Physiology and Pharmacology, 18 (4), 455-465

Winter 2015 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Assessing the effect of intra-paragigantocellularis lateralis injection of 17β-estradiol on the acute and persistent pain in the male rat

Roghaieh Khakpay*, Shabnam Barani, Homeira Hatami Nemati

Dept. of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 22 June 2014 **Accepted: 2 Sept 2014**

Abstract

Introduction: 17β-estradiol modulates nociception by binding to estrogenic receptors and also by allosteric interaction with other membrane-bound receptors like glutamate and $GABA_A$ receptors. Beside its autonomic functions, paragigantocellularis lateralis (LPGi) nucleus is also involved in pain modulation. The aim of the current study was to investigate the role of the intracellular estrogenic receptors in the pain modulation by the LPGi nucleus of male rats.

Methods: In this study, male Wistar rats in the range of 200-270 gr were used. In order to study the effect of intra-LPGi microinjection of 17β-estradiol on both acute and persistent pain modulation, cannulation of LPGi nucleus was performed. At first, drugs were injected and 15 minutes later 50 µl of 4% formalin was injected into the rat's hind paw. Then formalin-induced flexing and licking behaviours were recorded for 60 min.

Results: The results of current study showed that intra-LPGi injection of 17β-estradiol attenuated the flexing and the licking behaviours both in the first phase ($P<0.01$) and in the second phase ($P<0.001$) of formalin test. The estrogen receptor antagonist (*ICI182,780*) prevented 17β-estradiol-induced analgesic effect but could not reverse this effect to the control condition, and it had significant difference with the control group, yet.

Conclusion: It may be concluded some part of the analgesic effect of 17β-estradiol in the LPGi nucleus on the formalin-induced inflammatory pain is probably mediated by estrogenic receptors.

Key words: 17β-estradiol, Paragigantocellularis lateralis nucleus, *ICI182,780*, Pain modulation, Rat

* Corresponding author e-mail: rkhakpai@gmail.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۸ (٤)، ٤٥٥- ٤٦٥
زمستان ۱۳۹۳

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بررسی اثر تزریق داخل هسته پاراژیگانتوسلولاریس کناری ۱۷بتا- استرادیول بر درد حاد و مزمن در موش صحرایی نر

رقیه خاکپای*، شبنم بارانی، حمیرا حاتمی نعمتی
گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

دریافت: ۱ تیر ۹۳ پذیرش: ۱۱ شهریور ۹۳

چکیده

مقدمه: ۱۷- بتا استرادیول درک درد را از طریق اتصال به گیرنده‌های استروژنی و نیز واکنش آلوستریک با گیرنده‌های غشایی دیگر مثل گیرنده‌های گلوتاماتی و $GABA_A$ تعدیل می‌نماید. هسته‌پاراژیگانتوسلولاریس کناری (LPGi) علاوه بر کنترل برخی از اعمال اتونومیک، در تعدیل درد نیز نقش دارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش گیرنده‌های استروژنی در تعدیل درد حاد و مزمن در هسته LPGi موش‌های صحرایی نر بود.

روش ها: در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۷۰ گرم استفاده شد. برای بررسی اثر تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi در تعدیل درد حاد و مزمن، کانول‌گذاری هسته‌ی LPGi انجام شد. ابتدا داروها تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۴٪ به پنجه پای حیوان تزریق شد و سپس رفتارهای خم کردن (Flexing) و لیسیدن پا (Licking) القا شده با تزریق فرمالین به مدت ۶۰ دقیقه ثبت شد.

یافته ها: نتایج مطالعه اخیر نشان داد که تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل LPGi رفتارهای خم کردن و لیسیدن پا را هم در فاز اول هم در فاز دوم آزمون فرمالین کاهش داد. آنتاگونیست گیرنده‌های استروژن (ICI182,780) از اثر بی‌دردی القا شده با ۱۷بتا- استرادیول جلوگیری کرد ولی نتوانست این اثر را به شرایط کنترل برگرداند و هنوز اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل دارد.

نتیجه گیری: براساس یافته‌های مطالعه اخیر می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از بی‌دردی ناشی از تزریق ۱۷بتا- استرادیول به هسته‌ی LPGi روی درد التهابی القا شده با فرمالین، احتمالاً از طریق گیرنده‌های استروژنی وساطت می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ۱۷-بتا استرادیول، هسته پاراژیگانتوسلولاریس کناری، ICI182,780، تعدیل درد، موش صحرایی

مقدمه

درد عاملی هشداردهنده هنگام وقوع یا احتمال بروز آسیب‌های بافتی می‌باشد تا از آنها پیشگیری شود و/یا محافظت به عمل آید. با توجه به متفاوت بودن تجربیات درد در اشخاص مختلف و نیز به دلیل تفاوت درد در چگونگی دریافت، انتقال و تعدیل درد توسط سیستم عصبی [۲۸، ۲۹، ۴۴] به نظر می‌رسد شناخت مراکز عصبی موثر در تعدیل درد در حل مشکلات ناشی از درد مزمن اهمیت داشته باشند.

هسته‌ی پاراژیگانتوسلولاریس بخش وسیعی از تشکیلات مشبک بوده و به دو قسمت پشتی و کناری قابل تقسیم است. قسمت کناری آن به نام پاراژیگانتوسلولاریس کناری یا LPGi یک هسته مشبک واقع در قسمت سری بصل‌النخاع است. این ناحیه به عنوان حس‌گر شیمیایی بصل النخاع شناخته شده، و اعمال قلبی- عروقی، تنفسی، پاداش، رفتارهای جنسی، تعدیل درد و وابستگی به مورفین را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۵، ۷، ۸، ۱۴، ۱۶، ۳۱]. هسته‌ی LPGi ورودی‌هایی را از هسته‌ی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: rkhakpai@gmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

لوکوس سرلئوس (LC)، تشکیلات مشبک بصل‌النخاعی، هسته دستجات منزوی، هسته PAG و هسته‌ی رافه دریافت می‌کند [۴۴، ۴۰]، که نشان‌دهنده نقش این هسته در تعدیل درد می‌باشد. مهم‌ترین و واضح‌ترین خروجی عصبی از هسته‌ی LPGi به هسته‌ی LC می‌باشد [۳۷، ۴۰]. بیشترین نوروترانسمیتر رشته‌های وابران هسته‌ی LPGi در هسته‌ی LC، اسید آمینه تحریکی گلوتامات می‌باشد [۱۱]. البته میزان کمی از رشته‌های هسته‌ی LPGi در هسته‌ی LC مهاری بوده و در پایانه خود GABA ترشح می‌کنند [۳۸]. نورون‌های هسته LPGi به‌عنوان بخشی از سیستم پایین‌روی کنترل درد معرفی شده‌اند [۱، ۹] و استطاله‌های عصبی مستقیمی را به نخاع می‌فرستند. این نورون‌ها ممکن است انتقال اطلاعات مربوط به پردازش درد را در سطح نخاع تعدیل نمایند. تزریق لیدوکایین به داخل هسته LPGi سبب کاهش درد در آزمون صفحه داغ و مرحله اینترفاز، فاز اول و قسمت اول فاز دوم آزمون فرمالین می‌شود [۶].

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که استروژن سبب پردردی[1] و تستوسترون سبب بی‌دردی[2] می‌گردد [۲، ۱۰، ۱۷، ۲۰، ۲۱]. در طی تکوین و در سراسر بلوغ، بخش اعظم اثرات تستوسترون در حیوانات نر به وسیله استرادیولی وساطت می‌شود که از طریق حلقوی شدن تستوسترون تولید می‌شود [۴، ۳۴]. گیرنده‌های استروژنی به طور گسترده در سراسر سیستم اعصاب مرکزی پراکنده شده‌اند. علاوه بر گیرنده‌های داخل سلولی، استرادیول اثراتش را از طریق اتصال به گیرنده‌های غشایی سایر نوروترانسمیترها و کانال‌های یونی نیز اعمال می‌کند [۲۴]. mRNAی ایزوفرم ERα گیرنده استرادیول در نورون‌های LPGi بیان می‌شوند [۳۰، ۳۲]. استروژن در غلظت‌های بالا، علاوه بر گیرنده‌های استروژنی به گیرنده‌های غشایی نوروترانسمیترهای دیگر از جمله گیرنده‌های NMDA، AMPA و $GABA_A$ نیز متصل می‌شود [۳۶].

علیرغم کم بودن مطالعات درد مداوم و مزمن، شواهدی وجود دارد که استرادیول اثری روی پاسخ‌های رفتاری ناشی از تزریق فرمالین در فاز اول آزمون فرمالین ندارد [۲۳، ۲۷]. در موش‌های صحرایی ماده جایگزین کردن تدریجی ۱۷بتا- استرادیول با استفاده از لوله‌های Silastic رفتارهای القا شده با فرمالین طی فاز دوم آزمون فرمالین را کاهش می‌دهد [۲۷]. برعکس، در موش‌های صحرایی نر تزریق داخل بطنی استرادیول رفتارهای خم کردن[3] و لیسیدن[4] پای ملتهب را افزایش می‌دهد [۴، ۹]. تزریق زیرپوستی استرادیول به موش‌های صحرایی ماده اوریکتومی شده سبب افزایش فرکانس تکان دادن پای ملتهب می‌شود. بنابراین اگر موش‌های صحرایی ماده اوریکتومی شده به صورت کوتاه‌مدت و شبه- پرواستروسی در معرض استرادیول قرار بگیرند، رفتار دردی برانگیخته شده با التهاب در آنها به طور وابسته به شدت محرک افزایش می‌یابد و سبب القا پردردی می‌گردد [۳۵]. استروژن باعث کاهش سریع آستانه درد مکانیکی در موش‌های اوریکتومی شده (OVX^5) توسط گیرنده‌های استروژنی جفت شده با G پروتئین[6] می‌شود [۲۵]. استروژن درد محیطی وساطت شده با گیرنده‌های P2X3 را توسط فعالیت گیرنده‌های ERα و $GPR30^7$ بیان شده در نورون‌های آوران اولیه تنظیم می‌کند؛ که احتمالاً مسیر داخل سلولی cAMP-PKA-ERK1/2 در این اثر درگیر است [۲۶].

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر ۱۷ بتا- استرادیول در تعدیل درد در هسته LPGi بود؛ همچنین نقش گیرنده‌های استروژنی این هسته در تعدیل درد مطالعه شد.

مواد و روش ها

در این پژوهش از موش‌های صحرایی نژاد ویستار نر، در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۷۰ گرم استفاده می‌شد که از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری می‌شدند. دسترسی کاملی به آب و غذا داشتند. همچنین حیوانات در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند.

1. Hyperalgesia
2. Hypoalgesia

3. Flexing
4. Licking
5. Ovariectomy
6. G protein-coupled estrogen receptor
7. G protein-coupled receptor 30

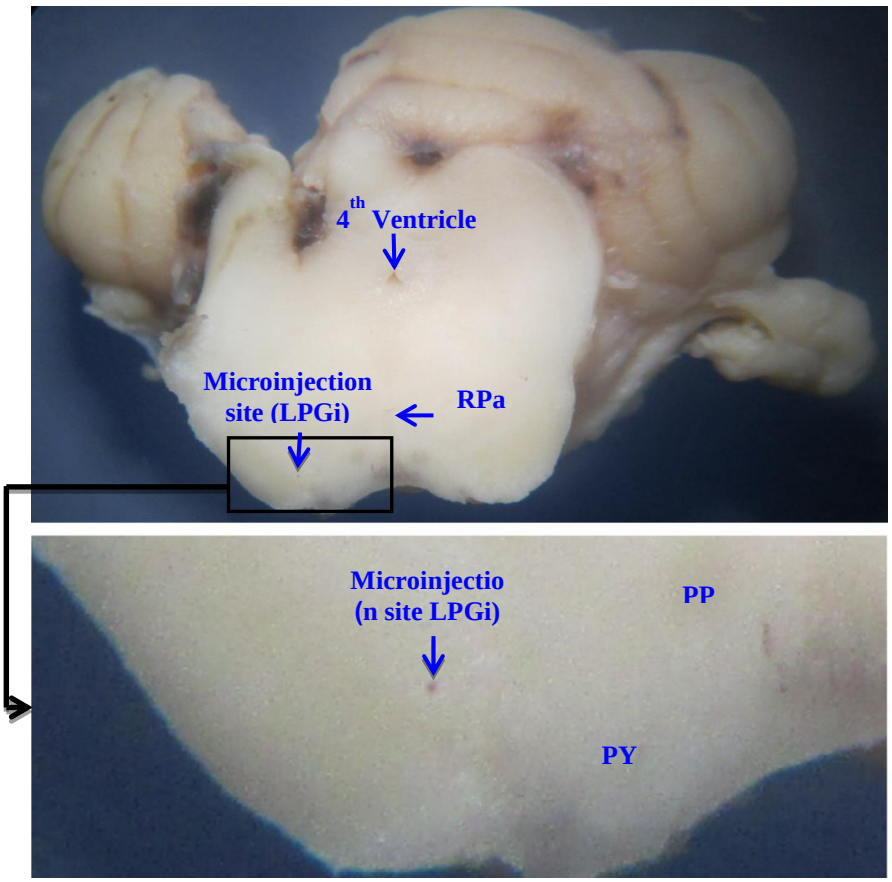
حیوانات به طور تصادفی در ۱۰ گروه شش تایی قرار گرفتند که شامل گروه اول یا کنترل (آزمون فرمالین در حیوانات دست نخورده)، گروه دوم یا شم (فقط کانول‌گذاری و آزمون فرمالین)، گروه سوم (تزریق نرمال سالین به عنوان حلال ۱۷بتا- استرادیول و آزمون فرمالین)، گروه چهارم (تزریق ۰/۱ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول و آزمون فرمالین)، گروه پنجم (تزریق ۰/۴ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول و آزمون فرمالین)، گروه ششم (تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول و آزمون فرمالین)، گروه هفتم (تزریق DMSO به عنوان حلال ICI 182,780 و آزمون فرمالین)، گروه هشتم (تزریق ۵۰ نانومول ICI 182,780 و آزمون فرمالین)، گروه نهم (تزریق ۲۵ نانومول ICI 182,780 و آزمون فرمالین) و گروه دهم (تزریق ۲۵ نانومول ICI 182,780 به داخل هسته LPGi، ۱۵ دقیقه پیش از تزریق دوز موثر ۱۷- بتا استرادیول به داخل هسته و آزمون فرمالین) می‌باشد.

برای بررسی اثر استرادیول روی تعدیل پایین‌روی درد از آزمون فرمالین استفاده شد [۴]. آزمون فرمالین باعث ایجاد یک درد دو مرحله‌ای می‌شود که فاز اول آن در اثر فعال شدن حاد گیرنده‌های درد و فاز دوم آن در اثر پاسخ‌های التهابی یا حساسیت بخش‌های مرکزی و تغییرات سیناپسی ایجاد می‌شود. آزمون فرمالین به صورت شایعی در مدل‌های درد حاد و تونیک و گاهی اوقات در درد التهابی و مزمن و یا پردردی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین می‌توان بیان کرد که آزمون فرمالین هم نشانگر درد حاد و هم مزمن می‌باشد [۷، ۴۱، ۴۳]. در این آزمون، ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین (خریداری شده از شرکت دکتر مجللی) ۴ درصد به زیر پوست پنجه پای چپ حیوان توسط سرنگ انسولین تزریق می‌شد. به دنبال تزریق فرمالین حیوان مجموعه‌ای از رفتارهای القاء شده با فرمالین را نشان می‌داد؛ که در این مطالعه مدت زمان سپری شده برای رفتارهای خم کردن پای ملتهب (Flexing) و لیسیدن پای ملتهب (Licking) به مدت ۶۰ دقیقه طی دو مرحله – فاز اول یا حاد از زمان تزریق تا دقیقه ۷ و فاز دوم یا مزمن از دقیقه ۱۵ تا دقیقه ۶۰ – ثبت می‌گردید.

برای کانول گذاری، حیوان پس از بی‌هوش شدن در دستگاه استریوتاکسی مستقر می‌گردید و پوست ناحیه سر به حداقل میزان برش داده می‌شد. پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و با نگرش به فاصله آنها و نسبت آن با فاصله ذکرشده در اطلس پاکسینوس (قدامی- خلفی (AP): ۱۱/۹-؛ طرفی (L): ۱/۶± و پشتی- شکمی (DV): ۱۰/۴ میلی‌متر) نواحی سطح جمجمه متعلق به هسته مورد آزمایش مشخص می‌گردید [۳۳]. بعد از علامت‌گذاری مناطق بالا با استفاده از مته‌های دندان‌پزشکی در محل مذکور منفذی به‌اندازه قطر کانول راهنما، که معمولاً از سرسوزن نمره ۲۳ است، ایجاد شده و کانول راهنما به اندازه مشخص که برای هر هسته متفاوت است در درون مغز مستقر شده و قسمت رویی آن در روی جمجمه به وسیله سیمان دندان‌پزشکی ثابت می‌شد. دو پیچ کوچک[1] در استخوان جمجمه تعبیه و در درون سیمان دندان‌پزشکی فرو می‌رفت. این دو پیچ در حکم مسلح‌سازی سیمان بوده و از جدا شدن آن از سطح جمجمه جلوگیری می‌کند. منفذ کانول راهنما در بیرون جمجمه به وسیله استایلت مسدود بوده و فقط در زمان‌های تزریق دارو برداشته می‌شد. یک کانول نازک‌تر که معمولاً از سرسوزن نمره ۳۰ می‌باشد، به طول حدود ۲ میلی‌متر [۵،۷،۲۲] بلندتر از کانول راهنما تهیه شده و به عنوان کانول تزریق استفاده می‌شد؛ که از یک طرف به یک لوله نازک پلی اتیلن وصل می‌گردید و سر دیگر لوله پلی‌اتیلن به سرنگ هامیلتون[2] وصل شده و ۵۰۰ نانولیتر از داروی مورد نظر تزریق می‌شد. بعد از اتمام جراحی موش باید ۷-۵ روز دوره بهبودی را طی می‌کرد تا برای آزمون رفتاری آماده گردد. برای اطمینان از محل درست تزریق به هسته LPGi پس از خاتمه آزمون رنگ قرمز خنثی (Neutral red) به هسته LPGi تزریق می‌شد و حیوان با دوز بالای اتر قربانی می‌شد. سپس مغز حیوان خارج شده و محل تزریق رنگ بررسی می‌شد؛ فقط داده‌های مربوط به حیواناتی که تزریق دارو به درستی انجام شده بود برای آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت.

در پژوهش حاضر از نرمال سالین به عنوان حلال ۱۷-بتا استرادیول [۲۲] (۱۷بتا- استرادیول کپسول‌دار شده با سیکلودکسترین، خریداری شده از شرکت سیگما) و از

1. Microscrew
2. Hamilton syringe



شکل ۱- مقطع بافتی تایید کننده تزریق صحیح دارو به هسته LPGi

DMSO به عنوان حلال ICI 182,780 [۳،۲۲] (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژن، خریداری شده از شرکت سیگما) استفاده شد. در این مطالعه غلظت‌های µmol ۰/۱، ۰/۴ و ۰/۸ و ۱۷- بتا استرادیول [۳،۲۲] و غلظت‌های nmol ۲۵ و ۵۰، ICI 182,780 [۲۲] مورد استفاده قرار گرفت. در روز آزمایش، ۵۰۰ نانولیتر استرادیول و داروهای دیگر در هر گروه با استفاده از سرنگ هامیلتون به صورت یک‌طرفه به سمت راست هسته LPGi تزریق می‌شد و پس از ۱۵ دقیقه، آزمون فرمالین انجام می‌شد.

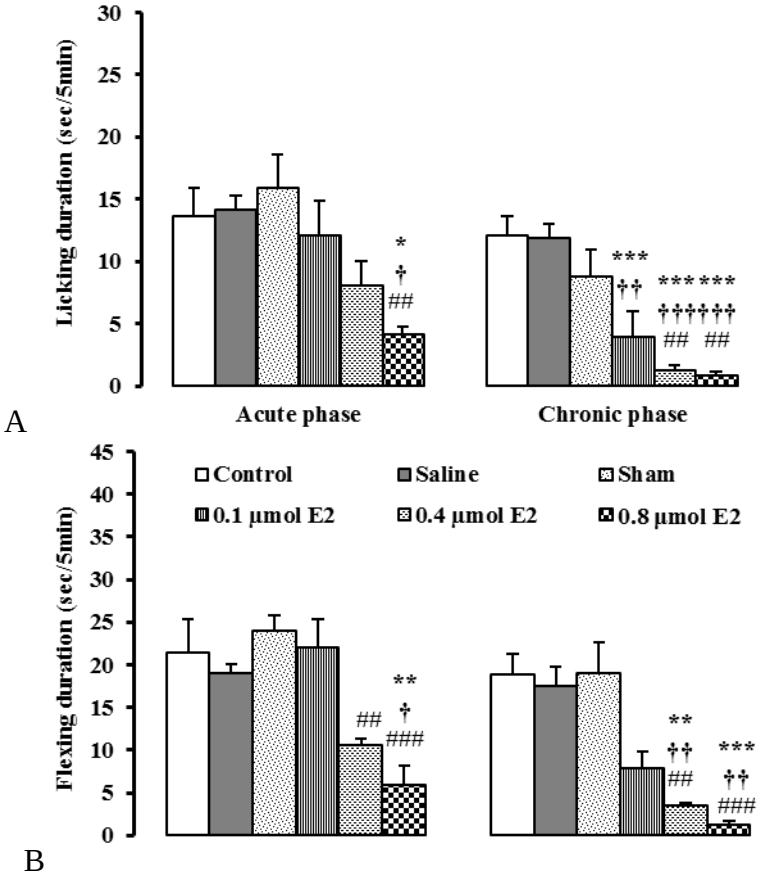
نتایج حاصله با کمک آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و PostHoc توکی و LSD مقایسه شدند و (P<0.05) به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در پژوهش حاضر تزریق ۰/۱ میکرومول ۱۷- بتا استرادیول به داخل هسته LPGi نتوانست مدت زمان خم کردن پای ملتهب را طی فاز اول آزمون فرمالین تغییر دهد (شکل ۲A). تزریق ۰/۴ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته LPGi فاز اول مدت زمان خم کردن پای ملتهب را فقط نسبت به گروه شم (P<0.01) کاهش داد (شکل ۲A)؛ ولی غلظت ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول فاز اول مدت زمان خم کردن پای ملتهب را نسبت به هر سه گروه کنترل (P<0.01)، سالین (P<0.05) و شم (P<0.001) به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲A).

تزریق µmol ۰/۴ و ۰/۸، ۱۷-بتا استرادیول مدت زمان خم کردن پای ملتهب را طی فاز دوم آزمون فرمالین نسبت به هر سه گروه کنترل (به ترتیب P<0.01 و P<0.001)، سالین (P<0.01) و شم (به ترتیب P<0.01 و P<0.001) به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲A). تزریق ۰/۱ میکرومول ۱۷- بتا استرادیول اثری روی فاز دوم مدت زمان خم کردن پای ملتهب نداشت (شکل ۲A).

در این مطالعه تزریق ۰/۱ میکرومول ۱۷- بتا استرادیول به داخل هسته LPGi نتوانست فاز اول مدت زمان لیسیدن



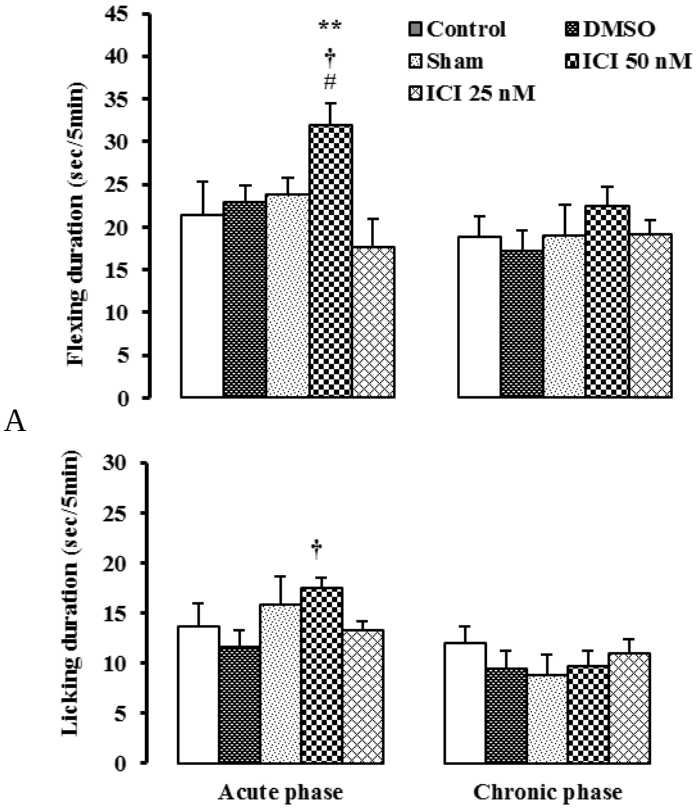
شکل ۲- مقایسه اثر تزریق دوزهای مختلف ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته LPGi روی مدت زمان خم کردن (A) و لیسیدن (B) پای ملتهب در آزمون فرمالین. ۱۵ دقیقه بعد از ریزتزریق دوزهای ۰/۱، ۰/۴ و ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته LPGi آزمون فرمالین (تزریق µl ۵۰ فرمالین ۴٪ به سطح داخلی پنجه پا) انجام می‌شد. E2: ۱۷بتا- استرادیول. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، † با گروه نرمال سالین و # با گروه شم می‌باشد. * نشان‌دهنده احتمال ($P<0.05$)، ** نشان‌دهنده احتمال ($P<0.01$) و *** نشان‌دهنده احتمال ($P<0.001$) می‌باشد. در هر گروه ۶ سر موش صحرایی نر استفاده شده است.

پای ملتهب را تغییر دهد (شکل ۲B). غلظت ۰/۴ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول مدت زمان لیسیدن پای ملتهب را طی فاز اول آزمون فرمالین فقط نسبت به گروه کنترل ($P<0.05$) به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲B)؛ ولی تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول فاز اول آزمون فرمالین را نسبت به هر سه گروه کنترل ($P<0.01$)، سالین ($P<0.05$) و شم ($P<0.01$) به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲B).

تزریق ۰/۱ میکرومول ۱۷-بتا استرادیول فاز دوم مدت زمان لیسیدن پای ملتهب را نسبت به گروه کنترل ($P<0.001$) و گروه سالین ($P<0.01$) به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲B). تزریق ۰/۴ و ۰/۸ میکرومول ۱۷-بتا استرادیول مدت زمان لیسیدن پای ملتهب طی فاز دوم آزمون فرمالین را نسبت به هر سه گروه کنترل ($P<0.001$)، سالین ($P<0.001$) و شم ($P<0.01$) به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲B).

تزریق ۵۰ نانومول ICI 182,720 (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژن) فاز اول مدت زمان خم کردن پای ملتهب را نسبت به هر سه گروه کنترل ($P<0.01$)، سالین ($P<0.05$) و شم ($P<0.05$) به طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۳A)؛ همچنین تزریق ۵۰ نانومول ICI 182,720 فاز اول مدت زمان لیسیدن پای ملتهب را نسبت به گروه DMSO ($P<0.05$) افزایش داد (شکل ۳B). تزریق ۵۰ نانومول ICI 182,720 نتوانست مدت زمان خم کردن و لیسیدن پای ملتهب را طی فاز دوم آزمون فرمالین تغییر دهد (شکل ۳A و شکل ۳B).

تزریق ۲۵ نانومول ICI 182,720 اثر معنی‌داری روی رفتارهای خم کردن و لیسیدن پای ملتهب طی فاز اول و دوم آزمون فرمالین نداشت (شکل ۳A و شکل ۳B). از آنجایی که



شکل ۳- مقایسه اثر تزریق ۲۵ و ۵۰ نانومول ICI 182,780 (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های ۱۷بتا- استرادیول) به داخل هسته LPGi روی مدت زمان خم کردن (A) و لیسیدن (B) پای ملتهب ناشی از تزریق µl ۵۰ فرمالین ۴٪ به سطح داخلی پنجه پا. ۱۵ دقیقه پیش از آزمون فرمالین، ریزتزریق ۲۵ و ۵۰ نانومول ICI 182,780 به داخل هسته LPGi انجام می‌شد. ICI: ICI 182,780. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، † با گروه نرمال سالین و # با گروه شم می‌باشد. * نشان‌دهنده احتمال ($P<0.05$) و ** نشان‌دهنده احتمال ($P<0.01$) می‌باشد. در هر گروه ۶ سر موش صحرایی نر استفاده شده است.

برای ادامه مطالعه دوزی از آنتاگونیست مورد نیاز بود که علی‌رغم داشتن اثر آنتاگونیستی، تعدیل درد را تحت تاثیر قرار ندهد؛ براساس نتایج به‌دست آمده، غلظت ۲۵ نانومول ICI 182,720 برای ادامه مطالعات رفتاری انتخاب شد.

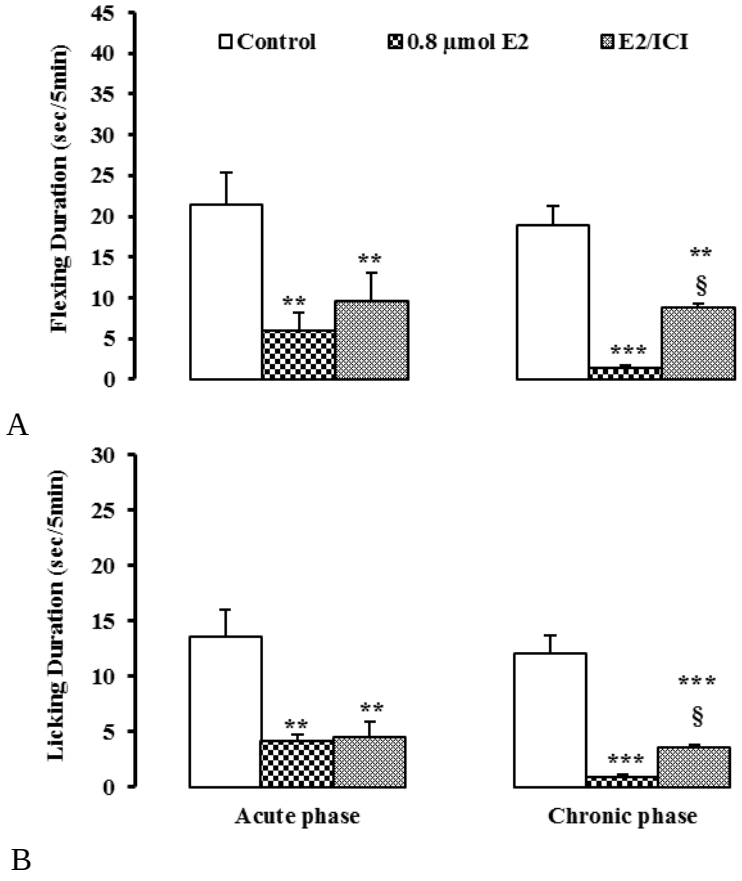
با تزریق ۲۵ نانومول ICI 182,780 به داخل هسته LPGi پیش از تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷- بتا استرادیول، بی‌دردی القا شده با ۱۷بتا- استرادیول روی رفتار خم کردن پای ملتهب فقط طی فاز دوم آزمون فرمالین خنثی شد ($P<0.05$) ولی به طور کامل به شرایط کنترل برنگشت و هنوز تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ($P<0.01$) داشت (شکل ۴A).

پیش‌تیمار هسته LPGi با ۲۵ نانومول ICI 182,780، اثر بی‌دردی ناشی از تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته LPGi روی رفتار لیسیدن پای ملتهب را فقط طی فاز دوم آزمون فرمالین خنثی نمود ($P<0.05$) ولی نتوانست آن را به شرایط کنترل برگرداند و هنوز تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ($P<0.001$) داشت (شکل ۴B).

بحث

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که بالاترین دوز ۱۷- بتا استرادیول (۰/۸ µmol) اثر ضددردی مؤثرتری را روی رفتارهای خم کردن و لیسیدن پای ملتهب اعمال می‌کند که با پیش تیمار آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژنی (ICI 182,780) این اثر خنثی می‌گردد ولی به شرایط پایه‌ای برنمی‌گردد. بنابراین بخشی از اثر ضددردی ۱۷بتا- استرادیول ممکن است به وسیله گیرنده‌های استروژنی وساطت شود.

بخش زیادی از مطالعات اخیر نقش استروئیدهای جنسی در پاسخ به دردزاهای حاد را بررسی کرده‌اند ولی نتایج گزارش شده بحث‌برانگیز هستند؛ به عنوان مثال گزارش شده که استرادیول آستانه پاسخ به آزمون صفحه داغ و مدت زمان



شکل ٤- مقایسه مدت زمان خم کردن (A) و لیسیدن (B) پای ملتهب ناشی از تزریق µl ۵۰ فرمالین ۴٪ به سطح داخلی پنجه پا در گروهی کـه ۱۷β- اسـترادیول بـه داخـل LPGi تزریق شده با گروه کنترل و گروهی که ۱۵ دقیقه پیش از تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته LPGi، ۲۵ نانومول ICI 182,720 دریافت کرده بودند. E2: ۱۷بتا- استرادیول و E2/ICI: ICI 182,780/۱۷بتا- استرادیول. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و § با گروه ۰/۸میکرومول ۱۷بتا–استرادیول مـی‌باشـد. * نشـان‌دهنـده احتمال (P<0.05)، ** نشان‌دهنده احتمال (P<0.01) و *** نشان‌دهنده احتمال (P<0.001) می‌باشد. در هر گروه ۶ سر موش صحرایی نر استفاده شده است.

تأخیر آزمون پس کشیدن دم را هم افزایش و هم کاهش می-دهد [۱۸، ۳۹، ۴۲]. بنابراین در مطالعه حاضر ما آزمون فرمالین را برگزیدیم تا علاوه بر فاز حاد درد بتوانیم درد مـداوم[1] را نیـز بررسی کنیم.

مطابق با یافته‌های پیشین آزمایشگاه مـا، تزریـق ۱۷بتـا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi – همانند رفتار تکان دادن پای ملتهب- سبب کاهش مدت زمان خـم کـردن و لیسـیدن پای ملتهب طی فاز اول آزمون فرمالین و القـا بـی‌دردی شـده اسـت کـه بـا نتـایج Kuba و همکـاران مغـایرت دارد [۲۳]. برخلاف نتایج این پژوهش، Mannino و همکارانش نیز نشان دادند که تزریق دوزهای مدرج شده‌ی ۱۷بتـا- اسـترادیول بـه موش‌های صحرایی ماده پاسخ‌هـای رفتـاری ناشـی از تزریـق فرمالین را فقط طی فاز دوم آزمون کاهش مـی‌دهـد [۲۷]. بـا این حال، غلظت و نحوه تزریق استرادیول، روش‌های سنجش درد و جنس حیوانـات مـورد اسـتفاده در مطالعـات ذکـر شـده متفاوت بوده است.

استرادیول در تعدیل درد نقش داشـته [۱۲] و افـزودن آن پاسخ‌های رفتاری به محرک‌های دردنـاک را هـم در حیوانـات ماده [۳۹] و هم در حیوانات نر [۴] تغییر می‌دهد که بـا نتـایج این مطالعه مطابقت دارد. تجویز بـرون‌زاد[2] اسـترادیول ممکـن اسـت پاسـخ‌هـای التهـابی را از طریـق تغییـر میـزان ترشـح پروستاگلندین E2 و کورتیزول تعدیل نماید و در نتیجه تعـدیل پاسخ دردی به محرک‌های التهابی را وساطت کنـد [۲۳] کـه در پژوهش حاضر نیز استرادیول باعث القا بی‌دردی مـی‌شـود.

1. Persistent pain

1. Exogenous

مطابق با مطالعه حاضر در مدل درد التهابی آزمون فرمالین، سطوح فیزیولوژیکی ۱۷بتا- استرادیول اثرات ضددردی استروژنی را تقلید می‌نماید [۱۱]. تاموکسیفن در مدل درد التهابی ناشی از فرمالین سبب پردردی می‌شود که با تزریق استرادیول پردردی ناشی از تاموکسیفن خنثی شده و احساس درد کاهش می‌یابد [۳۲]؛ که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. Kelly و همکاران نشان دادند که ۱۷بتا- استرادیول به سرعت سبب تعدیل پاسخ‌های التهابی در شرایط In vitro و In vivo می‌شود؛ و نتیجه گرفتند که در نورون‌های حسی اولیه درد ۱۷بتا- استرادیول ممکن است در تنظیم میزان حساسیت زنان به محرک‌های دردناک شرکت کند [۱۹] که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

در مطالعه حاضر مهار رفتارهای دردی ناشی از فرمالین توسط تزریق داخل LPGiی آنتاگونیست اختصاصی گیرنده-های استروژنی (ICI 182,780) بلوکه شد. مطابق با این نتایج، Ceccarellia و همکاران نیز اثر آنتاگونیستی ICI 182,780 را در موش‌های صحرایی نر نشان دادند [۹]. همچنین تزریق ۵۰ نانومول ICI 182,720 سبب افزایش فاز اول رفتارهای خم کردن و لیسیدن پای ملتهب و القا پردردی شد که تایید کننده اثر بی‌دردی القا شده با ۱۷بتا- استرادیول می‌باشد؛ هرچند که براساس یافته‌های پیشین آزمایشگاه ما، اثری روی رفتار تکان دادن پای ملتهب نداشته است. خاکپای و همکاران گزارش کرده‌اند که تزریق ICI 182,720 به هسته LC سبب کاهش فازهای اول و دوم رفتارهای خم کردن و لیسیدن پای ملتهب و القا بی‌دردی می‌شود [۲۲]؛ که با نتایج این پژوهش مغایرت دارد.

در این پژوهش ۱۷- بتا استرادیول مدت زمان خم کردن و لیسیدن پای ملتهب را کاهش داد. رفتار خم کردن پای ملتهب از انقباض تونیک عضلات خم‌کننده[1] به‌دلیل فعال شدن گیرنده‌های درد در پنجه پای موش صحرایی ناشی می‌شود [۳]. لیسیدن پای ملتهب پاسخ رفتاری با واسطه مراکز فوق-نخاعی است که حیوان در طی پاسخ به درد سایر فعالیت‌های خود را قطع می‌کند تا عضو آسیب‌دیده را لیس بزند [۴]. پس می‌توان پیشنهاد کرد که ممکن است ۱۷بتا- استرادیول در هسته LPGi با فعال کردن گیرنده‌های استروژنی - که فعالیت عصبی برانگیخته شده با درد در مدارهای نخاعی و فوق‌نخاعی را تعدیل می‌کنند- بی‌دردی را القا نماید. بنابراین براساس کاهش فاز اول رفتارهای القا شده با فرمالین می‌توان نتیجه گرفت که تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi احتمالاً از طریق گیرنده‌های استروژنی فعالیت نورونی مدارات نخاعی تحریک شده با محرک‌های دردی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. کاهش فاز دوم رفتارهای ناشی از تزریق فرمالین بیان‌گر آن است که تیمار هسته LPGi با ۱۷بتا- استرادیول ورودی‌های دردی و پردازش محرک دردی در این هسته و متعاقب آن در نخاع را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

نتایج پژوهش اخیر نشان‌دهنده القا بی‌دردی قوی توسط ریزتزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi می‌باشد. بی‌دردی ناشی از استروئید نورواکتیو ۱۷بتا- استرادیول به وسیله ICI 182,780 (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژنی) تا حدودی خنثی می‌شود ولی به شرایط کنترل بازنمی‌گردد. بنابراین، به نظر می‌رسد که احتمالاً در سطح رفتاری گیرنده‌های استروژنی هسته‌ی LPGi در اثر ضددردی ۱۷بتا- استرادیول در این هسته درگیر هستند. بدین صورت که احتمالا ۱۷بتا- استرادیول گیرنده‌های استروژنی نورون‌های LPGi را فعال می‌کند. فعال شدن نورون‌های این هسته سبب فعال شدن هسته LC با واسطه ورودی‌های گلوتامات‌ارژیک آن از هسته LPGi می‌شود. به دنبال فعال شدن هسته LC، نورآدرنالین در شاخ خلفی نخاع رها می‌گردد. نورآدرنالین نیز به‌نوبه خود به آدرنوسپتورهای آلفا-۲ در پایانه‌های حسی و نورون‌های بالارو متصل شده و باعث بروز بی‌دردی می‌شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت و همکاری دانشگاه تبریز به انجام رسیده است. بدین وسیله از این دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از زحمات جناب آقای دکتر علیرضا علی همتی که ما را در تهیه مقاطع بافتی هسته LPGi یاری نموده‌اند، سپاسگزاریم.

1. Flexor

References

[1] Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF, The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. ***Pain*** 60 (1995) 91-102.

[2] Aloisi AM, Bonifazi M. Sex hormones, central nervous system and pain. ***Horm Behav*** 50 (2006) 1-7.

[3] Aloisi AM, Ceccarelli I, Masi F, Scaramuzzino A, Effects of the essential oil from citrus lemon in male and female rats exposed to a persistent painful stimulation. ***Behav Brain Res*** 136 (2002) 127-35.

[4] Aloisi AM, Ceccarelli I, Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. ***Neuroscience*** 95 (2000) 559-66.

[5] Andrezik JA, Chan-Palay V, Palay SL, The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Conformation and cytology. ***Anat Embryol Berl*** 161 (1981) 355-71.

[6] Azhdari-Zarmehri H, Rahmati, Pozesh S, Ermi E, Emam- Jomeh, M.H . Effects of lidocaine injection into the lateral PGI nucleus on pain induced by formalin and hot plate tests in rats. ***Journal of Zanjan University Pzshy*** 21 (2013) 10-20.

[7] Azhdari-Zarmehri H, Semnanian S, FathollahiY, Pakdell FG, Responsiveness of paragigantocellularis nucleus neurons in morphine-dependent rats to forskolin in vivo: single unit recording. ***Yakhteh*** 6 (2005) 194-201.

[8] Azizi H, Semnanian S, Fathollahi Y, Pakdell FG, Azhdari-Zarmehri H, Rohampour K, Effect of rolipram, a type 4-specific phosphodiesterase inhibitor, on unit activity of paragigantocellularis neurons and withdrawal signs in morphine dependent rats. ***Yakhteh*** 7 (2005) 35-42.

[9] Ceccarellia I, Fiorenzania P, Grassob G, Larivierea WR, Massafraa C, Massaib L, Muscettolaa M, Aloisi AM, Estrogen and m-opioid receptor antagonists counteract the 17b-estradiol-induced licking increase and interferon-g reduction occurring during the formalin test in male rats. ***Pain*** 111 (2004) 181-190.

[10] Ceccarellia I, Fiorenzania P, Grassob G, Larivierea WR, Massafraa C, Massaib L, Muscettolaa M, Aloisi AM. Estrogen and m-opioid receptor antagonists counteract the 17b-estradiol-induced licking increase and interferon-g reduction occurring during the formalin test in male rats. ***Pain*** 111 (2004) 181-190.

[11] Christy A, Samantha M, Quinones-Jenab V, Charles E, Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. ***Pain*** 8 (2007) 334-342.

[12] Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM, Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. ***Pain*** 8 (2004) 397-411.

[13] Dawe GS, Huff KD, Vandergriff JL, Sharp T, O'Neill MJ, Rasmussen K, Olanzapine activates the rat locus coeruleus: in vivo electrophysiology and c-Fos immunoreactivity. ***Biol Psychiatry*** 50 (2001) 510-20.

[14] Erami E, Azhdari-Zarmehri H, Ghasemi-Dashkhasan E, Esmaeili MH, Semnanian S, Intraparagigantocellularislateralis injection of orexin A has an antinociceptive effect on hot plate and formalin tests in rat. ***Brain Res*** 1478 (2012) 16- 23.

[15] Erami E, Sofi Abadi M, Esmaeili M, Haghdoost-Yazdi H, Azhdari-Zarmehri H, Decreased formalin induced nociceptive behaviorsby morphine microinjection into the nucleusreticularis paragigantocellularis lateralis. ***Knowledge Health*** 6 (2011) 32-7.

[16] Fathi-Moghaddam H, Kesmati M, Kargar HM, The effect of paragigantocellularis lateralis lesionon conditioned place preference (CPP) in presenceor absence of alpha2 adrenergic agonist (clonidine) in male rats. ***Acta Physiol Hung*** 93 (2006) 33-40.

[17] Forman LJ, Tingle V, Estilow S, Cater J, The response to analgesia testing is affected by gonadal steroids in the rat. ***Life Sci*** 45 (1989) 447-454.

[18] Gordon FT, Soliman MR, The effects of estradiol and progesterone on pain sensitivity and brain opioid receptors in ovariectomized rats. ***Horm Behav*** 30 (1996) 244-50.

[19] Kelly A, Matthew P, Stephen B, Nathan A, James L, kenneth M, William P, 17β-Estradiol rapidly enhances bradykinin signaling in primary sensory neurons in vitro and in vivo. ***Pharmacol Exp Ther*** 335 (2010) 190-196.

[20] Kelly MJ, Lagrange AH, Wagner EJ, Ronnekleiv OK. Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. ***Steroids*** 64 (1999) 64-75.

[21] Kepler KL, Kest B, Kiefel JM, Cooper ML, Bodnar RJ, Roles of gender, gonadectomy and estrous phase in the analgesic effects of intracerebroventricular morphine in

rats. ***Pharmacol Biochem Behav*** 34 (1989) 119-127.

[22] Khakpay R, Semnaniana S, Javana M, Janahmadib M, The effect of intra-locus coeruleus injection of 17-estradiol on inflammatory pain modulation in male rat. ***Behav Brain Res*** 214 (2010) 409-416.

[23] Kuba T, Kemen LM, Quinones-Jenab V, Estradiol administration mediates the inflammatory response to formalin in female rats. ***Brain Res*** 1047 (2005) 119-122.

[24] Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA, Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. ***PNAS*** 93 (1996) 5925-5930.

[25] Li W, Yan T, Li S, An G. Estrogen Rapidly Enhances Incisional Pain of Ovariectomized Rats Primarily through the G Protein-Coupled Estrogen Receptor. ***Int J Mol Sci*** 15 (2014) 10479-91.

[26] Lu Y, Jiang Q, Yu L, Lu ZY, Meng SP, Su D, Burnstock G, Ma B. 17β-estradiol rapidly attenuates P2X3 receptor-mediated peripheral pain signal transduction via ERα and GPR30. ***Endocrinology*** 154 (2013) 2421-33.

[27] Mannino CA, South SM, Quinones-Jenab V, Inturrisi CE, Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. ***Pain*** 8 (2007) 334-342.

[28] Mogil JS, Chesler EJ, Wilson SG, Juraska JM, Sternberg WF. Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. ***Neurosci Biobehav Rev*** 24 (2000) 375-89.

[29] Mogil JS, The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 96 (1999) 7744-51.

[30] Murphy AZ, Hoffman GE, Distribution of gonadal steroid receptor-containing neurons in the preoptic-periaqueductal gray-brainstem pathway: a potential circuit for the initiation of male sexual behavior. ***Comp Neurol*** 438 (2001)191-212.

[31] Normandin JJ, Murphy AZ, Excitotoxic lesionsof the nucleus paragigantocellularis facilitate malesexual behavior but attenuate female sexualbehavior in rats. ***J NeuroSci*** 175 (2011) 212-23.

[32] Normandin JJ, Murphy AZ, Nucleus paragigantocellularis afferents in male and female rats: organization, gonadal steroid receptor expression, and activation during sexual behavior. ***Comp Neurol*** 508 (2008) 771-94.

[33] Paxinos G, Watson C, editors. ***The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.*** 6th ed., NewYork: Academic Press: 2005.

[34] Pilgrim C, Hutchinson JB, Developmental regulation of sex differences in the brain: can the role of gonadal steroids be redefined? ***Neuroscience*** 60 (1994) 843-855.

[35] Ralya A, McCarson KE. Acute estrogen surge enhances inflammatory nociception without altering spinal FOS expression. ***Neurosci Lett*** 575 (2014) 91-5.

[36] Rupprecht R, Holsboer F, Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. ***Trends Neurosci*** 22 (1999) 410-416.

[37] Singewald N, Kaehler ST, Philippu A, Noradrenaline release in the locus coeruleus ofconscious rats is triggered by drugs, stress andblood pressure changes. ***J Neuroreport*** 10 (1999) 1583-7.

[38] Singewald N, Philippu A, Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. ***Prog Neurobiol*** 56 (1998) 237-67.

[39] Stoffel EC, Ulibarri C, Craft RM, Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. ***Pain*** 103 (2003) 285-302.

[40] Ston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, EnnisM, van BE, Pieribone V, et al. Afferent regulationof locus coeruleus neurons: anatomy, physiologyand pharmacology. ***Prog Brain Res*** 88 (1991) 47-75.

[41] Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K, The formalin test: an evaluation of the method. ***Pain*** 51 (1992) 5-17.

[42] Tsuruoka M, Willis WD, Bilateral lesions in the area of the nucleus locus coeruleus affect the development of hyperalgesia during carrageenan-induced inflammation. ***Brain Res*** 726 (1996) 233-236.

[43] Watson GS, Sufka KJ, Coderre TJ, Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. ***Pain*** 70 (1997) 53-8.

[44] Xu XJ, Plesan A, Yu W, Hao JX, Wiesenfeldhallin Z, Possible impact of genetic differences on the development of neuropathic pain-like behaviors after unilateral sciatic nerve ischemic injury in rats. ***Pain*** 89 (2001) 135-45.