

مطالعه اثر تزریق داخل صفاقی نالوکسان بر عوامل موثر بر گیرنده متابوتروپیک GABA_B در هسته میخی شکل مزانسفال (Cnf) موش صحرائی

مرتضی بفشش^{1*}، مظفر رضوانی پور²، امید شیبانی³

تاریخ دریافت:

تاریخ پذیرش:

چکیده

مقدمه: شواهدی در دست است که نشان می‌دهد هسته میخی شکل پلی-مزانسفالی در انتقال درد نقش دارد. این پژوهش در راستای بررسی نقش تعدیل انتقال درد محیطی از طریق نخاع به سمت مراکز بالاتر عصبی انجام گرفت. مواد و روشها: در این تحقیق تاثیر تزریق داخل صفاقی نالوکسان بر اثرات ناشی از تزریق میکرونی مورفین و آگونیست گیرنده گابا نوع B (-) (باکلوپن) و آنتاگونیست آن (CGP35348) در موش صحرائی بررسی شد. یافته های پژوهش: تزریق میکرونی مرفین ($10 \mu\text{g} / 0.5 \mu\text{l} / \text{rat} \mu$) یا دوزهای متفاوت با کلوپن ($1 \mu\text{g} / \text{rat} \mu$ و 0.5 و 0.25) اثرات ضد دردی بارزی را در دو فاز حاد و مزمن آزمون بدنبال داشت. کاهش پاسخ ضد دردی که با تزریق مرفین یا با کلوپن در دو فاز ایجاد شد، بوسیله تزریق CGP35348 کاهش نشان داد. پاسخ به درد ناشی از تزریق میکرونی مرکب از باکلوپن (بالاترین دوز $1 \mu\text{g} / \text{rat} \mu$) و تزریق داخل صفاقی (i.p) نالوکسان در هر دو فاز در مقایسه با گروه سالیین یا گروه باکلوپن به تنهایی کاهش نشان داد. تزریق میکرونی CGP35348 به تنهایی در فاز حاد آزمون فرمالین، اثرات ضد دردی داشت و ترکیب مرفین با دوزهای مختلف با کلوپن، موجب تقویت پاسخ ناشی از باکلوپن نشد، در حالیکه ترکیب مرفین با CGP35348 موجب تقویت پاسخ ضد دردی در فاز حاد شد. نتیجه گیری نهایی: می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که گیرنده‌های GABA_B موجود در هسته میخی شکل از طریق گیرنده‌های مخدري اثرات ضد دردی خود را در آزمون فرمالین اعمال کرده اند.

واژه های کلیدی: نالوکسان، گیرنده GABA_B، هسته میخی شکل

1- مربی و عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلان

2- استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

3- استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مقدمه

احتمال دخالت سیستم مخدري و تداخل عملکردی آن با عوامل موثر بر گیرنده گابا در هسته میخی شکل مطالعه نشده است و تقویت اثر ضد دردی سیستمیک مرفین بوسیله اثرات گابا ارژیک در جوندگان منجر به این نتیجه‌گیری شده است که سیستم‌های مخدري و گابا ارژیک بطور جداگانه عمل می‌کنند ولی اثرات آنها در مسیرهای نزولی همگرا می‌شود (۱۰، ۱۱ و ۱۲). تفاوت عملکردی بین مخدرها و گابا، به ناحیه مورد مطالعه بستگی دارد مثلاً بی‌دردی ناشی از گابا به نالوکسان حساسیتی ندارد ولی آگونیسست‌های گابا و مهارکننده‌های گابا ترانس آمیناز موجب افزایش بی‌دردی ناشی از مخدرها می‌شوند (۱۳).

مواد و روش‌ها

نمونه مورد مطالعه: در این پژوهش از ۱۵۴ موش صحرایی نر از نژاد NMRI، با وزن تقریبی بین ۲۵۰-۳۱۰ gr در تمام آزمایشات استفاده شد. حیوانات در گروه‌های هشت تایی در شرایط کنترل ثابت حرارت ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) و نور نگهداری شدند. حیوانات به جز موقع آزمایش در دسترسی به آب و غذا هیچ محدودیتی نداشتند.

داروها و مواد: موادی که استفاده شد عبارت بودند از: نالوکسان (آلفاسان - هلند)، (-) باکلوفن (۱۴) و CGP35348 (سیگما-آلمان) به ترتیب به عنوان آگونیسست و آنتاگونیسست گیرنده GABA_B، مورفین (تولید دارو-ایران)، زابلازین (آلفاسان - هلند)، کتامین هیدروکلراید (روتکس مدیا- هلند).

باکلوفن (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر)، CGP35348 (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱۰ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر) و مورفین (۱۰ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر) در سالیان حل شدند و در هر روز محلول‌های جدیدی از آنها در حجم ۰/۵ میکرو لیتر در مدت زمان یک دقیقه با تکنیک پیش راندن حباب، بوسیله پمپ انفوزیون (Stoelting- USA) در مختصات AP= +۰/۲۸mm

درد ناشی از التهاب یا آسیب اعصاب محیطی یک وضعیت ناراحت‌کننده و بعضاً ناتوان کننده است. خوشبختانه سیستم‌های کنترل کننده نزولی درد که از قسمت شکمی بصل نخاع (RVM)، هسته دامه بزرگ (NRM)، هسته رافه پشتی (NRD)، هسته ماگنوسولار (NMC) و ماده خاکستری دورقناتی (PAG) سرچشمه می‌گیرند، نقش مهمی بر انتقال درد دارند (۱).

تزریق موضعی داروها، ضایعات تروماتیک ناحیه‌ای و یا تحریک الکتریکی این مناطق نقش فعال ضد دردی آنها را آشکار نموده است. علاوه بر مهار داخل نخاعی یا سگمنتال درد، در بین سیستم‌های کنترل کننده فوق نخاعی، RVM نقش کلیدی در سرکوب درد دارد (۲).

هسته میخی شکل (Cnf) یک ساختار مشبک در مغز میانی است که از بخش منقاری پل مغز تا قسمت پره تکتال تالاموس امتداد دارد (۳). این هسته در نزدیکی PAG است و ارتباطات وسیعی با سیستم نزولی درد دارد که عمدتاً ورودی و خروجی‌های گابا ارژیک و کولینرژیک با RVM، NRM و PAG برقرار می‌کند (۴).

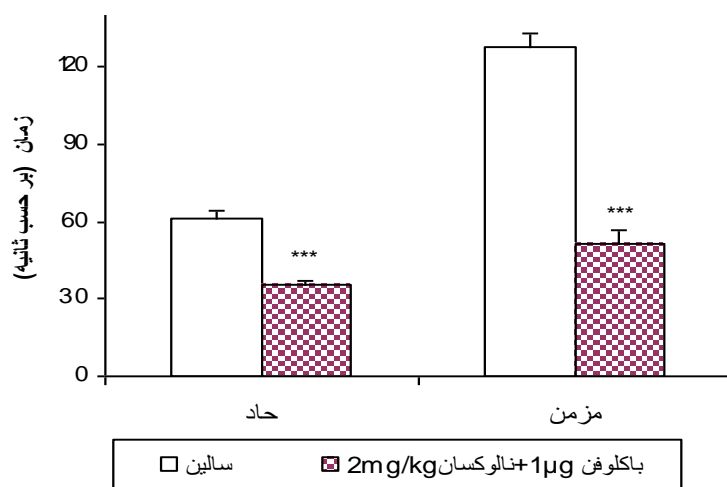
تحریک الکتریکی هسته میخی شکل در حین انجام آزمایشات رفتاری درد، موجب افزایش دوره زمانی (Tail-flick) آزمون پرش دم شده است (۵). به طوریکه این اثر ضد دردی بوسیله نالوکسان (آنتاگونیسست عمومی مخدرها) و اسکوپولامین (آنتاگونیسست موسکارینی کولینرژیک) قابل برگشت بوده است (۳ و ۶).

تخریب مراکز ضد دردی و فیبرهای نزولی کنترل درد، موجب کاهش اثر ضد دردی ناشی از مخدرها می‌شود (۷). گابا سه نوع گیرنده شناخته شده دارد. گیرنده‌های GABA_A در سیستم ضد دردی عملکرد شناخته شده‌ای دارند (۸ و ۹). از آنجا که وجود گیرنده‌های گابا A و B در هسته میخی ثابت شده است و گیرنده متابوتروپیک گابا B به دو صورت پیش سیناپسی و پس سیناپسی اثرات هیپربالریزه کننده و مهمی دارد، لذا هدف از این پژوهش ابتدا به بررسی نقش این گیرنده اختصاص یافت.

یافته های پژوهش

در این پژوهش تعداد ۱۵۴ موش صحرایی نر از نژاد N-MRI برای آزمایشات در نظر گرفته شد و داروهای مورد نظر در دوز های تعیین شده تزریق شدند. اثر نالوکسان بر تاثیر ضد دردی ناشی از تزریق آگونیست گیرنده گابا B:

مقایسه بین گروه باکلوفن و نالوکسان (۲mg/kg) و گروه باکلوفن به تنهایی با کمال تعجب، اختلاف ضد دردی معنی داری را برای نالوکسان نشان داد و این پاسخ در هر دو فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین مشاهده می شود ($F(2,8) = 0.004$ ($P < 0.001$) (شکل-۱).



شکل ۱: مقایسه میانگین مدت زمان پاسخ به درد گروه سالین با تزریق باکلوفن با دوز ۱ میکروگرم، ۱۰ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی نالوکسان در هر دو مرحله حاد و مزمن به طور معنی داری کمتر از گروه سالین می باشد ($P < 0.001$ (***)).

هسته موجب کاهش شدید مجموع زمان پاسخ به درد در اثر تزریق فرمالین ۵٪ به داخل پنجه پای عقبی سمت چپ حیوان شد که این کاهش در هر دو فاز حاد و مزمن مشاهده شد. در مقایسه با گروه سالین و شم جراحی،

نسبت به خط اینتر اورال (IA)، $LP = 1/4$ mm و $DV = 6$ mm تزریق می شد و سوزن تزریق به مدت یک دقیقه در محل هسته باقی می ماند. پس از فیکساسیون، برش های کرونال به ضخامت $150 \mu m$ تهیه و روی لام ژلاتینه فیکس شده و با روش رنگ آمیزی نیسل، رنگ آمیزی و تأیید می شدند.

آنالیز آماری: مقایسه بین گروهها بوسیله آزمون t دو دامنه انجام شد و بسته به برابری یا نابرابری واریانسها، ANOVA و آزمون Dunnet post hoc برای بررسی داده ها در گروهها استفاده شد. اختلاف بین میانگین ها در صورت $P < 0.05$ معنی دار تلقی شد. هر مقدار عددی از نمودارها بیانگر میانگین $\pm SEM$ در تعداد هشت عدد موش می باشد.

تزریق میکرونی مورفین یا آگونیست گیرنده گابا B:

آنالیز داده ها با آزمون t دو دامنه نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه سالین و گروه شم جراحی وجود ندارد [$F(3,0) = 0.402$ ($P = 0.11$)] (جدول ۱). تزریق مورفین ($10 \mu g / 0.5 \mu l$) در داخل

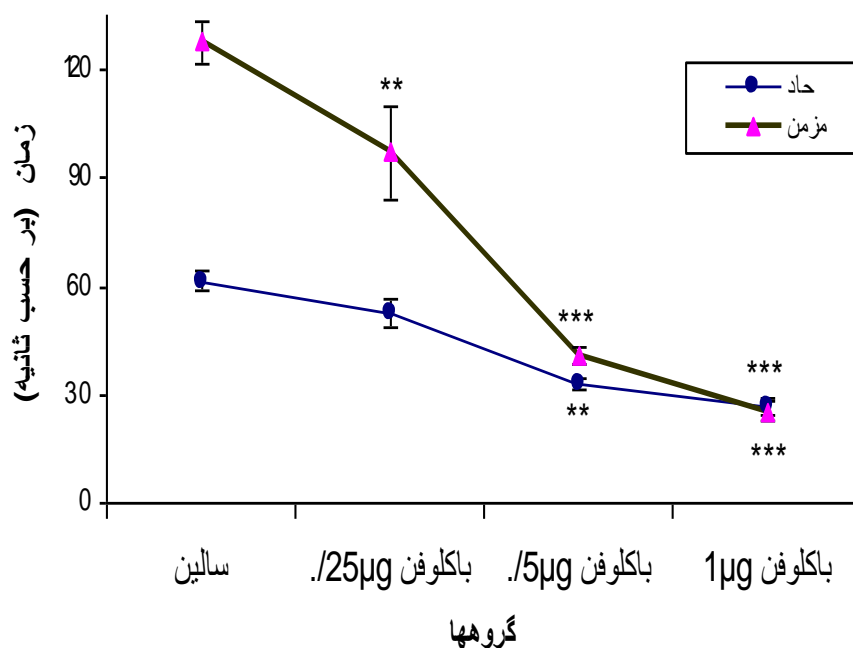
این کاهش کاملاً معنی دار بود ($F(3,0) = 41/38$ ($P < 0/01$)) (جدول شماره ۱).

گروهها	فاز حاد	فاز مزمن
سالمین	۶۱/۵۶±۳/۰۴	۱۲۷±۵/۵۶
شم جراحی	۵۷/۱۸±۳/۲۵	۱۱۶/۸۱±۳/۰۸
مورفین ۱۰ μg/rat	۳۵/۶۲±۱/۴۱***	۵۱/۸۱±۴/۸۵***
باکلوپن ۱ μg/rat	۲۶/۸۱±۲/۱***	۲۵/۴۳±۲/۹***
باکلوپن ۰/۵ μg/rat	۳۳/۲۵±۱/۴۸***	۴۰/۶۸±۲/۴۱***
باکلوپن ۰/۲۵ μg/rat	۵۲/۵±۳/۷۹	۹۷±۱۲/۸**
باکلوپن ۱ μg/rat + ۲ mg/kg نالوکسان	۲/۴۲±۰/۸۹ *** ☆	۱۰±۱/۸۵ *** ☆

جدول ۱: خلاصه نتایج به دست آمده از تزریق میکرونی سالمین، مورفین، باکلوپن و تزریق داخل صفاقی نالوکسان نشان داده شده است: حیوانات با سالمین (۰/۵ میکرولیتر)، با کلوپن (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکروگرم) و باکلوپن ۱ μg همراه یا بدون تزریق نالوکسان ۲mg/kg مورد مطالعه قرار گرفتند ($p < 0/01$)**. ($p < 0/001$)*** می باشد. ☆ : مقایسه بین گروه باکلوپن + نالوکسان با گروه باکلوپن.

مشاهده شد. با استفاده از ANOVA تایید شد که دارو موجب اثرات کاهش و وابسته به دوز شده است. $[F(3, 28) = 43/64$ ($p < 0/01$)] بطوریکه بیشترین پاسخ ضددردی در بالاترین دوز مشاهده می شود.

تزریق میکرونی دوزهای مختلف باکلوپن (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و میکروگرم) در داخل هسته میخی شکل، موجب کاهش شدید پاسخ به درد شد (شکل ۱). بی دردی ناشی از باکلوپن همانند مورفین در هر دو فاز آزمون فرمالین

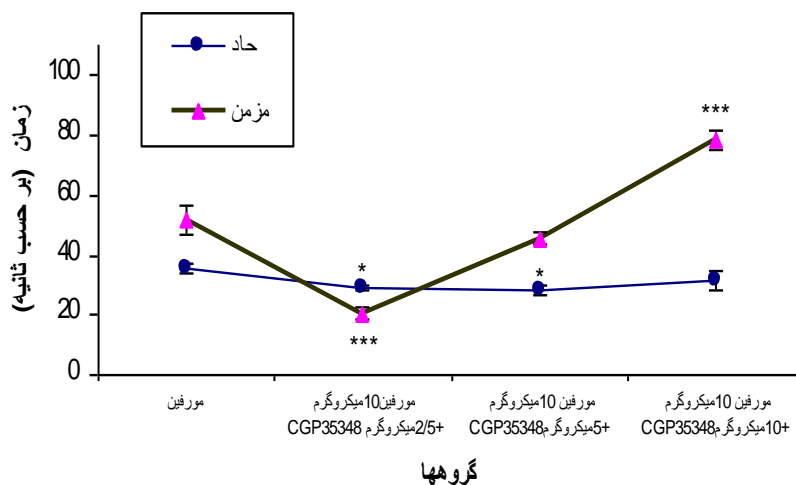


شکل ۱. اثرات ضد دردی دوزهای مختلف باکلوفن در فاز اول (۰-۵ دقیقه) و فاز دوم (۴۵-۱۵ دقیقه) آزمون فرمالین. مجموع زمان پاسخ به درد لیسیدن و گازگرفتن پنجه پای تزریق شده در زمان آزمون ثبت شده است. هر مقدار نشان داده شده برابر با میانگین \pm SEM زمان ثبت شده در تعداد ۸ عدد موش می باشد $p < 0.01$ و $p < 0.001$ ***.

تزریق میکرونی آنتاگونیست گیرنده گابا B:

۲۸۶ = $F(3, 28)$. آنالیز داده های مربوط به CGP35348 در حضور مورفین نشان داد که این دارو در دوزهای کم اثرات ضددردی مورفین را تشدید کرده است. ($P < 0.01$) $F(3, 28) = 5.0/662$ (نمودار ۲).

تزریق CGP35348 فقط در فاز مزمّن موجب افزایش پاسخ به درد به صورت وابسته به دوز شد، ولی این اختلاف فقط در حضور بالاترین دوز (۱۰ میکروگرم) معنی دار شده است ($P < 0.05$).

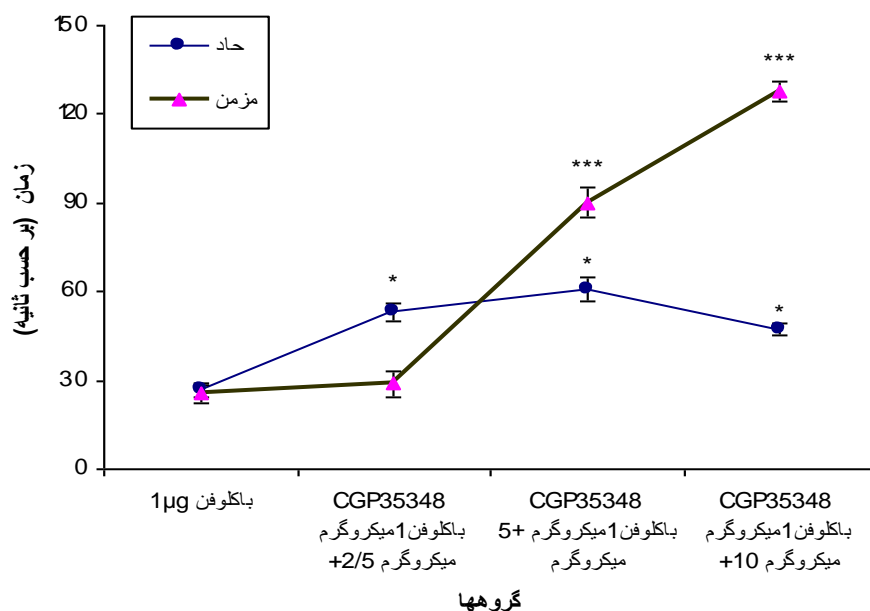


نمودار ۲: اثر ناشی از دوزهای مختلف CGP35348 (۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرولیتر) بر اثرات ضد دردی ناشی از تزریق ۱۰ میکروگرم مورفین در فاز حاد (۰-۵ دقیقه) و فاز مزمن (۴۵-۱۵ دقیقه) پس از تزریق فرمالین در پنجه پای عقبی حیوان. هر مقدار نشان داده شده برابر است با میانگین \pm SEM زمان ثبت شده در تعداد ۸ عدد موش $P < 0.05$ * و $P < 0.001$ ***.

تزریق میکرونی همزمان آگونیست و آنتاگونیست گیرنده گاباB:

۱۰ میکروگرم CGP35348 را دریافت می کردند. آنالیز داده ها بوسیله ANOVA، یک تقابل اثر میان باکلوفن و CGP35348 را نشان داد، بطوریکه در بالاترین دوز CGP35348، اثرات ضددردی باکلوفن کاملاً از بین رفته است [$F(3, 28) = 10.1/80$ ($P = 1/0.00$)].

نمودار ۳ اثر تعدیل کنندگی ناشی از تزریق میکرونی CGP35348 بر اثر ضددردی ناشی از باکلوفن در هسته میخی شکل را بعد از تزریق فرمالین نشان می دهد. حیوانات قبل از تزریق باکلوفن، دوزهای مختلف ۲/۵، ۵ و



نمودار ۳: مقایسه اثر تعدیل کنندگی ناشی از تزریق میکرونی CGP₃₅₃₄₈ بر اثر ضد درد ناشی از بکلوفن در فاز حاد (۰-۵ دقیقه) و فاز مزمن (۴۵-۱۵ دقیقه) پس از تزریق فرمالین در پنجه پای عقبی حیوان. هر مقدار نشان داده شده برابر است با میانگین $\pm SEM$ زمان ثبت شده در تعداد ۸ عدد موش $P < 0.05$ و $P < 0.001$.

بحث و نتیجه گیری

در برخی مطالعات گذشته، نالوکسان موجب کاهش اثر ضد درد ناشی از بیکوکولین (آنتاگونیست گیرنده GABA_A) تزریق شده به داخل PAG یا تزریق i.t. موسیمول (آگونیست گیرنده GABA_A) و یا تزریق i.c.v. بکلوفن شده است (۱۸ و ۱۶). در تحقیقات دیگر هم ثابت شده است که تزریق میکرونی نالوکسان یا موسیمول بداخل PAG موجب کاهش اثر ضد درد ناشی از مورفین و بیکوکولین شده است (۱۴). تقریباً بطور کلی در آزمونهای حرارتی درد، آگونیستهای GABA_A اثرات ضد درد مورفین را بلوک می کنند که این اثر بوسیله آنتاگونیستهای GABA_A معکوس می شود (۱۲ و ۱۳).

مکانیسم فوق نخاعی که بواسطه گیرنده های μ موجب اثرات بی درد مورفین می شود (۱۱). بوسیله فعال شدن گیرنده α آدرنرژیک یا سروتونرژیک

داروهای مخدر و داروهای که موجب انتقال سیناپسی گابا می شوند، دارای اثرات ضد درد شناخته شده ای هستند. در این تحقیق تزریق داخل هسته ای مورفین و بکلوفن (به عنوان آگونیست گیرنده GABA_B) موجب ایجاد اثرات ضد درد شد، به طوری که این پاسخ ضد درد به ترتیب به میزان ۷۰-۵۰ درصد در هر دو فاز آزمون فرمالین مشاهده شد. نتایج به دست آمده نشان داد تزریق داخل صفاقی نالوکسان موجب تشدید پاسخ ضد درد مرکزی ناشی از بکلوفن در هسته میخی شکل شده است که این کاهش به ترتیب برای فاز حاد و مزمن برابر ۹۵/۲ درصد و ۸۹/۶ درصد می باشد. در اثر تزریق همزمان بکلوفن و CGP₃₅₃₄₈، اثرات ضد درد بکلوفن در بالاترین دوز CGP₃₅₃₄₈ کاملاً حذف شده است در حالیکه اثرات ناشی از مورفین بخصوص در فاز حاد بوسیله CGP₃₅₃₄₈ تقویت شده است.

نتایج بدست آمده در این پژوهش باشند که نشان دهنده دخالت گیرنده های GABA_B در پاسخ ضد دردی ناشی از باکلوفن می باشد (۱۷،۹ و ۱۸). به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که خروجی مهاری گابا آرژیک هیسته Cnf، نقش مهمی در تعدیل رفتار پاسخ به درد در موش صحرایی دارد.

سپاسگزاری

صمیمانه از پرسنل و اعضای محترم هیئت علمی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان که هزینه این طرح را متقبل شدند و در انجام آن همکاری نمودند سپاسگزاری میگردد.

5HT₃ از طریق مسیر سروتونرژیک اسپاینوپتال اعمال می شود (۱۶). همچنین مکانیسم ضد دردی فوق نخاعی باکلوفن به صورت پیش سیناپسی و پس سیناپسی (۳)، از طریق مهار مسیره های صعودی و فعال کردن مسیر نزولی نورآدرنرژیک (۸) و سروتونرژیک (۱) واسطه گری می شود.

بطور کلی می توان گفت این اختلاف عملکردی داروها و گیرنده ها می تواند مربوط به محل قرارگیری گیرنده در شبکه درهم پیچیده عصبی و تفاوت عملکردی دو سیستم ضد دردی حرارتی و مکانیکی - شیمیایی باشد که موجب بروز چنین حالاتی می شود. مکانیسم نخاعی باکلوفن در ایجاد پاسخ ضددردی، وابسته به مهار فیبرهای آوران اولیه درد است. این اثر با تزریق CGP₃₅₃₄₈ i.t کاملاً خنثی می شود (۳). این نتایج می تواند تایید کننده

References

1. Abellan MT, Jolas T, Aghajanian GK, et al. Dual control of dorsal raphe serotonergic neurons by GABA_B receptors. *Electrophysiological and micro dialysis studies. Synapse* 2000; 36: 21-34.
2. Abols IA, Basbaum AI. Afferent connections of the rostral medulla of the cat: a neural substrate for midbrain-medullary interactions in the modulation of pain. *J Comp Neurol* 1991; 201(2): 285-297.
3. Bernard D, Bing Z, Lebares D. Afferents and efferents of the rat cuneiformis nucleus: an anatomical study with reference to pain transmission- *Brain Res* 1989; 490(1): 181-185.
4. Bouhasira D, Bing Z, LeBars D. Studies of brain structures involved in diffuse noxious inhibitory controls: the mesencephalon. *J Neurophysiol* 1990; 64:1712-1723.
5. Chang KM, Kim YH, Song DK, et al. Differential modulation by baclofen on antinociception- induced by morphine and β -endorphin administered intracerebroventricularly in the formalin test. *Neuropeptides* 1999; 33(6): 534-541.
6. Choi SS, Han KJ, Lee HK, et al. Possible antinociceptive mechanisms of opioid receptor antagonists in the mouse formalin test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003; 75: 447-457.
7. Cutting DA, Forban CC. Alternative approaches to analgesia, baclofen as a model compound. *Br Pharmacol* 1975; 54: 171-182.

8. Diring DM, Yaksh TL. Intrathecal baclofen & muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275(1): 219-227.
9. Furst S. Transmitter involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin* 1999; 48(2): 129-141.
10. Gilbert AK, Franklin KBJ. GABAergic modulation of descending inhibitory system from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose_response analysis of nociception and neurological deficits 2001; 90:25-36.
11. Green GM, Dickenson A. GABA-receptor control of the amplitude and duration of the neural response to formalin in the rat spinal cord. *Eur J Pain* 1997; 1(2): 95-104.
12. Hammond DL, Nelson V, Thomas D. Intrathecal methysergide antagonizes the antinociception but not the hyperalgesia produced by injection of baclofen in the ventromedial medulla of the rat. *Neuroscience letters* 1998; 224(13):93-96.
13. Hardman JE, Limbard EL, Goodman L. et al. The pharmacological basis of therapeutics 10th Ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001
14. Heinricher MM, Kaplan HJ. GABA-mediated inhibition in rostral ventromedial medulla: role in nociceptive modulation in the lightly anesthetized rat. *Neuroscience* 1991; 47: 105-113.
15. Hony Y, Abbott FV. Behavioral effect of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rats. *Neuroscience* 1994; 63: 827-836.
16. Hugel S, Schlichter R. Convergent control of synaptic GABA release from rat dorsal horn neurons by adenosine and GABA autoreceptors. *J Physiol* 2003; 551: 479-489.
17. Hurley RW, Banfor P, Hammond DL. Spinal pharmacology of antinociception produced by microinjection of μ and δ opioid receptor agonist in the ventromedial medulla of the rat. *Neuroscience* 2003; 118: 789-796.
18. Levy RA, Proudfit HK. The analgesic action of baclofen. *J Pharmacol EXP Ther* 1997; 200: 437-442.