

اثر تجویز نخاعی مسدودکننده اتصالاتهای منفذدار به همراه آگونیست و آنتاگونیست گابا A بر پاسخهای رفتاری به درد شیمیایی در موش صحرایی نر

نویسندگان: سیمین افشارکارگر^۱، مسعود فریدونی*^۲، ناصر مهدوی شهری^۳

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۳- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

E-mail: fereidoni@um.ac.ir

* نویسنده مسئول: مسعود فریدونی

چکیده

مقدمه و هدف: اینترنورونهای گابارژیک در ارتباط با احساس درد در سطح نخاع توزیع شده اند؛ همچنین موسیمول و بیکوکولین (آگونیست و آنتاگونیست $GABA_A$) به ترتیب باعث کاهش و افزایش درد می شوند. اتصالاتهای منفذدار (Gj)، اتصالاتهای غشایی برای مبادله عوامل سیگنالینگ و متابولیت های کوچک هستند. این پژوهش با تجویز نخاعی (i.t) کربنوکسالون (مسدودکننده Gj) به بررسی نقش اتصالاتهای منفذدار و سیستم گابارژیک نخاعی بر احساس درد شیمیایی پرداخته است.

مواد و روش ها: موش های صحرایی نر نژاد ویستار (250g-200g) در 8 گروه هفت تایی دسته بندی شدند. داروها به حجم 100 μ l، به مقادیر کربنوکسالون (1nM)، موسیمول (0/3 μ g) و بیکوکولین (0/6 μ g و 0/3 μ g) به صورت نخاعی، در حالت انفرادی یا هم درمانی تجویز شدند. از تزریق کف پای 0/5 ml فرمالین 2/5 درصد استفاده و رفتار درد به مدت 1 ساعت بررسی شد.

نتایج: کربنوکسالون و موسیمول هریک به تنهایی باعث کاهش درد ($p < 0.01$ و $p < 0.05$) و بیکوکولین موجب افزایش درد ($p < 0.01$) ناشی از فرمالین شدند. تجویز کربنوکسالون به همراه موسیمول کاهش درد را بیشتر کرد ($p < 0.05$) و همچنین تجویز کربنوکسالون آثار پردردی بیکوکولین را کاهش داد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: تقویت اثر ضدردی ناشی از موسیمول و تخفیف اثر افزایش درد ناشی از بیکوکولین به دنبال انسداد Gjها، با در نظر گرفتن Gj بین اینترنورونهای مهاری اولیه مؤثر بر اینترنورونهای ثانویه مهارکننده نورونهای انتقال دهنده علائم درد در نخاع، می تواند قابل توجه شود.

واژگان کلیدی: درد، تجویز نخاعی، اتصالاتهای منفذدار، کربنوکسالون، $GABA_A$

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم - شماره ۱۰۵
تیر ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱۳
آخرین اصلاحها: ۱۳۹۲/۶/۹
پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۲۰

مقدمه

درد، یک تجربه حسی پیچیده است؛ درحقیقت، درد نتیجه‌ای از برهمکنش پیچیده انواع ورودی‌های سیناپسی در مسیری است که از گیرنده محیطی شروع می‌شوند، از محور نوروئی بالا می‌روند و سرانجام به قشر مخ و ساختارهای لیمبیک می‌رسند (۱). شاخ پشتی نخاع، اولین محل برهمکنش سیناپسی در مسیر عصبی درد است؛ در این محل، آوران‌های علائم درد (Nociceptive afferent) با نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد (Projection neuron) ارتباطات سیناپسی برقرار می‌کنند. یافته‌های فراوانی نشان می‌دهند که نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد فقط به ورودی‌های آوران اولیه، وابسته نیستند، بلکه در کنترل شبکه‌ای محلی از اینترنورون‌های تحریکی، مهارتی و راه‌های تعدیل‌کننده درد نزولی هستند که در نهایت، حالت‌های افزایش یا کاهش حساسیت به درد را هماهنگ می‌کنند؛ این شبکه نوروئی شاخ پشتی نخاع به عنوان کنترل درجه‌ای انتقال سیگنال‌های درد به مناطق مغزی بالاتر است، جایی که درد درک می‌شود (۲). بیشتر نورون‌های سطح شاخ پشتی نخاع اینترنورون هستند. اینترنورون‌ها می‌توانند تحریکی یا مهارتی باشند و ورودی‌شان را از مراکز مغزی بالاتر یا دیگر اینترنورون‌ها، علاوه بر فیبرهای محیطی دریافت کنند؛ بنابراین آنها نقشی بحرانی در سطح تحریک‌پذیری و خروجی شاخ پشتی نخاع بازی می‌کنند (۳). گابا یکی از میانجی‌های عصبی مهارتی مهم در CNS است و اینترنورون‌های گاباژژیک در لامیناهای ۱ تا ۳ نخاع وجود دارند (۴). توزیع آناتومیکی نورون‌ها و گیرنده‌های گابا، همچنین پاسخ‌های ضددردی آگونیست گیرنده‌های گابا A و گابا B با این عقیده سازگار است که این سیستم انتقال، ممکن است دارای مزیت کلینیکی در درمان درد حاد، التهابی و نوروپاتی باشد به طوری که آگونیست‌های گیرنده گابا A، همچنین مهارکننده‌های جذب و متابولیسم آن، فعالیت ضددردی بارزی را در مدل‌های حیوانی درد حاد التهابی و نوروپاتی انجام می‌دهند. مطالعات نشان داده‌اند که نورون‌های گاباژژیک و

گیرنده‌های آنها در برخی نواحی سیستم عصبی که برای بسیاری از جنبه‌های انتقال و درک درد بحرانی هستند، قرار گرفته‌اند (۵).

اتصال‌های منفذدار، کانال‌های غشایی حساس به ولتاژی هستند که امکان انتقال سلول به سلول را برای یون‌ها، پیامبران ثانویه و مولکول‌های کوچک فراهم می‌آورند و ارتباط الکتریکی، بیوشیمیایی و متابولیکی را بین سلول‌ها برقرار می‌کنند؛ همچنین آنها به عنوان راه‌های یونی با مقاومت پایین و متصل‌کننده سلول‌های تحریک‌پذیر (عصب و عضله) تعریف می‌شوند (۶، ۷ و ۸). پژوهشگران دریافته‌اند که جفت شدن اتصال‌های منفذدار در میان سلول‌های گلیال پس از آسیب عصبی یا التهاب افزایش می‌یابد؛ به علاوه، مسدودکننده‌های این اتصال‌های منفذدار تغییرهای القاشده توسط التهاب را در گلیال‌ها و نورون‌ها از بین می‌برند و به طور معنی‌داری درد را کاهش می‌دهند؛ بنابراین مسدودکننده‌های اتصال‌های منفذدار ممکن است دارای خاصیت ذاتی به عنوان داروهای ضد درد باشند (۹). مطالعات پیشین که داده‌های آنها در مراحل انتشارند نشان داده‌اند، تجویز کربنوکسالون به عنوان مسدودکننده اتصال‌های منفذدار به کاهش احساس درد طی آزمون فرمالین منجر شد، با توجه به اهمیت سیستم گاباژژیک در نقل و انتقال درد، این پژوهش به بررسی اهمیت اتصال‌های منفذدار در کارکرد سیستم گاباژژیک در سطح نخاع پرداخته و این فرض را در نظر گرفته که اتصال‌های منفذدار از طریق برهمکنش با سیستم گاباژژیک در انتقال درد در سطح نخاع نقش دارند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ کیلوگرم استفاده شد. حیوانات در شرایط تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته با دمای کنترل شده (۲۲±۲ °C) و بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند و به مدت یک هفته پیش از شروع آزمایش‌ها در فضای آزمایشگاه قرار گرفتند تا با

آزمایش شدند که پس از کانول گذاری هیچ گونه نقص حرکتی نداشتند و به طور کامل، سالم بودند. تمامی داروها با حجم $10 \mu\text{l}$ و به وسیله سرنگ هامیلتون ۵۰ میکرولیتری تجویز شدند.

برای سنجش میزان درد شیمیایی از آزمون فرمالین استفاده شد؛ این آزمون بر مبنای روشی که دابوسون^۱ و دنیس^۲ در سال ۱۹۷۷ برای موش های صحرایی معرفی کرد، انجام گرفت؛ در این آزمون برای القای درد شیمیایی از تجویز 0.05 ml فرمالین $2/5$ درصد به کف پای راست حیوان استفاده شد. پاسخ رفتاری طی آزمون فرمالین در جوندگان شامل دو مرحله نوروزنیک و التهابی است؛ مرحله اول، درد (نوروزنیک)، ناشی از تحریک مستقیم پایانه های اعصاب محیطی توسط فرمالین است که در ۵ تا ۱۰ دقیقه ابتدای تزریق اتفاق می افتد؛ در مرحله دوم درد (التهابی) که ناشی از واکنش های التهابی در بافت های محیطی است، کفای به مدت ۲۰ تا ۶۰ دقیقه پس از تجویز فرمالین مشاهده می شود؛ در این آزمون، پس از تجویز فرمالین، رفتار حیوان به مدت ۱ ساعت بررسی شد، بدین صورت که درجه درد در هر ۱۵ ثانیه ثبت و سپس میانگین درجات درد در هر ۵ دقیقه محاسبه شد. طی این آزمون، پاسخ های رفتاری به درد به صورت شدت درد، کمیتی می شوند، بدین ترتیب که در درجه ۰ حیوان بدون درد است، پا به طور کامل، روی کف واقع شده و وزن حیوان روی آن قرار می گیرد، در درجه ۱، حیوان، نوک پا را روی زمین می گذارد، در درجه ۲، حیوان، پا را تمام مدت بالا نگه می دارد و در درجه ۳، حیوان، پا را تکان می دهد، گاز می گیرد یا لیس می زند (۱۳).

آنالیز آماری داده ها

داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شدند و با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism 5، به روش آنالیز واریانس یک طرفه ارزیابی شدند؛ سپس میانگین داده های گروه ها با آزمون t-student- Newman- Keuls مقایسه-

محیط آزمایشگاه تطابق یابند. تمامی مراحل تکثیر، پرورش حیوانات و آزمایش ها در آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی جانوری دانشگاه فردوسی مشهد و مطابق با دستورالعمل های اخلاقی موجود در خصوص کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت (۱۰). برای انجام آزمایش ها، حیوانات به صورت تصادفی در هشت گروه هفتایی دریافت کننده سالین به عنوان حلال داروها (i.t)، کربنو کسالون (i.t)، موسیمول (i.t)، موسیمول (i.t)- کربنو کسالون (i.t)، بیکوکولین (i.t)، بیکوکولین (i.t)- کربنو کسالون (i.t) تقسیم شدند؛ علاوه بر گروه های یاد شده برای اطمینان از بی تأثیر بودن جراحی در روند آزمایش، یک گروه کنترل نیز وجود داشت که در آن، حیوانات بدون عمل جراحی برای تجویز i.t فقط سالین (i.p) دریافت کردند. کربنو کسالون (1 nM) (Sigma)، موسیمول ($0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Sigma) و بیکوکولین متیو دیده ($0.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Sigma) و 0.3 مورد نظر در هر گروه با فاصله زمانی ۵ دقیقه تجویز شدند و پس از گذشت ۵ دقیقه از حیوانات، آزمون فرمالین به عمل آمد. برای کانول گذاری به منظور تجویز نخاعی (i.t) (Intrathecal injection) از روش Yaksh & Rudy استفاده شد؛ در این روش ابتدا حیوانات با استفاده از تجویز داخل صفاقی کتامین ($100 \text{ mg}/\text{kg}$) و زایلوزین ($20 \text{ mg}/\text{kg}$) بیهوش شدند. پس از ثابت کردن سر حیوان در دستگاه استرئوتاکس، در فاصله میان گوش ها و به طرف پایین، برشی به اندازه 2 cm ایجاد شد و عضلات به آرامی کنار زده شدند تا غشای اطلس-اکسی پیتال نمایان شد؛ پس از آن به کمک یک سوزن سر کج، سوراخی در این غشا ایجاد شد تا مایع مغزی نخاعی خارج شود که نشانه دسترسی به فضای تحت عنکبوتیه بود؛ سپس یک لوله پلی اتیلن 10 به طول 11 cm که در فاصله 8 cm از یک طرف آن با پارافیلیم، برجستگی کوچکی ایجاد شده بود، به آرامی به فضای تحت عنکبوتیه فروبرده شد به طوری که انتهای کانول میان مهره های قطعات کمری ۴ و ۵ قرار گرفت. برای تجویز دارو 3 cm از کانول خارج از نخاع باقی ماند (۱۱ و ۱۲). پس از یک دوره بهبودی ۵ تا ۷ روزه، تنها حیواناتی

¹ - Dubuisson

² - Dennis

شدند و $p < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2007 ترسیم شدند.

نتایج

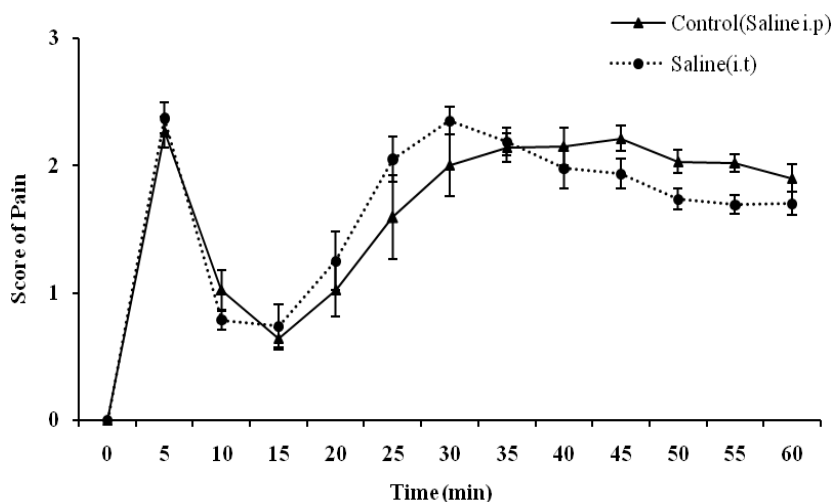
نتایج حاصل از آزمون فرمالین در این مطالعه نشان دادند که حیوانات گروه کنترل (سالمین i.p) و گروه سالمین (i.t) مشابه یکدیگر عمل کرده، بنابراین جراحی بر نتایج آزمون بی تأثیر بوده و هریک از این دو گروه می توانند برای مقایسه با سایر گروه های تجربی استفاده شوند (شکل ۱).

مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در گروه موش های دریافت کننده سالمین (i.t) با گروه دریافت کننده کربنوکسالون (i.t) نشان داد که درد شیمیایی ایجاد شده توسط تزریق کف پای فرمالین، طی هر دو مرحله نوروزنیک و التهابی آزمون فرمالین در گروه موش های دریافت کننده کربنوکسالون به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0.01$) (شکل ۲).

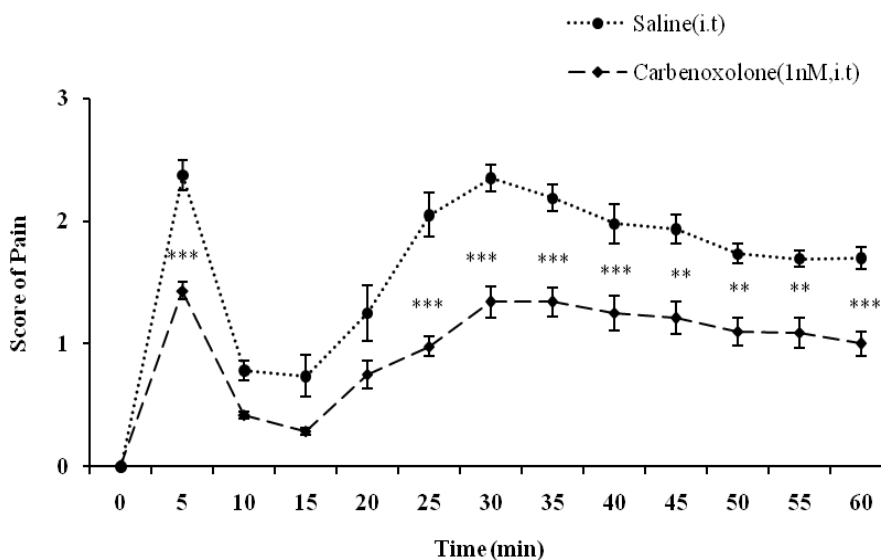
نتایج نشان دادند که تجویز نخاعی موسیمول به عنوان آگونیست گیرنده $GABA_A$ در گروه موش های دریافت کننده موسیمول (i.t) در مقایسه با گروه موش های دریافت کننده سالمین (i.t) به کاهش معنی دار در احساس درد شیمیایی طی هر دو فاز نوروزنیک و التهابی آزمون فرمالین منجر شد ($p < 0.05$)؛ همچنین مقایسه نتایج حاصل از تجویز نخاعی هم زمان موسیمول و کربنوکسالون در گروه موش های دریافت کننده موسیمول (i.t) - کربنوکسالون (i.t) با گروه موش های دریافت کننده موسیمول (i.t) نشان داد که تجویز نخاعی هم زمان موسیمول و کربنوکسالون به کاهش معنی دار احساس درد شیمیایی در هر دو فاز نوروزنیک و التهابی نسبت به تجویز نخاعی موسیمول به تنهایی انجامید ($p < 0.05$) (شکل ۳)؛ به عبارتی، کربنوکسالون باعث تشدید اثر موسیمول در کاهش احساس درد طی آزمون فرمالین شد.

مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در گروه موش های دریافت کننده سالمین (i.t) با گروه دریافت کننده بیکوکولین (i.t) $0.3 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ نشان داد که احساس درد شیمیایی تنها در اواخر مرحله دوم آزمون فرمالین (مرحله التهابی) افزایش یافت و تجویز نخاعی به ایجاد پردردی انجامید ($p < 0.05$)؛ از طرفی، مقایسه نتایج حاصل از تجویز نخاعی هم زمان بیکوکولین و کربنوکسالون در گروه موش های دریافت کننده بیکوکولین (i.t) $0.3 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ - کربنوکسالون (i.t) با گروه موش های دریافت کننده بیکوکولین (i.t) $0.3 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ نشان داد که طی مرحله التهابی آزمون فرمالین، گروه دریافت کننده بیکوکولین همراه با کربنوکسالون کاهشی معنی دار در احساس درد نسبت به گروه دریافت کننده بیکوکولین به تنهایی داشت ($p < 0.01$) (شکل ۴).

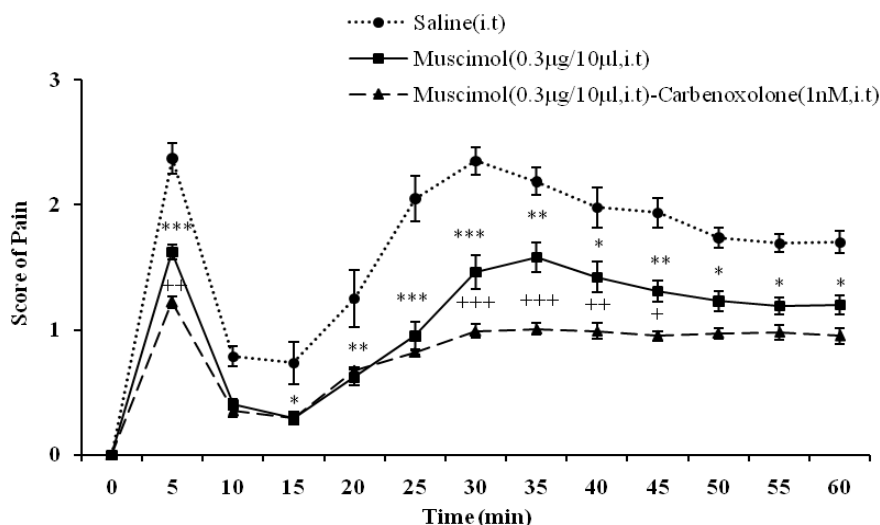
نتایج نشان دادند که تجویز نخاعی بیکوکولین ($10 \mu\text{l}$ $0.6 \mu\text{g}$) به عنوان آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ در گروه موش های دریافت کننده بیکوکولین (i.t) $0.3 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ در مقایسه با گروه موش های دریافت کننده سالمین (i.t) به افزایش معنی دار در احساس درد شیمیایی طی مرحله بینابینی و التهابی آزمون فرمالین منجر شد ($p < 0.01$)؛ همچنین مقایسه نتایج حاصل از تجویز نخاعی هم زمان بیکوکولین و کربنوکسالون در گروه موش های دریافت کننده بیکوکولین (i.t) $0.3 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ - کربنوکسالون (i.t) با گروه موش های دریافت کننده بیکوکولین (i.t) $0.6 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ نشان داد که تجویز نخاعی کربنوکسالون به همراه بیکوکولین سبب می شود آثار پردردی ایجاد شده توسط تجویز بیکوکولین ($10 \mu\text{l}$ $0.6 \mu\text{g}$) در آزمون فرمالین تعدیل شود ($p < 0.05$) (شکل ۵)؛ بنابراین کربنوکسالون به طور معنی داری اثر بیکوکولین را در ایجاد پردردی کاهش داد.



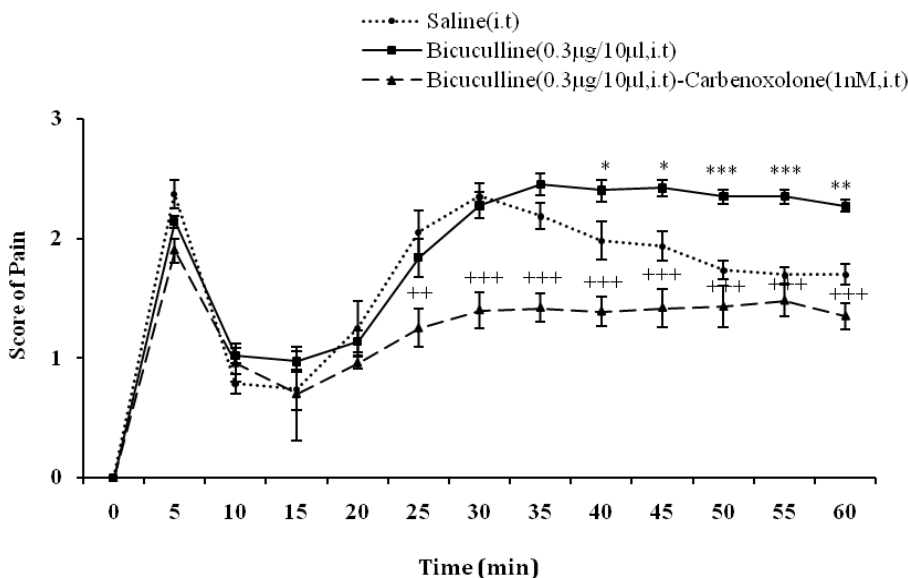
شکل ۱. مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در موش‌های گروه کنترل (سالیین i.p) و موش‌های دریافت‌کننده سالیین (i.t). این نمودار نشان می‌دهد که احساس درد شیمیایی ناشی از تزریق فرمالین در این دو گروه یکسان بوده، عمل جراحی بر روند آزمایش‌ها تأثیری ندارد. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند ($n=7$).



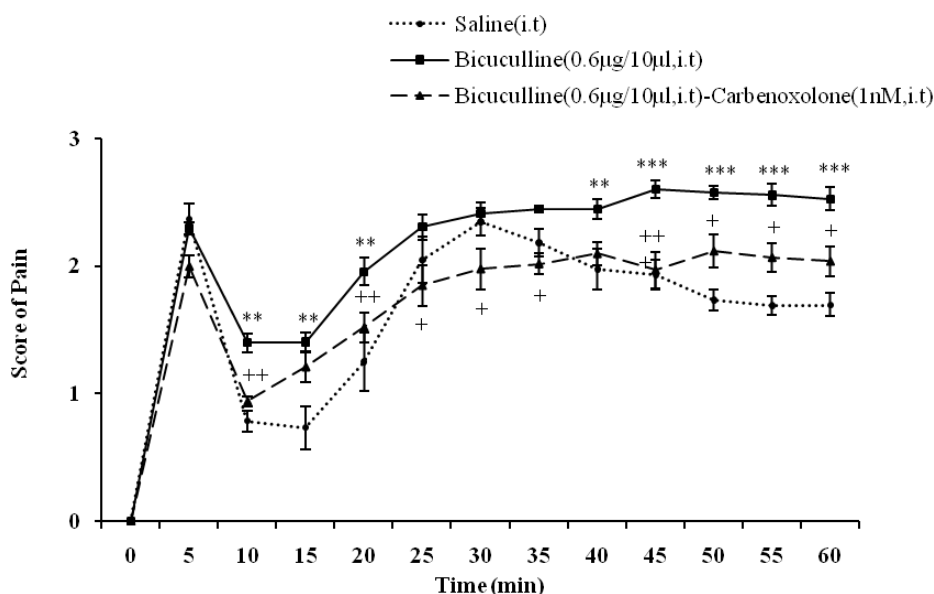
شکل ۲. مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در گروه موش‌های دریافت‌کننده سالیین به‌عنوان حلال دارو (i.t) و گروه موش‌های دریافت‌کننده کربنوکسالون (i.t). نتایج نشان می‌دهد که تجویز نخاعی کربنوکسالون به کاهش معنی‌دار در درد شیمیایی ناشی از آزمون فرمالین طی هر دو فاز نوروزنیک و التهابی منجر شده است ($p < 0.001$ و $p < 0.01$ در مقایسه با گروه سالیین (i.t)). نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند ($n=7$).



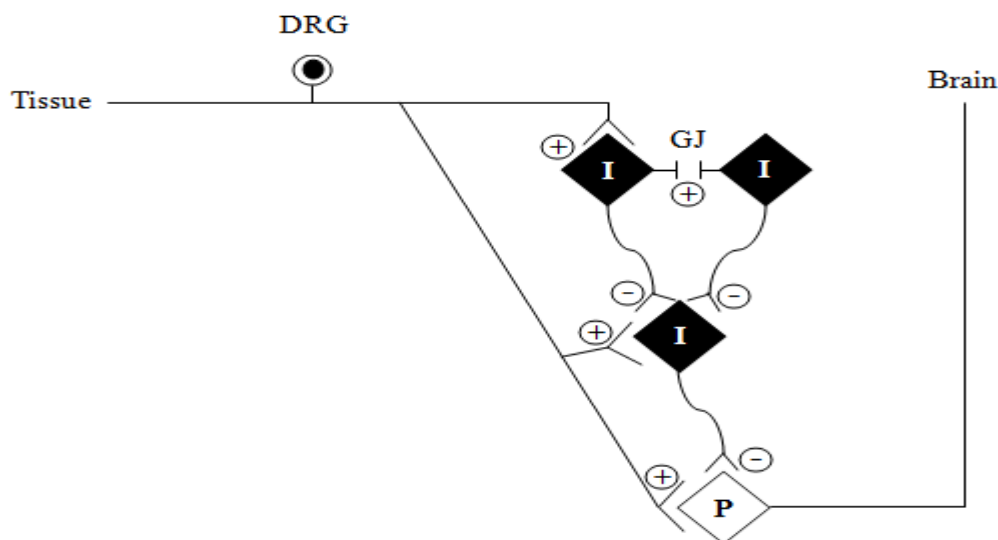
شکل ۳. مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در گروه موش‌های دریافت‌کننده سالین (i.t) و گروه موش‌های دریافت‌کننده موسیمول (i.t) و گروه موش‌های دریافت‌کننده موسیمول (i.t) - کربنوکسالون (i.t). نتایج نشان می‌دهند که تجویز نخاعی موسیمول در مقایسه با موش‌های دریافت‌کننده سالین به کاهشی معنی‌دار در احساس درد شیمیایی ناشی از آزمون فرمالین طی هر دو فاز نورونیک و التهابی منجر شده است ($p < 0.001$ ، $**p < 0.01$ ، $*p < 0.05$ در مقایسه با گروه سالین (i.t)؛ همچنین تجویز نخاعی هم‌زمان موسیمول و کربنوکسالون در مقایسه با گروه دریافت‌کننده موسیمول (i.t) نشان داد که کربنوکسالون باعث تشدید آثار موسیمول شده، احساس درد شیمیایی را در هر دو فاز نورونیک و التهابی کاهش می‌دهد ($p < 0.001$ ، $++p < 0.01$ و $+p < 0.05$ در مقایسه با گروه موسیمول (i.t)). نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند ($n=7$).



شکل ۴. مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در گروه موش‌های دریافت‌کننده سالین (i.t) و گروه موش‌های دریافت‌کننده بیکوکولین (i.t) و گروه موش‌های دریافت‌کننده بیکوکولین (i.t) - کربنوکسالون (i.t). نتایج نشان می‌دهند که تجویز نخاعی بیکوکولین به تنهایی در مقایسه با موش‌های دریافت‌کننده سالین، فقط در مرحله دوم آزمون فرمالین (مرحله التهابی) به ایجاد پردردی منجر شده است ($p < 0.001$ ، $**p < 0.01$ ، $*p < 0.05$ در مقایسه با گروه سالین (i.t)؛ همچنین نتایج نشان می‌دهند که تجویز نخاعی بیکوکولین به همراه کربنوکسالون، کاهش آثار پردردکننده بیکوکولین در مرحله التهابی آزمون فرمالین را در پی داشت ($p < 0.001$ ، $+++p < 0.001$ و $++p < 0.01$ در مقایسه با گروه بیکوکولین (i.t) μl). نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند ($n=7$).



شکل ۵. مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین در گروه موش‌های دریافت‌کننده سالین (i.t) و گروه موش‌های دریافت‌کننده بیکوکولین (۰/۶ µg/۱۰ µl i.t) و گروه موش‌های دریافت‌کننده بیکوکولین (۰/۶ µg/۱۰ µl i.t) - کربنوکسالون (i.t). نتایج نشان می‌دهند که تجویز نخاعی بیکوکولین به‌تنهایی در مقایسه با موش‌های دریافت‌کننده سالین، در مرحله بینابینی و مرحله دوم آزمون فرمالین (فاز التهابی) به ایجاد پردردی منجر شد ($p < 0.001$ ، $p < 0.01$ در مقایسه با گروه سالین (i.t))؛ همچنین مقایسه نتایج حاصل از تجویز نخاعی بیکوکولین به همراه کربنوکسالون نشان داد که کربنوکسالون به‌طور معنی‌داری آثار بیکوکولین در پردردی حاصل از فرمالین را تخفیف داده است ($p < 0.01$ ، $p < 0.05$ در مقایسه با گروه بیکوکولین (۰/۶ µg/۱۰ µl i.t)). نتایج به‌صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند ($n = 7$).



شکل ۶. مدار پیشنهادی برای وجود اتصال‌های منفذدار میان اینترنورون‌های مهارتی در شاخ پشتی نخاع. I: اینترنورون مهارتی به‌احتمال از نوع GABA، P: نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد (Projection neurons)، DRG: گانگلیون ریشه پشتی نخاع (ترسیم توسط نگارنده).

بحث و نتیجه‌گیری

در راستای نتایج پیشین، (داده‌های ارائه‌شده برای انتشار)، کربنوکسالون در این تحقیق نیز به کاهش احساس درد در دو مرحله آزمون فرمالین منجر شد (شکل ۲)؛ گزارش‌هایی دیگر نیز گویای نقش اتصال‌های منفذدار در انتقال درد هستند. کربنوکسالون باعث ایجاد بی‌دردی در آزمون‌های درد مختلف می‌شود که ممکن است از طریق به‌هم‌ریختن آرایش کانکسین‌ها ایجاد این اثر را سبب‌شود (۱۴ و ۱۵). از بین رفتن آلودانیای مکانیکی و پردردی حرارتی توسط کربنوکسالون، بازتابی از اثر روی اتصال‌های منفذدار است (۱۴). سلول‌های گلیال در حقیقت به‌طور الکتریکی و از طریق اتصال‌های منفذدار به شکل شبکه‌ای گسترده در ارتباط هستند؛ فعالیت زیاد این سلول‌ها در یک محل می‌تواند به فعالیت سلول‌های گلیال دورتر منجر شود؛ این سلول‌های گلیال ممکن است باعث آزادسازی موادی شوند که احساس درد را افزایش دهند (۱۴ و ۱۶)؛ پس انسداد اتصال‌های منفذدار می‌تواند باعث کاهش آزادسازی این مواد، کاهش التهاب و احساس درد شود. مطالعات نشان داده‌اند که میکروگلیاها، آستروسیت‌ها و نورون‌های نخاع کم‌ری با تزریق کف‌پایی فرمالین به موش صحرائی فعال می‌شوند (۱۷).

نورون‌های گابا‌ارژیک در سرتاسر شاخ پستی نخاع فراوان‌اند به‌طوری‌که به تقریب، تمام سلول‌های لامینای ۱ تا ۳، حاوی گلیاسین و همچنین GABA هستند؛ البته جمعیت‌هایی از سلول‌ها فقط حاوی GABA می‌باشند (۱۸). GABAی آزادشده در نخاع در پاسخ به تزریق فرمالین از دو منبع تأمین می‌شود (۱۹ و ۲۰)؛ منبع اصلی GABA در نخاع، اینترنورون‌های نخاعی هستند، به‌طوری‌که آوران‌های اولیه با دندریت اینترنورون‌های گابا‌ارژیک در نخاع ارتباطات سیناپسی برقرار کرده، بنابراین GABAی آزادشده از اینترنورون‌های نخاعی نتیجه فعالیت مستقیم آوران‌های اولیه گلو‌تاماترژیک و

پپتیدرژیک ناشی از تحریک آوران‌های درد است؛ منبع دوم نورون‌های گابا‌ارژیک در Rostroventral medulla هستند (۲۰). گیرنده‌های GABA_A در ریشه پستی نخاع (۲۱)، فیبرهای آوران اولیه (۱۸)، اینترنورون‌های مهاری (۴، ۱۸) و نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد در لامیناهای نخاعی (۲۰ و ۲۲) وجود دارند لذا به دنبال یافته‌ها و اطلاعات یادشده، این پژوهش درصدد جستجوی وجود رابطه احتمالی میان سیستم گابا‌ارژیک و اینترنورون‌های مرتبط با اتصال‌های منفذدار در سطح نخاع و در انتقال پیام درد برآمده است.

توضیح، اینکه در نورون‌های شاخ پستی نخاع، ناقل همراه پتاسیم - کلرید (KCC2) به کاهش غلظت Cl⁻ درون سلولی منجر شده که شرایط را برای هایپرپلاریزاسیون و مهار نورونی پس از تحریک و فعال-سازی گیرنده‌های GABA_A و گلیاسین فراهم می‌کند. در آوران‌های اولیه درد نیز باز شدن کانال کلرید مرتبط با گیرنده GABA_A باعث مهار سلول با غیرفعال شدن کانال-های سدیمی (به دلیل پدیده Accommodation) و همچنین کاهش جریان ورودی کلسیم به پایانه سیناپسی و در نتیجه، کاهش آزادسازی میانجی‌های عصبی تحریکی می‌شود (۲۳)؛ بنابراین انتظار می‌رود که موسیمول در شرایط طبیعی با تقلید عملکرد GABA و اثر بر گیرنده‌های GABA_A در نورون‌های شاخ پستی نخاع، باعث مهار سلول و در نتیجه کاهش انتقال ایمپالس درد در نخاع شده، آنتاگونیزه کردن گیرنده‌های GABA_A با بیکوکولین به بروز آثار معکوس می‌انجامد. در گذشته، مشخص شده که موسیمول به کاهش احساس درد و بیکوکولین، باعث افزایش احساس درد می‌شود (۲۴) که با نتایج این تحقیق هم‌راستا است (شکل ۳، ۴ و ۵)، در این تحقیق به مداخله آثار تجویز هم‌زمان این مواد با کربنوکسالون در احساس درد در سطح نخاع پرداخته شده است. با توجه به حضور اینترنورون‌های مهاری و تحریکی در شاخ پستی نخاع (۴) و با توجه به مدارهای نورونی توزیع شده در نورون‌های سطح شاخ

پشتی نخاع (۲۵ و ۲۶)؛ همچنین براساس نتایج این پژوهش که توضیح آن خواهد آمد، شاید بتوان این فرضیه احتمالی را مطرح کرد که میان اینترنورون‌های مهارى اولیه در شاخ پشتی نخاع اتصال‌های منفذدار وجود دارند و آنها از طریق اینترنورون‌های مهارى ثانویه به نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد مربوط می‌شوند (شکل ۶)؛ به‌طور خلاصه در این پژوهش مشاهده شد که در سطح نخاع ۱- تحریک گاباآرژیک (با موسیمول) به کاهش احساس درد (شکل ۳) منجر شد؛ ۲- مهار گاباآرژیک (با بیکوکولین) به افزایش احساس درد (شکل ۵) انجامید؛ ۳- انسداد اتصال‌های منفذدار (با کربنوکسالون) باعث کاهش احساس درد (شکل ۲) شد؛ ۴- تحریک گاباآرژیک ضمن انسداد اتصال‌های منفذدار، باعث تشدید روند کاهش درد (شکل ۳) شد و ۵- مهار گاباآرژیک هم‌زمان با انسداد اتصال‌های منفذدار به تخفیف در افزایش احساس درد ناشی از مهار گاباآرژیک انجامید (شکل ۵). بنابر نتایج و با استفاده از شواهد علمی، شاید بتوان این فرض را مطرح کرد که اینترنورون‌های ثانویه مهارکننده‌ای میان اینترنورون‌های مهارى اولیه و نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد وجود داشته باشند (شکل ۶). اکنون با فرض وجود اتصال‌های منفذدار میان اینترنورون‌های مهارى اولیه، این اتصال‌ها باعث تقویت اثر مهارى اینترنورون‌های اولیه روی اینترنورون‌های مهارى ثانویه می‌شوند؛ این تشدید مهار در مهار، به معنای رفع مهار از روی نورون‌های انتقال‌دهنده پیام درد به مناطق بالاتر مغزی و افزایش ادراک درد است (۲۶ و ۲۷). ثبت‌های الکتریکی گرفته‌شده از نورون‌های سطح شاخ پشتی نخاع با فرضیه یادشده همخوانی دارند و نشان‌دادند که اینترنورون‌های مهارى، روی اینترنورون‌های مهارى دیگری اعمال نفوذ می‌کنند و این آرایش سیناپسی، زمینه‌ساز رفع مهار موضعی بوده، ممکن است نقشی کلیدی در پردازش اطلاعات درد داشته باشد (۲۷)؛ با این فرض، کاهش درد به دنبال فعال‌سازی $GABA_A$ در سطح نخاعی توسط موسیمول و کاهش بیشتر این ضددردی به دنبال انسداد هم‌زمان در

اتصال‌های منفذدار توسط کربنوکسالون (شکل ۳) قابل‌توضیح می‌شود زیرا طبق فرضیه بالا، ابتدا مسدود کردن اتصال‌های منفذدار میان اینترنورون‌های مهارى اولیه می‌تواند باعث کاهش اثر مهارى روی اینترنورون‌های مهارى ثانویه شود که به نوبه خود به مهار بهتر نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد و کاهش ارسال سیگنال‌های درد منجر می‌شود (شکل ۲)؛ اکنون این مهار می‌تواند به آثار مهارى ناشی از فعال‌سازی گیرنده $GABA_A$ به کمک موسیمول، نیز اضافه شود و درد، بیشتر کاهش یابد (شکل ۳).

مهار آنتاگونیستی گیرنده $GABA_A$ به کمک بیکوکولین در سطح نخاع به دلیل کاهش آثار مهارى $GABA_A$ روی نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد می‌بایست احساس درد را افزایش دهد (پردردی) (شکل ۵) و اگر در همین ضمن در اتصال‌های منفذدار میان اینترنورون‌های مهارى اولیه، انسداد ایجاد شود می‌باید پردردی ناشی از بیکوکولین تخفیف یابد، همان‌گونه که از نتایج نیز برآمد (شکل ۵)، زیرا طبق فرض بالا، انسداد اتصال‌های منفذدار میان اینترنورون‌های اولیه، اثر مهارى روی اینترنورون‌های ثانویه را کاهش داده که به افزایش هم‌زمان در رهائش میانجی مهارى روی نورون‌های انتقال‌دهنده علائم درد نخاعی منجر می‌شود؛ این افزایش رهائش میانجی مهارى می‌تواند با اثر بیکوکولین در مهار گیرنده‌های $GABA_A$ مخالفت کرده و لذا اثر پردردکنندگی بیکوکولین را تخفیف دهد (شکل ۶).

در مجموع، یافته‌های این تحقیق ضمن تأیید مطرح‌کردن نقش احتمالی اتصال‌های منفذدار در انتقال و تعدیل علائم درد در سطح نخاع، درخصوص چگونگی ایفای این نقش و تعدیل‌ها، احتمال وجود این اتصال‌های سلولی را در سلول‌های مهارى گاباآرژیک مطرح می‌کند. برای توضیح یافته‌های این پژوهش و با استفاده از شواهد علمی، سازوکار عملی این اتصال‌ها در انتقال و تعدیل درد آنجان فرض و ارائه شده است که در سطح نخاع، اینترنورون‌های مهارى اولیه‌ای در نظر گرفته شده که به کمک اتصال‌های باز به هم مرتبط بوده،

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد بوده، بدین وسیله از مؤسسه یادشده نهایت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

این اینترنورون‌ها به اینترنورون‌های مهاری ثانویه‌ای سیناپس می‌دهند که به نوبه خود، نورون‌های نخاعی انتقال‌دهنده علائم درد را مهارکنند و این مجموعه با هم دست‌کم در بخشی از پردازش علائم ارسالی درد مشارکت داشته‌باشند (شکل ۶)

منابع

- Lynch JW, Callister RJ. Glycine receptors: a new therapeutic target in pain pathways. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006; 7: 48-53.
- Zeilhofer HU. The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62: 2027-35.
- Kohno T, Kumamoto E, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. Action of opioids in excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol*. 1999; 518: 803-13.
- Christopher WL, Khandwala H, Osmond G, Hefferan M. Coadministration of intrathecal strychnine and bicuculline effects synergistic allodynia in the rat: an isobolographic analysis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 296: 756-61.
- Dohi T, Morita K, Kitayama T, Motoyama N, Morioka N. Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for neuropathic pain. *Pharmacol Ther*. 2009; 123: 54-79.
- Mese G, Richad G, White T. Gap junction: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 2007; 127: 2516-24.
- Meier C, Dermietzel R. Electrical synapses-gap junctions in the brain. *Results Probl Cell Differ*. 2006; 43: 99-128.
- Goodenough DA, Pau DL. Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 26: 1-19.
- Huang TY, Belzer V, Hanani M. Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. *Eur J Pain*. 2010; 14: 1-11.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *J Pain*. 1983; 16: 109-10.
- Yaksh TL, Rudy TA. Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain*. 1978; 4: 229-359.
- Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Intrathecal injection of carbenoxolone, a gap junction decoupler, attenuates the induction of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*. 2010; 224: 123-32.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rat and cat. *Pain*. 1977; 4: 161-74.
- Spataro LE, Sloane EM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Schoeniger D, Jekich BM, Barrientos RM, Maier SF, Watkins LR. Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation. *J Pain*. 2004; 5: 392-405.
- Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics*. 2010; 7: 482-93.
- Bruzzone R, Dermietzel R. Structure and function of gap junctions in the developing brain. *Cell Tissue Res*. 2006; 326: 239-48.
- Qin M, Wang JJ, Cao R, Zhang H, Duan L, Gao B, Xiong YF, Chen LW, Rao ZR. The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Neurosci Res*. 2006; 55: 442-50.
- Sorkin LS, Puig S, Jones DL. Spinal bicuculline produces hypersensitivity of dorsal horn neurons: effects of excitatory amino acid antagonists. *J Pain*. 1998; 77: 181-90.
- Suh HW, Kim YH, Choi YS, Choi SR, Song DK. Effects of GABA receptor antagonists injected spinally on antinociception induced by opioids administered supraspinally in mice. *Eur J Pharmacol*. 1996; 307: 141-7.
- Kaneko M, Hammond DL. Role of spinal gamma-aminobutyric acid A receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 282: 928-38.
- Naik AK, Pathirathna S, Jevtovic-Todorovic V. GABAA receptor modulation in dorsal root ganglia in vivo affects chronic pain after nerve injury. *Neurosci*. 2008; 154: 1539-53.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM. Laminar compartmentalization of GABA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci*. 1996; 16: 2863-97.
- Price TJ, Cervero F, Koninck YD. Role of cation-chloride-cotransporters (ccc) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem*. 2005; 5: 547-55.
- Lee IO, Lim ES. Intracisternal or intrathecal glycine, taurine, or muscimol inhibit bicuculline-induced allodynia and thermal hyperalgesia in mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2010; 31: 907-14.
- Graham BA, Brichta AM, Rj C. Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol*. 2007; 98: 1057-63.
- Chen YP, Chen SR, Pan HL. Effect of morphine on deep dorsal horn projection neurons depends on spinal GABAergic and glycinergic tone: implications for reduced opioid effect in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 315: 696-703.
- Labrakakis C, Lorenzo LE, Bories C, Riberio-da-silva A, Koninck YD. Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Mole pain*. 2009; 2: 1-8.

The effect of intrathecal administration of gap junction blocker and GABA_A agonist and/or antagonist on chemical pain behavioral responses in male rat

Simin Afshar-Kargar¹, Masoud Fereidoni^{2*}, Naser Mahdavi-Shahri³

1. M. Sc. of Animal Physiology - Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Associate Professor - Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Professor - Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Email: fereidoni@um.ac.ir

Background and Objective: GABAergic inhibitory interneurons are distributed in spinal cord for pain sensation, so that muscimol and bicuculline (GABA_A agonist and antagonist) reduces and enhances pain, respectively. Gap junctions (Gj) are membrane contacts for exchanging the signaling agents and small metabolites. Using spinal administration (i.t) of carbenoxolone (Gj blockers), this study tried to understand the Gj and spinal GABAergic system roles on chemical pain sensation.

Materials ad Methods: Male Wistar rats (200-250 g) were divided into 8 groups (n=7). The drugs were injected at 10 µl volume intrathecally including carbenoxolone (1nM), muscimol (0.3 µg) and bicuculline (0.3 and 0.6 µg) individually or as a form of co-treatment. Sub-plantar injection of 0.05 ml of 2.5% formalin was used and pain related behaviors were recorded for 1 hour.

Results: Carbenoxolone and muscimol reduced pain (p<0.01 and p<0.05, respectively), and bicuculline elevated pain (p<0.01) induced by formalin. Carbenoxolone co-treatment with muscimol reduced pain more than each one (p<0.05). Administration of carbenoxolone reduced hyperalgesia induced by bicuculline (p<0.05).

Conclusion: Muscimol analgesic effect elevation and bicuculline hyperalgesic effect alleviation followed by Gjs blockade might be explained when the existence of Gj is considered between a primary inhibitory interneuron effective on a secondary interneuron which inhibits spinal pain projection neurons.

Key words: Pain, Intrathecal injection, Gap junctions, Carbenoxolone, GABA_A