

# نقش احتمالی سیستم اپیوئیدی در بی دردی ناشی از سروتونین در تست فرمالین

دکتر علیرضا محجل نائبی<sup>۱</sup> ، دکتر ابوالحسن احمدیانی<sup>۲</sup>

**Title :** Possible Role of Opioidergic System in Serotonin Induced Analgesia in the Formalin Test

**Authors :**Alireza Nayebi<sup>1</sup> , Abolhassan Ahmadiani<sup>2</sup>

**Abstract :**There is much evidence indicating that the serotonergic system involves in the central regulation of nociceptive sensitivity. However, the exact mechanism of serotonergic system and also its interaction with other neural systems has not yet been understood. In this study, the effect of serotonin (5-HT) and fenfluramine, as a serotonin releaser, on formalin induced pain and also its possible interaction with opioidergic system have been studied. Results obtained from this study show that serotonin in intrathecal (100 µg/rat, i.t.) and intracerebroventricular (100 µg/rat, i.c.v.) administration produces significant ( $P < 0.05$ ) analgesia in early and late phase of formalin test. These analgesic effects were abolished by pretreatment with the naloxone hydrochloride (2 mg/kg, i.p.). Furthermore, fenfluramine (10 mg/kg, i.p.) induced analgesia in both phases which has been reversed by pretreatment with the naloxone (2 mg/kg, i.p.). The results of our study may indicate that serotonin induces antinociceptive effect in chronic inflammatory pain through activation of opioidergic neurons, but it needs more investigation in order to clarify the mechanism of this interaction.

**Key words :***Serotonin; Fenfluramine; Opioidergic system; Naloxone, Formalin test.*

1- Assistant Professor, School of Pharmacy , Tabriz University of Medical Sciences

۱-استادیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

2-Associated Professor, School of Medicine, Shabeed-Beheshti University of Medical Sciences

۲-دانشیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

## خلاصه

شواهد قابل ملاحظه ای در رابطه با نقش سروتونین (5-HT) در تعدیل درد حاد و مزمن در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی وجود دارد. با وجود این مکانیسم دقیق اثر ضد دردی سروتونین و ارتباط آن با سایر سیستم‌های عصبی هنوز بدرستی مشخص نیست. در این مطالعه اثر 5-HT<sub>3</sub> بر روی درد ناشی از تزریق فرمالین و نقش احتمالی سیستم اپیوئیدی بررسی شده است. تزریق داخل بطن مغزی (i.c.v.) سروتونین (100 µg/rat) بی دردی معنی داری را در فاز اول و دوم تست فرمالین ایجاد کرد که با پیش درمانی توسط داروی نالوکسان (2 mg/kg, i.p) بی دردی ایجاد شده در هر دو فاز از بین رفت. تزریق داخل نخاعی (i.t.) سروتونین (100 µg/rat) نیز بی دردی معنی داری را در هر دو فاز ایجاد کرد که با پیش درمانی با نالوکسان (2 mg/kg, i.p) بی دردی ایجاد شده در هر دو فاز از بین رفت. فن فلور آمین (10 mg/kg, i.p) در هر دو فاز بی دردی ایجاد کرد که توسط داروی نالوکسان (2 mg/kg, i.p) آستانه درد مجدداً به حالت اول برگشت پیدا کرد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که 5-HT با ایجاد اثرات مرکزی نقش تعدیل‌کنندگی بر درد مزمن ناشی از تزریق فرمالین که مدل مناسب مطالعه دردهای مزمن انسانی می‌باشد، دارد و پیشنهاد می‌شود که اثر بی دردی ایجاد شده توسط آن احتمالاً از طریق فعال سازی نرون‌های اپیوئیدرژیک باشد با وجود این برای مشخص شدن نحوه تداخل بین سیستم سروتونرژیک و اپیوئیدرژیک نیاز به مطالعات بعدی وجود دارد.

گل واژگان: سروتونین، فن فلور آمین، سیستم اپیوئیدرژیک، نالوکسان، تست فرمالین

## مقدمه

مطالعه قبلی ما نشان می‌دهد که در بی دردی ایجاد شده بدنال حذف تستوسترون به روش گنادکتومی میزان 5-HT در شاخ خلفی نخاع در ناحیه L5 افزایش می‌یابد (۲). همچنین گزارشهای زیادی مبنی بر ایجاد بی دردی توسط داروهای مهارکننده اختصاصی آپتیک سروتونین چون زیملیدین، سرتالین و سیتالوپرام وجود دارد که تأییدی بر دخالت این سیستم عصبی بر تعدیل درد می‌باشد (۳، ۴، ۶). گزارش دیگر نشان می‌دهد که فن فلور آمین، بعنوان آزاد کننده 5-HT از پایانه‌های اعصاب سروتونرژیک، با ایجاد اثرات تعدیل‌کنندگی بر درد آستانه درد را افزایش می‌دهد (۸).

گزارشات متعدد حاکی از تداخل بین سیستم سروتونرژیک و اپیوئیدرژیک می‌باشند (۹، ۸). برخی از داروهای ضد افسردگی که مهارکننده آپتیک 5-HT

نتایج بدست آمده از مطالعات مختلف نشان می‌دهند که سیستم سروتونرژیک در اعصاب مرکزی در تعدیل درد و افزایش آستانه درد دخالت دارد (۶-۱). افزایش فعالیت سیستم سروتونرژیک نزولی با اثر ضد دردی همراه است و کاهش فعالیت این نرون‌ها برعکس سبب افزایش حساسیت به عوامل دردزا می‌گردد (۲). ۲-متیل سروتونین، آگونیست گیرنده 5-HT<sub>3</sub>، در تزریق داخل بطن مغزی سبب کاهش درد در تستهای درد حاد شده و بی دردی وابسته به دوزی را در تست فرمالین ایجاد می‌کند (۲). نتایج متناقضی در ارتباط با تأثیر 5-HT بر روی درد وجود دارد و برخی از محققین آن را بعنوان یک مسدیاتور دردزا مطرح می‌کنند (۷).

برای ارزیابی درد مزمن از تست فرمالین استفاده گردید. مطالعات رفتاری درد در فاصله ۱۰ صبح تا ۴ بعد از ظهر و در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۱ °C) و در شرایط آرام و بدون استرس و با توجه به تطابق نیم تا یک ساعته حیوان با محیط انجام می شد. بعد از تطابق ۵۰ میکرولیتر از محلول فرمالین ۲/۵٪ با سرنگ انسولین به زیر پوست (S.C.) کف پای چپ حیوان تزریق می شد. جهت ثبت رفتارهای مربوط به درد بلافاصله بعد از تزریق فرمالین، حیوان در محفظه مخصوص از جنس پلاستی گلاس شفاف با ابعاد ۳۰ × ۳۰ × ۳۰ cm قرار داده می شد و رفتار حیوان هر ۱۵ ثانیه به مدت ۶۰ دقیقه از طریق آینه ای که با زاویه ۴۵ درجه در پائین محفظه قرار داشت بررسی میگردید. عکس العمل حیوان نسبت به درد در هر ۱۵ ثانیه به شرح زیر به کمیت های ۰، ۱، ۲ و ۳ تبدیل شده و ثبت می شد:

۰ = حیوان پای تزریق شده را کاملاً روی زمین می گذارد و به آن تکیه میکند.

۱ = حیوان پای تزریق شده را بطور ناقص روی زمین میگذارد و در حین حرکت لنگیدن آشکاری دارد.

۲ = حیوان پای تزریق شده را بالا نگه می دارد.

۳ = حیوان از شدت درد پای تزریق شده را تکان می دهد و یا می لیسد.

میانگین پاسخ به درد در ۵ دقیقه اول و دقیقه ۲۰ الی ۶۰ بعد از تزریق فرمالین محاسبه و به شکل فاز اول و دوم در هیستوگرام نتایج نشان داده شده است.

### تزریق داخل نخاعی و تزریق داخل بطن مغزی

در حیوانات بیهوش شده توسط پنتوباریتال (50 mg/kg, i.p) از فضای آنلانتواکسیپیتال لوله پلی

می باشند در صورت مصرف توام با اپیوئیدها اثر ضد دردی آنها افزایش می یابد (۱۰). همچنین مصرف توام فن فلورآمین به همراه مورفین سبب افزایش اثر ضد دردی مورفین می شود (۸). با توجه به گزارشهای متعددی که در زمینه اثرات سروتونین در انواع دردها وجود داشت در این مطالعه سعی شد که اثر سروتونین بر درد ناشی از تزریق فرمالین و همچنین ارتباط اثرات آن با سیستم اپیوئیدرژیک بررسی شود. تست فرمالین مدل مناسب بررسی درد التهابی تونیک می باشد و رفتارهای مربوط به دردی که در رت بعد از تزریق فرمالین دیده می شود شباهت زیادی با دردهای مزمن انسانی دارد (۱۳-۱۱). بنابراین در این بررسی این تست به عنوان مدل بررسی درد مزمن مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه میتواند نقش مهمی در روشن شدن مکانیسم های نرونی دخیل در تعدیل درد و نیز مشخص شدن نحوه تداخل بین سیستم های عصبی داشته باشد.

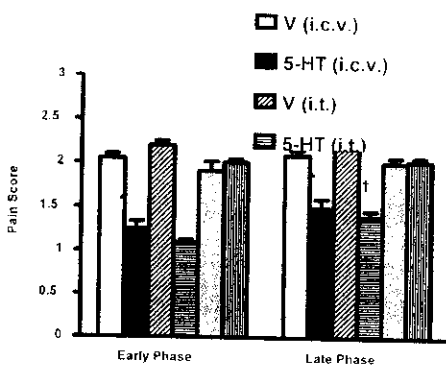
### روش کار

#### مواد و حیوانات

تمامی محلولهای دارویی در همان روز آزمایش بطور تازه تهیه شدند. سروتونین کراتینین سولفات (Sigma)، فن فلورآمین کارخانه لقمان (اهدائی بخش فارماکولوژی شهید بهشتی)، نالوکسان هیدروکلراید (Sigma) و پنتوباریتال سدیم Merck (اهدائی بخش فارماکولوژی شهید بهشتی) با مقادیر مورد نظر در 0.9% NaCl حل شدند. در این مطالعه از موش صحرایی نرنژاد Sprague-Dawley استفاده شد. حیوانات به ۸ گروه شش تایی تقسیم شده و بطور جداگانه در قفس های پلاستی گلاس نگهداری می شدند.

#### تست فرمالین

آن دسته از رت هائی که نیم ساعت قبل از انجام تست فرمالین به آنها نالوکسان با دوز  $2 \text{ mg/kg}$  به روش i.p. تزریق شده بود تزریق سروتونین ( $100 \mu\text{g/rat}$ , i.c.v.) بی دردی ایجاد نکرد. همچنین سروتونین در تزریق i.t. با همان دوز در هر دو فاز تست فرمالین بی دردی معنی دار ( $P < 0.05$ ) ایجاد کرد که با پیش درمانی توسط داروی نالوکسان ( $2 \text{ mg/kg}$ , i.p.) بی دردی ایجاد شده از بین رفت (شکل ۱).



شکل ۱. اثر سروتونین تزریق شده به روش تزریق داخل نخاعی ( $100 \mu\text{g/rat}$ ) و داخل بطن مغزی ( $100 \mu\text{g/rat}$ ) و نیز اثر آنها در گروهی از رت ها که با داروی نالوکسان ( $2 \text{ mg/kg}$ ) پیش درمانی شده اند. داده ها بصورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  بیان شده اند ( $n = 6$ ).  $P < 0.05$  \* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروهی است که حلال دارو را به روش تزریق i.c.v. دریافت کرده اند،  $P < 0.05$  † نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروهی است که حلال دارو را به روش تزریق i.t. دریافت کرده اند. V = حلال دارو، 5-HT = 5-هیدروکسی تریپتامین (سروتونین)، Nalox = نالوکسان هیدروکلراید

اتیلنی PE10 را به موازات نخاع وارد مجرای زیر عنکبوتیه می کنیم (۸). پس از طی دوره ریکاوری ۲۴ ساعته چنانچه حیوان مشکل حسی و حرکتی نداشته باشد برای تزریق دارو و انجام آزمایشات مورد استفاده قرار می گرفت.

برای قرار دادن کانول راهنما در داخل بطن، ابتدا حیوان را با پنتوباریتال ( $50 \text{ mg/kg}$ , i.p.) بیهوش کرده و سپس با کمک دستگاه استرئوتاکسی یک کانول استیل نمره ۲۱ به طول  $3/3 \text{ cm}$  بعنوان کانول راهنما با مختصات  $V = 3/3$ ،  $L = 1/4$  و  $AP = 0/8$  در بطن جانبی مغز قرار می دهیم. تزریق دارو بعد از طی یک دوره ریکاوری ۵ روزه انجام می گردید. در پایان آزمایشات برای حصول اطمینان از قرار گرفتن کانول در داخل بطن مغزی پس از کشتن حیوان و تزریق ماده رنگی از محل کانول برش تهیه می شد. در تمامی تزریقات i.t. و i.c.v. داروها در حجم ۱۰ میکرو لیتر تزریق می شدند. تاثیر داروها بر رفتار درد بلافاصله بعد از تزریق i.t. و i.c.v. و در تزریق داخل صفاقی نیم ساعت بعد از تزریق بررسی شد.

## روشهای آماری

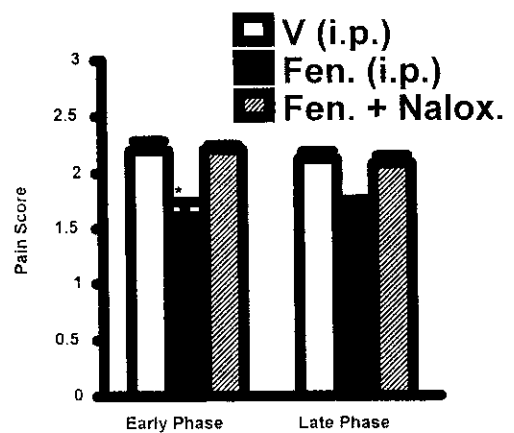
داده ها برحسب  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  بیان شده اند. برای بررسی تفاوت بین گروهها در هر فاز از آزمون غیر پارامتریک Kruskal-Wallis و در صورت وجود تفاوت معنی دار ( $P < 0.05$ ) از تست Dunn's multiple comparisons test استفاده شد. اختلاف با  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

تزریق i.c.v. سروتونین با دوز  $100 \mu\text{g/rat}$  در هر دو فاز بی دردی معنی داری ( $P < 0.05$ ) ایجاد کرد. در

تزریق i.p. داروی فن فلورآمین با دوز  $10 \text{ mg/kg}$  بی دردی معنی داری را در هر دو فاز ایجاد کرد. در آن گروهی از رت ها که به آنها نالوکسان با دوز  $2 \text{ mg/kg}$  به روش i.p. تزریق شده بود تزریق فن فلورآمین به روش i.p. با همان دوز اثر معنی داری را در آستانه درد ایجاد نکرد (شکل ۲).

دو فاز تست فرمالین ایجاد می کند که با نتایج بدست آمده از بررسی های دیگر که حاکی از دخالت سیستم سروتونرژیک در روند مرکزی تعدیل و کنترل درد می باشد (۶-۱) مطابقت می نماید هر چند که برخی از بررسی ها سروتونین را بعنوان ماده دردزا معرفی می نمایند (۷). علت وجود تناقض در نتایج می تواند مربوط به نوع حیوان مورد آزمایش و نوع تست بکار رفته برای ارزیابی درد باشد (۵). همچنین داروی فن فلورآمین به عنوان آزاد کننده سروتونین از نرون های سروتونرژیک نیز بی دردی معنی داری را در هر دو فاز ایجاد کرد. نتایج حاصل از بررسی های قبلی ما به روش تکنیک میکرودیالیز نشان می دهد که سطح نخاعی سروتونین در شاخ خلفی نخاع در ناحیه L5 بدنسال بی دردی ناشی از گنادکتومی و یا تجویز آنتاگونیست هورمون تستسترون افزایش می یابد (۵) که این نتیجه باز تأییدی بر نتایج حاصل از این مطالعه می باشد. گزارش های متعددی مبنی بر دخالت سایر سیستم های عصبی چون سیستم اپیوئیدرژیک در تعدیل درد در مدل های مختلف آزمایشگاهی، وجود دارد. (۱، ۸، ۱۱، ۱۲) و برخی از گزارش ها حاکی از وجود تداخل بین این دو سیستم عصبی می باشند (۱۱، ۱۲). مطالعه تداخل اثر این سیستم ها می تواند در مشخص شدن مکانیسم دقیق کنترل درد و نیز طراحی داروهای با اثرات اختصاصی تر کمک کننده می باشد. داروی نالوکسان به عنوان آنتاگونیست اپیوئیدی باعث از بین رفتن بی دردی ناشی از سروتونین و فن فلورآمین گردید. این امر نشان می دهد که احتمالاً بی دردی ناشی از تجویز سروتونین از طریق فعال کردن نرون های اپیوئیدرژیک می باشد زیرا مصرف آنتاگونیست اپیوئیدی توانست بی دردی ناشی از سروتونین را بطور معنی داری کاهش دهد. نتایج حاصل از این مطالعه نشانگر وجود ارتباط بین این دو سیستم عصبی در زمینه



شکل ۲. اثر تزریق داخل صفاقی فن فلورآمین (10 mg/kg) بر درد ناشی از تزریق فرمالین و نیز اثر تزریق داخل صفاقی آن با همان دوز در گروهی از رت ها که با نالوکسان هیدروکلراید (2 mg/kg, i.p) پیش درمانی شده اند. داده ها بصورت Mean  $\pm$  SEM بیان شده اند (n = 6),  $P < 0.05$  × نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروهی که حلال دارو را به روش تزریق i.p. دریافت کرده اند. V = حلال دارو، Fen. = فن فلورآمین، Nalox. = نالوکسان هیدروکلراید

## بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان می دهند که پاسخ های رفتاری که بدنسال تزریق زیر جلدی فرمالین به کف پای حیوان ایجاد می شود از دو فاز I و II تشکیل شده اند. فاز I از طریق فعال شدن فیبرهای عصبی نوع C ایجاد می شود در حالیکه در ایجاد فاز II مجموعه ای از واکنش های التهابی در بافت های محیطی و تغییر در عملکرد نرون های شاخ خلفی نخاع دخالت می کنند (۱۳، ۲). فاز II شباهت زیادی به دردهای التهابی انسان دارد در نتیجه این فاز بیشتر از فاز I مورد توجه ما می باشد. نتایج حاصل از این بررسی نشان می دهد که سروتونین در تجویز به روش تزریق i.c.v. و i.t. بی دردی معنی داری را در هر

## تشکر و قدردانی

در پایان از مدیریت محترم گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بخاطر در اختیار قراردادن داروهای مورد نیاز تشکر و قدردانی می گردد.

کنترل درد مزمن می باشد ولی برای مشخص شدن دقیق نحوه این ارتباط نیاز به مطالعه و بررسی های بعدی است.

## Reference:

1. Sanchez A., Niedbala B., Feria M. Modulation of neuropathic pain in rats by intrathecally injected serotonergic agonists, *NeuroReport* 1995, 6: 2585-2588.
2. Nayebe A. R., Ahmadiani A. Involvement of the spinal serotonergic system in analgesia produced by castration, *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 1999, 64: 467-471.
3. Smith A. J. The analgesic effect of selective serotonin reuptake inhibitors, *J. Psychopharmacol.* 1998, 12: 407-413.
4. Lund A., Mjelle-Joly N., Hole K. Chronic administration of desipramine and zimelidine changes the behavioural response in the formalin test in rats, *Neuropharmacology* 1991, 30: 481-487.
5. Kuraishi Y., Hirota N., Satoh M., Takagi E. Antinociceptive effects of intrathecal opioids, noradrenaline and serotonin in rats: mechanical and thermal algesia tests, *Brain Res.* 1985, 326: 168-171.
6. Fasmer O. B., Hunskaar S., Hole K. Antinociceptive effects of serotonergic reuptake inhibitors in mice, *Neuropharmacology* 1989, 28: 1363-1366.
7. Herbert M. K., Schmidt R. F. Activation of normal and inflamed fine articular afferent units by serotonin, *Pain* 1992, 50: 79-88.
8. Coda B. A., Hill H. F., Schaffer R. L., Luger T. J., Jacobson R. C. Enhancement of morphine analgesia by fenfluramine in subjects receiving tailored opioid infusions, *Pain* 1993, 52: 85-91.
9. Abbott F. V., Young S. N. Effect of 5-hydroxytryptamine precursors on morphine analgesia in the formalin test, *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 1989, 31: 855-860.
10. Nayebe A. R. M., Hassanpour M., Rezazadeh H. Effect of chronic and acute administration of fluoxetine and its additive effect with morphine on the behavioural response in the formalin test, In Press: *J. Pharmacy and Pharmacology.*
11. Detweiler D. J., Rohde D. S., Basbaum A. I. The development of opioid tolerance in the formalin test in the rat, *Pain* 1995, 63: 251-254.
12. Clavelou P., Dalle R., Orliaguet T., Woda A., Raboisson P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations, *Pain* 1995, 62: 295-204.
13. Tjolsen A., Berge O., Hunskaar S., Rosland J. H., Hole K. The formalin test: an evaluation of method, *Pain* 1992, 51: 5-17.