



## Effects of intrathecal administration of genipin on pain and morphine induced analgesia in rats

Zohreh Abbasi, Masoud Fereidoni\*, Morteza Behnam-Rassouli

*Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*

Received: 17 Apr 2013

Accepted: 29 May 2013

### Abstract

**Introduction:** Uncoupling protein 2 (UCP2) in the inner mitochondrial membrane changes the activity of  $K_{ATP}$  channels and the cell excitability, probably by decreasing the ATP production. Given the expression of UCP2 in primary afferent neurons, and the importance of these channels in morphine-induced analgesia, genipin, an UCP2 inhibitor, may affect these processes, when administrated intrathecally.

**Methods:** Tail flick assay and formalin test were used to study thermal and chemical pain, respectively, in adult male Wistar rats. Catheterization of the spinal subarachnoid space was used to localize the effects of genipin.

**Results:** Genipin increased pain sensation in tail flick assay and in the first phase of the formalin test, but decreased pain in the second phase of the formalin test ( $P < 0.001$  in all groups). Genipin also antagonized analgesic effect of morphine ( $P < 0.01$  in tail flick and  $P < 0.001$  in the first phase of the formalin test) and did potentiate it in the second phase of the formalin test ( $P < 0.001$ ); but had no effect on hyperalgesic effects of ultra-low dose of morphine.

**Conclusion:** Probably, genipin increases ATP/ADP ratio, thereby inhibits  $K_{ATP}$  channels in primary pain afferents and lowers pain threshold and decreases analgesic effects of morphine, at least in part, by inhibition of UCP2. Apparently, the anti-inflammatory effect of genipin causes analgesia in the formalin test. Genipin had no effect on hyperalgesic effects of ultra-low dose of morphine, maybe due to the common signaling mechanisms such as  $K_{ATP}$  channels.

**Key words:** UCP2, genipin,  $K_{ATP}$  channel, Morphine

\* Corresponding author e-mail: fereidoni@um.ac.ir  
Available online at: [www.phypha.ir/ppj](http://www.phypha.ir/ppj)

## اثر تجویز داخل نخاعی Genipin بر درد و بی‌دردی ناشی از مرفین در موش صحرایی

زهرة عباسی، مسعود فریدونی\*، مرتضی بهنام رسولی  
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

پذیرش: ۸ خرداد ۹۲

دریافت: ۲۸ فروردین ۹۲

### چکیده

**مقدمه:** UCP2 در غشای داخلی میتوکندری، باعث تغییر در فعالیت کانال‌های  $K_{ATP}$  و تغییر در تحریک پذیری سلول می‌شود که احتمالاً با کاهش تولید ATP می‌باشد. با توجه به بیان UCP2 در آوران‌های درد در نخاع، و نقش این کانال‌ها در بی‌دردی مرفین، احتمال تأثیر تجویز داخل نخاعی Genipin، مهارکننده UCP2، بر احساس درد و بر بی‌دردی ناشی از مرفین بررسی شد.

**روش‌ها:** جهت ارزیابی درد حرارتی و شیمیایی در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به ترتیب آزمون‌های پس کشیدن دم (Tail flick) و فرمالین بکار گرفته شد و برای موضعی کردن محل اثر Genipin از تکنیک جراحی و کانول گذاری در فضای تحت عنکبوتیه استفاده گردید.

**یافته‌ها:** Genipin درد را در آزمون پس کشیدن دم ( $P < 0.001$ )، و در مرحله اول آزمون فرمالین ( $P < 0.001$ ) افزایش، ولی در مرحله دوم آزمون فرمالین کاهش داد ( $P < 0.001$ )؛ همچنین بی‌دردی مرفین را در آزمون پس کشیدن دم ( $P < 0.01$ ) و مرحله اول آزمون فرمالین ( $P < 0.001$ ) آنتاگونیست کرد و در مرحله دوم آزمون فرمالین باعث بروز بی‌دردی نسبتاً قوی‌تری شد ( $P < 0.001$ )؛ اما اثری بر پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین نداشت.

**نتیجه‌گیری:** احتمالاً Genipin، حداقل تا حدی، با مهار UCP2، افزایش نسبت ATP/ADP، و مهار کانال‌های  $K_{ATP}$  در آوران‌های اولیه باعث کاهش آستانه درد شده، و بی‌دردی مرفین را کاهش داده است. ظاهراً اثرات ضد التهابی Genipin باعث بروز بی‌دردی در مرحله دوم آزمون فرمالین شده است. ممکن است بی‌اثر بودن Genipin بر پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین به دلیل تشابه مکانیسم‌های عمل Genipin و این دوز مرفین، مثل اثر بر کانال‌های  $K_{ATP}$ ، باشد.

واژه‌های کلیدی: UCP2، Genipin، کانال‌های  $K_{ATP}$ ، مرفین

### مقدمه

بیان می‌شود و ظاهراً در احساس درد نقش دارد [۸]. مطالعات گذشته نشان دادند حیواناتی که UCP2 را بیش از حد عادی بیان می‌کنند، آستانه درد بیشتری نیز دارند [۷]. UCP2 در نورون‌هایی که به وسیله گلوکز فعال می‌شوند، باعث کاهش تولید ATP، باز شدن کانال‌های  $K_{ATP}$  در غشای سلولی، هایپریپلاریزاسیون غشاء و سرانجام کاهش برانگیختگی این نورون‌ها می‌گردد [۱۱، ۲۱]. کانال‌های  $K_{ATP}$  در نورون‌هایی که در حس کردن گلوکز نقشی ندارند، به عنوان عناصر کنترل‌کننده انرژی سلول عمل کرده، وضعیت متابولیکی سلول را به تغییر در جریان‌های بین غشایی پتاسیم

UCP2 عضوی از خانواده Uncoupling protein‌ها در غشای داخلی میتوکندری است که باعث نشت پروتون از فضای بین دو غشاء به ماتریکس میتوکندری، و در نتیجه کاهش تولید ATP می‌گردد [۲، ۱۴]. این پروتئین در شاخ خلفی نخاع مخصوصاً در ناحیه substantia gelatinosa

fereidoni@um.ac.ir  
www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله:



گرفت. زمان بروز پاسخ یک بار قبل از تجویز داخل صفاقی و بار دوم ۵ دقیقه پس از تجویز داخل نخاعی بدست آمد. برای مقایسه بین گروه‌ها، نتایج به صورت درصد حداکثر اثر ممکن (Maximum Possible Effect) MPE% بیان شد:

$$\text{MPE\%} = \frac{\text{Post Drug Latency} - \text{Pre Drug Latency}}{\text{Cut of time} - \text{Pre Drug Latency}} \times 100$$

برای سنجش درد شیمیایی از آزمون فرمالین استفاده شد. این آزمون به روشی که توسط Dennis و Dubuisson در سال ۱۹۷۷ برای موش‌های صحرایی معرفی شد، انجام گرفت [۴]. تزریق زیر پوستی محلول فرمالدهید (محلول فرمالین) به کف پای عقبی موش صحرایی باعث ایجاد دو مرحله مشخص در رفتار درد می‌شود، یک مرحله اولیه پاسخ (۵ دقیقه اول پس از تزریق فرمالین، فاز نورونیک)، و یک مرحله ثانویه پاسخ (از دقیقه ۱۱ شروع شده و گاهی تا ۶۰ دقیقه طول می‌کشد، فاز التهابی) که با سه رفتار مشخص، لنگیدن، بالا بردن پا، و لیسیدن یا گاز گرفتن پا، همراه است. بین مرحله اول و دوم، یک اینترفاز خاموش وجود دارد که از دقیقه ۶ تا دقیقه ۱۰ و گاهی تا دقیقه ۲۰ طول می‌کشد و رفتار درد کمی طی آن مشاهده می‌شود. این گونه نظریه پردازی شده که دو مرحله مختلف نشان دهنده دو نوع مختلف درد از نظر کیفی می‌باشند. مرحله ۱، دردی است که به وسیله تحریک شیمیایی مستقیم اعصاب آوران C توسط فرمالین ایجاد شده است؛ و مرحله ۲ درد القاء شده به وسیله واکنش التهابی در بافت‌های محیطی می‌باشد [۲۲]. در این مطالعه، مقدار ۰/۰۵ ml از محلول فرمالین ۲/۵٪ به صورت زیر جلدی به کف پای عقبی حیوان تزریق و رفتار حیوان به مدت یک ساعت مورد بررسی گرفت. درجه درد هر ۱۵ ثانیه ثبت، و سپس میانگین درجه‌های درد در هر ۵ دقیقه محاسبه گردید. درجه بندی رفتارهای درد بر اساس توصیفات Dennis و Dubuisson به این صورت بود: عدد "صفر" برای وقتی که جانور دردی ندارد و کف پا روی زمین است؛ "یک" برای وقتی که فقط پنجه پا را روی زمین می‌گذارد؛ "دو" برای وقتی که پا را کاملاً بالا

صفاقی و داخل نخاعی، ابتدا تجویز داخل صفاقی و سپس تجویز داخل نخاعی انجام شد. پس از گذشت ۵ دقیقه از تجویز داخل نخاعی دوباره آزمون پس کشیدن دم و بلافاصله پس از آن تزریق فرمالین به پای عقبی راست و بررسی رفتار درد حیوان به مدت یک ساعت انجام گردید.

برای کانول گذاری جهت تجویز داخل نخاعی از تکنیک Rudy و Yaksh استفاده گردید [۲۶]. بر اساس این روش، حیوانات با تجویز داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۲۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. پس از تراشیدن موها و ثابت کردن سر حیوان در دستگاه استرنوتاکس، درست در خط وسط از بین گوش‌ها برشی کوچک به طول ۲ سانتیمتر به طرف پایین ایجاد گردید. با ایجاد این برش، عضلات گردنی مشاهده شد که مشخصه این عضلات وجود یک شیار بارز بود؛ با برش عمقی در راستای این شیار و کنار زدن عضلات از روی تیغه اکسی-پیتال جمجمه، غشای اطلس-اکسی‌پیتال مشاهده شد. با ایجاد خراشیدگی در سطح غشای اطلس-اکسی‌پیتال، مایع مغزی-نخاعی خارج شد که نشانه دسترسی به فضای تحت عنکبوتیه بود. کانول پلی‌اتیلن (PE-10) در فضای تحت عنکبوتیه قرار گرفت، به آرامی به طرف قطعه کمری نخاع به اندازه ۸ سانتیمتر پیش برده شد و برای تجویز دارو ۳ سانتیمتر از لوله خارج نخاع باقی ماند. پس از یک دوره بهبودی ۵ تا ۷ روزه، تنها حیواناتی مورد آزمایش قرار می‌گرفتند که بعد از کانول گذاری هیچ گونه نقص حرکتی نداشتند. داروها با حجم ۱۰ میکرولیتر و به وسیله سرنگ هاملتون ۵۰ میکرولیتری تجویز شدند.

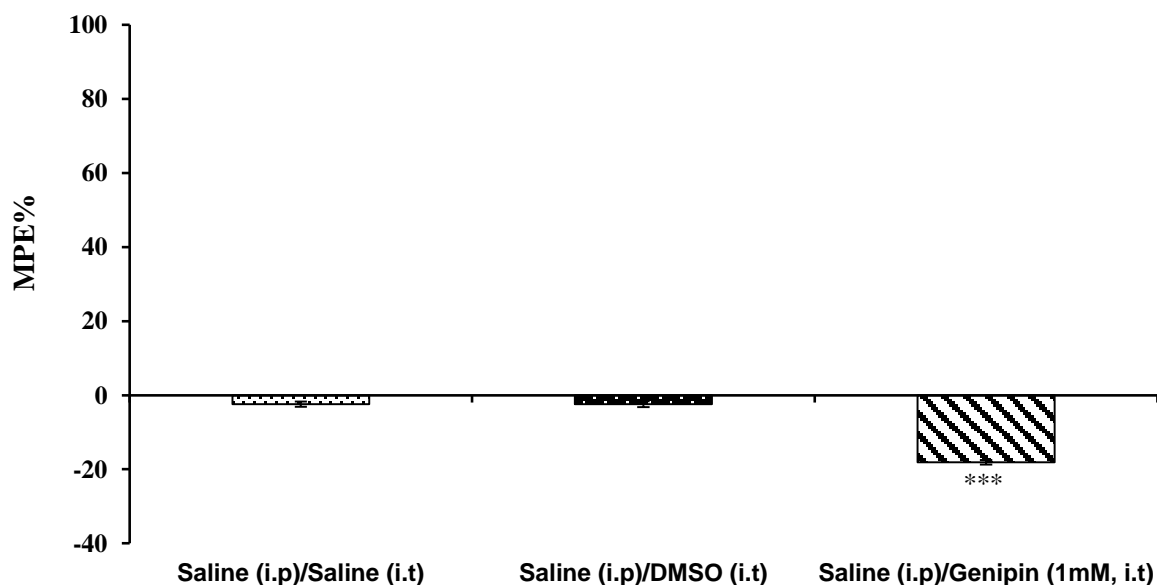
برای سنجش درد حرارتی از آزمون پس کشیدن دم به روش D'Amour و Smith استفاده گردید [۳]. شدت تابش نور دستگاه به یک سوم میانی دم جانور به گونه‌ای تنظیم شد که متوسط زمان پس کشیدن دم پس از اعمال نور بین ۴ تا ۶ ثانیه باشد. برای جلوگیری از آسیب بافتی تابش نور پس از ۱۵ ثانیه قطع می‌شد (cut-off time). در این پژوهش این آزمون سه مرتبه و به فاصله زمانی یک دقیقه در ناحیه یک سوم میانی دم انجام شد و میانگین داده‌ها برای زمان پس کشیدن دم به عنوان آستانه زمانی در بروز درد (Tail Flick Latency) برای هر حیوان مد نظر قرار

کمک نرم افزار Microsoft Excel 2007 بر روی نمودار نمایش داده شدند.

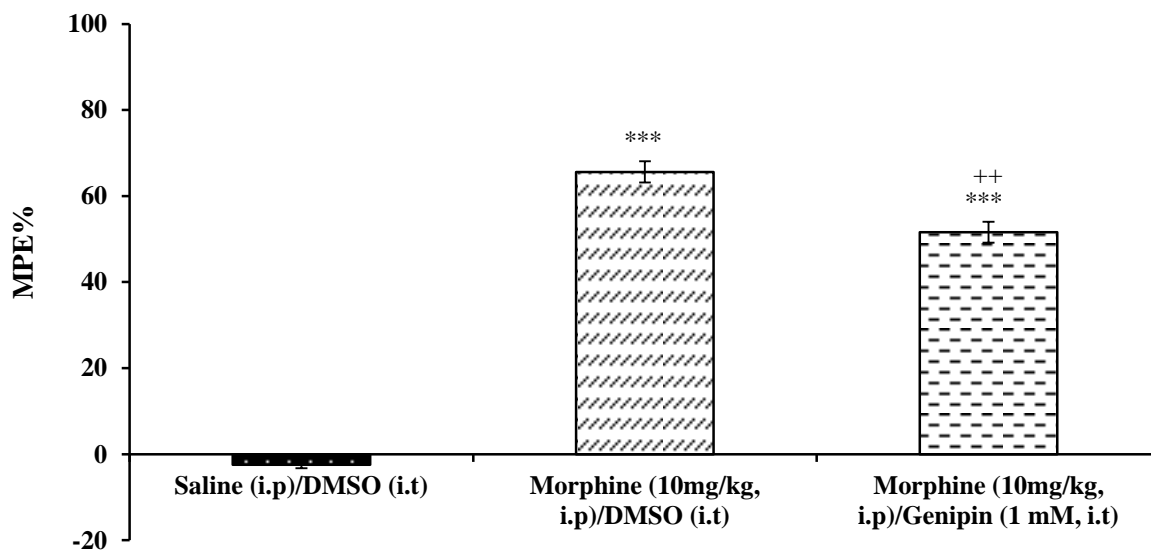
می گیرد؛ و "سه" برای وقتی که پا را لیس می زند و یا گاز می گیرد [۴]. داده ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ارائه شده؛ با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 5 و به روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس میانگین داده های گروه ها با آزمون  $T_{\text{student}}$  مقایسه و  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج به

### یافته ها

در آزمون پس کشیدن دم، نتایج نشان داد که تجویز

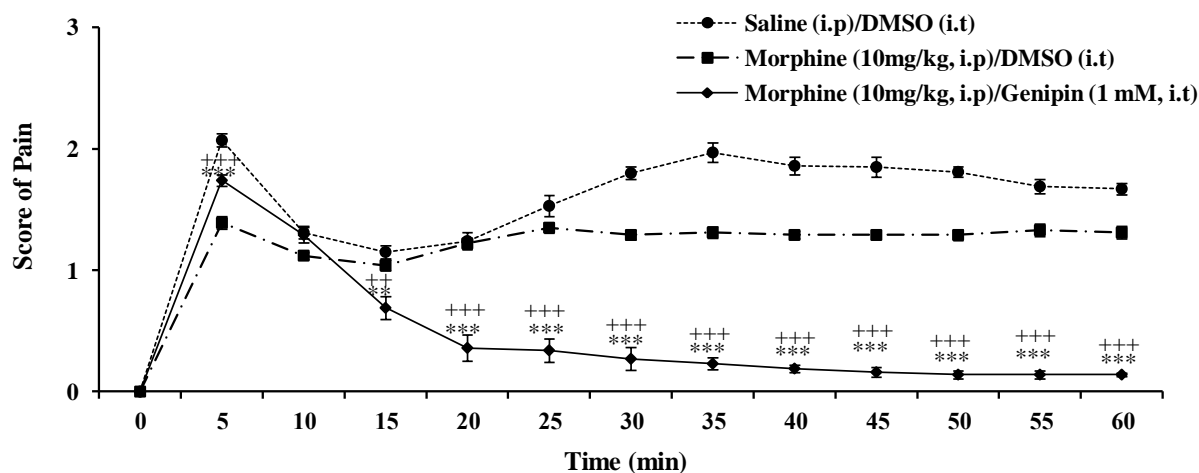


**شکل ۱-** مقایسه نتایج حاصل از آزمون پس کشیدن دم بین گروه های سالیین (i.p)/سالیین (i.t)، سالیین (i.p)/DMSO (i.t) و سالیین (i.p)/Genipin (1 mM, i.t). نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروه سالیین (i.p)/سالیین (i.t) و گروه سالیین (i.p)/DMSO (i.t) نبود. اما تجویز داخل نخاعی Genipin در مقایسه با سایر گروه ها منجر به کاهش آستانه درد حرارتی و بروز پردردی گردید. نتایج بصورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ارائه شده است،  $(n=7)$  و  $P < 0.001$  (\*\*\*) در مقایسه با گروه سالیین (i.p)/سالیین (i.t).

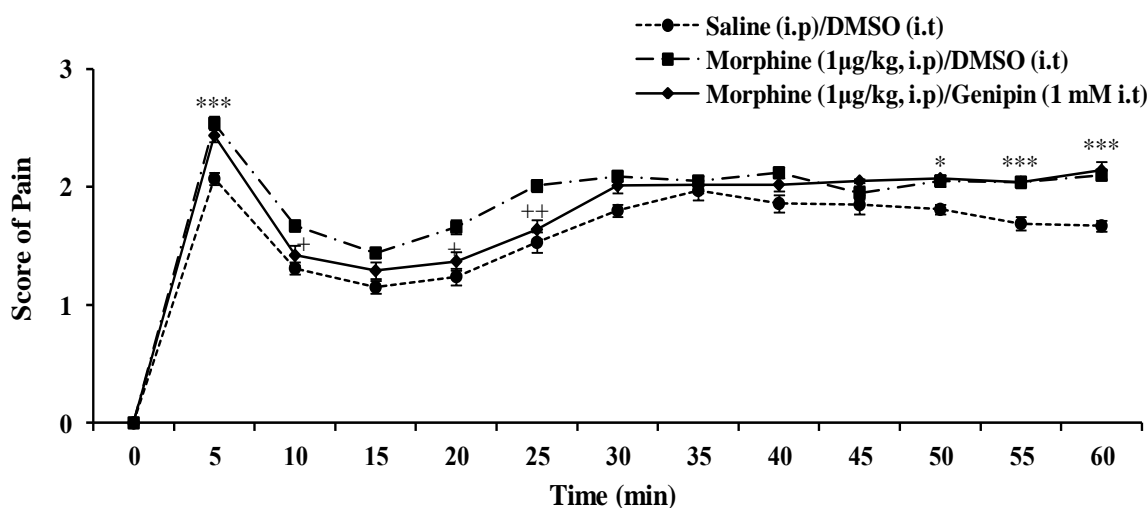


**شکل ۲-** مقایسه نتایج حاصل از آزمون پس کشیدن دم بین گروه های سالیین (i.p)/DMSO (i.t) و مرفین (10 mg/kg, i.p)/DMSO (i.t) و مرفین (10 mg/kg, i.p)/Genipin (1 mM, i.t). نتایج نشان داد که تجویز مرفین به همراه Genipin بصورت داخل نخاعی در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین (i.p)/DMSO (i.t)، همچنان منجر به بروز بی درد در رفتار حیوان گردید، اما نتایج این گروه در مقایسه با گروه دریافت کننده مرفین و DMSO نشان داد که Genipin باعث کاهش آستانه درد حرارتی شده و بی درد مرفین را آنتاگونیست کرد. نتایج بصورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ارائه شده است،  $(n=7)$  و  $P < 0.001$  (\*\*\*) در مقایسه با گروه سالیین (i.p)/DMSO (i.t) و  $P < 0.01$  (++) در مقایسه با گروه مرفین (10 mg/kg, i.p)/DMSO (i.t).





شکل ۵- مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه‌های سالین (i.t) DMSO/(i.p) ۱۰ mg/kg و مرفین (i.p) ۱۰ mg/kg و مرفین (i.p) ۱۰ mg/kg و جنپین (i.t) ۱ mM. نتایج نشان داد که تجویز مرفین به همراه جنپین در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.t) DMSO/(i.p)، همچنان باعث ایجاد بی‌دردی گردید، اما نتایج این گروه در مقایسه با گروه مرفین (i.p) ۱۰ mg/kg و (i.t) DMSO/(i.p) نشان داد که جنپین توان بی‌دردی ناشی از مرفین را در مرحله اول آزمون فرمالین کاهش ولی در مرحله دوم آزمون فرمالین، تقویت کرد. نتایج بصورت mean±SEM ارائه شده است، (n=7) و  $***P<0.001$  و  $**P<0.01$  در مقایسه با گروه سالین (i.p) DMSO/(i.p)، (i.t)  $+++P<0.001$  و  $++P<0.01$  در مقایسه با گروه مرفین (i.p) ۱۰ mg/kg و (i.t) DMSO/(i.p).



شکل ۶- مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه‌های سالین (i.t) DMSO/(i.p) ۱ µg/kg و مرفین (i.p) ۱ µg/kg و مرفین (i.p) ۱ µg/kg و جنپین (i.p) ۱ µg/kg. نتایج نشان داد که تجویز دوز بسیار ناچیز مرفین به همراه جنپین در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.t) DMSO/(i.p)، منجر به بروز پردردی در مرحله اول و در برخی از زمان‌های مرحله دوم آزمون فرمالین گردید، اما نتایج این گروه در مقایسه با گروه مرفین (i.p) ۱ µg/kg و (i.t) DMSO/(i.p) نشان داد که جنپین در مرحله اول آزمون فرمالین بر پردردی ناشی از دوز بسیار ناچیز مرفین اثری نداشت ولی در دقایق ۲۰ تا ۲۵ مرحله دوم آزمون فرمالین اثرات پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین را کاهش داد. نتایج بصورت mean±SEM ارائه شده است، (n=7) و  $***P<0.001$  و  $*P<0.05$  در مقایسه با گروه سالین (i.t) DMSO/(i.p) و  $++P<0.01$  و  $+P<0.05$  در مقایسه با گروه مرفین (i.p) ۱ µg/kg و (i.t) DMSO/(i.p).

(شکل ۲)، نتایج حاصل از آزمون پس کشیدن دم ( $P<0.01$ ) نشان داد در گروه دریافت کننده مرفین (۱ µg/kg)، جنپین (i.p) ۱ mM در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.p) DMSO/(i.t)، همچنان اثرات پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین در حیوان قابل ملاحظه بود ( $P<0.001$ )؛ اما در

همچنان اثرات بی‌دردی در رفتار حیوان مشاهده گردید ( $P<0.001$ )؛ اما به هر حال تجویز داخل نخاعی جنپین متعاقب تجویز داخل صفاقی مرفین، در مقایسه با گروه دریافت کننده مرفین (۱۰ mg/kg)، اثرات بی‌دردی مرفین را تخفیف داد





ایجاد شده به وسیله DNP با افزودن انسدادگر کانال  $K_{ATP}$  مهار می‌شود [۱۹]. از آنجا که DNP عملکرد UCP ها را تقلید می‌کند مکانیسم پیشنهاد شده بیشتر حمایت می‌شود. در مرحله اول (نوروژنیک) آزمون فرمالین، درد بطور معنی‌داری در گروه دریافت‌کننده Genipin افزایش یافت، (شکل ۴). به نظر می‌رسد که در این مرحله نیز مشابه مکانیسم پیشنهادی برای آزمون پس کشیدن دم، Genipin احتمالاً با مهار UCP2 در پایانه‌های آوران‌های درد در سطح نخاع باعث افزایش نسبت ATP/ADP و مهار کانال‌های  $K_{ATP}$  می‌شود. مهار این کانال‌ها با تجمع پتاسیم در این نوروها و در نتیجه افزایش تحریک‌پذیری آن‌ها، باعث افزایش آزادسازی میانجی‌های عصبی از این فیبرها شده، بدین ترتیب موجب تشدید انتقال سیگنال درد می‌شود. در مرحله دوم آزمون فرمالین که وابسته به فرآیندهای التهابی است، Genipin باعث کاهش معنی‌دار درد شد، (شکل ۴). با توجه به یافته‌های درد حرارتی و مرحله اول آزمون فرمالین انتظار کاهش چشمگیر درد در مرحله دوم آزمون فرمالین در حضور Genipin نمی‌رفت؛ بنابراین توضیح این پدیده پیچیده‌تر خواهد بود. در مطالعات نشان داده شده که Genipin دارای اثرات ضد التهابی هم در بافت‌های محیطی [۱۲، ۱۳] و هم در بافت‌های عصبی [۲۰] است؛ این مولکول فعالیت فاکتور NF-Kb را در سلول‌های میکروگلیال محیط کشت سرکوب و آزادسازی سایتوکاین‌های التهابی را از این سلول‌ها مهار می‌کند [۲۰]. احتمالاً Genipin به همین دلیل توانسته درد ایجاد شده به وسیله فرمالین را تسکین دهد. اگرچه Genipin، UCP2 را مهار کرده و انتظار می‌رفت که درد التهابی در مرحله دوم آزمون فرمالین افزایش یابد، به نظر می‌رسد که خاصیت ضد التهابی آن از طریق مهار تولیدات سلول‌های میکروگلیال شاید خیلی قوی‌تر از هر گونه اثری است که از طریق مهار UCP2 مشاهده می‌شود؛ و بدین طریق توانسته اثرات پردردی احتمالی ناشی از مهار UCP2 را که برای مرحله دوم آزمون فرمالین مورد انتظار بود پوشش دهد. از آنجا که فعال شدن کانال‌های  $K_{ATP}$  در بروز اثرات بی‌دردی مرفین در سطح نخاع نقش دارد [۲۷] و با توجه به اینکه با تجویز داخل نخاعی Genipin پس از مرفین این اثر آنتاگونیست شده است (شکل ۲ و ۵)؛ احتمالاً این دو

همچنین دوز بسیار ناچیز مرفین در مرحله دوم آزمون فرمالین نیز در برخی زمان‌ها منجر به بروز پردردی گردید ( $P < 0.05$ )؛ اما در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مرفین ( $1 \mu\text{g/kg}$ )، DMSO/(i.t) Genipin بر اثرات پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین در مرحله اول آزمون فرمالین تأثیر چندانی نداشت. به علاوه مرحله دوم آزمون را نیز چندان تغییری نداد. به هر حال، در دقایق ۲۰ تا ۲۵ کمی از اثر پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین کاسته شده ( $P < 0.05$ )؛ اما در دقایق بعدی همین مقدار کم نیز دیده نشد (شکل ۶).

## بحث

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تجویز داخل نخاعی Genipin باعث کاهش معنی‌دار آستانه درد حرارتی در آزمون پس کشیدن دم گردید، (شکل ۱). با توجه به حضور کانال‌های  $K_{ATP}$  در پایانه‌های پیش سیناپسی [۱۵]، چنین به نظر می‌رسد که احتمالاً مشابه سلول‌های  $\beta$  در لوزالمعده، Genipin حداقل تا حدی با مهار UCP2 در میتوکندری‌های پایانه‌های مرکزی فیبرهای آوران اولیه درد، باعث افزایش نسبت ATP/ADP شده و کانال‌های  $K_{ATP}$  را مهار می‌کند [۲۹]. از آنجا که فعالیت این کانال‌ها با تحریک‌پذیری سلول‌ها از جمله نوروها مرتبط است [۱۵]، پیشنهاد کردیم که Genipin احتمالاً با کاهش جریان از میان کانال‌های  $K_{ATP}$ ، به واسطه مهار UCP2، منجر به افزایش تحریک‌پذیری این فیبرها در شاخ خلفی نخاع، دپلاریزاسیون آن‌ها، باز شدن کانال‌های کلسیمی وابسته ولتاژ و افزایش آزادسازی میانجی‌های عصبی در دوزها شده، بدین ترتیب احساس درد را افزایش داده است (شکل ۷). در حمایت از نتایج این مطالعه نشان داده شده که حیواناتی که UCP2 را بیش از حد عادی بیان می‌کنند، نسبت به حیوانات تیپ وحشی آستانه درد بیشتری دارند [۷]. همچنین نشان داده شده که کانال‌های  $K_{ATP}$  در کنترل پتانسیل غشاء نقش داشته و فعال شدن آن‌ها به وسیله دی‌نیتروفنول (DNP)، که یک جداکننده مصنوعی فسفریلاسیون اکسیداتیو است، باعث افزایش جریان‌های پتاسیمی، هایپرپلاریزاسیون غشاء و کاهش تولید پتانسیل عمل می‌شود [۶، ۱۹]؛ و این جریان‌های

فعالیت PKA، PKC و افزایش کلسیم باعث پیشبرد التهاب می‌شود [۵، ۱۰]، لذا حضور مرفین اثرات ضد التهابی Genipin را به خوبی کاهش داده است. در کل یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که Genipin باعث افزایش احساس درد در آزمون پس کشیدن دم و مرحله اول آزمون فرمالین شده؛ و بی‌دردی مرفین را آنتاگونیست می‌کند. مکانیسم پیشنهادی چنین است: Genipin، احتمالاً با مهار UCP2، باعث افزایش تولید ATP، افزایش نسبت ATP/ADP، مهار کانال‌های  $K_{ATP}$ ، باز شدن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، در نتیجه پردردی شده است؛ و از همین طریق بی‌دردی مرفین از طریق کانال‌های  $K_{ATP}$  را نیز آنتاگونیست کرده است (شکل ۷). با توجه به مکانیسم پیشنهادی انتظار می‌رفت که مهار این پروتئین درد التهابی را نیز افزایش دهد؛ اما کاهش چشمگیری داشت. باید توجه داشت که Genipin با سرکوب فعالیت سلول‌های میکروگلیال دارای اثرات ضد التهابی است؛ شاید این اثر بوده که توانسته بر التهاب و درد ناشی از آن و همزمان بر تسهیل انتقال درد توسط خود Genipin غلبه نموده، درد را تسکین دهد. با توجه به اینکه کانال‌های  $K_{ATP}$  در نورون‌ها می‌توانند به عنوان افکتورهای در سیستم‌های پیامبر ثانویه، مثل G-پروتئین‌ها، آبشارهای PIP، و فسفریلاسیون‌های وابسته به پروتئین کیناز (که در پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین دخیلند) نیز عمل کنند، لذا ممکن است بخشی از اثرات پردردی و تشدید التهاب دوز بسیار ناچیز مرفین تا حدی به واسطه کانال‌های  $K_{ATP}$  بروز نماید.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مصوب دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد که با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شده است. بدینوسیله از آن سازمان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

می‌توانند یک مسیر سیگنال‌رسانی مشترک داشته باشند و آن کانال  $K_{ATP}$  است. مرفین با افزایش جریان از میان این کانال‌ها باعث کاهش تحریک‌پذیری فیبرهای آوران اولیه می‌شود [۲۷]. در مقابل، Genipin با کاهش فعالیت این کانال‌ها، احتمالاً از طریق مهار UCP2 و افزایش نسبت ATP/ADP، باعث افزایش تحریک‌پذیری این فیبرها شده است؛ که با کاهش تحریک‌پذیری پس از تجویز مرفین رقابت کرده و اثرات بی‌دردی آن را کاهش داده است (شکل ۷). بر اساس این نتایج مکانیسم پیشنهادی برای عملکرد Genipin بر احساس درد از طریق مهار UCP2 بیشتر حمایت می‌شود. در مرحله دوم آزمون فرمالین، پس از تجویز داخل نخاعی Genipin به تنهایی، بی‌دردی نسبتاً قوی‌تری نسبت به تزریق مرفین به تنهایی بروز کرد؛ و این اثر ضد درد با تجویز داخل نخاعی Genipin پس از مرفین تغییر معنی‌داری نیافت (شکل ۴ و ۵). ظاهراً اثرات ضد التهابی Genipin بسیار قوی است، به نحوی که تقریباً اثرات ضد التهابی و بروز اثرات ضد درد را اشباع کرده و حضور مرفین در محدوده اشباع اثر ضد التهابی آن بوده است.

در تجویز داخل نخاعی Genipin پس از تجویز دوز بسیار ناچیز مرفین، حضور هیچ‌یک از مرفین یا Genipin روی پردردی دیگری تأثیر قابل ملاحظه‌ای نداشت (شکل ۳ و ۶). این ممکن است به خاطر اشتراک در مکانیسم پردردی هر دو باشد. بر اساس این نتایج، و از آنجا که برای Genipin مهار کانال  $K_{ATP}$  مطرح است [۲۹]، این امکان می‌رود که کانال‌های  $K_{ATP}$  در بروز اثرات پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین شرکت داشته باشند که نیازمند مطالعات بعدی است. در مرحله دوم آزمون فرمالین این دوز بسیار ناچیز مرفین باعث شد تا اثرات ضد درد Genipin کاملاً معکوس شود (شکل ۶). اگرچه Genipin از طریق سرکوب فعالیت NF- $\kappa$ B و کاهش آزادسازی سایتوکاین‌های پیش التهابی دارای اثرات ضد التهابی است، اما دوز بسیار ناچیز مرفین احتمالاً از طریق فعال‌سازی GS، افزایش

## References

- [1] Allen TG, Brown DA, Modulation of the excitability of cholinergic basal forebrain neurones by KATP channels. *J Physiol* 554 (2004) 353-370.
- [2] Andrews ZB, Diano S, Horvath TL, Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: In support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* 6 (2005) 829-840.
- [3] D'Amour FE, Smith DL, A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72 (1941) 74-79.
- [4] 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.
- [5] Esmaceli-Mahani S, Shimokawa N, Javan M, Maghsoudi N, Motamedi F, Koibuchi N, Ahmadiani A, Low-dose morphine induces hyperalgesia through activation of G $\alpha$ s, protein kinase C, and L-type Ca $^{2+}$  channels in rats. *J Neurosci Res* 86 (2008) 471-479.
- [6] Gryshchenko O, Fischer IR, Dittrich M, Viatchenko-Karpinski S, Soest J, Böhm-Pinger MM, Igelmund P, Fleischmann BK, Hescheler J, Role of ATP-dependent K $^{+}$  channels in the electrical excitability of early embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cell Sci* 112 (1999) 2903-2912.
- [7] Horvath B, Spies C, Horvath G, Kox WJ, Miyamoto S, Barry S, Warden CH, Bechmann I, Diano S, Heemskerk J, Horvath TL, Uncoupling protein 2 (UCP2) lowers alcohol sensitivity and pain threshold. *Biochem Pharmacol* 64 (2002) 369-374.
- [8] Horvath B, Spies C, Warden CH, Diano S, Horvath TL, Uncoupling protein 2 in primary pain and temperature afferents of the spinal cord. *Brain Res* 955 (2002) 260-263.
- [9] Hoshovska IuV, Shymanska TV, Sahach VF, Effect of UCP2 activity inhibitor genipin on heart function of aging rats. *Fiziol Zh* 55 (2009) 28-34.
- [10] Hosseini Sh, Sabouni F, Fereidoni M, Moghimi A, Anti-inflammatory effect of shikonin on cultured astrocytes derived from rat brain. *Physiol Pharmacol* 16 (2012) 107-120.
- [11] Kong D, Vong L, Parton LE, Ye C, Tong Q, Hu X, Choi B, Brüning JC, Lowell BB, Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves KATP channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metab* 12 (2010) 545-552.
- [12] Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, Park EH, Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *J Ethnopharmacol* 103 (2006) 496-500.
- [13] Koo HJ, Song YS, Kim HJ, Lee YH, Hong SM, Kim SJ, Kim BC, Jin C, Lim CJ, Park EH, Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol* 495 (2004) 201-208.
- [14] Krauss S, Zhang CY, Lowell BB, The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 248-261.
- [15] Liss B, Roeper J, Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (Review). *Mol Membr Biol* 18 (2001) 117-127.
- [16] Ly CV, Verstreken P, Mitochondria at the synapse. *Neuroscientist* 12 (2006) 291-299.
- [17] Mailloux RJ, Adjeitey CN, Harper ME, Genipin-induced inhibition of uncoupling protein-2 sensitizes drug-resistant cancer cells to cytotoxic agents. *PLoS One* 5 (2010) e13289.
- [18] Matsuka Y, Ono T, Iwase H, Mitirattanakul S, Omoto KS, Cho T, Lam YY, Snyder B, Spigelman I, Altered ATP release and metabolism in dorsal root ganglia of neuropathic rats. *Mol Pain* 4 (2008) 458-471.
- [19] Morley GE, Anumonwo JM, Delmar M, Effects of 2,4-dinitrophenol or low [ATP] $_{(i)}$  on cell excitability and action potential propagation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 71 (1992) 821-830.
- [20] Nam KN, Choi YS, Jung HJ, Park GH, Park JM, Moon SK, Cho KH, Kang C, Kang I, Oh MS, Lee EH, Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. *Int Immunopharmacol* 10 (2010) 493-499.
- [21] Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB, Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 499 (2007) 228-232.
- [22] Randolph BC, Peters MA, Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. *Anesth Prog* 44 (1997) 11-16.
- [23] Rodrigues AR, Duarte ID, The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K $^{+}$  channels. *Br J Pharmacol* 129

- (2000) 110-114.
- [24] Story GM, The emerging role of TRP channels in mechanisms of temperature and pain sensation. *Curr Neuropharmacol* 4 (2006) 183-196.
- [25] Turner JD, Gaspers LD, Wang G, Thomas AP, Uncoupling protein-2 modulates myocardial excitation-contraction coupling. *Circ Res* 106 (2010) 730-738.
- [26] Yaksh TL, Rudy TA, Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 17 (1976) 1031-1036.
- [27] Yang SW, Kang YM, Guo YQ, Qiao JT, Dafny N, ATP-sensitive potassium channels mediate norepinephrine- and morphine-induced antinociception at the spinal cord level. *Int J Neurosci* 93 (1998) 217-223.
- [28] Yin XF, Fu ZG, Zhang DY, Jiang BG, Alterations in the expression of ATP-sensitive potassium channel subunit mRNA after acute peripheral nerve and spinal cord injury. *Eur Neurol* 57 (2007) 4-10.
- [29] Zhang CY, Parton LE, Ye CP, Krauss S, Shen R, Lin CT, Porco JA Jr, Lowell BB, Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced  $\beta$  cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab* 3 (2006) 417-427.
- [30] Zhou H, Zhao J, Zhang X, Inhibition of uncoupling protein 2 by genipin reduces insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 486 (2009) 88-93.
- [31] Zimmermann M, Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl* 128 (1986) 221-233.
- [32] Zoga V, Kawano T, Liang MY, Bienengraeber M, Weihrauch D, McCallum B, Gemes G, Hogan Q, Sarantopoulos C, KATP channel subunits in rat dorsal root ganglia: Alterations by painful axotomy. *Mol Pain* 6 (2010) 563-569.