Archive of SID

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال چهارم، شماره دوم، پیاپی چهاردهم، پاییز ۱۳۹۴ (۴۳-۳۷)

تأثیر مهاری بیکوکولین بر نورون‌های دوکی ناحیه پارابراکیال در موش‌های صحرایی نر در مدل درد تونیک

مهسا کمالی[۱]، کاظم جوانمردی[۲*]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران و عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد جهرم،دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
۲. استادیار فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۸ – تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۸/۲۵)

چکیده

گابا ناقل عصبی است که نقش اصلی را در فرآیند مهار پیام‌های درد مزمن به عهده دارد. هسته پارابراکیال در جنبه های شناختی و احساسی درد نقش مهمی دارد. بنابراین هدف از این مطالعه تأثیر مهاری بیکوکولین بر نورو نهای دوکی ناحیه پارابراکیال در موش های صحرایی نر در مدل درد تونیک بود. در این مطالعه تجربی از ۳۵ موش نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰ الی ۳۰۰ گرم به ٤ گروه کنترل، دوزهای ۱۰۰، ۵۰ و ۲۰۰ نانوگرم/رت تقسیم شدند. بیکوکولین توسط سرنگ هامیلتون و لوله پلی اتیلن به ناحیه پارابراکیال به موش‌ها تزریق شد. در مطالعه حاضر از آزمون فرمالین استفاده گردید و سپس برای بررسی بافت‌شناسی سلول‌های دوکی از رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین استفاده شد. تعداد سلول‌های دوکی در هسته پارابراکیال در گروه کنترل و دوزهای ۵۰ و۱۰۰ نانوگرم/رت تغییر معناداری نداشت اما میزان این سلول‌ها در دوز ۲۰۰ نانوگرم کاهش معناداری ($p<۰/۰۵$) داشت. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد تحریکات دردزا سبب تغییر تعداد نورون دوکی در هسته پارابراکیال که به عنوان یکی از مراکز سیستم تعدیل درد می‌باشد شده است که این تغییر در تعداد بیان کننده ارتباط بین عملکرد سلول‌ها در بالاترین دوز آنتاگونیست گیرنده در مقابل محرک درد زا است.

واژه‌های کلیدی: پارابراکیال، بیکوکولین، نورون دوکی، فرمالین، گابا.

The inhibitory effect of bicuculline on the fusiform neurons in the parabrachial nucleus on tonic pain model in rats: role of GABAergic

Mahsa Kamali[1], Kazem Javanmardi[2*]
1. M. Sc. Student, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran and Young Researchers and Elite Club, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
2. Assistant Professor, Department of physiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran
(Received: Oct. 30, 2014 - Accepted: Nov. 16, 2015)

Abstract

GABA is a neurotransmitter that is an essential role in the inhibition of pain and GABA signals responsible for chronic pain. Parabrachial nucleus is involved in cognitive and emotional aspects of pain. The purpose of this study is to evaluate the inhibitory effect of bicuculline on the fusiform neurons of the parabrachial nucleus on tonic pain model in rats. In this study, 35 male Wistar rats weighting approximately 250-300g were divided into four groups: Control, 50, 100 and 200 ng/rat. Bicycling was injected through the cannula in Parabrachial area using a Hamilton syringe and polyethylene tubing. Formalin tests were used in this study and then fusiform cells were counted using hematoxylin and eosin staining. The fusiform cells in Control and the doses of 50 and 100 ng/rat groups did not change significantly, but in the dose of 200ng group, the cells in parabrachial nucleus were significantly reduced ($p<0.05$). The results of our study indicated that nociceptive stimulation causes changes in the number of fusiform neurons in parabrachial nucleus and it expresses the relationship between function and the number of cells at the highest dose of the antagonist of GABA cells in chronic pain.

Keywords: parabrachial, bicuculline, fusiform neurons, formalin, GABA.

* نویسندهٔ مسئول: E-mail: k.javanmard @yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

درد یک حس نامطلوب است که تحت تأثیر دامنه وسیعی از عوامل محرک به وجود می‌آید. این حس مکانیسم دفاعی بدن است که هر زمان بافتی دچار آسیب شود فرد را وادار می‌سازد که از خود واکنش نشان دهد و محرک مولد درد را از میان بردارد. درجه واکنش هر فرد نسبت به درد متغیر است. این امر تا حدودی ناشی از توانایی مغز برای کنترل پیام‌های ورودی به سیستم عصبی توسط فعال کردن یک سیستم کنترل درد موسوم به سیستم ضددرد می‌باشد (Guyton *et al*., 2005).

مطالعاتی که درمورد میزان شیوع درد در جامعه آمریکا انجام شد نشان داد که میزان شیوع دردهای مزمن ۶۰-۲۰ درصد می‌باشد. این مطالعه همچنین نشان داد که سالانه درآمریکا حدود ۶۱ میلیارد دلار صرف معالجه سر درد، کمر درد، دردهای عضلانی و روماتیسمی می‌شود (Chlminski *et al*., 2005).

ناحیه پارابراکیال در ناحیه خلفی جانبی ساقه مغز در محل اتصال پل مغزی (در زیر مخچه) و مزانسفال (در زیر کالیکولوس تحتانی) قرار گرفته است. در حقیقت یک قسمت از پارابراکیال به داخل مزانسفال گسترش یافته وقسمت دیگر در پل مغزی قرار دارد (Bernard, 2007; Carey, 2014). دو ناحیه در پارابراکیال در بروز اعمال این ناحیه ازاهمیت بیشتری برخوردار است. یکی ناحیه جانبی پارابراکیال که ناحیه‌ای است که پیام‌های دردآور را از لایه یک شاخ خلفی نخاع دریافت می‌کند و دیگری ناحیه میانی پارابراکیال که در حس چشایی نقش داشته و در قسمت میانی و قدامی نسبت به پایک مخچه‌ای فوقانی قرار گرفته است (Bernard, 2007; Li Esther *et al*., 2005;). این ناحیه در بروز بعضی از پاسخ‌های سیستم اتونوم به خصوص پاسخ‌های سیستم اتونوم در هنگام درد نقش دارد. بسیاری از آوران‌هایی که از لایه یک و دو شاخ خلفی نخاع منشاء می‌گیرند به این ناحیه ختم می‌شوند (Hermanson & Blomqvist, 2005; Jergova *et al*., 2008).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که گابا در بروز بسیاری از اعمال ناحیه پارابراکیال نقش دارد. مهار گیرنده‌های گابا A در ناحیه پارابراکیال، سبب افزایش فعالیت نورونی در تالاموس می‌شود. به نظر می‌رسد که فعالیت نورونی در ناحیه پارابراکیال تحت کنترل شدید نورون‌های گاباارژیک می‌باشد. نورون‌های گاباارژیک در مناطقی از مغز که ورودی‌های خود را به ناحیه پارابراکیال می‌رسانند، به میزان زیادی یافت می‌شوند (Everton, 2013). با توجه به نقش این هسته در تعدیل درد و توجه به این موضوع که تاکنون تحقیقی در ارتباط با مطالعات هیستولوژیکی این هسته در ارتباط با درد تونیک صورت نگرفته است در این پژوهش برای اولین بار به بررسی اثربیکوکولین به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده گابا A بر نورون‌های دوکی در ناحیه پارابراکیال در موش‌های صحرایی نر در مدل درد تونیک پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ تا۳۰۰ گرم انجام شد. نگهداری حیوانات در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و در دوره ۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی و دسترسی آزاد به غذا و آب، در حیوان خانه نگهداری شدند. پس از بیهوشی با پنتوباربیتال سدیم به میزان ۵۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن که به صورت داخل صفاقی تزریق شد، حیوانات به دستگاه استریوتاکسی منتقل شده و ناحیه پارابراکیال جانبی بر اساس اطلس پاکسینوس کانول‌گذاری شد (±1.6 mm midline, -0.9 mm bregma, -2.5 mm Skull) در این حالت، کانول‌های شماره ۲۳ در ۲ میلی‌متری بالای ناحیه پارابراکیال خارجی جانبی کار گذاشته شد یک هفته بعد از کانول‌گذاری، حیوانات با استفاده از آزمون

www.SID.ir

Archive of SID

فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمون فرمالین یک روش استاندارد جهت اندازه‌گیری پاسخ‌های ایجاد شده به محرک‌های دردزای شیمیایی می‌باشد (Dubuisson & Dennis, 1997). دراین آزمون، حیوان در یک جایگاه ویژه که شامل یک چهار پایه آلومینیومی است و روی آن یک صفحه شیشه‌ای قرار دارد درون اتاقکی مستقر می‌شود. در زیر صفحه شیشه‌ای، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه تعبیه شده است که مشاهدات را آسان‌تر و دقیق‌تر می‌کند. قبل از هر آزمایش، حیوان مورد نظر به طور دقیق وزن شده و پس از انجام تزریق داخل صفاقی مورد نظر، برای سازگاری با محیط جدید، ۱۵ دقیقه قبل از شروع آزمون، درون جایگاه مشاهده قرار داده می‌شد. پس از آن حیوان را در محفظه مقیدکننده گذاشته و مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر فرمالین رقیق شده ۲/۵ درصد با استفاده از سرنگ انسولین به زیر پوست کف پای چپ حیوان تزریق می‌شد.

پس از تزریق فرمالین حیوان بلافاصله به جایگاه مشاهده برگردانده شده و به مدت ۱ ساعت پاسخ‌های حیوان به محرک دردزاتوسط کورنومتر و بر حسب ثانیه ثبت گردیدند (Victoria, 2009).

تزریق داروها به داخل ناحیه پارابراکیال جانبی، از طریق یک سر سوزن شماره ۳۰ که ۲ میلی‌متر بلندتر از کانول راهنما می‌باشد، صورت گرفت.

حجم تزریق، ۰/۵ میکرولیتر بود که از طریق یک سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتری صورت گرفت. برای بررسی گیرنده‌های گابا A از آنتاگونیست این گیرنده، بیکوکولین (توکریس، انگلستان) به میزان ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم در ناحیه پارابراکیال جانبی تزریق شد. در گروه‌های کنترل نیز در هر دو مورد سالین به میزان نیم میکرولیتر تزریق شد. در انتهای آزمایش، پس از کشته شدن حیوان، با تزریق ۰/۵ میکرولیتر متیلن‌بلو و تهیه برش‌هایی به ضخامت ۵۰ میکرومتر صحت کانول‌گذاری مورد ارزیابی قرار گرفت.

از هر سطح ۱۰ برش انتخاب شده و مورد مطالعه نهایی میکروسکوپی قرار گرفت. بنابراین از هر موش ۲۰ برش منتخب از ناحیه هسته پارابراکیال با استفاده از میکروسکوپ مجهز به دوربین عکس برداری شدند برای شمارش نورون‌ها در هسته پارابراکیال مربعی به مساحت ۹۰۰۰۰ میلی‌مترمربع در نظر گرفته شد و بررسی نهایی فقط بر روی نورون‌هایی که در این محدوده قرار گرفته بودند انجام گرفت.

داده‌های تجربی از نظر آماری با استفاده از t-test تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

نتایج نشان داد که بیشترین درصد نورون‌های هسته پارابراکیال را نورون‌های دوکی شکل تشکیل می‌دهند، در نتیجه بررسی‌ها بر روی نورون‌های دوکی هسته پارابراکیال متمرکز شده است.

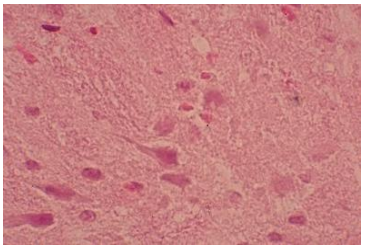
در مقایسه تعداد نورون‌های دوکی در دوز ۵۰ نانوگرم قبل از آزمون فرمالین (۱/۲۱±۲۵۶/۲۴) نسبت به گروه کنترل (۱/۰۲±۲۵۵/۰۲) و بعد از آزمون (۱/۲۱±۲۵۶/۲۶) نسبت به گروه کنترل (۱/۲۵±۲۵۵/۰۳) تفاوت معناداری را نشان نداد (نمودار ۱) (تصویرهای ۱ و ۲).

در مقایسه تعداد نورون‌های دوکی در دوز ۱۰۰ نانوگرم در قبل از آزمون (۱/۲۵±۲۵۵/۱۶) نسبت به گروه کنترل (۱/۰۲±۲۵۵/۰۲) و بعد از آزمون فرمالین (۱/۲۵±۲۵۶/۳۷) نسبت به گروه کنترل (۱/۲۵±۲۵۵/۰۳) افزایش رانشان داد اما این تفاوت از نظر آماری معنادار ($p<0/05$) (شکل ۲) (تصویر ۳).

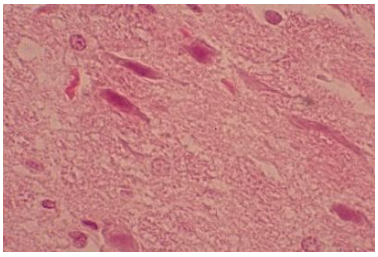
در مقایسه تعداد نورون‌های دوکی در دوز ۲۰۰ نانوگرم در قبل از آزمون (۱/۲۶±۲۵۶/۱۶) نسبت به گروه کنترل (۱/۰۲±۲۵۵/۰۲) و بعد از آزمون فرمالین (۱/۲۰±۲۵۰/۳۷) نسبت به گروه کنترل (۱/۲۵±۲۵۵/۰۳) کاهش معناداری را نشان داد (شکل ۳) (تصویر ۴).

www.SID.ir

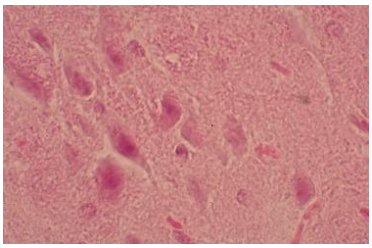
Archive of SID



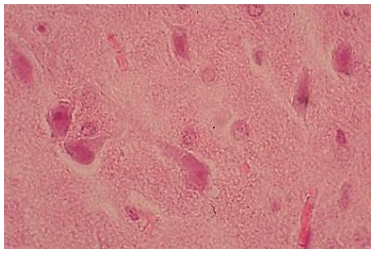
تصویر ۱. فتومیکروگراف نورون‌های دوکی شکل هسته پارابراکیال مغز موش‌های صحرایی در گروه کنترل با بزرگنمایی ۱۰۰ (هماتوکسیلین- ائوزین)



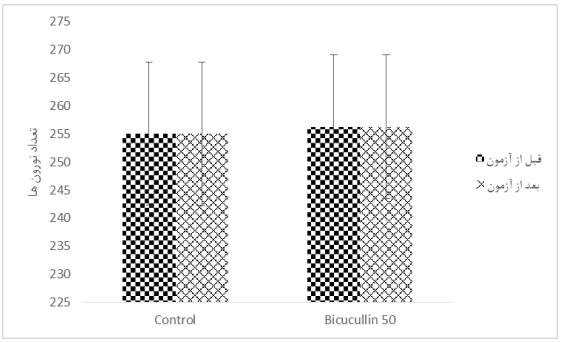
تصویر ۳. فتومیکروگراف نورون‌های دوکی شکل هسته پارابراکیال مغز موش‌های صحرایی در گروه دریافت‌کننده بیکوکولین با دوزهای ۱۰۰ نانوگرم با بزرگنمایی ۱۰۰ (هماتوکسیلین- ائوزین)



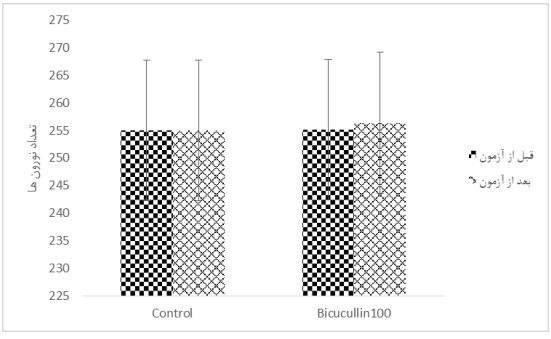
تصویر ۲. فتومیکروگراف نورون‌های دوکی شکل هسته پارابراکیال مغز موش‌های صحرایی در گروه دریافت‌کننده بیکوکولین با دوزهای ۵۰ نانوگرم با بزرگنمایی ۱۰۰ (هماتوکسیلین – ائوزین)



تصویر ٤. فتومیکروگراف نورون‌های دوکی شکل هسته پارابراکیال مغز موش‌های صحرایی در گروه دریافت‌کننده بیکوکولین با دوزهای ۲۰۰ نانوگرم با بزرگنمایی ۱۰۰ (هماتوکسیلین- ائوزین)



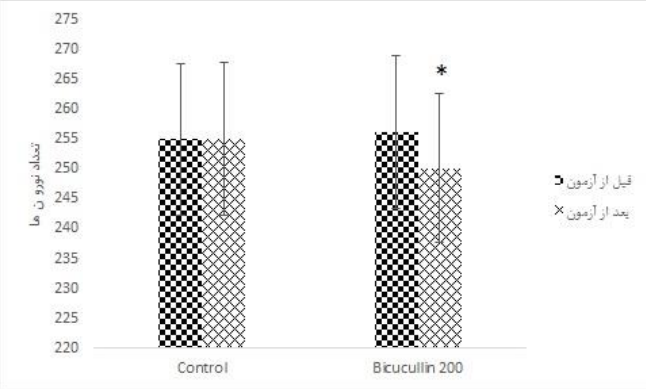
نمودار ۱. مقایسه تغییرات تعداد سلول‌های دوکی در هسته پارابراکیال پس از تزریق دوز ۵۰ نانوگرم نسبت به گروه کنترل



نمودار ۲. مقایسه تغییرات تعداد سلول‌های دوکی در هسته پارابراکیال پس از تزریق دوز ۱۰۰ نانوگرم نسبت به گروه کنترل

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳. مقایسه تغییرات تعداد سلول‌های دوکی در هسته پارابراکیال پس از تزریق دوز ۲۰۰ نانوگرم نسبت به گروه کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که بیشترین درصد نورون‌های موجود در هسته پارابراکیال را هسته‌های دوکی شکل تشکیل می‌دهد که برای اولین بار گزارش شده است.

یافته‌ها نشان می‌دهد که القای درد تونیک ناشی از فرمالین، سبب تغییر در تعداد نورون‌های دوکی شکل تنها دردوز ۲۰۰ نانو گرم می‌شود.

از آنجا که نورون‌ها قابلیت تکثیر ندارند، لذا این نتایج حاکی از این است که بیکوکولین در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ خاصیت سمی نداشته و باعث القا مرگ سلولی نمی‌شود اما دوز ۲۰۰ نانوگرم این آنتاگونیست خاصیت سمی داشته و باعث کاهش تعداد نورون‌های دوکی در این هسته شده است و از آنجا که تعداد این نورورن‌ها بیش از سایر نورون‌های این هسته است احتمالاً آوران‌های بیشتری از نخاع دریافت می‌کنند و در نتیجه پس از مهار توسط آنتاگونیست عکس‌العمل قابل توجه‌تری در بالاترین دوز از خود نشان می‌دهد.

عدم تغییر در تعداد نورون‌های دوکی در این هسته نشان‌دهنده عدم تأثیر بیکوکولین بر گیرنده‌های گابا در درد مزمن دارد که نتایج این پژوهش با نتایج Javanmardi *et al*. (2013) تطابق دارد.

بیکوکولین در دوزهای ۲۵ و ۴۰ نانوگرم به داخل یک ماده خاکستری دور قنات سیلویوس سبب مهار آزمون پس کشیدن دم و همچنین افزایش فعالیت خودبه‌خودی سلول‌های «off» و کاهش فعالیت سلول‌های «on» در RVM گردیده است (Enza, 2013) در RVM نیز تزریق دوزهای ۲۵-۲۰۰ نانوگرم بیکوکولین به صورت وابسته به دوز سبب بروز بی‌دردی شد که این بی‌دردی با تزریق THIP[1] یعنی آگونیست رسپتور GABA A که پنج دقیقه قبل در همان محل تزریق شد، از بین رفت (Jennie, 2014).

همچنین با تزریق بیکوکولین (۵۰ نانوگرم) به داخل RVM[2] پاسخ حیوان به تزریق دوزهای متفاوت فرمالین در تست فرمالین کاهش یافته است (Gilbert *et al*., 2001)، که با نتایج حاصل از این پژوهش تطابق ندارد که احتمالاً علت آن عدم نقش گیرنده‌های گابا در RVM در آزمون درد فرمالین بوده است. تزریق بیکوکولین در دوزهای بین ۱۰۰-۴۰۰ نانوگرم در هسته Submedius نیز که یکی از هسته‌های تالاموس می‌باشد، موجب بروز بی‌دردی در آزمون پس کشیدن دم در موش‌های صحرایی شد (Jia *et al*., 2004). به نظر می‌رسد در این مناطق، بی‌دردی ایجاد شده توسط بیکوکولین ناشی از مهار پیش‌سیناپسی گیرنده گابا A باشد که می‌تواند موجب

1. 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridine-3-ol
2. Rostral ventromedial medulla

www.SID.ir

Archive of SID

رهایش گابا شده که موجب بروز بی‌دردی می‌شود (Nemmani & Mogil, 2003). از آنجا که در مطالعه ما با مهار گیرنده گابا A تغییری در پاسخ حیوان به محرک دردآور حرارتی ایجاد نشد، شاید بتوان گفت که در ناحیه پارابراکیال گیرنده‌های گابا A مرتبط با مسیرهای کنترل درد شیمیایی به شکل اندوژن فعال نمی‌باشند.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که تحریکات دردزا سبب تغییر تعداد نورون دوکی در هسته پارابراکیال که به عنوان یکی از مراکز سیستم تعدیل درد می‌باشد شده است و این تغییر تعداد بیان‌کننده ارتباط بین عملکرد سلول‌ها در بالاترین دوز آنتاگونیست گیرنده در مقابل محرک درد زا است.

در مطالعات بعدی جهت بررسی دقیق موفولوژی نورون‌ها بررسی آنها با روش ایمونو هیستوشیمی پیشنهاد می گردد.

REFERENCES

Bernard, JF.; (2007). Parabrachial hypothalamic and amydaloid projections. in: encyclopedia of pain. Springer, Heidelberg; 1761-1766.

Carey, DB.; Sarah, WO.; Susan, GW.; Abdul, A.; Bill, JY.; (2014). Identification of neural networks that contribute to motion sickness through principal components analysis of Fos labeling induced by galvanic vestibular stimulation. PLoS One; 9(1): 1-14.

Chelminski, PR.; Ives, TJ.; Felix, KM.; Prakken, SD.; (2005). A primary care, multi-disciplinary disease management program for opioid-treated patients with chronic non-cancer pain and a high burden of psychiatric comorbidity. BMC Health Serv; pp:5-3.

Dubuisson, D.; Dennis, SF.; (1997). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. Pain; 4(2):161-74.

Enza, P.; Ida, M.; Livio, L.; Serena Giulia, B.; (2013). Effects of a metabotropic glutamate receptor subtype 7 negative allosteric modulator in the periaqueductal grey on pain responses and rostral ventromedial medulla cell activity in rat. Palazzo *et al*. Molecular Pain; (9): 44.

Esther, MK.; Leonora, JM.; Rutger, K.; Gert, H.; (2005). Neurons in the lateral sacral cord of the cat project to periaqueductal grey, but not to thalamus. European Journal of Neuroscience; 3(21): 2159-66.

Everton, HK.; Lisandra, BO.; José, VM.; (2013). Baclofen into the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium chloride intake during cell dehydration. Behavioral and Brain Functions; 9(17): 1-9.

Gilbert, AK.; Franklin, KB.; (2001). GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. Pain; 90(12): 25-36.

Guyton, AC.; Hall, JE.; (2012). Textbook of Medical physiology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 312-90.

Hermanson, O.; Blomqvist, A.; (2005). Subnuclear localization of FOS-like immunoreactivity in the rat parabrachial nucleus after nociceptive stimulation. J Comp Neurol; 368(1): 45-56.

Javanmardi, K.; Soltani hekmat, A.; Shekoohi, M.; Hasanein, P.; Bakhshi, M.; Ghodsi, R.; Rezaeian, L.; (2013). The Role of Parabrachial GABAA Receptors in Pain Modulation in Rats. journal of Fasa University of Medical Sciences; 3(2): 117-123.

Jennie, LC.; Julia, WN.; James, GP.; Lindsay, BH.; (2014). CC12, a P450/Epoxygenase inhibitor, acts in the rat rostral ventromedial medulla to attenuate morphine antinociception.

www.SID.ir

Archive of SID

Brain Res; 1499: 1-11.

Jergova, S.; Kolesar, D.; Cizkova, D.; (2008). Expression of c-Fos in the parabrachial nucleus following peripheral nerve injury in rats. Eur J Pain; 12(2): 172-9.

Jia, H.; Xie, YF.; Xiao, DQ.; Tang, JS.; (2004). Involvement of GABAergic modulation of the nucleus submedius (Sm) morphine-induced antinociception. Pain; 108(1-2): 28-35.

Nemmani, KV.; Mogil, JS.; (2003). Serotonin-GABA interactions in the modulation of mu- and kappa-opioid analgesia. Neuropharmacology; 44(3): 304-10.

Victoria, V.; Evagelia, A.; (2009). Pain relief and retainig control during childbirth. A sacrifice of the feminine identity? Healts science Journal; 3(1): 3-9.

www.SID.ir