

Efek Agonis Selektif Reseptor Opioid Kappa U-50,488h pada Perubahan Morfologi Neuronal *refrontal Cortex* (Pfc) dan *Nucleus Accumbens* (Nac) Mencit (*Mus musculus*) yang Mengalami Ketergantungan Morfin

Toetik Aryani*, Nanik Widjayanti, Junaidi Khotib

Departemen Farmasi Klinis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya

*alamat korespondensi : toetik_61@yahoo.com

Repeated treatment of morphine produces several change in brain and behavior that far outlast their initial neuropharmacological effects. The nature of persistent drug-induced neural plasticity is of interest because it is thought to contribute to the development of drug dependency and addiction. To determine if chronic morphine treatment alters the morphology of prefrontal cortex (PFC) and nucleus accumbens (NAc), this study was designed to evaluate the effects of a selective kappa opioid receptor agonist U-50,488H on the morphological change of PFC and NAc neurons, we have used chronic morphine exposure to leads dependency of mice. Mice were treated morphine with an escalating doses from 10 mg/kg to 140 mg/kg. Mice receive morphine twice a day daily for a week. At 8th of the day, mice were treated naloxone to precipitated withdrawal syndrome. U-50.488H dose 0.1; 1 and 3 mg/kg were administrated thirty minutes before injection of morphine. This observation shown that the increasing of locomotion reduced significantly by repeated administration of U-50,488H ($F_{(4,49)} = 18.30$ $p = 0,001$) and a significant reduction on the decreasing of weight ($F_{(4, 49)} = 3.360$ $p = 0.020$). Furthermore, we observed that treatment of morphine produces the morphological change of PFC and NAc neurons, that was stained by hematoxylin-eosin. The changes are shape, size, density of neuron and apoptosis cell. Compared with control mice, apoptosis cell of morphine-treated animals.

Keywords : U-50,488H, morphine dependence, withdrawal syndrome, morphology neuronal.

PENDAHULUAN

Berdasarkan *World Drug Report* tahun 2005 jumlah penyalahgunaan narkoba di dunia sebesar 200 juta orang (5% dari populasi dunia) yang terdiri dari: 160,9 juta orang (ganja), 13,7 juta orang (kokaina), 15,9 juta orang (opiat) dan 10,6 juta orang (heroina) (BNN, 2003). Sementara prevalensi penyalahgunaan narkoba di Indonesia terdeteksi sebesar 3,9% atau yang pertama kali menggunakan narkoba pada usia 15 tahun (BNN, 2005).

Morfina merupakan prototipe dari golongan opioid yang prevalensi penyalahgunaannya cukup tinggi. Pemakaian morfina jangka panjang dapat menimbulkan ketergantungan baik secara fisik maupun psikis. Dalam keadaan ketergantungan tersebut apabila tidak diberikan morfina maka akan menimbulkan gejala *withdrawal*. Gejala ini juga akan muncul apabila diberikan antagonis reseptor dimana morfina berikatan, seperti nalokson, nalorfin, naltrekson atau levalorfan (Nestler, 2001; Adinoff, 2004; Apriyani, 2007; Irawati, 2006).

Sistem mesokortikal limbik dopamin berperan dalam memediasi positif efek *reinforcement* dari

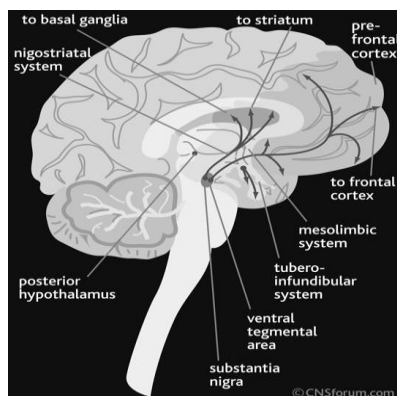
penyalahgunaan obat meliputi kokaina, amfetamina, nikotina dan opiat. Jalur anatomikal ini meliputi *ventral tegmenred area* (VTA) dalam *midbrain* dan diproyeksikan pada beberapa daerah forebrain meliputi *nucleus accumbens* (NAc) dan *medial prefrontal cortex* (mPFC). Sistem tersebut memediasi efek *reinforcement*. Selain itu morfina juga merubah *neurofilament* dan *cytoskeletal proteins* lain pada cerebral cortex dan VTA pada hewan coba dan pada manusia dengan ketergantungan opioid. Paparan morfina secara kronik juga mengurangi transport axonal pada NAc *shell* dan mengurangi ukuran dari dopamin di VTA (Noble & Cox, 1997; Espejo, 2001).

Pengaruh perubahan morfologi sel saraf terhadap pemberian morfina kronik dengan dosis bertingkat dua kali dalam sehari selama 7 hari dapat dilihat pada PFC dan NAc. PFC merupakan bagian anterior dari *frontal lobe* dari otak (gambar 1), daerah pertumbuhan motor dan premotor. Perubahan morfologi sel saraf pada PFC secara kualitatif dapat dilihat dari jarak antar sel saraf pada kelompok morfina lebih renggang sehingga kepadatan atau densitas saraf berkurang jika dibandingkan dengan normal. Selain itu hasil

pengamatan pada PFC juga menunjukkan peningkatan jumlah pembuluh darah otak pada kelompok morfina. Bentuk sel pada PFC dari hasil pengamatan pada kelompok normal tampak nukleus dan nukleolus dengan jelas, sedang pada morfina menunjukkan sel dengan nukleus dan nukleolus dalam jumlah lebih sedikit dibanding dengan normal. Selain itu, terdapat sel yang mengalami apoptosis, ditunjukkan pada fragmen sel dengan inti yang mengecil dan terjadi penyusutan sel saraf diikuti dengan perubahan warna inti menjadi lebih gelap (Noble & Cox, 1997; Espejo, 2001; Tao, 2000).

NAC terdiri dari daerah *core* dan *shell*. *Core* NAC terdapat lebih banyak sel glia jika dibandingkan dengan daerah *shell* NAC. *Core* NAC secara anatomis berhubungan dengan *anterior cingulate* dan *orbitofrontal cortex* dan merupakan bagian utama dalam memediasi ekspresi respon perilaku dalam merangsang prediksi terjadinya motivasi (Noble & Cox, 1997; Espejo, 2001).

Berdasarkan mekanisme dan jalur sistem mesokortikal limbik, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pra-perlakuan U-50,488H menekan perubahan morfologi sel saraf secara kualitatif meliputi bentuk sel saraf, ukuran, kepadatan atau densitas sel saraf dan adanya sel apoptosis pada irisan koronal PFC dan NAc yang diinduksi dengan pemberian morfin kronis dengan dosis bertingkat sehari dua kali selama 7 hari. Pada hari ke-8, 2 jam kemudian nalokson diberikan untuk mempresipitasi gejala *withdrawal* yang muncul pada mencit.



Gambar 1 Jalur transmisi DA (Kruk & Pycock, 1993)

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pra-perlakuan U-50,488H terhadap perubahan morfologi sel saraf secara kualitatif meliputi bentuk sel saraf, ukuran, kepadatan, atau

densitas sel saraf dan adanya sel apoptosis pada irisan koronal PFC dan NAc yang diinduksi dengan pemberian morfina kronis. Morfina diberikan dengan dosis bertingkat sehari dua kali selama 7 hari.

Pada hari ke-8 diberikan nalokson untuk mempresipitasi gejala *withdrawal* yang muncul pada mencit. Pengamatan gejala *withdrawal* dilakukan selama 15 menit setelah injeksi nalokson.

Metode Pewarnaan dengan Hematoxilin dan Eosin (HE)

Semua mencit/tikus dalam percobaan dan kelompok kontrol dilakukan anestesi overdosis (*deeply anaesthetized*) dan perfusi *transcardial* dengan *phosphate buffered saline* (PBS, pH 7,4) dengan *fixative* 4% paraformaldehida dalam PBS. Otak mencit/tikus dipindahkan dan dilindungi dalam 30%b/v larutan sukrosa pada suhu 4°C sampai terjadi *sink* (jenuh). Irisan beku dengan ketebalan 20µm dipotong *coronal* ($\pm 1,5$ mm) dengan alat *freezing microtome*.

PFC dan NAc diwarnai dengan *hematoxilin* dan *eosin* ditujukan untuk memeriksa lokasi dan mengamati perubahan struktur morfologi bagian tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas pemberian U-50,488H terhadap perubahan morfologi saraf pada bagian *prefrontal cortex* (PFC) dan *nucleus accumbens* (NAc) pada mencit yang mengalami ketergantungan morfina. U-50,488H merupakan antagonis reseptor opioid μ yang digunakan untuk regulasi keseimbangan antara reseptor opioid μ dan κ .

Subyek mencit mendapat perlakuan dengan morfin dosis bertingkat mulai dari 10 mg/kg BB – 140 mg/kg BB dua kali sehari selama 7 hari. Pemberian dosis tersebut mampu menginduksi terjadinya ketergantungan morfina. Kelompok mencit juga mendapat pra-perlakuan U-50,488H dengan rentang dosis 0,1 mg/kg BB, 1 mg/kg BB dan 3 mg/kg BB diberikan 30 menit sebelum injeksi morfina. Setelah itu mencit diinjeksi dengan nalokson secara intraperitoneal, dan kemampuan koordinasi diuji dengan menggunakan alat *rotarod* dengan kecepatan 10 rp metode *fixed speed rotarod* (FSSR). Hasil pra-perlakuan U-50,488H terhadap kemampuan koordinasi hewan coba dapat dilihat pada tabel 1

dan Gambar 2. Hasil pengamatan menunjukkan ada perbedaan yang bermakna ($F_{(4,49)} = 13,879$; $p < 0,001$) pada kelompok normal dibandingkan dengan kelompok morfin. Pada pra-perlakuan U-50,488H tidak memberikan pengaruh pada kemampuan fungsi koordinasi.

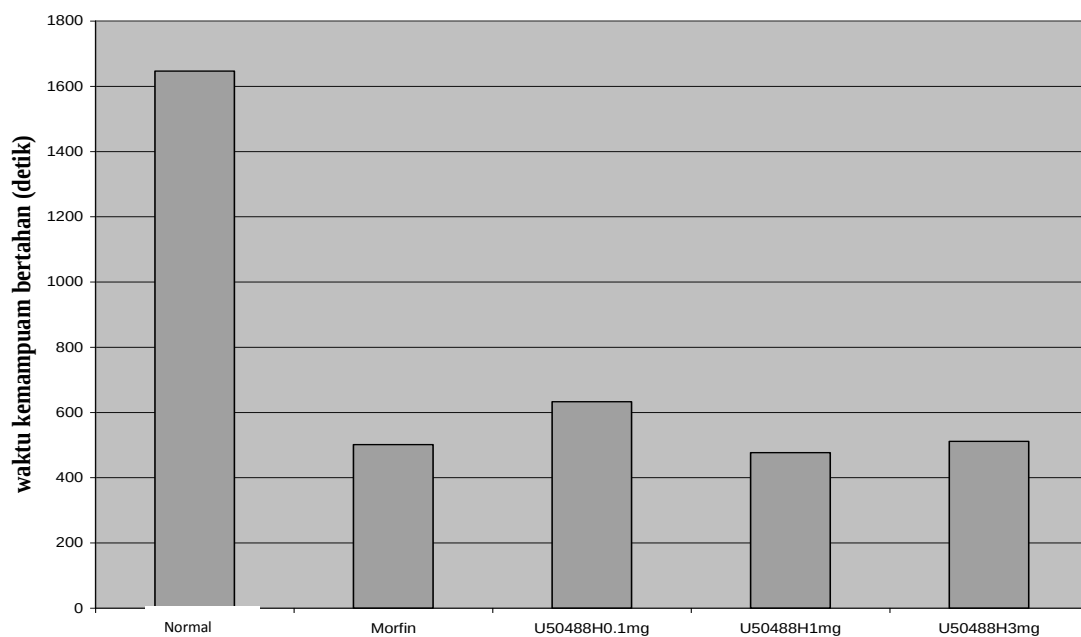
Untuk mengetahui perubahan morfologi jaringan saraf pada PFC dilakukan pembedahan mencit untuk kelompok kontrol dan kelompok pra-perlakuan untuk dipreparasi secara histokimia dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Bagian PFC diambil dari $\pm 1,5$ mm dari bregma ke arah anterior.

Pada gambar 3 dapat dilihat bahwa bentuk sel pada PFC dari hasil pengamatan pada kelompok normal menunjukkan nukleus dan nukleolus yang tampak dengan jelas. Pada kelompok morfin menunjukkan jumlah nukleus dan nukleolus lebih sedikit jika dibandingkan dengan normal. Jarak

antar inti sel pada kelompok morfin sangat renggang sehingga kerapatan atau densitas neuron lebih kecil dibandingkan dengan kelompok normal. Neuron yang mempunyai karakteristik tersebut merupakan sel yang mengalami apoptosis. Pada pra-perlakuan U-50,488H menunjukkan sel mengalami perbaikan jika dibandingkan dengan kelompok morfina. Hal ini dilihat dari bentuk nukleus dan nukleolus yang jelas dan berkurangnya sel apoptosis. Pada kelompok morfin banyak terdapat pembuluh darah. Gambar 3 menunjukkan adanya perubahan morfologi sel saraf jika dibandingkan dengan kelompok normal meliputi densitas atau kerapatan, jarak antar sel, ukuran dan juga terdapat sel saraf yang mengalami apoptosis; hasil pewarnaan Hematoxylin-Eosin dari irisan koronal *prefrontal cortex* otak mencit.

Tabel 1 Pengaruh pra-perlakuan U-50,488H terhadap kemampuan koordinasi hewan coba yang mengalami gejala *withdrawal*

No.	Kelompok	Rotaration (detik)
1	Normal	1646,60 $\pm$ 549,51
2	Morfin	501,10 $\pm$ 319.34*
3	U-50,488H 0,1 mg/kg BB + Morfin	632,80 $\pm$ 475,81
4	U-50,488H 1 mg/kg BB + Morfin	476,50 $\pm$ 386,82
5	U-50,488H 3 mg/kg BB + Morfin	511,30 $\pm$ 368,35

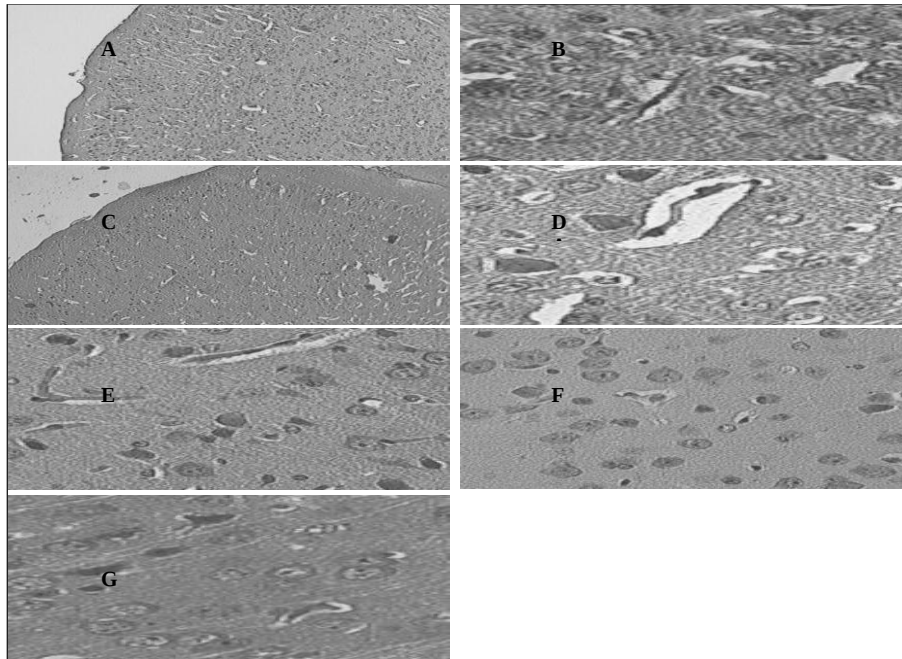


Gambar 2 Pengaruh pra-perlakuan U-50,488H terhadap kemampuan fungsi koordinasi hewan coba yang mengalami gejala *withdrawal*

Kesimpulan

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa pemberian selektif agonis reseptor opioid κ (U-50.488H) dapat menekan munculnya gejala *withdrawal* pada hewan coba mencit yang mengalami ketergantungan morfina. Pra-perlakuan U-50,488H dapat menekan perubahan

morfologi sel saraf pada PFC dan NAc ditunjukkan dengan perubahan morfologi sel saraf secara kualitatif meliputi bentuk sel, ukuran, kerapatan atau densitas sel saraf. Selain itu, terdapat adanya pengurangan sel apoptosis pada PFC dan NAc.



Gambar 3 Irisan koronal *prefrontal cortex* (PFC) otak mencit dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. (A) dan (B) Normal; (C) dan (D) Morfin; (E) U-50,488H 0,1 mg/kgBB; (F) U-50,488H 1 mg/kgBB; (G) U-50,488H 3 mg/kgBB.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinoff, B., 2004, Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv Rev Psychiatry*, 12, p. 305-320.
- Apriyani, E., 2007, *Regulasi keseimbangan reseptor opioid μ dan κ dalam menekan gejala withdrawal pada mencit yang mengalami ketergantungan morfin.*, Fakultas Universitas Airlangga, Indonesia.
- BNN., 2003, *Situasi permasalahan penyalahgunaan dan peredaran gelap narkoba*. Indonesia, p.1-65.
- BNN., 2005, *Survei nasional penyalahgunaan dan peredaran gelap narkoba di rumah tangga*, www. BNN. com diakses tanggal 24 Oktober 2007.
- Espejo, E.F., Serrano, M.I., Caile, S., and Stinus, L., 2001, Behavioral expression of opiate withdrawals altered after prefrontocortical dopamine depletion in rats; monoaminergic correlates. *Neuropsychopharmacology*, Vol.25 No.2, p.204-212.
- Irawati, D., 2006, *Efektivitas antagonis dopamin dalam menurunkan gejala withdrawal pada mencit dengan ketergantungan morfin.*, Fakultas Universitas Airlangga, Indonesia.
- Nestler, E.J., 2001, Molecular basis of long term plasticity underlying addiction. *Neuroscience*, Vol. 2, p.119-128.
- Nestler, E.J., and Aghajanian, G.K., 1997, Molecular and cellular basis of addiction. *Journal of Science*, Vol.278, p. 58-63.
- Nestler, E. J., and Carlezon, William, A., 2005, The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Journal of Biological Psychiatry*, Vol 59, p. 1151-1159.
- Noble, Florence and Cox, Brain M., 1997. The Role of Dopaminergic Systems in Opioid Receptor Desensitization in Nucleus Accumbens and Caudate Putamen of Rat After Chronic morphine Treatment., *The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics* 283 p. 557-565.
- Tao, P.L., Wu, S.C., Yang, C.H., and Wu, C.C., 2000, Study the mechanisms of U-50,488 to prevent the development of morphine tolerance in guinea pigs. *Chinese Journal of Physiology*. 43(4): 179-184.