Archive of SID

IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۳۹۸ ، دوره ۳، شماره ۳، پیاپی ۱۱، صفحه ۲۱۳-۲۰۳

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

مقاله پژوهشی

تقویت اثرات ضد دردی متعاقب تجویز همزمان مهارکننده گیرنده وانیلوئیدی و مهارکننده سیکلواکسیژناز نوع ۲ در مدل درد فرمالین درموش صحرایی

پریسا کریمی‌دهکردی [۱]، زهرا موسوی [۱]، نیما نادری [۲*]

۱. گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۲۴ بهمن ۱۳۹۸ پذیرش: ۷ اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف: مشخص شده گیرنده‌هایی با نام کلی transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 یا به اختصار TRPV1 درانتقال درد نقش اساسی ایفا میکنند و آنتاگونیست این گیرنده یعنی کاپسازپین میتواند در تسکین درد موثر باشد. از سوی دیگر آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ (COX 2) به طور اختصاصی در سلول‌های اعصاب مرکزی، در نورون‌های گلوتاماترژیک هیپوکامپ و کورتکس مغز یافت می‌شود. مهار سیکلو اکسیژناز از طرق مختلف (مرکزی و محیطی) می‌تواند در از بین بردن درد دخیل باشد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین اثرات ضددردی مرکزی کاپسازپین و برهم کنش احتمالی آن با مهارکننده آنزیم سیکلواکسیژناز در مغز است.

روش‌ها: در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده گردید. با استفاده از روش جراحی استریوتکس، کانولی ازجنس فولاد ضدزنگ در بطن جانبی مغز قرار داده شد. یک هفته پس از جراحی، داروها در داخل بطن جانبی تزریق و ۱۰ دقیقه بعد از تزریق دارو، آزمون فرمالین آغاز شد. اثر ضددردی دارو بر اساس نمره دهی رفتارهای ناشی از درد با متد دوبوآسون و دنیس بررسی گردید. گروه‌های مورد بررسی شامل گروه-های دریافت‌کننده کاپسازپین (۵ و ۵۰ نانومول)، سلکوکسیب (۲ و ۲۰ نانومول) و گروه دریافت‌کننده همزمان کاپسازپین (۵ نانومول) و سلکوکسیب (۲ نانومول) بود.

یافته‌ها: محاسبه سطح زیر منحنی شدت رفتار ناشی از درد نشان می‌دهد که گروه درمانی دریافت‌کننده کاپسازپین ۵ نانومول (۱/۱ ± ۹۲/۴) و کپسازپین ۵۰ نانومول (۲/۱ ± ۵۷/۰۲) و گروه درمانی دریافت‌کننده سلکوکسیب ۲ نانومول (۱/۱ ± ۸۳/۹) و سلکوکسیب ۲۰ نانومول (۱/۴ ± ۵۱/۶) کاهش معنی‌داری در رفتار درد ناشی از آزمون فرمالین در مقایسه با گروه کنترل (۲/۰ ± ۱۰۳/۶) نشان دادند. تجویز همزمان دوزهای ۲ نانو مول سلکوکسیب و ۵ نانو مول کاپسازپین موجب کاهش معنی‌دار سطح زیر منحنی میزان شدت درد (۰/۸ ± ۵۰/۶) در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۲ نانو مول سلکوکسیب و ۵ نانو مول کاپسازپین به تنهایی گردید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که یک اثر تجمعی یا سینرژیستی بین مهارکننده‌های گیرنده وانیلوئیدی و مهار کننده‌های آنزیم سیکلواکسیژناز در اثرات ضددردی در آزمون فرمالین وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: آزمون فرمالین، درد، سیکو اکسیژناز نوع ۲، کاپسازپین، گیرنده TRPV1

مقدمه

در طی سال‌های گذشته، گیرنده‌های وانیلوییدی به عنوان یک هدف درمانی جدید در پاتولوژی برخی از بیماری‌ها مورد توجه قرارگرفته اند. تحقیقات اخیر نشان داده است که یکی از اعضای خانواده گیرنده وانیلوئیدی بنام TRPV1[1] هدف

[1] Transient receptor potential cation channel subfamily V member1

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: naderi@sbmu.ac.ir (ORCID ID: 0000-0003-4591-8918)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

مهمی در درمان انواع درد (التهابی، احشایی، سرطانی و نوروپاتیک) می‌باشد [۱, ۲]. گیرنده TRPV1 یک کانال یونی وابسته به لیگاند است. کاپسایسین (ماده‌ی موثره موجود در فلفل قرمز) آگونیست این گیرنده بوده و می‌تواند سبب حساسیت سنسورهای درد و حرارت گردد. تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد که دوز بالای کاپسازپین (آنتاگونیست گیرنده‌ی TRPV1) به صورت موضعی و سیستمیک درحیوانات می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضددرد مدنظر قرار گیرد [۳]. علاوه بر این، برخی از مدیاتورهای مرتبط با درد نظیر برادی‌کینین، گلوتامات، پروستاگلاندین ها می‌توانند از طریق جی پروتئین و مسیر تیروزین کینازی به طور غیرمستقیم TRPV1 را فعال کنند [۴]. آنتاگونیست های گیرنده TRPV1 از طریق مهار اثر اندووانیلوئیدها جلوی فعال‌شدن گیرنده را می‌گیرند. در مطالعه-ای که به منظور بررسی اثرات ضد دردی کاپسازپین در مدل درد ناشی از تست فرمالین طراحی گردید، مشخص شد تزریق زیرجلدی کاپسازپین باعث کاهش درد در فاز حاد و به میزان کمتری باعث کاهش درد در فاز مزمن می‌گردد [۵, ۶]. مطالعات نشان دادند در تست فرمالین در صورت عدم حضور گیرنده TRPV1، دوز خوراکی استامینوفن اثر ضد دردی ندارد و در این شرایط استامینوفن بر روی پروستاگلاندین E2 (که مهار آن مسئول اثر ضددردی و ضد تب استامینوفن می‌باشد) و اندوکانابینوئیدهای مغزی بی‌اثر است. تزریق داخل بطن مغزی AM404 (N-arachidonoylaminophenol) که یکی از متابولیت های فعال استامینوفن و مهار کننده بازجذب آناندامید می‌باشد باعث فعال‌شدن گیرنده TRPV1 و اثرات ضددردی آن در تست فرمالین می‌گردد. از طرفی مهار گیرنده TRPV1 توسط تزریق داخل بطن مغزی کاپسازپین باعث مهار اثر ضد دردی استامینوفن خوراکی می‌شود که می‌توان نتیجه گرفت گیرنده TRPV1 در عمل ضددردی استامینوفن در مغز درگیر است [۷]. در ماکروفاژهای تحریک شده توسط لیپوپلی ساکارید، درمان با کاپسازپین می‌تواند سبب کاهش معنی‌دار تولید سایتوکاین‌های التهابی و آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ شود [۸]. پس عملکرد گیرنده‌های TRPV1 در میزان بیان آنزیم سیکلواکسیژناز و پروستاگلاندین های مرتبط با آن تاثیر دارد [۹].

فعالیت مسیر سیکلواکسیژناز و همچنین گیرنده TRPV1 نقش تعیین‌کننده‌ای در بروز رفتار ناشی از درد و همچنین تبدیل نوع درد از حالت حاد به مزمن دارند. علت این امر آن است که آزاد شدن مدیاتورهای التهابی نظیر پروستاگلاندین‌ها به ویژه نوع E2 و سیگنالینگ گیرنده TRPV1 (از طریق تاثیر لیگاندهای درونزاد نظیر آناندامید و متابولیت های لیپواکسیژناز) سبب ایجاد نوع خاصی از شکل‌پذیری نورونی[2] می‌شود که در تبدیل درد حاد به مزمن دخالت دارد [۱۰]. با وجود این‌که در سال‌های اخیر گیرنده‌های وانیلوئیدی بعنوان یکی از گیرنده‌های آیونوتروپیک مهم در فرآیند درد بطور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته اند، لیکن هنوز در خصوص برهمکنش مهار کننده‌های گیرنده‌های وانیلوئیدی و مهارکننده‌های آنزیم سیکلواکسیژناز در دردهای التهابی و مکانیسم احتمالی این برهمکنش مطالعه جامعی صورت نگرفته است. در این راستا، مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات تجمعی تجویز همزمان سلکوکسیب و کاپسازپین در درد التهابی ناشی از تزریق فرمالین انجام شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد استفاده

در این مطالعه از ۵۳ موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰–۲۰۰ گرم (تهیه شده از انستیتو پاستور تهران) استفاده گردید. موش‌ها در شرایط مناسب نگهداری شده و به‌استثنای زمانی که تحت آزمایش قرار داشتند، آب و غذا به مقدار کافی در دسترس آن‌ها قرار گرفت. جراحی استریوتکس در شرایط کنترل‌شده و استاندارد انجام و بعد از یک هفته، تزریق دارو از طریق کانول تعبیه شده در مغز انجام شد. محل نگهداری حیوانات دارای دمای کنترل‌شده (۲ °C ± ۲۲) و چرخه تاریکی–روشنایی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ۷:۰۰ صبح) بود. همه آزمایشات بین ساعت ۹:۰۰ تا ۱۲:۰۰ انجام گردید. هر موش فقط یکبار مورد آزمایش قرار گرفت. حیوانات حدود یک ساعت قبل از انجام آزمایش به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا به شرایط آزمایشگاه عادت کرده و شرایط جدید کمترین تأثیر را بر آستانه درد داشته باشد. شرایط نگهداری و آزمایشات انجام شده بر روی حیوانات مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی انجام گرفت و به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسیده است.

[2] Neuronal plasticity

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

جراحی استریوتاکسی

موش‌ها با استفاده از تزریق همزمان کتامین (ساخت شرکت Alfasan کشور هلند) با دوز ۱۰۰میلی گرم/کیلوگرم و زایلازین (ساخت شرکت Alfasan کشور هلند) با دوز ۱۰میلی‌گرم/کیلوگرم بیهوش گردیده و پس از بیهوشی با استفاده از روش جراحی استریوتکس نسبت به قرار دادن کانول در محل بطن جانبی در مغز (با مختصات قدامی- خلفی = ۰/۹۶ میلی متر، جانبی = ۱/۶ میلی متر، پشتی- شکمی = ۳/۶ میلی‌متر، بر اساس اطلس پاکسینوس) اقدام گردید. با استفاده از مختصات فوق نقطه‌ی مورد نظر در سطح جمجمه توسط مته دندان‌پزشکی مشخص و سوراخ گردید. سپس کانولی از جنس فولاد ضدزنگ (سرسوزن شماره ۲۳ به طول ۹ میلی‌متر) با استفاده از دستگاه استریوتکس در بطن جانبی مغز قرار داده شد و توسط سیمان دندانپزشکی در جای خود محکم گردید.

تجویز دارو و آزمون درد فرمالین

پس از گذشت یک هفته از جراحی (دوره ریکاوری)، داروها با استفاده از سرنگ همیلتون و با حجم ۵ مایکرولیتر با استفاده از لوله پلی اتیلنی رابط و سرسوزن شماره ۳۰ به طول ۱۰ میلی‌متر در داخل بطن جانبی در طی ۵-۳ دقیقه تزریق شد. ۱۰ دقیقه بعد از تزریق دارو تست فرمالین انجام شد. فرمالین ۵٪ در آب مقطر (تهیه شده از فرمالین ۳۷٪ وزنی- وزنی ساخت شرکت مرک کشور آلمان) با حجم ۴۰ مایکرولیتر توسط سرنگ انسولین به قسمت رویی پای راست موش به روش زیر جلدی تزریق شد. سپس بلافاصله حیوان به داخل محفظه منتقل و به مدت یک ساعت رفتار ناشی از درد حیوان مورد ارزیابی و ثبت قرار گرفت. جهت مشاهده راحت‌تر و بدون مانع کف پای حیوان، یک آیینه با زاویه ۴۵ درجه در زیر سطح شیشه‌ای دستگاه تعبیه‌شده بود. نمره‌دهی رفتار ناشی از شدت درد به روش دوبوآسون و دنیس [۱۱] به شرح زیر انجام شد: الف) نمره صفر: حیوان پای تزریق‌شده را کاملاً روی سطح قرار داده و بدون لنگیدن راه می‌رود. ب) نمره یک: حیوان پای تزریق‌شده را کاملاً روی سطح قرار نمی‌دهد و موقع راه رفتن می‌لنگد. ج) نمره دو: حیوان پای تزریق‌شده را کاملاً بالا نگه می‌دارد. د) نمره سه: حیوان پای تزریق‌شده را می‌لیسد یا گاز می‌گیرد یا به‌شدت تکان می‌دهد. نمره دهی هر ۱۵ ثانیه یکبار انجام و سپس میانگین نمرات در بازه‌های زمانی ۵ دقیقه‌ای محاسبه گردید. ازآنجایی‌که رفتار ناشی از درد تزریق فرمالین در دو مرحله (فاز اول شامل ۱۵ دقیقه اول بعد از تزریق به دلیل درد ناشی از تزریق و فاز دوم شامل ۱۵ تا ۶۰ دقیقه بعد از تزریق به دلیل اثر التهاب زایی فرمالین) بروز می‌کند، سطح زیر منحنی برای هرکدام از این دو فاز به‌صورت جداگانه و با روش ذوزنقه‌ای محاسبه و بین گروه‌های مختلف درمانی مقایسه گردید. روش محاسبه سطح زیر منحنی بر مبنای روش ذوزنقه ای به شرح ذیل است:

سطح زیر منحنی در دوره زمانی ۰ الی ۱۵ دقیقه = ۵ × (نمره درد در دقیقه ۵ + نمره درد در دقیقه ۱۰ + نصف نمره درد در دقیقه ۱۵)

سطح زیر منحنی در دوره زمانی ۱۵ الی ۶۰ دقیقه = ۵ × (نصف نمره درد در در دقیقه ۱۵ + نمره درد در دقیقه ۲۰ + نمره درد در دقیقه ۲۵ + نمره درد در دقیقه ۳۰ + نمره درد در دقیقه ۳۵ + نمره درد در دقیقه ۴۰ + نمره درد در دقیقه ۴۵ + نمره درد در دقیقه ۵۰ + نمره درد در دقیقه ۵۵ + نصف نمره درد در دقیقه ۶۰).

گروه های مورد مطالعه

حیوانات در گروه‌های مختلف ۸ الی ۱۰ تایی به صورت تصادفی قرار گرفته و درمان‌های زیر را به ترتیب دریافت نمودند: (۱) گروه کنترل که حلال دی‌متیل‌سولفوکساید (ساخت شرکت مرک کشور آلمان) را با حجم ۵ مایکرولیتر به‌صورت داخل بطن مغزی دریافت نمودند. (۲) گروه‌های جداگانه که دوزهای ۲ یا ۲۰ نانومول سلکوکسیب (ساخت شرکت سیگما کشور آمریکا) را به‌صورت داخل بطن مغزی دریافت نمودند. (۳) گروه‌های جداگانه که دوزهای ۵ یا ۵۰ نانومول کاپسازپین (ساخت شرکت Tocris کشور انگلستان) را به‌صورت داخل بطن مغزی دریافت نمودند. (۴) جهت بررسی برهم‌کنش این دو دارو، و بر اساس نتایج بدست آمده از گروه-های قبلی، در یک گروه دیگر، سلکوکسیب (۲ نانومول) و کاپسازپین (۵ نانومول) به فاصله ۵ دقیقه از یکدیگر به روش تزریق داخل بطن مغزی تجویز گردید. انتخاب دوزها بر مبنای مطالعه پایلوت بوده است. در تمامی گروه‌ها، ۱۰ دقیقه پس از تجویز دارو (یا حلال مربوطه در گروه کنترل)، تست فرمالین انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

محاسبات آماری

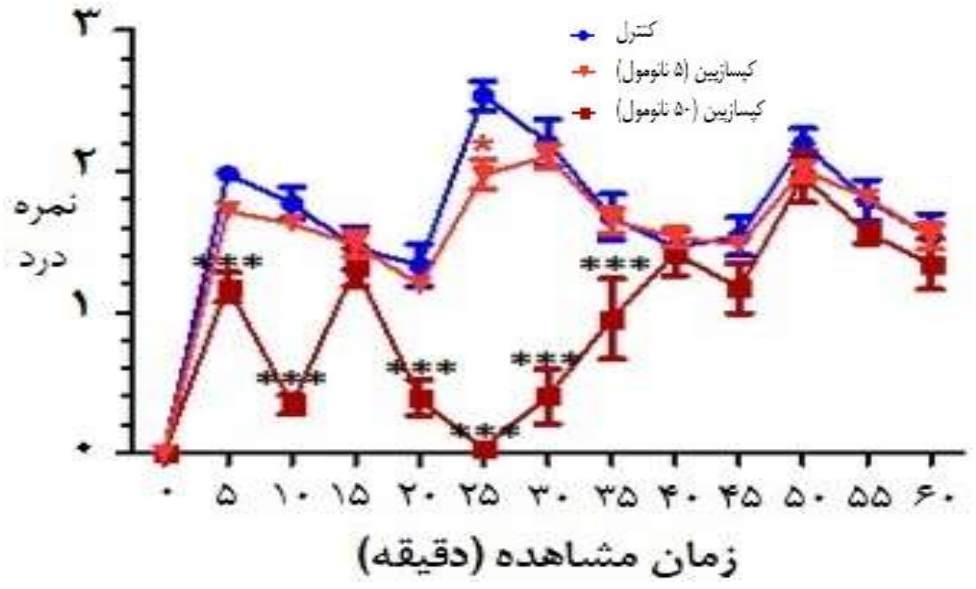
نتایج در هر گروه به‌صورت «میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین» نمایش داده شده‌اند. جهت مقایسه شدت رفتار ناشی از درد در زمان های مختلف از آنالیز واریانس دو طرفه به همراه تست تکمیلی بن‌فرونی استفاده گردید. به‌منظور ارزیابی تغییرات در سطح زیر منحنی نمرات رفتار ناشی از درد، آنالیز واریانس یک‌طرفه به همراه آزمودن تکمیلی توکی جهت مقایسه گروه‌های درمانی با یکدیگر مورد استفاده قرار گرفت. رسم نمودارها و انجام آنالیز آماری با استفاده از برنامه Graphpad Prism نسخه ۵ انجام شد. مقادیر $p < ۰/۰۵$ به‌عنوان حد اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تاثیر پیش تیمار با کاپسازپین بر شدت رفتار ناشی از درد در آزمون فرمالین

نتایج مربوط به تغییرات نمره درد در فواصل زمانی مختلف در نمودار ۱ نشان داده شده است. آنالیز واریانس دوطرفه نشان‌دهنده برهمکنش معنی‌داری بین فاکتورهای زمان و نوع درمان می‌باشد [$F(۲۴و۲۵۲) = ۱۱/۸۴$ ،$p <۰/۰۰۰۱$] با توجه به نمودار در گروه کنترل در طی ۶۰ دقیقه مشاهده، رفتار ناشی از درد بطور شدید وجود دارد. در گروه دریافت‌کننده دوز ۵ نانومول کاپسازپین رفتار ناشی از درد تقریبا مشابه گروه کنترل است (بجز دقیقه ۲۵ که کاهش معنی‌داری در شدت رفتار ناشی از درد در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید) که نشان‌دهنده تاثیر اندک متعاقب درمان با این دوز آنتاگونیست گیرنده وانیلوئیدی بر درد ناشی از فرمالین بوده است. بااین‌حال، پیش درمانی با دوز ۵۰ نانومول کاپسازپین توانست شدت رفتار ناشی از درد را در مقالیسه با گروه کنترل کاهش دهد. آنالیز تکمیلی نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در نمره شدت درد در دقایق ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ در گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ نانو مول کاپسازپین در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد که این اختلاف معنی‌دار در زمان‌های مربوطه در نمودار ۱ نشان داده شده است. در مقابل هیچ اختلاف معنی‌داری در شدت رفتار ناشی از درد در زمان‌های مختلف در گروه دریافت‌کننده دوز ۵ نانومول کپسازپین در مقایسه با گروه کنترل دیده نشد.

جهت بررسی تأثیر کلی درمان‌های انجام‌شده بر روند شدت درد ناشی از تست فرمالین، سطح زیر منحنی نمودار ۱ در بازه‌های زمانی صفر تا پانزده دقیقه (فاز اول) و بازه زمانی پانزده



نمودار ۱- میزان درد بر حسب زمان‌های پیگیری و به تفکیک گروه‌های درمانی. تأثیر درمان با کاپسازپین (۵ یا ۵۰ نانو مول) یا حلال آن (گروه کنترل) بر شدت درد ثبت‌شده در تست فرمالین. داروها (و یا حلال آن در گروه کنترل) ۱۰ دقیقه قبل از انجام تست فرمالین از راه تزریق داخل بطن مغز به حیوان داده شده است. جهت ایجاد درد، فرمالین ۵٪ با حجم ۴۰ مایکرولیتر به کف پای حیوان به‌صورت زیرجلدی تزریق گردیده است. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر می‌باشد. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۰۱$ ،*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۵$.

www.SID.ir

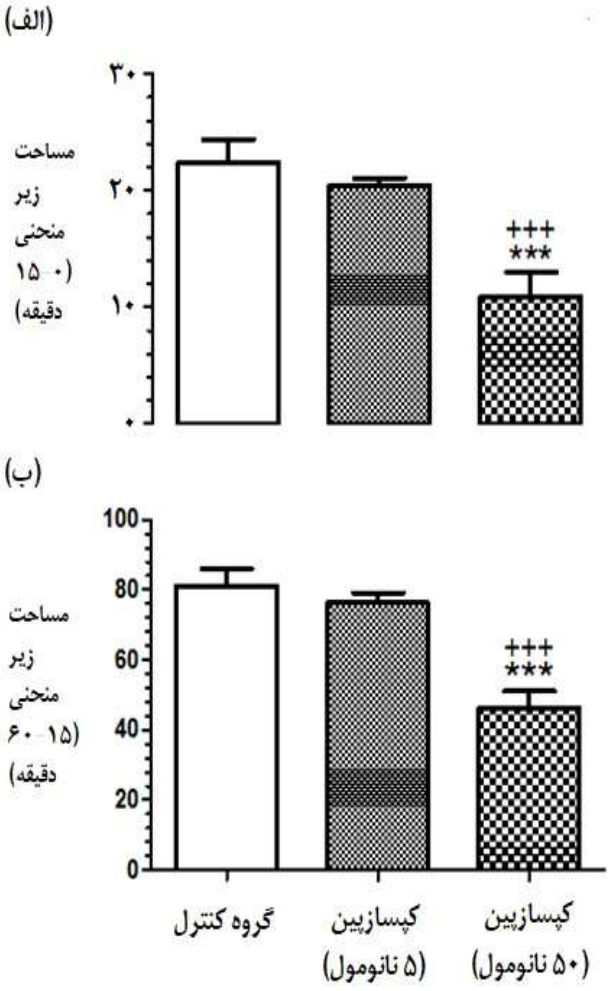
Archive of SID

تا شصت دقیقه (فاز دوم) با استفاده از روش محاسبه مساحت ذوزنقه ها برای تک‌تک موش‌ها محاسبه و میانگین و انحراف استاندارد به‌دست‌آمده برای هر گروه در نمودار ۲ نشان داده شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح زیر منحنی گروه‌های مختلف درمانی در فاز اول [قسمت الف، $p < ۰/۰۰۰۱$، $F(۲و۲۱) = ۱۰۳/۶$] و فاز دوم [قسمت ب، $p < ۰/۰۰۰۱$، $F(۲و۲۱) = ۱۵۰/۳$] شدت رفتار ناشی از درد می‌باشد. آزمون تکمیلی نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار تجویز دوز ۵۰ نانومول کاپسازپین در کاهش رفتار ناشی از درد در مقایسه با گروه کنترل هم در فاز اول و هم در فاز دوم می‌باشد. همچنین، میزان شدت درد متعاقب تجویز دوز ۵۰ نانو مول کاپسازپین در مقایسه با دوز ۵ نانومول آن در هر دو فاز بطور معنی‌داری کمتر بود.

تاثیر پیش تیمار با سلکوکسیب بر شدت رفتار ناشی از درد در آزمون فرمالین

نتایج مربوط به تغییرات نمره درد در زمان‌های مختلف در نمودار ۳ نشان داده شده است. آنالیز واریانس دوطرفه نشان‌دهنده برهمکنش معنی‌داری بین فاکتورهای زمان و نوع درمان می‌باشد [$p < ۰/۰۰۰۱$، $F(۲۴و۲۵۲) = ۱۰/۲۲$]. آنالیز تکمیلی نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در نمره شدت درد در زمان‌های مختلف در گروه‌های دریافت‌کننده دوز ۲ و ۲۰ نانومول سلکوکسیب در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. در گروه دریافت کننده دوز ۲ نانومول سلکوکسیب رفتار ناشی از درد در زمان‌های ۵، ۱۵، ۲۵، ۳۰ دقیقه آزمون فرمالین در مقایسه با گروه کنترل شدت کمتری نشان دادند. همچنین گروه دریافت‌کننده دوز ۲۰ نانومول سلکوکسیب، رفتار ناشی از درد در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۵۰ و ۵۵ دقیقه آزمون فرمالین در مقایسه با گروه کنترل (گروه دریافت‌کننده حلال) شدت کمتری نشان دادند.

نتایج روند شدت درد پس از تجویز سلکوکسیب در نمودار ۴ نشان داده شده است. آنالیز واریانس یک طرفه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح زیر منحنی شدت درد بین گروه‌های درمانی در فاز اول [قسمت الف، $p < ۰/۰۰۱$، $F(۲و۲۱) = ۱۸۴/۳$] و فاز دوم [قسمت ب، $p < ۰/۰۰۰۱$، $F(۲و۲۱) = ۱۸۳/۱$] است. آزمون تکمیلی نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار تجویز هر دو دوز ۲ و ۲۰ نانو مول سلکوکسیب در کاهش رفتار ناشی از درد در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. همچنین میزان شدت درد متعاقب تجویز دوز ۲۰ نانو مول سلکوکسیب در مقایسه با دوز ۲ نانو مول آن در هر دو فاز بطور معنی‌داری کمتر بود.



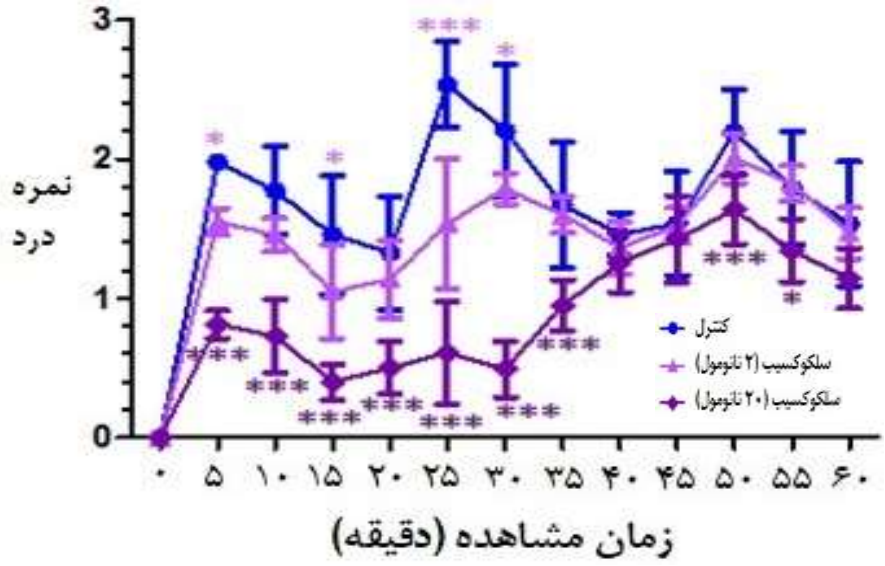
نمودار ۲– شدت درد در کل زمان فاز اول و فاز دوم آزمون فرمالین بر حسب گروه‌های درمانی. گروه کنترل حلال دریافت نمود و گروه‌های آزمون دوزهای مختلف کپسازپین دریافت کردند. محاسبه سطح زیر منحنی به‌دست‌آمده از نمودار ۱ برای تک تک حیوانات مورد مطالعه در ۱۵ دقیقه اول (فاز اول، قسمت الف) و ۱۵ تا ۶۰ دقیقه (فاز دوم، قسمت ب) با استفاده از محاسبه مجموع مساحت ذوزنقه ها انجام پذیرفته است. نتایج به‌صورت میانگین + انحراف معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۸ سر می باشد. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده حلال (گروه کنترل) با $p < ۰/۰۰۱$، $^{+++}$: اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده کاپسازپین (۵ نانو مول) با $p < ۰/۰۰۱$.

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021



نمودار ۳- میزان درد بر حسب زمان‌های پیگیری و به تفکیک گروه‌های درمانی. تأثیر درمان با سلکوکسیب (۲ یا ۲۰ نانو مول) و حلال آن بر شدت درد ثبت‌شده در تست فرمالین. داروها (و یا حلال آن‌ها در گروه کنترل) ۱۰ دقیقه قبل از تست فرمالین از راه تزریق داخل بطن مغز به حیوان داده‌شده است. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر است. *: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۵$ و ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۱$

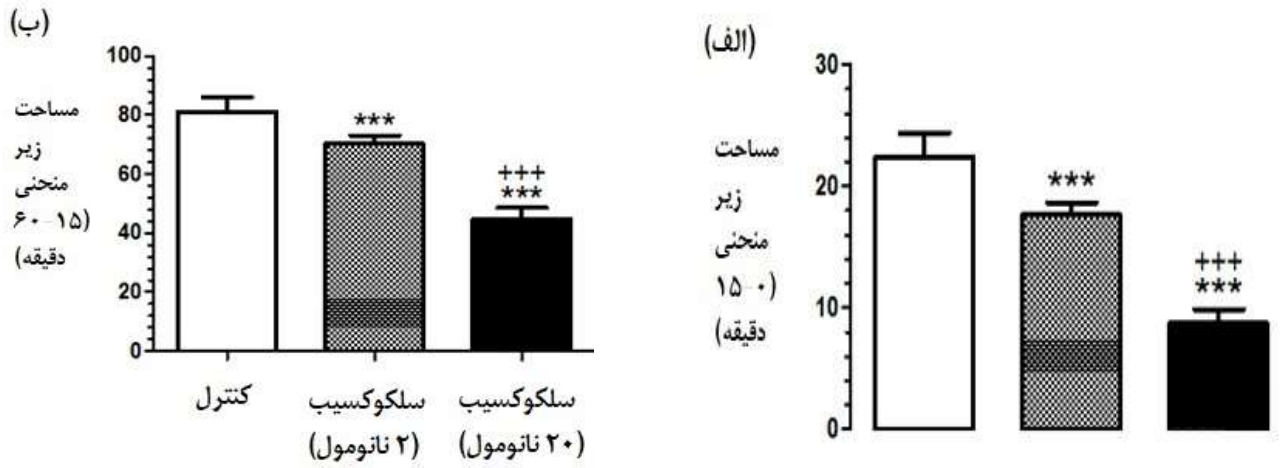
اثر تزریق همزمان داخل بطن مغزی دوزهای ۲ نانو مول سلکوکسیب و ۵ نانو مول کاپسازپین در تست فرمالین

جهت بررسی برهمکنش دو داروی سلکوکسیب و کاپسازپین، به یک گروه بصورت همزمان دوز های ۲ نانو مول سلکوکسیب و ۳ نانو مول کاپسازپین ۱۰ دقیقه قبل از انجام تست فرمالین تجویز گردید و نتایج آن با گروهی که دوز ۲ نانومول سلکوکسیب و گروهی که دوز ۳ نانومول کاپسازپین را دریافت کرده بودند و همچنین گروه کنترل مقایسه گردید. نتایج مربوط به تغییرات نمره درد در زمان های مختلف در نمودار ۵ نشان داده شده است. آنالیز واریانس دو طرفه نشان‌دهنده برهمکنش معنی‌داری بین فاکتورهای زمان و درمان می باشد [$F(۳۶و۳۳۶) = ۷/۶۷۱$ ،$p < ۰/۰۰۰۱$]. آنالیز تکمیلی نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در نمره شدت درد در زمان‌های مختلف در گروه دریافت‌کننده دوز ۲ نانومول سلکوکسیب به تنهایی (در زمان‌های ۵، ۱۵، ۲۵، ۳۰ دقیقه آزمون فرمالین) در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. نکته جالب توجه اینکه در گروه دریافت‌کننده تجویز همزمان دوز ۲ نانومول سلکوکسیب و دوز ۵ نانو مول کاپسازپین کاهش معنی‌دار در شدت رفتار ناشی از درد در مدت زمان بیشتری از آزمون فرمالین در مقایسه با گروه کنترل دیده شد. به نحوی که گروه دریافت‌کننده تجویز توامان سلکوکسیب و کاپسازپین تقریباً در تمام زمان‌های آزمون (بجز دقیقه ۴۵) کاهش معنی‌دار در رفتار ناشی از درد در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. گروه دریافت‌کننده کاپسازپین (۵ نانومول) بجز در دقیقه ۲۵ آزمون، در سایر زمان ها اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل در شدت رفتار ناشی از درد نداشت.

نمودار ۶ تاثیر کلی درمان‌های انجام‌شده بر روند شدت درد ناشی از تست فرمالین را نشان می‌دهد. آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح زیر منحنی شدت درد در فاز اول [قسمت الف، $F(۳و۲۸) = ۱۷۶/۴$ ،$p < ۰/۰۰۰۱$] و فاز دوم [قسمت ب، $F(۳و۲۸) = ۲۲۵/۸$ ،$p < ۰/۰۰۰۱$] می‌باشد. آزمون تکمیلی نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار تجویز سلکوکسیب (۲ نانومول) در کاهش سطح زیر منحنی شدت درد در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. با این حال، کاپسازپین (۵ نانومول) نتوانست تغییر معنی‌داری در سطح زیر منحنی در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نماید. نکته قابل توجه اینکه تجویز همزمان سلکوکسیب (۲ نانومول) و کپسازپین (۵ نانومول) سبب کاهش معنی‌دار رفتار ناشی از درد در مقایسه با گروه کنترل و همچنین کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه‌هایی که هر کدام از این داروها را به تنهایی دریافت نموده است گردیده است.

www.SID.ir

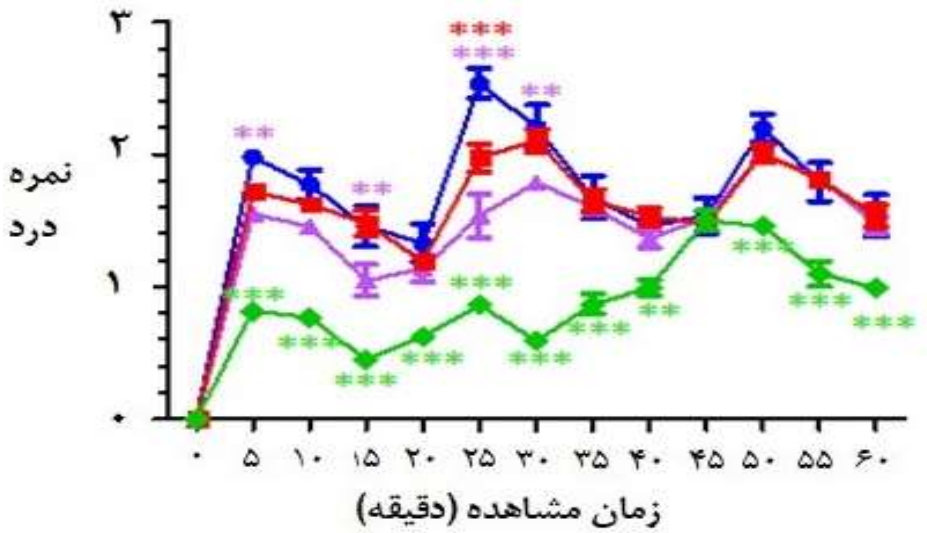
Archive of SID



نمودار ٤– شدت درد در کل زمان فاز اول و فاز دوم آزمون فرمالین بر حسب گروه‌های درمانی. گروه کنترل، حلال دریافت نمود و گروه‌های آزمون، سلکوکسیب دریافت کردند. محاسبه سطح زیر منحنی به‌دست‌آمده از نمودار ۳ برای تک تک حیوانات مورد مطالعه در فاز اول (نمودار الف) و فاز دوم (نمودار ب) از طریق محاسبه مجموع مساحت ذوزنقه ها به دست آمده است. نتایج به‌صورت میانگین + انحراف معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد نمونه ها در هر گروه ۸ سر می باشد. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده حلال (گروه کنترل) با $p < ۰/۰۰۱$، +++: اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده سلکوکسیب (۲نانو مول) با $p <۰/۰۰۱$.

بحث

مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی برهم‌کنش مهار سیستم وانیلوییدی و مهار آنزیم سیکلواکسیژناز۲ در سیستم عصبی مرکزی بر درد ناشی از تست فرمالین طراحی گردید. در این خصوص، از یک آنتاگونیست گیرنده وانیلوییدی نوع ۱ به نام کاپسازپین و یک مهارکننده اختصاصی آنزیم سیکلو اکسیژناز نوع ۲ به نام سلکوکسیب استفاده گردید و اثر هرکدام به‌تنهایی و برهم کنش میان آن‌ها در آزمون درد التهابی فرمالین بررسی شد. نتایج آزمایشات نشان‌دهنده تاثیر هر کدام از این داروها به تنهایی و همچنین اثر تجمعی معنی‌دار (احتمالا سینرژیسم) ترکیب دو داروی مورد استفاده می‌باشد. بدین معنی که تجویز همزمان این دو دارو سبب تجمع و تشدید اثرات ضد دردی آن گردیده و چه بسا ممکن است این اثر از مجموع اثرات ضد دردی هر کدام از این ترکیبات به تنهایی بیشتر باشد.

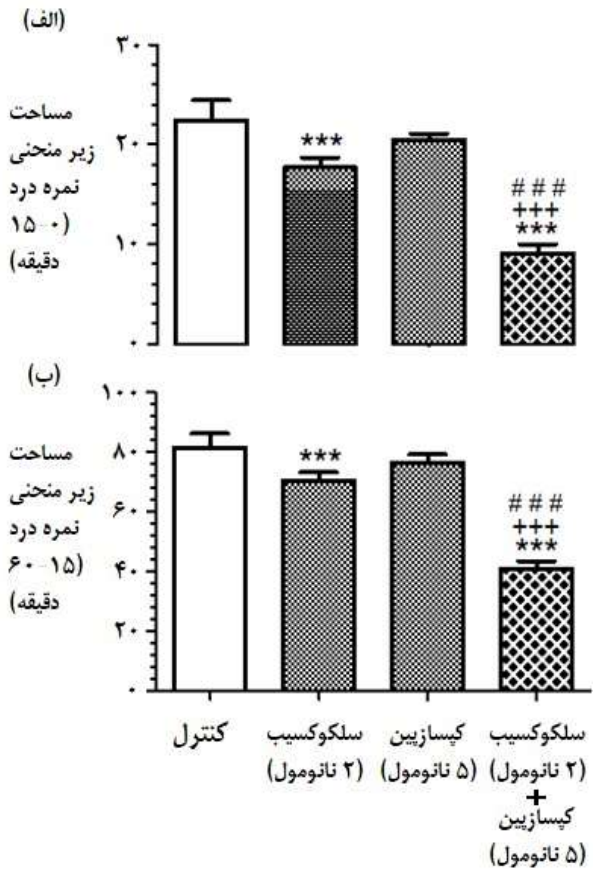


نمودار ٥– میزان درد بر حسب زمان‌های پیگیری و به تفکیک گروه‌های درمانی. تاثیر درمان با دوز ۲ نانو مول سلکوکسیب و دوز ۵ نانو مول کاپسازپین به‌تنهایی و یا بصورت همزمان بر شدت درد ثبت شده در تست فرمالین. داروها (و یا حلال آن‌ها در گروه کنترل) ۱۰ دقیقه قبل از تست فرمالین از راه تزریق داخل بطن مغز به حیوان داده شده است. نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر می باشد. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۱$ و ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۱$.

www.SID.ir
Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021



نمودار ٦- شدت درد در کل زمان فاز اول و فاز دوم آزمون فرمالین بر حسب گروه‌های درمانی. محاسبه سطح زیر منحنی بدست آمده از نمودار ۵ برای تک تک حیوانات در فاز اول (قسمت الف) و فاز دوم (قسمت ب) رفتار ناشی از درد در موش رت از طریق محاسبه مجموع مساحت ذوزنقه‌ها انجام شده است. نتایج بصورت میانگین + انحراف معیار از میانگین نشان داده شده است. تعداد نمونه ها در هر گروه ۸ سر می باشد. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده حلال (گروه کنترل) با $p < ۰/۰۰۱$، +++: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده دوز ۵ نانو مول کاپسازپین با $p < ۰/۰۰۱$، ###: اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده دوز ۲ نانو مول سلکوکسیب با $p < ۰/۰۰۱$.

در مطالعاتی که قبلاً انجام شده، نشان داده شد که تزریق سیستمیک سلکوکسیب می‌تواند از طریق اثر مرکزی سبب بروز بی‌دردی در یک مدل درد التهابی محیطی نظیر تزریق کاراژینان در کف پای رت گردد. نکته جالب توجه اینکه این نوع بی‌دردی عمدتاً از طریق مسیر اپیوئیدهای اندوژن بوده و مهار بیوسنتز پروستاگلاندین ها نقش کمتری در بروز این نوع بی‌دردی داشته است [۱۲]. در مطالعه ما در مدل درد ناشی از تزریق فرمالین، تجویز داخل بطن مغزی دو دوز از سلکوکسیب یعنی ۲ و ۲۰ نانو مول هردو باعث کاهش درد گردید و این نتیجه با نتایج بدست‌آمده از مطالعات قبلی مطابقت داشته و بار دیگر پیشنهاد می‌کند که بخشی از اثرات ضددرد سلکوکسیب از طریق مرکزی اعمال می‌شود.

در مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثرات ضددردی کاپسازپین و روتنیوم قرمز در مدل درد ناشی از تست فرمالین طراحی گردید، تزریق زیرجلدی کاپسازپین و روتنیوم قرمز هر دو باعث کاهش درد در فاز اول رفتار ناشی از درد در تست فرمالین شدند و به میزان کمتری باعث کاهش درد در فاز دوم گردیدند. تزریق داخل بطن مغزی دو ترکیب ذکر شده باعث کاهش درد در هر دو فاز (اول و دوم) تست فرمالین شدند. پس به نظر می‌رسد آنتاگونیست گیرنده TRPV1 می‌تواند در درمان دردهای ایجاد شده توسط فرمالین به صورت مرکزی موثر باشد [۵]. نتایج مطالعه مذکور با نتایج مطالعه ما مطابقت داشته و می‌تواند بیانگر اثر ضد دردی مرکزی کاپسازپین در مدل درد ناشی از تست فرمالین باشد.

در یک مطالعه دیگر، داروی AM404 که از ترکیبات فعال‌کننده کانال TRPV1 و مهارکننده سیکلواکسیژناز است، در سه مدل درد فرمالین (فازهای حاد و مزمن)، آزمون ون فری[3]، آزمون غوطه ور شدن دم[4] در کنار داروهای استامینوفن، ایبوپروفن و کاپسازپین مورد بررسی و مقایسه قرارگرفت. نتایج نشان دادند در تست فرمالین در صورت عدم حضور گیرنده TRPV1 دوز خوراکی استامینوفن اثر ضد دردی ندارد و این دوز استامینوفن بر روی پروستاگلاندین E2 و اندوکانابینوئیدهای مغزی بی اثر است. تزریق داخل بطن مغزی AM404 باعث فعال‌شدن گیرنده TRPV1 و اثرات ضددردی آن در تست فرمالین گردید. از طرفی مهار گیرنده TRPV1 به وسیله‌ی تزریق داخل بطن مغزی کاپسازپین باعث مهار اثر ضددردی استامینوفن خوراکی به صورت هم زمان شده است [۷]. در مطالعه حاضر، برای اولین بار، بررسی اثر تجویز هم زمان کاپسازپین و سلکوکسیب در کاهش میزان درد ناشی از تست التهابی فرمالین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد تزریق هم زمان کاپسازپین (۵ نانومول) و سلکوکسیب (۲ نانومول) به صورت داخل بطن مغزی سبب افزایش مهار درد و برهم کنش موثر، احتمالاً اثر سینرژیسم یا تجمعی می‌گردد.

[3] von Frey
[4] Tail immersion test

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

پروستاگلاندین E2 بعنوان یک محصول سیکلواکسیژناز در درد التهابی نقش بسیار مهمی دارد. داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی با مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و کاهش تولید پروستانوئیدها بخصوص پروستاگلاندین E2 سبب کاهش درد التهابی می‌گردند. گیرنده‌های پروستاگلاندین در داخل سلول با افکتورهایی نظیر پروتئین کیناز C و پروتئین کیناز A ارتباط دارند و از طریق آن‌ها سبب حساس‌شدن و یا فعال‌سازی قسمت‌های متعددی می‌شوند که از میان آن‌ها می‌توان به گیرنده‌های TRPV1 و گیرنده‌های پورینرژیک و کانال‌های سدیمی و کلسیمی وابسته به ولتاژ اشاره کرد [۱۳]. فعال‌سازی این مولکول‌ها می تواند سبب تشدید حس درد (هایپرآلژزیا) گردد. لذا پروستاگلاندین E2 نقش بسیار مهمی در انتقال سیگنال درد داشته و تعامل سایر سیستم‌های گیرنده‌ای نظیر TRPV1 با آن می‌تواند در تقویت اثر ضددردی موثر باشد. گیرنده TRPV1 یکی از گیرنده‌های عملکردی مایکروگلیاها است [۱۴] و مایکروگلیاها در تعدیل فعالیت نورون‌های تحریکی گلوتاماترژیک نقش مهمی دارند [۱۵]. با توجه به اهمیت میانجی عصبی گلوتامات در فرایند انتقال درد و از طرف دیگر نقش مهم پروستاگلاندین ها خصوصاً پروستاگلاندین E2 در فرآیند انتقال درد در مغز، مهار همزمان این دو مکانیسم می‌تواند در کاهش رفتار ناشی از درد اثری فراتر از یک اثر ساده تجمعی داشته باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نقش موثر کاپسازپین در کاهش درد التهابی و همچنین با توجه به تقویت اثر ضددردی این ترکیب در تجویز همزمان با سلکوکسیب، پیشنهاد می‌گردد مهار همزمان گیرنده وانیلوئیدی و آنزیم سیکلواکسیژناز به عنوان یک راهکار موثر در کاهش دردهای التهابی مورد توجه قرار گیرد. بدیهی است ارزیابی بیشتر این برهمکنش با استفاده از روش‌های مختلف تجویز و انواع مختلف ترکیبات مهارکننده روشن‌کننده جوانب مختلف اثرات ضد دردی این ترکیبات خواهد بود.

سپاسگزاری

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه دوره دکترای عمومی داروسازی پریسا کریمی دهکردی می‌باشد. نویسندگان این مقاله از همکاری خانم آتنا ملکی صادقی در روند اجرای این پایان نامه قدردانی بعمل می آورند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

پ.ک.د.: انجام مطالعه، نوشتن مقاله؛ ز.م.: نظارت بر حسن انجام مطالعه؛ ن.ن.: طراحی مطالعه، آنالیز آماری، نوشتن مقاله.

فهرست منابع

[1] Caterina MJ, Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. ***Pain*** 105 (2003) 5-9.
[2] Geppetti P, Materazzi S, Nicoletti P, The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. ***Eur J Pharmacol*** 533 (2006) 207-214.
[3] Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J, Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. ***Br J Pharmacol Chemother*** 31 (1967) 138-151.
[4] Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M, Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. ***J Biol Chem*** 277 (2002) 13375-13378.
[5] Santos AR, Calixto JB, Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. ***Neurosci Lett*** 235 (1997) 73-76.
[6] Ang SF, Sio SW, Moochhala SM, MacAry PA, Bhatia M, Hydrogen sulfide upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite in sepsis-evoked acute lung injury via transient receptor potential vanilloid type 1 channel activation. ***J Immunol*** 187 (2011) 4778-4787.
[7] Mallet C, Barriere DA, Ermund A, Jonsson BA, Eschalier A, Zygmunt PM, Högestätt ED, TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. ***PLoS One*** 5 (2010) e12748.
[8] Ninomiya Y, Tanuma SI, Tsukimoto M, Differences in the effects of four TRPV1 channel antagonists on lipopolysaccharide-induced cytokine production and COX-2 expression in murine macrophages. ***Biochem Biophys Res Commun*** 484 (2017) 668-674.
[9] Choi SE, Kim TH, Yi SA, Hwang YC, Hwang WS, Choe SJ, Hans SJ, Kim HJ, Kim DJ, Kang Y, Lee K, Capsaicin attenuates palmitate-induced expression of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by increasing palmitate oxidation and reducing c-Jun activation in THP-1 (human acute monocytic leukemia cell) cells. ***Nutr Res*** 31 (2011) 468-478.
[10] Ma W, Li L, Xing S, PGE2/EP4 receptor and TRPV1 channel are involved in repeated restraint stress-

www.SID.ir

Archive of SID

induced prolongation of sensitization pain evoked by subsequent PGE2 challenge. ***Brain Res*** 1721 (2019) 146335.

[11] 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.

[12] Rezende RM, Dos Reis WG, Duarte ID, Lima PP, Bakhle YS, de Francischi JN, The analgesic actions of centrally administered celecoxib are mediated by endogenous opioids. ***Pain*** 142 (2009) 94-100.

[13] Kawabata A, Prostaglandin E2 and pain--an update. ***Biol Pharm Bull*** 34 (2011) 1170-1173.

[14] Schilling T, Eder C, Importance of the non-selective cation channel TRPV1 for microglial reactive oxygen species generation. ***J Neuroimmunol*** 216 (2009) 118-121.

[15] Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A, Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 109 (2012) E197-205.

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:16 +0330 on Saturday March 13th 2021

Research paper

Augmentation of analgesic effects following co-administration of vanilloid receptor blocker and cyclooxygenase type 2 inhibitor in rat formalin test

Parisa Karimi Dehkordi[1], Zahra Mousavi[1], Nima Naderi[2*]

1. *Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
2. *Department of Toxicology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 13 February 2020 Accepted: 26 April 2020

Abstract

Background and aims: The transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) receptors play a substantial role in pain transmission and the receptor antagonist capsazepine could alleviate pain in various pharmacological models. On the other hand, the enzyme cyclooxygenase type 2 (COX-2) has been shown to exist in central nervous system, particularly in hippocampal glutamatergic neurons as well as in cortex and the enzyme inhibition could alleviate pain transmission and perception. The aim of the present study was to investigate the analgesic effect of capsazepine and its possible interaction with COX-2 inhibition in the brain.

Methods: Male wistar rats (200–250 g) were used in this study. One week after insertion of a stainless steel guide cannula by stereotaxic surgery, drugs were administered into left lateral ventricle on the day of experiment 10 min before formalin test and the pain related behavior of the rat was measured based on method described by Dubuisson and Dennis. Experimental groups consisted of capsazepine (5 and 50 nM), celecoxib (2 and 20 nM), and co-administration of capsazepine (5 nM) and celecoxib (2 nM).

Results: Results showed a significant decrease in pain related behavior in rats received capsazepine 5 nM (92.4 ± 1.1), capsazepine 50 nM (57.0 ± 2.1), celecoxib 2 nM (83.9 ± 1.1), or celecoxib 20 nM (51.6 ± 1.4) compared with the control (103.60 ± 2.0) group. Moreover, co-administration of celecoxib (2 nM) and capsazepine (5 nM) significantly decreased pain related behavior of rats (50.6 ± 0.8) compared with the group received celecoxib (2 nM) or capsazepine (5 nM) alone, respectively.

Conclusion: The results suggest a possible additive and/or synergistic interaction between celecoxib and capsazepine in analgesic effects in formalin test.

Keywords: Formalin test; pain, Cyclooxygenase type 2, Capsazepine, TRPV1

Please cite this article as follows:

Karimi Dehkordi P, Mousavi Z, Naderi N, Augmentation of analgesic effects following co-administration of vanilloid receptor blocker and cyclooxygenase type 2 inhibitor in rat formalin test. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 3 (2019) 203-213.

*Corresponding author: naderi@sbmu.ac.ir (ORCID ID: 0000-0003-4591-8918)

www.SID.ir