

## بررسی اثر تخریب اختصاصی مسیر شکمی - جانبی PAG به NRM توسط نوروتوکسین Ibotenic Acid در آزمون فرمالین

فرناز نیکبخت، ژیلا بهزادی

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

### چکیده

نورون‌هایی که از قسمت شکمی - جانبی PAG به هسته رافه ماگنوس NRM می‌روند، حاوی اسیدهای آمینه تحریکی EAA به عنوان ناقل شیمیایی هستند. این مسیر نقش مهمی در سیستم پایین رونده تعدیل درد ایفا می‌کند. جهت تعیین نقش این مسیر اختصاصی در درک درد، تخریب شیمیایی در ناحیه شکمی - جانبی PAG به صورت یک طرفه با استفاده از ماده Ibotenic acid در دو دوز  $0.2 \mu\text{l}$  و  $0.5 \mu\text{l}$  (نوروتوکسین اختصاصی نورون‌های حاوی EAA) در موش‌های صحرایی نر انجام شد. پس از یک هفته میزان درک درد از طریق آزمون فرمالین (10%،  $50 \mu\text{l}$ ) به مدت ۶۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان آزمایشات، حیوانات توسط فرم آلدنید ۱۰٪ پرفیوز شدند. جهت تعیین ناحیه تزریق، رنگ آمیزی نیسل بر روی مقاطع ۸۰ میکرونی تهیه شده توسط ویبراتوم انجام گرفت. نتایج افزایش معنی‌داری را در فاز اول فرمالین در گروه‌های آزمون نسبت به کنترل نشان می‌دهد. در فاز دوم تنها میزان  $0.5 \mu\text{l}$  نوروتوکسین سبب کاهش معنی دار این فاز شده است.

نتایج نشان می‌دهند که گیرنده‌های NMDA موجود در PAG در درک درد ناشی از فرمالین دخالت دارند. واژه‌های کلیدی: اسیدهای آمینه تحریکی، بی‌دردی، هسته رافه‌ماگنوس، ناحیه شکمی - جانبی قنات مغزی، آزمون فرمالین.

### مقدمه

در نهایت فعال شدن مسیر نزولی آن به شاخ خلفی نخاع می‌گردد [۱۳]. اسیدهای آمینه تحریکی و خصوصاً گیرنده NMDA آنها که به صورت گسترده در سراسر دستگاه اعصاب مرکزی وجود دارند، نقش مهمی را در درک و تعدیل حس درد ایفاء می‌کنند [۱، ۳، ۶، ۱۱، ۱۲]. گیرنده‌های NMDA همچنین در چگونگی پاسخ به درد القاء شده توسط فرمالین نیز نقش دارند. آزمون فرمالین از دو فاز جداگانه تشکیل شده است، فاز اولیه که به علت تحریک مستقیم گیرنده‌های درد ایجاد می‌شود و

ماده خاکستری اطراف قنات مغزی (PAG) و هسته رافه‌ماگنوس در بصل النخاع (NRM) به عنوان دو مرکز اساسی در سیستم نزولی کنترل درد شناخته شده‌اند [۵، ۸]. مطالعات انجام شده، نشان می‌دهند که بی‌دردی ناشی از تحریک PAG به واسطه یک مسیر تک سیناپسی به NRM اعمال می‌شود [۸]. این مسیر که از قسمت شکمی - جانبی PAG (VL-PAG) شروع می‌شود [۱۰]، با آزادسازی اسیدهای آمینه تحریکی در هسته رافه‌ماگنوس سبب تحریک نورون‌های این هسته و

گروه دوم ( $n=8$ ) تحت تزریق یک طرفه (ناحیه راست) ماده Ibotenic Acid به میزان  $0.2 \mu\text{l}$  در ناحیه VL PAG قرار گرفتند. ماده Ibotenate سیگما که در حلال خود بافر فسفات سدیم (PBS) حل شده و در دو غلظت نهایی  $2 \mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$  و  $5 \mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$  آماده تزریق شد. جهت تزریق ابتدا موش‌ها با تزریق داخل صفاقی مخلوط Ketamin ( $100 \text{ mg/kg}$ ) و Rompun ( $\text{mg/kg}$ ) 5) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکس قرار گرفتند. سپس با توجه به مختصات زیر که نسبت به خط میانی گوش در نظر گرفته شده [7]، سوراخی در جمجمه آنها ایجاد شد.

L: 0.2 V: 5.2 AP: 1.2

تزریق توسط سرنگ هامپلتون  $10 \mu\text{l}$  که به دستگاه استریوتاکس متصل بود انجام شد.

گروه سوم ( $n=6$ ) ماده Ibotenic Acid با دوز  $0.5 \mu\text{l}$  در مختصات فوق تزریق شد.

گروه چهارم گروه Sham ( $n=2$ ) این گروه فقط حلال نوروتوکسین را به میزان  $0.2 \mu\text{l}$  و با pH 7.4 دریافت کردند. تزریق کلیه مواد با سرعت  $0.5 \mu\text{l}$  در دقیقه انجام گرفت. جهت جلوگیری از پخش ماده، سرنگ به مدت حداقل ۱۰ دقیقه در محل باقی ماند.

پس از گذشت یک هفته از انجام تزریق، آزمون فرمالین بر روی گروه‌های فوق انجام گرفت. در انتهای مطالعه حیوانات مجدداً بیهوش شده و از طریق قرار دادن کانولی در آنورت صعودی، عروق مغزی آنها تحت پرفیوژن قرار گرفت. شستشو با 150 ml سالین شروع شده و با 500 ml محلول فیکساتیو (فرمالین ۱۰٪ در بافر فسفات 0.1M pH 7.4) ادامه پیدا کرد. جهت بررسی محل تزریق پس از خروج مغز از جمجمه برش‌های ۸۰ میکرونی توسط ویبراتوم از قسمت مغز

فاز دوم که از تغییرات مرکزی و التهاب محیطی سرچشمه می‌گیرد. ظاهراً مکانیسم‌های مرکزی که به علت تغییرات ایجاد شده در CNS به وجود می‌آیند، مسئول اصلی رفتارهای درد فاز دوم هستند. تزریق فرمالین نه تنها سبب آزادسازی اسیدهای آمینه تحریکی (آسپاراتات و گلوتامات) در شاخ خلفی نخاع می‌شود، بلکه همچنین می‌تواند از طریق آزاد کردن تاکی‌کینین‌ها از انتهای فیبرهای حسی درد و بر روی رسپتورهای NMDA اثر کرده و باعث ایجاد تغییرات طولانی در عملکرد نورون‌های CNS نیز شود [2].

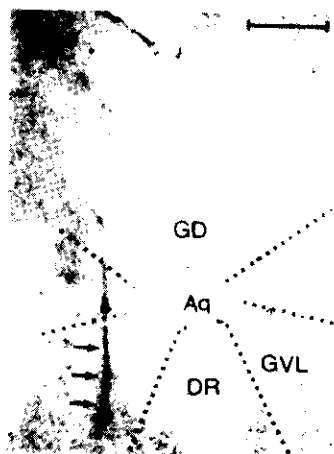
از آنجائیکه گیرنده‌های NMDA نقش مهمی را در مدارهای نورونی تعدیل درد در داخل PAG و خصوصاً خروجی آن به هسته رافه‌ماگنوس ایفاء می‌کنند [5]، ما در این تحقیق بر آن شدیم تا با استفاده از تزریق نوروتوکسین Ibotentic Acid [4، 9] به ناحیه شکمی -بانبی PAG، اثرات ناشی از بلوک گیرنده‌های NMDA را در این ناحیه و با استفاده از مدل درد فرمالین مشاهده کنیم.

## مواد و روش‌ها

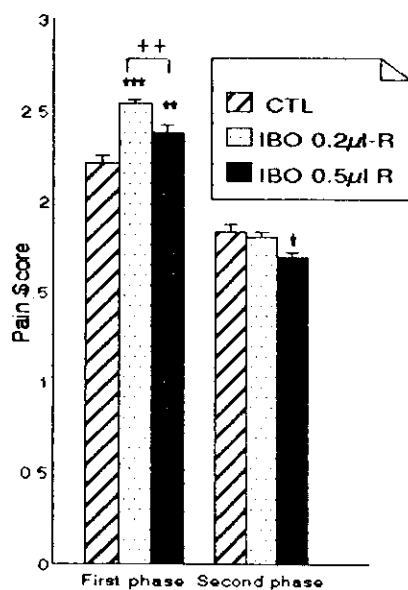
در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد Sprague Dawley با میانگین وزنی ۲۰۰ الی ۴۰۰ گرم در ۴ گروه استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و آب و غذا به طور معمول در دسترس آنها قرار می‌گرفت.

در گروه اول (گروه فرمالین  $n=6$ ) فرمالین ۱۰٪ به میزان  $50 \mu\text{l}$  در زیر پوست پنجه پای راست حیوان تزریق گردید. حیوان بلافاصله پس از تزریق در جعبه‌های پلکسی گلاس مخصوص مشاهده قرار داده شده و پاسخ‌های ناشی از درد به مدت ۶۰ دقیقه در آنها ثبت و نمره‌گذاری شد.

دوم آزمون فرمالین در نمودار ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- محل تزریق Ibotenic Acid در بخش CGLV ماده خاکستری قنات مغزی که با پیکان مشخص شده است.  
Micron 488 : Scale bar



شکل ۲- در این نمودار اثر تخریب شیمیایی ناحیه VL-PAG با دوزهای (0.5, 0.2 µl) نوروتوکسین Ibotenic Acid بر روی شدت درد ناشی از فرمالین نشان داده شده است. علامت \* اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمون نسبت به کنترل (گروه ۱) را نشان می‌دهد \* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001 علامت + اختلاف معنی دار بین دو گروه آزمون را نشان می‌دهد +++ P<0.01

میانی آنها گرفته شد. برش‌ها سپس توسط کرزیل ویوله (نیسل) رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری تحت مطالعه قرار گرفتند. داده‌های تجربی از نظر آماری با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و Student t-test آنالیز گردیدند. نتایج در همه موارد به صورت Mean±SEM بیان شد. تصویر ۱ محل تزریق ماده Ibotenic Acid را در ناحیه شکمی - جانبی PAG نشان می‌دهد.

## نتایج

در این تحقیق رفتار درد بلافاصله پس از تزریق فرمالین ۱۰٪ و همچنین یک هفته پس از تخریب شیمیایی آوران تحریکی هسته رافه‌ماگنوس و پس از القاء درد توسط فرمالین بررسی شد که نتایج آن ارائه می‌شود. به دلیل عدم وجود تفاوت معنی دار بین گروه شم و گروه ۱، نتایج این دو گروه در هم ادغام شد. تخریب ناحیه VL PAG با نوروتوکسین Ibotenic Acid سبب افزایش معنی دار شدت درد در فاز اول آزمون فرمالین نسبت به گروه کنترل شده و شدت این افزایش برای دوز 0.2 µl بیشتر از دوز 0.5 µl آن می‌باشد (۱۳٪ افزایش برای دوز 0.2 µl و ۷٪ افزایش برای دوز 0.5 µl). (P<۰/۰۱)

شدت درد در فاز اول آزمون فرمالین بین دو دوز 0.2 µl و 0.5 µl نوروتوکسین نیز تفاوت معنی داری از خود نشان می‌دهد (P<۰/۰۱). تخریب VL PAG اگر چه سبب کاهش شدت درد فاز دوم آزمون فرمالین برای هر دو دوز نوروتوکسین شده ولی کاهش تنها برای دوز 0.2 µl معنی دار می‌باشد (۶٪ کاهش برای دوز 0.2 µl و ۰/۰۵ P). مقایسه اثر تخریب ناحیه VL PAG با دو دوز 0.5 µl و 0.2 µl Inbotenic Acid بر روی فاز اول و

## بحث

نتایج نشان می‌دهد که تزریق ماده Ibotenic Acid به ناحیه شکمی - جانبی PAG، می‌تواند سبب افزایش معنی‌دار فاز ۱ یا فاز درد حاد در آزمون فرمالین شود که شدت این افزایش در دوز  $0.2 \mu\text{l}$  نوروتوکسین بیشتر از دوز  $0.5 \mu\text{l}$  آن است (۱۳٪ افزایش در مقابل ۷٪).

مطالعات انجام شده به دنبال تزریق گلوتامات به داخل تنه مغزی نشان می‌دهند که تزریق این ماده ابتدا سبب ایجاد رفتارهای بیانگر درد یا SPS (Spontaneous Pain State) شده و سپس حالت بی‌دردی ایجاد می‌کند. از آنجایی که این حالت‌ها، مشابه آزاد شدن گلوتامات به دنبال اعمال یک تحریک در دوز از انتهای مسیرهای صعودی درد (Spinobulbar, Spinoencephalic) است، می‌توان نتیجه گرفت که مسیرهای صعودی انتقال درد خود عامل تحریک مسیرهای نزولی تعدیل‌کننده آن هستند. در واقع مداری فرضی وجود دارد که در آن تحریک مسیرهای صعودی انتقال درد به طور همزمان سبب تحریک مسیرهای نزولی کنترل درد نیز می‌شوند و در این مدار، اسیدهای آمینه تحریکی و خصوصاً گیرنده NMDA آنها رل مهمی ایفاء می‌کند [۶].

از طرف دیگر مسیر تحریکی خروجی از PAG به NRM، به صورت تونیک توسط نورون‌های واسطه گابائریک مهار می‌شود. به علاوه یک محرک دردزا با آزادسازی گلوتامات از انتهای مسیرهای آوران درد سبب فعال شدن نورون‌های انکفالینریک از PAG شده و چون این نورون‌ها خود مهار کننده نورون‌های گابائریک هستند، پدیده درد می‌تواند از طریق عمل مهار، سبب فعال شدن نورون‌های تحریکی خروجی از PAG شود [۱۴].

مشخص است که گیرنده NMDA در این مسیر فرضی حداقل بر روی نورون‌های انکفالینریک و نورون‌های خروجی از PAG وجود دارد. از طرف دیگر از آنجائیکه Ibotenic Acid آنالوگ گلوتامات بوده و می‌تواند از طریق احتباس کلسیم درون سلولی موجب مرگ سلول بشود، می‌توان نتیجه گرفت که تزریق آن در ناحیه VL PAG حداقل باعث تخریب مسیرهای تحریکی خروجی و احتمالاً نورون‌های انکفالینی مرتبط با آنها می‌شود که نتیجه هر دو حالت، کاهش فعالیت مسیرهای نزولی تعدیل درد است.

نتایج این تحقیق همچنین نشان می‌دهند که شدت درد در فاز ۱ آزمون فرمالین برای دوز  $0.2 \mu\text{l}$  نوروتوکسین بیشتر از دوز  $0.5 \mu\text{l}$  آن است.

از آنجائیکه نوروتوکسین Ibotenic Acid از طریق گیرنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی و به خصوص گیرنده NMDA عمل می‌کند با افزایش دوز می‌توان شاهد کاهش حساسیت نورونی بود [۱۵].

بر طبق نتایج در میزان درد ایجاد شده در فاز دوم برای دوز  $0.2 \mu\text{l}$  نوروتوکسین تفاوتی مشاهده نمی‌شود در صورتیکه دوز  $0.5 \mu\text{l}$  آن کاهش اندک ولی معنی‌داری را در میزان درد فاز دوم ایجاد کرده است (۶٪). احتمالاً انتشار بیشتر نوروتوکسین در دوزهای بالاتر به مناطق اطراف ناحیه PAG VL [۱۵] که در ایجاد هایپر آلژزی ثانویه فوق نخاعی مؤثر هستند [۲] توانسته است با اثر برگیرنده‌های NMDA آنها سبب کاهش هایپر آلژزی ثانویه در فاز دوم شود.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که اسیدهای آمینه تحریکی با اثر برگیرنده NMDA خود، در پردازش درد ناشی از فرمالین دخالت دارند.

## منابع

- [1] Carlton, S.M., Zhou, S., Coggeshall, R.E., Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. *Brain Res.* 790 (1998) 160-169.
- [2]Coderre, T.J., Vaccarino, A.L., Melzack, R., Central nervous plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res.* 535 (1990) 155-158.
- [3] Harris, J.A., Corsi, M., Quataroli, M., Arban, R. and Bentivoglio, M., Up regulation of spinal glutamate receptors in chronic pain. *Neuroscience*, 74 (1996) 7-121.
- [4] Inglis, W.L., Semba, K., Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid, Ampa, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Res.* 755 (1997) 17-27.
- [5] Jacquet, Y.F., The NMDA receptor: central role in pain inhibition in rat periaqueductal gray. *Eur. J. Pharmacol.* (1988) 271-276.
- [6] Jensen, T.S., Yaksh, T.L., The antinociceptive activity of excitatory amino acids in the rat brainstem: an anatomical and pharmacological analysis. *Brain Res.* 569 (1992) 255-267.
- [7] Kamei, J., Aoki, T., Kasuya, Y., Periaqueductal gray matter stimulation produced analgesia in diabetic rats. *Neurosci. Lett.* 142 (1992) 13-16.
- [8] Lakos, S., Basbaum, A.I., An ultrastructural study of the projections from the midbrain periaqueductal gray to spinally projecting, serotonin-immunoreactive neurons of the medullary nucleus raphe magnus in the rat. *Brain Res.* 443 (1988) 383-388.
- [9] Metzner, W., Juranek, J., A method to biotinylate and histochemically visualize ibotenic acid for pharmacological inactivation studies. *J. Neurosci. Meth.* 76 (1997) 143-150.
- [10] Prieto, G.J., Cannon, J.T. and Liebeskind, J.C., N. Raphe magnus lesions disrupt stimulation-produced analgesia from ventral but not dorsal midbrain areas in the rat. *Brain Res.* 261 (1983) 53-57.
- [11] Sandkuhler, J. and Gebhart, G.F., Relative contributions of the nucleus raphe magnus and adjacent medullary reticular formation to the inhibition by stimulation in the periaqueductal gray of a spinal nociceptive reflex in the pentobarbital anesthetized rat. *Brain Res.* 305 (1984) 77-87.
- [12] Spinella, M., Cooper, M.L., Bondar, R.J., Excitatory amino acid antagonists in the rostral ventro medial medulla inhibit mesencephalic morphin analgesia in rats. *Pain.* 64 (1996) 545-552.
- [13] Wiklund, L., Behzadi, G., Kalen, P., Headley, P.M., Nicolopoulos, L.S., Parsons C.G., and West D.C., Autoradiographic and electrophysiological evidence for excitatory amino acid transmission in the periaqueductal gray projection to nucleus raphe magnus in the rat. *Neurosci. Lett.*, 93 (1988) 158-163.
- [14] Williams, F.G., Mullet, M.A., Beitz, A.J., Basal release of met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Res.* 690 (1995) 207-217.
- [15] Yeomans, D.C. and Proudfit, H.K., Antinociception induced by microinjection of substance P into the A7 catecholamine cell group in the rat. *Neuroscience*, 49 (1992) 681-691.