Physiology and Pharmacology, 12 (2), 101 - 108
Summer 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

The firing rate of neurons in the nucleus cuneiformis in response to formalin in male rats

Abbas Haghparast*, Amir-Mohammad Alizadeh, Fereshteh Motamedi

Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University (M.C.), Tehran, Iran

Received: 30 Dec 2007 Revised: 4 June 2008 Accepted: 9 June 2008

Abstract

Introduction: Although formalin-induced activity in primary afferent fibers and spinal dorsal horn is well described, the midbrain neural basis underlying each phase of behavior in the formalin test has not been yet clarified. The present study was designed to investigate the nucleus cuneiformis (CnF) neuronal responses during two phases after subcutaneous injection of formalin into the hind paw of rat.

Methods: In this study, 76 male NMRI adult rats, weighing 230-320 g were used. Control group (n = 24) was merely tested for determining spontaneous firing rate of CnF neurons. In the formalin group, formalin-induced neural activity of 37 cells were simultaneously recorded from the CnF during first phase (0-5 min) and second phase (15-60 min) of formalin test at 5-min intervals, using an extracellular single unit recording technique. Saline group (n = 15) received 50µl saline s.c. instead of formalin into the plantar surface of hind paw 15 min after baseline recording.

Results: The baseline firing rate of neurons in the CnF varied between 1.2 and 39.2 spikes/sec and the average frequency of spontaneous activity over 1 h was 11.8 ± 1.1 spikes/sec. There were three neural clusters after formalin injection. Neurons in cluster 1 (46%) exhibited severe, transient excitatory response in the first (acute) phase, while neurons in cluster 2 (35%) exhibited tonic but long-lasting excitatory response in the second (chronic) phase. Cluster 3, a small portion of neurons (about one fifth), failed to show any evident responses to formalin test.

Conclusion: Our findings suggest that alteration of neural activity and pattern in the spontaneous background of CnF neurons can mediate a role in the transmission of nociceptive information induced by the peripheral injection of formalin and can be discussed in light of the role of these neurons in nociceptive information processing following peripheral stimuli.

Keywords: Nucleus cuneiformis; Formalin test; Firing rate; Single unit recording; Rat

* Corresponding author e- mail: haghparast@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۲)، ۱۰۱ – ۱۰۸
تابستان ۱۳۸۷

میزان فعالیت نورون‌های هسته میخی‌شکل موش صحرایی نر در پاسخ به فرمالین

عباس حق‌پرست*، امیرمحمد علیزاده، فرشته معتمدی
مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: بهمن ۸۶ بازبینی: خرداد ۸۷ پذیرش: خرداد ۸۷

چکیده

مقدمه: هر چند که رفتارهای ناشی از تزریق فرمالین در پنجه پای عقبی موش صحرایی در فیبرهای آوران اولیه و شاخ خلفی نخاع به خوبی مطالعه شده‌است، اساس نورونی هر یک از مراحل رفتاری در آزمون فرمالین در مغز میانی، تا کنون آشکار نشده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی نقش هسته میخی‌شکل (Nucleus Cuneifromis) و پاسخدهی نورونی آن در دو فاز پس از تزریق فرمالین به پنجه پای عقبی موش صحرایی طراحی گردیده است.

روش‌ها: در این مطالعه از ۷۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد NMRI با وزن تقریبی ۳۲۰–۲۳۰ گرم استفاده گردید. گروه کنترل (n=۲۴) که تنها برای بدست آوردن فعالیت خودبخودی نورون‌های هسته میخی شکل مورد آزمایش قرار گرفتند. گروه سالین (n=۱۵) که پس از ۱۵ دقیقه ثبت فعالیت پایه، سالین (۵۰ میکرولیتر) بجای فرمالین به صورت زیرجلدی در پنجه پای حیوان تزریق شد. گروه فرمالین که فعالیت ۳۷ نورون هسته میخی شکل در پاسخ به تزریق فرمالین در پنجه عقبی پای حیوان در فاز اول (۵–۰ دقیقه) و فاز دوم (۶۰–۱۵ دقیقه) در فواصل ۵ دقیقه‌ای به روش ثبت تک واحدی خارج سلولی ثبت شد.

یافته‌ها: نرخ فعالیت پایه در نورون‌های هسته میخی شکل بین ۱/۲ تا ۳۹/۲ اسپایک در ثانیه بود و میانگین فعالیت خودبخودی در این نورون‌ها در طول یک ساعت ۱/۱ ± ۱۱/۸ اسپایک در ثانیه بدست آمد. الگوی فعالیت نورونهای این هسته پس از تزریق فرمالین به سه خوشه نورونی تغییر یافت. نورونهای خوشه اول (۴۶٪) پاسخهای تحریکی تک فازی قوی و گذرا را در فاز اول (حاد) نشان دادند در حالیکه نورونهای خوشه دوم (۳۵٪) پاسخهای تحریکی تک فازی قوی ولیکن طولانی را در فاز دوم (مزمن) نشان دادند. خوشه سوم گروه کوچکی از نورونها (حدود یک پنجم) بودند که اصولاً تغییر پاسخی پس از تزریق فرمالین نداشتند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما پیشنهاد می‌کند که تغییر در الگوی فعالیت خودبخودی نورون‌های هسته میخی شکل می‌تواند در مسیر انتقال اطلاعات مربوط به درد ناشی از تزریق محیطی فرمالین ایفای نقش کند و بحث در این زمینه می‌تواند منجر به روشن شدن نقش این نورون‌ها در پردازش اطلاعات درد در پی یک تحریک محیطی گردد.

واژه‌های کلیدی: هسته میخی‌شکل؛ آزمون فرمالین؛ فعالیت نورونی؛ ثبت تک واحدی؛ موش صحرایی

مقدمه

آزمون فرمالین در سال ۱۹۷۷ بوسیله آقایان دابیسون و دنیس با هدف ایجاد روشی برای تحریک دردناک طولانی مدت طراحی شد [۷]. پاسخ دوفازی دردی که به این ترتیب ایجاد می‌شود در بسیاری از جوندگان از جمله موش صحرایی و موش سوری مورد بررسی قرار گرفته است. در گربه‌ها نمودار پاسخ‌های رفتاری تک فازی دیده می‌شود، در حالیکه در جوندگانی نظیر موش‌ها پس از تزریق فرمالین، یک فاز مقدماتی کوتاه (فاز ۱) به همراه درد شدید، مرحله بینابینی (اینترفاز) که شدت درد به

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: haghparast@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

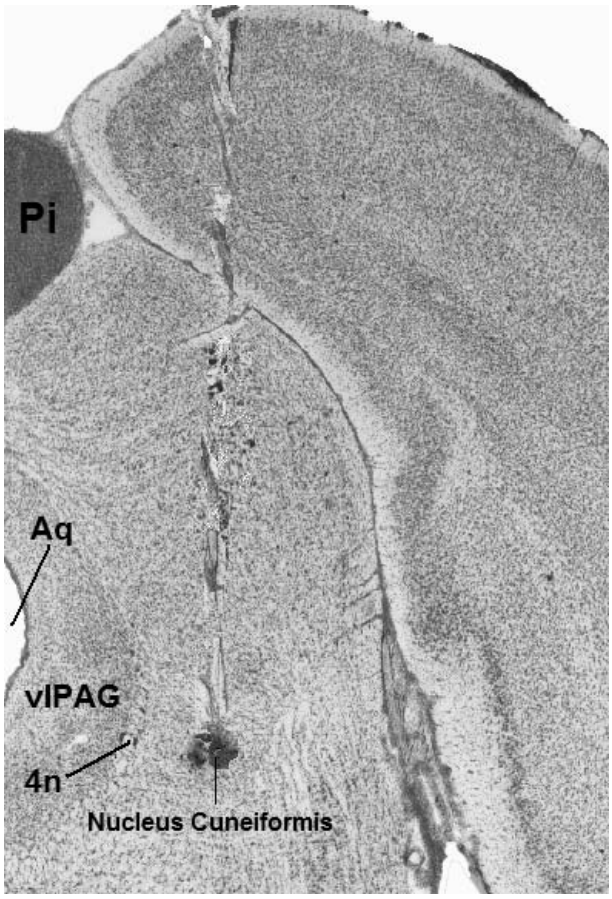
کمترین مقدار خود و در مواردی به صفر می‌رسد و در پایان، یک فاز بلند مدت (فاز ۲) که همراه با شدت گرفتن دوباره احساس درد در جانور است، پدید می‌آید. فرضیه مطرح در این زمینه؛ فاز ۱ این نمودار را مربوط به تحریک مستقیم گیرنده‌های درد می‌داند [۷،۱۶] ولی فاز ۲ را به حساس شدن مرکزی (Central sensitization) نورونهای مسیر درد بر اثر ورودی‌های مسیر آوران اولیه درد، در طول فاز اول [۵،۲۲،۲۳] و یا گسترش التهاب نسبت می‌دهد [۱۳،۱۴،۲۰]. با این حال، مکانیسم واقعی مسئول کاهش رفتار مشخصه درد در پایان فاز ۲ روشن نیست. فعالیت نورونها در سطوح مختلف دستگاه عصبی در پاسخ به تزریق زیر جلدی فرمالین، متفاوت بوده و تزریق فرمالین، تحریک دو فازی فیبرهای عصبی C و Aδ [۱۶،۲۱] را به مانند نورونهای دارای دامنه فعالیت گسترده (Wide Dynamic Range; WDR) در نخاع [۲،۴،۵،۱۲،۲۰] به دنبال خواهد داشت که بصورت گذرا، طبیعت دوگانه پاسخ رفتاری را به موازات خود پدید می‌آورد. به بیان دیگر، تخلیه خودبخودی نورونها در ساختارهای متعدد ساقه مغز فقط برای چند دقیقه نخست پس از تزریق فرمالین افزایش می‌یابد و برای فاز ۲ مشاهده نشده است [۷،۸]. از این رو، فعالیت ناشی از تزریق فرمالین، در فیبرهای آوران اولیه و شاخ پشتی نخاع بخوبی توصیف شده است ولی توضیح زیادی در زمینه مغز میانی در دست نیست.

مکانیسم های نورونی دخیل در آزمون فرمالین در مغز میانی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته و از طرفی تفاوت در مسیر های دخیل در آزمون‌های درد حاد و دردهای مزمن التهابی در نواحی دیگر نیز به اثبات رسیده است. به نظر می‌رسد در بحث مذکور، مکانیسم‌های دخیل در مغز پیشین واجد نقش مهمی باشند. هسته میخی شکل (Cuneiformis nucleus; CnF) در موقعیت شکمی جانبی ماده خاکستری دورقناتی (Periaqueductal gray; PAG) واقع گردیده و بخشی از مسیر پائین رو تعدیل درد به شمار می‌آید. نورون‌های هسته میخی‌شکل به هسته سجافی بزرگ (Nucleus raphe magnus; NRM) که نقشی کلیدی در تعدیل درد و در بی دردی ناشی از مورفین دارد، عصبی دهی می کنند. مطالعات پیشین همچنین آشکار ساخته‌اند که هسته میخی‌شکل نقش واضحی در درد حاد [۹،۱۰]، همچون PAG [۳،۶] وNRM [۱۷،۱۸] دارد. از طرفی مطالعات پیشین دال بر نقش هسته میخی شکل در دردهای مزمن التهابی همچون آزمون فرمالین بوده و یک بررسی رفتاری بوسیله این گروه نشان داد که تزریق مورفین به درون هسته میخی شکل به صورت معنی‌داری سبب کاهش رفتارهای درد (لیسیدن و تکان دادن پا) در فازهای ۱ و۲ در آزمون فرمالین می‌شود [۱]. مشاهدات بالا حاکی از نقش هسته میخی شکل در فرآیند درد التهابی مزمن ناشی از تزریق فرمالین در پنجه عقبی پای حیوان در جریان آزمون فرمالین می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور روشن نمودن پاسخ نورونی و الگوی فعالیت نورونهای هسته CnF در جریان آزمون فرمالین (فاز اول و دوم) به عنوان مدلی از یک درد شدید مزمن، بر اساس تکنیک ثبت تک واحدی خارج سلولی انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۷۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد NMRI با وزن تقریبی ۳۲۰-۲۳۰ گرم که در یک حیوانخانه با شرایط دمایی ۲۲ ± ۲^{oC} و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته در قفس‌های با جمعیت ۴-۳ سر و دسترسی آزاد به خوراک موش و آب نگهداری می‌شدند، استفاده شد. حیوان قبل از انجام آزمایش های الکتروفیزیولوژی، حداقل به مدت سه روز تحت مراوده رفتاری با آزمایشگر قرار گرفته و تمامی آزمایشات با توجه به راهنمای استفاده و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی منتشر شده توسط انستیتوی ملی سلامت ایالات متحده آمریکا (NIH Publications No. 85-23, revised 1985) انجام گرفته و مورد تائید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی نیز واقع شده و از هر حیوان تنها یکبار استفاده گردید. فرمالدئید ۲/۵٪ از ترکیب ۱ قسمت فرمالین (~36.6% formalin, Fluka) با ۱۳/۶۴ قسمت نرمال سالین تهیه شد. تمامی آزمایش‌ها در یک اتاق خلوت با دمای ۲۵ ± ۱^{oC} انجام پذیرفت.

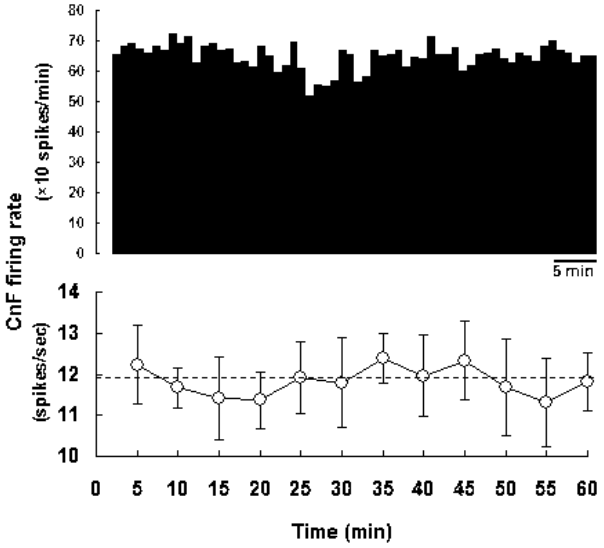
در مطالعه فوق برای بررسی الکتروفیزیولوژیک الگوی فعالیت نورونهای هسته میخی شکل در شرایط پایه و آزمون فرمالین از روش ثبت تک واحدی (Single Unit Recording) استفاده شد. در روز آزمایش حیوان ابتدا توزین و با استفاده از ماده بیهوشی اورتان به میزان ۱/۵g/kg-۱/۲ وزن موش به روش درون صفاقی بی‌هوش گردید. سپس حیوان به دستگاه استریوتاکس منتقل و پس از تمیز کردن سطح جمجمه،



شکل ۱- فتومیکروگراف از یک نمونه مقطع ناحیه ثبت گرفته شده از هسته میخی‌شکل موش صحرایی. در این تصویر، محلی که به روش تخریب الکتریکی نشان‌گذاری شده‌است، ناحیه‌ای است که نوک الکترود در آنجا قرار داشته و فعالیت نورونی ثبت گردیده است. این مقطع بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (۲۰۰۵ میلادی)، در فاصله ۸/۳- میلی متر نسبت به برگما و ۱/۷ میلیمتر در یک سمت خط وسط قرار دارد. **4n**؛ عصب زوج چهارم مغزی، **Aq**؛ قنات سیلویوس، **vlPAG**؛ بخش شکمی جانبی ماده خاکستری دور قناتی، **Pi**؛ غده صنوبری.

مختصات هسته میخی شکل (۸/۵-۷/۵ میلیمتر عقب نسبت به برگما، ۱/۹-۱/۶ میلیمتر در سمت راست و یا چپ خط وسط و ۶/۵-۵/۵ میلی متر عمق نسبت به سطح جمجمه) بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون [۱۹] تعیین گردید. در مرحله بعد، پس از ایجاد سوراخ در سطح جمجمه، میکروالکترود فلزی (قطر تقریبی ۳-۱ میکرومتر، مقاومت ۷-۳ مگا اهم) از جنس تنگستن توسط دستگاه پیش برنده میکروالکترود و به کمک میکروسکوپ تشریح به عمق مورد نظر (۶/۵-۵/۵ میلیمتر) از سطح جمجمه به ناحیه مورد بررسی فرستاده شد. سپس امواج الکتریکی گرفته شده توسط میکروالکترود فلزی و پری آمپلی فایر، به یک آمپلی فایر Bandpass مدل WPI فرستاده شده و سیگنال‌های ثبت شده ۱۰۰۰۰ بار تقویت و فیلتره (۳۰۰HZ-۱۰KHZ) گردید. سپس سیگنالها برای نمایش به اوسیلوسکوپ منتقل شده و صدای آنها نیز پس از فیلتر شدن، قابل شنیدن شد. در مرحله بعد سیگنال‌های ثبتی به دستگاه موج بیز (Window discriminator) مدل WPI منتقل و با قرار دادن یک پنجره برای دامنه امواج ثبتی، پتانسیل‌های مورد مطالعه یک واحد نورونی از دیگر نورونهای در حال ثبت با دامنه‌های متفاوت جدا گردیده و به جمع کننده اطلاعات سیگنالی (Data acquisition) انتقال یافت. سیگنال‌های جمع آوری شده بصورت on-line برای ثبت Peristimulus Time Histogram و off-line برای دسته‌بندی اطلاعات ورودی به نرم افزار کامپیوتری تحت ویندوز فرستاده می‌شد. لذا در این شرایط می‌توان میزان و الگوی فعالیت نورونی پیش و پس از تزریق زیرجلدی فرمالین ۲/۵٪ (آزمون فرمالین) را در فواصل ۵ دقیقه‌ای در فاز اول (۵-۰ دقیقه) و دوم (۶۰-۱۵ دقیقه) بررسی نمود. تغییر فعالیت نورونی به مفهوم افزایش و یا کاهش در فعالیت نورونی بترتیب با توجه به افزایش و یا کاهش رقمی فعالیت نورونی از میانگین فعالیت پایه نورون و دو انحراف معیار (Mean±2SD) در نظر گرفته شد. در پایان هر آزمایش، جهت تأییدیه بافت شناسی، از شدت جریان ثابت (DC) مارکر آمپلی فایر WPI استفاده گردید و پس از پرفیوژن قلبی توسط فرمالین، سر حیوان جدا و مغز در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. پس از سفت شدن نسج مغزی برشهای ۱۰۰-۵۰ میکرونی تهیه و محل ثبت تأئید گردید (شکل ۱).

سه گروه آزمونی به قرار زیر موجود بود؛ ۱) گروه کنترل (n=۲۴) که برای بدست آوردن فعالیت خودبخودی نورون‌های هسته میخی شکل پس از پایداری ثبت نورونی به مدت ۶۰-۴۰ دقیقه مورد آزمایش قرار گرفتند. ۲) گروه سالین (n=۱۵) که پس از ۱۵ دقیقه ثبت فعالیت پایه، سالین (۵۰ میکرولیتر) بجای فرمالین به صورت زیرجلدی در پنجه پای حیوان تزریق شد. این گروه برای بدست آوردن اثر حجم تزریق در ناحیه پنجه پای حیوان و فعالیت خودبخودی نورونهای هسته میخی شکل مورد آزمایش قرار گرفتند. ۳) گروه فرمالین که در این گروه ۳۷ سر موش صحرایی پس از ۱۵ دقیقه ثبت فعالیت پایه، فرمالین ۲/۵٪ (۵۰ میکرولیتر) به صورت زیرجلدی در پنجه پای مقابل ناحیه ثبت، تزریق شد. در این مطالعه در مجموع، ۹۵ نورون هسته میخی شکل ثبت گرفته شده همراه با تائیدیه بافتی، مورد



شکل۲- نمونه‌ای از ثبت فعالیت خودبخودی نورون‌های هسته میخی شکل موش صحرایی بی‌هوش (بالا) و میانگین فعالیت پایه نورونهای این هسته در موش‌های کنترل (۳۴ تا ۵۸ نورون در هر نقطه زمانی از ۲۱ تا ۳۹ سر موش صحرایی). خط ممتد بیانگر میانگین فعالیت پایه است.

تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در گروه سوم بدلیل تزریق فرمالین، جهت ثبت فعالیت نورونی تنها از یک سلول به ازای هر حیوان استفاده گردید در حالی که در گروه کنترل و سالین فعالیت نورونی ۵۸ سلول از ۳۹ سر موش به روش ثبت تک واحدی مورد بررسی قرار گرفتند.

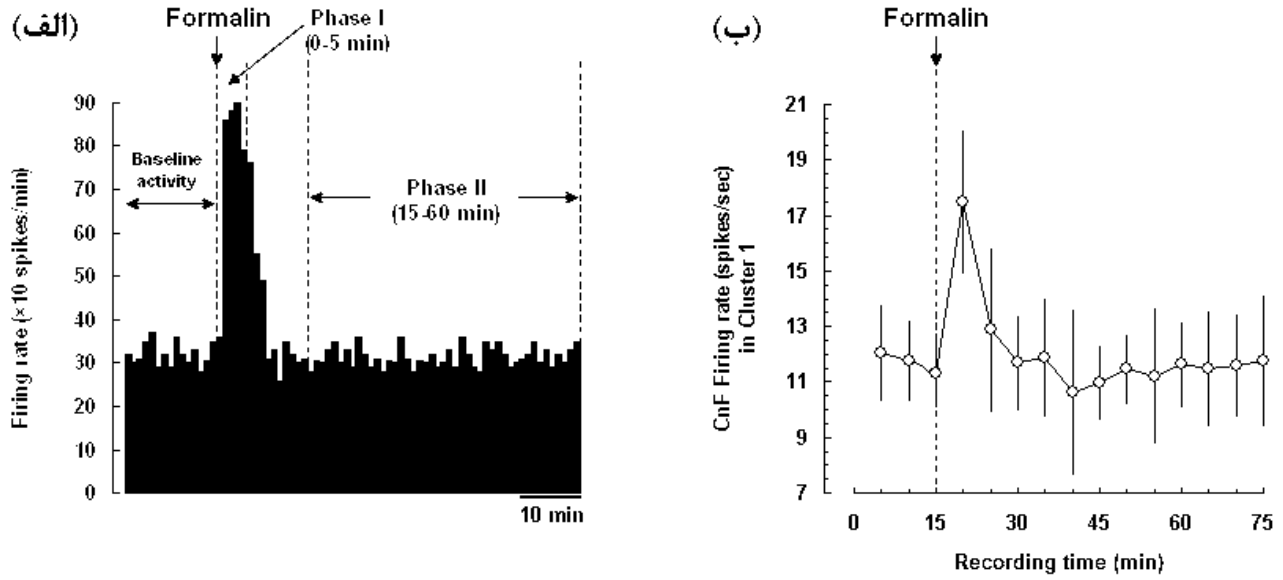
تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار Graph pad Prism® ver. 5.0 انجام گرفت. جهت بررسی اثر تزریق فرمالین و یا سالین بر فعالیت نورونی در زمانهای متفاوت از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه مدل Repeated measures و در صورت معنی‌داری از پس آزمون توکی (Tukey) استفاده گردید. جهت بررسی درون گروهی میانگین فعالیت نورونی، پیش و پس از تزریق فرمالین (فاز اول و دوم) و سالین از آزمون *t* دانشجویی (student *t*-test) استفاده شد. P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مرحله از ۵۸ نورون (۳۹ حیوان که مورد تائید بافت‌شناسی واقع شدند) پس از پایداری فعالیت آنها (۳۰ تا ۴۰ دقیقه) به مدت ۶۰-۴۰ دقیقه ثبت پایه به عمل آمد که بعنوان معیار و مرجع فعالیت طبیعی نورون‌های CnF در طول ۱ ساعت مد نظر قرار گرفت (شکل ۲). گروه سالین به عنوان کنترل ۱) فرآیند و حجم تزریق و ۲) بروز تغییر در فعالیت نورونی در طول زمان ثبت در نظر گرفته شد. این داده‌ها تحت آزمون آنالیز واریانس یکطرفه از نوع repeated measures قرار گرفته و مشخص شد که اختلاف معنی‌داری در میان هیچ یک از نقاط ثبت پایه با فواصل ۵ دقیقه‌ای در طول زمان یک ساعته، وجود ندارد [F(11,573)=0.9646, P=0.48, N.S.]. نرخ فعالیت (Firing rate) پایه در این تحقیق بین ۱/۲۴ تا ۳۹/۲۱ اسپایک در ثانیه در نورونهای هسته میخی شکل متفاوت بود ولیکن میانگین فعالیت خودبخودی نورونهای این هسته در طول یک ساعت ۱/۱ ± ۱۱/۸۲ اسپایک در ثانیه بدست آمد (شکل ۲).

نورون‌ها در این هسته غالباً دارای اسپایکهایی با شکل موج دو فازی بودند که پهنای آن بین ۱/۵ تا ۴ میلی ثانیه و دامنه ۸۰ تا ۶۵۰ میکروولت اندازه‌گیری شد. توزیع درصدی فعالیت خودبخودی (۱۰<۲۰<۳۰<۴۰ اسپایک در ثانیه) نورون‌های هسته میخی شکل به ترتیب ۵۰<۳۴/۴۸<۸/۶۲<۶/۹ درصد محاسبه گردیده و اکثریت نورونها (۷۶٪) فرکانسی کمتر از ۱۳ اسپایک بر ثانیه داشتند.

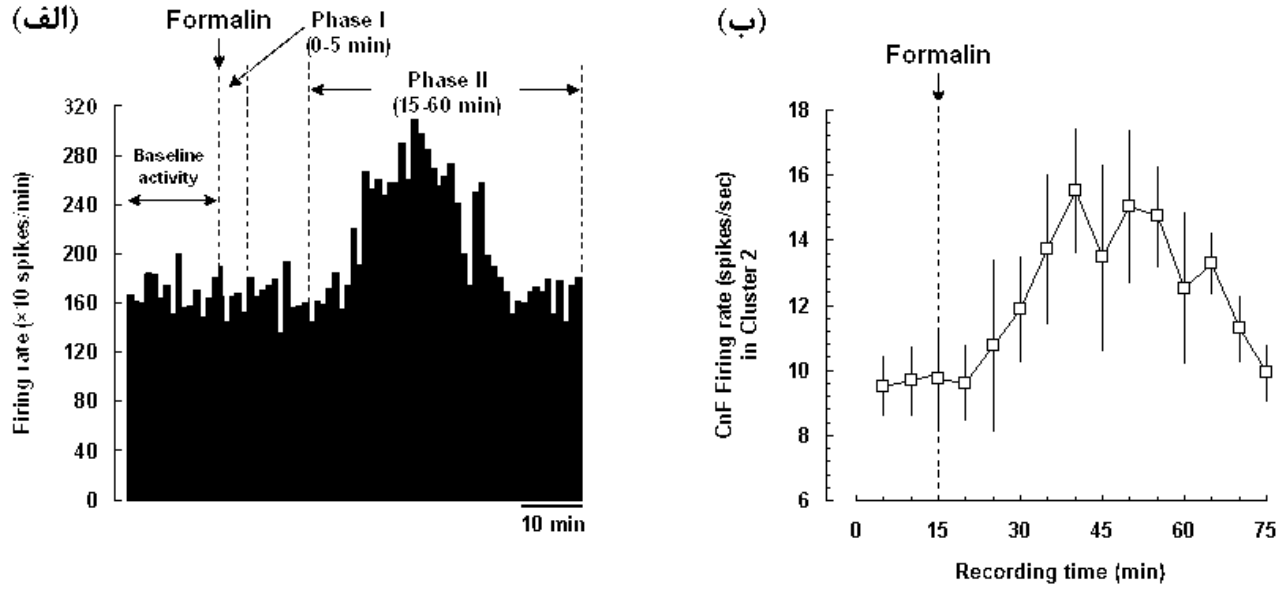
تزریق زیر جلدی فرمالین ۲/۵ درصد در ناحیه پنجه پای عقبی حیوان در اکثریت نورونهای هسته CnF در جریان فازهای ۱ و ۲ آزمون فرمالین (به استثناء بخش کوچکی که هیچ پاسخی نداشتند) یک اثر تک فازی تحریکی بر نرخ فعالیت نورونی در این هسته بر جای گذاشت (شکل ۳ و ۴). در این مرحله اثر فرمالین بر روی ۳۷ نورون در ناحیه هسته میخی شکل از ۳۷ موش صحرایی نژاد NMRI ثبت شد (یک سلول از هر موش). پس از سپری شدن دوره پایداری (۳۰ تا ۴۰ دقیقه) و ثبت فعالیت پایه (۱۵ دقیقه)، فرمالین ۲/۵٪ به میزان ۵۰ میکرولیتر در پنجه پای عقبی مخالف محل ثبت نورونی تزریق شد. برای بررسی روند پاسخدهی نورونها به تزریق فرمالین از آنالیز خوشه‌ای(Cluster analysis) استفاده شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، در حدود ۴۶٪ از نورون‌های این هسته دارای پاسخ تحریکی تک‌فازی بودند که بلافاصله پس از تزریق فرمالین شروع شده و برای ۴ تا ۸ دقیقه پایدار ماند. این وضعیت تقریباً ۱ دقیقه پس از تزریق شروع و پس از گذشت ۲ تا ۴ دقیقه به حداکثر خود رسید. این نورون‌ها بعنوان خوشه اول دسته‌بندی شدند. میانگین درصد پاسخ (تحریک تک‌فازی) در



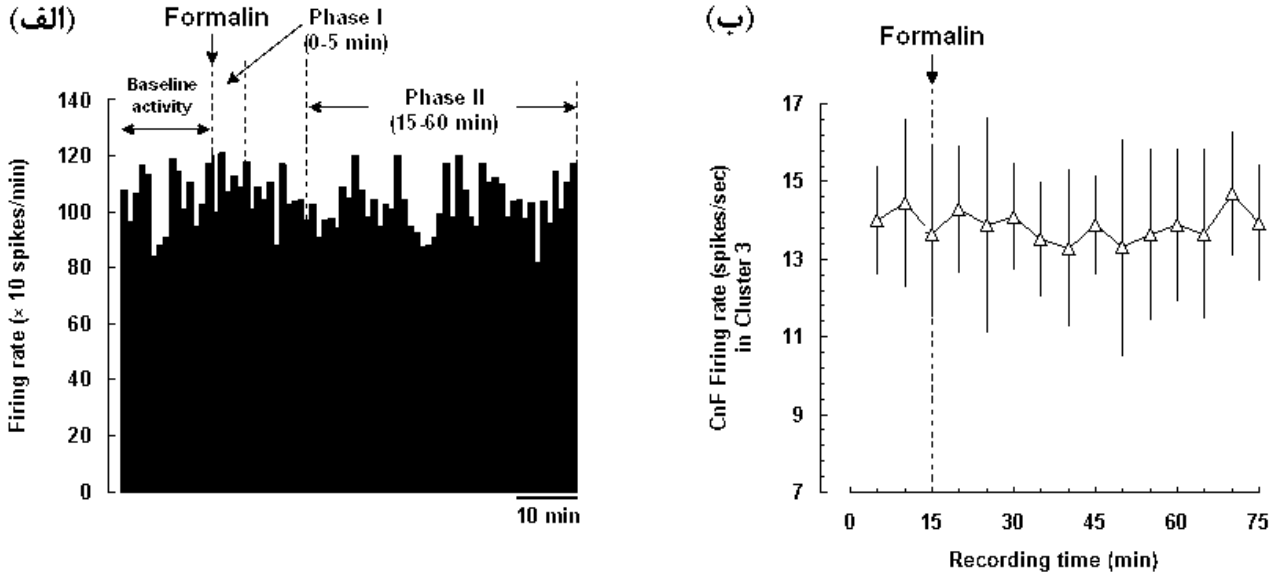
شکل۳- اثر تزریق زیرجلدی فرمالین بر فعالیت نورون‌های خوشه اول هسته میخی‌شکل موش صحرایی. **الف**- یک نمونه الگوی پاسخدهی بـه فرمـالین در نـورون‌هـای خوشه اول در خلال یک ساعت. **ب**- میانگین فعالیت نورون‌های خوشه اول قبل و بعد از تزریق فرمالین (n=۱۷). این پاسخ تحریکی شدید و گذرا در فاز درد حـاد (فـاز اول) برای ۴ تا ۸ دقیقه پایدار بود.

اکثریت نورون‌های (۱۴ از ۱۷ نورون؛ تقریبـاً ۸۰٪) ایـن خوشـه، بیش از ۷۰ درصد (۱۱/۸±۷۲/۴) بـوده در حالیکـه در ۳ نـورون دیگر این تغییرات جزئی بود.

از طرفی ۳۵ درصد از نورون‌ها (خوشه دوم) در آغاز فـاز دوم آزمون فرمالین شروع به افزایش فعالیت نمودند (شـکل ۴). آغـاز فعالیت تحریکی القاء شده در نورون‌های این گروه ۱۳-۶ دقیقـه پس از تزریق فرمالین بود و تا دقـایق ۲۴ تـا ۵۷ آن ادامـه پیـدا کرد. بیشینه این اثر بین دقایق ۳۲ تـا ۴۹ در نـورون‌هـا متفـاوت بود. این در حالی است که آنالیز واریانس یکطرفه نشـان از عـدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین فعالیـت خودبخـودی (پایـه) نورون‌های این هسته، قبل و بعد از تزریق سالین در پنجـه پـای حیـوان دارد [F(2,20)=0.684, P=0.52, N.S.]. در نورونهای خوشه دوم، میانگین درصد پاسخ (تحریک تک‌فـازی)، بیش از صد در درصد (۱۵/۲ ± ۱۰۳/۹) بود.



شکل۴- اثر تزریق زیرجلدی فرمالین بر فعالیت نورون‌های خوشه دوم هسته میخی‌شکل موش صحرایی **الف**- یک نمونه الگوی پاسـخدهی بـه فرمـالین در نـورون‌هـای خوشه دوم در خلال یک ساعت. **ب**- میانگین فعالیت نورون‌های خوشه دوم قبل و بعد از تزریق فرمالین (n=۱۳). این پاسخ تحریکی بسیار قـوی و پایـا در فـاز ۲ (فـاز درد مزمن) برای ۲۴ الی ۴۷ دقیقه پایدار بود.



شکل۵- اثر تزریق زیرجلدی فرمالین بر فعالیت نورون‌های خوشه سوم هسته میخی شکل موش صحرایی. **الف**- یک نمونه الگوی پاسخدهی به فرمالین در نورون‌های خوشه سوم در خلال یک ساعت. **ب**- میانگین فعالیت نورون‌های خوشه سوم قبل و بعد از تزریق فرمالین (n=۷). نورونهای خوشه سوم، هیچ گونه پاسخی به تزریق فرمالین نشان ندادند.

در نورون‌های خوشه سوم که حدود یک پنجم جمعیت نورون‌های ثبت گرفته شده در هسته میخی‌شکل بود، هیچگونه اختلاف معنی‌داری بین فعالیت نورونی پیش و پس از تزریق فرمالین دیده نشد و پاسخدهی نورون‌های فوق به محرک شیمیایی فرمالین، خنثی بود (شکل ۵). نرخ فعالیت نورون‌های این گروه (n=۷) بین ۸/۱۸ تا ۲۱/۷۵ اسپایک در ثانیه متغیر بود و میانگین فعالیت خودبخودی در طول ۱۵ دقیقه، ۳/۲۱ ± ۱۴/۰۴ اسپایک در ثانیه ثبت گردید.

بحث

این مطالعه برای نخستین بار به بررسی پاسخ‌های نورونی در ناحیه هسته میخی شکل در پاسخ به تزریق فرمالین در موش صحرایی نر بی‌هوش با استفاده از روش ثبت تک واحدی خارج سلولی پرداخته است. این مطالعه در کل به دو یافته مهم دست یافت. نخست آنکه، این مطالعه نشان داد که نورون‌های هسته میخی شکل دارای طیف وسیعی از نظر نرخ فعالیت نورونی بوده و میانگین این فعالیت نورونی حدود ۱۳ اسپایک در هر ثانیه است. در بخش دوم آزمایشات، پاسخ تحریکی تک فازی در بخش اعظمی از نورونهای هسته CnF پس از تزریق فرمالین در پنجه عقبی پای حیوانات (آزمون فرمالین) به عنوان مدلی از دردهای التهابی بود. در آزمون فرمالین، در این مدت زمان یک ساعته، سه نوع الگوی پاسخدهی نورونی مشاهده شد. چهل و شش درصد از ثبت های بعمل آمده، بیانگر یک پاسخ تحریکی قوی ولیکن گذرا در فاز ۱ آزمون فرمالین بودند در حالیکه ۳۵٪ از نورون‌های هسته میخی شکل از خود یک پاسخ تحریکی قوی و طولانی مدت در طول فاز ۲ فرمالین تست نشان دادند. علاوه بر آن، یک پنجم از کل نورون‌های ثبت گرفته شده از هسته فوق هیچگونه پاسخی به تزریق فرمالین نشان ندادند.

چنانکه که اشاره شد؛ تزریق زیر جلدی فرمالین در پنجه پای عقبی حیوان، تحریک دوفازی در فیبرهای C و Aδ [۱۶،۲۱] و شاخ پشتی نخاع [۴،۵،۱۱] را در پی دارد که پاسخ‌های رفتاری را به موازات فعالیت های عصبی ایجاد می‌نماید، ولی وضعیت در مغز میانی مانند هسته میخی شکل به گونه دیگری است. چنین پاسخ تک فازی در یک ساعت اول پس از تزریق فرمالین (آزمون فرمالین)، در هسته خلفی شکمی میانی تالاموس نیز دیده شده است [۱۵]. در تحقیق حاضر، حدوداً ۴۶ درصد از نورون‌های میخی‌شکل در فاز ۱ آزمون فرمالین فعالیت تحریکی در پاسخ به تزریق فرمالین نشان دادند که این پاسخ به عنوان اثر مستقیم مواد شیمیایی (فرمالین) بر پایانه‌های آزاد درد محیطی، تلقی گردید. با این وجود در تعدادی از نورون‌های هسته CnF یک پاسخ همراه با تأخیر ۲۰ تا ۳۰ دقیقه‌ای مشاهده شد که

ندرتاً گزارش شده است. یک توضیح برای این پدیده، گسترش میدان دریافتی گروهی از نورون‌ها در محل تزریق در نتیجه حساس شدن مرکزی است. احتمال دیگر مربوط به افزایش پاسخدهی نورون‌های خاموش به ورودی‌های بالارونده درد که هیچ پاسخی به تحریک دردناک در سوژه‌های بکر نداشتند، به سبب حساس شدن مرکزی است. این نتایج، ما را به سوی این نظر هدایت می‌کنند که حساسیت مرکزی ممکن است در سطوح مختلف مغز میانی در طول فاز دوم آزمون فرمالین رخ دهد.

از دیگر سو، گزارشات متعددی گویای این واقعیت هستند که دشارژ نورون‌ها در ناحیه دریافت گیرنده‌های محیطی درد در طول فاز دوم آزمون فرمالین در مقایسه با فاز اول آن به نسبت ۱ به ۳ و حتی تا ۱ به ۵ کاهش می‌یابد [۱۶،۲۱]. این بدین معناست که فعالیت نورونی در فاز دوم در سطوح بالاتر سیستم عصبی در مقایسه با بخشهای محیطی افزایشی بیشتری نشان می‌دهد. این نسبت در نورون‌های WDR در شاخ پشتی نخاع در مقایسه با ناحیه دریافت گیرنده‌های درد بزرگتر (۱ به ۲ و حتی در مواردی ۲ به ۳) بوده و نشاندهنده افزایش حساسیت نورونی به محرک دردناک (فرمالین) است. داده‌های ما نشان داد که میانگین درصد پاسخ تک فازی نورون‌های هسته میخی شکل در طول فاز ۲ (خوشه نورونی دوم؛ حدود ۱۰۰ درصد) به نسبت فاز ۱ (خوشه نورونی اول؛ حدود ۷۲ درصد) بیش از یک بوده و نسبت آن ۳ به ۲ است. اگر فاز ۲ صرفاً در نتیجه تحریک ناشی از تزریق فرمالین می‌بود آنگاه نمی‌بایستی نسبت دامنه تحریک در فاز ۲ از فاز ۱ بیشتر می شد. بنابراین محتمل است که سیگنال‌های دردی در طول فاز ۲ به سبب وجود حساس شدن مرکزی، در جریان انتقال به هسته میخی‌شکل تقویت شده باشند. با این وجود، تحقیق پیش رو نمی‌تواند صراحتاً بگوید که آیا در این پدیده، تحریک ناشی از وجود فرمالین در زیر پوست پنجه پا، در فاز ۲ دخیل می‌باشد یا خیر. بررسی این مطلب به مطالعات بیشتر نیاز دارد.

در نهایت، نتایج مطالعات ما حاکی از آن است که هسته میخی-شکل موش صحرایی نقش مهمی در مسیر انتقال اطلاعات مربوط به درد ناشی از تزریق محیطی فرمالین (آزمون فرمالین) بر عهده دارد. افزون بر این، در هردو فاز ۱ و ۲ آزمون فرمالین پاسخ‌ها در وهله اول متأثر از ورودی های محیطی و سپس در فاز دوم، در نتیجه حساس شدن دستگاه عصبی مرکزی است.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید که بدینوسیله از حمایت های مادی و معنوی آن مرکز سپاسگزاری می‌شود.

منابع

[۱] حق‌پرست عباس، اسماعیلی آرین، مقایسه اثرات تزریق مرفین و لیدوکائین در هسته میخی شکل موش صحرایی بر تعدیل حس درد مزمن و حاد با استفاده از آزمون فرمالین. **مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند** ۱۴ (۱۳۸۶) ۵ تا ۱۱.

[2] Diaz A, Dickenson AH, Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurones produced by subcutaneous formalin inflammation. ***Pain*** 69 (1997) 93-100.

[3] Dickenson AH, Oliveras JL, Besson JM, Role of the nucleus raphe magnus in opiate analgesia as studied by the microinjection technique in the rat. ***Brain Res*** 170 (1979) 95-111.

[4] Dickenson AH, Sullivan AF, Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. ***Neurosci Lett*** 83 (1987) 207-211.

[5] Dickenson AH, Sullivan AF, Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. ***Pain*** 30 (1987) 349-360.

[6] Du HJ, Kitahata LM, Thalhammer JG, Zimmermann M, Inhibition of nociceptive neuronal responses in the cat's spinal dorsal horn by electrical stimulation and morphine microinjection in nucleus raphe magnus. ***Pain*** 19 (1984) 249-257.

[7] Dubuisson D, Dennis SG, The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. ***Pain*** 4 (1977) 161-174.

[8] Gilbert AK, Franklin KB, The role of descending fibers from the rostral ventromedial medulla in opioid analgesia in rats. ***Eur J Pharmacol*** 449 (2002) 75-84.

[9] Haghparast A, Gheitasi IP, Lashgari R, Involvement of

glutamatergic receptors in the nucleus cuneiformis in modulating morphine-induced antinociception in rats. ***Eur J Pain*** 11 (2007) 855-862.

[10] Haghparast A, Soltani-Hekmat A, Khani A, Komaki A, Role of glutamatergic receptors located in the nucleus raphe magnus on antinociceptive effect of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis of rat. ***Neurosci Lett*** 427 (2007) 44-49.

[11] Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH, Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. ***Brain Res*** 518 (1990) 218-226.

[12] Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, Coderre TJ, Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. ***Pain*** 82 (1999) 57-63.

[13] Hunskaar S, Berge OG, Hole K, Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. ***Pain*** 25 (1986) 125-132.

[14] Hunskaar S, Hole K, The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. ***Pain*** 30 (1987) 103-114.

[15] Jung SC, Kim JH, Choi IS, Cho JH, Bae YC, Lee MG, Shin HC,Choi BJ, Corticothalamic modulation on formalin-induced change of VPM thalamic activities. ***Neuroreport*** 15 (2004) 1405-1408.

[16] McCall WD, Tanner KD, Levine JD, Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. ***Neurosci Lett*** 208 (1996) 45-48.

[17] Mohrland JS, Gebhart GF, Effects of focal electrical stimulation and morphine microinjection in the periaqueductal gray of the rat mesencephalon on neuronal activity in the medullary reticular formation. ***Brain Res*** 201 (1980) 23-37.

[18] Morgan MM, Tierney BW, Ingram SL, Intermittent dosing prolongs tolerance to the antinociceptive effect of morphine microinjection into the periaqueductal gray. ***Brain Res*** 1059 (2005) 173-178.

[19] Paxinos G, Watson C, editors. ***The rat brain in streotaxic coordinates***. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

[20] Pitcher GM, Henry JL, Second phase of formalin-induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. ***Eur J Neurosci*** 15 (2002) 1509-1515.

[21] Puig S, Sorkin LS, Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. ***Pain*** 64 (1996) 345-355.

[22] Yashpal K, Katz J, Coderre TJ, Effects of preemptive or postinjury intrathecal local anesthesia on persistent nociceptive responses in rats. Confounding influences of peripheral inflammation and the general anesthetic regimen. ***Anesthesiology*** 84 (1996) 1119-1128.

[23] Yashpal K, Mason P, McKenna JE, Sharma SK, Henry JL, Coderre TJ, Comparison of the effects of treatment with intrathecal lidocaine given before and after formalin on both nociception and Fos expression in the spinal cord dorsal horn. ***Anesthesiology*** 88 (1998) 157-164.