

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

مرتضی بخشش^{*}، مظفر رضوانی پور^۱، محمد شیبانی^۲

تاریخ پذیرش:

تاریخ دریافت:

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 تعديل 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 (–) باکلوفن) و آنتاگونیست آن (CGP35348) در موش صحرایی بررسی شد.

یافته های پژوهش: تزریق میکرونی مرفین ($10\text{ }\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{l/rat}$) یا دوزهای متفاوت با کلوفن ($1\text{ }\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{l/rat}$ و $0.25\text{ }\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{l/rat}$) اثرات ضد دردی بارزی را در دو فاز حاد و مزمن آزمون بدنیال داشت. کاهش پاسخ ضد دردی که با تزریق مرفین یا با کلوفن در دو فاز ایجاد شد، بوسیله تزریق CGP35348 کاهش نشان داد. پاسخ به درد ناشی از تزریق میکرونی مرکب از باکلوفن (بالاترین دوز $1\text{ }\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{l/rat}$) و تزریق داخل صفاقی (i.p.) نالوکسان در هر دو فاز در مقایسه با گروه سالین یا گروه باکلوفن به تنها یک کاهش نشان داد.

تزریق میکرونی CGP35348 به تنها یک در فاز حاد آزمون فرمالین، اثرات ضد دردی داشت و ترکیب مرفین با دوزهای مختلف با کلوفن، موجب تقویت پاسخ ناشی از با کلوفن 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 مخدوش اثرات ضد دردی خود را در آزمون فرمالین اعمال کرده اند.

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

bakhshesh.m@gmail.com Email:

۱- مربی و عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام

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

۳- استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اصیاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مقدمه

احتمال دخالت سیستم مخدري و تداخل عملكردي آن با عوامل موثر بر گيرنده گابا در هسته ميخي شكل مطالعه نشده است و تقويت اثر ضد دردي سیستمیک مرفين بوسيله اثرات گابا ارزيك در جوندگان منجر به اين نتيجه گيري شده است که سیستم هاي مخدري و گابا ارزيك بطور جدگاهه عمل مىكنند ولی اثرات آنها در مسيرهای نزولي همگرا مىشود(۱۲و۱۱و۱۰). تفاوت عملكردي بين مخدريها و گابا، به ناحие مورد مطالعه بستگي دارد مثلاً بيدردي ناشي از گابا به نالوكسان حساسيتى ندارد ولی آگونويست هاي گابا و مهاركنتهای گابا ترانس آميناز موجب افزایش بيدردي ناشي از مخدريها مىشوند(۱۳).

مواد و روش‌ها

نمونه مورد مطالعه: در اين پژوهش از ۱۵۴ مosh صحرایي نر از نژاد NMRI، با وزن تقریبی بین ۳۱۰-۲۵۰gr در تمام آزمایشات استفاده شد. حيوانات در گروه های هشت تا يي در شرایط كنترل ثابت حرارت (۲۱±۲°C) و نور نگهداري شدند. حيوانات به جز موقع آزمایش در دسترسی به آب و غذا هیچ محدودیتی نداشتند.

داروها و مواد: موادی که استفاده شد عبارت بودند از: نالوكسان (آلفاسان - هلند)، (-) باکلوفن (۱۴) و CGP35348 (سيگما- آلمان) به ترتيب به عنوان آگونويست و آنتاگونويست گيرنده GABA، مورفين (تولید دارو- ايران)، زايلازين (آلفاسان - هلند)، کتامين هييدروكلرايد (روتكس ميديا- هلند).

باکلوفن (۰/۲۵، ۰/۰ و ۱ ميكروگرم در ۰/۵ ميكروليتر)، CGP35348 (۰/۵ و ۱۰ ميكروگرم در ۰/۵ ميكروليتر) و مورفين (۱۰ ميكروگرم در ۰/۵ ميكروليتر) در سالين حل شدند و در هر روز محلول هاي جديدي از آنها در حجم ۰/۵ ميكرو ليتر در مدت زمان يك دقيقه با تکنيك پيش راندن حباب، بوسيله پمپ انفوزيون AP= +۰/۲۸mm (Stoelting- USA) در مختصات

درد ناشي از التهاب يا آسيب اعصاب محيطي يك وضعیت ناراحتکننده و بعضًا ناتوان کننده است. خوشختانه سیستم هاي کنترل کننده نزولي درد که از قسمت شکمی بصل النخاع (RVM)، هسته دامه بزرگ (NRM)، هسته رافه پشتی (NRD)، هسته ماگنوسلاور (NMC) و ماده خاکستری دورقناطی (PAG) سرچشممه مىگيرند، نقش مهاری موثری بر انتقال درد دارند(۱).

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

هسته ميخي شكل (Cnf) يك ساختار مشبك در مغز ميانی است که از بخش منقاری پل مغز تا قسمت پره تكتال تalamos امتداد دارد(۳). اين هسته در نزديکی PAG است و ارتباطات وسیعی با سیستم نزولي درد دارد که عمدتاً ورودی و خروجی هاي گابا ارزيك و کولینرژيك با RVM و NRM و PAG برقرار مىکند(۴).

تحریک الکتریکی هسته ميخي شكل در حین انجام آزمایشات رفتاري درد، موجب افزایش دوره زمانی (-Tail flick) آزمون پرش دم شده است(۵). به طوريکه اين اثر ضد درد بوسيله نالوكسان (آنتاگونويست عمومی مخدريها) و اسكوبولامين (آنتاگونويست موسكاريني کولينرژيك) قبل برگشت بوده است(۶و۷).

تخريب مراكز ضد درد و فيبرهای نزولي کنترل درد، موجب کاهش اثر ضد درد ناشي از مخدريها مىشود(۷). گابا سه نوع گيرنده شناخته شده دارد. گيرنده هاي GABA در سیستم ضد دردی عملكرد شناخته شده‌اي دارند(۸ و ۹). از آنجا که وجود گيرنده‌های گابا A و B در هسته ميخي ثابت شده است و گيرنده متابوتروپيك گابا B به دو صورت پيش سيناپسي و پس سيناپسي اثرات هيبيرپلاريزه کننده و مهاری دارد، لذا هدف از اين پژوهش ابتدا به بررسی نقش اين گيرنده اختصاص یافت.

یافته های پژوهش

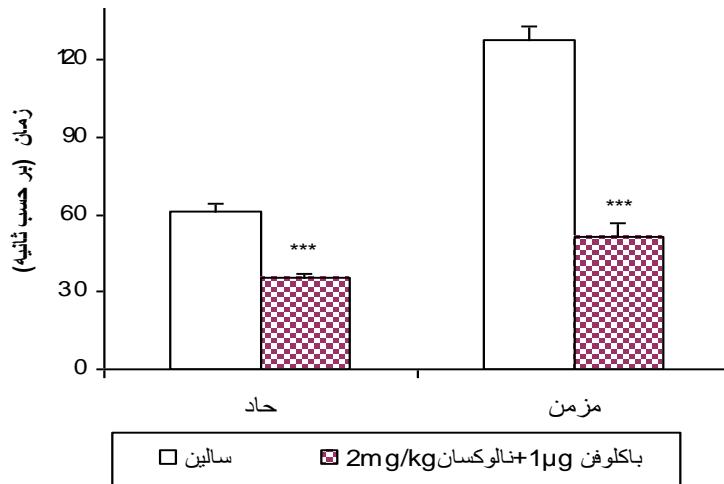
در این پژوهش تعداد ۱۵۴ موش صحرایی نر از نژاد N-MRI برای آزمایشات در نظر گرفته شد و داروهای مورد نظر در دوز های تعیین شده تزریق شدند.

اثر نالوکسان بر تاثیر ضد دردی ناشی از تزریق آگونیست گیرنده گابا **B**:

مقایسه بین گروه باکلوفن و نالوکسان (2mg/kg) و گروه باکلوفن به تنها بی 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 $[F(2, 28) = 0.004, P < 0.001]$ (شکل ۱).

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



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 ($P < 0.001$). *** $P < 0.001$.

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،

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 $[F(3, 40) = 0.402, P = 0.1]$. تزریق مورفین ($5\ \mu\text{g}/0.1\ \mu\text{l}$) در داخل

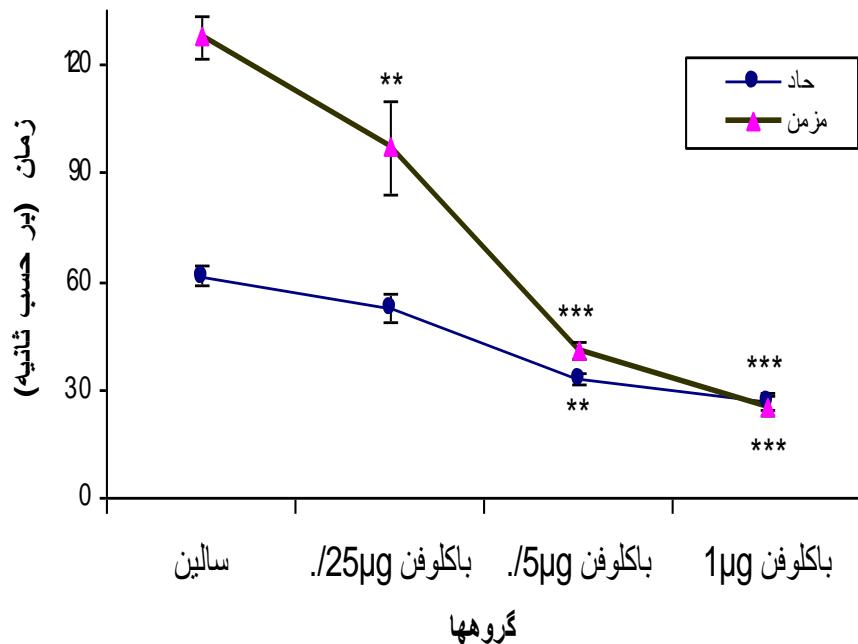
این کاهش کاملاً معنی‌دار بود ($F(۳, ۲۸) = ۴۱/۳۸$ ($P < 0.01$)) (جدول شماره ۱).

گروهها	فاز حاد	فاز مزمن
سالین	$۶۱/۵۶ \pm ۳/۰۴$	$۱۲۷ \pm ۵/۵۶$
شم جراحی	$۵۷/۱۸ \pm ۳/۲۵$	$۱۱۶/۸۱ \pm ۳/۰۸$
مورفین $۱۰ \mu\text{g}/\text{rat}$	$۳۵/۶۲ \pm ۱/۴۱$ ***	$۵۱/۸۱ \pm ۴/۸۵$ ***
باکلوفن $۱ \mu\text{g}/\text{rat}$	$۲۶/۸۱ \pm ۲/۱$ ***	$۲۵/۴۳ \pm ۲/۹$ ***
باکلوفن $۰/۵ \mu\text{g}/\text{rat}$	$۳۳/۲۵ \pm ۱/۴۸$ ***	$۴۰/۶۸ \pm ۲/۴۱$ ***
باکلوفن $۰/۲۵ \mu\text{g}/\text{rat}$	$۵۲/۵ \pm ۳/۷۹$	$۹۷ \pm ۱۲/۸$ **
باکلوفن $۱ \mu\text{g}/\text{rat}$ + ۲ mg/kg نالوکسان	$۲/۴۲ \pm ۰/۸۹$ *** ⚫	$۱۰ \pm ۱/۸۵$ *** ⚫

جدول ۱: خلاصه نتایج به دست آمده از تزریق میکرونی سالین، مورفین، باکلوفن و تزریق داخل صفاقی نالوکسان نشان داده شده است: حیوانات با سالین ($۰/۵$ میکرولیتر)، با کلوفن ($۰/۲۵$ و $۰/۰۵$ و $۰/۰۱$ میکروگرم) و باکلوفن $1 \mu\text{g}$ همراه با بدون تزریق نالوکسان 2mg/kg مورد مطالعه قرار گرفتند ($p < 0.01$). ***: مقایسه بین گروه باکلوفن + نالوکسان با گروه باکلوفن.

مشاهده شد. با استفاده از ANOVA تایید شد که دارو موجب اثرات کاهشی وابسته به دوز شده است. $[F(۳, ۲۸) = ۴۳/۸۴$ ($p < 0.01$)] بطوریکه بیشترین پاسخ ضددردی در بالاترین دوز مشاهده می شود.

تزریق میکرونی دوزهای مختلف باکلوفن ($۰/۰۵$ ، $۰/۲۵$ و ۱ میکروگرم) در داخل هسته میخی شکل، موجب کاهش شدید پاسخ به درد شد (شکل ۱). بی دردی ناشی از باکلوفن همانند مورفین در هر دو فاز آزمون فرمالین

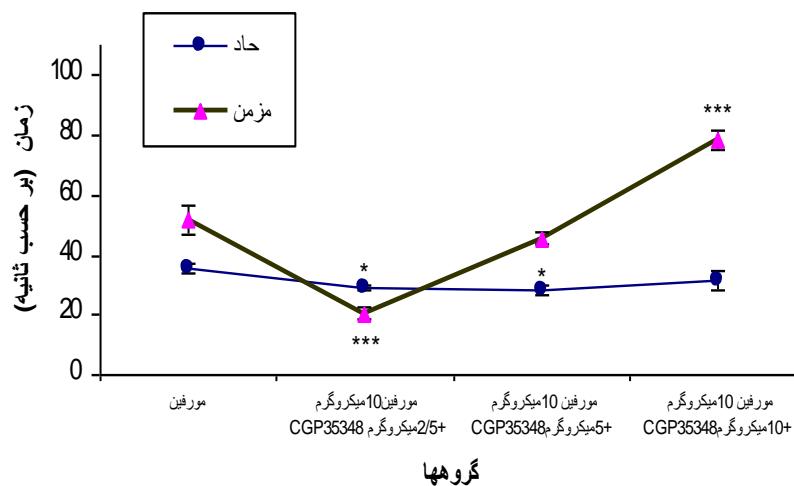


شکل ۱. اثرات خد دردی دوزهای مختلف با کلوفن در فاز اول (۵-۰ دقیقه) و فاز دوم (۱۵-۴۵ دقیقه) آزمون فرمالین. مجموع زمان پاسخ به درد لیسیدن و گازگرفتن پنجه پای تزریق شده در زمان آزمون ثبت شده است. هر مقدار نشان داده شده برابر با میانگین \pm SEM زمان ثبت شده در تعداد ۸ عدد موش می باشد $*p<0.05$, $**p<0.01$ و $***p<0.001$.

تزریق میکرونی آنتاگونیست گیرنده گابا B:

تزریق CGP₃₅₃₄₈ فقط در فاز مزمن آنالیز داده های مربوط به در حضور مرفین نشان داد که این دارو در CGP₃₅₃₄₈ دوزهای کم اثرات خدردی مورفین را تشدید کرده است (نمودار ۲). $F(3, 28) = 28.6$ و $P < 0.01$. [F(3, 28) = 5.0/6.2 (P < 0.05)]

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



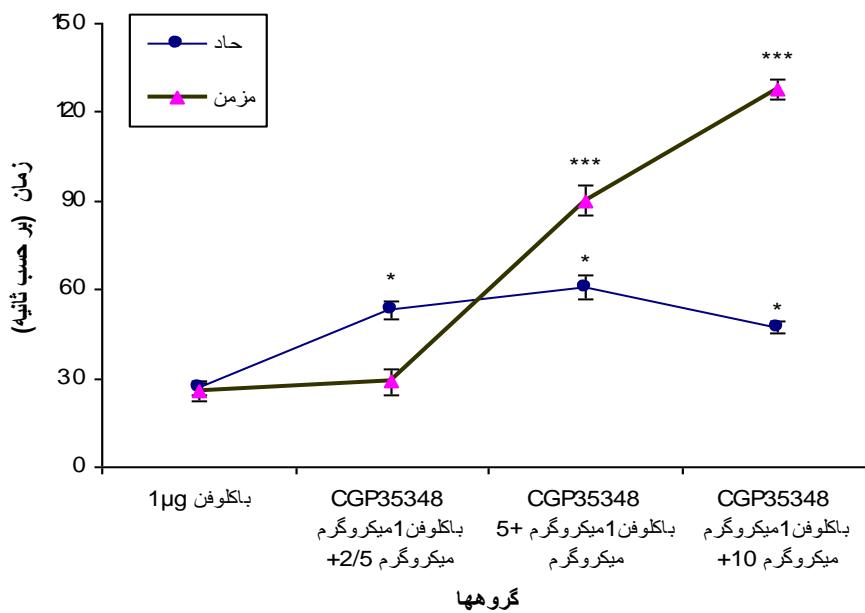
نمودار ۲: اثر ناشی از دوزهای مختلف CGP35348 (۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرولیتر) بر اثرات ضد دردی ناشی از تزریق ۱۰ میکروگرم مرفین در فاز حداد (۵-۰ دقیقه) و فاز مزمن (۴۵-۱۵ دقیقه) پس از تزریق فرمالین در پنجه پای عقبی حیوان. هر مقدار نشان داده شده برابر است با میانگین \pm SEM زمان ثبت شده در تعداد ۸ عدد موش $P < 0.05$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

تزریق میکرونی همزمان آگونیست و آنتاگونیست

گیرنده گابا B:

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 ضد دردی باکلوفن کاملاً از بین رفته است $[F(3, 28) = 10.1 / P = 0.000]$.

نمودار ۳ اثر تعديل کنندگی ناشی از تزریق میکرونی CGP35348 بر اثر ضد دردی 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 تعديل کنندگی ناشی از تزریق میکرونی CGP35348 بر اثر ضددردی ناشی از باکلوفن در فاز حداد (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 ۱ عدد موش $P < 0.05$ و $*** = P < 0.001$.

بحث و نتیجه گیری

در برخی مطالعات گذشته، نالوکسان موجب کاهش اثر ضد دردی ناشی از بیکوکولین (آنتاگونیست گیرنده i.t (GABA_A) تزریق شده به داخل PAG یا تزریق i.c.v موسیمول (آگونیست گیرنده GABA_A) و یا تزریق باکلوفن شده است(۱۶ و ۱۷). در تحقیقات دیگر هم ثابت شده است که تزریق میکرونی نالوکسان یا موسیمول بداخل PAG موجب کاهش اثر ضددردی ناشی از مورفین و بیکوکولین شده است (۱۴). تقریباً بطور کلی در آزمونهای حرارتی درد، آگونیستهای GABA_A اثرات ضد دردی مورفین را بلوك می کنند که این اثر بوسیله آنتاگونیستهای GABA_A معکوس می شود (۱۲ و ۱۳).

mekanisim فوق نخاعی که بواسطه گیرنده های μ موجب اثرات بی دردی مورفین می شود (۱۱). بوسیله فعال شدن گیرنده α_2 آدرنرژیکی یا سروتونرژیکی

داروهای مخدر و داروهایی که موجب انتقال سینپاسی گابا می شوند، دارای اثرات ضد دردی شناخته شده ای هستند. در این تحقیق تزریق داخل هسته ای مورفین و باکلوفن (به عنوان آگونیست گیرنده GABA_B) موجب ایجاد اثرات ضد دردی شد، به طوری که این پاسخ ضد دردی به ترتیب به میزان ۵۰-۷۰ 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 باکلوفن در هسته میخی شکل شده است که این کاهش به ترتیب برای فاز حداد و مزمن برابر ۹۵/۲ درصد و ۸۹/۶ درصد می باشد. در اثر تزریق همزمان باکلوفن و CGP35348، اثرات ضد دردی باکلوفن در بالاترین دوز ۳۵۳۴۸ CGP35348 کاملاً حذف شده است در حالیکه اثرات ناشی از مورفین بخصوص در فاز حداد 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 ارزیکی هسته Cnf، نقش مهمی در تعديل رفتار پاسخ به درد در موش صحرابی دارد.

سپاسگزاری

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

5HT₃ از طریق مسیر سروتونرژیک اسپاینوبیال اعمال می شود (۱۶). همچنین مکانیسم ضد دردی فوق نخاعی باکلوفن به صورت پیش سیناپسی و پس سیناپسی (۳)، از طریق مهار مسیرهای صعودی و فعال کردن مسیر نزولی نورادرنرژیک (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 - شیمیابی باشد که موجب بروز چنین حالاتی می شود. مکانیسم نخاعی باکلوفن در ایجاد پاسخ ضددردی، وابسته به مهار فیرهای آوران اولیه درد است. این اثر با تزریق i.t CGP35348 کاملاً خنثی می شود (۳). این نتایج می تواند تایید کننده

References

1. Abellán 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, Lebars D. Afferents and efferents of the rat cuneiformis nucleus: an anatomical study whit 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 responses 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 venteromedial 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, Proudfoot HK. The analgesic action of baclofen. *J Pharmacol EXP Ther* 1997; 200: 437-442.