



Role of nitric oxide and Jun N-terminal kinase in the development of dark neurons in the dorsal horn of the spinal cord following induction of inflammatory pain

Parichehr Hassanzadeh¹, Abolhassan Ahmadiani^{2*}

1- Dept. Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine., Kurdistan Univ. Med., Sci., Sanandaj, Iran.

2- Dept. Pharmacology and Neuroscience Research Center, Shaheed Beheshti Univ. Med. Sci., Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Dark neurons which their morphological characteristics are consistent with those of cells undergoing apoptosis, are generated as an acute or delayed consequence of several pathological situations. The present study was designed to evaluate whether inflammatory pain regarding the role of NO and JNK lead to the formation of dark neurons in the dorsal horn of the lumbar spinal cord in rats.

Methods: Acute or chronic inflammatory pain was induced by intraplantar injection of 1%, 2.5% or 5% formalin in male Wistar rats weighing 250-300 g (n=7). Spectrophotometrical analysis of the serum nitrite (metabolite of NO) and histological procedures for detection of dark neurons were performed at definite time intervals. Pretreatment with celecoxib 10, 20 or 40 mg/kg/i.p.; quercetin 40 or 100 µg/rat/i.t. as an inhibitor of JNK pathway, and PTIO 20 or 30 µg/rat/i.t, as NO scavenger, were performed to investigate the role of NO and JNK.

Results: Injection of formalin led to the increase of the serum nitrite in the concentration and time-dependent manners. The effect of 5% formalin was significantly eminent which was blocked by celecoxib 40 mg/kg. Visual inspections of the spinal cord sections showed that on day 5, following chronic injections of 5% formalin, numbers of dark neurons were significantly increased in the lumbar dorsal horn. Acute and chronic administration of other concentrations of formalin did not induce any remarkable dark phenotype. Injections of celecoxib 40 mg/kg, quercetin 100 µg/rat/i.t. or PTIO 30 µg/rat/i.t. before each injection of 5% formalin, led to a reliable reduction of dark neurons.

Conclusion: The results showed that the intensity and duration of the inflammatory pain play a major role in its peripheral and central developed disorders. According to the role of NO and JNK; it seems that administration of their inhibitors, or an appropriate dose of celecoxib may exert a protective effect against the aforementioned consequences.

Keywords: Inflammatory pain, Dark neurons, Celecoxib, PTIO, Quercetin.

* Corresponding Author Email: aahmadiani@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

نقش NO و JNK در ظهور نورونهای تیره در شاخ خلفی نخاع بدنبال القای درد التهابی

پریچهر حسن زاده^۱، ابوالحسن احمدیانی^{۲*}

۱- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۲- گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دریافت: دی ۸۵ بازبینی: اردیبهشت ۸۶ پذیرش: اردیبهشت ۸۶

چکیده

مقدمه: نورونهای تیره که ویژگیهای مرفولوژیک آنها تشابه بارزی با سلولهای آپوتوتیک دارد، بعنوان پیامد شرایط مختلف پاتولوژیک شناخته می‌شوند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر درد التهابی بر ظهور احتمالی نورونهای تیره در نخاع موش صحرایی و نقش NO و JNK در آن طراحی شده است.

روش‌ها: درد التهابی حاد و مزمن با تزریق غلظتهای ۱٪، ۵٪ و ۵٪ فرمالین در موش‌های صحرایی نر از نژاد Wistar (۲۵۰-۳۰۰ گرم) القاء گردید (n=7). سپس آنالیز اسپکتروفتومتریک نیتريت سرمی (متابولیت NO) و ارزیابی‌های هیستولوژیک جهت ردیابی نورونهای تیره در فواصل زمانی مشخص انجام شد. پیش‌درمانی با سلوکسیب ۴۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (i.p./مهارکننده مسیر JNK) ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم (i.t./rat) و PTIO (NO scavenger) ۳۰ و ۲۰ میکروگرم (i.t./rat)؛ به ترتیب بمنظور اثبات نقش درد التهابی در بروز پیامدهای احتمالی محیطی و مرکزی و همچنین نقش NO و JNK در این ارتباط انجام شد.

یافته‌ها: تجویز فرمالین منجر به افزایش میزان نیتريت سرمی بطور وابسته به زمان و غلظت گردید که نقش فرمالین ۵٪ به مراتب بیش از سایر غلظتها بود. اثر مذکور بواسطه پیش‌درمانی با سلوکسیب ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم مهار گردید. روز پنجم؛ بدنبال تزریق روزانه غلظتهای مختلف فرمالین ۵٪، تعداد نورونهای تیره در تیغه‌های سطحی بطور چشمگیری افزایش یافته بود. تجویز حاد و مزمن سایر غلظتهای فرمالین تأثیری بر مرفولوژی نورونهای شاخ خلفی نداشت. پیش‌درمانی با سلوکسیب ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم؛ PTIO ۳۰ میکروگرم/rat؛ و کوئرستین ۱۰۰ میکروگرم/rat منجر به کاهش معنی‌دار ظهور نورونهای تیره گردید.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌ها، شدت و مدت زمان درد التهابی در بروز پیامدهای محیطی و مرکزی آن نقش بسزایی دارند. با عنایت به نقش NO و JNK؛ به نظر می‌رسد که استفاده از مهارکننده آنها و همچنین تجویز دوز مناسب سلوکسیب مانع از ایجاد و یا پیشرفت عوارض ناشی از درد التهابی گردد.

واژه‌های کلیدی: درد التهابی، نورونهای تیره، سلوکسیب، NO، JNK.

مقدمه

که مسئول آسیب‌رسانی و مرگ نورون می‌باشند، عرضه نموده‌اند. طی مطالعات هیستولوژیک سیستم عصبی مرکزی، مشخص شده است که نورودژنراسیون می‌تواند منجر به تغییرات مرفولوژیک اکسایتوتوکسیک (excitotoxic) در نورونها گردد. معمولاً نورونهای مذکور بواسطه تمایل شدید آنها نسبت به رنگهای مختلف بافتی

در سالهای اخیر، مطالعات انجام شده در تمامی زمینه‌های نورویولوژیک اطلاعات مهمی را در مورد روندهای نورودژنراتیو

aaahmadiani@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

فاکتورهای نسخه برداری مانند c-Jun در شاخ خلفی نخاع القاء می‌شوند [۲۷]. البته لازم به ذکر است که فعال شدن c-Jun کاملاً وابسته به فسفریله شدن آن توسط c-Jun N-terminal Kinase (JNK) می‌باشد که بعنوان آغازگر آپوپتوز شناخته شده است [۱۳]. در واقع، مجموعه c-Jun/JNK بعنوان جزء اساسی روند مرگ سلول در نظر گرفته می‌شود [۱۴].

با عنایت به نکات فوق و نقش NO و مسیر JNK در پردازش پیامهای درد و دژنراسیون نورونی، اثر آنها نیز در بروز پیامدهای احتمالی ناشی از القای درد التهابی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

در تحقیق حاضر از موشهای صحرایی نر از نژاد Wistar و در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شده است. حیوانات ضمن دسترسی به غذای مخصوص و آب آشامیدنی، در سیکل تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شده و قواعد مربوط به استانداردهای اخلاقی مصوب IASP مد نظر قرار گرفت [۲۸].

درد التهابی بواسطه تجویز حاد و مزمن غلظتهای مختلف فرمالین القاء گردید. در تجویز حاد، سه گروه حیوان در نظر گرفته شده و بترتیب ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۱٪، ۲/۵٪، و ۵٪ بطور یکطرفه در کف پای راست یا چپ حیوان تزریق گردید (n=۷). در تجویز مزمن فرمالین بمدت ۴ روز، سه گروه دیگر از حیوانات انتخاب شده و در روز اول غلظتهای مختلف فرمالین بطور دو طرفه در کف پا تزریق شده و در روز دوم؛ تزریقات دو طرفه در سطوح پشتی پا انجام شد. روند تزریق در روزهای سوم و چهارم نیز بترتیب فوق‌الذکر بود (n=۷). در گروه‌های کنترل دریافت کننده سالیان نیز روند مشابهی طی شد.

از آنجائیکه هدف از تحقیق حاضر ارزیابی تغییرات احتمالی بیوشیمیایی و مورفولوژیک القاء شده توسط درد التهابی بود، لذا بررسی رفتارهای ناشی از تجویز فرمالین که قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱]، مد نظر قرار نگرفت.

از آنجائیکه نیمه عمر NO در سیستم‌های بیولوژیک فوق‌العاده کوتاه است، لذا در این مطالعه تعیین غلظت نیتريت (متابولیت NO) در سرم حیوان بعنوان معیاری جهت ارزیابی میزان

که مسئول ظاهر تیره رنگ آنها می‌باشد، شناخته شده و به همین علت نورونهای تیره (Dark neurons) نامیده می‌شوند [۵،۹،۱۰]. نورونهای تیره بعنوان نمودی از آسیبهای شدید نورونی در نظر گرفته می‌شوند و در واقع پیامد زودرس و یا دیررس شرایط و ضایعات پاتولوژیک می‌باشند [۹،۱۰،۶،۲۱].

طبق گزارش Ishida و همکارانش، نورونهای تیره تنها چند ساعت پس از تمرینهای استرس‌زا در مغز موش صحرایی ظاهر می‌شوند [۱۵]. محققین بر این باورند که تغییرات مورفولوژیک نورونهای تیره که مشابه سلولهای آپوپتوتیک می‌باشد، غالباً برگشت ناپذیر بوده و نورونهای مذکور فاقد انسجام عملکردی می‌باشند [۳،۲۳]. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه با میکروسکپ الکترونی مشخص گردید که نورونهای مذکور دژنراتیو بوده و با تغییرات ریزساختاری داخل سلولی و سیناپس آتیپیک همراه می‌باشند [۱۲].

بر اساس نتایج مطالعه Bennett و همکاران، نورونهای تیره بدنبال جراحی عصب محیطی و هایپرالژیای ناشی از تجویز مزمن اویپوئیدها در لایه‌های سطحی شاخ خلفی نخاع (تیغه‌های I و II) ایجاد می‌شوند [۳].

با توجه به مستندات، تزریق زیر جلدی فرمالین بعنوان مدل درد التهابی، هایپر آلژیای طولانی مدتی را در مناطق وسیعی از بدن جاندار القاء نموده و اعصاب محیطی را فعال می‌کند که منجر به فعال شدن نورونهای نخاع نیز می‌گردد [۴،۷]. با عنایت به نکات ذکر شده، هدف از طراحی مطالعه حاضر تعیین حداقل شدت و مدت درد التهابی بوده است که بتواند منجر به تشکیل نورونهای تیره در شاخ خلفی بخش کمری نخاع موش صحرایی گردد. اهمیت بخش مذکور در نخاع در هدایت و کنترل درد بخوبی مشخص شده است.

از طرف دیگر، طی سالیان متمادی نقش نیتريك اکساید (NO) بعنوان مولکول نشانه پردازی که قابلیت برانگیختن پاسخهای بیولوژیک متنوعی را دارد، شناخته شده است. این مولکول در نورونهای نخاعی نیز تولید شده و نقش مهمی را در پردازش پیامهای درد ایفاء می‌کند [۲]. التهاب ناشی از فرمالین نیز منجر به افزایش نیتريك اکساید سنتاز (NOS) در نورونهای شاخ خلفی نخاع می‌شود [۲۲]. همچنین مشخص شده است که محرکهای دردزا از جمله تجویز فرمالین، باعث افزایش بیان

سیتوپلاسم؛ که به همین دلیل تحت عنوان نورونهای تیره نامیده شده اند، ۳- رنگ پذیری شدید و یکنواخت نوکلئوپلاسم با هتروکروماتین غیرقابل تشخیص [۳].

البته لازم به ذکر است که برخی اوقات افزایش رنگ پذیری در سیتوپلاسم نورونهای سالم شاخ خلفی نخاع نیز دیده می شود که شاید به اشتباه بعنوان نورونهای تیره در نظر گرفته شوند؛ لیکن بایستی توجه نمود که در نورونهای مذکور افزایش رنگ پذیری در نوکلئوپلاسم رخ نمی دهد. در واقع، نکته یاد شده وجه تمایز نورونهای مذکور با نورونهای تیره می باشد. در ضمن همانگونه که ذکر شد، افزایش رنگ پذیری در نوکلئوپلاسم و سیتوپلاسم نورونهای تیره بطور یکنواخت رخ می دهد و هتروکروماتین قابل تشخیص نیست، در صورتیکه در نورون سالم هتروکروماتین گرانولار قابل رویت می باشد. در برخی از سلولهای گلیال به ویژه در الیگودندروسیتها نیز احتمال افزایش رنگ پذیری وجود دارد؛ هر چند که اولیگودندروسیتها از نورونهای تیره قابل افتراق می باشند. اصولاً سلولهای گلیال دارای هتروکروماتین تجمع یافته می باشند که با میکروسکپ نوری بصورت یک توده متراکم قابل رویت است، درحالیکه این ویژگی در نورونهای تیره دیده نمی شود.

در صورت افزایش غلظت نیتريت بدنبال القای درد التهابی، تجویز داخل صفاقی دوزهای ۱۰، ۲۰، و ۴۰ میلی گرم سلکو کسپ (Searl)؛ ۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین انجام می شد. در ضمن، پیش درمانی با دوزهای مذکور در صورت ظهور نورونهای تیره نیز مد نظر قرار گرفت. گروههای کنترل نیز دریافت کننده حامل، شامل ۲۰٪ DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma) و سالین بودند. تجویز PTIO با دوزهای ۲۰ و ۳۰ میکروگرم/ i.t. / rat بعنوان NO scavenger (2-phenyl-1,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxide, Sigma) و کوئرستین (Sigma) ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم/ rat/i.t. بعنوان مهار کننده مسیر JNK، ده دقیقه قبل از تزریق فرمالین بمنظور ارزیابی اثر آنها در پیشگیری احتمالی از ظهور نورونهای تیره انجام می شد. جهت تجویز دارو بصورت i.t.، داروها در ۱۰٪ DMSO و سالین ۹۰٪ حل شده و سپس دارو با حجم کلی ۱۰ میکرولیتر به کمک ۱۰ میکرولیتر سالین وارد کاتتر می شد. جهت کار گذاشتن کاتتر،

تولید و فعالیت NO محیطی پس از القای درد التهابی در نظر گرفته شده است. ۱/۵ و ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد غلظت های مختلف فرمالین و ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق در تجویز مزمن (ساعت ۱۲۰)، سر حیوان توسط گیوتین قطع شده و میزان نیتريت پس از خونگیری طبق رفرانس تعیین گردید [۱۱]. بطور خلاصه، ۵۰۰ میکرولیتر از سرم حیوان پس از طی مراحل همراه با حجم مشخصی از سولفوسالیسیلیک اسید و بافر (5% NH₄Cl, 5% NaOH با واکنشگر Griess؛ N-1% sulfanilamide, 1-naphtyl ethylene amide) مخلوط شده و پس از آنالیز اسپکتروفتومتریک نیتريت سرم در طول موج ۵۴۰ نانومتر، غلظت آن با استفاده از منحنی کالیبراسیون تعیین گردید.

به منظور ارزیابی اثر درد التهابی بر ظهور احتمالی نورونهای تیره در شاخ خلفی بخش کمری نخاع، بررسی های هیستولوژیک مقاطع نخاع [۳، ۲۳] در زمانهایی مشابه با آنچه که در مورد سنجش نیتريت ذکر گردید، انجام شد. بطور خلاصه، حیوانات پس از بیهوشی با پنتوباریتال سدیم تحت پرفیوژن قلبی با فسفات بافر سالین و تثبیت کننده شامل گلوتارالدئید ۱٪، فرمالدئید ۱٪، و کلرید کلسیم ۰/۲ میکرومولار در بافر فسفات ۰/۱۲ مولار (PH≈7.3) قرار گرفته و پس از خارج نمودن بخش کمری نخاع، نمونه مذکور حداقل بمدت ۱۲ ساعت در تثبیت کننده نگهداری می شد. در هر حیوان دو بلوک در سطوح L4-L5 (هر کدام حدود ۱-۱/۵ میلی متر) انتخاب شده و در محلول ۲٪ OsO₄ همراه با فسفات بافر بمدت ۲ ساعت قرار داده شد. پس از دهیدراتاسیون نمونه در غلظتهای افزایشنده اتانل، روند انفیلتراسیون در اپوکسی رزین انجام شد. در هر بلوک ۱۰ برش به ضخامت ۰/۵ میکرومتر و در فواصل ۵۰ میکرومتری زده شد و پس از انتقال نمونه روی لام، رنگ آمیزی با تولوئیدین بلو ۱٪ و سدیم بورات ۱٪ در دمای حدود ۶۵ °C بمدت دو دقیقه انجام شد. برای هر حیوان ۶ برش بطور تصادفی جهت مشاهده با میکروسکپ نوری انتخاب گردید و هر یک از مقاطع بر اساس سیستم لامینار Rexed به سه ناحیه شامل تیغه های I-II، III-IV و V-VI تقسیم شدند. در صورت تشکیل نورونهای تیره و تائید آنها، شمارش نورونهای مذکور در هر دو طرف چپ و راست هر ناحیه توسط فرد بی اطلاع از نحوه گروه بندی، انجام می شد. طبق نظر Bennett و همکارانش، نورونهای تیره دارای سه ویژگی اساسی می باشند: ۱- دیواره سلولی نامنظم، ۲- افزایش رنگ پذیری در سراسر نوکلئوپلاسم و

یافته‌ها

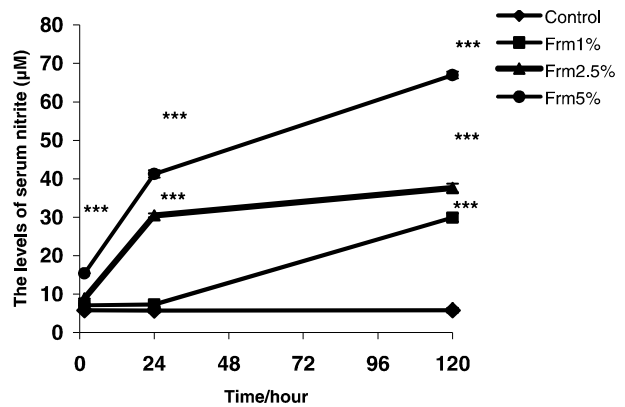
۱/۵ و ۲۴ ساعت پس از تزریق منفرد فرمالین ۱٪ افزایش قابل توجهی در میزان نیتريت سرمی مشاهده نشد، هر چند که ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق در تجویز مزمن، غلظت نیتريت در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری یافت (شکل ۱)، $(P < 0.001)$. ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد و مزمن فرمالین ۲/۵٪، میزان نیتريت افزایش چشمگیری یافت (شکل ۱)، $(P < 0.001)$ ، در حالیکه ۱/۵ ساعت پس از تزریق حاد اثری مشاهده نگردید (شکل ۱)، $(P > 0.05)$. سنجش غلظت نیتريت بدنبال تجویز حاد و مزمن فرمالین ۵٪ در کلیه فواصل زمانی مذکور حاکی از افزایش قابل توجه غلظت نیتريت در مقایسه با گروه کنترل و سایر غلظت‌های فرمالین بود (شکل ۱)، $(P < 0.001)$.

۳۰ دقیقه قبل از تجویز غلظتهای مختلف فرمالین، تجویز داخل صفاقی سلوکسیب با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم تغییر قابل توجهی در میزان نیتريت حاصل از القای درد التهابی ایجاد نکرد (شکل‌های ۲ و ۳، $P > 0.05$).

پیش درمانی با سلوکسیب ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم علیرغم عدم تاثیر آن بر غلظت نیتريت ناشی از فرمالین ۵٪ که پس از گذشت ۱/۵ ساعت از تزریق حاصل شده بود، در تمامی موارد دیگر باعث کاهش چشمگیر میزان نیتريت حاصل از تجویز غلظتهای مختلف فرمالین گردید (شکل ۴، $P < 0.001$).

مشاهده میکروسکوپی نمونه‌های نخاع کمري حاکی از افزایش ظهور نورونهای تیره در تیغه‌های I-II (شکل‌های ۶ و ۷) بدنبال تزریقات مکرر فرمالین ۵٪ بود (شکل ۵، $P < 0.001$). در ضمن، بین تعداد این نورونها در سمت راست و چپ شاخ خلفی اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ($P > 0.05$). تعداد نورونهای تیره در تیغه‌های عمقی تر بر مراتب کمتر از تعداد این نورونها در تیغه‌های سطحی بود ($1/19 \pm 0/27$ در تیغه‌های III-IV؛ و $0/33 \pm 0/14$ در تیغه‌های V-VI). تزریق منفرد فرمالین ۵٪ و تجویز حاد و مزمن غلظتهای ۱٪ و ۲/۵٪ این ماده منجر به بروز تغییر قابل ملاحظه‌ای در مورفولوژی نورونهای شاخ خلفی نخاع نشد (شکل ۵، $P > 0.05$).

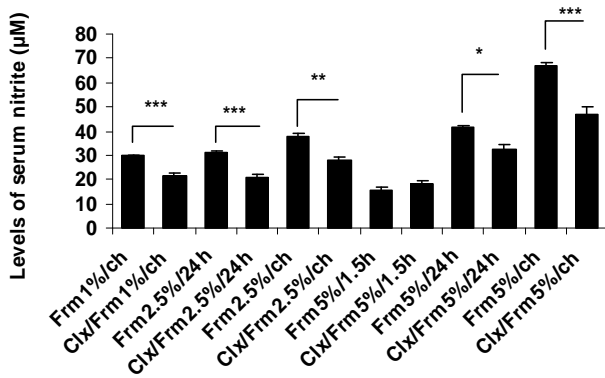
۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین ۵٪، تجویز داخل صفاقی سلوکسیب ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در ظهور نورونهای تیره گردید (شکل ۸، $P < 0.05$).



شکل ۱- اثر درد التهابی بر میزان نیتريت سرم. ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق در تجویز مزمن فرمالین ۱٪، غلظت نیتريت در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری یافت (ساعت ۱۲۰، $P < 0.001$). ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد و مزمن فرمالین ۲/۵٪ (ساعات ۲۴ و ۱۲۰) غلظت نیتريت افزایش چشمگیری یافت ($P < 0.001$)، در حالیکه ۱/۵ ساعت پس از تزریق حاد، تفاوت معنی داری با گروه کنترل مشاهده نگردید. سنجش غلظت نیتريت بدنبال تجویز حاد و مزمن فرمالین ۵٪ در کلیه فواصل زمانی مذکور حاکی از افزایش قابل توجه غلظت نیتريت در مقایسه با گروه کنترل و سایر غلظت‌های فرمالین بود ($P < 0.001$). داده‌ها بصورت میانگین \pm SEM بیان شده‌اند. $P < 0.001$ ***.

حیوان توسط کتامین ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم داخل صفاقی بیهوش شده و پس از ثابت نمودن سر حیوان در دستگاه استرئوتاکس، کاتتر پلی اتیلن-۱۰ از طریق ایجاد شکافی در غشای اطلسی پس سری در فضای زیر عنکبوتیه قرار داده شد و سپس بخش انتهایی کاتتر به آرامی وارد ناحیه کمري می‌شد. بخش ابتدایی کاتتر نیز توسط سیم استیل در بالای جمجمه حیوان تثبیت شده و شکاف ایجاد شده توسط نخ بخیه ۰-۳ بسته شد. جهت پیشگیری از بروز عفونتهای احتمالی، پنی سیلین ۳۰۰۰۰ واحد به حیوانات تزریق گردید. حیوانات پس از جراحی بمدت یک هفته تحت ریکاوری قرار داده شده و مشاهده هر گونه نقص حرکتی منجر به حذف حیوان مربوطه از مطالعه گردید.

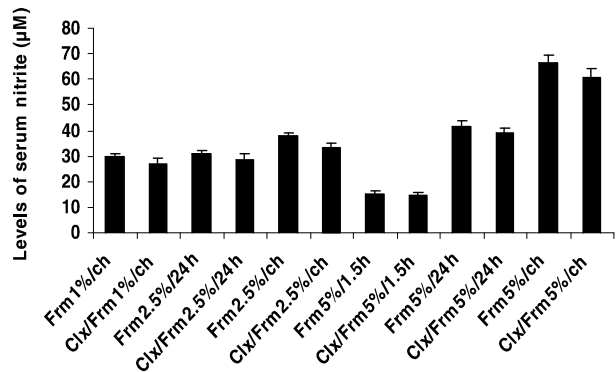
با استفاده از نرم افزار SAS، آزمون آماری ANOVA دو طرفه همراه با تست Tukey جهت آنالیز میزان نیتريت سرم و تعیین تفاوت در تعداد نورونهای تیره بین: تیغه‌های شاخ خلفی نخاع، سمت چپ و راست هر تیغه، و گروه‌های تحت درمان مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها بصورت میانگین \pm SEM ارائه شده و $P < 0.05$ بعنوان حداقل سطح معنی دار در نظر گرفته شد.



شکل ۴- اثر پیش درمانی با سلوکسیب ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم بر میزان نیتريت سرمی ناشی از القای درد التهابی: پیش درمانی با سلوکسیب ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم داخل صفاقی به جز عدم تاثیر آن بر میزان نیتريت پس از گذشت ۱/۵ ساعت از تزریق فرمالین ۵٪ ($P>0.05$)، منجر به کاهش معنی دار میزان نیتريت حاصل از تجویز غلظت های مختلف فرمالین گردید. داده ها بصورت میانگین \pm SEM بیان شده اند. $P<0.001$ ***, $P<0.01$ ** , $P<0.05$ *

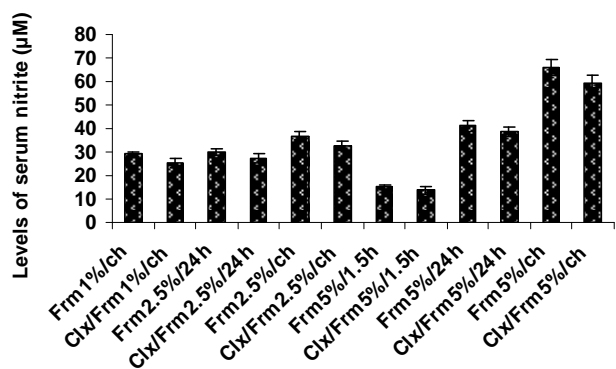
بحث

جراحی بافتی یا حضور ماده خارجی در بدن منجر به آغاز وقایع پیچیده پاتوفیزیولوژیک می شود که می تواند بصورت درد التهابی نمود یابد. در مطالعه حاضر، سه غلظت از فرمالین به منظور ارزیابی نسبی پیامد شدت های متفاوت درد مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج، تزریق فرمالین بطور وابسته به غلظت و زمان باعث افزایش میزان نیتريت سرم شد (شکل ۱). این یافته تائیدی است بر نتایج مطالعات قبلی که مبین افزایش تولید NO بدنال القای محرک دردزا بوده اند [۱۶،۲۲]. علاوه بر این، نیتريك اکساید سنتاز (NOS) آنزیم فعالی در ضایعات التهابی می باشد [۱۷]. بالا بودن میزان نیتريت سرمی علیرغم گذشت ۲۴ ساعت از آخرین تزریق فرمالین، می تواند حاکی از این نکته باشد که درد التهابی تا مدت ها پس از اعمال تحریک اولیه تداوم دارد. مورد اخیر منعکس کننده یک روند پاتولوژیک همراه با تغییرات دینامیک و پیشرونده می باشد. پیش درمانی با سلوکسیب ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم بعنوان داروی ضد درد و ضد التهاب سبب کاهش چشمگیر میزان نیتريت سرم ناشی از القای درد التهابی شد (شکل ۴). به نظر می رسد که سلوکسیب با دوز مذکور از طریق مهار پاسخ التهابی و روندهای اکسایتوتوکسیک و همچنین بواسطه تداخل احتمالی با عملکرد iNOS و /یا سایر مسیرهای محیطی مانع از افزایش تولید محیطی NO می شود. البته لازم به ذکر است که بر اساس مطالعه

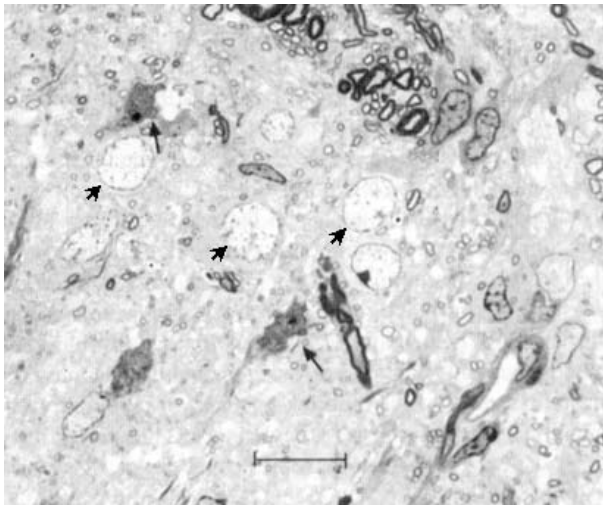


شکل ۲- اثر پیش درمانی با سلوکسیب ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم بر میزان نیتريت سرمی ناشی از القای درد التهابی: سی دقیقه قبل از تزریق فرمالین، با تجویز داخل صفاقی سلوکسیب ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم تغییر قابل توجهی در میزان نیتريت حاصل از القای درد التهابی ایجاد نشد ($P>0.05$). داده ها بصورت میانگین \pm SEM بیان شده اند.

پیش درمانی با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم سلوکسیب اثر قابل ملاحظه ای را در پی نداشت ($P>0.05$). ده دقیقه قبل از تزریق فرمالین ۵٪، تزریق PTIO ۳۰ میکروگرم/کیلوگرم i.t./rat منجر به کاهش قابل توجه ظهور نورونهای تیره گردید (شکل ۸، $P<0.05$). دوز ۲۰ میکروگرم این دارو تاثیر قابل توجهی بر تعداد نورونهای مذکور نداشت (شکل ۸، $P>0.05$). پیش درمانی با کوئرستین ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم i.t./rat نیز سبب کاهش معنی دار ظهور نورونهای تیره گردید (شکل ۸، $P<0.01$). با تجویز دوز ۴۰ میکروگرم/کیلوگرم این دارو تغییر قابل ملاحظه ای در تعداد نورونهای مذکور مشاهده نشد (شکل ۸، $P>0.05$).

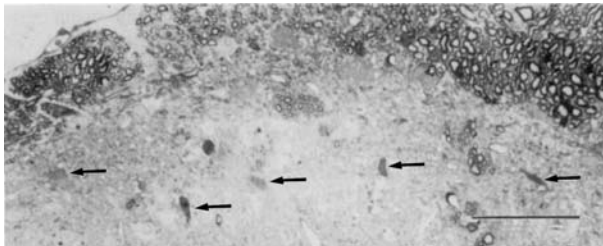


شکل ۳- اثر پیش درمانی با سلوکسیب ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم بر غلظت نیتريت سرمی ناشی از القای درد التهابی: تجویز سلوکسیب با دوز ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم اثر قابل توجهی را در میزان نیتريت حاصل از القای درد التهابی سبب نگردید ($P>0.05$). داده ها بصورت میانگین \pm SEM بیان شده اند.

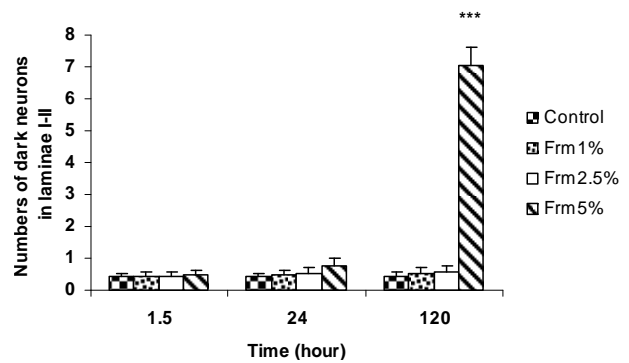


شکل ۶- فتومیکروگراف نورونهای تیره بدنبال القای درد التهابی: تجویز مزمن فرمالین ۵٪ منجر به ظهور قابل توجه نورونهای تیره در تیغه های سطحی شاخ خلفی نخاع شد (بیکان). افزایش رنگ پذیری در سراسر سیتوپلاسم و نوکلئوپلاسم، و دیواره سلولی نامنظم جزو مشخصه های بارز نورونهای مذکور بوده و وجه تمایز آنها با نورونهای طبیعی (نوکلئوپلاسم) می باشد. (scale bar=25µm).

تیره بدنبال القای درد التهابی ذکر شد، بیشترین تراکم نورونهای تیره در تیغه های سطحی شاخ خلفی مشاهده گردید. توزیع توپوگرافیک مزبور نشاندهنده این است که نورونهای تیغه های II I- نخاع کمتری را بایستی بعنوان هدف اصلی اکسایتوتوکسیسیته حاصل از تجویز فرمالین در نظر گرفت. در همین ارتباط به نظر می رسد که اختلال عملکرد نورونهای تیغه های I-II نقش مهمی را در مکانیسم های نخاعی درد التهابی ایفاء کنند. از آنجائیکه به نظر می رسد نورونهای تیره اینترنورونهای مهاری باشند [۳]، لذا افزایش ظهور آنها بدنبال القای درد التهابی می تواند منعکس کننده کاهش اثرات مهاری و در نتیجه ایجاد عدم تعادل پایدار در مدار تحریکی- مهاری موجود در شاخ خلفی نخاع باشد. همانگونه که قبلاً گزارش شده است، آپوپتوز نیز سبب ایجاد آسیب در سیستم های مهاری



شکل ۷- فتومیکروگراف نورونهای تیره: تصویر دیگری از پراکندگی نورونهای تیره در تیغه های سطحی شاخ خلفی بدنبال تجویز مزمن فرمالین ۵٪. (scale bar=50µm)



شکل ۵- اثر تجویز حاد و مزمن غلظت های مختلف فرمالین بر ظهور نورونهای تیره. ۲۴ ساعت پس از آخرین تجویز مزمن فرمالین ۵٪ (ساعت ۱۲۰، Frm5%) افزایش قابل توجه تعداد نورونهای تیره در تیغه های I-II مشاهده گردید ($P < 0.001$). ۱/۵ ساعت و ۲۴ ساعت پس از تزریق منفرد فرمالین ۵٪، همچنین ۱/۵ ساعت و ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد و مزمن غلظت های ۱٪ و ۲/۵٪ فرمالین تغییر قابل ملاحظه ای در مورفولوژی نورونهای شاخ خلفی نخاع مشاهده نگردید ($P > 0.05$). داده ها بصورت میانگین \pm SEM بیان شده اند. $P < 0.001$ ***

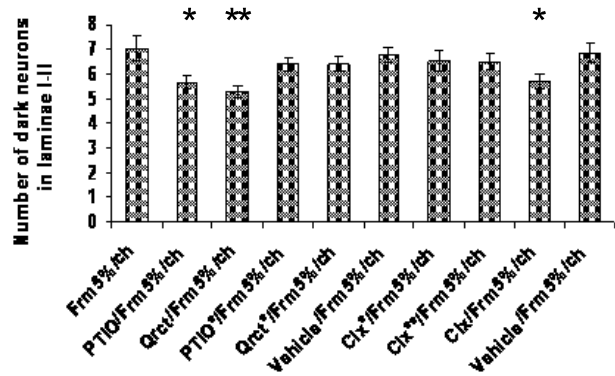
Miyataka و همکاران، سلوکسیب فاقد تاثیر قابل توجهی بر میزان بیان iNOS می باشد [۱۸]. لذا انجام مطالعات تکمیلی در این راستا ضروری به نظر می رسد. همچنین با عنایت به شکل ۴ مشخص می گردد که پیش درمانی با سلوکسیب ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم تاثیر قابل توجهی بر غلظت نیتريت پس از گذشت ۱/۵ ساعت از تزریق فرمالین ۵٪ نداشت. نکته آخر در خور تامل بوده و لازم است تا اثر سلوکسیب به تنهایی بر میزان نیتريت سرمی در فواصل زمانی یاد شده مورد ارزیابی قرار گیرد.

تجویز مزمن فرمالین ۵٪ منجر به افزایش ظهور نورونهای تیره در تیغه های I-II شاخ خلفی نخاع گردید ($P < 0.001$). به نظر می رسد تزریق مکرر فرمالین ۵٪ که تحریک درذای شدیدتری را ایجاد می کند [۲۴]، در القای آسیب اکسایتوتوکسیک نورونها نقش داشته باشد. از طرف دیگر، انتشار این نورونها در هر دو سمت راست و چپ شاخ خلفی نخاع از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$). این یافته حاکی از بروز تغییراتی در ساختار و عملکرد نورونها در هر دو طرف نخاع بدنبال تجویز دوطرفه و مزمن فرمالین ۵٪ می باشد. تزریق منفرد فرمالین ۵٪ و همچنین تجویز حاد و مزمن فرمالین ۱٪ و ۲/۵٪ ظهور قابل توجه نورونهای تیره را در پی نداشت. بنابراین بروز تغییرات هیستوپاتولوژیک مذکور کاملاً وابسته به الگوی تحریک می باشد. البته نقش سایر مکانیسم های داخل سلولی را نیز نباید از نظر دور داشت. همانگونه که در مورد نحوه توزیع نورونهای

L- و [NO-activated poly (ADP ribose) synthase] NAME (مهار کننده NOS) سبب محافظت نورونها در برابر سمیت عصبی ناشی از NO شده‌اند [۱۶، ۲۹].
پیش درمانی با کوئرستین نیز بطور وابسته به دوز مانع از ظهور نورونهای تیره شد (شکل ۸، $P < 0.01$). این یافته نشانگر نقش اساسی JNK در مسیر نشانه پردازی مرتبط با آسیب نورونی ناشی از درد التهابی می‌باشد. در مطالعه دیگری تجویز کوئرستین سبب کاهش بروز آپوپتوز در سلولهای اپی تلیال توبولهای کلیه شده است [۲۶].

با عنایت به نقش بارز NO و JNK در تشکیل نورونهای تیره، بار دیگر می‌توان تشابه دو پدیده نورونهای تیره و آپوپتوز را مد نظر قرار داد. تاکنون مکانیسم‌های دخیل در ظهور نورونهای تیره بخوبی شناخته نشده‌اند. بنابر نظر Vohra و همکارانش، با وجود اینکه نورونهای تیره نمودی از جراحت عصبی بوده و درجات متفاوتی از آسیب را شامل می‌شوند، لیکن نحوه تشکیل آنها بخوبی روشن نیست [۲۵]. البته لازم به ذکر است که فعال شدن گیرنده‌های NMDA (N-methyl-D-aspartate) و/یا سایر زیر گروه‌های گیرنده‌های گلوتامات و متعاقباً فعال شدن PKC (Phosphokinase C) و NO در ظهور نورونهای تیره بدنبال CCI (Chronic Constriction Injury) و ایجاد تحمل نسبت به اثر مرفین در موش صحرایی مشخص شده است [۸، ۱۹]. آنچه که در مورد نحوه تشکیل این نورونها بدنبال القای درد التهابی می‌توان اظهار نمود این است که در روند درد التهابی، سیگنالهای پیشرونده و مداوم ناشی از التهاب بافتهای محیطی و جراحت التهابی پایانه‌های اعصاب محیطی که بدنبال تزریق فرمالین ایجاد می‌شود [۲۰]، دشارژهای بیش از حدی را در اعصاب محیطی بر می‌انگیزد که بعنوان نیروی محرکه در راستای افزایش فعالیت اعصاب و ایجاد پاسخهای افراط گونه در نورونهای شاخ خلفی نخاع کمری عمل نموده و در نهایت منجر به ظهور نورونهای تیره می‌شود.

با عنایت به تصاویر نورونهای تیره مشخص می‌گردد که نورونهای مذکور بطور قابل ملاحظه‌ای دستخوش تغییرات آناتومیک شده و به نظر می‌رسد فاقد انسجام عملکردی و توانایی لازم جهت دریافت و انتقال پیام باشند. در عین حال علیرغم اینکه گزارشات قبلی حاکی از برگشت ناپذیر بودن تغییرات مرفولوژیک نورونهای تیره بوده و نتایج مطالعه حاضر



شکل ۸- اثر پیش درمانی با سلوکوسیب، PTIO و کوئرستین بر ظهور نورونهای تیره ناشی از تجویز مزمن فرمالین ۵٪: ۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین ۵٪، تزریق داخل صفاقی سلوکوسیب ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم (Clx/Frm5%/ch) منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در ظهور نورونهای تیره گردید ($P < 0.05$). تجویز سلوکوسیب با دوز ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم (Clx*) و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم (Clx**) اثر قابل ملاحظه‌ای را در پی نداشت ($P > 0.05$). ده دقیقه قبل از تزریق فرمالین ۵٪، تجویز PTIO ۳۰ میکروگرم/کیلوگرم (PTIO/Frm5%/ch) i.t./rat و کوئرستین ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم (Qrct*/Frm5%/ch) i.t./rat منجر به کاهش قابل توجه تعداد نورونهای تیره گردید ($P < 0.05$ ، $P < 0.01$). پیش درمانی با PTIO با دوز ۲۰ میکروگرم/کیلوگرم (PTIO*) rat و کوئرستین ۴۰ میکروگرم/کیلوگرم (Qrct*) در مقایسه با گروه کنترل تاثیر قابل توجهی بر تعداد نورونهای تیره نداشت ($P > 0.05$). داده‌ها بصورت میانگین \pm SEM بیان شده‌اند. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ **.

می‌گردد [۱۳]؛ این نکته شاید تأییدی بر تشابه بین مسیرهای نشانه پردازی مرتبط با پدیده‌های آپوپتوز و نورونهای تیره باشد. پیش درمانی با سلوکوسیب بطور وابسته به دوز منجر به کاهش قابل توجه آسیب نورونی ناشی از القای درد التهابی گردید (شکل ۸). این دارو علاوه بر مهار انتخابی COX-2 سبب کاهش تولید مدياتورهای التهابی شده و احتمالاً بواسطه کاهش حساسیت آورانهای محیطی و کاهش دریافت ورودی‌های تحریکی از محیط باعث کاهش firing نورونهای مرکزی و تضعیف فعالیت آنها می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد ممانعت از هاپیرآلژیای مرکزی ناشی از تجویز فرمالین، موجب مهار پیامدهای بعدی مانند تشکیل نورونهای تیره می‌گردد.

پیش درمانی با PTIO بعنوان NO scavenger بطور وابسته به دوز منجر به کاهش معنی دار ظهور نورونهای تیره گردید (شکل ۸، $P < 0.05$). به نظر می‌رسد که تولید بیش از حد NO احتمالاً بواسطه فعال نمودن وقایع داخل سلولی باعث اکسایتوتوکسیسیتی و تغییرات دژنراتیو نورونی گردد. نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهند که تجویز i.t. بنزامید بعنوان مهار کننده PARS:

- Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord*. New York: Plenum Press, 1989, p. 463-471.
- [4] Banna NR, Saade NE, Atweh SF, Suhayle JJ, Prolonged discharge of wide-dynamic range spinal neurons evoked by formaldehyde injected in their cutaneous receptive fields. *Exp Neurol* 93 (1986) 275-278.
- [5] Cammermeyer J, The importance of avoiding "dark" neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol* 1 (1961) 245-270.
- [6] Czurko A, Nishino H, Collapsed (argyrophilic, dark) neurons in rat model of transient focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 162 (1993) 71-74.
- [7] Dickenson AH, Sullivan AF, Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre- and post-formalin. *Pain* 30 (1987) 349-360.
- [8] Davar G, Hama A, Deykin A, Vos B, Maciewicz R, MK-801 blocks the development of thermal hyperalgesia in a rat model of experimental painful neuropathy. *Brain Res* 553 (1991) 327-330.
- [9] Gallyas F, Hsu M, Buzsaki G, Four modified silver method for thick sections of formaldehyde-fixed mammalian central nervous tissue: "dark" neurons, pericarya of all neurons, microglial cells and capillaries. *J Neurosci Meth* 50 (1993) 159-164.
- [10] Gallyas F, Zoltay G, Dames W, Formation of "dark" (argyrophilic) neurons of various origin proceeds with a common mechanisms of biophysical nature (a novel hypothesis). *Acta Neuropathol* 83 (1992) 504-509.
- [11] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126 (1982) 131-138.
- [12] Hama AT, Sagen J, Papas GD, Spinal neurons in rats with unilateral constriction nerve injury: a preliminary study. *Neurol Res* 16 (1994) 297-304.
- [13] Harris C, Maroney AC, Johnson EM, Identification of JNK-dependent and independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurochem* 83 (4) (2002) 992-1001.
- [14] Ham J, Eilers A, Whitefield J, Neame SJ, Shah B, c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochem Pharmacol* 60 (2000) 1015-1021.
- [15] Ishida K, Ungusparkorn C, Hida H, Alhara N, Ida k, Nishino H, Argyrophilic dark neurons distribute with a

نیز نشان‌دهنده نقش NO و JNK در ظهور این نورونها بدنبال القای درد التهابی می‌باشند، لیکن هنوز بطور قطع نمی‌توان در مورد اینکه تغییرات مرفولوژیک ایجاد شده منجر به آتروفی یا مرگ سلول شود، اظهار نظر نمود. در مطالعات بعدی لازم است که مدتها پس از آخرین تزریق فرمالین؛ ارزیابی خصوصیات الکتروفیزیولوژیک نورونها و استفاده از مارکرهای مناسب علاوه بر بررسی ویژگیهای مرفولوژیک نورونها، مد نظر قرار گیرند. در مجموع، با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که القای درد التهابی بمدت طولانی، آسیب و سمیت عصبی را در پی داشته باشد. با عنایت به نقش NO و JNK در بروز پیامدهای محیطی و مرکزی درد التهابی، احتمالاً تجویز مهار کننده و یا خنثی کننده‌های آنها را می‌توان بعنوان عوامل محافظت کننده در برابر عوارض مذکور در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان حاضر، نظرات ارزشمند جناب آقای دکتر کمالیان؛ مدیر گروه پاتولوژی بیمارستان شریعتی، آقایان دکتر آنتوان تریلر و دکتر کلود شوایتزر؛ E'cole Normal Supérieur, Paris, France. آقای دکتر مهدی زاده؛ گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران، آقای دکتر تقی؛ گروه آناتومی دانشگاه تربیت مدرس و پرسنل محترم گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی را صمیمانه ارج می‌نهند.

منابع

- [1] Ahmadiani A, Hosseiny J, Semnianian S, Javan M, Saeedi F, Kamalinejad M, Saremi S, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract. *J Ethnopharmacol* 72 (2000) 287-292.
- [2] Anbar M, Gratt BM, Role of Nitric Oxide in the physiopathology of pain. *J Pain Symptom Manag* 14(4) (1997) 225-254.
- [3] Bennett GJ, Kajander KC, Sahara Y, Iadarola MJ, Sugimoto T, Neurochemical and anatomical changes in the dorsal horn of rats with an experimental painful peripheral neuropathy. In: F Cervero, GJ Bennett, PM Headley, *Proceedings of Sensory Information in the*

- behavior and spinal nitric oxide synthase v-pimmunoreactivity in rats. *Pharmacol Biochem Be* 62 (1999) 531-536.
- [23] Sugimoto T, Bennett GJ, Kajander KC, Strychnin-enhanced transsynaptic degeneration of dorsal horn neurons in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 98 (1989) 139-143.
- [24] Tjolsen A, Berge OG, Hunskaa S, Rosland JH, Hole K, The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51 (1992) 5-17.
- [25] Vohra BPS, James TJ, Shamra SP, Kansal VK, Chudhary A, Gupta SK, Dark neurons in the ageing cerebellum: their mode of formation and effect of Maharishi Amrit Kalesh. *Biogerontology* 3 (6) (2002) 347-354.
- [26] Wang L, Matsushita K, Araki I, Takeda M, Inhibition of c-Jun N-Terminal Kinase ameliorates apoptosis induced by hydrogen peroxide in the kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). *Nephron* 91 (2002) 142-147.
- [27] Zimmermann M, Immediate-early genes in the nervous system-are they involved in mechanisms of chronic pain? *Patol Fiziol Ter* 4 (1992) 47-51.
- [28] Zimmermann M, The recommendations of the committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (*IASP Ethical Guideline*). (1983).
- [29] Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Nitric Oxide activation of poly-(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263 (1994) 687-689.
- different pattern in the brain after over hours treadmill running and swimming in the rat. *Neurosci Lett* 277 (1999) 149-152.
- [16] Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ, Nitric Oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a rat model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* 50 (1992) 7-10.
- [17] Michel T, Feron O, Nitric Oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest* 100 (1997) 2146-2152.
- [18] Miyataka M, Rich KA, Ingram M, Yamamoto T, Bing RJ, Nitric Oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 39 (2002) 785.
- [19] Mayer DJ, Mao J, Price DD, Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 7731-7736.
- [20] Navascues J, Casafont I, Villagra NT, Lafarya M, Berciano MT, Reorganization of nuclear compartments of type A neurons of trigeminal ganglia in response to inflammatory injury of peripheral nerve endings. *J Neurocytol* 33 (4) (2004) 393-405.
- [21] Onizuka K, Fukuda A, Kunitatsu M, Kumazaki M, Sasaki M, Takaku A, Nishino H, Early cytopathic features in rat ischemia model and reconstruction by neuronal graft. *Exp Neurol* 137 (2) (1996) 324-332.
- [22] Przewlocka B, Mika J, Capone F, Machelska H, Pavone F, Intrathecal oxotremorine affects formalin-induced