی‌داری را در مقایسه با میزان MPE روز پنجم و هشتم در گروه مورفین به همراه DMSO (بترتیب ۳۰٪ و ۲۰٪) نشان داد (نمودار۲).



نمودار ۲- اثر تزریق مزمن درون بطنی داروی W-7 بر روی تحمل به اثرات ضددردی مورفین در موش صحرایی.

**** اختلاف معنی‌دار بین حداکثر اثر ضد دردی روز پنجم و هشتم در گروه‌های دریافت‌کننده مقادیر ۰/۵ و ۱ میکرومول W-7 به همراه مورفین با گروه دریافت‌کننده مورفین به همراه DMSO (p<۰/۰۵).***

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:03 IRST on Sunday February 25th 2018

همان‌طور که در نمودار ۲ دیده می‌شود MPE روز پنجم و هشتم در گروه دریافت‌کننده داروی W-7 (مقدار ۱ میکرومول به ازای هر موش) به همراه مورفین داخل صفاقی به ترتیب ۸۵٪ و ۶۵٪ بود که در مقایسه با میزان MPE روز پنجم و هشتم در گروه مورفین به همراه DMSO (به ترتیب ۳۰٪ و ۲۰٪) افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). این نتایج نشان می‌دهند که میزان MPE روز هشتم در گروه‌های دریافت‌کننده مقادیر بالاتر W-7 (مقادیر ۰/۵ و ۱ میکرومول به ازای هر موش) به همراه مورفین با میزان MPE در روز نخست در آن گروه‌ها تفاوت معنی‌داری ندارد، بدین معنی که تجویز مزمن داخل بطنی داروی W-7 (مقادیر ۰/۵ و ۱ میکرومول به ازای هر موش) به همراه مورفین داخل صفاقی تحمل به اثرات ضددردی مورفین را مهار می‌کند (نمودار ۲).

تجویز داخل بطنی حداکثر مقدار W-7 (مقدار ۱ میکرومول به ازای هر موش) به همراه تجویز داخل صفاقی سرم فیزیولوژیک تفاوت معنی‌داری را در زمان تأخیری پس‌کشیدن دم در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سرم فیزیولوژیک به تنهایی ایجاد نکرد ($p>۰/۰۵$ نمودار ۱).

بحث

این مطالعه به منظور بررسی اثر مهار فوق نخاعی پروتئین کالمودولین از طریق تجویز داخل بطنی مهارکننده اختصاصی این پروتئین (داروی W-7) بر بروز تحمل به اثرات ضددردی مورفین صورت گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تجویز داخل بطنی داروی W-7 به صورت مزمن موجب جلوگیری از بروز تحمل به اثرات ضددردی مورفین می‌گردد به طوری که میزان حداکثر اثر ضددردی (MPE) روز پنجم و هشتم در گروه‌های دریافت‌کننده مقادیر زیاد این دارو به همراه مورفین به صورت معنی‌داری نسبت به گروه مورفین به همراه DMSO افزایش نشان داد. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند نشان‌دهنده این مطلب باشد که کالمودولین و مسیرهای وابسته به آن در ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین نقش دارند که این مسأله با گزارشات قبلی سایر محققین هم‌خوانی دارد [۱۸-۱۷، ۱۰-۹]. به عنوان مثال نشان داده شده است که تزریق داخل بطنی مهارکننده آنزیم کلسیم-کالمودولین پروتئین کیناز II سبب مهار ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین در آزمون Tail-Flick در موش صحرایی می‌گردد [۹].

محققین گزارش کرده‌اند که تحریک مزمن گیرنده‌های اوپیوییدی توسط آگونیست این گیرنده‌ها موجب افزایش کلسیم داخل سلولی می‌شود [۲۰-۱۹] که این امر سبب جدا شدن کالمودولین از غشاء سلول می‌گردد [۸]. افزایش میزان کالمودولین موجود در سیتوزول، انتقال کالمودولین را به درون هسته سلول القاء می‌کند [۲۱]. کالمودولین در هسته بروز(Expression) یکسری از ژن‌ها را تغییر می‌دهد که این تغییرات در بروز عوارض ناشی از تجویز مزمن اوپیوییدها از جمله ایجاد تحمل مؤثرند [۲۳-۲۲]. علاوه بر آن کالمودولین از طریق فسفریلاسیون پروتئین‌های phosducin-like در مغز باعث تنظیم عملکرد پروتئین‌های G (G-proteins) می‌شود که این پروتئین‌ها در مسیرهای سیگالینگ مربوط به گیرنده‌های اپیوئیدی نقش دارند [۲۴]. از سوی دیگر نشان داده شده است که در اثر تجویز مزمن مورفین، محتوای کالمودولین مغز موش افزایش می‌یابد [۱۳-۱۲، ۲۲]. هم‌چنین افزایش فعالیت کالمودولین در قسمت‌های مختلف مغز از جمله استریتوم، مغز میانی، قشر مخ و تالاموس در اثر تجویز مورفین گزارش شده است [۲۶-۲۵].

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که مهار مزمن فعالیت کالمودولین در مغز موش، ایجاد تحمل به اثر ضددردی

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:03 IRST on Sunday February 25th 2018

مورفین را مهار می‌کند. بنابراین به نظر می‌رسد که تغییرات مشاهده شده در محتوا و میزان فعالیت کالمودولین در پی تجویز مزمن مورفین احتمالاً در ایجاد عوارضی هم‌چون ایجاد تحمل به مورفین نقش دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان می‌باشد. بدین‌وسیله از زحمات کلیه پرسنل این مرکز قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

References

[1] Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci*, 1992; 13(5): 177-84.

[2] Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 1997; 278(5355): 52-8.

[3] Kreek MJ. Opiates, opioids and addiction. *Mol Psychiatry* 1996; 1(3): 232-54.

[4] Ye XF, Lu Y, Zhang P, Liang JH. Calmodulin inhibitor trifluoperazine attenuates the development and expression of morphine-induced conditioned place preference in rats. *Eur J Pharmacol*, 2004; 486(3): 265-71.

[5] Cheung W. Calmodulin: an overview. *Fed Proc*, 1982; 41(7): 2253-7.

[6] Adachi S, Oka JI, Fukuda H. Calcium-dependent dynamic changes in the subcellular distribution of calmodulin in frog spinal cells. *Brain Res*, 1989; 487(1): 196-9.

[7] Baram D, Simantov R. Enkephalins and opiate antagonists control calmodulin distribution in neuroblastoma-glioma cells. *J Neurochem*, 1983; 40(1): 55-63.

[8] Wang D, Sadee W, Quillan JM. Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors. *J Biol Chem*, 1999; 274(3): 22081-8.

[9] Fan GH, Wang LZ, Qiu HC, Ma L, Pei G. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus attenuates morphine tolerance and dependence. *Mol Pharmacol*, 1999; 56(1): 39-45.

[10] Wang ZJ, Tang L, Xin L. Reversal of morphine antinociceptive tolerance by acute spinal inhibition of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Pharmacol*, 2003; 465(1-2): 199-200.

[11] Rodriguez-Munoz M, de la Torre-Madrid E, Gaitan G, Sanchez-Blazquez P, Garzon J. RGS14 prevents morphine from internalizing Mu-opioid receptors in periaqueductal gray neurons. *Cell Signal,* 2007; 19(12): 2558-71.

[12] Bonnet KA, Engelberg L, Gusik SA. Calmodulin increases in selective brain regions with opioid dependence. *Life Sci*, 1982; 31(20-21): 2295-8.

[13] Hoskins B, Ho IK, Meydrech EF. Effects of aging and morphine administration on calmodulin and calmodulin-regulated enzymes in striata of mice. *J Neurochem*, 1985; 44(4): 1069-73.

[14] Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav,* 2007; 51(1): 171-80.

[15] Esmaeili Mahani S, Vahedi S, Motamedi F, Pourshanazari A, Khaksari M, Ahmadiani A. Nifedipine

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:03 IRST on Sunday February 25th 2018

potentiates antinociceptive effects of morphine in rats by decreasing hypothalamic pituitary adrenal axis activity. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005; 82(1): 17-23.

[16] Esmaeili Mahani S, Motamedi F, Javan M, Ahmadiani A. Involvement of hypothalamic pituitary adrenal axis on the effects of nifedipine in the development of morphine tolerance in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005; 81(1): 152-7.

[17] Tang L, Shukla PK, Wang LX, Wang ZJ. Reversal of morphine antinociceptive tolerance and dependence by the acute supraspinal inhibition of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006; 317(2): 901-9.

[18] Hamdy MM, Noda Y, Miyazaki M, Mamiya T, Nozaki A, Nitta A, et al. Molecular mechanisms in dizocilpine-induced attenuation of development of morphine dependence: an association with cortical Ca2+/calmodulin-dependent signal cascade. *Behav Brain Res,* 2004; 152(2):263-70.

[19] Diaz A, Ruiz F, Florez J, Pazos A, Hurle MA. Regulation of dihydropyridine-sensitive Ca++ channels during opioid tolerance and supersensitivity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995; 274(3): 1538-44.

[20] Welch SP, Olson KG. Opiate tolerance-induced modulation of free intracellular calcium in synaptosomes. *Life Sci*, 1991; 48(19): 1853-61.

[21] Wang D, Tolbert LM, Carlson KW, Sadee W. Nuclear Ca2+/calmodulin translocation activated by mu-opioid (OP3) receptor. *J Neurochem*, 2000; 74(4): 1418-25

[22] Niu S, Kuo CH, Gan Y, Nishikawa E, Sadakata T, Ichikawa H, et al. Increase of calmodulin III gene expression by mu-opioid receptor stimulation in PC12 cells. *Jpn J Pharmacol*, 2000; 84(4): 412-7.

[23] Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*. 1998; 392(6672) :198-202.

[24] Sanchez-Blazquez P, Rodriguez-Munoz M, Montero C, de la Torre-Madrid E, Garzon J. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II supports morphine antinociceptive tolerance by phosphorylation of glycosylated phosducin-like protein. *Neuropharma_ cology*. 2008; 54(2): 319-30.

[25] Hoskins B, Ho IK, Meydrech EF. Effects of morphine and aging on brain calmodulin levels in mice. *Exp Aging Res*, 1985; 11(3-4): 143-5.

[26] Nehmad R, Nadler H, Simantov R. Effects of acute and chronic morphine treatment of calmodulin activity of rat brain. *Mol Pharmacol*, 1982; 22(2): 389-94.

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 21:03 IRST on Sunday February 25th 2018

Calmodulin Potentiates the Antinociceptive Effects of Morphine in Rats

A. Azarang[1], A. Shamsizadeh[2], V. Sheibani[3], S. Azizollahi[1], Gh.R. Sepehri[4], M. Allahtavakoli[5], M.E. Rezvani[5], M. Mahmoodi[6]

Received: 28/06/08 Sent for Revision: 04/02/09 Received Revised Manuscript: 14/02/09 Accepted: 16/03/09

Background and Objectives: Calmodulin is involved in signaling pathways of opioid receptors. The present study was performed to determine the effect of chronic intracerebroventricular (ICV) administration of W-7, a specific calmodulin inhibitor, on the development of morphine tolerance.

Materials and Methods: This experimental study was carried out on 75 male wistar rats weighing 200-250 g. The cannula was placed in the lateral ventricle of rat's brain according to the Paxinos and Watson atlas using the stereotaxic instrument. Rats were allowed a 7 day recovery period after the surgery for implantation of the cannula. Morphine was injected intraperitoneally based on a daily dose of 15mg/kg for 8 days. The development of tolerance to analgesic effects of morphine was measured on days 1, 3, 5 and 8 by Tail-Flick test. W-7 (0.25, 0.5 and 1micromol/rat) was injected as ICV each day 10 minutes prior the morphine administration. On days that Tail-Flick test was performed W-7 was administered after the test.

Results: Chronic administration of morphine alone for 8 days induced tolerance to its antinociceptive effect. ICV administration of W-7 in dose of 0.5 and 1 micomol/rat could prevent the development of morphine tolerance. However administration of W-7 in dose of 0.25 micomol/rat could not prevent the development of morphine tolerance

Conclusion: Chronic ICV administration of W-7 (a specific calmodulin inhibitor) inhibited the development of morphine tolerance. These results indicate that calmodulin and calmodulin- dependent pathways may play a role in the morphine tolerance process.

Key words: Calmodulin, Tolerance, Morphine, W-7

Funding: This study was supported by Kerman neuroscience research center.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Kerman Neuroscience Research Center, approved the study.

1- General Physicion, Neuroscience Research Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2-Assistant Prof., Dept. of Physiology and Pharmacology, Medical School, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
(Corresponding Author) Tel: (0391) 5234003, Fax: (0391) 5225902, E-mail: alishamsy@gmail.com
3- Assistant Prof., Neuroscience Rasearch Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran
4- Prof., Dept. of Physiology and Pharmacology, Medical School, University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5- Assistant Prof., Dept. of Physiology and Pharmacology, Medical School, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
6- Associate Prof., Dept. of Biochemistry, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran