دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیستم، شماره ۶، صفحه ۵۳۹ - ۵۲۷ (بهمن و اسفند ۱۳۹۶)

Iran South Med J 2018;20(6): 527-539

بررسی نقش PKCγ نخاعی در تحمل و هیپرآلجزیای القا شده بدنبال تجویز مکرر مورفین در موش‌های صحرایی نر

کبری قاسملو (MSc)[۱]، هما مناهجی (PhD)[۱ و ۲*]، لیلا درگاهی (PhD)[۳]، ساره پندآموز (PhD)[۳]

[۱] گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران
[۳] مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۱۱/۱۹ - پذیرش مقاله: ۹۶/۵/۱)

چکیده

زمینه: اپیوییدهایی مثل مورفین یک انتخاب خوب برای درمان دردهای حاد و مزمن در کلینیک می‌باشند. استفاده کلینیکی از داروهای اپیوئیدی جهت تسکین درد دارای محدودیت است. زیرا تکرار تجویز آنها منجر به ایجاد تحمل و وابستگی فیزیکی و کاهش **potency** دارو می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی نقش **Protein Kinase Cγ(PKCγ)** در تحمل و هیپرآلجزیای القا شده به‌دنبال تجویز مکرر مورفین در موش‌های صحرایی نر است.

مواد و روش‌ها: جهت آزمایش، موش‌ها به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل: تزریق سالین، تحمل به مورفین و هیپرآلجزیا، متفورمین، تحمل و هیپرآلجزیای القا شده به مورفین + متفورمین بودند. ابتدا مورفین ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و به‌صورت زیر جلدی یک مرتبه در روز و به مدت ۱۴ روز تزریق شد. تست رفتاری هارگریوز به‌ترتیب قبل (کنترل) و بعد از تزریق اولین دوز مورفین در روز اول و سپس روز ۱۴ پس از آخرین تزریق برای بررسی تحمل انجام گرفت. در بررسی هیپرآلجزیا تست رفتاری قبل از تزریق اولین دوز مورفین و سپس قبل از آخرین تزریق آن در روز ۱۴ و آنگاه دو روز پس از آخرین تزریق یعنی روز ۱۶ صورت گرفت. بیان **(PKCγ)** نخاعی در روزهای ۱۴ پس از آخرین تزریق و روز ۱۶ بروش وسترن بلات سنجیده شد. متفورمین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی همراه با مورفین به مدت ۱۴ روز تزریق گردید. سنجش تست رفتاری هارگریوز و میزان بیان **PKCγ** با همان روشی که در بالا اشاره شد صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج تحمل معنی‌داری را در روز ۱۴پس از تزریق آخرین دوز مورفین و القای هیپرآلجزیا را در روزهای ۱۴ قبل از تزریق مورفین و ۱۶ در مقایسه با کنترل نشان داد. همچنین افزایش معنی‌داری در بیان **PKCγ** در روز ۱۴ و روز ۱۶ در مقایسه با کنترل دیده شد که این افزایش در تحمل بیشتر از هیپرآلجزیا بود. تزریق ۱۴روزه متفورمین به همراه مورفین سبب کاهش معنی‌دار تحمل و هیپرآلجزیا گردید. بیان **PKCγ** نخاعی نیز در تحمل و هیپرآلجزیا کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که افزایش بیان **PKCγ** نخاعی در تحمل و القای هیپرآلجزیای حاصل از استفاده مکرر مورفین می‌تواند نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: تحمل به مورفین، هیپرآلجزیا، متفورمین، PKCγ

* تهران، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

Email: manahejih@sbmu.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

مقدمه

داروهای اپیوییدی از جمله مهم‌ترین داروهایی هستند که از زمان‌های گذشته تا امروز برای درمان درد استفاده شده‌اند. مورفین نمونه بارز یک آگونیست اپیوئیدی است که مناسب‌ترین انتخاب در درمان دردهای حاد و مزمن در کلینیک می‌باشد. استفاده کلینیکی از داروهای اپیوییدی جهت تسکین درد دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد زیرا تکرار تجویز آنها منجر به ایجاد تحمل و وابستگی فیزیکی و هیپرآلجزیا می‌شود (۴-۱).

ساده‌ترین تعریف از هیپرآلجزیا پیدایش پردردی در حضور و یا حتی عدم حضور محرک دردناک می‌باشد و پدیده‌ای است که بدنبال استفاده مکرر و طولانی مدت اپیوییدها نیز ایجاد می‌شود (۵ و ۶). ولی تحمل به اثر ضد دردی مورفین از نظر فارماکولوژی شیفت به راست منحنی دوز- پاسخ می‌باشد، بدین معنی که برای حفظ بی‌دردی به داروی بیشتری نیاز است زیرا اثر دارو کاهش می‌یابد (۷ و ۸). علیرغم بررسی‌های وسیعی که جهت شناخت پدیده تحمل و هیپرآلجزیای ناشی از مصرف مکرر مورفین صورت گرفته است، مکانیسم‌های درگیر در آن به خوبی شناخته نشده است. گرچه این دو پدیده به یکدیگر مرتبط هستند ولی دارای مکانیسم‌های جداگانه‌ای می‌باشند. از طرفی تحقیقات اخیر نشان داده است که مکانیسم‌های درگیر در تحمل و هیپرآلجزیای ناشی از مصرف مکرر مورفین با مکانیسم‌های درگیر در تحمل و هیپرآلجزیای حاصل از دردهای التهابی و نوروپاتیک مشابه است (۹ و ۱۰). از جمله مکانیسم‌های پیشنهادی دخیل در گسترش پدیده تحمل و هیپرآلجزیای القا شده به دنبال تجویز مکرر مورفین، از Protein Kinase C (PKC) نام برده می‌شود. به‌نظر می‌رسد که مسیر پیامبرهای ثانویه فعال کننده PKC و PKA در بروز پدیده تحمل اپیوئیدها نقش بالقوه‌ای داشته باشند (۷). تجویز مزمن اپیوییدها با افزایش بیان PKC داخل سلولی سبب فعال شدن رسپتور N- Methyl- (NMDA) D- Aspartate می‌شود که این خود در مکانیسم هیپرآلجزیا دخیل است (۱۱ و ۱۲).

آیگو (Igwe) و همکاران مشاهده کردند که مکانیسم‌های ملکولی هیپرآلجزیای حرارتی ایجاد شده حاصل از تزریق کف پایی Complete freund's adjuvant (CFA) با واسطه PKCβII صورت می‌گیرد (۱۳)، ولی از طرف دیگر یاجیما (Yajima) و همکاران نشان دادند که هیپرآلجزیای حرارتی ایجاد شده توسط CFA به PKC وابسته نمی‌باشد (۱۴). سانگ (Song) و همکاران نیز، مشاهده نمودند که بدنبال ایجاد پدیده تحمل و هیپرآلجزیای ناشی از مصرف مزمن مورفین سطح PKCγ به طور معنی‌داری در نخاع افزایش یافته است (۱۵). نقش PKC و ایزوزیم‌های آن در درد و بی‌دردی منبع تحقیقات وسیعی در دو دهه اخیر بوده است و استفاده از مهار کننده‌ها و فعال کننده‌های مختلف آن در مطالعات گسترده‌ای که روی بررسی درد صورت می‌گیرد نتایج متناقضی را به‌وجود آورده است. از جمله نشان داده شده است که مهار کننده‌های PKC از ایجاد پدیده تحمل به اثرات ضد دردی مورفین جلوگیری می‌نمایند و یا تحمل به اثر ضددردی آن را کاهش می‌دهند (۱۶ و ۱۷). مائو (Mao) و همکاران در مطالعه‌ای با تزریق اینتراتکال مورفین علاوه بر تحمل به اثرات ضددردی مورفین پردردی یا هیپرآلجزیای ناشی از آن را نیز گزارش نمودند. آنها همچنین روشی را در رابطه با سنجش هیپرآلجزیای حاصل از مصرف مزمن مورفین ارائه نمودند که درتحقیقات زیادی به آن اشاره شده است. مائو همچنین مشاهده نمود استفاده از مهار کننده PKC (GM1) می‌تواند از ایجاد هر دو پدیده تحمل و هیپرآلجزیای ناشی از مورفین جلوگیری نماید. البته در تحقیقات مائو اشاره‌ای به نقش ایزوزیم‌های PKC در پدیده‌های تحمل و هیپرآلجزیا نشده است (۱۲). ولی بنظر می‌رسد که در بررسی مکانیسم‌های

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

دخیل در ایجاد تحمل و هیپرآلجزیای ناشی از اپیوییدها PKC و برخی از ایزوزیم‌های آن نقش داشته باشند (۵). همچنین استفاده از داروی مناسبی که بتواند با کاهش PKC منجر به کاهش تحمل و هیپرآلجزیا شود به مطالعات بیشتری نیاز دارد. لذا هدف از این پژوهش بررسی نقش PKCγ نخاعی در تحمل و هیپرآلجزیای القا شده بدنبال تجویز مکرر مورفین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم صورت گرفت. موش‌ها در شرایط استاندارد آب و غذا و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای تقریباً ثابت (۲±۲۲) درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و به استثنای زمان آزمایش به غذا و آب کافی دسترسی داشتند. مورفین از شرکت دارویی تماد (تهران- ایران) و متفورمین از شرکت دارویی سیگما (آمریکا) تهیه شدند. تمام آزمایشات بر اساس دستورالعمل کار با حیوانات آزمایشگاهی موسسه ملی آمریکا (NIH) انجام شده و کلیه روش‌ها مورد تأیید کمیته اخلاق تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ۲۰۱۱ :۹۰/۳/۱۸/ ۱۹۴ می‌باشد. برای انجام آزمایشات حیوانات بصورت تصادفی انتخاب و به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند.

۱-گروه تزریق سالین

۲-گروه تحمل وهیپرآلجزیای القا شده بوسیله مورفین

۳-گروه متفورمین

۴-گروه تحمل و هیپرآلجزیای القا شده با مورفین + متفورمین

در گروه‌های رفتاری سنجش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین با تست هارگریوز در روز اول قبل وسپس ۳۰ دقیقه پس از دریافت مورفین و آنگاه در روز ۱۴ پس از تزریق آخرین دوز آن انجام شد. سنجش هایپرآلجزیا قبل از تزریق اولین دوز مورفین و سپس در روز ۱۴ قبل از تزریق آخرین دوز مورفین (آخرین دوز مورفین پس از تست رفتاری تزریق می‌شد) و آنگاه در روز ۱۶ یعنی ۴۸ ساعت پس از تزریق آخرین دوز مورفین صورت گرفت.

برای سنجش میزان بیان PKCγ، قطعه کمری نخاع در روزهای ۱۴ و ۱۶ بلافاصله پس از تست رفتاری خارج گردیده و برای آزمایش‌های ایمونوبلاتینگ آماده گردید.

ابتدا با استفاده از تست هارگریوز یا (پلانتار تست) قبل از تزریق مورفین آستانه درد اندازه‌گیری می‌شد. سپس مورفین به صورت زیر جلدی و به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم یکبار در روز به مدت ۱۴روز و به‌صورت مکرر تزریق گردید. تست رفتاری قبل و بعد از تزریق اولین دوز مورفین در روز اول و سپس هر روز تا روز ۱۴ انجام گرفت. در نهایت روز ۱۴ پس از تزریق آخرین دوز مورفین تحمل مشاهده گردید برای تأیید ایجاد تحمل، در روز ۱۵ مورفین با دوز ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم تزریق شد

جهت القای هایپرآلجزیای حاصل از تزریق مکرر مورفین، مورفین به همان روشی که در بالا ذکر شد تجویز گردید با این تفاوت که تست رفتاری هارگریوز در روز ۱۴ قبل از تزریق آخرین دوز مورفین انجام شد (سپس آخرین دوز مورفین تزریق گردید و تا دو روز آینده هیچ مورفینی تزریق نگردید) سپس در روز ۱۶ یعنی ۴۸ ساعت پس از قطع آخرین دوز مورفین تست رفتاری صورت گرفت. در گروه نرمال سالین روش تزریق و بررسی تست رفتاری به همان صورتی که در بالا در مورد مورفین ذکر گردید انجام گرفت. بمنظور بررسی اثر متفورمین روی تحمل و هایپرآلجزیای حاصل از تزریق مکرر مورفین، ابتدا متفورمین جداگانه در سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم و به تنهایی تزریق گردید و از بین این سه دوز مورد آزمایش، دوز ۱۰۰ میلی‌گرم انتخاب شد. لذا متفورمین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به تنهایی و همچنین همراه با مورفین به مدت ۱۴ روز و به‌طور مکرر ۳۰ دقیقه پس از تزریق مورفین تزریق شد. تست رفتاری هارگریوز برای سنجش تحمل، قبل و بعد از تزریق اولین دوز مورفین به‌همراه متفورمین در روز اول و سپس در روز ۱۴ پس از تزریق

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

آخرین دوز مورفین به همراه متفورمین انجام گرفت. سنجش هایپرآلجزیا، ابتدا قبل از تزریق مورفین به همراه متفورمین در روز اول و سپس قبل از تزریق آخرین دوز مورفین به همراه متفورمین در روز ۱۴ و سپس ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق یعنی در روز ۱۶ انجام گرفت. برای سنجش میزان بیان PKCγ بروش وسترن بلات در روزهای ۱۴ و ۱۶ نخاع بلافاصله پس از تست رفتاری خارج گردید.

تست رفتاری هارگریوز برای سنجش هیپرآلجزیای حرارتی (پلانتار تست)

به منظور ارزیابی هیپرآلجزیای حرارتی ایجاد شده توسط مورفین از دستگاه (Plantar test ،Ugo Basile ،Italy) استفاده شد. حیوان درون محفظه‌های مخصوص دستگاه قرار گرفته و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه که به محیط جدید عادت می‌کرد منبع متحرک تابش اشعه مادون قرمز دستگاه زیر کف پای راست و چپ حیوان به نوبت قرار می‌گرفت. با عقب کشیدن پا تایمر دستگاه متوقف و منبع حرارتی خاموش می‌شد. محرک حرارتی با شدت ثابت برای همه گروه‌ها اعمال می‌گردید. مدت زمان تحمل در برابر تابش اشعه گرمایی به کف پاها بیانگر آستانه تحمل درد حیوان بود که بر حسب ثانیه ثبت می‌گردید. این کار سه بار با فواصل زمانی حداقل ۵ دقیقه برای هر یک از دو پا در نظر گرفته می‌شد و سپس در هر موش آستانه‌ها از یکدیگر کم می‌شدند و در نهایت میانگین این سه پاسخ به عنوان مدت زمان تأخیر در عقب کشیدن پا از محرک حرارتی دردناک به‌عنوان معیار سنجش تحمل و هیپرآلجزیای حرارتی در نظر گرفته می‌شد. به‌منظور جلوگیری از آسیب بافتی زمان مشخصی که معمولاً ۳۰ ثانیه است برای قطع آزمایش یا (Cut off) در نظر گرفته می‌شد.

روش Immunoblotting: هدف از تکنیک ایمونوبلاتینگ یا وسترن بلاتینگ، بررسی میزان بیان پروتئین در بافت مورد مطالعه می‌باشد. به‌طور خلاصه، در این تکنیک باندهای پروتئینی جدا و توسط الکتروفورز به غشای PVDF منتقل و سپس پروتئین هدف توسط آنتی بادی اختصاصی شناسایی می‌شود. باند پروتئینی مورد نظر که توسط آنتی‌بادی اولیه شناسایی شده است با استفاده از کیت ایلومینسانس (illuminecence) آشکار می‌شود. برای انجام آزمایشات ابتدا حیوانات باگاز CO2 بیهوش شده و پس از جدا کردن سر و خروج نخاع به سرعت قطعه لومبار نخاع جدا گردیده و داخل میکروتیوب قرار داده می‌شد. پس از لیز و هموژن شدن نمونه‌ها، پروتئین استخراج شده به‌روش برادفورد تعیین غلظت می‌گردید و منحنی استاندارد آن رسم می‌شد. با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل، حرکت پروتئین‌ها مشاهده و توسط جریان الکتریکی به کاغذ انتقال می‌یافت. از محلول بلاتینگ به منظور پوشاندن کاغذ برای ممانعت از واکنش غیراختصاصی آنتی‌بادی استفاده می‌شد.

پس از اتمام این مرحله بافر بلاتینگ آنتی بادی اولیه برای (PKCγ ،UK ،Cambridge ،Abcam ،mouse monoclonal anti-PKCγ) PKCγ با رقت ۱/۱۰۰۰۰ رقیق شده و در دمای محیط انکوبه و shake می‌گردید. پس از آن وارد مرحله انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه (UK، Cambridge، Abcam، anti-rabbit for PKCγ) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ شده و در آخر کاغذ را در سلفون پیچیده و در کاست فیلم قرار داده و در تاریک خانه ظاهر می‌گردید. داده‌ها به‌صورت دانسیتومتری و نرمالایز شده با بتا اکتین و با استفاده از نرم افزار NIH Image-J ویرایش ۱/۴۴ نشان داده شده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به صورت انحراف معیار± میانگین بیان گردید. به‌منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار Prism ویرایش ۵ استفاده گردید. برای مقایسه داخل گروهی، در گروه تحمل و هیپرآلجزیا از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه Repeated measure one way ANOVA و تست تعقیبی Tukey و برای بررسی اثر زمان در گروه‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه

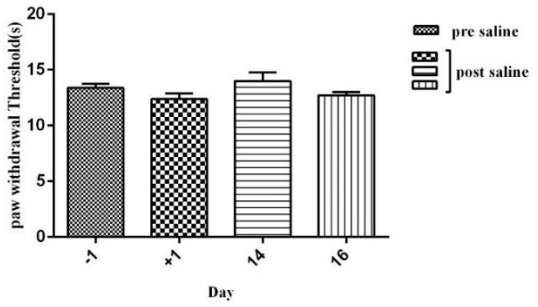
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

two way ANOVA و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. (P<۰/۰۵) به عنوان معنی‌داری در نظر گرفته شد. در گروه‌های مولکولی داده‌ها به صورت دانسیتومتری با استفاده از Image-J بیان شد و در گروه‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه one way ANOVA و تست تعقیبی دانت و t-test استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در گروه کنترل (تزریق سالین)

مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴روزه سالین اختلاف معنی‌داری را در روزهای آزمایش با یکدیگر و با قبل از تزریق سالین نشان نداد. لذا در هر گروه روز اول و قبل از تزریق بعنوان کنترل در هر گروه در نظر گرفته شد که به‌صورت (۱-) در نمودارها نشان داده شده است (نمودار ۱).

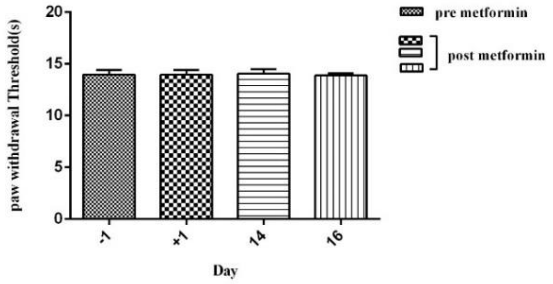


نمودار ۱) نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴روزه سالین.

Fig 1) The results of behavioral Hargreaves test after 14 days of saline injection.

نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در گروه متفورمین به تنهایی

مقایسه نتایج رفتاری حاصل از تزریق ۱۴ روزه متفورمین به تنهایی با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم و به‌صورت داخل صفاقی نشان داد که به‌علت بی اثر بودن دوز ۵۰ میلی‌گرم روی پدیده‌های تحمل و هایپرآلجزیا از آن صرفنظر شد ولی مشابه بودن اثر دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم منجر به استفاده از دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم گردید. نتایج رفتاری حاصل از متفورمین ۱۰۰ میلی گرم به تنهایی نیز در روزهای مورد آزمایش کاهش معنی‌داری را روی تحمل و هیپرآلجزیا نشان نداد (نمودار ۲).



نمودار ۲) نتایج رفتاری حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه متفورمین.

Fig 2) The results of behavioral Hargreaves test after 14 days of metformin.

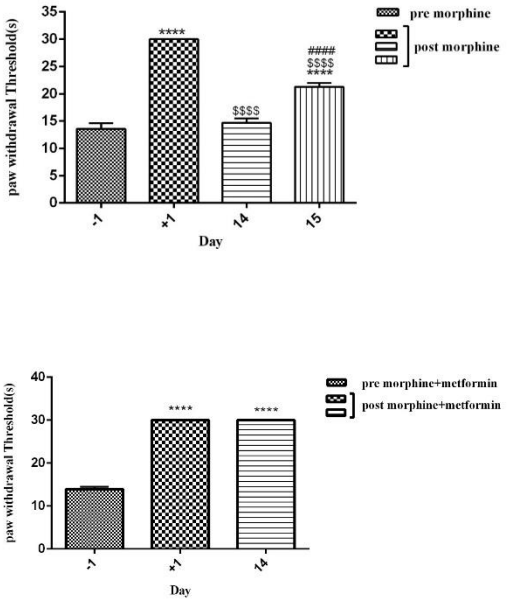
نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در گروه تحمل به اثرات ضد دردی مورفین به تنهایی و مورفین به‌همراه متفورمین

مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴روزه مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و به‌صورت زیر جلدی سبب افزایش معنی‌دار آستانه پس کشیدن پا در روز اول نسبت به کنترل (قبل از تزریق) شد (P<۰/۰۰۰۱). ولی مقایسه نتایج روز ۱۴ با کنترل کاهش معنی‌داری را در اثر ضد دردی مورفین نشان نداد. همچنین مقایسه نتایج روز ۱۴ با روز ۱ کاهش معنی‌دار اثر ضد دردی مورفین را در روز ۱۴ نشان داد (P<۰/۰۰۰۱).

برای تأیید کاهش اثر ضد دردی مورفین و یا به عبارتی تأیید پیدایش تحمل، پس از تزریق ۱۴روزه مورفین، در روز ۱۵ دوز بالاتری از مورفین یعنی ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

تزریق گردید. در این دوز از مورفین افزایش معنی‌داری در اثر ضددردی مورفین در مقایسه با قبل(P<۰/۰۰۰۱) و بعد از تزریق اولین دوز مورفین (P<۰/۰۰۰۱) و با روز ۱۴ (P<۰/۰۰۰۱) مشاهده شد (نمودار ۳ الف).



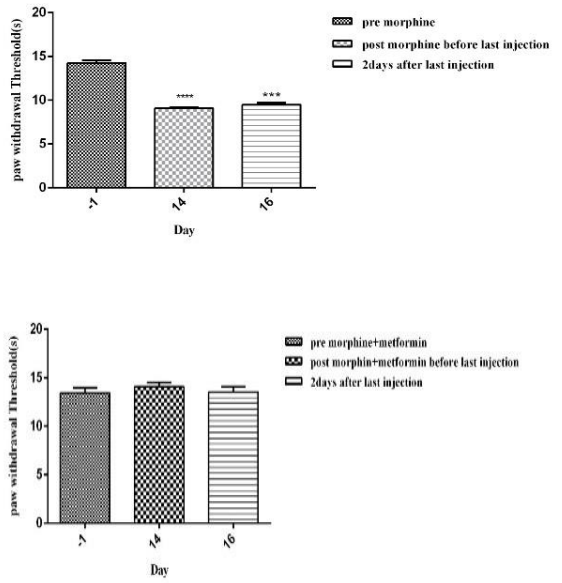
نمودار۳ الف و ب) نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در گروه تحمل به اثرات ضد دردی مورفین به تنهایی و مورفین به همراه متفورمین
****P<۰/۰۰۰۱، $$$$P<۰/۰۰۰۱، #### P<۰/۰۰۰۱، ***P<۰/۰۰۱

Fig 3) (A and B)- The results of behavioral Hargreaves test in tolerating group to morphine and morphine+metformin
**** P<0.0001, $$$$ P<0.0001, #### P<0.0001 *** P<0.001

مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به همراه متفورمین به میزان ۱۰۰میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب افزایش معنی‌دار آستانه پس کشیدن پا در روز ۱۴ و ۱ نسبت به کنترل شد (P<۰/۰۰۱) همچنین مقایسه اثر ضد دردی مورفین به همراه متفورمین در روز ۱۴ با روز ۱ پس از تزریق اولین دوز مورفین به همراه متفورمین اختلاف معنی‌داری نشان نداد. این نتیجه بیانگر کاهش تحمل به اثر ضد دردی مورفین به دنبال تزریق متفورمین به همراه مورفین می‌باشد (نمودار۳ ب).

نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز درگروه هایپرآلجزیای ناشی از مورفین به تنهایی و مورفین به همراه متفورمین

مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و به‌صورت زیر جلدی کاهش معنی‌دار آستانه پس کشیدن پا را در روز ۱۴ قبل از تزریق آخرین دوز مورفین نسبت به کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱). مقایسه نتایج حاصل از تست هارگریوز در روز ۱۶، (۴۸ ساعت پس از قطع تزریق مورفین) نیز نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را در آستانه پس کشیدن پا نشان داد (P<۰/۰۰۱). مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در روز ۱۶ نسبت به روز ۱۴ معنی‌دار نبود (نمودار ۴ الف).



نمودار ۴ الف و ب) نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در گروه هیپرآلجزیای ناشی از مورفین به تنهایی و مورفین به همراه متفورمین
***P<۰/۰۰۱.

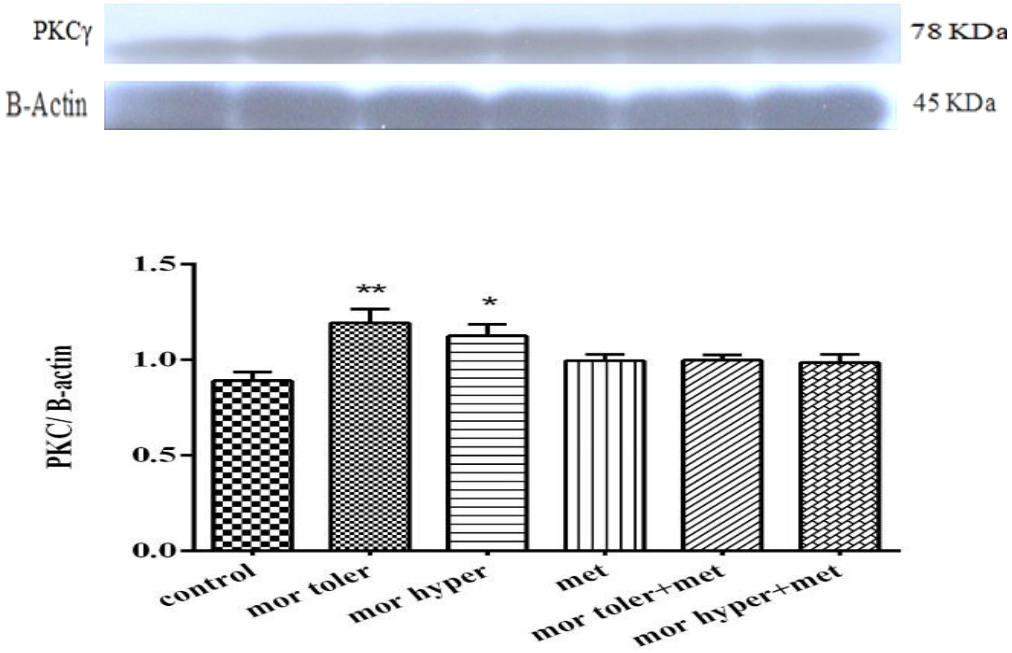
Fig 4 (A and B)- The results of behavioral Hargreaves test in hyperalgesia group to morphine and morphine+metformin.*** P<0.001

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به همراه متفورمین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم سبب افزایش آستانه پس کشیدن پا در روزهای ۱۴ و ۱۶ گردید به طوری‌که به میزان آستانه پس کشیدن پا در کنترل رسید و با آن معنی‌دار نگردید. همچنین در مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین به همراه متفورمین در روز ۱۴ نسبت به روز ۱۶ اختلاف معنی‌داری دیده نشد (نمودار ۴ ب).

نتایج حاصل از تغییر بیان PKC به دنبال تجویز مورفین، مورفین به‌همراه متفورمین در گروه تحمل به مورفین و گروه هیپرآلجزیا در مقایسه با کنترل

مقایسه نتایج میزان بیان PKCγ به روش وسترن بلات در گروه تحمل و هایپرآلجزیا نشان داد که تجویز ۱۴ روزه مورفین سبب افزایش معنی‌دار PKCγ در روز ۱۴ در شرایط تحمل (P<۰/۰۱) و در روز ۱۶ در شرایط هیپرآلجزیا (P<۰/۰۵) نسبت به کنترل شد. به عبارتی در شرایط تحمل میزان بیان PKCγ در مقایسه با کنترل بیشتر از بیان آن در هیپرآلجزیا بود ولی مقایسه نتایج بیان PKCγ در شرایط تحمل با هیپرآلجزیا اختلاف معنی‌داری نشان نداد. همچنین مقایسه بیان PKCγ در گروه دریافت کننده ۱۴روزه مورفین به همراه متفورمین در شرایط تحمل و هیپرآلجزیا با کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت ولی مقایسه بیان PKCγ در گروه دریافت کننده ۱۴روزه مورفین به همراه متفورمین در شرایط تحمل کاهش معنی‌داری را در روز ۱۴ در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین به تنهایی نشان داد (P<۰/۰۵). گرچه مقایسه بیان PKCγ در گروه دریافت کننده ۱۴روزه مورفین به همراه متفورمین در شرایط هیپرآلجزیا نیز در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین به تنهایی در روز ۱۶ کاهش یافته بود ولی با آن معنی‌داری نبود (نمودار ۵).



نمودار ۵) نتایج حاصل از تغییر بیان PKCγ به دنبال تجویز مورفین، مورفین به همراه متفورمین در گروه تحمل به مورفین و گروه هیپرآلجزیا در مقایسه با کنترل P*<۰/۰۵، P**<۰/۰۱.

Fig 5) The results of PKCγ expression changes following morphine and morphine+metformin injection in tolerating and hyperalgesic groups to compare of control P<0. 01** P<0.05, *

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

بحث

مقایسه نتایج به دست آمده از تزریق ۱۴ روزه مورفین به‌صورت زیر جلدی، در تست هارگریوز افزایش معنی‌داری را در روز اول پس از اولین تزریق مورفین با کنترل (قبل از تزریق مورفین) نشان داد ولی مقایسه روز ۱۴ پس از تزریق مورفین با کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت که می‌تواند حاکی از پیدایش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین در این روز می‌باشد. برای تأئید تحمل در روز ۱۵ از دوز بالاتر مورفین استفاده گردید که توانست با افزایش آستانه درد، تا حد زیادی بی‌دردی کاهش یافته حاصل از تزریق مکرر مورفین را برگرداند. که این خود با تعریفی که از تحمل به اثر ضددردی مورفین می‌شود همخوانی دارد. تحمل مطابق این تعریف عبارت است از: کاهش اثر ضد دردی مورفین در اثر استفاده مزمن و با یک دوز ثابت که برای حفظ بی‌دردی باید دوز دارو را افزایش داد (۷ و ۸). بررسی هیپرآلجزیای حاصل از تزریق ۱۴ روزه مورفین در روز ۱۴ قبل از تزریق مورفین و ۴۸ ساعت پس از تزریق آخرین دوز آن یعنی روز ۱۶، پردردی حرارتی معنی‌داری نسبت به کنترل نشان داد که با کاهش آستانه پس کشیدن پا مشخص گردید. در ادامه این پژوهش اثر متفورمین روی تحمل و هیپرآلجزیای حاصل از تزریق مکرر مورفین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که متفورمین توانست هیپرآلجزیای ناشی از مورفین و تحمل به اثرات ضد دردی آن را کاهش دهد و سبب بهبود اثرات ضددردی آن شود.

همسو با این نتایج مائو و همکاران در مطالعه‌ای با تزریق ۱۰ میکروگرم مورفین به‌صورت اینتراتکال و یک بار در روز و به مدت ۸ روز متوالی تحمل به اثرات ضددردی مورفین را در روز ۸ و هیپرآلجزیا را در روز ۱۰ گزارش نمودند. برای بررسی ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین تست tail-flick را در روز اول قبل و بعد از اولین دوز مورفین ودر روز ۸ به دنبال تزریق آخرین دوز مورفین انجام دادند و پدیده تحمل را مشاهده کردند. آنها همچنین جهت بررسی هیپرآلجزیای حرارتی ناشی از مورفین، از تست هارگریوز در روز اول قبل از تزریق مورفین و در روز ۸ قبل از تزریق آخرین دوز مورفین و در روز۱۰ یعنی ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق مورفین استفاده نمودند و در نهایت کاهش پیشرونده‌ای را در آستانه درد گزارش دادند (۱۲ و ۱۸).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر علیرغم تفاوت در روش و روزهای مورد آزمایش، با نتیجه مائو که تحمل و هیپرآلجزیا را بدنبال استفاده مکرر مورفین نشان داده بود همخوانی داشت به‌طوری که در پژوهش حاضر از تزریق ۱۴ روزه مورفین به‌صورت زیر جلدی استفاده شده و پدیده تحمل در روز ۱۴ پس تزریق آخرین دوز مورفین و هیپرآلجزیا در روز ۱۴ قبل از آخرین دوز تزریق مورفین و دو روز بعد در روز ۱۶ گزارش گردید. نتایج پژوهش حاضر همچنین نشان داد که تجویز ۱۴ روزه مورفین سبب افزایش معنی‌دار بیان PKCγ در شرایط تحمل و هیپرآلجزیا نسبت به کنترل شده است که این افزایش در شرایط تحمل ($P<۰/۰۱$) بیشتر از هیپرآلجزیا ($P<۰/۰۵$) بود گرچه مقایسه بیان PKCγ در شرایط تحمل و هیپرآلجزیا با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان نداد. البته باید توجه داشت که هیپرآلجزیا و تحمل ناشی از مصرف مکرر مورفین دو پدیده مجزا هستند بدین معنی که هیپرآلجزیای ناشی از مورفین گونه‌ای از افزایش حساسیت متناقضی می‌باشد که بعد از مواجه کوتاه مدت یا بلند مدت با مورفین ایجاد می‌شود در حالی‌که همانطور که در بالا ذکر گردید تحمل پدیده‌ای است که در مواجه مکرر با مورفین حاصل می‌گردد که سبب کاهش اثر ضد دردی آن می‌شود به طوری که برای ایجاد اثر بی‌دردی به دوز بالاتری نیاز می‌باشد (۱۹). مائو همچنین به‌منظور بررسی مکانیسم‌های دخیل در دو پدیده تحمل و هیپرآلجزیا نقش رسپتورهای اسیدهای آمینه تحریکی مانند NMDA و

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

مولکول داخل سلولی PKC را مورد بررسی قرار داد. او از آنتاگونیست رسپتور NMDA یعنی (MK801) و مهارکننده PKC یعنی (GM1) استفاده نمود و مشاهده کرد که MK801 و GM1 هیپرآلجزیای ناشی از مورفین و تحمل به اثرات ضددردی مورفین را بهبود داده‌اند. ولی آنها در تحقیق خود به نقش زیر گروه‌های PKC اشاره‌ای ننمودند (۱۲). ولی در پژوهش حاضر برای پی بردن به نقش PKC در شرایط تحمل و هیپرآلجزیای حاصل از مورفین زیر واحد گامای آن مورد بررسی قرار گرفت و همانطور که در نتایج اشاره شد بیان آن در شرایط تحمل در مقایسه با کنترل بیشتر از هیپرآلجزیا با کنترل بود. در ادامه آزمایشات جهت کاهش بیان PKCγ، تحمل و هیپرآلجزیا از متفورمین که یک داروی ضد هیپرگلیسمی است استفاده شد. متفورمین به مدت ۱۴ روز همراه با مورفین تزریق گردید و تست رفتاری هارگریوز نشان داد که متفورمین توانسته است تحمل به اثرات ضد دردی مورفین و هیپرآلجزیای ناشی از آن را کاهش دهد. این در حالی است که مصرف متفورمین به تنهایی به مدت ۱۴ روز افزایش معنی‌داری را در آستانه پس کشیدن پا در روزهای آزمایش نشان نداد.

لذا بنظر می‌رسد اثر متفورمین زمانی آشکار می‌شود که به همراه مورفین تجویز شود. از این رو همانطور که در این پژوهش نیز اشاره شد متفورمین به مدت ۱۴ روز همراه با مورفین تزریق گردید و سبب افزایش آستانه پس کشیدن پا و یا به عبارتی کاهش تحمل و هیپرآلجزیا و همچنین کاهش بیان PKCγ در روزهای ۱۴ و ۱۶ نسبت به گروه دریافت کننده مورفین در روزهای مشابه شد و حتی میزان بیان آن در این روزها به حد کنترل رسید. این نتایج می‌تواند نشان دهنده اثر متفورمین به‌همراه مورفین روی کاهش این دو پدیده در ارتباط با کاهش بیان PKCγ باشد. سانگ و همکاران روند پیدایش تدریجی هیپرآلجزیای ناشی از مورفین و تحمل به اثرات ضد دردی آنرا مورد بررسی قرار دادند. آنها در مطالعه خود پیدایش تدریجی پدیده تحمل و هیپرآلجزیای ناشی از مورفین را با تست رفتاری فون فری و هارگریوز قبل از تزریق مورفین و سپس بعد از تزریق آن در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۴ ارزیابی نمودند. آنها ایجاد هیپرآلجزیا و تحمل به اثرات ضددردی مورفین را از روز ۳ تا روز ۱۴ به‌صورت تدریجی و پیشرونده نشان دادند (۱۵). ولی در پژوهش حاضر این روند مورد نظر نبوده و تحمل تنها در روز ۱۴ پس از تزریق آخرین دوز مورفین و هیپرآلجزیای حرارتی در روز ۱۴ قبل از تزریق آخرین دوز مورفین و سپس در روز ۱۶ اندازه‌گیری شد که نتایج حاکی از ایجاد هر دو پدیده در روزهای ۱۴ و ۱۶ آزمایش بود.

سانگ همچنین در مطالعه خود با اندازه‌گیری بیان PKCγ و زیر واحد NR 1 گیرنده NMDA نقش آنها را در تحمل و هیپرآلجزیای ناشی از مصرف مکرر مورفین نشان داد وی در ادامه پژوهش خود از ملاتونین جهت مهار PKCγ استفاده نمود و مشاهده کرد که ملاتونین توانسته است از بروز تحمل و هیپرآلجزیا با کاهش بیان PKCγ و زیر واحد NR1 گیرنده NMDA جلوگیری نماید (۱۵). در پژوهش حاضر از متفورمین برای کاهش تحمل و هیپرآلجزیا و بیان PKCγ استفاده شد. متفورمین توانست تحمل و هیپرآلجزیای حاصل از استفاده مکرر مورفین و بیان PKCγ. را کاهش دهد. همان‌طور که تحقیقات متعدد نشان داده است استفاده مکرر از مورفین با دوزهای مختلف و به اشکال متفاوت منجر به پیدایش تحمل و هیپرآلجزیا می شود. نکته مهم در تمام این تحقیقات پیدا کردن راه حلی جهت کاهش این دو پدیده بهنگام استفاده مکرر از مورفین می‌باشد، از قبیل شناخت مولکول‌های دخیل در پیدایش آنها و یا استفاده از داروهای مختلف جهت مهار آنها. از اینرو در پژوهش حاضر میزان بیان PKCγ و مهار آن مورد توجه قرار گرفت به‌خصوص که نقش آن در هیپرآلجزیا کمتر مورد توجه قرار گرفته است. همان طور که در بالا ذکر گردید میزان بیان PKCγ در تحمل و هیپرآلجزیا افزایش یافت ولی این افزایش در تحمل بیشتر بود که می‌تواند دلیلی بر متفاوت بودن مکانیسم‌های دخیل در این

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

دو پدیده باشد. از طرفی برای کاهش تحمل و هیپرآلجزیا و بیان PKCγ از متفورمین استفاده شد. علیرغم آنکه متفورمین به‌عنوان یک داروی کاهش دهنده قند خون شناخته می‌شود ولی نشان داده شده است که دارای اثراتی فراتر از کاهش قند خون می‌باشد. همانطور که نتایج این پژوهش نشان داد متفورمین به تنهایی در تست هارگریوز اثری روی رفتار درد نداشت ولی استفاده آن به همراه مورفین توانست سبب بهبود اثرات ضد دردی مورفین شود و تحمل و هیپرآلجزیا و بیان PKCγ نخاعی را کاهش دهد. در رابطه با اثرات غیر کلاسیک متفورمین، پن (Pan) و همکاران در بررسی‌های خود روی ایجاد تحمل به اثرات ضد دردی مورفین به نقش میکروگلیاها اشاره نمودند. آنها با استفاده از متفورمین به عنوان مهار کننده میکروگلیا کاهش تحمل به اثر ضددردی مورفین را نشان دادند و بدین ترتیب پیشنهاد نمودند که می‌توان در کلینیک با استفاده از متفورمین بی‌دردی حاصل از مورفین را که طی استفاده مکرر کاهش می‌یابد بهبود داد. جالب آنکه متفورمین، علیرغم آنکه یک داروی ضد هیپرگلیسمی است ولی توانسته است با مهار سایتوکاین‌هایی که توسط مورفین فعال شده و در ایجاد تحمل نقش داشته‌اند از بروز تحمل جلوگیری نماید. در مطالعه پن، تزریق مورفین به‌صورت زیر جلدی و دو بار در روز و به‌مدت ۷ روز منجر به پیدایش تحمل شده بود. او برای سنجش درد از تست tail- flick استفاده کرده بود. تزریق دوزهای مختلف متفورمین توانسته بود به‌صورت وابسته به دوز تحمل را کاهش دهد. پن در آزمایشات خود متفورمین را با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم ۱۵ دقیقه قبل از مورفین تزریق می‌کرد. او متوجه شد که متفورمین به تنهایی اثری روی آستانه درد ندارد ولی چنانچه به‌طور مکرر و همراه مورفین استفاده گردد تحمل به اثرات ضد دردی آنرا کاهش می‌دهد.

پن همچنین در جستجوی مکانیسم متفورمین متوجه شد که استفاده مکرر مورفین سبب افزایش فعالیت میکروگلیا و بیان مارکر Iba-1 می‌شود. تزریق صفاقی متفورمین توانست با مهار میکروگلیا در بهبود اثر ضددردی مورفین سودمند باشد (۱۹). در پژوهش حاضر دوز ۵۰ میلی‌گرم متفورمین اثری روی تحمل و هیپرآلجزیا نداشت و دوزهای بالاتر یعنی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم نیز روی این دو پدیده دارای اثری مشابه بودند. به‌علاوه استفاده از متفورمین به تنهایی نیز اثری روی دو پدیده تحمل و هیپرآلجزیا نداشت ولی استفاده مکرر متفورمین به‌همراه مورفین تحمل و هیپرآلجزیا را کاهش داد که از این جهت با نتایج پن همسو بود. پن همچنین گزارش داد که متفورمین احتمالاً در مهار PKCγ نیز نقش داشته باشد زیرا فعالیت PKCγ نقش مهمی در حساسیت مرکزی ناشی از تحمل به مورفین دارد که می‌تواند در تحریک‌پذیری نورون‌های درد شرکت کند. وی پیشنهاد نمود که متفورمین با مهار فعالیت میکروگلیا و کاهش حساسیت مرکزی در نخاع می‌تواند در کاهش تحمل به مورفین مشارکت داشته باشد. شواهد نشان داده است که متفورمین عمل خود را از طریق فعال کردن Adenosin monophosphate activated protein kinase (AMPK) با مهار میکروگلیا انجام می‌دهد از اینرو به‌نظر می‌رسد که در کاهش تحمل و بهبود اثر ضد دردی مورفین در کلینیک نقش داشته باشد (۱۹). البته متفورمین نیز در پژوهش حاضر به تنهایی اثری روی آستانه درد نداشت ولی توانست به‌همراه مورفین میزان تحمل و هیپر آلجزیای ناشی از تزریق مکرر مورفین و میزان بیان PKCγ را کاهش دهد.جین (Jin) و همکاران، نیز با تزریق ۱۰ میکروگرم مورفین به صورت اینتراتکال به مدت ۵ روز تحمل به اثرات ضددردی مورفین را مشاهده نمودند و آنرا با تست‌های رفتاری هات پلیت (حرارتی) و Randall Selitto (هیپرآلجزیای مکانیکی) ارزیابی کردند. آنها افزایش بیان PKC را در تحمل به اثرات ضد دردی مورفین در نخاع با روش وسترن بلات گزارش نمودند، سپس با استفاده از مهارکننده اختصاصی آن (chelerythrin) به‌صورت اینتراتکال از ایجاد تحمل به اثرات ضددردی مورفین جلوگیری نمودند. آنها گزارشی در ارتباط با هیپرآلجزیا ارائه

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

ننمودند (۲۰). مکانیسم‌های نوروبیولوژیکی تحمل به اپیوئیدهاو مکانیسم‌های دقیق هایپرآلجزیای ناشی از آن تا کنون بخوبی شناخته نشده است (۲۱). تحمل به اثرات ضد دردی مورفین وهیپرآلجزیای ناشی از آن دارای دو مکانیسم سلولی متفاوت می‌باشد که شامل غیرحساس شدن گیرنده اوپیوییدی در تحمل و حساس شدن گیرنده درد در هیپرآلجزیا می‌باشد (۱). از جمله مکانیسم‌های سلولی مورد توجه، مسیر فعالیت PKC داخل سلول می‌باشد که مطالعات مختلف به مهارکننده‌های اختصاصی آن شامل GM1 (۱۸)، bisindolylmaleimide I و chelerythrin (۲۲)، Go7874 (۲۱) Go6976 (۲۳) اشاره نموده‌اند. در پژوهش حاضر از متفورمین نه به‌عنوان یک داروی مؤثر در درمان دیابت بلکه به عنوان مهار کننده غیراختصاصی PKC با توجه به نقش آن در تضعیف عوارض جانبی حاصل از استفاده مکرر مورفین مورد توجه بوده است. لازم به ذکر است که داروی متفورمین خط اول درمان در دیابت تیپ ۲ می‌باشد و مکانیسم دقیق عملکرد آن ناشناخته است.گالو (Gallo) و همکاران با مطالعه روی سلول‌های اندوتلیال ورید نافی جفت انسان نشان دادند که متفورمین از فعالیت PKCβII در هیپرگلیسمی پیشگیری می نماید (۲۴). ماهانی و همکاران، نقش PKC را در هیپرآلجزیای ایجاد شده با حداقل دوز مورفین بررسی نمودند و با استفاده از مهار کننده اختصاصی آن (chelerythrin) آستانه درد را با تست رفتاری tail-flick ارزیابی کرده و افزایش آن را پس از مهار PKC گزارش نمودند (۲۵). بنابراین همان‌طور که در پژوهش حاضر اشاره شد متفورمین سبب کاهش تحمل به اثر ضد دردی مورفین و هیپرآلجزیای ناشی از آن و کاهش بیان PKC گردید.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که ایزوزیم PKCγ می‌تواند در بروز تحمل و القای هیپرآلجزیای حاصل از استفاده مکرر مورفین نقش داشته باشد و متفورمین به عنوان یک داروی غیر اختصاصی مهار کننده PKC توانست تحمل و هیپرآلجزیا را کاهش دهد.

این پژوهش تحت حمایت مالی سازمان و یا مؤسسه‌ای نبوده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Lim G, Wang S, Mao J. cAMP and protein kinase A contribute to the downregulation of spinal glutamate transporters after chronic morphine. Neuroscience letters. 2005;376(1):9-13.
2.Mayer DJ, Mao J, Price DD. The development of morphine tolerance and dependence is associated with translocation of protein kinase C. Pain. 1995;61(3):365-74.
3.Xu T, Chen M, Zhou Q, et al. Antisense oligonucleotide knockdown of mGlu 5 receptor attenuates the antinociceptive tolerance and up-regulated expression of spinal protein kinase C associated with chronic morphine treatment. European journal of pharmacology. 2012;683(1):78-85.
4.Shokoofeh S, Homa M, Leila D, Samira D. Expression of spinal cord GABA transporter 1 in morphine-tolerant male Wistar rats. European journal of pharmacology. 2015;767:77-81.
5.Angst MS, Clark JD. Opioid-induced Hyperalgesia. A Qualitative Systematic Review. The Journal of the American Society of Anesthesiologists. 2006;104(3):570-587.
6.Drdla R, Gassner M, Gingl E, Sandkühler J. Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal. Science. 2009;325(5937):207-210.
7.Smith FL, Javed RR, Smith PA, et al. PKC and PKA inhibitors reinstate morphine-induced behaviors in morphine tolerant mice. Pharmacological research. 2006;54(6):474-80.
8.DuPen A, Shen D, Ersek M. Mechanisms of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. Pain Management Nursing. 2007;8(3):113-121.
9.Zaringhalam J, Manaheji H, Mghsoodi N, et al. Spinal μ-opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthritis in rats. Clinical and

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

experimental pharmacology and physiology. 2008;35(11):1309-1315.
10.Nazemi S, Manaheji H, Zaringhalam J, et al. Post-injury repeated administrations of minocycline improve the antinociceptive effect of morphine in chronic constriction injury model of neuropathic pain in rat. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2012;102(4):520-525.
11.Hamidi GA, Manaheji H, Janahmadi M, et al. Co-administration of MK-801 and morphine attenuates neuropathic pain in rat. Physiology & Behavior. 2006;88(4-5):628-636.
12.Mao J, Price DD, Mayer DJ. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. Journal of Neuroscience. 1994;14(4):2301-2312.
13.Igwe O, Chronwall B. Hyperalgesia induced by peripheral inflammation is mediated by protein kinase C βII isozyme in the rat spinal cord. Neuroscience. 2001;104(3):875-890.
14.Yajima Y, Narita M, Shimamura M, et al. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. Brain Research. 2003;992(2):288-293.
15.Song L, Wu C, Zuo Y. Melatonin prevents morphine-induced hyperalgesia and tolerance in rats: role of protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptors. BMC Anesthesiology. 2015;15(12): 1-8.
16.Bailey CP, Smith FL, Kelly E, et al. How important is protein kinase C in μ-opioid receptor desensitization and morphine tolerance? Trends in pharmacological sciences. 2006; 27(11):558-565.
17.Sjøgren P, Jensen N-H, Jensen TS. Disappearance of morphine-induced hyperalgesia after discontinuing or substituting morphine with other opioid agonists. Pain. 1994;59(2):313-316.
18.Mao J. Overview on opioid induced- hyperalgesia. In: Mao J. first eds; Opioid induced-hyperalgesia. New York: Informa healthcare Inc, 2010, 1-9.
19.Pan Y, Sun X, Jiang L, et al. Metformin reduces morphine tolerance by inhibiting microglial-mediated neuroinflammation. Journal of Neuroinflammation. 2016;13(294): 1-12.
20.Jin WY, Yu LC. Involvement of protein kinase C in morphine tolerance at spinal levels of rats. ACS Chemical Neuroscience. 2010;1(2):122-128.
21.Gabra BH, Bailey CP, Kelly E, et al. Pre-treatment with a PKC or PKA inhibitor prevents the development of morphine tolerance but not physical dependence in mice. Brain Research. 2008;1217:70-77.
22.Granados-Soto V, Kalcheva I, Hua XY, et al. Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. Pain. 2000;85(3):395-404.
23.Hull LC, Llorente J, Gabra BH, Smith FL, et al. The effect of protein kinase C and G protein-coupled receptor kinase inhibition on tolerance induced by μ-opioid agonists of different efficacy. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2010;332(3):1127-1135.
24.Gallo A, Ceolotto G, Pinton P, et al. Metformin prevents glucose-induced protein kinase C-β2 activation in human umbilical vein endothelial cells through an antioxidant mechanism. Diabetes. 2005;54(4):1123-1131.
25.Esmaeili-Mahani S, Shimokawa N, Javan M, et al. Low-dose morphine induces hyperalgesia through activation of Gαs, protein kinase C, and l-type Ca2+ channels in rats. Journal of Neuroscience Research. 2008;86(2):471-479.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]

Original Article

The Role of Spinal PKCγ in Tolerance and Hyperalgesia Induced by Repeated Morphine Administration in Male Rats

K. Ghasemloo (MSc)[1], H. Manaheji (PhD)[1,2], L. Dargahi (PhD)[3], S. pandamooz (PhD)[3]*

[1] Department of Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Tehran, Iran
[2] Neurophysiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Tehran, Iran
[3] Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Tehran, Iran

(Received 7 Feb 2017 Accepted 23 Jul 2017)

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate the possible role of Protein Kinase C_γ (PKC_γ) in morphine tolerance and induced hyperalgesia following repeated morphine administration in male rats.

Material and Methods: Rats were divided into 4 groups for testing. The groups consisted of control (saline), morphine tolerance and hyperalgesia, metformin, morphine tolerance and hyperalgesia + metformin. First morphine (10mg/kg, s.c) administrated daily up to 14 days subcutaneously. Hargreaves' behavioral test was performed to evaluate morphine tolerance. The test was ececuted before morphin injection and the results considered as "control" .Then the test repeated after the first dose of morphine on the first day and then on day14th after the last injection. To consider morphine hyperalgesia PWL (Paw Withdrawal Latency) was measured by Hargreaves test before and after first morphine injection on the first day and then on day 14th before the last injection of morphine and on day16th two days after the last injection of morphine. The expression of spinal PKC_γ measured on day 14th and 16th. Metformin 100mg/kg, co-administrated with morphine daily up to 14 days then PWL and PKC_γ expression were assessed as mentioned above.

Results: The results showed a significant tolerance and hyperalgesia on day 14th and 16th compareed to control. PKC_γ expression also increased significantly on day 14th and 16th compareed to control. However, there was no significant difference in comparison between day 14th and day 16th. Co-administration of metformin and morphine up to 14 days increased PWL in morphine tolerance and reduced hyperalgesia and PKC_γ expression.

Conclusion: The results showed that increasing of spinal PKC_γ expression in chronic morphine administration might be involved in morphine tolerance mechanism and induced hyperalgesia.

Key words: morphine tolerance, hyperalgesia, metformin, PkC_γ

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Ghasemloo K, Manaheji H, Dargahi L. pandamooz S. The Role of Spinal PKCγ in Tolerance and Hyperalgesia Induced by Repeated Morphine Administration in Male Rats. Iran South Med J 2018; 20(6): 527-539

Copyright © 2018 Ghasemloo, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*] *Addressforcorrespondence:* Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran. Email: manahejih@sbmu.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-08]