



کاهش رفتارهای دردی آزمون فرمالین با تزریق مرفین به داخل هسته پاراژیکانتوسولولاریس موش

صحرائی

الهه ارمی^۱ (M.Sc.)، محمد صوفی آبادی^۲ (Ph.D.)، محمدحسین اسماعیلی^۲ (Ph.D.)، هاشم حق دوست یزدی^۲ (Ph.D.)، حسن اژدری زرمهری^{۲*} (Ph.D.)

۱- دانشگاه آزاد اهر- گروه پرستاری- مربی. ۲- دانشگاه علوم پزشکی قزوین- مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی- دکترای فیزیولوژی.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۴/۱۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۴

چکیده

مقدمه: تزریق سیستمیک مرفین سبب بی‌دردی در آزمون فرمالین می‌شود. ولی هسته‌ها و مراکز مغزی که این بی‌دردی را وساطت می‌کنند، مشخص نشده است؛ بنابراین در این مطالعه اثرات تزریق داخل هسته پاراژیکانتوسولولاریس جانبی (LPGI) مرفین، روی پاسخ رفتاری به درد در آزمون فرمالین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی رفتاری از مدل درد التهابی به‌وسیله فرمالین در موش‌های صحرائی سفید، در محدوده وزنی ۲۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. با عمل جراحی استروتاکسی، کانول راهنما در داخل هسته LPGI قرار گرفت و پس از یک هفته استراحت، آزمون فرمالین با تزریق ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۲٪ به زیر پوست پنجه پای حیوان انجام شد. **نتایج:** تزریق مرفین به داخل LPGI سبب کاهش شدید رفتارهای دردی در مرحله فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین شد (دوز ۵۰ نانومول). در مقایسه با تزریق داخل LPGI مرفین که رفتارهای دردی را در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین شدیداً کاهش داد ($P < 0.001$)، تزریق جانبی‌تر نسبت به LPGI مرفین، هیچ تأثیری روی رفتارهای دردی آزمون فرمالین نداشت.

نتیجه‌گیری: تزریق داخل LPGI مرفین سبب کاهش شدید رفتارهای دردی در مرحله فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین شد که پیشنهاد می‌کند گیرنده‌های اپیوئیدی در LPGI سبب مداخله با مکانیسم‌های رفتارهای دردی در آزمون فرمالین به‌عنوان درد التهابی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مرفین، بی‌دردی، هسته پاراژیکانتوسولولاریس جانبی، آزمون فرمالین.

Original Article

Knowledge & Health 2011;6(2):32-37

Decreased Formalin Induced Nociceptive Behaviors by Morphine Microinjection into the Nucleus Reticularis Paragigantocellularis Lateralis

Elaheh Erami¹, Mohammad Sofi Abadi², Mohammad Hossein Esmaeili², Hashem Haghdoost-Yazdi², Hassan Azhdari Zarmehri^{2*}

1- M.Sc. of Nursing, Faculty of Nursing, Islamic Azad University of Abhar, Abhar, Iran. 2- Ph.D. in Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Abstract:

Introduction: Systemic injections of morphine have been shown to elicit analgesic responses in formalin test. However, the locations of central sites that may mediate these effects have not been clearly elucidated. This study assessed the antinociceptive action of morphine after microinjection into the nucleus reticularis paragigantocellularis lateralis (LPGI) in the formalin test in rats. Formalin-induced behaviour is characterized by two phases relevant to acute and tonic.

Methods: In this behavioral study, Inflammatory Pain Model by formalin was used in white rats with weight range of 200-300g. Using a stereotaxic apparatus, cannula was inserted into the LPGI. After 1 week recovery, animals were initially submitted to the injection of 50 ml of 2% formalin solution in hind paw.

Results: Intra-LPGI microinjection of morphine produced robust inhibition of formalin-evoked behaviour in phase 1, interphase and phase 2 ($P < 0.001$); however, exogenous injection of morphine in the LPGI had no effect on reducing formalin induced nociceptive behaviors

Conclusion: The results suggested that morphine plays an anti-nociceptive role in LPGI in phase 1, interphase and late phase of formalin test in rats, which suggests that opioid receptors in the LPGI may be involved in the LPGI-mediated depression of formalin test as inflammatory pain.

Keywords: Morphine, Analgesic, Nucleus reticularis paragigantocellularis lateralis, Formalin test.

Conflict of Interest: No

Received: 7 July 2010

Accepted: 28 May 2011

*Corresponding author: H. Azhdari Zarmehri, Email: hasan.azhdari@gmail.com

مقدمه

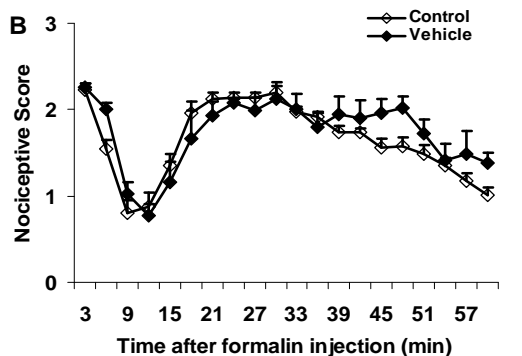
هسته پارازیگانتوسولولاریس جانبی (LPGi)، بخش وسیعی از تشکیلات مشبک می‌باشد که به ۲ قسمت پشتی و جانبی قابل تقسیم است. هسته پارازیگانتوسولولاریس در بخش شکمی جانبی ساقه مغز قرار دارد. قسمت جانبی آن به نام پارازیگانتوسولولاریس جانبی یا LPGi، یک هسته مشبک واقع در قسمت سری بصل‌النخاع است. این ناحیه به‌عنوان حس‌گر شیمیایی بصل‌النخاع می‌باشد و روی اعمال قلبی-عروقی و تنفسی و درد اثر، می‌گذارد. هسته LPGi در موش‌های صحرایی در جهت سری‌دمی کشیده شده و ابعاد آن ۳/۳ میلی‌متر طول، ۱/۰۵ میلی‌متر قطر بزرگ و ۱ میلی‌متر قطر کوچک آن به‌صورت پشتی شکمی است. نورون‌های آن ناهمگن پخش شده و از نظر اندازه به ۳ گروه کوچک، متوسط و بزرگ از نظر اندازه تقسیم می‌شوند (۱ و ۲). هسته LPGi از مناطق مختلف، عصب دریافت می‌کند. از هسته لوکوس سرلئوس (LC) نورون‌هایی به هسته LPGi وارد می‌شود. ورودی‌های هسته LC به LPGi با نورون‌های آن، که دوباره زواید نورونی می‌دهند، سیناپس می‌کنند و در این حالت هنوز این سؤال دقیقاً جواب داده نشده است که نقش سیناپس‌های متقابل دو هسته و ارتباط دوطرفه بین هسته LC و LPGi چه وظیفه مهمی را برعهده‌دارند. همچنین آوران‌هایی از تشکیلات مشبک بصل‌النخاعی، هسته دستجات منزوی و هسته رافه بزرگ به هسته LPGi وارد می‌شوند (۲ و ۳). مهم‌ترین و واضح‌ترین وابران از هسته LPGi به هسته LC می‌باشد. البته ارسال وابران‌های LPGi به مناطق پیرامون نظیر LC نیز گزارش شده است، ولی نحوه ارتباط آن با نورون‌های آن مناطق و نیز معماری ارتباط نورونی آن‌ها مشخص نیست (۳). بیش‌ترین نوروترانسمیتر رشته‌های وابران هسته LPGi در هسته LC، اسیدهای آمینه تحریکی گلوتامات می‌باشد و به‌کاربردن مواد تخریب‌کننده نورون‌های گلوتاماترژیک و یا تخریب LPGi، رهایش گلوتامات در هسته LC مهار شده و پاسخ نورون‌های آن تغییر می‌یابد (۳). در اجسام سلولی نورون‌های LPGi عوامل نوروشیمیایی، استیل‌کولین (ACh)، پپتید پانکراسی یا VIP، فاکتور رهاکننده کورتیکوتروپین یا CRF، دینورفین، نور آدرنالین، نوروتنسن، سروتونین، سوماتواستاتین یا SST، ماده P گزارش شده است (۱، ۲ و ۴). هسته LPGi، یک منطقه سیستم سمپاتیکی تحریکی در مغز می‌باشد. در این حالت LPGi به‌عنوان منطقه‌ای برای آماده‌کردن بدن در برابر محرک‌های آنی و پاسخ دفاعی جنگ و گریز، به‌صورت بخشی از یک مجموعه عملکردی ایفای نقش می‌کند. به‌کاربردن زیرجلدی نالوکسان (۲ mg/ Kg) در موش‌های وابسته به مرفین باعث افزایش فعالیت ذاتی نورون‌های LPGi می‌شود. این وضعیت بیانگر وجود نوعی تحمل و وابستگی در نورون‌های LPGi می‌باشد. از این طریق شاید فعالیت نورون‌های LC به‌علت افزایش

فعالیت نورون‌های LPGi قابل توصیف باشد (۳ و ۵). البته قابل ذکر است که در آزمایش‌های قبلی، بررسی در سطح سلولی و ملکولی روی نورون‌های هسته LPGi صورت نگرفته است که مشخص می‌شود آیا نقش LPGi در بروز وابستگی و تحمل ناشی از تغییرات درونی و ذاتی خود نورون‌های LPGi است یا این هسته تحت تأثیر ورودی‌هایش قرار می‌گیرد. مطالعات رفتاری، نقشی را برای LPGi در بی‌دردی القاشده توسط مرفین پیشنهاد می‌کنند. LPGi به‌عنوان قسمتی از هسته شکمی میانی بصل‌النخاع (RVM) با استپاله‌هایشان به شاخ خلفی نخاع، کانال وابران سیستم کنترل درد را تشکیل می‌دهند (۶، ۷ و ۸). علی‌رغم نقش شبکه عصبی درگیر در تعدیل درد در LPGi نوروترانسمیترهای درگیر و چگونگی عملکرد آن‌ها بر روی این شبکه مشخص نشده است. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که فعال‌شدن LPGi، به‌وسیله تحریک الکتریکی یا شیمیایی می‌تواند سبب بی‌دردی شود و ممکن است در تعدیل درد در سیستم داخلی ضد درد (حلقه بازخورد) متشکل از نخاع-نخاع شرکت کند. شواهدی وجود دارد که تزریق مرفین در LPGi سبب تأخیر کشیدن دم می‌شود. باتوجه به اینکه RVM و LPGi به‌عنوان مناطق درگیر در بی‌دردی شناخته شده‌اند، ولی نقش مرفین در تعدیل درد آزمون فرمالین در این مناطق روشن نشده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تزریق مرفین داخل LPGi بر پاسخ رفتاری به درد در آزمون فرمالین می‌باشد و به این سؤالات پاسخ داده شود:

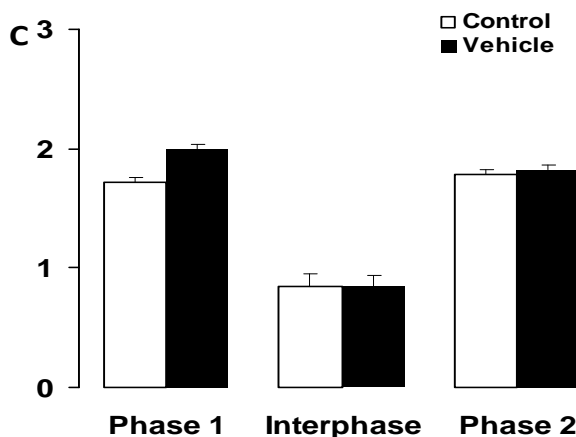
- آیا تزریق داخل LPGi مرفین سبب بی‌دردی در مدل درد التهابی آزمون فرمالین می‌شود؟

مواد و روش‌ها

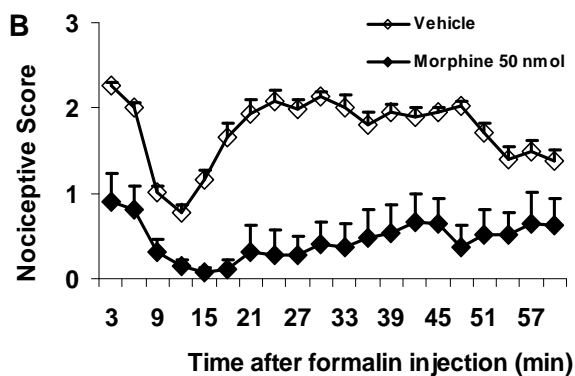
در این پژوهش از ۲۰ سر موش صحرایی سفید؛ نژاد Sprague Dawley؛ در محدوده وزنی ۲۰۰-۳۰۰ گرمی؛ خریداری شده از انستیتو رازی، در ۳ گروه استفاده شد. ۱- گروه شاهد، ۲- گروه تزریق حلال به داخل هسته LPGi و ۳- گروه تزریق مرفین به داخل هسته LPGi. در این پژوهش از مطالعه مدل درد التهابی به‌وسیله تزریق فرمالین استفاده شد. آزمون فرمالین یک روش ارزشمند و مدل مناسب برای سنجش و ارزیابی درد مداوم و پایدار ناشی از یک محرک شیمیایی می‌باشد و از سوی دیگر می‌توان اثرات درد حاد را نیز در طی فاز اول این تست بررسی کرد. در این تست به‌منظور مشاهده و بررسی رفتارهای حیوان، از یک محفظه شفاف با کف مسطح، به ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ و از جنس Plexiglass استفاده شد. برای مشاهده پنجه پای حیوان، در زیر محفظه شفاف، آینه‌ای تعبیه شده بود. در این تست، با یک سرسوزن نمره ۳۰، زیر پوست پنجه‌ی پای حیوان، ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۲٪ تزریق شد. به‌دنبال تزریق فرمالین، حیوان مجموعه‌ای از رفتارهای القاشده با فرمالین و رفتارهای خودبه‌خودی را نشان داد که نمره ۰ تا ۳ داده شد (۹). نمره صفر زمانی داده شد که پای



نمودار ۱- مقایسه نمره آزمون فرمالین بین گروه شاهد و حلال برای ۶۰ دقیقه



نمودار ۲- میانگین نمره آزمون فرمالین در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین در دو گروه شاهد و حلال



نمودار ۳- مقایسه نمره آزمون فرمالین بین گروه حلال و مورفین روی رفتارهای دردی آزمون فرمالین برای ۶۰ دقیقه

حیوان به طور طبیعی روی زمین بود. نمره ۱ زمانی داده شد که پای حیوان، مختصری روی زمین بود. نمره ۲ زمانی داده شد که پای حیوان از زمین کنده شده بود و نمره ۳ زمانی داده شد که حیوان پایش را گاز می گرفت و یا لیس می زد.

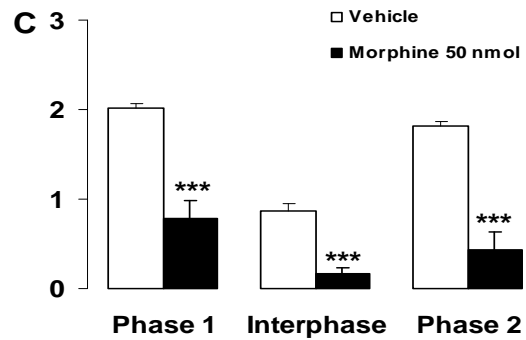
برای ریز تزریق داروها، ابتدا کانول گذاری هسته براساس مختصات آن در اطلس پاکسینوس (۱۰) انجام می شد و پس از بهبودی (یک هفته بعد) حیوانات برای تست رفتاری آماده می شدند. در روز آزمایش، داروها در هر گروه (که در زیر آمده است) با استفاده از سرنگ هامیلتون و لوله پلی اتیلن (PE-100) با کانول گیج ۲۳ (۰/۵ $\mu\text{l}/\text{min}$) تزریق می شد.

روش تزریق دارو در گروه های مختلف به صورت ریز تزریق بود. برای انجام تزریق داروها و ترکیبات، کانول های تزریق و راهنما در هسته مورد آزمایش تعبیه می شد. برای کانول گذاری، حیوان پس از بیهوش شدن در دستگاه استروئوتاکسی مستقر می شد و پوست ناحیه سر به حداقل میزان، برش داده می شد. پس از کنار زدن بافت های پوششی اطراف نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و با توجه به فاصله آن ها و نسبت آن با فاصله ذکر شده در اطلس پاکسینوس (۱۰) نواحی سطح جمجمه متعلق به هسته مورد آزمایش مشخص می شد. بعد از علامت گذاری مناطق ذکر شده با استفاده از مته های دندان پزشکی، در محل مذکور منفذی به اندازه قطر کانول راهنما، که معمولاً از سرسرنگ نمره ۲۳ است، ایجاد و کانول راهنما به اندازه ۵ سانتی در درون مغز مستقر شد و قسمت رویی آن در روی جمجمه، به وسیله سیمان دندان پزشکی ثابت می شد. دو پیچ کوچک (پیچ عینک) در استخوان جمجمه تعبیه می شد و در درون سیمان دندان پزشکی فرو می رفت. این دو پیچ در حکم مسلح سازی سیمان بود و از جدا شدن آن از سطح جمجمه جلوگیری می کرد. منفذ کانول راهنما در بیرون جمجمه به وسیله درپوش خاصی مسدود بود و فقط در زمان های تزریق دارو برداشته می شد. یک کانول نازک تر که از سوزن نمره ۳۰ بود، به اندازه ای که ۲ میلی متر طولی تر از نوک کانول راهنما باشد، تهیه شد و از یک طرف به یک لوله نازک پلی اتیلن وصل شد. سر دیگر لوله پلی اتیلن به سرنگ هامیلتون وصل شد و مقدار مشخص حجم ماده تزریقی در قسمت نوک کانول تزریق وارد می کرد. به دنبال تزریق فرمالین، حیوان مجموعه ای از رفتارهای القاشده با فرمالین و رفتارهای خود به خودی را نشان داد که در هر ۱۵ ثانیه، نمره ۰ تا ۳ داده شد و تا ۱ ساعت رفتار دردی ثبت شد (۱۰). میانگین زمان در دقیقه محاسبه شد و همچنین فاز حاد (۷ دقیقه اول) و فاز مزمن (۴۰ دقیقه پایانی) محاسبه و میانگین گیری شده برای مقایسه دو گروه از آزمون t استفاده شد.

۴- آزمون فرمالین دارای ۲ فاز می‌باشد که هر فاز نوع متفاوتی از درد را نشان می‌دهد (۹ و ۱۱).

تزریق مرفین به داخل LPGi به‌عنوان یکی از مناطق تعدیل‌کننده درد، می‌تواند فرصتی را فراهم کند تا نقش مرفین در سیستم تعدیل‌کننده نزولی درد، مورد مطالعه قرار گیرد. تزریق مرفین به داخل هسته LPGi، سبب کاهش شدید رفتارهای درد در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین شد. ممکن است مرفین سبب فعال کردن نسبی و یا تأخیری سیستم تعدیل درد نزولی از طریق LPGi شود.

۳ مسیر از ساقه مغز به نخاع که سبب مهار در سطح نخاع می‌شود، در گربه و موش آزمایشگاهی توصیف شده است (۱۲ و ۱۳). اولی از LPGi منشأ گرفته است و از قسمت شکمی نخاع منشعب می‌شود و دو تایی دیگر از طریق فانیکلوس پشتی- جانبی منشعب می‌شود و از هسته رافه بزرگ و LPGi منشأ می‌گیرند. تحریک الکتریکی هسته رافه بزرگ، سبب بی‌دردی می‌شود و به‌وسیله نالوکسان کاهش می‌یابد (۱۴ و ۱۵) و پاسخ سلول به تحریک دردناک در سطح نخاعی کاهش می‌یابد (۱۶ و ۱۷). به‌علاوه تخریب هسته رافه بزرگ سبب کاهش بی‌دردی تولیدشده توسط تزریق سیستمیک مرفین می‌شود (۱۸) و تزریق سیستمیک مرفین سبب تخلیه نورونی را در هسته رافه بزرگ تغییر می‌دهد (۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۱). دیکنسون و همکاران (۱۹) و لوی و همکاران (۲۰) بی‌دردی ناشی از تزریق مرفین به هسته رافه بزرگ گزارش کردند که تزریق مرفین به مناطق اطراف شامل ساختار مشبک دیده نشد. این یافته‌ها با مطالعه آکایکه و همکاران (۲۱) متفاوت بود که نشان دادند که ساختار مشبک که از هسته ژینگانتوسولولاریس (NRGC و LPGi) تشکیل شده است و خیلی حساس به مرفین در تولید بی‌دردی است. آنان دریافتند که مرفین سبب بی‌دردی ۲۰ برابر در LPGi نسبت به NRGC شده است و جالب اینکه بی‌دردی تولید شده از طریق تحریک الکتریکی LPGi نیز دیده شد. همچنین عظمی و همکاران (۲۲) نشان دادند که ریز تزریق مرفین به داخل LPGi یا NRM سبب افزایش آستانه درد معیار اندازه‌گیری شده توسط آزمون Tail Flick می‌باشد که به‌وسیله نالوکسان مهار شده است (۲۲). تزریق ۱ میکروگرم مرفین به داخل LPGi سبب بی‌دردی شد، درحالی‌که بعد از تزریق مرفین به داخل هسته رافه بزرگ، سبب بی‌دردی نشد. این مشاهدات متفاوت از مطالعات دیکنسون و لوی (۱۹ و ۲۰) است که نشان دادند تزریق مرفین به داخل ساختار مشبک، سبب بی‌دردی نمی‌شود. اختلاف در روش استفاده‌شده دو مطالعه فوق وجود دارد. در مطالعه دیکنسون و لوی (۱۹ و ۲۰) نوک کانال راهنما در ساقه مغز بود و ممکن است سبب تخریب مسیر پایین‌رو از LPGi به نخاع شده باشد. آکایکه و همکاران نشان دادند که تزریق مرفین به LPGi، تولید بی‌دردی کرد و LPGi ۲۰ برابر بیشتر از



نمودار ۴- میانگین نمره آزمون فرمالین در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ در دو گروه حلال و مورفین

نتایج

۱- اثر تزریق حلال در داخل هسته پاراژینگانتوسولولاریس جانبی، روی رفتارهای درد آزمون فرمالین

تزریق فرمالین سبب رفتارهای درد شد که از فاز ۲ فاز تشکیل شده است. تزریق سالین (۰/۵ میکرولیتر) به‌عنوان حلال به داخل هسته (۱۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین) تغییری در رفتارهای درد فاز اول و دوم نداشت (نمودار ۱). مقایسه میانگین نمره رفتار درد در ۲ گروه شاهد و حلال در فازهای مختلف، در نمودار ۲ نشان داده شده است. مقدار عددی ۱/۷۲ برای شاهد و ۱/۹۹ برای گروه حلال در فاز اول، ۰/۸۵ برای گروه شاهد و ۰/۸۵ برای گروه حلال در فاز اینترفاز و ۱/۷۹ برای گروه شاهد و ۱/۸۲ برای گروه حلال در فاز دوم گزارش شده است.

۲- مقایسه نتایج آزمون فرمالین بین تزریق مرفین و حلال نمرات آزمون فرمالین در ۲ گروه حلال و مرفین در زمان‌های مختلف در نمودار ۳ ارائه شده است. تزریق داخل LPGi مرفین در دوزهای ۵۰ نانومول روی رفتارهای درد آزمون فرمالین نشان می‌دهد که تزریق داخل LPGi مرفین سبب کاهش شدید نمره درد در فاز ۱، اینترفاز و فاز ۲ نسبت به گروه حلال شده است (نمودار ۴). مقدار عددی ۱/۹۹ برای گروه حلال و ۰/۷۸ برای گروه مرفین در فاز اول، ۰/۸۵ برای گروه حلال و ۰/۱۶ برای گروه مرفین در اینترفاز و ۱/۸۲ برای گروه حلال و ۰/۴۴ برای گروه مرفین در فاز دوم می‌باشد ($P < 0.001$).

بحث

در این مطالعه اثر تزریق داخل LPGi مرفین روی رفتارهای درد آزمون فرمالین بررسی شده است. آزمون فرمالین در این پژوهش به این دلایل استفاده شده است: ۱- آزمون فرمالین تحریک دردناک مناسبی را فراهم می‌کند. ۲- نسبت به مدل‌های درد حاد، تحریک دردناک در آزمون فرمالین به‌طور مداوم می‌باشد و از این جهت می‌تواند مشابه درد بالینی باشد. ۳- حیوان آزمایشگاهی استرس کمتری را تجربه می‌کند.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً مرفین از طریق فعال کردن رسپتورهایش در LPGI، سبب فعال کردن سیستم مهارى پایین‌رو می‌شود و از این طریق با مکانیسم‌هایی که در شکل‌گیری اینترفاز و فاز دوم نقش دارند، مداخله می‌کند و برای شناسایی چنین مکانیسم‌هایی نیاز به مطالعات بیشتر است.

References

- Andrezik JA, Chan-Palay V, Palay SL. The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Demonstration of afferents by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anat Embryol (Berl)* 1981;161(4):373-90.
 - Andrezik JA, Chan-Palay V, Palay SL. The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Conformation and cytology. *Anat Embryol (Berl)* 1981;161(4):355-71.
 - Guyenet PG, Young BS. Projections of nucleus paragigantocellularis lateralis to locus coeruleus and other structures in rat. *Brain Res* 1987;406(1-2):171-84.
 - Shen F, Yu W. [Study of cytochemical properties in the nucleus paragigantocellularis lateralis of rats]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1994;25(3):271-4.
 - Lovick TA. Tonic GABAergic and cholinergic influences on pain control and cardiovascular control neurones in nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. *Pain* 1987;31(3):401-9.
 - Fields HL, Malick A, Burstein R. Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 1995;74(4):1742-59.
 - Heinricher MM, Barbaro NM, Fields HL. Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. *Somatosens Mot Res* 1989;6(4):427-39.
 - Heinricher MM, McGaraughty S, Tortorici V. Circuitry underlying antinociceptive actions of cholecystokinin within the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 2001;85(1):280-6.
 - 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* 1977;4(2):161-74.
 - G.Paxinos and C.Watson. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (4th and 6th edition), Academic Press, New York (1998 and 2007). 2005.
 - Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 1995;60(1):91-102.
 - Basbaum AI, Clanton CH, Fields HL. Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *J Comp Neurol* 1978;178(2):209-24.
 - Basbaum AI, Fields HL. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. *J Comp Neurol* 1979;187(3):513-31.
 - Oliveras JL, Redjemi F, Guilbaud G, Besson JM. Analgesia induced by electrical stimulation of the inferior centralis nucleus of the raphe in the cat. *Pain* 1975;1(2):139-45.
 - Oliveras JL, Hosobuchi Y, Redjemi F, Guilbaud G, Besson JM. Opiate antagonist, naloxone, strongly reduces analgesia induced by stimulation of a raphe nucleus (centralis inferior). *Brain Res* 1977;120(2):221-9.
- NRGC حساس به مرفین بود (۲۱). تزریق مرفین به میزان ۲ نانوگرم/کیلوگرم به داخل LPGI قادر به تولید بی‌دردی است. نویسندگان استدلال می‌کنند تزریق سیستمیک مرفین در دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم می‌تواند تولید غلظت مرفین در مغز نزدیک به ۰/۱۷۳ میکروگرم در ۰/۵ میکرولیتر ایجاد کند و چون تزریق ۳۸۰ نانوگرم مرفین به داخل هسته مگنوس بزرگ بر آستانه درد تأثیر ندارد، در نتیجه هسته مگنوس بزرگ نمی‌تواند سهمی در بی‌دردی تولید شده توسط تزریق سیستمیک مرفین داشته باشد. برای آزمایش اینکه کدام هسته نقش مهم‌تری در بی‌دردی تولیدشده از طریق تجویز سیستمیک مرفین دارد، عظمی و همکاران از تزریق نالوکسان به دنبال بی‌دردی ایجادشده توسط مرفین در چندین ناحیه در مغز استفاده کردند. در آن مطالعه، تزریق در NRM و ۵ قسمت دیگر از جمله LPGI انجام شد. این روش به علت طبیعت قابل حل نالوکسون در چربی که منجر به انتشار سریع این ماده در بافت مغز می‌شود لازم بود (۲۲). با استفاده از این دسته‌بندی، مناطق تزریق نالوکسان در خط میانی سبب آنتاگونیسم‌زدایی بیشتر از بی‌دردی مرفین نسبت به ادامه جانبی آن شد (۲۲).
- قبلاً مرحله اینترفاز را یک مرحله مهارى غیرفعال می‌شناختند و شاید به این دلیل مورد توجه زیاد قرار نگرفته بود، در حالی که در چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که مرحله اینترفاز به صورت فعال ایجاد می‌شود و به طور درون‌زاد، نتیجه مکانیسم‌های متوقف‌کننده درد می‌باشد (۲۳). فرانکلین و همکارانش گزارش کردند که پنتوباریتال و دیازپام سبب مهار مرحله اینترفاز می‌شود و پیشنهاد کردند که آگونیست‌های GABA، سبب پرده‌برداری از درد مرحله اینترفاز می‌شوند (۲۳). هنری و همکارانش نشان دادند که دو تزریق پی‌درپی فرمالین به کف پای حیوان سبب کاهش ثانویه در نمره رفتارهای درد بعد از تزریق دوم فرمالین شد، در حالی که انتظار اثر جمعی دو تزریق پی‌درپی فرمالین به کف پای حیوان وجود داشت. نتیجه شده است که مکانیسم‌های مهارى فعال مرحله اینترفاز، سبب کاهش درد بعد از تزریق دوم فرمالین شده است. آن‌ها این را به فرمی از بی‌دردی غیراپیوئیدی نسبت می‌دهند که از مناطق فوق نخاعی منشأ می‌گیرد و سبب کنترل مهارى پایین‌رو در طی مرحله اینترفاز می‌شود. احتمالاً مرفین از طریق مسیر غیر اپیوئیدی سبب افزایش مهار در فاز ۲ آزمون فرمالین شده است. با توجه به اینکه رسپتورهای NMDA و GABA در شکل‌گیری مرحله اینترفاز و فاز ۲ نقش دارند و تحقیقات رهایش گلوتامات و گابا در طی آزمون فرمالین گزارش شده است (۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۲۹)، ممکن است مرفین از طریق تأثیر بر رسپتورهای NMDA و GABA و یا تغییر رهایش نوروترانسمیترها سبب کاهش رفتارهای درد در مرحله اینترفاز و فاز ۲ آزمون فرمالین شده است.

16. Duggan AW, Griersmith BT. Inhibition of the spinal transmission of nociceptive information by supraspinal stimulation in the cat. *Pain* 1979;6(2):149-61.
17. Fields HL, Basbaum AI, Clanton CH, Anderson SD. Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Res* 1977;126(3):441-53.
18. Proudfit HK, Anderson EG. Morphine analgesia: blockade by raphe magnus lesions. *Brain Res* 1975;98(3):612-8.
19. Dickenson AH, Oliveras JL, Besson JM. Role of the nucleus raphe magnus in opiate analgesia as studied by the microinjection technique in the rat. *Brain Res* 1979;170(1):95-111.
20. Levy RA, Proudfit HK. Analgesia produced by microinjection of baclofen and morphine at brain stem sites. *Eur J Pharmacol* 1979;57(1):43-55.
21. Akaike A, Shibata T, Satoh M, Takagi H. Analgesia induced by microinjection of morphine into, and electrical stimulation of, the nucleus reticularis paragigantocellularis of rat medulla oblongata. *Neuropharmacology* 1978;17(9):775-8.
22. Azami J, Llewelyn MB, Roberts MH. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. *Pain* 1982;12(3):229-46.
23. Franklin KB, Abbott FV. Pentobarbital, diazepam, and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABAA receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;46(3):661-6.
24. Stiller CO, Linderoth B, O'Connor WT, Franck J, Falkenberg T, Ungerstedt U, et al. Repeated spinal cord stimulation decreases the extracellular level of gamma-aminobutyric acid in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Brain Res* 1995;699(2):231-41.
25. Silva E, Hernandez L, Contreras Q, Guerrero F, Alba G. Noxious stimulation increases glutamate and arginine in the periaqueductal gray matter in rats: a microdialysis study. *Pain* 2000;87(2):131-5.
26. 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(2):141-7.
27. Maione S, Oliva P, Marabese I, Palazzo E, Rossi F, Berrino L, et al. Periaqueductal gray matter metabotropic glutamate receptors modulate formalin-induced nociception. *Pain* 2000;85(1-2):183-9.
28. Chaplan SR, Malmberg AB, Yaksh TL. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280(2) 829-38.
29. Vaccarino AL, Clemmons HR, Mader GJ, Jr., Magnusson JE. A role of periaqueductal grey NMDA receptors in mediating formalin-induced pain in the rat. *Neurosci Lett* 1997;236(2):117-9.