



## بررسی نقش $PKC\gamma$ نخاعی در تحمل و هیپرآلجزیای القا شده بدنبال تجویز مکرر مورفین در موش‌های صحرایی نر

کبری قاسملو (MSc)<sup>۱</sup>، هما مناهجی (PhD)<sup>۱\*</sup>، لایلا درگاهی (PhD)<sup>۲</sup>، ساره پندآموز (PhD)<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

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

### چکیده

زمینه: اپیویدهایی 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  $Protein Kinase C\gamma (PKC\gamma)$  در تحمل و هیپرآلجزیای القا شده بدنبال 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 هیپرآلجریا، متفورمین، تحمل و هیپرآلجریای القا شده به مورفین + متفورمین بودند. ابتدا مورفین ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم و به صورت زیر جلدی یک مرتبه در روز و به مدت ۱۴ روز تزریق شد. تست رفتاری هارگریوز به ترتیب 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 هیپرآلجریا 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  $PKC\gamma$  نخاعی در روزهای ۱۴ پس از آخرین تزریق و روز ۱۶ بروش و سترن بلات سنجیده شد. متفورمین به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی همراه با مورفین به مدت ۱۴ روز تزریق گردید. سنجش تست رفتاری هارگریوز و میزان بیان  $PKC\gamma$  با همان روشی که در بالا اشاره شد صورت گرفت.

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

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که افزایش بیان  $PKC\gamma$  نخاعی در تحمل و القای هیپرآلجریای حاصل از استفاده مکرر مورفین می‌تواند نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: تحمل به مورفین، هیپرآلجریا، متفورمین،  $PKC\gamma$

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

## مقدمه

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

ساده‌ترین تعریف از هیپرآلجی پیدایش پردردی در حضور و یا حتی عدم حضور محرک دردناک می‌باشد و پدیده‌ای است که بدنال استفاده مکرر و طولانی مدت اپیویدها نیز ایجاد می‌شود (۵ و ۶). ولی تحمل به اثر ضد درد مورفین از نظر فارماکولوژی شیف 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 هیپرآلجی 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 هیپرآلجی ناشی از مصرف مکرر مورفین با مکانیسم‌های درگیر در تحمل و هیپرآلجی حاصل از دردهای التهابی و نوروپاتیک مشابه است (۹ و ۱۰). از جمله مکانیسم‌های پیشنهادی دخیل در گسترش پدیده تحمل و هیپرآلجی القا شده به دنبال تجویز مکرر مورفین، از Protein Kinase C (PKC) نام برده می‌شود. به نظر می‌رسد که مسیر پیامبرهای ثانویه فعال کننده PKC و PKA در بروز پدیده تحمل اپیویدها نقش بالقوه‌ای داشته باشند (۷). تجویز مزمن اپیویدها با افزایش بیان PKC داخل

سلولی سبب فعال شدن رسپتور N-Methyl- (NMDA) D- Aspartate می‌شود که این خود در مکانیسم هیپرآلجی دخیل است (۱۱ و ۱۲).

آیگو (Igwe) و همکاران مشاهده کردند که مکانیسم‌های ملکولی هیپرآلجیای حرارتی ایجاد شده حاصل از تزریق کف پایی (Complete freund's adjuvant (CFA) واسطه PKC $\beta$ II صورت می‌گیرد (۱۳)، ولی از طرف دیگر یاجیما (Yajima) و همکاران نشان دادند که هیپرآلجیای حرارتی ایجاد شده توسط CFA به PKC وابسته نمی‌باشد (۱۴). سانگ (Song) و همکاران نیز، مشاهده نمودند که بدنال ایجاد پدیده تحمل و هیپرآلجیای ناشی از مصرف مزمن مورفین سطح PKC $\gamma$  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 به وجود آورده است. از جمله نشان داده شده است که مهار کننده‌های PKC از ایجاد پدیده تحمل به اثرات ضد درد 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 هیپرآلجیای ناشی از آن را نیز گزارش نمودند. آنها همچنین روشی را در رابطه با سنجش هیپرآلجیای حاصل از مصرف مزمن مورفین ارائه نمودند که در تحقیقات زیادی به آن اشاره شده است. مائو همچنین مشاهده نمود استفاده از مهار کننده PKC (GM1) می‌تواند از ایجاد هر دو پدیده تحمل و هیپرآلجیای ناشی از مورفین جلوگیری نماید. البته در تحقیقات مائو اشاره‌ای به نقش ایزوزیم‌های PKC در پدیده‌های تحمل و هیپرآلجی نشده است (۱۲). ولی بنظر می‌رسد که در بررسی مکانیسم‌های

می‌شد) و آنگاه در روز ۱۶ یعنی ۴۸ ساعت پس از تزریق آخرین دوز مورفین صورت گرفت.

برای سنجش میزان بیان PKC $\gamma$ ، 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 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم یکبار در روز به مدت ۱۴ روز و به صورت 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 میلی گرم 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 سالیین 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 میلی گرم و به تنهایی تزریق گردید و از بین این سه دوز مورد آزمایش، دوز ۱۰۰ میلی گرم انتخاب شد. لذا متفورمین با دوز ۱۰۰ میلی گرم به تنهایی و همچنین همراه با مورفین به مدت ۱۴ روز و به طور مکرر ۳۰ دقیقه پس از تزریق مورفین تزریق شد. تست رفتاری هارگریوز برای سنجش تحمل، قبل و بعد از تزریق اولین دوز مورفین به همراه متفورمین در روز اول و سپس در روز ۱۴ پس از تزریق

دخیل در ایجاد تحمل و هیپرآلجزیای ناشی از اپیوئیدها 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 هیپرآلجزیای شود به مطالعات بیشتری نیاز دارد. لذا هدف از این پژوهش بررسی نقش PKC $\gamma$  نخاعی در تحمل و هیپرآلجزیای القا شده بدنال 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 ( $22 \pm 2$ ) 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: ۱۹۴/۹۰/۳/۱۸ می‌باشد. برای انجام آزمایشات حیوانات بصورت تصادفی انتخاب و به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند.

### ۱- گروه تزریق سالیین

### ۲- گروه تحمل و هایپرآلجزیای القا شده بوسیله مورفین

### ۳- گروه متفورمین

۴- گروه تحمل و هایپرآلجزیای القا شده با مورفین + متفورمین در گروه‌های رفتاری سنجش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین با تست هارگریوز در روز اول قبل و سپس ۳۰ دقیقه پس از دریافت مورفین و آنگاه در روز ۱۴ پس از تزریق آخرین دوز آن انجام شد. سنجش هایپرآلجزیای 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

آخرین دوز مورفین به همراه متفورمین انجام گرفت. سنجش هایپرآلجریا، 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 PKC $\gamma$  بروش و سترن بلات در روزهای ۱۴ و ۱۶ نخاع بلافاصله پس از تست رفتاری خارج گردید.

### تست رفتاری هارگریوز برای سنجش هایپرآلجریای حرارتی (پلانتار تست)

به منظور ارزیابی هایپرآلجریای 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 به عنوان معیار سنجش تحمل و هایپرآلجریای حرارتی در نظر گرفته می‌شد. به منظور 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 و سترن بلاتینگ، بررسی میزان بیان پروتئین در بافت مورد مطالعه می‌باشد. به طور خلاصه، در این تکنیک باندهای

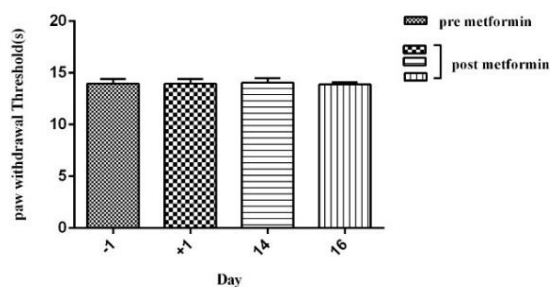
پروتئینی جدا و توسط الکتروفورز به غشای PVDF منتقل و سپس پروتئین هدف توسط آنتی بادی اختصاصی شناسایی می‌شود. باند پروتئینی مورد نظر که توسط آنتی‌بادی اولیه شناسایی شده است با استفاده از کیت ایلومینسانس (illuminescence) آشکار می‌شود. برای انجام آزمایشات ابتدا حیوانات با گاز CO<sub>2</sub> بیهوش شده و پس 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 به روش 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 mouse monoclonal anti- PKC $\gamma$  (PKC $\gamma$  با رقت ۱/۱۰۰۰۰ رقیق شده و در دمای محیط انکوبه می‌گردید. پس از آن وارد مرحله انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه (anti- PKC $\gamma$  rabbit for PKC $\gamma$  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 به صورت دانسیتمتری 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  $\pm$  میانگین بیان گردید. به منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار Prism ویرایش ۵ استفاده گردید. برای مقایسه داخل گروهی، در گروه تحمل و هایپرآلجریا از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه Repeated measure one way ANOVA و تست تعقیبی Tukey برای بررسی اثر زمان در گروه‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه

صفاقی نشان داد که به علت بی اثر بودن دوز ۵۰ میلی گرم روی پدیده های تحمل و هیپرآلجیای از آن صرف نظر شد ولی مشابه بودن اثر دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم منجر به استفاده از دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم گردید. نتایج رفتاری حاصل از متفورمین ۱۰۰ میلی گرم به تنهایی نیز در روزهای مورد آزمایش کاهش معنی داری را روی تحمل و هیپرآلجیای 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 به همراه متفورمین**

مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم و به صورت زیر جلدی سبب افزایش معنی دار آستانه پس کشیدن پا در روز اول نسبت به کنترل (قبل از تزریق) شد ( $P < 0.0001$ ). ولی مقایسه نتایج روز ۱۴ با کنترل کاهش معنی داری را در اثر ضد دردی مورفین نشان نداد. همچنین مقایسه نتایج روز ۱۴ با روز ۱ کاهش معنی دار اثر ضد دردی مورفین را در روز ۱۴ نشان داد ( $P < 0.0001$ ).

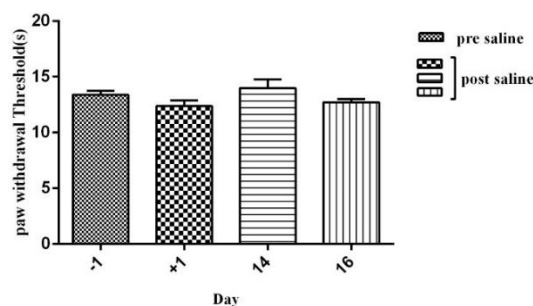
برای تأیید کاهش اثر ضد دردی مورفین و یا به عبارتی تأیید پیدایش تحمل، پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین، در روز ۱۵ دوز بالاتری از مورفین یعنی ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم

two way ANOVA و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. به عنوان معنی داری در نظر گرفته شد. در گروه های مولکولی داده ها به صورت دانسیتومتری با استفاده از Image-J بیان شد و در گروه های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه one way ANOVA و تست تعقیبی دانت و t-test استفاده گردید.

## یافته ها

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

مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه سالین اختلاف معنی داری 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 به صورت (۱-) در نمودارها نشان داده شده است (نمودار ۱).



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

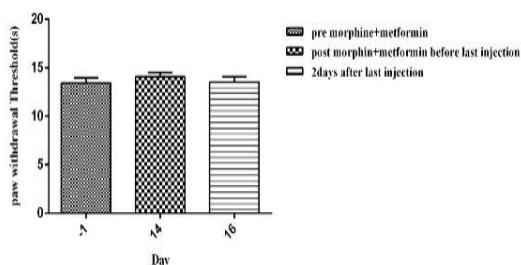
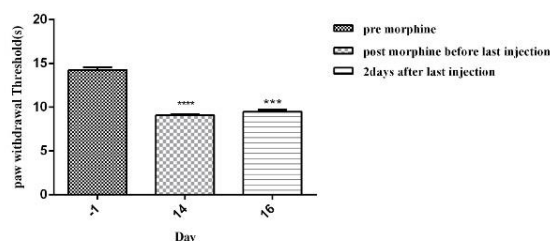
Fig 1) The results of behavioral Hargreaves test after 14 days of saline injection.

### 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 میلی گرم و به صورت داخل

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

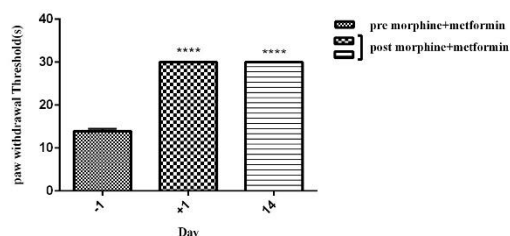
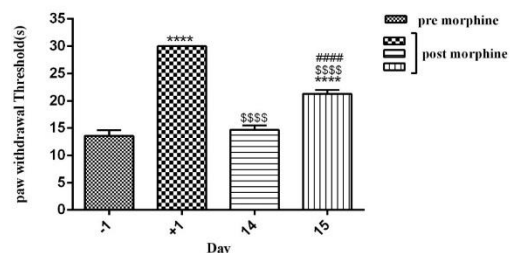
مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم و به صورت زیر جلدی کاهش معنی دار آستانه پس کشیدن پا را در روز ۱۴ قبل از تزریق آخرین دوز مورفین نسبت به کنترل نشان داد ( $P < 0.001$ ). مقایسه نتایج حاصل از تست هارگریوز در روز ۱۶، (۴۸ ساعت پس از قطع تزریق مورفین) نیز نسبت به کنترل کاهش معنی داری را در آستانه پس کشیدن پا نشان داد ( $P < 0.001$ ). مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در روز ۱۶ نسبت به روز ۱۴ معنی دار نبود (نمودار ۴ الف).



نمودار ۴ الف و ب) نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در گروه هایپرآلجزیای ناشی از مورفین به تنهایی و مورفین به همراه متفورمین. \*\*\* $P < 0.001$

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

تزریق گردید. در این دوز از مورفین افزایش معنی داری در اثر ضد درد مورفین در مقایسه با قبل ( $P < 0.0001$ ) و بعد از تزریق اولین دوز مورفین ( $P < 0.0001$ ) و با روز ۱۴ ( $P < 0.0001$ ) مشاهده شد (نمودار ۳ الف).



نمودار ۳ الف و ب) نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز در گروه تحمل به اثرات ضد درد مورفین به تنهایی و مورفین به همراه متفورمین. \*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

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

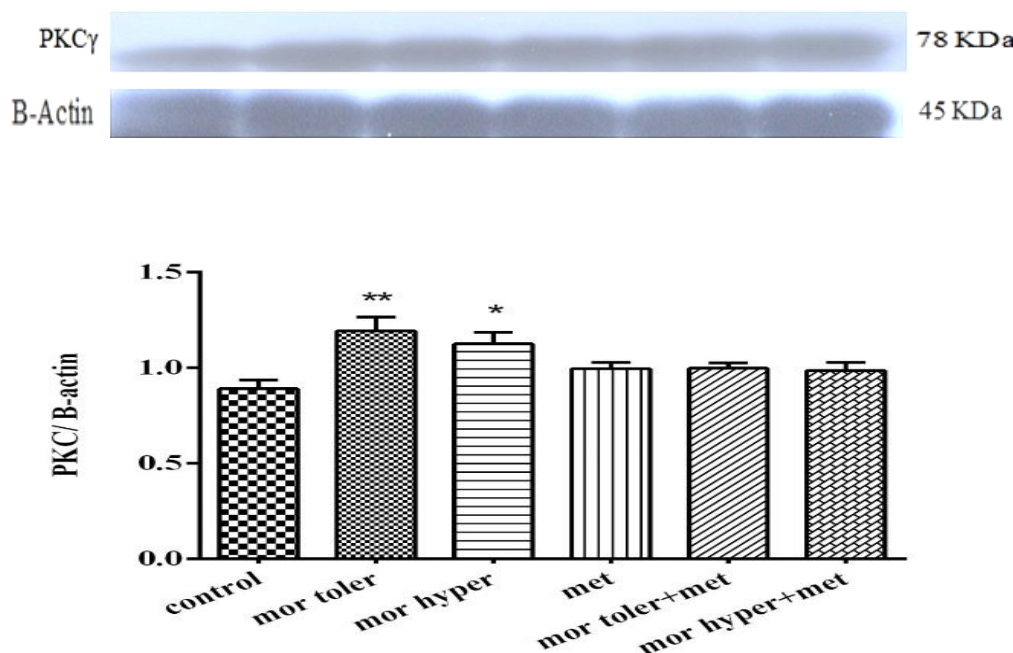
مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به همراه متفورمین به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم سبب افزایش معنی دار آستانه پس کشیدن پا در روز ۱۴ و ۱ نسبت به کنترل شد ( $P < 0.001$ ) همچنین مقایسه اثر ضد درد مورفین به همراه متفورمین در روز ۱۴ با روز ۱ پس از تزریق اولین دوز مورفین به همراه متفورمین اختلاف معنی داری نشان نداد. این نتیجه بیانگر کاهش تحمل به اثر ضد درد مورفین به دنبال تزریق متفورمین به همراه مورفین می باشد (نمودار ۳ ب).

مقایسه نتایج حاصل از تست رفتاری هارگریوز پس از تزریق ۱۴ روزه مورفین با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به همراه متفورمین به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم سبب افزایش آستانه پس کشیدن پا در روزهای ۱۴ و ۱۶ گردید به طوری که به میزان آستانه پس کشیدن پا در کنترل رسید و با آن معنی دار 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 معنی داری دیده نشد (نمودار ۴ ب).

نیفتایج حاصل از تغییر بیان PKC به دنبال تجویز مورفین، مورفین به همراه متفورمین در گروه تحمل به مورفین و گروه هیپرالجزیا در مقایسه با کنترل

مقایسه نتایج میزان بیان PKC $\gamma$  به روش وسترن بلات در گروه تحمل و هاپیرآلجیا نشان داد که تجویز ۱۴ روزه مورفین سبب افزایش معنی دار PKC $\gamma$  در روز ۱۴ در شرایط

تحميل ( $P < 0/01$ ) و در روز ۱۶ در شرایط هیپرالجزیا ( $P < 0/05$ ) نسبت به کنترل شد. به عبارتی در شرایط تحميل میزان بیان  $PKC\gamma$  در مقایسه با کنترل بیشتر از بیان آن در هیپرالجزیا بود ولی مقایسه نتایج بیان  $PKC\gamma$  در شرایط تحميل با هیپرالجزیا اختلاف معنی داری نشان نداد. همچنین مقایسه بیان  $PKC\gamma$  در گروه دریافت کننده ۱۴ روزه مورفین به همراه متفورمین در شرایط تحميل و هیپرالجزیا با کنترل اختلاف معنی داری نداشت ولی مقایسه بیان  $PKC\gamma$  در گروه دریافت کننده ۱۴ روزه مورفین به همراه متفورمین در شرایط تحميل کاهش معنی داری را در روز ۱۴ در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین به تنهایی نشان داد ( $P < 0/05$ ). گرچه مقایسه بیان  $PKC\gamma$  در گروه دریافت کننده ۱۴ روزه مورفین به همراه متفورمین در شرایط هیپرالجزیا نیز در مقایسه با گروه دریافت کننده مورفین به تنهایی در روز ۱۶ کاهش یافته بود ولی با آن معنی داری نبود (نمودار ۵).



نمودار ۵) نتایج حاصل از تغییر بیان PKC $\gamma$  به همراه منفورمین در گروه تحمل به مورفین و گروه هیپرالجیا در مقایسه با کنترل  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ .

Fig 5) The results of PKC $\gamma$  expression changes following morphine and morphine+metformin injection in tolerating and P<0.01\*\* P<0.05, \*hyperalgesic groups to compare of control

## بحث

مقایسه نتایج به دست آمده از تزریق ۱۴ روزه مورفین به صورت زیر جلدی، در تست هارگریوز افزایش معنی داری 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 معنی داری نداشت که می تواند حاکی از پیدایش تحمل به اثرات ضد دردی مورفین در این روز می باشد. برای تأیید تحمل در روز ۱۵ از دوز بالاتر مورفین استفاده گردید که توانست با افزایش آستانه درد، تا حد زیادی بی دردی کاهش یافته حاصل از تزریق مکرر مورفین را برگرداند. که این خود با تعریفی که از تحمل به اثر ضد دردی مورفین می شود 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 بی دردی باید دوز دارو را افزایش داد (۷ و ۸). بررسی هیپرالجزیای 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 معنی داری نسبت به کنترل نشان داد که با کاهش آستانه پس کشیدن پا مشخص گردید. در ادامه این پژوهش اثر متفورمین روی تحمل و هیپرالجزیای حاصل از تزریق مکرر مورفین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که متفورمین توانست هیپرالجزیای ناشی از مورفین و تحمل به اثرات ضد دردی آن را کاهش دهد و سبب بهبود اثرات ضد دردی آن شود.

همسو با این نتایج مائو و همکاران در مطالعه ای با تزریق ۱۰ میکروگرم مورفین به صورت اینتراتکال و یک بار در روز و به مدت ۸ روز متوالی تحمل به اثرات ضد دردی مورفین را در روز ۸ و هیپرالجزیا را در روز ۱۰ گزارش نمودند. برای بررسی ایجاد تحمل به اثرات ضد دردی مورفین تست tail-flick را در روز اول قبل و بعد از اولین دوز مورفین

و در روز ۸ به دنبال تزریق آخرین دوز مورفین انجام دادند و پدیده تحمل را مشاهده کردند. آنها همچنین جهت بررسی هیپرالجزیای 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 روز ۱۰ یعنی ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق مورفین استفاده نمودند و در نهایت کاهش پیشرونده ای 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 هیپرالجزیا را بدنبال استفاده مکرر مورفین نشان داده بود همخوانی داشت به طوری که در پژوهش حاضر از تزریق ۱۴ روزه مورفین به صورت زیر جلدی استفاده شده و پدیده تحمل در روز ۱۴ پس از تزریق آخرین دوز مورفین و هیپرالجزیا 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 معنی دار بیان  $PKC\gamma$  در شرایط تحمل و هیپرالجزیا نسبت به کنترل شده است که این افزایش در شرایط تحمل ( $P < 0.01$ ) بیشتر از هیپرالجزیا ( $P < 0.05$ ) بود گرچه مقایسه بیان  $PKC\gamma$  در شرایط تحمل و هیپرالجزیا با یکدیگر اختلاف معنی داری نشان نداد. البته باید توجه داشت که هیپرالجزیا و تحمل ناشی از مصرف مکرر مورفین دو پدیده مجزا هستند بدین معنی که هیپرالجزیای ناشی از مورفین گونه ای از افزایش حساسیت متناقضی می باشد که بعد از مواجه کوتاه مدت یا بلند مدت با مورفین ایجاد می شود در حالی که همانطور که در بالا ذکر گردید تحمل پدیده ای است که در مواجه مکرر با مورفین حاصل می گردد که سبب کاهش اثر ضد دردی آن می شود به طوری که برای ایجاد اثر بی دردی به دوز بالاتری نیاز می باشد (۱۹). مائو همچنین به منظور بررسی مکانیسم های دخیل در دو پدیده تحمل و هیپرالجزیا نقش رسپتورهای اسیدهای آمینه تحریکی مانند NMDA و

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 هیپرالجزیا و تحمل به اثرات ضددردی مورفین را از روز ۳ تا روز ۱۴ به صورت 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 هیپرالجزیای 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  $\text{PKC}\gamma$  و زیر واحد NR 1 گیرنده NMDA نقش آنها را در تحمل و هیپرالجزیای ناشی از مصرف مکرر مورفین نشان داد وی در ادامه پژوهش خود از ملاتونین جهت مهار  $\text{PKC}\gamma$  استفاده نمود و مشاهده کرد که ملاتونین توانسته است از بروز تحمل و هیپرالجزیا با کاهش بیان  $\text{PKC}\gamma$  و زیر واحد NR1 گیرنده NMDA جلوگیری نماید (۱۵). در پژوهش حاضر از متفورمین برای کاهش تحمل و هیپرالجزیا و بیان  $\text{PKC}\gamma$  استفاده شد. متفورمین توانست تحمل و هیپرالجزیای حاصل از استفاده مکرر مورفین و بیان  $\text{PKC}\gamma$  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 هیپرالجزیا می‌شود. 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  $\text{PKC}\gamma$  و مهار آن مورد توجه قرار گرفت به‌خصوص که نقش آن در هیپرالجزیا کمتر مورد توجه قرار گرفته است. همان‌طور که در بالا ذکر گردید میزان بیان  $\text{PKC}\gamma$  در تحمل و هیپرالجزیا افزایش یافت ولی این افزایش در تحمل بیشتر بود که می‌تواند دلیلی بر متفاوت بودن مکانیسم‌های دخیل در این

مولکول داخل سلولی  $\text{PKC}$  را مورد بررسی قرار داد. او از آنتاگونیست رسپتور NMDA یعنی (MK801) و مهارکننده  $\text{PKC}$  یعنی (GM1) استفاده نمود و مشاهده کرد که MK801 و GM1 هیپرالجزیای ناشی از مورفین و تحمل به اثرات ضددردی مورفین را بهبود داده‌اند. ولی آنها در تحقیق خود به نقش زیر گروه‌های  $\text{PKC}$  اشاره‌ای ننمودند (۱۲). ولی در پژوهش حاضر برای پی بردن به نقش  $\text{PKC}$  در شرایط تحمل و هیپرالجزیای 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 هیپرالجزیا با کنترل بود. در ادامه آزمایشات جهت کاهش بیان  $\text{PKC}\gamma$ ، تحمل و هیپرالجزیا 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 هیپرالجزیای 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 هیپرالجزیا و همچنین کاهش بیان  $\text{PKC}\gamma$  در روزهای ۱۴ و ۱۶ نسبت به گروه دریافت‌کننده مورفین در روزهای مشابه شد و حتی میزان بیان آن در این روزها به حد کنترل رسید. این نتایج می‌تواند نشان دهنده اثر متفورمین به همراه مورفین روی کاهش این دو پدیده در ارتباط با کاهش بیان  $\text{PKC}\gamma$  باشد. سانگ و همکاران روند پیدایش تدریجی هیپرالجزیای ناشی از مورفین و تحمل به اثرات ضد دردی آنرا مورد بررسی قرار دادند. آنها در مطالعه خود پیدایش تدریجی پدیده تحمل و هیپرالجزیای ناشی از

دو پدیده باشد. از طرفی برای کاهش تحمل و هیپرآلجیازیا و بیان  $PKC\gamma$  از متفورمین استفاده شد. علیرغم آنکه متفورمین به عنوان یک داروی کاهش دهنده قند خون شناخته می شود ولی نشان داده شده است که دارای اثراتی فراتر از کاهش قند خون می باشد. 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 هیپرآلجیازیا و بیان  $PKC\gamma$  نخاعی را کاهش دهد. در رابطه با اثرات غیر کلاسیک متفورمین، پن (Pan) و همکاران در بررسی های 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 ضد درد مورفین را نشان دادند و بدین ترتیب پیشنهاد نمودند که می توان در کلینیک با استفاده از متفورمین بی دردی حاصل از مورفین را که طی استفاده مکرر کاهش می یابد بهبود داد. جالب آنکه متفورمین، علیرغم آنکه یک داروی ضد هیپرگلیسمی است ولی توانسته است با مهار سایتوکاین هایی که توسط مورفین فعال شده و در ایجاد تحمل نقش داشته اند از بروز تحمل جلوگیری نماید. در مطالعه پن، تزریق مورفین به صورت زیر جلدی و دو بار در روز و به مدت 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 به صورت وابسته به دوز تحمل را کاهش دهد. پن در آزمایشات خود متفورمین را با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم ۱۵ دقیقه قبل از مورفین تزریق می کرد. او متوجه شد که متفورمین به تنهایی اثری روی آستانه درد ندارد ولی چنانچه به طور مکرر و همراه مورفین استفاده گردد تحمل به اثرات ضد دردی آنرا کاهش می دهد.

پن همچنین در جستجوی مکانیسم متفورمین متوجه شد که استفاده مکرر مورفین سبب افزایش فعالیت میکروگلیا و بیان مارکر Iba-1 می شود. تزریق صفاقی متفورمین توانست با

مهار میکروگلیا در بهبود اثر ضد درد مورفین سودمند باشد (۱۹). در پژوهش حاضر دوز ۵۰ میلی گرم متفورمین اثری روی تحمل و هیپرآلجیازیا نداشت و دوزهای بالاتر یعنی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم نیز روی این دو پدیده دارای اثری مشابه بودند. به علاوه استفاده از متفورمین به تنهایی نیز اثری روی دو پدیده تحمل و هیپرآلجیازیا نداشت ولی استفاده مکرر متفورمین به همراه مورفین تحمل و هیپرآلجیازیا را کاهش داد که از این جهت با نتایج پن همسو بود. پن همچنین گزارش داد که متفورمین احتمالاً در مهار  $PKC\gamma$  نیز نقش داشته باشد زیرا فعالیت  $PKC\gamma$  نقش مهمی در حساسیت مرکزی ناشی از تحمل به مورفین دارد که می تواند در تحریک پذیری نورون های درد شرکت کند. وی پیشنهاد نمود که متفورمین با مهار فعالیت میکروگلیا و کاهش حساسیت مرکزی در نخاع می تواند 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 می دهد از اینرو به نظر می رسد 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 به همراه مورفین میزان تحمل و هیپرآلجیازیا ناشی از تزریق مکرر مورفین و میزان بیان  $PKC\gamma$  را کاهش دهد. جین (Jin) و همکاران، نیز با تزریق ۱۰ میکروگرم مورفین به صورت ایتراکال به مدت ۵ روز تحمل به اثرات ضد درد مورفین را مشاهده نمودند و آنرا با تست های رفتاری هات پلنت (حرارتی) و Randall Selitto (هیپرآلجیای 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) به صورت ایتراکال از ایجاد تحمل به اثرات ضد درد مورفین جلوگیری نمودند. آنها گزارشی در ارتباط با هیپرآلجیازیا ارائه

نقش  $\text{PKC}$  را در هیپرالجزیای 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  $\text{PKC}$  گزارش نمودند (۲۵). بنابراین همان‌طور که در پژوهش حاضر اشاره شد متفورمین سبب کاهش تحمل به اثر ضد دردی مورفین و هیپرالجزیای ناشی از آن و کاهش بیان  $\text{PKC}$  گردید.

### نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که ایزوزیم  $\text{PKC}\gamma$  می‌تواند در بروز تحمل و القای هیپرالجزیای حاصل از استفاده مکرر مورفین نقش داشته باشد و متفورمین به عنوان یک داروی غیر اختصاصی مهار کننده  $\text{PKC}$  توانست تحمل و هیپرالجزیا را کاهش دهد.

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

### تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

نمودند (۲۰). مکانیسم‌های نوروبیولوژیکی تحمل به اپیوئیدها و مکانیسم‌های دقیق هایپرالجزیای ناشی از آن تا کنون بخوبی شناخته نشده است (۲۱). تحمل به اثرات ضد دردی مورفین و هیپرالجزیای ناشی از آن دارای دو مکانیسم سلولی متفاوت می‌باشد که شامل غیرحساس شدن گیرنده اوپیویدی در تحمل و حساس شدن گیرنده درد در هایپرالجزیا می‌باشد (۱). از جمله مکانیسم‌های سلولی مورد توجه، مسیر فعالیت  $\text{PKC}$  داخل سلول می‌باشد که مطالعات مختلف به مهارکننده‌های اختصاصی آن شامل  $\text{GM1}$  (۱۸)، bisindolylmaleimide I و chelerythrin (۲۲)،  $\text{Go7874}$  (۲۱) و  $\text{Go6976}$  (۲۳) اشاره نموده‌اند. در پژوهش حاضر از متفورمین نه به عنوان یک داروی مؤثر در درمان دیابت بلکه به عنوان مهار کننده غیراختصاصی  $\text{PKC}$  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  $\text{PKC}\beta\text{II}$  در هیپرگلیسمی پیشگیری می‌نماید (۲۴). ماهانی و همکاران،

### 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  $\mu$ -opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthritis in rats. *Clinical and*

- 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  $\beta$ II 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  $\mu$ -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  $\mu$ -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- $\beta$ 2 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  $G_{\alpha s}$ , protein kinase C, and l-type  $Ca^{2+}$  channels in rats. *Journal of Neuroscience Research*. 2008;86(2):471-479.

Original Article

# The Role of Spinal PKC $\gamma$ in Tolerance and Hyperalgesia Induced by Repeated Morphine Administration in Male Rats

K. Ghasemloo (MSc)<sup>1</sup>, H. Manaheji (PhD)<sup>1,2\*</sup>, L. Dargahi (PhD)<sup>3</sup>, S. pandamooz (PhD)<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Tehran, Iran

<sup>2</sup> Neurophysiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Tehran, Iran

<sup>3</sup> 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 $\gamma$  (PKC $\gamma$ ) 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 executed before morphine injection and the results considered as "control". Then the test repeated after the first dose of morphine on the first day and then on day 14<sup>th</sup> 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 14<sup>th</sup> before the last injection of morphine and on day 16<sup>th</sup> two days after the last injection of morphine. The expression of spinal PKC $\gamma$  measured on day 14<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup>. Metformin 100mg/kg, co-administrated with morphine daily up to 14 days then PWL and PKC $\gamma$  expression were assessed as mentioned above.

**Results:** The results showed a significant tolerance and hyperalgesia on day 14<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> compared to control. PKC $\gamma$  expression also increased significantly on day 14<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> compared to control. However, there was no significant difference in comparison between day 14<sup>th</sup> and day 16<sup>th</sup>. Co-administration of metformin and morphine up to 14 days increased PWL in morphine tolerance and reduced hyperalgesia and PKC $\gamma$  expression.

**Conclusion:** The results showed that increasing of spinal PKC $\gamma$  expression in chronic morphine administration might be involved in morphine tolerance mechanism and induced hyperalgesia.

**Key words:** morphine tolerance, hyperalgesia, metformin, PkC $\gamma$

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Ghasemloo K, Manaheji H, Dargahi L, pandamooz S. The Role of Spinal PKC $\gamma$  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.

\*Address for correspondence: Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.  
Email: manahejih@sbsmu.ac.ir

Website: <http://bpums.ac.ir>  
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>