Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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[1], Javad Sajedianfard[1*], Saeid Hosseinzadeh[2], Kaveh Rahimi1, Saeedeh Ahmadi Jokani[1]

[1] Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2] 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

A B S T R A C T

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.
(Ethic 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.

© The Author(s) Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

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

علیا مشیری[۱]، جواد ساجدیان فرد[۱*]، سعید حسین‌زاده[۲]، کاوه رحیمی[۱]، سعیده احمدی جوکانی[۱]

[۱] گروه علوم پایه، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

[۲] گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

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، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

Email:
sajedian@shirazu.ac.ir

چکیده

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 ناحیهٔ PAG، در موش‌های صحرایی دیابتی در آزمون فرمالین است.

مواد و روش ها: 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 به‌صورت داخل صفاقی استفاده گردید. پپتیدهای CGRP و یا rCT با دوز ۱/۵ nmol با حجم ۵ میکرولیتر روزانه و به مدت ۷ روز به‌صورت داخل بطن مغزی تزریق شد. رفتارهای مرتبط با درد در آزمون فرمالین تا دقیقه ۶۰ در گروه‌های مطالعه‌شده ثبت گردید؛ همچنین ناحیهٔ PAG به‌منظور ارزیابی تغییر میزان بیان mRNA پپتیدهای CGRP و rCT برداشته 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 ناحیهٔ 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 ناحیهٔ PAG گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: تزریق داخل بطن مغزی پپتیدهای CGRP و rCT، درد ناشی از تزریق فرمالین در موش‌های صحرایی نمونهٔ تجربی دیابت قندی القاشده توسط استرپتوزوتوسین را احتمالاً به‌واسطهٔ 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 کلسی‌تونین (CGRP) و رت کلسی‌تونین (rCT) در ناحیهٔ خاکستری دور قناتی (PAG) موش‌های صحرایی دیابتی در آزمون فرمالین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، اردیبهشت ۱۴۰۱؛۳۰(۱): ۶۴-۵۵.

حق‌مؤلف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم پزشکی ایلام

مقدمه

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

CGRP یکی از پپتیدهای خانوادهٔ کلسی‌تونین است که گیرنده‌های آن در نواحی مختلف مغز وجود دارند و بی‌دردی را وساطت می‌کنند. گیرندهٔ CGRP از اودایمریزاسیون پروتئینی به نام RAMP با گیرندهٔ کلسی‌تونین به‌وجود می‌آید. گیرنده‌های CGRP تراکم بالایی در PAG و نواحی مختلف هستهٔ رافه مگنوس دارند (۷). آنتاگونیست‌های CGRP موجب مهار آثار ضددرد در نورون‌های trigeminal می‌شوند. این داده‌ها تأیید می‌کنند که CGRP در هر دو سیستم نزولی مهاری و تسهیلی درد نقش دارد. تجویز CGRP در قسمت شکمی جانبی ناحیهٔ PAG موجب مهار نورون‌های انتقال‌دهندهٔ درد در موش صحرایی شده است. تجویز CGRP به‌صورت تزریق مستقیم داخل هستهٔ رافه مگنوس، موجب کاهش درد می‌شود (۳, ۴).

کلسی‌تونین حدود ۲۰ درصد با CGRP هومولوگ است. گیرندهٔ کلسی‌تونین به دو شکل CTRa و CTRb وجود دارد که توانایی آن‌ها برای اتصال به کلسی‌تونین تفاوت چندانی باهم ندارد. به‌طورکلی، توزیع گیرنده‌های CGRP و CT در موش صحرایی درجهٔ بالایی از هم پوشانی دارند (۵). آثار ضددردی در رابطه با تزریق داخل بطن مغزی سالمون کلسی‌تونین در آزمون تکانهٔ دم و صفحهٔ داغ موجب آثار ضددردی مشاهده‌شده است (۶).

بیماری دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیکی اندوکرینی رایج در جوامع بشری است (۷). تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با آثار ضددردی پپتیدهای CGRP و rCT در موش‌های صحرایی دیابتی انجام‌نشده است. در دیابت مزمن به علت تخریب نورون‌های عصبی، آستانهٔ احساس درد کاهش می‌یابد؛ اما بر اساس مطالعات پیشین در دیابت حاد کوتاه‌مدت، زمان کافی برای تخریب نورونی وجود ندارد، بااین‌حال، حساسیت به درد افزایش می‌یابد و حیوان نسبت به درک حس درد آستانهٔ تحریک کمتری دارد (۸). هدف از این مطالعه افزایش اطلاعات دربارهٔ دو پپتید CGRP و rCT در رابطه با آثار ضددردی در آزمون فرمالین و تغییر میزان بیان mRNA آن‌ها در ناحیهٔ PAG موش‌های صحرایی دیابتی است.

مواد و روش ها

حیوانات: همهٔ آزمایش‌ها روی موش‌های صحرایی نر نژاد اسپراگ داولی (با وزن تقریبی ۳۰±۲۷۰) انجام شد. آب و غذا به‌صورت آزادانه در اختیار حیوانات قرار داشت و حیوانات تا زمان آزمایش، در دمای ۲۲±۲°C و تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعت نگه‌داری گردیدند. پروتکل این مطالعه توسط کمیتهٔ اخلاق مصوب دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه شیراز (کد: INT2M129396) تصویب شد.

القای دیابت در موش‌های صحرایی دیابتی: برای دیابتی کردن موش‌های صحرایی، داروی استرپتوزوتوسین با دوز ۴۵ mg/kg از راه داخل صفاقی، به‌صورت تک‌دوز به موش‌های صحرایی تزریق گردید. استرپتوزوتوسین در بافر سیترات سدیم سرد با pH=۴/۵ حل شد (۲۰). پیش از القای دیابت، به مدت ۱۲ ساعت، به حیوانات غذا داده نشد. موش‌های 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 mg/dl ۲۵۰ بود، به‌عنوان موش‌های دیابتی استفاده شد.

گروه‌های آزمایش: 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 پنجهٔ 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 پنجهٔ 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 پنجهٔ 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 پنجهٔ پای عقب دریافت نمودند.

مواد شیمیایی: در این مطالعه، CGRP و rCT از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد. پودر لیوفیلیزه‌شدهٔ پپتیدها در نرمال سالین حل گردید و پس از تهیهٔ 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 آلدریچ، آمریکا) تهیه گردید.

جراحی: موش‌های صحرایی توسط داروی بیهوشی کتامین (kg/mg ۹۵) و زایلازین (kg/mg5) بیهوش شدند. برای تزریق داخل بطن مغز، بر اساس اطلس پاکسینوس و با مختصات DV=-3.6، L=+1.5 و AP=0.8، کانول راهنما در ناحیهٔ 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 ناحیهٔ PAG جدا شد و تا زمان بررسی میزان بیان mRNA، در دمای ۷۰°C- درجهٔ 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 سامانهٔ عصبی مرکزی در کنترل آن را مشاهده کرد. در روز آزمون، فرمالین ۲/۵ درصد با حجم µl 50 به کف پنجهٔ 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، هنگامی‌که حیوان کف پای خود را بر سطح قفس آزمون قرار می‌داد، عدد «صفر» ثبت می‌شد؛ هنگامی‌که 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 هنگامی‌که حیوان ناحیهٔ 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 شمارهٔ ۱. توالی پرایمرها

نام پرایمر	توالی نوکلئوتید	ژن هدف
CTF CTR	ATCTAAGCGGTGCGGTAATC CTTGTTGAAGTCCTGCGTGT	CT
CR LR	GAGCCTGTGACACTGCCACC GGTGGCTGACCGGGCCTAGAT	CGRP
Control	F: GAAATCGTGGACATTAAG R: GCTAGAAGCATTTGCGGTGGA	β-actin

دستورالعمل کیت صورت گرفت.

سنتز cDNA: به‌منظور انجام سنتز cDNA از RNA استخراج‌شده، از کیت cDNA Synthesis EasyTM (شرکت پارس طوس- ایران) استفاده شد. برای این منظور، حجمی از RNA استخراج‌شده که حاوی ۳۰۰۰ نانوگرم RNA بود، در میکروتیوب RNase free با یک میکرولیتر پرایمر Random hexamer مخلوط گردید و با آب تیمارشده با DEPC به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. ادامهٔ مراحل سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت.

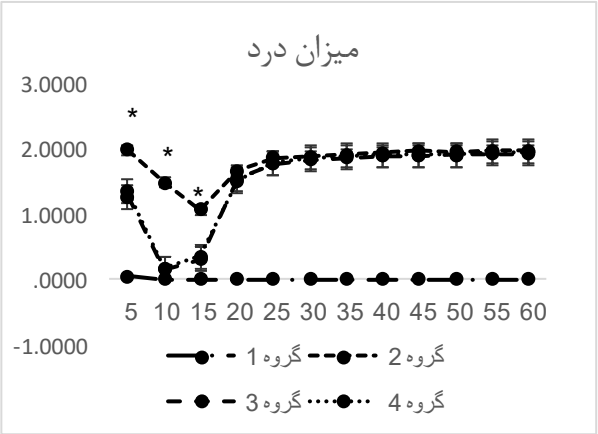
بررسی بیان ژن با استفاده از Real-time PCR: بررسی بیان mRNA پپتیدهای CGRP، rCT و β-actin با استفاده از Real-time PCR انجام شد. برای انجام Real-time PCR از کیت (BIOEeasy- چین) با حجم نهایی واکنش ۲۰µl طبق دستورالعمل کیت استفاده گردید. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در جدول شمارهٔ ۱ نشان داده‌شده است.

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.

یافته ها

آزمون فرمالین: میانگین شدت درد در فاز حاد آزمون فرمالین، در گروه‌های سوم (۱/۲۸±۰/۰۴) و چهارم (۱/۳۵±۰/۰۵) به‌طور معناداری کمتر از گروه دوم (۲/۰۰±۰/۰۲) بود (P<0.05). در فاز میانی آزمون فرمالین، میانگین شدت درد در گروه‌های سوم (۰/۲۳±۰/۰۰) و چهارم (۰/۲۶±۰/۰۱) به‌طور معناداری کمتر از گروه دوم (۱/۰±۲۹/۰۳) بود (P<0.05).

میانگین شدت درد در فاز مزمن آزمون فرمالین گروه‌های مطالعه‌شده در کل فاز مزمن تفاوت معناداری نداشت (شکل شمارهٔ ۱). اعداد میانگین (mean±SEM) مربوط به زمان‌های مختلف آزمون فرمالین (از زمان



شکل شمارهٔ ۱. شدت درد در گروه‌های مختلف آزمون فرمالین. گروه ۱. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به‌صورت زیرپوستی در پنجهٔ پای عقب؛ گروه ۲. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد در پنجهٔ پای عقب؛ گروه ۳. rCT با دوز nmol1.5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد؛ گروه ۴. CGRP با دوز nmol 1.5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد. * تفاوت معناداری گروه‌های سوم و چهارم با گروه دوم.

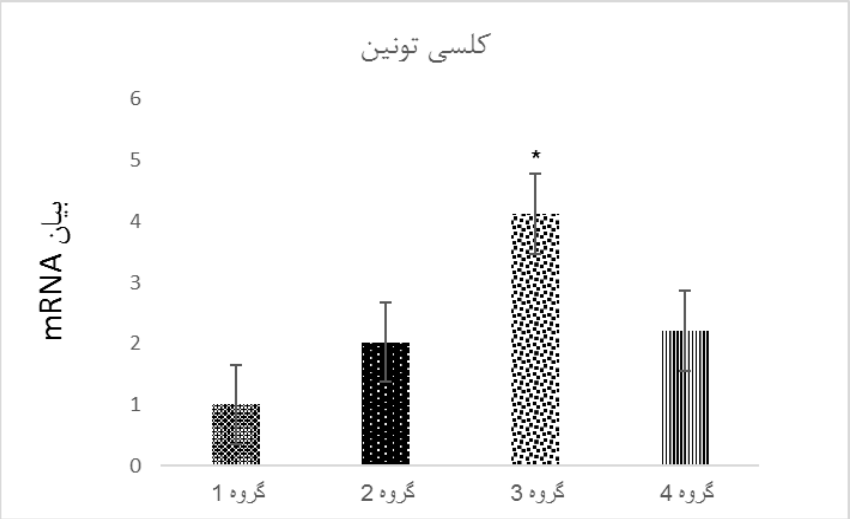
جـدول شمارهٔ ۲. رفتار درد در آزمون فرمالین. گروه ۱. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به‌صورت زیرپوستی در پنجهٔ پای عقب؛ گروه ۲. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد در پنجهٔ پای عقب؛ گروه ۳. rCT با دوز nmol1.5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد؛ گروه ۴. CGRP با دوز nmol 1.5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد. حروف نامشابه اختلاف سطح معناداری میان گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد (mean±SEM) (P<0.05).

	دقیقهٔ ۵	دقیقهٔ ۱۰	دقیقهٔ ۱۵	دقیقهٔ ۲۰	دقیقهٔ ۲۵	دقیقهٔ ۳۰	دقیقهٔ ۳۵	دقیقهٔ ۴۰	دقیقهٔ ۴۵	دقیقهٔ ۵۰	دقیقهٔ ۵۵	دقیقهٔ ۶۰
گروه ۱	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0±0a
گروه ۲	2± 0.003c	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
گروه ۳	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
گروه ٤	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

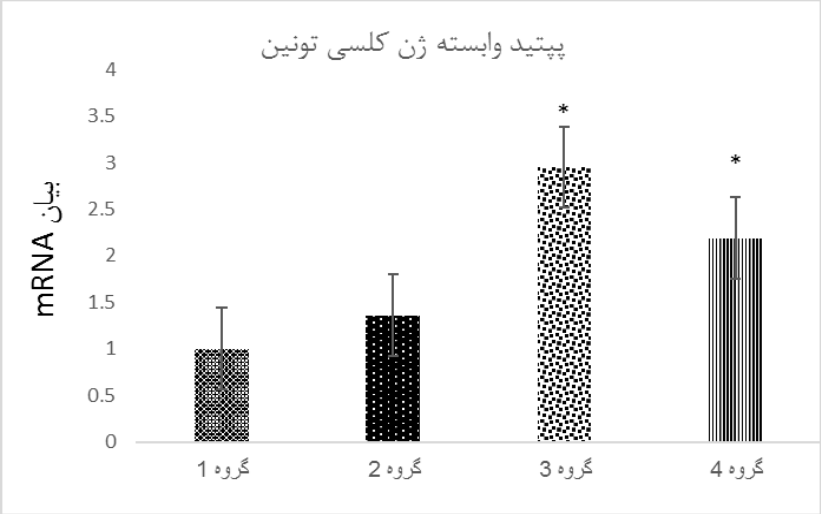
شروع آزمون تا مدت‌زمان ۶۰ دقیقه با فواصل زمانی ۵ دقیقه) در جدول شمارهٔ ۱ نشان داده‌شده است.

بیان mRNA پپتیدهای CGRP و rCT: به دنبال تجویز داخل بطن مغزی rCT، بیان mRNA مربوط به rCT در گروه سوم (۴/۱۲±۰/۳۸) به‌طور معناداری در مقایسه با گروه دوم (۲/۰۲±۰/۱۵) افزایش یافت (P<0.05) (شکل شمارهٔ ۲)، بااین‌حال، 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 شمارهٔ ۲)؛ همچنین به دنبال تجویز داخل بطن مغزی CGRP، بیان mRNA مربوط به rCT در گروه سوم (۲/۹۵±۰/۳۲) به‌طور معناداری در مقایسه با گروه دوم (۱/۳۶±۰/۱۰) افزایش یافت (P<0.05) (شکل شمارهٔ 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 شمارهٔ ۳).



شکل شمارهٔ ۲. بیان mRNA مربوط به rCT در گروه‌های مطالعه‌شده. گروه ۱. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به‌صورت زیرپوستی در پنجهٔ پای عقب؛ گروه ۲. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد در پنجهٔ پای عقب؛ گروه ۳. rCT با دوز nmol1.5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد؛ گروه ۴. CGRP با دوز nmol 1.5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد. * تفاوت معناداری گروه‌های سوم و چهارم با گروه دوم.



شکل شمارهٔ ۳. بیان mRNA مربوط به CGRP در گروه‌های مطالعه‌شده. گروه ۱. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به‌صورت زیرپوستی در پنجهٔ پای عقب؛ گروه ۲. سرم فیزیولوژی (ICV) و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد در پنجهٔ پای عقب؛ گروه ۳. rCT با دوز nmol1.5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد؛ گروه ۴. CGRP با دوز nmol 1.5 به‌صورت ICV و ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد. * تفاوت معناداری گروه‌های سوم و چهارم با گروه دوم.

بحث و نتیجه‌گیری

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 ازجمله سامانهٔ ضد درد نقش دارد (۹). CGRP و گیرنده‌های آن به‌طور گسترده در مسیرهای درد در دستگاه عصبی مرکزی و محیطی توزیع شده‌اند. نشان داده‌شده است که CGRP ممکن است با فعال کردن گیرندهٔ CGRP1 در PAG و فعال کردن سامانهٔ 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 به‌طور 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، به‌واسطهٔ افزایش غلظت مونوآمین‌ها در ناحیهٔ خاکستری دور قناتی، موجب کاهش درد در آزمون فرمالین شده است (۱۴). CGRP موجب آزاد شدن نوروترانسمیترها و پاسخ نورونی به محرک آسیب‌رسان در همهٔ سطوح می‌شود. تجویز داخل طناب نخاعی CGRP، به‌واسطهٔ افزایش میزان بیان CGRP در شاخهٔ پشتی طناب نخاعی، شدت درد را در درد نوروپاتیک ناشی از تحریک مکانیکی در موش‌های صحرایی با آسیب عصب نخاعی کاهش می‌دهد (۱۵).

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

(STN) nucleus thelateralsubnucleus of solitary tract نشان داده است (۱۷). گفتنی است که mRNA گیرندهٔ CGRP در ناحیهٔ PAG یافت شده است؛ بنابراین، تصور می‌شود PAG محل بیان گیرندهٔ مربوط به CGRP نیز باشد (۹)؛ همچنین تجویز CGRP در ناحیهٔ پشتی جانبی PAG نشان می‌دهد که CGRP از طریق CLR و RAMP-1، موجب تعدیل درد می‌گردد (۳). مواد التهاب‌زا نظیر فرمالین و کپساسین، به‌طور مستقیم گیرنده‌های پتانسیل گذرای نوع TRPA1 و TRPV1 را در گانگلیون ریشه پشتی فعال می‌کنند و سبب تحریک سنتز CGRP می‌شوند. با تزریق عوامل التهابی نظیر فرمالین به‌صورت محیطی، میزان بیان mRNA ی CGRP در گانگلیون ریشهٔ پشتی افزایش می‌یابد (۱۸, ۱۹). حضور CGRP به‌صورت فیدبک مثبت سبب می‌گردد که سنتز آن در انتهاهای نورونی افزایش یابد (۲۰). در پژوهش حاضر، تجویز CGRP داخل بطن مغز موجب افزایش بیان mRNA مربوط به CGRP در ناحیهٔ PAG موش‌های صحرایی دیابتی شد. بااین‌حال، تجویز rCT داخل بطن مغز موجب افزایش بیان mRNA مربوط به هر دو پپتید CGRP و rCT در ناحیهٔ 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، بیان mRNA گیرندهٔ کلسی‌تونین در sciatic nerve tissue and L4-L5 DRG افزایش می‌یابد (۲۲). افزایش رهایی نوروپپتید CGRP مربوط به عوارض پیش‌دیابت و عوارض کوتاه‌مدت دیابت است. نوروپاتی از عوارض بلندمدت دیابت است که کاهش آستانهٔ درد در این مدت ممکن است به‌واسطهٔ کاهش میزان CGRP و سایر نوروپپتیدها در سامانهٔ ضددردی باشد (۲۳). در دیابت نوروپاتیک، پاسخ‌های خودبه‌خودی و پاتولوژیکال در پاسخ به محرک‌های دردزا و غیر دردزا اتفاق می‌افتد که نشانگر هیپرآلجزیا است (۲۴). کاهش آستانهٔ درد در تحریک مکانیکی paw withdrawal، کاهش زمان tail-flick در تحریک دمایی و افزایش flinch responses به دنبال تزریق فرمالین در کف پا، نشانهٔ ایجاد هیپرآلجزیا در دیابت نوروپاتیک هستند (۲۵)

افزایش میزان بیان mRNA ی CGRP و rCT در ناحیهٔ 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 غیرنوروپاتیک، موجب مشاهدهٔ 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 مطالعهٔ ما ممکن است که اثر ضددردی تزریق rCT و CGRP در بطن مغز موش‌های صحرایی در آزمون فرمالین، به‌واسطهٔ افزایش میزان بیان mRNA مربوط به rCT و CGRP در ناحیهٔ PAG باشد که تصور می‌شود موجب بیان mRNA پپتید در سامانهٔ ضد دردی می‌گردد. در یک مطالعهٔ مشابه نمونهٔ 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 صفحهٔ 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 ناحیهٔ خاکستری دور قناتی باشد؛ بنابراین، حضور اگزوژنوس دو پپتید CGRP و rCT می‌تواند به‌واسطهٔ افزایش بیان mRNA این دو پپتید در ناحیهٔ خاکستری دور قناتی،

موجب سنتز بیشتر آن‌ها در سامانهٔ ضددردی و درنتیجه، بروز آثار ضددردی مرتبط با آن‌ها گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامهٔ مقطع دکتری رشتهٔ فیزیولوژی است؛ بنابراین، از دانشگاه شیراز برای حمایت مالی پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

کد اخلاق: INT2M129396

References

1. 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
2. Mason P. Medullary circuits for nociceptive modulation. Curr Opin Neurobiol. 2012; 22:4:640- doi: 10.1016/j.conb.2012.03.008.
3. 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.
4. 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; 873:1:54-9.doi: 10.1016/s0006-8993(00)02473-2.
5. 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.
6. 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.
7. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2010;33 Suppl 1(Suppl 1):S62-S9. doi: 10.2337/dc10-S062
8. Balali Dehkordi Sh, Sajedianfard J, Owji AA. The effect of intra-cerebroventricular injection of insulin on the levels of monoamines on 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.
9. 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 .
10. 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.
11. 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.
12. 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 .
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.000000 0000000831
17. 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 .
18. 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 .
19. 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.
20. 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.
21. 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, Nikooie 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.jcjd.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.