Physiology and Pharmacology, 14(3), 252-261
Autumn 2010 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Is the pain modulatory action of 17β-estradiol in locus coeruleus of male rats mediated by $GABA_A$ receptors?

Roghaieh Khakpay[1], Saeed Semnanian[1*], Mohammad Javan[1], Mahyar Janahmadi[2]

1. Dept. Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Dept. Physiology, Shahid Beheshti University (M.C.), Tehran, Iran

Received: 17 March 2010 **Accepted: 27 June 2010**

Abstract

Introduction: Estradiol is a neuroactive steroid, which is found in several brain areas such as locus coeruleus (LC). Estradiol modulates nociception by binding to its receptors and also by allosteric interaction with other membrane-bound receptors like glutamate and $GABA_A$ receptors. LC is involved in noradrenergic descending pain modulation.

Methods: In order to study the effect of 17β-estradiol on both acute and persistent pain modulation and its mechanisms, formalin was injected into the hind paw of male rats. 17β-estradiol was unilaterally injected into the right LC by Hamilton syringe. Formalin-induced responses including licking and flexing duration and paw jerking frequency were recorded for 60 min after injection of 50 µl of 2% formalin. Also, the expression of α_2 and γ_1 subunits of $GABA_A$ receptor genes were examined by RT-PCR technique.

Results: The results of the current study showed that intra-locus coeruleus injection of 17β-estradiol attenuated the second phase, but not the acute phase of formalin induced pain ($P< 0.05$). $GABA_A$ receptor antagonist (bicuculline) reversed the antinociceptive effect of 17β-estradiol, but the expression level of α_2 and γ_1 subunits of $GABA_A$ receptor genes were not significantly changed.

Conclusion: It may be concluded that the analgesic effect of 17β-estradiol in formalin induced inflammatory pain is possibly mediated through the interaction with membrane-bound $GABA_A$ receptors, however this effect is not exerted at the gene expression level.

Key words: locus coeruleus nucleus, 17-β-estradiol, bicuculline, pain modulation, rat

*Corresponding author e-mail: ssemnan@modares.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۴ (۳)، ۲۵۲ - ۲۶۱
پاییز ۱۳۸۹

فیزیولوژی و فارماکولوژی

آیا اثر ۱۷-بتا استرادیول در هسته لوکوس سرولئوس در تعدیل درد موش‌های صحرایی نر به وسیله گیرنده‌های $GABA_A$ وساطت می‌شود؟

رقیه خاکپای، سعید سمنانیان[۱]*، محمد جوان[۱]، مهیار جان احمدی[۲]
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۲۶ اسفند ۸۸ پذیرش: ۶ تیر ۸۹

چکیده

مقدمه: استرادیول استروئید نورواکتیوی است که در نواحی مغزی متعددی از جمله لوکوس سرولئوس (LC) یافت می‌شود. 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. LC در تعدیل پایین‌رو و نورآدرنرژیک درد نقش دارد.

روش‌ها: برای مطالعه اثر۱۷β- استرادیول در تعدیل درد حاد و مداوم و مکانیسم اثر آن، فرمالین به پنجه پای موش‌های صحرایی نر تزریق شد. پاسخ‌های القا شده با فرمالین شامل مدت زمان لیسیدن وخم کردن پای ملتهب و تعداد تکان‌های ناگهانی آن به مدت ۶۰ دقیقه پس از تزریق ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲٪ ثبت شد. همچنین، بیان ژن-های زیرواحدهای α_2 و γ_1 گیرنده $GABA_A$ با استفاده از تکنیک RT-PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج مطالعه اخیر نشان داد که تزریق ۱۷β- استرادیول به داخل LC، فاز دوم درد القا شده با فرمالین را کاهش داد ولی اثری روی فاز اول آن نداشت ($P< 0.05$). آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ (بیکوکولین) اثر ضددردی ناشی از ۱۷β- استرادیول را به حالت پایه برگرداند، ولی میزان بیان ژن‌های زیرواحدهای α_2 و γ_1 گیرنده $GABA_A$ تغییر معنی‌داری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که اثر بی‌دردی ۱۷β- استرادیول روی درد التهابی القا شده با فرمالین احتمالا از طریق گیرنده‌های غشایی $GABA_A$ وساطت می‌شود ولی این اثر در سطح بیان ژن زیرواحدهای این گیرنده اعمال نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: هسته لوکوس سرولئوس، ۱۷β- استرادیول، بیکوکولین، تعدیل درد و موش صحرایی

مقدمه

پاسخ‌های رفتاری، هورمونی و عصبی حیوانات ماده به محرک‌های دردناک به مراتب شدیدتر از حیوانات نر می‌باشد [۱،۵]. شواهدی وجود دارد که استروژن سبب پردردی (hyperalgesia) و تستوسترون سبب بی‌دردی (hypoalgesia) می‌گردد [۱۳،۱۷]. در طی تکوین و در سراسر بلوغ، بخش اعظم اثرات تستوسترون در حیوانات نر استرادیولی وساطت می‌شود که از طریق حلقوی شدن تستوسترون تولید می‌شود [۱،۲۶]. گیرنده‌های استروژنی به طور گسترده در سراسر سیستم اعصاب مرکزی پراکنده شده‌اند. هر دو نوع گیرنده استروژنی آلفا و بتا در هسته لوکوس سرولئوس (LC) موش‌های صحرایی نر و ماده یافت شده است [۲۹،۳۰].

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: ssemnan@modares.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

استروژن در غلظت‌های بالا، علاوه بر گیرنده‌های استروژنی به گیرنده‌های غشایی نوروترانسمیترهای دیگر از جمله گیرنده‌های NMDA، AMPA و $GABA_A$ نیز متصل می‌شود [۲۷]. اخیراً اثر تعدیل کننده استرادیول روی اثر بی‌دردی ناشی از نیکوتین در نخاع موش‌های صحرایی ماده نشان داده شده است [۸].

استرادیول تعداد زیرواحدهای گیرنده‌های $GABA_A$ را کاهش می‌دهد [۶]. تیمار موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده با استرادیول میزان زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده های $GABA_A$ را در هسته پری‌اپتیک میانی و Bed nucleus of the stria terminalis افزایش می‌دهد [۱۲]. همچنین تیمار سلول‌های NT2-N با استرادیول به مدت ۲ روز سبب افزایش بیان ژن زیرواحد آلفا-۲ می‌شود ولی اثری روی بیان ژن زیرواحد گاما-۱ ندارد [۲۵].

LC ورودی‌های تحریکی را از هسته پاراژیگانتوسلولاریس لترالیس (LPGi) و ورودی‌های مهاری را از دورسومدیال روسترال مدولا دریافت می‌کند [۳،۱۰،۱۱،۲۰]. LC نیز به نوبه خود ورودی‌های نورآدرنرژیکی را از طریق مسیرهای پایین‌رو به نخاع می‌فرستد [۹،۱۴،۱۶] و پردردی ناشی از ورودی‌های التهابی محیطی را کاهش می‌دهد [۱۴،۳۳].

بخش زیادی از مطالعات اخیر نقش استروئیدهای جنسی را روی پاسخ به دردزاهای حاد بررسی کرده‌اند [۱۵،۳۱،۳۲]. 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 [۱۸،۲۱]. در موش‌های صحرایی ماده جایگزین کردن تدریجی β۱۷- استرادیول با استفاده از لوله‌های Silastic رفتارهای القا شده با فرمالین طی فاز دوم آزمون فرمالین را کاهش می‌دهد [۲۱]. برعکس، در موش‌های صحرایی نر تزریق داخل بطنی (i.c.v.) استرادیول رفتارهای خم کردن و لیسیدن پای ملتهب را افزایش داده است ولی رفتار تکان دادن پای ملتهب (paw-jerking) را کاهش داده است [۱،۷].

هدف از انجام مطالعه اخیر بررسی اثر β۱۷- استرادیول در تعدیل درد در هسته LC می‌باشد. نقش گیرنده‌های $GABA_A$ این هسته روی تغییرات القا شده با استرادیول روی پاسخ‌های رفتاری ناشی از تزریق فرمالین نیز بررسی می‌شود. علاوه بر این به منظور بررسی اثر β۱۷- استرادیول در سطح بیان ژن، بیان ژن زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده $GABA_A$ نیز بررسی می‌گردد.

مواد و روشها

موشهای صحرایی نر نژاد Sprague–Dawley تهیه شده از انستیتو رازی، در محدوده وزنی ۸۰ تا ۱۲۰گرم به طور تصادفی در گروههای ۶ تایی قرار می‌گرفتند و محدودیتی در دسترسی به آب و غذا نداشتند و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می شدند.

برای بررسی اثر استرادیول روی تعدیل پایین‌رو درد از آزمون فرمالین استفاده شد [۱]. به منظور مشاهده و بررسی رفتارهای حیوان، از یک محفظه شفاف با کف مسطح، به ابعاد 30×30×30 سانتی‌متر و از جنس Plexiglass استفاده شد. در این آزمون، ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۲ درصد به زیر پوست پنجه پای راست حیوان توسط یک سر سوزن نمره ۳۰ تزریق شد. به دنبال تزریق فرمالین رفتارهای ناشی از تزریق فرمالین شامل Licking Duration، Flexing Duration، و Paw-Jerking Frequency به مدت ۶۰ دقیقه ثبت می‌شد [۱]. پاسخ‌های رفتاری ناشی از تزریق فرمالین دارای دو فاز می‌باشد: فاز اول میانگین پاسخ‌های رفتاری ۵ دقیقه اول آزمون و فاز دوم میانگین پاسخ‌های رفتاری بین دقیقه‌های ۱۵ تا ۶۰ می‌باشد.

برای ریزتزریق داروها، ابتدا کانول گذاری LC براساس مختصات ذکرشده در اطلس پاکسینوس (مختصات نسبت به برگما: قدامی-خلفی ۹/۸-، جانبی ۱/۳ و عمق ۷/۵ میلی‌متر) انجام می‌شد و پس از دوره بهبودی ۵ تا ۷ روزه حیوانات برای انجام آزمون فرمالین آماده می‌شدند. برای کانول گذاری، پس از بیهوشی حیوان در دستگاه استرئوتاکسی 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 ناحیه مربوط به هسته LC سمت راست براساس مختصات ذکرشده در اطلس پاکسینوس در سطح جمجمه مشخص می‌گردید. بعد از علامت گذاری ناحیه مذکور، با استفاده از مته‌های دندانپزشکی در محل مشخص شده منفذی

به اندازه قطر کانول راهنما، سرسرنگ نمره ۲۳، ایجاد شده و کانول راهنما براساس عمق ذکر شده در اطلس پاکسینوس برای هسته LC، در درون مغز مستقر شده و قسمت رویی آن درروی جمجمه بوسیله سیمان دندانپزشکی ثابت می‌شد. دو پیچ کوچک (microscrew) نیز به صورت وارونه در استخوان جمجمه تعبیه و در درون سیمان دندانپزشکی برای مسلح سازی سیمان فرو می‌رفتند. منفذ کانول راهنما در بیرون جمجمه بوسیله درپوش خاصی مسدود بوده و فقط در زمان تزریق دارو برداشته می‌شد. یک کانول نازکتر که معمولاً سرسرنگ نمره ۳۰ می‌باشد به طول حدود ۲ میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما تهیه شده و از یک طرف به یک لوله نازک پلی اتیلن وصل می‌گردید. سر دیگر لوله پلی اتیلن به سرنگ هامیلتون وصل شده و حجم مورد نظر داروی مربوطه تزریق می‌گردید. در پژوهش حاضر، از ACSF به عنوان حلال β۱۷- استرادیول و بیکوکولین (خریداری شده از شرکت سیگما) استفاده شد. از غلظت‌های μmol ۰/۱، ۰/۴ و ۰/۸ β۱۷- استرادیول (β۱۷- استرادیول کپسول‌دار شده با سیکلودکسترین) [۱] و غلظت‌های ۲/۵ و ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر [۲۵] بیکوکولین برای مطالعه رفتاری و غلظت μmol ۰/۸ β۱۷- استرادیول برای مطالعه مولکولی استفاده شد. در روز آزمایش، ۳۰۰ نانولیتر استرادیول و بیکوکولین (آنتاگونیست گیرندهGABAA) به‌طور دستی در طی ۱ دقیقه با استفاده از سرنگ هامیلتون (Hamilton syringe) و لوله پلی اتیلن (PE-20) از مسیر کانول گیج ۳۰ تزریق می‌شد و پس از ۱۰ دقیقه، آزمون فرمالین انجام می‌شد.

بررسی بیان ژنهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده $GABA_A$ با کمک روش RT-PCR نیمه کمی انجام می‌گرفت. بدین منظور، پس از دریافت تزریقات مورد نظر و انجام آزمون فرمالین، سر حیوان قطع می‌شد، برش‌های یک میلی‌متری از ناحیه ساقه مغز حیوان برداشته می‌شد و ناحیه مربوط به هسته LC پانچ شده و به میکروتیوپ استریل منتقل می گردید. نمونه‌ها پس از استخراج در نیتروژن مایع (۱۷۰°C-) نگهداری می‌شدند. سپس، کل RNA موجود در بافت مورد استفاده با کمک محلول استخراج RNX plus (سیناژن) و بر اساس پروتکل کلروفرم–الکل شرکت سازنده استخراج می‌شد. تمامی روند استخراج RNA به‌جز مواردی که نیاز به انکوبه کردن در دمای آزمایشگاه دارد، روی یخ انجام می‌گیرد. در این مرحله از روی تمام mRNAهای موجود در نمونه استخراج شده، cDNA سنتز می‌شود. سنتز cDNA براساس پروتکل ذکر شده برای کیت‌های cDNA سازی خریداری شده از شرکت BIONEER در حضور پرایمر Oligo-dt و ۴ میکروگرم RNA استخراج شده انجام می‌شد. به منظور تکثیر قطعه ای از cDNA مربوط به ژن زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده $GABA_A$ و GAPDH از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. برای هر قطعه مورد نظر، از یک واکنش PCR استفاده می‌شد. برای تهیه پرایمرهای واکنش‌های PCR توالی ژن های زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده $GABA_A$ وGAPDH در موش صحرایی با کمک وبگاه Swiss-Prot به دست آمد.

پرایمرهای پیش‌رو و پس‌رو ژنهای مذکور با مشخصات ارائه شده در جدول ۱ طراحی و یکتا بودن آنها با کمک نرم افزار Blast روی وبگاه NCBI تایید شد. فرآیند PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی پیش‌رو و پس‌رو برای هر ژن (زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده $GABA_A$ و GAPDH)، و براساس پروتکل ذکر شده برای Master mix تهیه شده از شرکت ROVALAB انجام گرفت. برای بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، از ۳۲ سیکل برای هر سه ژن مورد نظر استفاده شد تا سیگنال مربوط به تراکم باند محصول PCR اولا قابل رؤیت باشد و ثانیا وارد فاز اشباع منحنی تکثیر محصول PCR نگردد. محصول PCR تحت تابش نور ماورای بنفش و بواسطه حضور اتیدیوم بروماید در ژل آگارز رؤیت و از آن عکسبرداری شد. شدت سیگنال‌های هر باند به کمک نرم افزار Uvitec سنجیده شد. برای هر نمونه تراکم باند مربوط به زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده $GABA_A$ نسبت به تراکم باند مربوط به GAPDH انداز ه گیری شد. هر گروه شامل نمونه‌های به دست آمده از ۶ حیوان بود.

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 نظرگرفته شد.

یافته ها

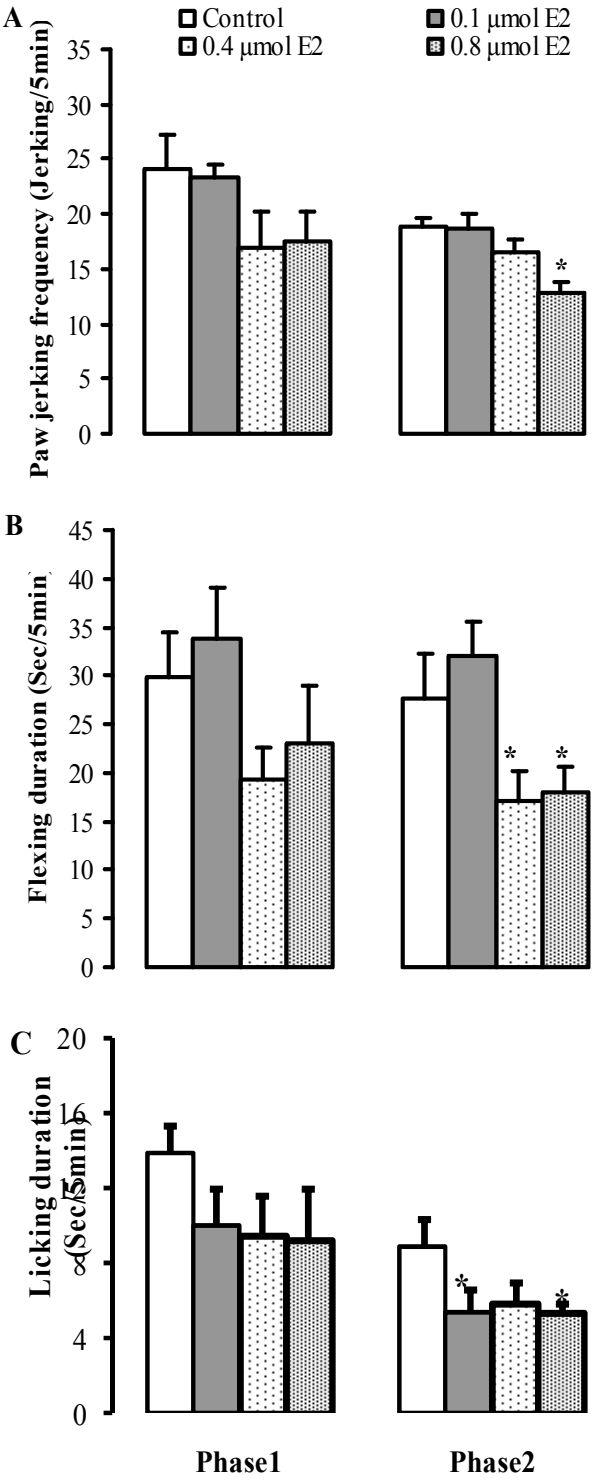
از آنجایی‌که نتایج مربوط به گروه‌های شم و حلال تفاوت

معنی‌داری با گروه کنترل نشان ندادند، نتایج مربوط به آنها ارائه نشده است. تزریق ۰/۴ و ۰/۸ میکرومول β۱۷- استرادیول، فرکانس تکان دادن پای ملتهب را طی فاز دوم کاهش داد ولی فقط اثر دوز ۰/۸ µmol از نظر آماری معنی دار بود (شکل-۱A، $P < 0.05$). طی فاز دوم، رفتار لیسیدن پای ملتهب به طور معنی‌داری با تزریق ۰/۸ µmol و ۰/۱، β۱۷- استرادیول کاهش یافت (شکل-۱B، $P < 0.05$). تزریق ۰/۸ µmol و ۰/۴، β۱۷- استرادیول به داخل LC به طور معنی‌داری مدت زمان خم کردن پای ملتهب را طی فاز دوم آزمون فرمالین کاهش داد (شکل-۱C، $P < 0.05$). بالاترین غلظت β۱۷- استرادیول اثر ضددردی موثرتری را روی رفتارهای القا شده با فرمالین اعمال می‌کند و بنابراین برای آزمایشات بعد انتخاب شد.

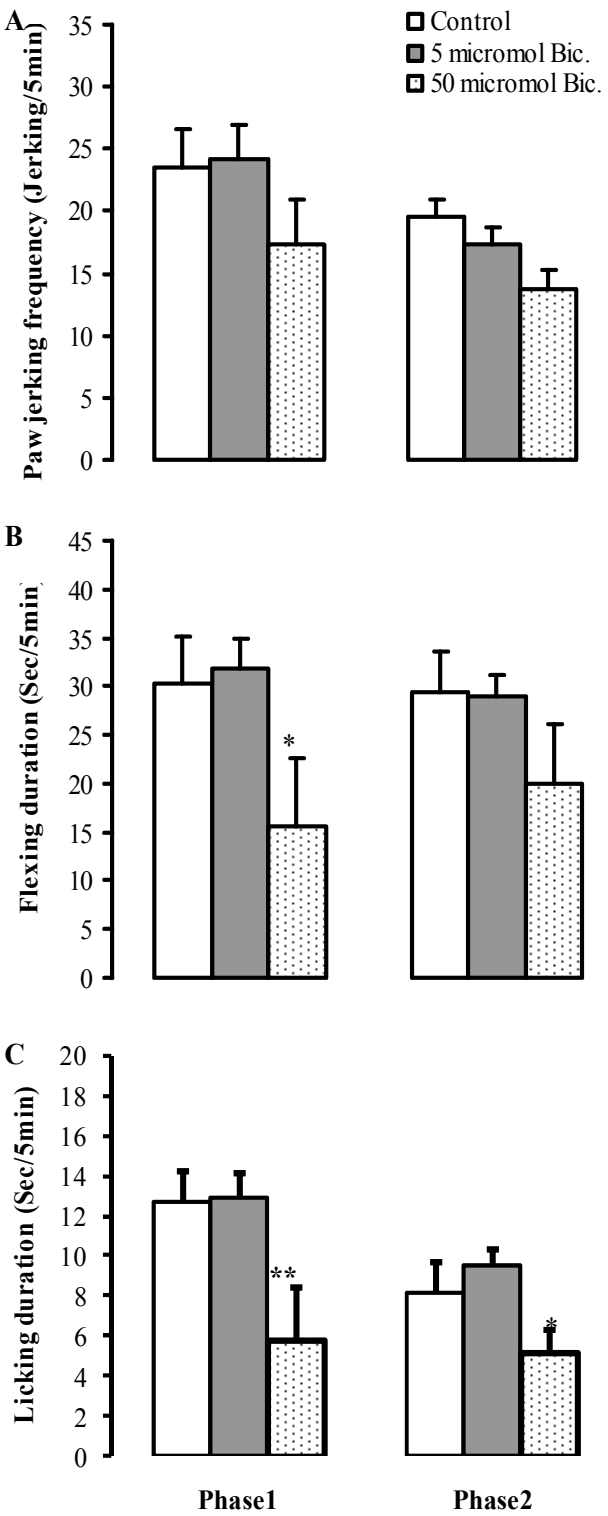
برای بررسی نقش گیرنده‌های $GABA_A$ در اثر ضددردی β۱۷- استرادیول، دوزی از بیکوکولین موردنیاز بود که بدون داشتن اثری در تعدیل درد عملکرد آنتاگونیستی خود را حفظ نموده باشد؛ بدین منظور ۵۰ µmol بیکوکولین ۱۰ دقیقه قبل از انجام آزمون فرمالین به داخل LC تزریق شد. تزریق ۵۰ µmol بیکوکولین فاز اول رفتارهای خم کردن ($P < 0.05$) و لیسیدن ($P < 0.01$) پای ملتهب را به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل-۲B و ۲C)؛ فاز دوم رفتار لیسیدن نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل-۲C، $P < 0.05$). اما، تزریق ۵ µmol بیکوکولین به داخل LC اثری روی هیچ کدام از رفتارهای القا شده با فرمالین نداشت (شکل-۲)؛ بنابراین دوز ۵ µmol برای آزمایشات بعد انتخاب شد.

به منظور بررسی نقش احتمالی گیرنده‌های $GABA_A$ در اثر ضددردی β۱۷- استرادیول، ۵ µmol بیکوکولین ۱۰ دقیقه قبل از تزریق ۰/۸ میکرومول β۱۷- استرادیول، به داخل LC تزریق شد و ۱۰ دقیقه پس از تزریق β۱۷- استرادیول آزمون فرمالین انجام شد. بیکوکولین توانست اثر ضددردی β۱۷- استرادیول طی فاز دوم رفتارهای تکان دادن ناگهانی ($P < 0.05$) و خم کردن ($P < 0.01$) پای ملتهب را به حالت پایه و کنترل برگرداند (شکل-۳).

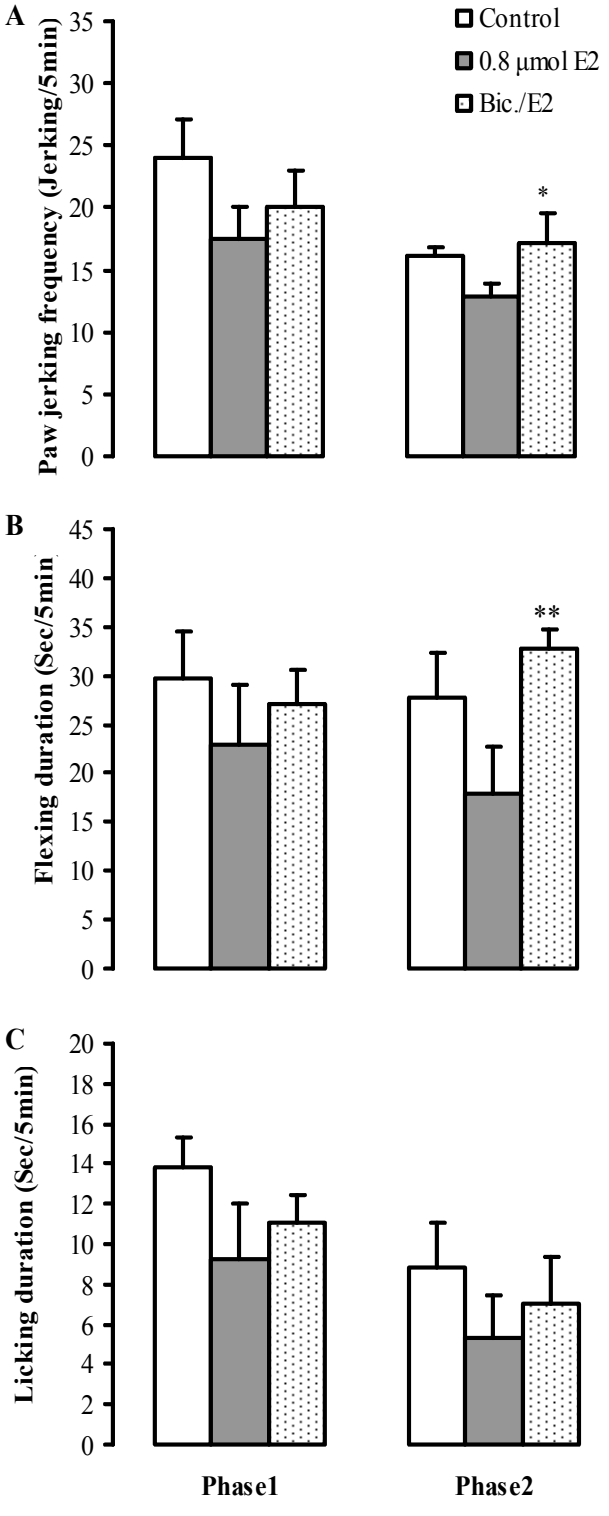
برای بررسی بیان ژنهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده-$GABA_A$، میزان بیان این ژنها در گروه‌های کنترل (دست نخورده)، کنترل-فرمالین (حیوانات دست نخورده که آزمون



شکل ۱- اثر تزریق ۰/۸، ۰/۴ و ۰/۱ میکرومول β۱۷- استرادیول به داخل LC روی پاسخ‌های رفتاری ناشی از تزریق µl ۵۰ فرمالین ۲٪ به سطح داخلی پنجه پا شامل تکان دادن ناگهانی پای ملتهب (A)، مدت زمان خم کردن (B) و لیسیدن (C) پای ملتهب. فاز اول میانگین پاسخ‌های رفتاری ۵ دقیقه اول آزمون و فاز دوم میانگین پاسخ‌های رفتاری بین دقیقه‌های ۱۵ تا ۶۰ می‌باشد. E2: β۱۷- استرادیول. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با احتمال ($P < 0.05$) می‌باشد. در هر گروه ۶ سر موش صحرایی نر استفاده شده است.



شکل۲- پاسخ‌های رفتاری القا شده با تزریق فرمالین (µl ۵۰، ۲٪) شامل تکان دادن ناگهانی پای ملتهب (A)، مدت زمان خم کردن (B) و لیسیدن (C) پای ملتهب در موشهای صحرایی تیمار شده با غلظت‌های µmol ۵ و ۵۰ بیکوکولین. Bic.: بیکوکولین. * و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با احتمال ($P < 0.05$) و ($P < 0.01$) می‌باشد. در هر گروه ۶ سر موش صحرایی نر استفاده شده است.

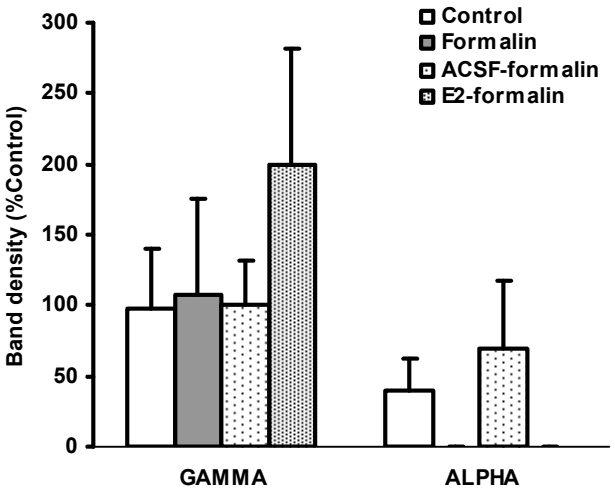


شکل۳- مقایسه پاسخ‌های رفتاری ناشی از درد التهابی در گروهی که β۱۷- استرادیول به داخل LC تزریق شده با گروهی که ۱۰ دقیقه قبل از تزریق β۱۷- استرادیول µmol ۵ بیکوکولین دریافت کرده‌اند. رفتارهای القا شده با تزریق فرمالین (µl ۵۰، ۲٪) شامل تکان دادن ناگهانی پای ملتهب (A)، مدت زمان خم کردن (B) و لیسیدن (C) پای ملتهب می‌باشد. E2: β۱۷- استرادیول و E2/Bic.: بیکوکولین/β۱۷- استرادیول. * و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با احتمال ($P < 0.05$) و ($P < 0.01$) می‌باشد. در هر گروه ۶ سر موش صحرایی نر استفاده شده است.

فرمالین روی آنها انجام شده بود)، ACSF (حیوانات قبل از انجام آزمون فرمالین ACSF را به عنوان حلال β۱۷- استرادیول دریافت کرده بودند) و استرادیول (حیوانات قبل از انجام آزمون فرمالین β۱۷- استرادیول دریافت کرده بودند) بررسی شد. همانطوری که در شکل-۴ مشاهده می‌شود با آنکه β۱۷- استرادیول بیان ژن آلفا-۲ را کاهش و گاما-۱ را افزایش داده است ولی هیچ یک از این اثرات از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بالاترین غلظت β۱۷- استرادیول (۰/۸ μmol) اثر ضددردی موثرتری را روی رفتارهای القا شده با فرمالین اعمال می‌کند که با پیش تیمار بیکوکولین این اثر به شرایط کنترل برمی‌گردد. بنابراین اثر ضددردی β۱۷- استرادیول ممکن است تا حدودی به وسیله گیرنده‌های $GABA_A$ وساطت می‌شود ، ولی از آنجایی که بیان ژنهای دو زیرواحد این گیرنده توسط β۱۷- استرادیول



شکل۴- مقایسه بیان ژنهای زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده$GABA_A$، بین گروه‌های کنترل (دست نخورده)، کنترل-فرمالین (حیوانات دست نخورده که آزمون فرمالین روی آنها انجام شده بود)، ACSF (حیوانات قبل از انجام آزمون فرمالین ACSF را به عنوان حلال β۱۷- استرادیول دریافت کرده بودند) و استرادیول (حیوانات قبل از انجام آزمون فرمالین β۱۷- استرادیول دریافت کرده بودند). بیان ژنهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده$GABA_A$ با کمک روش RT-PCR نیمه کمی سنجش و نسبت به بیان استاندارد داخلی GAPDH نرمالایز شده است. ACSF: Artifical cerebrospinal fluid و E2: β۱۷- استرادیول. هر گروه شامل نمونه‌های به دست آمده از ۶ حیوان بود.

تغییر نیافت احتمالا اثر ضددردی β۱۷- استرادیول در سطوحی غیر از بیان ژن این گیرنده اعمال می‌شود.

شواهد زیادی وجود دارد که هورمون‌های استروئیدی اعمال نورونی متعددی را در سیستم اعصاب مرکزی با تغییر وسعت میدان دریافت نورون‌ها و واکنش‌های بین نورونی تنظیم می‌نمایند [۴،۱۹،۲۲،۲۸،۳۴]. بخش زیادی از مطالعات اخیر نقش استروئیدهای جنسی در پاسخ به دردزاهای حاد را بررسی کرده‌اند ولی این نتایج بحث‌برانگیز هستند؛ به خصوص نشان داده شده که استرادیول آستانه پاسخ به hot plate و مدت زمان تاخیر آزمون tail flick را هم افزایش و هم کاهش می‌دهد [۱۵،۳۱،۳۳]. بنابراین در مطالعه حاضر ما آزمون فرمالین را برگزیدیم تا علاوه بر فاز حاد درد بتوانیم درد مداوم (persistent pain) را نیز بررسی کنیم.

تزریق β۱۷- استرادیول به داخل LC اثری روی پاسخ‌های رفتاری القا شده با فرمالین طی فاز اول آزمون ندارد که با نتایج Kuba و همکاران مطابقت دارد [۱۸]. Mannino و همکارانش نیز نشان دادند که دوزهای تدریجی β۱۷- استرادیول به موش‌های صحرایی ماده پاسخ‌های رفتاری ناشی از تزریق فرمالین را فقط طی فاز دوم آزمون کاهش داد [۲۱]. همچنین شواهدی وجود دارد که تزریق i.c.v. استرادیول به موش‌های صحرایی نر اثرات متفاوتی روی رفتاری القا شده با فرمالین می‌گذارد؛ استرادیول رفتارهای خم کردن و لیسیدن پای ملتهب را افزایش و رفتار تکان دادن ناگهانی پای ملتهب را کاهش می‌دهد [۱،۷] که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی ندارد. اما غلظت و نحوه تزریق استرادیول، روش‌های سنجش درد و جنس حیوانات مورد استفاده در مطالعات ذکر شده متفاوت بوده است.

β۱۷- استرادیول فرکانس تکان دادن پای ملتهب را کاهش داد. این رفتار یک رفلکس فازیک هست که کاهش آن نشان دهنده آستانه درد بالاتر می‌باشد [۱]. همچنین رفتار خم کردن پای ملتهب –انقباض تونیک عضلات خم کننده‌ای که توسط گیرنده‌های دردی پنجه پا فعال شده‌اند [۲]- نیز کاهش یافت که نشان دهنده غیرفعال شدن رفلکس‌های نخاعی می‌باشد. علاوه‌براین، با کاهش لیسیدن پای ملتهب نقش مراکز فوق نخاعی در اثر ضددردی β۱۷- استرادیول نیز تائید شد چون لیسیدن رفتاری است در پاسخ به درد شدید که حیوان

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر بخشی از ژنهای مورد مطالعه

ژن مورد نظر	Forward primers	Reverse primers
$GABA_A$ R **زیر واحد آلفا-۲**	5'- GCTTACACGACCTCGGAAGTCA -3'	5'- GATTCGGGGCGTAGTTGGCAA -3'
$GABA_A$ R **زیر واحد گاما-۱**	5'- AGTGGAAAAAGCCCTCAGTGGA -3'	5'- CCCTCCAAGCACTGGTAACCA -3'
GAPDH	5́ -AGAACATCATCCCTGCATCC-3́	5'-AGCCGTATTCATTGTCATACC-3'

اعمال دیگر خود را برای لیسیدن بخش آسیب دیده قطع می‌کند [۱]. بنابراین می‌توان پیشنهاد داد که تزریق β۱۷- استرادیول به داخل LC احتمالا از طریق گیرنده‌های استروژنی یا گیرنده‌های غشایی نوروترانسمیترهای دیگر مثل گیرنده‌های $GABA_A$ در هسته LC، فعالیت نورونی مدارات نخاعی و فوق نخاعی تحریک شده با محرک‌های دردی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

تزریق بیکوکولین به داخل LC اثر ضددردی β۱۷- استرادیول طی فاز دوم رفتارهای تکان دادن ناگهانی و خم کردن پای ملتهب را به حالت پایه و کنترل برگرداند؛ ولی β۱۷- استرادیول اثری روی بیان ژنهای زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ گیرنده‌های $GABA_A$ نداشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا بخشی از بی‌دردی ناشی از تزریق β۱۷- استرادیول به هسته LC توسط گیرنده‌های $GABA_A$ وساطت می‌شود ولی این نقش واسطه در سطح بیان ژن زیرواحدهای این گیرنده اعمال نمی‌شود.

در مطالعه اخیر β۱۷- استرادیول بیان ژن آلفا-۲ را کاهش و گاما-۱ را افزایش داده است که از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. شواهدی وجود دارد که استرادیول بیان ژن زیرواحدهای مختلف گیرنده‌های $GABA_A$ مثل زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱ را در نواحی متعددی از سیستم اعصاب مرکزی تغییر می‌دهد [۶،۱۲،۲۵]. Herbison و Fenelon با تیمار موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده با استرادیول نشان دادند که میزان زیرواحدهای آلفا-۲ و گاما-۱گیرنده‌های $GABA_A$ در هسته پری‌اپتیک میانی و Bed nucleus of the stria terminalis افزایش یافته است [۱۲] که با نتایج مربوط به هسته LC پس از آزمون فرمالین مطابقت ندارد. برخلاف یافته‌های مطالعه حاضر تیمار سلول‌های NT2-N با استرادیول به مدت ۲ روز بیان ژن زیرواحد آلفا-۲ را افزایش داده است ولی اثری روی بیان ژن زیرواحد گاما-۱ نداشته است [۲۵].

بنابراین پیشنهاد می‌شود که تزریق β۱۷- استرادیول به داخل هسته LC موش‌های صحرایی نر برای القا بی‌دردی متوسط کافی می‌باشد. احتمالا بخشی از بی‌دردی ناشی از تزریق β۱۷- استرادیول توسط گیرنده‌های غیر استروژنی و به ویژه گیرنده‌های $GABA_A$ موجود در هسته LC وساطت می‌شود ولی این نقش واسطه در سطح بیان ژن زیرواحدهای این گیرنده اعمال نمی‌شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت و همکاری صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) به انجام رسیده است. بدین وسیله از این حمایت تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] 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.

[2] 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(1) (2002) 127-35.

[3] Aston-Jones G, Locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Aston-Jones G, editor.

The Rat Nervous System, 3rd ed., USA: Elsevier, 2004, 259-294.

[4] Bradshaw HB, Berkley KJ, Estrous changes in responses of rat gracile nucleus neurons to stimulation of skin and pelvic viscera. ***J Neurosci*** 20(20) (2000) 7722-7.

[5] Berkley KJ, Sex differences in pain. ***Behav Brain Sci*** **20** (1997) 348–371.

[6] Beyenburg S, Stoffel-Wagner B, Bauer J, Watzka M, Blumcke I, Bidlingmaier F, Elger CE, Neuroactive steroids and seizure susceptibility. ***Epilepsy Res*** 44 (2001) 141–153.

[7] 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.

[8] Chen Y, Cui Y, Lin JW, Xiang QL, Liu WF, Wang TH, Modulatory role of estradiol in nicotinic antinociception in adult female rats. ***Life Sci*** 85(1-2) (2009) 91-6.

[9] Clark FM, Proudfit HK, The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord in the rat determined by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. ***Brain Res*** 538 (1991) 231–245.

[10] Ennis M, Aston-Jones G, GABA-mediated inhibiton of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. ***J Neurosci*** **9** (1989a) 2973–2981.

[11] Ennis M, Aston-Jones G, Potent inhibitory input to locus coeruleus from the nucleus prepositus hypoglossi. ***Brain Res Bull*** 22 (1989b) 793–803.

[12] Herbison AE, Fenelon VS, Estrogen Regulation of $GABA_A$ Receptor Subunit mRNA Expression in Preoptic Area and Bed Nucleus of the Stria Terminalis of Female Rat Brain. ***J Neurosci*** S3 (1995) 2328-2337.

[13] 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.

[14] Jones SL, Gebhart GF, Quantitative characterization of coeruleospinal inhibition of nociceptive transmission in the rat. ***J Neurophysiol*** 56 (1986) 1397–1410.

[15] Gordon FT, Soliman MR, The effects of estradiol and progesterone on pain sensitivity and brain opioid receptors in ovariectomized rats. ***Horm Behav*** 30(3) (1996) 244-50.

[16] Kayser V, Guilbaud G, Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. ***Pain*** 28 (1987) 99–107.

[17] 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. ***Pharmac Biochem Behav*** *34* (1989) 119–127.

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

[19] Lee DY, Chai YG, Lee EB, Kim KW, Nah SY, Oh TH, Rhim H, 17Beta-estradiol inhibits high-voltage-activated calcium channel currents in rat sensory neurons via a non-genomic mechanism. ***Life Sci*** 70(17) (2002) 2047-59.

[20] Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M, Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolu Vulgaris Leucoagglutinin. ***Neuroscience*** 65(1) (1995) 119-160.

[21] Mannino CA, South SM, Quinones-Jenab V, Inturrisi CE, Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. ***J Pain*** 8(4) (2007) 334-342.

[22] McEwen BS, Coirini H, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, Gould E, Schumacher M, Woolley C, Steroid hormones as mediators of neural plasticity. ***J Steroid Biochem Mol Biol*** 39 (1991) 223–32.

[23] Paxinos G, Watson C, ***The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates,*** 4th and 6th ed., Academic Press, New York (1998 and 2007).

[24] Pedersen LH, Scheel-Krüger J, Blackburn-Munro G, Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. ***Pain*** 127(1-2) (2007) 17-26.

[25] Pierson RC, Lyons AM, Greenfield LJ, Gonadal steroids regulate GABA (A) receptor subunit mRNA expression in NT2-N neurons. ***Brain Res Mol Brain Res*** 138 (2005) 105–15.

[26] 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.

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

[28] Saleh TM, Connell BJ, Centrally mediated effect of 17b-estradiol on parasympathetic tone in male rats. ***Am J Physiol*** 276(45) (1999) R474–R481.

[29] Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I, Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. ***J Comp Neurol*** 388(4) (1997) 507-25.

[30] Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW, Distribution of androgen and estrogen receptor mRN-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. ***J Comp Neurol 294*** **(1990) 76-95**.

[31] 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.

[32] Stoffel EC, Ulibarri CM, Folk JE, Rice KC, Craft RM, Gonadal hormone modulation of Mu, Kappa, and Delta opioid antinociception in male and female rats. ***J Pain*** 6 (4) (2005) 261-274.

[33] 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.

[34] Womble MD, Andrew JA, Crook JJ, 17β-Estradiol reduces excitatory postsynaptic potential (EPSP) amplitude in rat basolateral amygdala neurons. ***Neurosci Lett*** 331 (2002) 83-86.