

تعیین اثر تجویز مزمن فلوکستین بر بی دردی ناشی از گنادکتومی موش صحرایی نر در آزمون فرمالین

علیرضا محجل نایبی^۱، محمد رضا برگزین^۲

تاریخ پذیرش: ۸۲/۱۰/۲۸

Title: Effect of chronic-administered fluoxetine on castration induced analgesia using formalin test.

Authors: Mohajjel Nayebi A.R.¹, Bargozin M.R.²,

Abstract: Several studies indicate that testosterone has a role in pain nociception. Recently, we have shown that castration and flutamide induced analgesia in the male rats using formalin test. This analgesic effect correlated with increase of serotonin in dorsal horn of the spinal cord. The aim of this study is to investigate the effect of chronic administration of fluoxetine on castration and flutamide induced analgesia. Four weeks after castration, we observed analgesia in the second phase of formalin test. Also, Flutamide (10 mg/kg, i.p.), as a testosterone receptor antagonist, induced analgesic effect. Fluoxetine (0.16 mg/kg, i.p. for 5 days) potentiated the analgesic effect of castration and flutamide. The results indicat that castration and flutamide produce analgesia which can be potentiated by co-administraion with chronic adminstration of fluoxetine. This study substantiates our previous report showing a correlation between testosterone and serotonergic system. However, the exact mechanism of testosterone interaction with serotonergic system is not clear and remains to be elucidated.

Key words: Fluoxetine; Testosterone; Formalin test.

1- Associate Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences.
2- Pharm.D.

۱- دانشیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
۲- دکتر داروساز.

چکیده

نتایج حاصل از بررسی های انجام شده حاکی از دخالت هورمون تستوسترون در پدیده درد می باشد. مطالعه قبلی ما نیز نشان می دهد که برداشتن گنادها و یا مسدود کردن گیرنده تستوسترون توسط فلوتاماید در رتهای نر بی دردی در فاز دو آزمون فرمالین ایجاد می کند که توام با افزایش سطح سروتونین در شاخ خلفی نخاع ناحیه کمری است. هدف از این مطالعه بررسی اثر تجویز مزمن (۵ روزه) داروی فلوکستین بر روی بی دردی ناشی از برداشتن گنادها و تجویز فلوتاماید است. چهار هفته بعد از برداشتن گنادها بی دردی در فاز دو آزمون فرمالین ایجاد شد. داروی فلوتاماید به عنوان آنتاگونیست گیرنده تستوسترون با دوز 10 mgkg^{-1} بی دردی در فاز دو آزمون فرمالین ایجاد کرد. بی دردی ناشی از برداشتن گنادها و تجویز فلوتاماید (10 mgkg^{-1}) با تجویز فلوکستین ($16/0 \text{ mgkg}^{-1}$ به مدت ۵ روز) به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان میدهد که حذف تستوسترون به روش گنادکتومی و یا تجویز فلوتاماید بی دردی ایجاد میکند که با تجویز مزمن (۵ روزه) فلوکستین بی دردی ایجاد شده تشدید می یابد. این مطالعه نتایج قبلی ما را که حاکی از وجود ارتباط بین هورمون تستوسترون و سیستم سروتونرژیک است تأیید می نماید. برای مشخص شدن دقیق این ارتباط نیاز به مطالعات بعدی است.

گل واژه گان : فلوکستین، تستوسترون، آزمون فرمالین.

مقدمه

آزمون فرمالین که در سال ۱۹۷۷ توسط Dubuisson and Dennis ابداع شده است (۱)، به عنوان یک مدل تجربی درد التهابی تونیک تا به امروز مورد استفاده قرار گرفته است. درد ایجاد شده توسط فرمالین با دردهای حاد متفاوت است. این نوع درد بدنبال آسیب بافتی، التهاب و حساس شدن فیبرهای حسی ایجاد می شود و رفتارهای ناشی از درد ایجاد شده شباهت زیادی با دردهای شایع انسانی دارد.

در شاخ خلفی نخاع نقش اعصاب سروتونرژیک در تعدیل درد توسط مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (۲، ۳، ۴). نتایج یک بررسی نشان می دهد که آنتاگونیست های 5-HT و آسیب اعصاب سروتونرژیک هسته رافه، آستانه درد را در تست پس کشیدن دم (Tail-Flick) و صفحه داغ (Hot Plate) کاهش می دهد (۵). افزایش فعالیت اعصاب نزولی مسیر bulbo-spinal از طریق تحریک الکتریکی هسته رافه مگنوس سبب افزایش

آزاد سازی 5-HT و نوسازی آن در شاخ خلفی نخاع می شود (۶، ۷). گیرنده های 5-HT_{1A} و 5-HT₃ در شاخ خلفی نخاع شناسایی شده اند که در نقش تعدیل کنندگی سروتونین در درد دخالت دارند (۱۰، ۹، ۸، ۲). مطالعه قبلی ما نیز نشان می دهد که تجویز مزمن و حاد فلوکستین، به عنوان مهار کننده آپتیک نرونی سروتونین، آستانه درد را در آزمون فرمالین افزایش می دهد (۱۱).

نتایج مطالعات متعدد نشان گر نقش هورمون تستوسترون در پدیده درد می باشد (۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۲). Saifi و Rao نشان دادند که در رت های نر گنادکتومی شده بی دردی در تست های درد حرارتی ایجاد می شود (۱۸). همچنین بر اساس نتایج مطالعه دیگر لوپرویلید (آنالوگ آهسته رهش هورمون گنادوتروپین) بهبودی چشمگیری در شدت سر دردهای خوشه ای ایجاد می کند که این اثر با کاهش سطح هورمون تستوسترون ارتباط دارد (۱۹).

حیوانات

مطالعه بر روی رت های نر آلبینو در محدوده وزنی ۳۰۰ - ۲۵۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در گروه های شش تایی در قفس های پلی پروپیلین ترانسپارنت استاندارد در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی و در دمای معمول آزمایشگاه 25 ± 3 درجه نگهداری شدند. در تمام مدت مطالعه حیوانات آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

برداشتن گنادها

بیهوشی با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم با دوز 50 mg kg^{-1} انجام شد. پس از بی هوشی کامل توسط قیچی کوچک جراحی از وسط اسکروتوم یک شکاف طولی به طول تقریبی ۲ سانتی متر ایجاد کرده و پس از شکافتن لایه پوششی زیرین بیضه ها از داخل کیسه اسکروتوم به بیرون آورده شد. عروق خونی و وازودفران توسط یک تکه نخ بسته شده و از محل پائین تر بیضه ها جدا گردید. پس از آن محل برش داده شده با نخ جراحی دوخته شد. حیوانات پس از به هوش آمدن تا روز انجام آزمایش نگه داری شدند. مطالعه آستانه درد ۴ هفته بعد از گنادکتومی انجام شد.

آزمون فرمالین

برای ارزیابی درد مزمن از آزمون فرمالین طبق روش Dubuisson and Dennis 1977 استفاده شد. همه آزمون ها در فاصله ۱۰ صبح تا ۴ بعد از ظهر و در دمای آزمایشگاه ($25-21^\circ \text{C}$) و در شرایط آرام و بدون استرس و با توجه به تطابق نیم تا یک ساعته حیوان با محیط آزمایشگاه انجام شد. بعد از تطابق ۵۰ میکرولیتر از محلول فرمالین ۲/۵٪ با سرنگ انسولین به زیر جلد کف پای چپ حیوان تزریق شد. جهت

در زمینه تداخل هورمون تستوسترون با سیستم سروتونرژیک گزارش های متعددی وجود دارد. بر اساس نتایج یک مطالعه، در رتهای نر گنادکتومی شده بیوستنز ۵- هیدروکسی تریپتوفان در ناحیه لیمبیک و دینسفالون افزایش می یابد (۲۰). نتایج مطالعه دیگر نشان میدهد که تداخل آندروژنها با سروتونین در کنترل دیمورفیسم جنسی طناب نخاعی کمری - خاجی موثر است (۲۱). شاکر و همکارانش نشان داده اند که در مردان مبتلا به هیپوگنادیسم ثانویه افزایش ۵- هیدروکسی ایندول استیک اسید در ادرار دیده میشود که با درمان با تستوسترون به سطح اولیه کاهش می یابد (۲۲). مطالعه قبلی ما نیز دخالت سروتونین نخاعی را در تاثیر تستوسترون در درد نشان داده است. کاهش سطح این هورمون و یا مسدود کردن گیرنده های آن توسط فلوتاماید بی دردی در آزمون فرمالین ایجاد می کند که با افزایش سطح سروتونین در شاخ خلفی نخاع همراه است (۲۳). بنابراین در این مطالعه سعی می شود تا اثر داروی فلوکستین به عنوان مهار کننده آپتیک نرونی سروتونین، بر بی دردی ناشی از گنادکتومی و تجویز داروی فلوتاماید مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

مواد

تمامی مواد شیمیائی و داروهای مورد استفاده به طور تازه در همان روز آزمایش تهیه شدند. فلوکستین و فلوتاماید به ترتیب در حلال اتانول - آب (به نسبت ۱ به ۱۰) و اتانول - آب (به نسبت ۲ به ۱) حل و با مقادیر و دوزهای مورد نظر مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی اثر داروها بر آزمون فرمالین، تجویز داروها به روش تزریق داخل صفاقی نیم ساعت قبل از آزمون فرمالین صورت گرفت.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

داده ها بر حسب Mean±SEM بیان شدند. برای مقایسه میانگین ها از تست آنالیز واریانس غیر پارامتریک Kruskal-Wallis استفاده شد. در صورت $P < 0.05$ ، برای مقایسه دو به دو میانگین داده ها از Dunns Multiple Comparison Test استفاده گردید.

نتایج

در تمامی گروه های مورد بررسی از آنجائیکه در فاز یک تست فرمالین تفاوت معنی داری مشاهده نشد لذا نتایج مربوط به این فاز نشان داده نشده اند.

۱- اثر گنادکتومی و فلوتاماید بر آزمون فرمالین

در رت های نر گنادکتومی شده، بعد از چهار هفته بی دردی معنی داری ($P < 0.05$) در فاز دو آزمون فرمالین در مقایسه با گروه Sham و رت های دست نخورده (Intact) ایجاد شد. هم چنین داروی فلوتاماید به عنوان آنتاگونیست گیرنده تستوسترون با دوز 10 mgkg^{-1} بی دردی معنی داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کرد (شکل ۱).

ثبت رفتارهای مربوط به درد بلافاصله بعد از تزریق فرمالین، حیوان در محفظه مخصوص تست از جنس پلاستی گلاس با ابعاد $40 \times 25 \times 20$ سانتی متر قرار داده شد. در قسمت پائین محفظه آینه ای با زاویه تقریباً 45° درجه قرار داده تا حرکات حیوان به طور کامل قابل ردیابی باشد. رفتارهای مربوط به درد به مدت 60 دقیقه به روش زیر ثبت گردید:

هر 15 ثانیه عکس العمل حیوان به درد را به شکل کمیت های $0, 1, 2, 3$ ثبت کردیم.

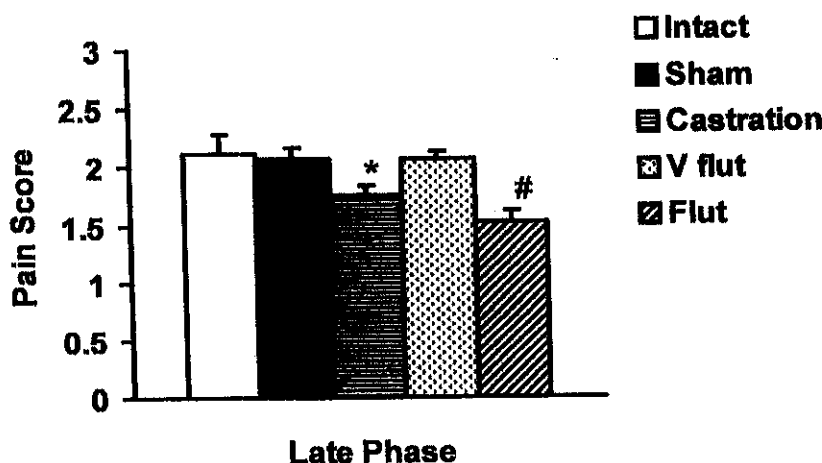
0 = حیوان پسای تزریق شده را کاملاً روی زمین می گذارد و به آن تکیه می کند.

1 = پای تزریق شده را به آهستگی و بطور ناقص روی زمین می گذارد و به آن تکیه می کند.

2 = از شدت درد پای تزریق شده را بالا نگه می دارد.

3 = پای تزریق شده را از شدت درد تکان می دهد و می لیسد.

میانگین پاسخ به درد در 5 دقیقه اول (فاز اول) و دقیقه $60-20$ (فاز دوم) برای n موش محاسبه شد (Pain Score).

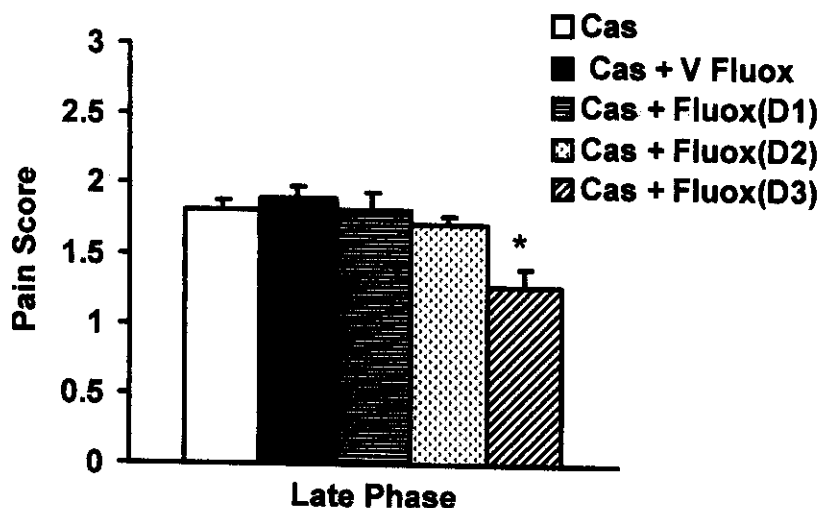


شکل ۱. اثر گنادکتومی و داروی فلوتاماید (10 mg/kg , i.p.) بر آزمون فرمالین، ($n = 6$ rats) $p < 0.05$ * در مقایسه با رتهای نر Intact و Sham، $p < 0.05$ # در مقایسه به رتهای نر تحت درمان با حلال فلوتاماید، V Flut = Vehicle of Flutamide، Flut = Flutamide.

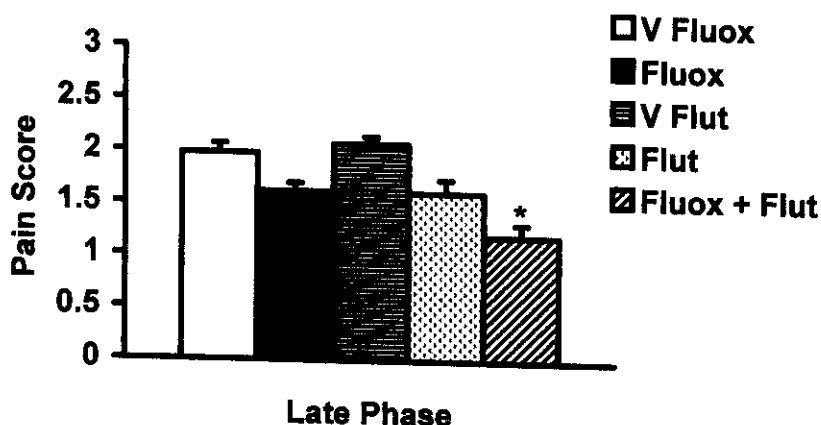
هفته ای مورد بررسی قرار گرفت. فلوکستین تنها در دوز ۰/۱۶ میلی گرم توانست بی دردی ناشی از گنادکتومی را بطور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش دهد (شکل ۲).

۲- اثر تجویز مزمن داروی فلوکستین بر بی دردی ناشی از گنادکتومی

اثر داروی فلوکستین در تزریق داخل صفاقی با دوزهای ۰/۰۴، ۰/۰۸، و ۰/۱۶ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن در رت های نر گنادکتومی شده ۴



شکل ۲. اثر تجویز مزمن داروی فلوکستین (D3=۰/۱۶ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بر بی دردی ناشی از گنادکتومی. ($n = 6$ rats), $p < 0.05$ * در مقایسه با رت های نر گنادکتومی شده و گنادکتومی شده تحت درمان با حلال فلوکستین، V Fluox = Vehicle of Fluoxetine, Fluox = Fluoxetine, Cas = Castrated



شکل شماره ۳. اثر تجویز مزمن فلوکستین (۰/۱۶ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بر بی دردی ناشی از فلوتاماید، ($n = 6$ rats), $p < 0.05$ * در مقایسه با رت های نر تحت درمان با فلوکستین و فلوتاماید، V Fluox = Vehicle of Fluoxetine, Fluox = Fluoxetine, V Flut = Vehicle of Flutamide, Flut = Flutamide

۳- اثر تجویز مزمن فلوکستین بر بی دردی ناشی از فلوتاماید

در یک گروه از رت های نر به مدت ۵ روز داروی فلوکستین با دوز ۰/۱۶ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به روش صفاقی تزریق و در روز پنجم علاوه بر فلوکستین داروی فلوتاماید با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تزریق گردید. نیم ساعت بعد از تزریق داروها آزمون فرمالین انجام شد. نتایج نشان می دهد که گروهی از رت ها که تحت درمان با هردو داروی فلوکستین و فلوتاماید قرار گرفته بودند بی دردی بیشتری ($P < 0.05$) در مقایسه با هر یک از داروها به تنهایی ایجاد شد (شکل ۳).

بحث

پاسخ های دردناک ناشی از تزریق داخل کف پای فرمالین از دو فاز تشکیل شده است. فاز اول به نظر می رسد که از طریق فعال سازی فیبرهای C- است در حالی که فاز دو به دنبال واکنش های التهابی بافت های محیطی و تغییر در اعمال طناب نخاعی ایجاد می شود. فاز دو ۲۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین ایجاد می شود و در ارزیابی داروهایی موثر در درمان دردهای التهابی مفیدتر از فاز یک است (۱ و ۲۴). از این رو فاز دو برای ما نسبت به فاز یک از اهمیت بیشتری برخوردار بود. نتایج مطالعه قبلی ما نشان می دهد که چهار هفته بعد از برداشتن گنادها در رت های نر و نیز فلوتاماید به عنوان آنتاگونیست تستوسترون بی دردی در فاز دو آزمون فرمالین ایجاد می کند. این اثر توام با افزایش سطح سروتونین در شاخ خلفی نخاع ناحیه کمری است (۲۳). بنابراین در این مطالعه سعی شد تا اثر داروی فلوکستین به عنوان مهار کننده آپتیک سروتونین بر روی

بی دردی ناشی از گنادکتومی و تجویز فلوتاماید مورد بررسی قرار گیرد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که حذف جراحی گونه تستوسترون (گنادکتومی کردن) پس از ۴ هفته بی دردی معنی داری را در فاز دو آزمون فرمالین ایجاد میکند. با توجه به اینکه حدود ۲ هفته بعد از برداشتن گنادها در رت های نر غلظت هورمون تستوسترون به طور چشمگیری کاهش می یابد، می توان گفت که احتمالاً بی دردی ایجاد شده ناشی از کاهش سطح این هورمون است. هر چند که در این میان نقش سایر سیستم های تعدیل کننده درد چون سیستم سروتونریک و یا اپیوئید پپتیدهای آندوژن را نباید نادیده گرفت. تزریق داخل صفاقی داروی فلوتاماید نیز بی دردی در فاز دو ایجاد کرد. این دارو آنتاگونیست رقابتی گیرنده های تستوسترون است و با مسدود کردن و ممانعت از تاثیر آن بر گیرنده های اختصاصی خود از اثرات آن جلوگیری می کند. فلوتاماید حلالیت نسبتاً مناسب در چربی دارد و به راحتی در نواحی مختلف بدن چون سیستم اعصاب مرکزی توزیع می یابد. بنابراین نتایج این بررسی باز نقش هورمون تستوسترون را در پدیده درد تایید می کند. افزایش اثر ضد دردی فلوتاماید در صورت تجویز توام با فلوکستین، نشان گر وجود ارتباط بین اثر ضد دردی ناشی از حذف تستوسترون با سیستم سروتونریک است.

نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان می دهد که داروی فلوکستین اثر ضد دردی داروی فلوتاماید را افزایش می دهد. احتمالاً در بیمارانی که اندیکاسیون داروی فلوتاماید وجود دارد بتوان با مصرف توام آن با فلوکستین اثر ضد دردی مناسبی ایجاد کرد. بدیهی است که قبل از

حصول اطمینان بررسی های بالینی مناسب انجام گیرد.

آن بایستی اثر این دو دارو در مدل های حیوانی مبتلا به اختلالاتی چون کانسر پروستات بررسی و پس از

References:

- 1- Dubuisson D, Dennis SG., The formalin test: A quantitation study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.
- 2- Tonym L., Yaksh TL., Peter R. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 208: 446-453.
- 3- Abhold RH, Bowker RM. Descending modulation of dorsal horn biogenic amines as determined by in vivo dialysis. *Neurosci Lett* 1990; 231-236.
- 4- Wang QP, Nakai Y., The dorsal raphe: An important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull* 1994; 34: 575-585.
- 5- Fasmer OB, Berg OG, Hole K. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6-dihydroxytryptamine: different effects in the formalin and tail-flick tests. *Neuropharmacology* 1985; 24: 729-734.
- 6- Rivot JP, Chiang C, Besson JM. Increase of serotonin metabolism within the dorsal horn of the spinal cord during nucleus raphe magnus stimulation, as reversed by in vivo electrochemical detection. *Brain Res* 1982; 238: 117-126.
- 7- Hammond DL, Tyce GM, Yaksh TL., Effect of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in to spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. *J Physiol* 1989; 359: 151-162.
- 8- Oyama T., Ueda M., Kuraishi Y., Akaika A., Dual effect of serotonin of formalin induced nociception in the rat spinal cord. *Neurosci Res* 1996; 25: 129-135.
- 9- Bardin L., Jourdan D., Alloui A., Lavarenne J., Eschalier A. Differential influence of two serotonin 5-HT₃ receptor antagonists on spinal serotonin induced analgesia in rats. *Brain Res* 1997; 765:267-272.
- 10- Bardin L., Lavarenne J, Echaliier A. Serotonin receptor subtyper involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 2000; 86:11-18.
- 11- Nayebi ARM., 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 rats. *J Pharm Pharmacol* 2001; 54: 219-225.
- 12- Rao SS., Saifi AQ. Influence of testosterone on morphine analgesia in albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1985; 29: 103-106.
- 13- Klimek A. Use of testosterone in the treatment of cluster headache, *Eur Neurol* 1985; 24:53-56.
- 14- Romero MT., Cooper ML., Komisaruk BR., Bodnar RJ., Gender – specific and gonadectomy-specific effects upon swim analgesia: Role of steroid replacement therapy. *Physiol Behav* 1988; 44: 257-265.
- 15- Polleri A. Pain and sex steroids. *Advances in pain Res & Ther* 1992; 20:253-256.
- 16- Kavaliers M, Galea LAM. Sex differences in the expression and antagonism of swim stress-induced analgesia in deer mice vary with the breeding season. *Pain* 1995; 63:327-334.
- 17- Sternberg WF., Mogil JS., Kest B., Page GG., Leong Y., Yam V., Liebeskind JC., Neonatal testosterone exposure influences neurochemistry of non-opioid swim stress-induced analgesia in adult mice. *Pain* 1995; 63: 321-326.
- 18- Rao SS., Saifi AQ., Effect of testosterone on threshold of pain. *Indian J Physiol Pharmacol* 1981; 25:387-389.
- 19- Nicolodi M., Sicuteri F., Poggioni M., Hypothalamic modulation of nociception and reproduction in cluster headach. I Therapeutic trials of leuprolide. *Cephalalgia* 1993; 13: 253-257.
- 20- Long JB., Youngblood WW., Kizer JS. Effect of castration and adrenalectomy on in vitro rates of tryptophan hydroxylation and levels of serotonin in microdissected brain nuclei of adult male rats. *Brain Res* 1983; 277:289-297.
- 21- Cowburn PJ, Payne AP. Androgens and indoleamines interact to control sexual dimorphism in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1994; 169: 101-104.
- 22- Shakir KM., Jasser MZ., Yashihashi AK., Drake AJ., Pseudocarcinoid syndrome associated with hypogonadism and response to testosterone therapy. *Mayo Cli Proc* 1996; 71: 1145-1149.
- 23- Nayebi ARM., Ahmadiani A., Involvement of the spinal serotonergic system in analgesia produced by castration. *Pharmacol Biochem behav* 1999; 64: 467-471.
- 24- Shibata M., Ohkubo T., Takahashi ., Inoki R., Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-352H.