رفتارهاي دردناك ناشي از تزريق فرمالين و تحمل نسبت به مرفين در رت نر معتاد

نعمت الله غيبي* دكتر محمد جاودان**

Noxious behaviours from injection of formalin and morphine tolerance of addicted male rats

N.Gheibi M.Javdan

Abstract

Background: Formalin as a chemical noxious stimulus evokes biphasic pain that its latter phase as a chronic inflammation pain is similar to clinical pain.

Objective: Assessment of noxious behaviours from subcutaneous injection of formalin and morphine tolerance effects on the responses of addicted male rats.

Methods: Flinching and licking behaviours scored as quantitative pain. Experiments were carried out in normal and morphine addicted rats. Behaviour scores measured quantitative after injection of formalin in plantar region of hind paw. Assessment of morphine tolerance was carried out by intrapritoneal injection of morphine (10mg/Kg) 10 minute before formalin injection.

Findings: In this study, we observed biphasic model of formalin test. Morphine injection in normal animals supressed noxious behaviours. Flinching and licking responses evoked by formalin not affected by morphine injection. Licking scores in addicted rats have significant difference from normal rats ($p<0.05$).

Conclusion: Addicted rats showed tolerance to morphine analgesia after formalin injection. Hyperalgesic effects of formalin injection observed in addicted rats.

Keywords: Formalin, Pain, Morphine, Addiction, Tolerance, Male Rat

چكيده

زمينه : فرمالين، محرك دردزاي شيميايي، يك درد دو مرحله اي ايجاد مي كند كه مرحله دوم آن الگويي از درد التهابي مزمن مشابه دردهاي باليني است.

هدف : مطالعه به منظور ارزيابي رفتارهاي دردناك ناشي از تزريق زيرجلدي فرمالين و اثرات تحمل نسبت به مرفين در نوع پاسخ رت هاي نر معتاد انجام شد.

مواد و روش ها : در اين مطالعه تجربي كه در سال 1380 انجام شد آزمايش هاي كمّي درد براي دو رفتار ليسيدن مكان تزريق و جمع كردن پوست پشت در موش هاي سالم و معتاد با تزريق فرمالين 2/5 درصد مورد سنجش قرار گرفتند. براي بررسي تحمل نسبت به بي دردي ناشي از مرفين، مقدار 10 ميلي گرم بر كيلوگرم مرفين به صورت درون صفاقي تزريق و سنجش درد ادامه يافت.

يافته ها : الگوي درد دو مرحله اي ناشي از فرمالين در حيوان هاي سالم و معتاد مشاهده شد. در گروه سالم رفتارهاي دردناك با تزريق مرفين مهار شدند. تزريق درون صفاقي مرفين در گروه معتاد در هيچ كدام از پاسخ هاي دردناك ناشي از تزريق فرمالين تفاوت معني دار نداشت. پاسخ ليسيدن مكان تزريق در گروه معتاد افزايش معني داري نسبت به حيوانات سالم نشان داد ($p<0/05$).

نتيجه گيري : با توجه به يافته ها، مصرف دراز مدت مرفين در رت هاي معتاد تشديد درد ناشي از فرمالين را نسبت به حيوان هاي سالم به دنبال دارد. رت هاي معتاد تحت تزريق فرمالين، نسبت به بي دردي ناشي از تزريق مرفين تحمل نشان مي دهند.

كليد واژه ها : فرمالين، درد، مرفين، اعتياد، تحمل، رت نر

* مربي بخش فيزيك پزشكي دانشگاه علوم پزشكي قزوين و دانشجوي دكتري بيوفيزيک ** استاديار گروه علوم تشريح دانشگاه علوم پزشكي قزوين

*** مقدمه :**

آزمون فرمالين توسط دابيسون و دنيس (1997) تشريح شد و به عنوان الگوي درد التهابي مزمن عموميت پيدا كرد.[1] رفتارهاي دردزاي فرمالين الگوي معتبري از درد باليني يعني درد مزمن است كه انسان ها نيز تجربه مي كنند.[2]

با تزريق زيرجلدي فرمالين رقيق شده (2/5 درصد) به كف پنجه عقبي حيوان، رفتارهاي مربوط به حس درد طي دو مرحله قابل مشاهده است؛ مرحله اول پاسخ تحريكي گذراست كه حدود 2 تا 5 دقيقه طول مي كشد، درصورتي كه مرحله دوم بسته به غلظت فرمالين، حدود 25 تا 45 دقيقه به طول مي انجامد.[3] مرفين اولين اپيوئيد طبيعي است كه خصوصيات آن شناسايي شد. تحقيقات بيش تر در پستانداران به شناخت اپيوئيدهايي با منشأ داخلي و نيز گيرنده‌هاي اين اپيوئيدها منجر شد. انكفالين ها و اندورفين ها به خصوص بتاا‌ندورفين از اپيوئيدهاي درون زاد هستند.[4] استفاده مكرر و زياد اپيوئيدها باعث ايجادسه حالت تحمل، وابستگي رواني و جسمي مي شود. تحمل، پس از مصرف مكرر داروي اپيوئيدي رخ مي دهد و باعث مي شود كه موجود براي رسيدن به همان تأثير اوليه به ميزان بيش تري از دارو نياز داشته باشد.[5] اپيوئيدهاي مصرف شده يا همان اپيوئيدهاي خارجي مثل مرفين بر روي گيرنده هاي اپيوئيدي با منشأ داخلي (δ, κ, μ) اثر مي كنند و با يك بازخورد منفي، ساخت پپتيدهاي با منشأ داخلي را كاهش مي دهند.[6]

هدف از اين مطالعه بررسي پاسخ هاي بي دردي ناشي از تزريق مرفين در حيوان هاي معتاد و مقايسه نوع پاسخ هاي دردناك فرمالين در حيوان هاي سالم و معتاد است.

*** مواد و روش ها :**

اين مطالعه تجربي در سال 1380 در دانشگاه علوم پزشكي قزوين بر روي 40 رت نر نژاد NMRI (شركت رازي، ايران) با وزن 150 تا 250 گرم انجام شد كه تحت شرايط چرخه روشنايي- تاريكي 12:12 ساعت و درجه حرارت 22 تا 24 درجه سانتي گراد در قفس هاي پنج تايي نگه داري مي شدند و به طور آزاد غذا دريافت مي نمودند. حيوان ها در چهار گروه 10 تايي سالم شاهد، سالم مرفيني، معتاد شاهد و معتاد مرفيني مورد آزمايش قرار گرفتند. براي القاي درد از محلول فرمالدئيد 37 درصد غلظت 2/5 درصد استفاده و به هر كدام از حيوان هاي مورد آزمايش 50 ميكروليتر تزريق شد. در آزمايش هاي انجام شده رفتارهاي وابسته به درد به طور كمّي با شمارش تعداد حركت و لرزش ناحيه پشتي حيوان و جمع كردن پوست اين ناحيه (Flinching) و تعداد دفعه هايي كه حيوان مكان مورد تزريق را با زبان خود مي ليسيد (Licking) در بازه هاي زماني 5 دقيقه و به مدت 60 دقيقه بررسي و ثبت شد.

دو گروه سالم به مدت 21 روز آب و سوكروز دريافت نمودند. در گروه سالم شاهد پس از تزريق درون صفاقي 1 ميلي ليتر سالين و سپس 50 ميكروليتر فرمالين به صورت زيرجلدي در كف پنجه عقبي حيوان، امتيازبندي دو رفتار ليسيدن مكان تزريق و جمع كردن پوست پشت انجام شد. در گروه سالم مرفيني، ابتدا محلول مرفين سولفات با دوز 10 ميلي گرم بر كيلوگرم به صورت درون صفاقي به هر حيوان تزريق شد و پس از 10 دقيقه با تزريق فرمالين به كف پنجه عقبي حيوان امتيازبندي دو شاخص مذكور صورت گرفت.

دو گروه معتاد با روش ليونگ و همكاران وابستگي به مرفين پيدا كردند؛[7] به اين صورت كه دارو را در دوزهاي 0/1، 0/2 و 0/3 ميلي گرم در ميلي ليتر هر كدام 48 ساعت و طي روزهاي بعد تا روز بيست و يكم، با غلظت 0/4 ميلي گرم بر ميلي ليتر دريافت نمودند. مرفين به صورت محلول در آب و مخلوط با 3 درصد سوكروز براي از بين بردن تلخي آن استفاده مي شد. مقدار متوسط نوشيدن آب و در نتيجه مصرف دارو تا پايان اين دوره روزانه 60 تا 80 ميلي گرم بر كيلوگرم بود. اين حيوان ها پس از اين دوره با تزريق مقدار 2 ميلي گرم بر كيلوگرم

نالوکسان نشانه هاي سندرم ترك را نشان دادند. در گروه معتاد شاهد 1 ميلي ليتر سالين به صورت درون صفاقي تزريق و سپس فرمالين به كف پنجه عقبي تزريق و رفتارهاي پاسخ به درد امتيازبندي شد. در گروه معتاد مرفيني با دوز 10 ميلي گرم بر كيلوگرم به صورت محلول در سالين و به طور درون صفاقي تزريق و پس از ده دقيقه با تزريق فرمالين به كف پنجه عقبي رفتارهاي دردناك فوق شمارش شدند.

در گروه هاي متفاوت تعداد امتيازها در پنج دقيقه اول تا دوازدهم يعني به طور كلي 60 دقيقه به برنامه نرم افزاري Excel وارد و براي محاسبه سطح معني داري از آزمون آماري t استفاده شد.

*** يافته ها :**

در گروه سالم شاهد هر دو رفتار جمع كردن پوست پشت و ليسيدن، مدل دو مرحله اي درد ناشي از فرمالين را نشان داد (نمودار شماره 1).

نمودار 1- پاسخ هاي رفتاري ناشي از فرمالين در گروه سالم شاهد، (□) جمع كردن پوست پشت (■)ليسيدن

در دسته دوم موش هاي سالم كه مرفين دريافت نمودند رفتارهاي دردناك ناشي از فرمالين مهار شدند و تنها پاسخ ناچيزي در مرحله اول دردناك مشاهده شد. گروه معتاد شاهد (سالينی)، دو مرحله اوليه (حاد) و ثانويه (مزمن) را در هر دو رفتار دردناك ناشي از تزريق فرمالين نشان دادند. در گروه معتاد مرفيني كه به جاي سالين مرفين درون صفاقي دريافت نمودند، در هر دو رفتار دردناك ناشي از فرمالين تحمل نسبت به مرفين مشاهده شد، ولي مقايسه پاسخ دهي آنها با گروه معتاد شاهد از نظر آماري اختلاف معني دار نشان نداد (نمودار شماره 2).

نمودار 2- مقايسه رفتارهاي جمع كردن پوست پشت (الف) و ليسيدن (ب)، ناشي از فرمالين در سه گروه سالم مرفيني (●) ، معتاد شاهد (□) و معتاد مرفيني (■)

تجزيه و تحليل پاسخ هاي رفتاري ناشي از تزريق فرمالين در گروه معتاد شاهد در مقايسه با حيوان هاي سالم شاهد، تنها در رفتار ليسيدن با سطح معني داري$p<0/05$ افزايش نشان داد (نمودار شماره 3).

نمودار 3- مقايسه رفتارهاي ليسيدن گروه معتاد شاهد (■) و گروه سالم شاهد (○)

*** بحث و نتيجه گيري :**

يافته هاي اين مطالعه همان الگوي دو مرحله اي دردزايي فرمالين يعني مرحله حاد و مزمن را در توافق با ساير تحقيق ها نشان داد.[1] در مطالعه هاي كمّي كردن درد به كمك آزمون فرمالين، رفتارهاي دردناك مانند ليسيدن موضع تزريق و جمع كردن پوست پشت به دليل اهميت، به عنوان مبناي امتيازبندي درد در نظر گرفته شده اند.[8] تفاوت پاسخ دهي به فرمالين در رفتارهاي مورد سنجش ناشي از تنوع احساس درد و الگوهاي متفاوت درد است.

اپيوئيدهايي نظير مرفين با فرونشاندن فعاليت سيستم هاي درك درد در سطوح بالاتر محور عصبي، اثر خود را اعمال مي كنند. در رت هاي سالمي كه تحت تزريق مرفين درون صفاقي قرار گرفتند، اين ماده با القاي بي دردي رفتارهاي دردناك ناشي از فرمالين را متوقف مي نمود و اين به دليل عملكرد مرفين به عنوان يك اپيوئيد خارجي قابل انتظار بود. مرفين به عنوان يك متوقف كننده رفتارهاي دردناك در مرحله دوم (مزمن) كاملاً مؤثر است. در اين مطالعه در مرحله اول (حاد) با وجود تزريق مرفين تعدادي از اين رفتارهاي دردناك مشاهده شد، شايد به اين دليل كه فعاليت ذاتي اپيوئيدها با توجه به شدت محرك دردزا متفاوت است.[9] روش هاي مختلفي براي ايجاد وابستگي و تحمل به مرفين نظير تزريق روزانه مرفين به صورت درون صفاقي يا استفاده از كپسول هاي زيرجلدي وجود دارند.[7و10] آنچه روش حل كردن مرفين در آب آشاميدني را نسبت به ساير روش هاي ايجاد وابستگي متمايز مي كند شباهت آن به الگوي وابستگي و اعتياد در انسان است، زيرا در اين روش حيوان ميزان مرفين مصرفي خودش را تنظيم مي كند.[11] اكثر مطالعه هاي مربوط به اثرات درد محيطي يا مركزي در حيوان ها صورت مي گيرند و ما مي توانيم در شرايط باليني تا حدي از آنها كمك بگيريم. اما در مصرف داروهاي مربوط به تقليل درد به خصوص دردهاي مزمن بعد از جراحي ها تجويزكنندگان با اين سؤال روبه رو مي شوند كه كدام تركيب دارويي مناسب تر است يا كدام مسير احساس درد ممكن است در يك عمل جراحي به خصوص درگير باشد. آيا بايد حساسيت گيرنده هاي محيطي را مهار كرد يا مسيرهاي آوران درد، تحريك پذيري نخاع يا حساسيت مركزي را مهار نمود. مطالعه ها نشان داده اند كه تركيب يك آگونيست گيرنده اپيوئيدي به همراه يك آنتاگونيست گيرنده NMDA براي مهار حساس شدن ضروري است.[12] اپيوئيدها عمده ترين سهم درماني مربوط به دردهاي حاد و برخي دردهاي مزمن را به خود اختصاص مي دهند، اما اين مطالعه و ديگر مطالعه ها نشان مي دهند كه نقش آنها پيچيده تر از آن است كه تصور مي شود. شواهد نشان مي دهند كه تحمل حاد به اپيوئيدها ممكن است خيلي سريع رخ دهد.[13] آنتاگونيست هاي NMDA بر روي اين تحمل حاد اثر معكوس دارند.[14] دوز بالاي اپيوئيدها قبل از جراحي منجر به تحمل حاد در انسان مي شود و براي كاهش درد بعد از عمل افزايش نياز به مصرف اپيوئيدها را به دنبال دارد. در يك مطالعه زناني كه دوز بالايي از فنتانيل براي القاي بي هوشي دريافت نموده بودند در مقايسه با آنهايي كه با دوز كمتر بي هوش شده بودند، درد شديدتري داشتند و در نتيجه نياز بيش تري به مصرف اپيوئيدها در اولين ساعت هاي بعد از عمل نشان دادند.[15]

در اين مطالعه نيز گروه معتاد به دوزي از مرفين كه در حيوان هاي سالم بي دردي را القاء مي نمود، تحمل نشان دادند. در گروه معتاد رفتار دردناك ليسيدن بيش تر از نمونه هاي سالم بود. تحقيق هاي ساير محققين نشان داده است كه مصرف مزمن مرفين (اعتياد) منجر به تشديد درد (Hyperalgesia) در اثر تحريك هاي دردناك مي شود.[16] شواهد متعدد نشان داده اند كه

مسيرهاي نزولي مهاركننده درد در بي دردي ناشي از مرفين در آزمون فرمالين دخيل هستند و تحمل به مرفين در موش هاي معتادي كه تحت تزريق فرمالين قرار گرفته اند، ناشي از عدم عملكرد اين سيستم كنترل نزولي است.[17و18]

به طور خلاصه در رت هاي نر معتاد به دليل مصرف مزمن مرفين اثرات تشديد درد ناشي از فرمالين نسبت به رت هاي سالم مشاهده شد و اين حيوان ها نسبت به بي دردي ناشي از تزريق مرفين تحمل نشان دادند.

* مراجع :

1. Dubuisson, D, Dennis S G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. Pain 1977; 4: 161-74

2. Tjolsen A, Berge O G, Hunskaar S, Rosland J H, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Pain 1992; 51: 5-17

3. Kandel E R, Schwarts J H. Principle of neural science. Elsevies 1985; 385-99

4. Reisine T. Opiate receptors. Neuropharmacology 1995; 463-72

5. Yu w, Haoj XuX, Wiesenfeld-Hallin Z. The development of morphine tolerance and dependence in rats with chronic pain. Brain Res 1997; 756: 141-6

6. Trujillo K A, Akil H. Opiate tolerance and dependence: recent finding and synthesis. New Biol 1991 3: 915-23

7. Leung C M, Dai S, Oglec W. Rapid induction of dependence to morphine in rats. Neuropharmacology 1986; 25: 305-7

8. Fields H L, Basbaum A I. Central nervous system mechanism of pain modulation. In: Text book of pain. Wall P D, Melzack R, (Eds). 3rd ed, London, Churchill Livingstone, 1994, 243-57

9. Millan M J. Kappa-opioid receptor-mediated antinociception in the rat I, comparative actions of mu-and kappa-opioids agains anoxious thermal, pressure and electrical simuli. J Pharamacol Exp Ther 1989; 251: 334-41

10. Rasmussen K. The role of the locus coeruleus and N Methyl D- aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate with drawal. Neuropsychopharmacology 1995; 13: 295-300

11. Badawy A A, Evans C M, Evans M. Production of tolerance and physical dependence in the rat by simple administration of morphine in drinking water. Br J Phamacol 1982; 75: 485-91

induces postoperative fentanyl tolerance.Can J Anaesth 1999; 46(9): 872–7

16. Mao J, Price D D, Mayer D J. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. J Pharmacol Exp Thr 1989; 251: 334-41

17. Abbott F V, Melzack F. Brainstem lesions dissociate neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. Brain Res 1982; 251: 149-55

18. Detweiler D J, Rohade D S, Basbaum A I. The development of opioid tolerance in the formalin test in the rat. Pain 1995; 63: 251-4

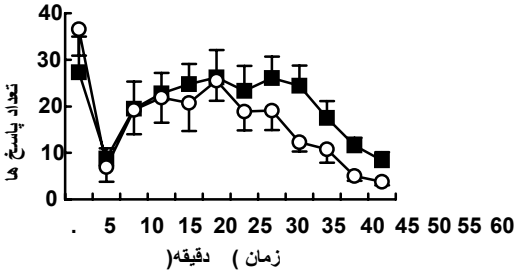
12. Aida S,Yamakura T,Baba H,Taga K,Fukuda S,Shimoji K. Pre-emptive analgesia by intravenous low-dose ketamine and epidural morphine in gastrectomy:a randomized double blind study. Anesthesiology 2000; 92: 1624 –30

13. Vinik H R,Kissin I.Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanil infusion in humans.Anesth Analg 1998; 86: 1307-11

14. Shimoyama N,Shimoyama, M,Inturrisi CE,Elliot KJ. Ketamine attenuates and reverses morphine tolerance in rodents. Anesthesiology 1996;85:1357- 66

15. Chia Y Y,Liu K,Wang J J, Kuo M C, Ho S T. Intraoperative high dose fentanyl

(نمودار 1)



(نمودار 3)

(نمودار 2)