

## Evaluation of mRNA Expression of Calcitonin Gene-Dependent Peptide (CGRP) and Rat Calcitonin (rCT) in the Periaqueductal Gray Area (PAG) of Diabetic Rats in the Formalin Test

Olya Moshiri<sup>1</sup> , Javad Sajedianfard<sup>1\*</sup> , Saeid Hosseinzadeh<sup>2</sup>, Kaveh Rahimi<sup>1</sup>, Saeedeh Ahmadi Jokani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> Dept of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research article

#### Article History:

Received: 08 June 2021

Revised: 26 June 2021

Accepted: 27 October 2021

#### \* Correspondence to:

Javad Sajedianfard

Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Email: sajedian@shirazu.ac.ir

### ABSTRACT

**Introduction:** CGRP and rCT are involved in descending pain control areas. This study aimed to evaluate the effect of intracerebroventricular administration (ICV) of CGRP and rCT on mRNA expression of CGRP and rCT peptides in the Periaqueductal Gray Area (PAG) of the diabetic rats in the formalin test.

**Material & Methods:** This study investigated 24 male Sprague-Dawley rats in four groups (n=6). To induce diabetes, streptozotocin at a dose of 45 mg/kg was used intraperitoneally. CGRP or rCT peptides at a dose of 1.5 nmol with a volume of 5 µl were ICV injected daily for seven days. Pain-related behaviors were recorded in the formalin test for up to 60 min in the study groups. The PAG was then removed to assess the changes made in the mRNA expression of the CGRP and rCT. (Ethical code: INT2M129396)

**Findings:** ICV injection of CGRP or rCT in diabetic rats reduced pain in the acute and middle phases of the formalin test. In addition, ICV administration of CGRP increased CGRP mRNA expression in the PAG. However, ICV administration of rCT increased the mRNA expression of both CGRP and rCT peptides after seven days in the PAG.

**Discussion & Conclusion:** ICV injection of CGRP and rCT peptides reduced the pain of formalin injection in rats in the experimental model of streptozotocin-induced diabetes mellitus, possibly by altering the mRNA expression of both peptides.

**Keywords:** Analgesia, CGRP, Diabetes, mRNA, rCT

### ➤ How to cite this paper

Moshiri O, Sajedianfard J, Hosseinzadeh S, Rahimi K, Ahmadi Jokani S. Evaluation of mRNA Expression of Calcitonin Gene-Dependent Peptide (CGRP) and Rat Calcitonin (rCT) in the Periaqueductal Gray Area (PAG) of Diabetic Rats in the Formalin Test. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(1): 55-64.



## بررسی تغییر بیان mRNA مربوط به پپتید وابسته به ژن کلسی تونین (CGRP) و رت کلسی تونین (rCT) در ناحیه خاکستری دور قناتی (PAG) موش‌های صحرایی دیابتی در آزمون فرمالین

علیا مشیری<sup>۱</sup>، جواد ساجدیان فردا<sup>۱\*</sup>، سعید حسین زاده<sup>۲</sup>، کاوه رحیمی<sup>۱</sup>، سعیده احمدی جوکانی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۵

نویسنده مسئول:

جواد ساجدیان فرد

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

Email:

sajedian@shirazu.ac.ir

**مقدمه:** CGRP و rCT در نواحی کنترل درد نزولی نقش دارند. هدف از این مطالعه بررسی اثر تجویز داخل بطن مغزی CGRP و rCT بر بیان mRNA پپتیدهای CGRP و rCT در ناحیه PAG، در موش‌های صحرایی دیابتی در آزمون فرمالین است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، از ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داولی در چهار گروه (N=6) استفاده شد. برای القای دیابت از داروی استرپتوزوتوسین با دوز ۴۵ mg/kg به صورت داخل صفاقی استفاده گردید. پپتیدهای CGRP و rCT با دوز ۱/۵ nmol با حجم ۵ میکرولیتر روزانه و به مدت ۷ روز به صورت داخل بطن مغزی تزریق شد. رفتارهای مرتبط با درد در آزمون فرمالین تا دقیقه ۶۰ در گروه‌های مطالعه شده ثبت گردید؛ همچنین ناحیه PAG به منظور ارزیابی تغییر میزان بیان mRNA پپتیدهای CGRP و rCT بر داشته شد.

**یافته‌ها:** تزریق داخل بطن مغزی CGRP و یا rCT در موش‌های صحرایی دیابتی، موجب کاهش درد در فاز حاد و میانی آزمون فرمالین گردید. علاوه بر این، تجویز CGRP داخل بطن مغز موجب افزایش بیان mRNA مربوط به CGRP در ناحیه PAG شد؛ اما تجویز rCT داخل بطن مغز موجب افزایش بیان mRNA مربوط به هر دو پپتید CGRP و rCT پس از گذشت هفت روز در ناحیه PAG گردید.

**بحث و نتیجه‌گیری:** تزریق داخل بطن مغزی پپتیدهای CGRP و rCT، درد ناشی از تزریق فرمالین در موش‌های صحرایی نمونه تجربی دیابت قندی القاشده توسط استرپتوزوتوسین را احتمالاً به واسطه تغییر در بیان mRNA مربوط به هر دو پپتید کاهش می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** دیابت، CGRP، rCT، ضد دردی، mRNA

**استناد:** مشیری، علیا؛ ساجدیان فرد، جواد؛ حسین زاده، سعید؛ رحیمی، کاوه؛ احمدی جوکانی، سعیده. بررسی تغییر بیان mRNA مربوط به پپتید وابسته به ژن کلسی تونین (CGRP) و رت کلسی تونین (rCT) در ناحیه خاکستری دور قناتی (PAG) موش‌های صحرایی دیابتی در آزمون فرمالین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، اردیبهشت ۱۴۰۱؛ ۳۰(۱): ۶۴-۵۵.

ناحیه PAG جزئی از ساختارهای مغز است. این هسته در اعمال فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بسیاری همچون درد، ترس، استرس و هوشیاری دخالت دارد (۱). هسته PAG موجود در مغز میانی، یکی از ساختارهای هماهنگ کننده مهم در مسیرهای کنترل درد نزولی است که این ناحیه در بردارنده تراکم بالایی از انتهای نورونهای ترشح کننده انکفالین است. ارتباط مستقیم PAG با هسته سروتونوزیک رافه مگنوس، نقش مهمی در تشکیل مسیرهای نزولی کنترل درد دارد. تعدیل درد به صورت یک مدار تعدیل درد نزولی است که ورودیها از مناطق چندگانه شامل هیپوتالاموس، آمیگدال، rACC و PAG به مدار وارد می شوند و خروجی مدار از طریق PAG به بصل النخاع صورت می گیرد. وجود سازوکارهای اندونوس برای تعدیل درد به اثبات رسیده است. در مسیر ضددرد نزولی نوروترانسمیترها و نوروپپتیدهای فراوانی نقش دارند (۲).

CGRP یکی از پپتیدهای خانواده کلسی تونین است که گیرنده های آن در نواحی مختلف مغز وجود دارند و بی دردی را وساطت می کنند. گیرنده CGRP از ارودایمیرزاسیون پروتئینی به نام RAMP با گیرنده کلسی تونین به وجود می آید. گیرنده های CGRP تراکم بالایی در PAG و نواحی مختلف هسته رافه مگنوس دارند (۷). آنتاگونیست های CGRP موجب مهار آثار ضددرد در نورون های trigeminal می شوند. این داده ها تأیید می کنند که CGRP در هر دو سیستم نزولی مهاری و تسهیلی درد نقش دارد. تجویز CGRP در قسمت شکمی جانبی ناحیه PAG موجب مهار نورون های انتقال دهنده درد در موش صحرایی شده است. تجویز CGRP به صورت تزریق مستقیم داخل هسته رافه مگنوس، موجب کاهش درد می شود (۳، ۴).

کلسی تونین حدود ۲۰ درصد با CGRP هومولوگ است. گیرنده کلسی تونین به دو شکل CTRa و CTRb وجود دارد که توانایی آنها برای اتصال به کلسی تونین تفاوت چندانی باهم ندارد. به طور کلی، توزیع گیرنده های

CT و CGRP در موش صحرایی درجه بالایی از هم پوشانی دارند (۵). آثار ضددردی در رابطه با تزریق داخل بطن مغزی سالمون کلسی تونین در آزمون تکانه دم و صفحه داغ موجب آثار ضددردی مشاهده شده است (۶).

بیماری دیابت یکی از شایع ترین بیماری های متابولیکی اندوکرینی رایج در جوامع بشری است (۷). تاکنون مطالعه ای در رابطه با آثار ضددردی پپتیدهای CGRP و rCT در موش های صحرایی دیابتی انجام نشده است. در دیابت مزمن به علت تخریب نورون های عصبی، آستانه احساس درد کاهش می یابد؛ اما بر اساس مطالعات پیشین در دیابت حاد کوتاه مدت، زمان کافی برای تخریب نورونی وجود ندارد، باین حال، حساسیت به درد افزایش می یابد و حیوان نسبت به درک حس درد آستانه تحریک کمتری دارد (۸). هدف از این مطالعه افزایش اطلاعات درباره دو پپتید CGRP و rCT در رابطه با آثار ضددردی در آزمون فرمالین و تغییر میزان بیان mRNA آنها در ناحیه PAG موش های صحرایی دیابتی است.

## مواد و روش ها

**حیوانات:** همه آزمایش ها روی موش های صحرایی نر نژاد اسپراگ داولی (با وزن تقریبی  $270 \pm 30$ ) انجام شد. آب و غذا به صورت آزادانه در اختیار حیوانات قرار داشت و حیوانات تا زمان آزمایش، در دمای  $22 \pm 2^\circ C$  و تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعت نگهداری گردیدند. پروتکل این مطالعه توسط کمیته اخلاق مصوب دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (کد: INT2M129396) تصویب شد.

**القای دیابت در موش های صحرایی دیابتی:** برای دیابتی کردن موش های صحرایی، داروی استرپتوزوتوسین با دوز  $45 \text{ mg/kg}$  از راه داخل صفاقی، به صورت تک دوز به موش های صحرایی تزریق گردید. استرپتوزوتوسین در بافر سترات سدیم سرد با  $\text{pH}=4/5$  حل شد (۲۰). پیش از القای دیابت، به مدت ۱۲ ساعت، به حیوانات غذا داده نشد. موش های صحرایی به مدت ۲۴ ساعت پس از تزریق

استرپتوزوتوسین، دکستروز ۵ درصد دریافت کردند. پس از ۷۲ ساعت، از دم آن‌ها خون گرفته شد و با استفاده از گلوکومتر، سطح گلوکز آن‌ها تعیین گردید. در این پژوهش، از موش‌های صحرایی که سطح گلوکز پلاسمایی‌شان بیشتر از ۲۵۰ mg/dl بود، به‌عنوان موش‌های دیابتی استفاده شد.

گروه‌های آزمایشی: در این مطالعه از ۳۰ سر موش صحرایی نر استفاده شد. در پایان، تعداد ۶ سر از موش‌های صحرایی به علت مرگ و یا تأیید نشدن دیابتی از مطالعه حذف گردیدند و ۲۴ سر موش صحرایی دیابتی، به‌طور تصادفی، در ۴ گروه (N=6) تقسیم‌بندی شدند:

گروه ۱ (کنترل): موش‌های صحرایی دیابتی که سرم فیزیولوژی، با حجمی مشابه با گروه آزمایش، به‌صورت داخل بطن مغزی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به‌صورت زیرپوستی، در پنجه پای عقب دریافت کردند؛

گروه ۲ (کنترل\_فرمالین): موش‌های صحرایی دیابتی که سرم فیزیولوژی، با حجمی مشابه با گروه‌های آزمایش، به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد به‌صورت زیرپوستی، در پنجه پای عقب دریافت نمودند؛

گروه ۳ (rCT): موش‌های صحرایی دیابتی که ۵۰ میکرولیتر rCT با دوز ۱/nmol5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد را به‌صورت زیرپوستی، در پنجه پای عقب دریافت کردند؛

گروه ۴ (CGRP): موش‌های صحرایی دیابتی که ۵۰ میکرولیتر CGRP با دوز ۱/۵ nmol به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد را به‌صورت زیرپوستی، در پنجه پای عقب دریافت نمودند.

مواد شیمیایی: در این مطالعه، CGRP و rCT از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. پودر لیوفلیزه‌شده پپتیدها در نرمال سالین حل گردید و پس از تهیه استوک با دوز مدنظر، تا زمان آزمایش در دمای ۷۰°C- نگه‌داری شد. در روز آزمایش، پپتیدها یک ساعت پیش از تزریق داخل بطن مغزی، در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند؛ همچنین برای القای دیابت، استرپتوزوسین (شرکت

سیگما آلدریج، آمریکا) تهیه گردید.

جراحی: موش‌های صحرایی توسط داروی بیهوشی کتامین (۹۵ kg/mg) و زایلازین (۵ kg/mg) بیهوش شدند. برای تزریق داخل بطن مغز، بر اساس اطلس پاکسنوس و با مختصات  $DV=-3.6$ ،  $L=+1.5$  و  $AP=0.8$ ، کانول راهنما در ناحیه بطن مغز کاشت گردید. یک هفته زمان به‌منظور ریکاوری حیوان در نظر گرفته شد؛ سپس به مدت ۷ روز، تزریقات داخل بطن مغزی در گروه‌های آزمایش صورت گرفت. روز هفتم، آزمون فرمالین انجام گردید. در پایان، حیوانات با استفاده از گاز دی‌اکسید کربن کشته شدند و بلافاصله مغز آن‌ها خارج گردید. با استفاده از اسکالپل ناحیه PAG جدا شد و تا زمان بررسی میزان بیان mRNA، در دمای ۷۰°C- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

آزمون فرمالین: با توجه به استاندارد بودن آزمون فرمالین، به‌عنوان روش بررسی درد تونیک ناشی از التهاب در موش صحرایی می‌توان تغییرات سامانه عصبی مرکزی در کنترل آن را مشاهده کرد. در روز آزمون، فرمالین ۲/۵ درصد با حجم ۵۰  $\mu$ l به کف پنجه پای حیوان تزریق شد و بلافاصله رفتار درد بر اساس دستورالعمل آزمون فرمالین تا ۶۰ دقیقه، در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای ثبت گردید، بدین ترتیب که در طول آزمون، هنگامی که حیوان کف پای خود را بر سطح قفس آزمون قرار می‌داد، عدد «صفر» ثبت می‌شد؛ هنگامی که حیوان کف پا را روی سطح قرار می‌داد؛ اما پا را اندکی جمع کرده بود، عدد «یک» ثبت می‌گردید؛ اگر حیوان پا را داخل شکم جمع می‌کرد یا با کف پا به زمین ضربه می‌زد، عدد «دو» و هنگامی که حیوان ناحیه تزریق را گاز می‌گرفت یا لیس می‌زد، عدد «سه» ثبت می‌شد.

استخراج mRNA: میزان ۳۰ میلی‌گرم از بافت با قرار دادن در تانک ازت منجمد گردید؛ سپس با کوبیدن در هاون هموژن شد. برای استخراج RNA، از کیت استخراج RNA کامل RNX-Plus Solution (شرکت سیناکلون- ایران) استفاده گردید. استخراج RNA طبق

جدول شماره ۱. توالی پرایمرها

نام پرایمر	توالی نوکلئوتید	ژن هدف
CTF	ATCTAAGCGGTGCGGTAATC	CT
CTR	CTTGTGAAGTCCTGCGTGT	
CR	GAGCCTGTGACACTGCCACC	CGRP
LR	GGTGGCTGACCGGGCCTAGAT	
Control	F: GAAATCGTGGACATTAAG R: GCTAGAAGCATTGCGGTGGA	$\beta$ -actin

دستورالعمل کیت صورت گرفت.

سنتر *cDNA* به منظور انجام سنتز *cDNA* از RNA استخراج شده، از کیت *cDNA Synthesis EasyTM* (شرکت پارس طوس- ایران) استفاده شد. برای این منظور، حجمی از RNA استخراج شده که حاوی ۳۰۰۰ نانوگرم RNA بود، در میکروتیوب RNase free با یک میکرولیتر پرایمر Random hexamer مخلوط گردید و با آب تیمار شده با DEPC به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. ادامه مراحل سنتز *cDNA* طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. بررسی بیان ژن با استفاده از *Real-time PCR* بررسی بیان mRNA پپتیدهای rCT، CGRP و  $\beta$ -actin با استفاده از *Real-time PCR* انجام شد. برای انجام *Real-time PCR* از کیت (BIOEeasy- چین) با حجم نهایی واکنش ۲۰  $\mu$ l طبق دستورالعمل کیت استفاده گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

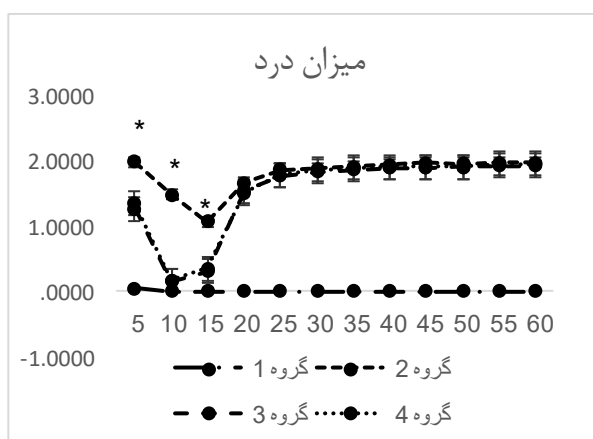
آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS با

روش آماری one-way ANOVA و آزمون تکمیلی توکی آنالیز گردید. سطح معناداری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

آزمون فرمالین: میانگین شدت درد در فاز حاد آزمون فرمالین، در گروه‌های سوم ( $1/28 \pm 0/04$ ) و چهارم ( $1/35 \pm 0/05$ ) به طور معناداری کمتر از گروه دوم ( $2/00 \pm 0/02$ ) بود ( $P < 0.05$ ). در فاز میانی آزمون فرمالین، میانگین شدت درد در گروه‌های سوم ( $0/23 \pm 0/00$ ) و چهارم ( $0/26 \pm 0/01$ ) به طور معناداری کمتر از گروه دوم ( $1/0 \pm 29/03$ ) بود ( $P < 0.05$ ).

میانگین شدت درد در فاز مزمن آزمون فرمالین گروه‌های مطالعه شده در کل فاز مزمن تفاوت معناداری نداشت (شکل شماره ۱). اعداد میانگین ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ) مربوط به زمان‌های مختلف آزمون فرمالین (از زمان



شکل شماره ۱. شدت درد در گروه‌های مختلف آزمون فرمالین. گروه ۱. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به صورت زیرپوستی در پنجه پای عقب؛ گروه ۲. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد در پنجه پای عقب؛ گروه ۳. rCT با دوز ۱.۵ nmol به صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد؛ گروه ۴. CGRP با دوز ۱.۵ nmol به صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد. \* تفاوت معناداری گروه‌های سوم و چهارم با گروه دوم.

**جدول شماره ۲.** رفتار درد در آزمون فرمالین. گروه ۱. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به صورت زیر پوستی در پنجه پای عقب؛ گروه ۲. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد در پنجه پای عقب؛ گروه ۳. rCT با دوز ۱.۵ nmol و ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد؛ گروه ۴. CGRP با دوز ۱.۵ nmol به صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد. حروف نامشابه اختلاف سطح معناداری میان گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد (mean±SEM) (P<0.05).

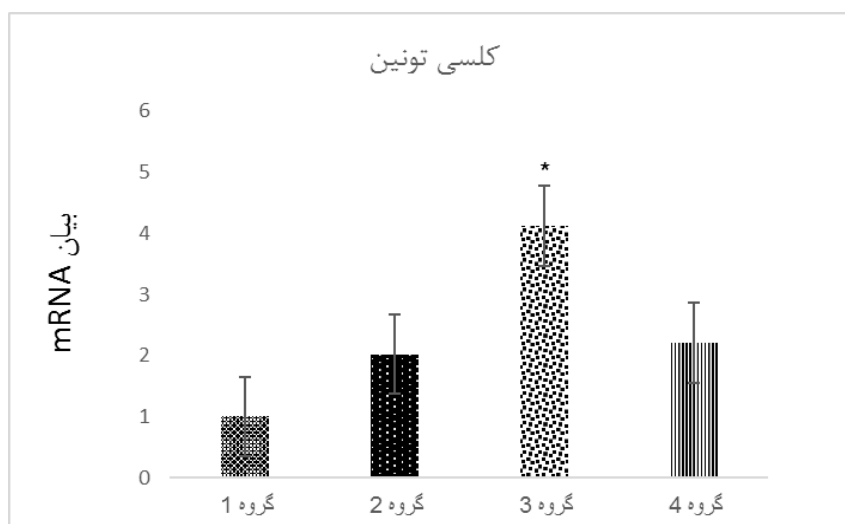
دقیقه ۵	دقیقه ۱۰	دقیقه ۱۵	دقیقه ۲۰	دقیقه ۲۵	دقیقه ۳۰	دقیقه ۳۵	دقیقه ۴۰	دقیقه ۴۵	دقیقه ۵۰	دقیقه ۵۵	دقیقه ۶۰	گروه
0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	۱
2±0b	1.5±0.05d	1.08±0.04d	1.68±0.07bc	1.78±0.05bc	1.89±0.05ab	1.93±0.06bc	1.95±0.03bc	1.98±0.04bc	1.98±0.01bc	1.98±0.01b	2±0b	۲
1.28±0.04b	0.16±0.01b	0.32±0.02b	1.55±0.06b	1.98±0.01b	1.85±0.02b	1.88±0.02b	1.91±0.01b	1.91±0.03b	1.92±0.02b	1.94±0.02b	1.93±0.01b	۳
1.35±0.05b	0.18±0.01b	0.36±0.02b	1.52±0.03b	1.8±0.03b	1.88±0.02	1.91±0.02b	1.92±0.02b	1.92±0.02b	1.93±0.02b	1.98±0.01b	1.97±0.02b	۴

شروع آزمون تا مدت زمان ۶۰ دقیقه با فواصل زمانی ۵ دقیقه) در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

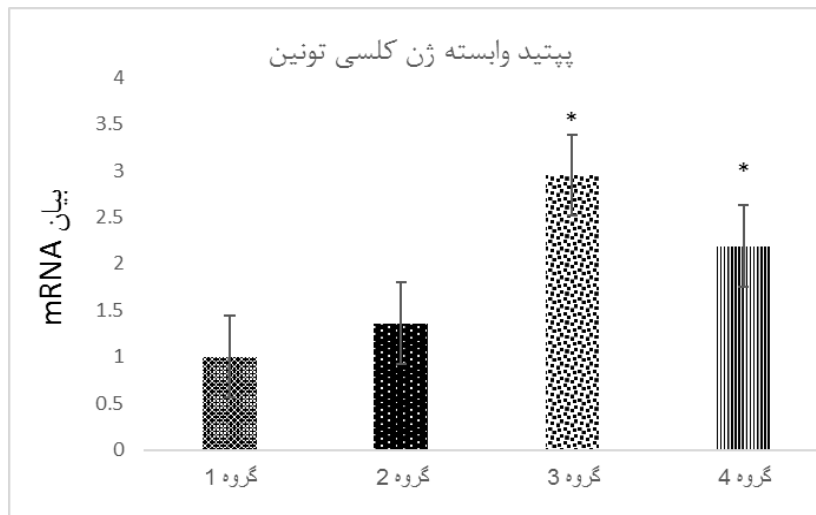
بیان mRNA پپتیدهای CGRP و rCT به دنبال تجویز داخل بطن مغزی αCT بیان mRNA مربوط به rCT در گروه سوم (۴/۱۲±۰/۳۸) به طور معناداری در مقایسه با گروه دوم (۲/۰۲±۰/۱۵) افزایش یافت (P<0.05) (شکل شماره ۲)، باین حال، تجویز داخل بطن مغزی rCT اثر معناداری بر بیان mRNA مربوط به CGRP در گروه چهارم (۲/۲۱±۰/۳۲) در مقایسه با گروه دوم

(۲/۰۲±۰/۱۵) نداشت (شکل شماره ۲)؛ همچنین به دنبال تجویز داخل بطن مغزی CGRP، بیان mRNA مربوط به rCT در گروه سوم (۲/۹۵±۰/۳۲) به طور معناداری در مقایسه با گروه دوم (۱/۳۶±۰/۱۰) افزایش یافت (P<0.05) (شکل شماره ۳).

گفتنی است تجویز داخل بطن مغزی CGRP اثر معناداری بر بیان mRNA مربوط به CGRP در گروه چهارم (۲/۱۹±۰/۲۶) در مقایسه با گروه دوم (۱/۳۶±۰/۱۰) داشت (P<0.05) (شکل شماره ۳).



**شکل شماره ۲.** بیان mRNA مربوط به rCT در گروه‌های مطالعه شده. گروه ۱. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به صورت زیر پوستی در پنجه پای عقب؛ گروه ۲. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد در پنجه پای عقب؛ گروه ۳. rCT با دوز ۱.۵ nmol به صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد؛ گروه ۴. CGRP با دوز ۱.۵ nmol به صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد. \* تفاوت معناداری گروه‌های سوم و چهارم با گروه دوم.



**شکل شماره ۳.** بیان mRNA مربوط به CGRP در گروه‌های مطالعه شده. گروه ۱. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به صورت زیرپوستی در پنجه پای عقب؛ گروه ۲. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد در پنجه پای عقب؛ گروه ۳. rCT با دوز ۱.۵ nmol به صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد؛ گروه ۴. CGRP با دوز ۱.۵ nmol به صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد. \* تفاوت معناداری گروه‌های سوم و چهارم با گروه دوم.

## بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، تزریق داخل بطن مغزی پپتید CGRP موجب کاهش درد ناشی از تزریق فرمالین در فاز حاد و میانی آزمون فرمالین، در موش‌های صحرایی دیابتی گردید.

CGRP در اعمال بیولوژیک از جمله سامانه ضد درد نقش دارد (۹). CGRP و گیرنده‌های آن به طور گسترده در مسیرهای درد در دستگاه عصبی مرکزی و محیطی توزیع شده‌اند. نشان داده شده است که CGRP ممکن است با فعال کردن گیرنده CGRP1 در PAG و فعال کردن سامانه نزولی درد، در مهار انتقال اطلاعات درد در شاخ پشتی طناب نخاعی نقش داشته باشد (۱۰). بدین ترتیب که CGRP موجب تسهیل انتقال درد در primary sensory afferent neurons و همچنین transmission neurons second order در دستگاه عصبی مرکزی می‌شود (۱۱). CGRP به طور گسترده در نورون‌های دستگاه عصبی مرکزی و محیطی بیان می‌گردد و اغلب عملکرد آن در تعامل با نوروترانسمیترها و سایر مراکز مغزی است (۱۲، ۱۳). تزریق داخل بطن مغزی پپتید CGRP، به واسطه افزایش غلظت مونوآمین‌ها در ناحیه خاکستری دور قناتی، موجب کاهش درد در آزمون فرمالین

شده است (۱۴). CGRP موجب آزاد شدن نوروترانسمیترها و پاسخ نورونی به محرک آسیب‌رسان در همه سطوح می‌شود. تجویز داخل طناب نخاعی CGRP، به واسطه افزایش میزان بیان CGRP در شاخه پشتی طناب نخاعی، شدت درد را در درد نوروپاتییک ناشی از تحریک مکانیکی در موش‌های صحرایی با آسیب عصب نخاعی کاهش می‌دهد (۱۵).

بیان mRNA پپتید CGRP در تعدادی از هسته‌های مغزی نشان داده شده است (۱۶). در حالت طبیعی، مقادیر فراوانی از mRNA CGRP در نورون‌های DRG و TG یافت شده است؛ همچنین mRNA CGRP در دورامتر، هیپوفیز، TNC، هیپوتالاموس، PAG، هیپوکامپ و سینگولیت کورتکس دیده می‌شود. بیشتر mRNA CGRP در جسم سلولی نورون‌های DRG و TG گزارش شده است؛ سپس پروتئین CGRP ترجمه شده در امتداد فیبرهای عصبی، به انتهای عصب حمل می‌گردد؛ همچنین immunoreactivity-CGRP rostrocaudal حضور mRNA CGRP را در هسته principal nucleus spinal trigeminal, extent paratrigeminal nucleus (paraV, nucleus (PrV) و



(STN) nucleus thelateral subnucleus of solitary tract نشان داده است (۱۷). گفتنی است که mRNA گیرنده CGRP در ناحیه PAG یافت شده است؛ بنابراین، تصور می‌شود PAG محل بیان گیرنده مربوط به CGRP نیز باشد (۹)؛ همچنین تجویز CGRP در ناحیه پستی جانبی PAG نشان می‌دهد که CGRP از طریق CLR و RAMP-1، موجب تعدیل درد می‌گردد (۳). مواد التهاب‌زا نظیر فرمالین و کپسازین، به‌طور مستقیم گیرنده‌های پتانسیل‌گذرای نوع TRPA1 و TRPV1 را در گانگلیون ریشه پستی فعال می‌کنند و سبب تحریک سنتر CGRP می‌شوند. با تزریق عوامل التهابی نظیر فرمالین به‌صورت محیطی، میزان بیان mRNA ی CGRP در گانگلیون ریشه پستی افزایش می‌یابد (۱۸، ۱۹). حضور CGRP به‌صورت فیدبک مثبت سبب می‌گردد که سنتر آن در انتهای نوروئی افزایش یابد (۲۰). در پژوهش حاضر، تجویز CGRP داخل بطن مغز موجب افزایش بیان mRNA مربوط به CGRP در ناحیه PAG موش‌های صحرایی دیابتی شد. باین‌حال، تجویز rCT داخل بطن مغز موجب افزایش بیان mRNA مربوط به هر دو پپتید CGRP و rCT در ناحیه PAG موش‌های صحرایی دیابتی گردید.

در مطالعات مشابه روی موش‌های صحرایی سالم، تجویز intrathecal و ICV سالمون کلسی‌تونین موجب کاهش درد شده است (۲۱). تجویز کلسی‌تونین داخل subarachnoid space می‌تواند موجب آثار ضددردی شود (۱۶). در موش‌های chronic constriction injury، sciatic nerve بیان mRNA گیرنده کلسی‌تونین در L4-L5 DRG tissue and افزایش می‌یابد (۲۲). افزایش رهایی نوروپیتید CGRP مربوط به عوارض پیش‌دیابت و عوارض کوتاه‌مدت دیابت است. نوروپاتی از عوارض بلندمدت دیابت است که کاهش آستانه درد در این مدت ممکن است به‌واسطه کاهش میزان CGRP و سایر نوروپیتیدها در سامانه ضددردی باشد (۲۳). در دیابت نوروپاتی، پاسخ‌های خودبه‌خودی و پاتولوژیکال در

پاسخ به محرک‌های دردزا و غیر دردزا اتفاق می‌افتد که نشانگر هیپرالجزیا است (۲۴). کاهش آستانه درد در تحریک مکانیکی paw withdrawal، کاهش زمان tail-flick در تحریک دمایی و افزایش flinch responses به دنبال تزریق فرمالین در کف پا، نشانه ایجاد هیپرالجزیا در دیابت نوروپاتی است (۲۵)

افزایش میزان بیان mRNA ی CGRP و rCT در ناحیه PAG همراه با تزریق این دو پپتید در بطن مغز می‌تواند به علت اثر هم‌افزایی و به‌صورت فیدبک مثبت باشد. این اثر مشاهده‌شده در موش‌های صحرایی دیابتی ممکن است به سبب افزایش موقتی پپتید CGRP در شرایط دیابت غیرنوروپاتی، موجب مشاهده تغییر فراوانی در بیان mRNA شده باشد. در این مطالعه، افزایش بیان mRNA مربوط به rCT و CGRP هماهنگ با کاهش درد ناشی از تزریق فرمالین است؛ بنابراین، در مطالعه ما ممکن است که اثر ضددردی تزریق rCT و CGRP در بطن مغز موش‌های صحرایی در آزمون فرمالین، به‌واسطه افزایش میزان بیان mRNA مربوط به rCT و CGRP در ناحیه PAG باشد که تصور می‌شود موجب بیان mRNA پپتید در سامانه ضد دردی می‌گردد. در یک مطالعه مشابه نمونه دیابت موشی نشان داده شد که ۴ هفته پس از تجویز CGRP، میزان بیان mRNA و پروتئین CGRP به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد و شدت درد در آزمون صفحه داغ کاهش پیدا می‌کند. پیشنهاد شده است که بیان بیش‌ازحد CGRP ممکن است با گسترش رگ‌های خونی و افزایش جریان خون، نوروپاتی محیطی ناشی از دیابت را بهبود بخشد (۲۶).

تزریق پپتیدهای CGRP و rCT به‌صورت داخل بطن مغز، درد ناشی از تزریق فرمالین در موش‌های صحرایی دیابتی را کاهش می‌دهد. سازوکار احتمالی می‌تواند به علت افزایش بیان mRNA این دو پپتید در ناحیه خاکستری دور قناتی باشد؛ بنابراین، حضور آگروژنوس دو پپتید CGRP و rCT می‌تواند به‌واسطه افزایش بیان mRNA این دو پپتید در ناحیه خاکستری دور قناتی،



فیزیولوژی است؛ بنابراین، از دانشگاه شیراز برای حمایت مالی پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

موجب سنتز بیشتر آن‌ها در سامانه ضددردی و در نتیجه، بروز آثار ضددردی مرتبط با آن‌ها گردد.

کد اخلاق: INT2M129396

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه مقطع دکتری رشته

## References

- Cannon JT, Prieto GJ, Lee A, Liebeskind JC. Evidence for opioid and non-opioid forms of stimulation –produced analgesia in the rat. *Brain Res.* 1982; 243:2:315-21. doi: 10.1016/0006-8993:8290255-4
- Mason P. Medullary circuits for nociceptive modulation. *Curr Opin Neurobiol.* 2012; 22:4:640. doi: 10.1016/j.conb.2012.03.008.
- Pozo-Rosich P, Storer RJ, Charbit AR, Goadsby PJ. Periaqueductal gray calcitonin gene-related peptide modulates trigeminovascular neurons. *Cephalalgia: IHS.* 2015; 35:14:1298-307. doi:10.1177/0333102415576723.
- Huang Y, Brodda-Jansen G, Lundeberg T, Yu LC. Anti-nociceptive effects of calcitonin gene-related peptide in nucleus raphe magnus of rats: an effect attenuated by naloxone. *Brain.* 2000; 123:1:54-9. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02473-2.
- Gorn AH, Lin HY, Yamin M, Auron PE, Flannery MR, Tapp DR, et al. Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. *JCI.* 1992; 90:5:1726-35. doi: 10.1172/JCI116046.
- Pecile A, Guidobono F, Netti C, Sibilia V, Biella G, Braga PC. Calcitonin gene-related peptide: antinociceptive activity in rats, comparison with calcitonin. *Regul Pept.* 1987;18:3-4:189-99. doi: 10.1016/0167-0115(87)90007-3.
- American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33 Suppl 1(Suppl 1):S62-S9. doi: 10.2337/dc10-S062
- Balali Dehkordi Sh, Sajedianfard J, Owji AA. The effect of intra-cerebroventricular injection of insulin on the levels of monoamines in the raphe magnus nucleus of non-diabetic and short-term diabetic rats in the formalin test. *Iran J Basic Med Sci.* 2019; 22:8: 915–921. doi: 10.22038/ijbms.2019.35580.8485.
- Walker CS, Conner AC, Poyner DR, Hay DL. Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2010; 31:10:476-83. doi: 10.1016/j.tips.2010.06.006 .
- Yu L-C, Weng X-H, Wang J-W, Lundeberg T. Involvement of calcitonin gene-related peptide and its receptor in anti-nociception in the periaqueductal grey of rats. *Neurosci Lett.* 2003;349:1:1-4. doi: 10.1016/S0304-3940(03)00273-8.
- Eftekhari S, Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components in human and rat spinal trigeminal nucleus and spinal cord at C1-level. *BMC Neuroscience.* 2011;4:8:43-52. doi: 10.1186/1471-2202-12-112.
- Poyner DR. Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors. *Pharmacol Ther.* 1992; 56:1:23-51. doi: 10.1016/0163-7258(92)90036-y .
- Harmann PA, Chung K, Briner RP, Westlund KN, Carlton SM. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the human spinal cord: a light and electron microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 1988; 269:3:371-80. doi: 10.1002/cne.902690305.
- Rahimi K, Sajedianfard J, Owji A.A. The effect of intracerebroventricular injection of CGRP on pain behavioral responses and monoamines concentrations in the periaqueductal gray area in rat. *IJBMS.* 2018;21:4:395-399. doi: 10.22038/IJBMS.2018.26384.6467.
- Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, McGregor GP, Morrison JF, Kelly JS, Evans RM. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *JNeurosci.* 1984;4:12::3101-1. doi: 10.1523/JNEUROSCI.04-12-03101.1984.
- Iyengar S, Ossipov MH, Johnson KW. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain.* 2017;158:4:543-559. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000831
- Bhatt DK, Gupta S, Ploug KB, Jansen-Olesen I, Olesen J. mRNA distribution of CGRP and its receptor components in the trigeminovascular system and other pain related structures in rat brain, and effect of intracerebroventricular administration of CGRP on Fos expression in the TNC. *Neurosci Lett.* 2014; 24 :559:99-104. doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.057 .
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104:76: 13525–13530. doi: 10.1073/pnas.0705924104 .
- Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci.* 2007; 27: 11412–11415. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3600-07.
- White S, Marquez de Prado B, Russo A.F, Hammond D.L. Heat Hyperalgesia and Mechanical Hypersensitivity Induced by Calcitonin Gene-Related Peptide in a Mouse Model of Neurofibromatosis. *PLoS One.* 2014;9:9:1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0106767.
- Spampinato S, Candeletti S, Cavicchini E, Romualdi P, Speroni E, Ferri S. Antinociceptive activity of salmon calcitonin injected intrathecally in the rat. *Neurosci Lett.* 1984;45(2):135-9. doi.org/10.1016/0304-3940(84)90088-0.

22. Zou Y, Xu F, Tang Z, Zhong T, Cao J, Guo Q, et al. Distinct calcitonin gene-related peptide expression pattern in primary afferents contribute to different neuropathic symptoms following chronic constriction or crush injuries to the rat sciatic nerve. *Mol pain*. 2016;12:1744806916681566. doi: 10.1177/1744806916681566.
23. Daneshyar S, Gharakhanlou R, Nikoie R, Forutan Y. The effect of high-fat diet and streptozotocin-induced diabetes and endurance training on plasma levels of calcitonin gene-related peptide and lactate in rats. *CanJDiabetes*. 2014;38: 461-465. doi: 10.1016/j.cjcd.2014.03.001.
24. Schreiber AK, Nones CF, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015;6:3:432-44. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.432.
25. Lee JH, McCarty R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. *Pain*. 1992;50:2:231-6. doi. 10.1016/0304-3959(92)90167-A.
26. Li H, Song Y, Wang Z, Wu Y, Wang W, Han J. Overexpression of CGRP improves peripheral neuropathy in diabetic mice. *Chinese*. 2019; 35:3:250-255.