[Article in Persian] Physiology and Pharmacology Vol. 10, Winter 2007, 291-302

Hypothalamus Pituitary Adrenal axis and stimulatory G proteins signaling role in nociceptive changes induced by forced swim stress

Masoud Fereidoni[1], Mohammad Javan[1], Saeed Semnanian[1*], Abolhasan Ahmadiani

1- Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University. Tehran, Iran.
2- Neuroscience Research Center, Shaheed Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Different mechanisms are involved in stress induced analgesia (SIA) and hyperalgesia (SIH). Repeated stress induces development of tolerance to SIA. The role of HPA axis and Gs signaling pathway in these effects are investigated in the current study.

Methods: Forced swim stress (5 min/day) in water (20±1 ºC) was employed to adult male Wistar rats (200-250 g). The nociceptive threshold was assessed using tail flick test. Adrenalectomized (ADX) rats were also subjected to stress tests. Oseltamivir was used to block Gs signaling pathway.

Results: Stress produced analgesia for 1 h ($p<0.001$) and hyperalgesia during 3-24 h after its induction ($p<0.05$). Repeated administration of the stress caused tolerance development to SIA and increased SIH recorded at 24 h after each session ($p<0.001$). Oseltamivir couldn't reverse the SIH. Dexamethasone produced hyperalgesia from 30 min ($p<0.001$) to 24 h after its administration ($p<0.01$). Repeated injection of dexamethasone increased the hyperalgesia recorded at 24 h after treatment ($p<0.001$). In ADX animals; SIA continued for 24 h ($p<0.01$). Adrenalectomy attenuated the chronic stress-induced SIA tolerance and eliminated SIH.

Conclusion: SIH is suggested to be related to adrenal activity which also has a role in SIA tolerance. Upper parts of HPA axis seems to be responsible for SIA. Oseltamivir could not reverse the SIH. Therefore, the Gs signaling pathway activation by opioid system may not be responsible for SIH.

Keywords: Forced swim stress, Analgesia, Hyperalgesia, HPA, Oseltamivir.

Archive of SID

* Corresponding Author Email: ssemnan@modares.ac.ir

www.SID.ir

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۵

نقش محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، آدرنال و سیگنالینگ پروتئین G تحریکی در تغییر آستانه درد ناشی از اعمال استرس شنای اجباری

مسعود فریدونی[۱]، محمد جوان[۱]، سعید سمنانیان[۱*]، ابوالحسن احمدیانی[۲]
۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دریافت: آذر ۸۵ بازبینی: بهمن ۸۵ پذیرش: اسفند ۸۵

چکیده

مقدمه: مکانیسمهای متعددی درگیر القاء بی دردی و پردردی ناشی از استرس هستند. تکرار استرس قادر است باعث ایجاد تحمل به بی دردی ناشی از استرس شود. نقش محور هیپوتالاموس – هیپوفیز– آدرنال (HPA) در این اثرات نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

روشها: استرس شنای اجباری (۵ دقیقه در روز در آب ^{o}C ۱±۲۰) در رتهای نر بالغ (۲۵۰-۲۰۰ گرم) نژاد ویستار بکار گرفته شد. از روش Tail flick برای سنجش آستانه درد استفاده شد. برای مطالعه نقش آدرنال از حیواناتی که آدرنال آنها برداشته شده بود (ADX) استفاده شد.

یافته‌ها: استرس تا یک ساعت پس از اعمال، بیدردی ایجاد نمود اما از ساعت سوم به بعد اثر آن بصورت پر دردی ظاهر شد. تکرار استرس ضمن القاء تحمل در آنالژزیای استرس، منجر به افزایش تدریجی هایپرآلژزیای آن شد. تجویز Oseltamivir نتوانست پردردی ناشی ازاسترس را مهار نماید. دگزامتازون حتی نیم ساعت پس از تجویز پردردی ایجاد نمود که تا ۲۴ ساعت ادامه داشت. تکرار تجویزآن در روزهای بعد منجر به افزایش پردردی شد. درحیوانات ADX، آنالژزیای استرس حتی ۲۴ ساعت پس از استرس دوام یافت. تکرار استرس درحیوانات ADX تحمل ناچیزی در آنالژزیای استرس القاء کرد و نتوانست باعث القاء پردردی گردد.

نتیجه گیری: احتمالا پردردی ناشی از استرس به ترشحات آدرنال مربوط بوده و این غده در القاء تحمل به بی دردی ناشی از استرس نیز نقش دارد. لذا این احتمال وجود دارد که محور HPA مستقل از آدرنال در بی دردی ناشی از استرس نقش داشته باشد. Oseltamivir نتوانست پردردی استرس را مهار کند، بنابر این احتمالا مسیر اپیوئیدی سیگنالینگ Gs نمی‌تواند به عنوان مسیر القاء پردردی ناشی از استرس مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: استرس شنای اجباری، هایپرآلژزیا (پردردی)، آنالژزیا (بی دردی)، HPA، Oseltamivir

مقدمه

بی دردی (آنالژزیا) ناشی از استرس پدیده‌ای شناخته شده است. فعالیت گیرنده‌های اپیوئیدی میو و دلتا [۱۴،۱۹] و مسیرهای غیر اپیوئیدی مثل سیستم هیستامینرژیک در القاء این بی دردی مطرح هستند [۴۰]. با تکرار استرس این بی دردی دچار تحمل می‌شود [۱۳]. القای پردردی (هایپرآلژزیای) مکانیکی و حرارتی کوتاه و دراز مدت ناشی از استرس نیز پدیده‌ای شناخته شده است [۲۶،۲۷،۳۹]. پردردی کوتاه مدت یا

* پست الکترونیک نویسندهٔ مسئول مکاتبات:
ssemnan@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

گذرا (در حد ۲ دقیقه) پس از برخی حالات استرسی حاد همچون واقع شدن در معرض بخارات اتر یا یک محیط نا آشنا و جدید بروز می‌کند. مکانیسمهای پیشنهادی برای بروز این پردردی شامل فعالیت محور HPA و درگیری سیستمهای گاباارژیک و α2 آدرنرژیک می‌باشد [۱۱]. پردردی طولانی مدت (با بیشتر از ۲۴ ساعت ماندگاری و گاهی تا ۹ روز متوالی) پس ازتجربه استرسهای مزمن یا مکرر (مثل محیط سرد و یا شنای اجباری مکرر) در جوندگان بروز می‌کند [۳۷،۳۸]. چندین مکانیسم برای بروز این پدیده پیشنهاد شده‌اند که اغلب بدلیل تغییراتی است که استرس مزمن در عملکرد برخی سیستمها دردستگاه اعصاب مرکزی منجمله در نخاع القاء می‌نماید. برخی از این تغییرات مشتمل هستند بر: الف) بروز تغییر در عملکرد سیستم اپیوییدی درون زاد [۲۵،۲۷،۳۸]. ب) کاهش فعالیت گیرنده آدنوزینی شماره ۱ [۳۷]. ج) کاهش فعالیت سیستم سروتونرژیک [۲۷]. د) افزایش رهایش ماده P و جمعیت گیرنده‌های ماده P و NMDA و غیر NMDA [۲۲،۲۳،۲۷]. ه) افزایش رهایش گلوتامات [۲۳،۲۴]. دگزامتازون به عنوان آنالوگ صناعی کورتیکواسترون قادر به مهار ترشح CRF و ACTH می‌باشد [۸،۱۶] لذا اگر به جای استرس بکار گرفته شود، تنها از نقش گلوکوکورتیکوئیدها تقلید می‌نماید [۱۰].

مورفین و تعداد دیگری از اپیوئیدها دارای اثری دو گانه بر حساسیت به درد هستند [۱،۲۹]. در دوزهای درمانی مرسوم مورفین یک ضد درد خوب است اما تیمار سیستمیک با مورفین در دوزهای فوق العاده اندک در موش صحرائی آزمایشگاهی اثر پردردی نشان میدهد [۳۱]. بطور مشابهی استرس نیز بر روی درد اثر دوگانه بروز میدهد زیرا بلافاصله پس از بسیاری از استرسهای غیر آسیب رسان و روانی بی دردی بروز می‌کند [۳۵] اما شواهدی وجود دارند که حداقل ۲۴ ساعت پس از تکرار برخی انواع استرسها، افزایش حساسیت به درد یا پردردی در حیوان آزمایشگاهی دیده شده است [۲۶،۲۷].

مورفین اثر بیدردی خود درسیستم اعصاب مرکزی را اغلب ازطریق گیرندهای جفت شده به پرتئین G مهاری (Gi/o) بروز می‌دهد [۲۰]. در این مسیر سلسله‌ای از وقایع درون سلولی مثل باز شدن کانالهای پتایسمی یکسویه جفت شونده با پروتئین G مهاری و یا مهار فعالیت آدنیلیل سیکلاز [۲۰،۴۱] فعالیت سلول را مهار می‌کند. شواهدی مبنی بر اینکه بیدردی ناشی از استرس حداقل قسمتی ناشی از فعالیت اپیوییدهای درون زاد است وجود دارند [۱۳،۱۴،۱۹]. اثر پردردی مورفین در دوزهای فوق العاده اندک در سطح سلولهای گانگلیون ریشه پشتی نخاع از طریق جفت شدن گیرنده اپیوئیدی با پروتئین G تحریکی (Gs) به ثمر می‌رسد [۱،۳،۴]. نظر به القاء اثرات بیدردی و پردردی توسط مورفین و استرس و با در نظر گرفتن بکارگیری مکانیسم اپیوئیدی در القاء بیدردی توسط استرس، محتمل است که بطور مشابه با مورفین، پردردی ناشی از استرس مزمن نیز از طریق فعال شدن مسیر سیگنالینگ Gs صورت بپذیرد. در تحقیق حاضر نقش محور HPA در بروز اثرات بیدردی استرس، القاء تحمل به اثر بی دردی استرس، پردردی ناشی از استرس مکرر بررسی شده است، همچنین احتمال دخالت پردردی استرس مکرر در بروز تحمل به بیدردی استرس و احتمال بروز پردردی ناشی از استرس از طریق فعال شدن مسیر سیگنالینگ Gs مورد تحقیق قرار گرفته است.

مواد و روشها

حیوانات

موشهای صحرایی نر نژاد ویستار(سرم سازی رازی) در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. موشها در قفسهای ۳ الی ۴ عددی و در شرایط استفاده آزاد از آب آشامیدنی شهری (درگروه ADX سرم فیزیولوژی برای نوشیدن استفاده شد) و خوراک پیش ساخته موش صحرای نگهداری شدند. شرایط محیطی استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی در شبانه روز و دمای ۲۲±۲ ^{o} C رعایت گردید. تمامی آزمایشات تحت مقرارات بین المللی حمایت از حیوانات و تایید کمیته اخلاق علمی دانشگاه تربیت مدرس صورت پذیرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

داروها

دگزامتازون [۱۰] (2 mg/kg) و اسلتامیویر [۴] (1mg/kg)، محلول در سرم فیزیولوژی به صورت تزریق داخل صفاقی یک میلی لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن استفاده شدند.

مخلوط کتامین هیدروکلراید (۵۰ mg/kg) + رامپون (mg/kg ۵)، به صورت تزریق داخل صفاقی یک میلی لیتر به ازای یک کیلوگرم وزن بدن برای بیهوشی مورد استفاده قرار گرفت.

استرس شنای اجباری

به منظور پرهیز از تغییرات داده‌ها ناشی از ریتمهای سیرکادین بویژه در مورد فعالیت محور HPA تمام جلسات استرس در ساعت ۱۰ صبح تا ۱۲ و به صورت یک مرتبه در هر روز انجام گرفت. بطور خلاصه هر حیوان بطور انفرادی در یک مخزن استوانه‌ای به ابعاد ۵۰ سانتیمتر ارتفاع و ۳۵ سانتیمتر قطر که حاوی ۴۰ سانتیمتر آب $20\pm1\ ^{o}C$ است، برای ۵ دقیقه وادار به شنا می‌شد. حیوانات گروه کنترل به مدت ۵ دقیقه در همان مخزن شنا حاوی آب به ارتفاع ۱ سانتیمتر قرار گرفتند. پس از خاتمه حیوان با حوله خشک شده و مورد سنجشهای بعدی قرار می‌گرفت [۱۷, ۲۶].

آزمون Tail-Flick

برای اندازه‌گیری تغییر آستانه درد حرارتی از آزمون Tail-Flick استفاده گردید. این آزمون بر اساس روش D,Amour و Smith (1971) انجام شد [۵] و دستگاه Tail-Flick از نوع HSE مدل ۸۱۲ استفاده شد. شدت نور دستگاه طوری تنظیم شد که زمان متوسط پاسخ دهی پایه بین ۴ تا ۵ ثانیه باشد و زمان ۱۵ ثانیه به عنوان زمان قطع تابش نور به ثلث میانی دم حیوان (cut of time) در نظر گرفته شد به این روش تغییرات در جهت کاهش زمان پایه نیز قابل آشکار شدن است. زمان پاسخ دهی (Tail-Flick Latency) قبل (زمان پایه) و بعد از تیمارها اندازه‌گیری شد. این زمان میانگین سه بار اندازه‌گیری متوالی با فواصل یک دقیقه‌ای بود.

تغییرات در آستانه درد بلافاصله، ۳۰ دقیقه و تا ۳ ساعت بعد به فواصل یک ساعت و ۲۴ ساعت پس از یک استرس و در گروه کنترل ثبت گردید. در گروه‌های دیگر تغییرات مذکور بلافاصله پس از استرس تا پنجمین جلسه استرس و نیز ۲۴ ساعت پس از هراسترس تا پنجمین جلسه بررسی شد.

تغییرات در آستانه درد ناشی از تجویز دگزامتازون، به جای استرس، مشابه گروهای استرسی نیز بررسی گردید. بررسی تغییرات در آستانه درد با تجویز مکرر Oseltamivir 1mg/kg ۱۵ دقیقه قبل از هر استرس صورت گرفته و تغییرات در آستانه درد ۲۴ ساعت پس از هراسترس تا پنجمین جلسه بررسی شد. در گروهی دیگر همین دارو ۲۴ ساعت پس از پنجمین جلسه استرس تجویز و ۳۰ دقیقه بعد تغییرات در آستانه درد سنجش شد.

اثر برداشتن آدرنال بر آستانه درد در حیوانات ADX بررسی شد، سپس آزمایشات گروه‌های استرسی مذکور، در این حیوانات و گروه شم تکرار شد.

درمواردی درصد تغییرات آستانه درد نسبت به cut off time به روش زیر محاسبه شد:

درصد تغییرات، که در آن TL برای Tail-flick latency وBL برای زمان پاسخ دهی پایه قبل از تیمار در نظر گرفته می‌شود. =[(TL-BL)/ (15-BL)]X100

جراحی آدرنالکتومی ADX

ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی داروی (کتامین هیدروکلراید+ رامپون) مورد بیهوشی عمیق قرار می گرفت. دو شکاف طولی پشتی در پوست حیوان به اندازه حدوداً ۴ سانتیمتر در دو طرف خط وسط ایجاد شده و سپس دو شکاف طولی در بافتهای پیوندی و عضلات جانور به اندازه یک تا یک و نیم سانتیمتر پائین تر از دنده های طرفین ایجاد می‌گردید. کلیه ها به آرامی و با دقت به بیرون از بدن کشیده می شد و غدد فوق کلیوی با کمک پنس و قیچی استخراج می شد. پس از برگرداندن کلیه بافت های زیر جلدی با نخ جراحی جذب شونده

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اثر استرس شنای اجباری و برداشتن آدرنال بر سطح کورتیکواسترون پلاسما

گروه ها	سطح پلاسمایی کورتیکواسترون (ng/ml)
شم	۱۹۴/۲±۱۵/۰۹
آدرنالکتومی	غیر قابل تشخیص
یک جلسه استرس	۸۳۶/۹۹±۶۰/۵۳***
سه جلسه استرس	۹۶۷/۸۱±۴۲/۹۷***
پنج جلسه استرس	۹۲۴/۷۴±۹۲/۸۷***
۲۴ ساعت پس از پنجمین جلسه استرس	**٤٥,٠٥٤±٣٥٢,٩

$p<0.001$***, $p<0.01$** در مقایسه با گروه شم. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد (n=8).

و پوست با نخ جراحی سیلک بخیه شده و سپس جانور برای ۵ روز بهبودی می یافت. پس از جراحی در تمام مراحل به جانور به جای آب آشامیدنی، سرم فیزیولوژی داده می شد. در گروه شم تمام مراحل عمل جراحی بطور مشابه تکرار می شود ولی غده فوق کلیوی استخراج نشده و نیز آب آشامیدنی مورد استفاده قرار می گیرد [۶].

اندازه‌گیری سطح کورتیکواسترون پلاسما: بلافاصله پس از اولین استرس در گروه‌های کنترل، ADX و شم و بعد از سومین و پنجمین جلسه استرس در گروه کنترل، موشهای صحرایی در ساعت ۹ تا ۱۰ صبح با قطع سر قربانی شده و خون تنه در لوله‌های پلاستیکی حاوی (۵٪) EDTA جمع آوری شد. پلاسما بلافاصله در دور ۲۵۰۰ در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و از سلولهای خونی جدا و منجمد گردید و تا زمان سنجش هورمونی در دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری گردید. سطح پلاسمایی کورتیکواسترون با روش رادیوایمونواسای و با استفاده از کیت مربوطه برای موش صحرایی (DRG International, Inc. USA) اندازه‌گیری شد. حساسیت سنجش ۰/۲۵ واحد بوده و واکنش متقاطع آنتی بادی با کورتیکواسترون ۱۰۰٪، با دزاکسی کورتیکواسترون ۰٫۳۴٪، و با سایر استروئیدها کمتر از ۰٫۱۰٪ بود [۶].

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به صورت میانگین ± SEM ارائه شده اند. تفاوت بین اثرات استرس بر آستانه درد در طول زمان مطالعه با آزمون ANOVA یک و یا دوطرفه و بدنبال آن آزمون مقایسه میانگین Newman-Keuls و با $p<0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن برآورد شد.

یافته ها

اثر استرس و برداشتن غده آدرنال بر سطح کورتیکواسترون پلاسما

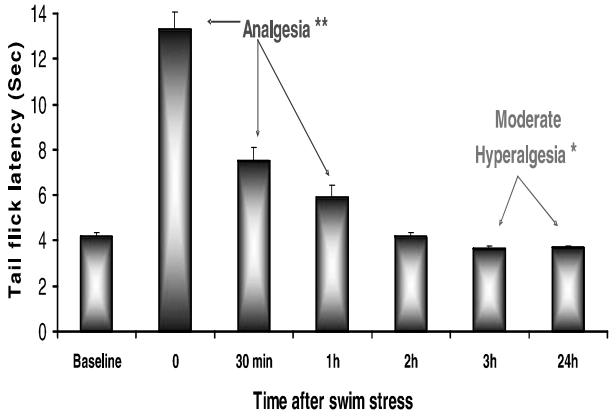
همانطور که در جدول۱ مشاهده می‌شود استرس شنای اجباری، بلافاصله منجر به افزایش سطح کورتیکواسترون پلاسما تا ۴ برابر شد ($p<0.001$). استرس تکراری حتی در روزهای سوم و پنجم نیز منجر به همان مقدار افزایش در سطح کورتیکواسترون پلاسما شد ($p<0.001$). ۲۴ ساعت پس از پنجمین استرس نیز مقدار قابل ملاحظه‌ای از افزایش سطح کورتیکواسترون پلاسما باقی مانده بود، حدود ۲ برابر ($p<0.001$) سطح کورتیکواسترون پلاسما در گروه ADX غیر قابل تشخیص بود.

اثر تک استرس و استرس تکراری بر آستانه درد

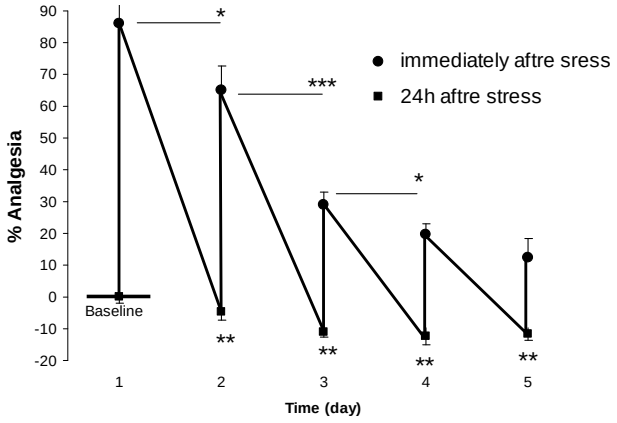
همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود استرس شنای اجباری، بلافاصله منجر به القای بیدردی شده است که تا یک ساعت ادامه داشته ($p<0.01$). از ساعت سوم پس از استرس، هایپرآلژزیای خفیف اما معنی داری بروز نمود ($p<0.05$) که تا ۲۴ ساعت پس از آن نیز ادامه داشته است ($p<0.05$).

شکل ۲ اثر استرس مکرر را بر آستانه درد بلافاصله پس از استرس و ۲۴ ساعت پس از هر استرس تا پنجمین جلسه نمایش می‌دهد. تکرار استرس منجر به افزایش شدت پردردی ثبت شده

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- اثراسترس شنای اجباری بر آستانه درد. $p<0.01$** و $p<0.05$* در مقایسه با بی دردی ایجاد شده بلافاصله پس از استرس. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است $(8>n>6)$.



شکل ۲- اثر استرس مکرر بر آستانه درد بلافاصله و ۲۴ ساعت پس از هر استرس تا پنجمین جلسه. $p<0.001$*** و $p<0.01$** ، $p<0.05$* در مقایسه با مقدار پایه. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است $(8>n>6)$.

۲۴ ساعت پس از هر استرس شده است که ۲۴ ساعت پس از سومین استرس به بیشترین حد کاهش خود رسید $(p<0.01)$. همزمان استرس مکرر منجر به کاهش بیدردی القاء شده بلافاصله پس از هر استرس (بروز تحمل) گردید $(p<0.001)$.

اثر تجویز Oseltamivir بر پردردی حاصل از استرس مکرر

تجویز مزمن روزانه Oseltamivir 1 mg/kg- i.p.، ۳۰ دقیقه قبل از هر یک از پنج جلسه شنای اجباری نتوانست اثر هایپر آلژزیک استرس مزمن را مهار کند (شکل ۳A). از سوی دیگر تجویز حاد Oseltamivir 1 mg/kg ip.، ۳۰ دقیقه قبل از آزمون Tail flick, ۲۴ ساعت پس از پنجمین جلسه شنای اجباری نیز نتوانست اثر هایپر آلژزیک استرس مزمن را مهار کند و این اثر تا دو ساعت بعد کماکان باقی ماند (شکل ۳B).

اثر دگزامتازون بر آستانه درد

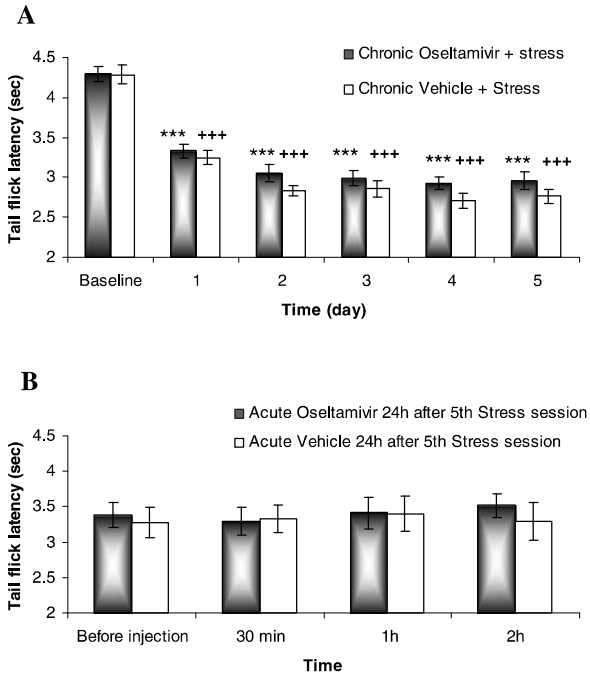
آنچنان که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد، تجویز حاد دگزامتازون 2 mg/kg i.p. طی مدت نیم ساعت بعد از تزریق منجر به پردردی گردید $(p<0.01)$ که تا سه ساعت بعد نیز بر شدت آن افزوده شد و پس از ۲۴ ساعت نیز ادامه داشته است $(p<0.01)$. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، تکرار تجویز دگزامتازون در روزهای بعد منجر به افزایش شدت پردردی ثبت شده ۲۴ ساعت پس از هر تجویز شده است $(p<0.01)$ که ۲۴ ساعت پس از دومین تا چهارمین تجویز به بیشترین حد خود رسیده است $(p<0.001)$.

اثر تک استرس و استرس تکراری بر آستانه درد در حیوانات ADX

شکل ۶A نشان میدهد که ۵ روز پس از جراحی حذف غده فوق کلیوی (ADX)، تغییری قابل ملاحظه در آستانه درد بوجود نیامده، اما استرس شنای اجباری توانسته است باعث بروز بی دردی بشود که در مقایسه با حیوانات شم (Sham-ADX) در اغلب ساعتهای پس از استرس از روند کاهشی کمتری برخوردار بوده $(p<0.01)$ و حتی تا ۲۴ ساعت پس از استرس باقی ماند (شکل ۶B) $(p<0.05)$.

استرس شنای اجباری بلافاصله باعث بروز بی دردی می‌شد که با تکرار استرس تحمل در آن پدید آمد اما در گروه ADX، بروز بیدردی ناشی از استرس با تکرار استرسها دچار تحمل کمتری شده است، طوری که در مقایسه با حیوانات شم بیدردی حتی در روزهای سوم و پنجم بخوبی باقی مانده است. (به ترتیب $p<0.01$ و $p<0.001$) (شکل ۷).

Archive of SID
www.SID.ir

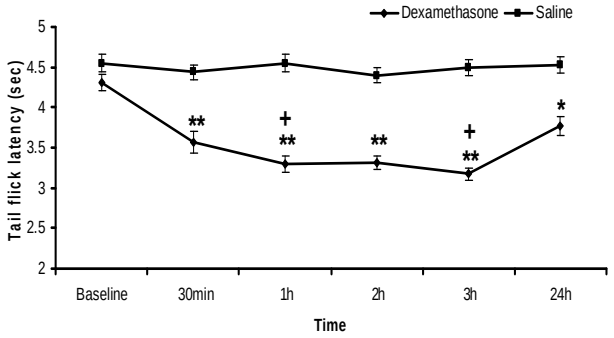


شکل۳- A : اثر تجویز مزمن روزانه Oseltamivir 1 mg/kg i.p.، ۳۰ دقیقه قبل از هر یک از پنج جلسه شنای اجباری بر پردردی ناشی از استرس. **B :** اثرتجویز حاد Oseltamivir 1 mg/kg i.p.، ۳۰ دقیقه قبل از آزمون Tail flick، ۲۴ ساعت پس از پنجمین جلسه شنای اجباری بر پردردی ناشی از استرس. $p<0.001$*** در مقایسه با مقدار پایه. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است (8>n>6).

۲۴ بعد از استرس شنای اجباری پردردی بروز کرد که با تکرار استرس شدت آن افزایش یافت، اما همچنانکه از شکل ۸ مشهود است در گروه ADX هیچ یک از پنج جلسه استرس شنای اجباری نتوانسته است باعث بروز اثر پردردی شود و حتی حد پایه آستانه درد نیز تا حدودی افزایش یافته و به صورت بیدردی در آمده است ($p<0.05$).

بحث

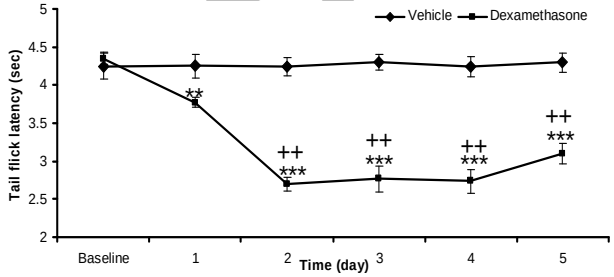
تا مدتها اثر بیدردی استرس به عنوان یک پدیده جالب توجه مورد تحقیقات زیادی واقع شد و مکانیسمهای زیادی برای بروز آنها مطرح شد منجمله نقش انواع گیرنده‌های میو و کاپا



شکل۴- اثر تجویز حاد Dexamethasone 2 mg/kg i.p. بر آستانه درد. $p<0.01$** ، $p<0.05$* در مقایسه با گروه سالین، $p<0.05$+ در مقایسه با نیم ساعت پس از تجویز دارو. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است (8>n>6).

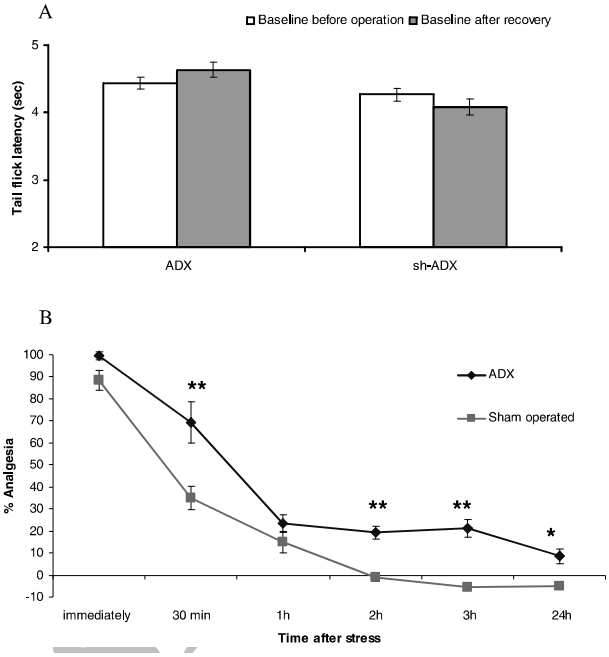
اپیوئیدی [۱۴،۱۹]. علاوه بر اپیوئیدهای درون زاد تداخل سیستمهای غیر اپیوئیدی در بروز بیدردی نظیر سیستم هیستامینرژیک نیز نشان داده شد [۴۰]. معلوم شده که بیدردی ناشی از استرس دچار تحمل می‌شود و این تحمل با تحمل بیدردی اپیوئیدی تداخل هم دارد [۱۳]. مشاهده اثرات هایپرآلژزیک استرس ورودی تحقیقی هیجان انگیز دیگری را برای تحقیق در مورد چگونگی این اثرات و مکانیسمهای آن باز کرد [۲۲،۲۶،۳۷]. تقریبا اغلب تحقیقات بر روی یکی از این اثرات استرس بر آستانه درد متمرکز بوده‌اند اما در تحقیق حاضر که نقش محور HPA مورد نظر قرار می‌گیرد، هر دو اثر بیدردی و پردردی استرس شنای اجباری مطالعه شده است.

نتایج نشان دادند که استرس شنای اجباری بلافاصله منجر به افزایش سطح کورتیکواسترون پلاسما شد (جدول۱) که



شکل۵- اثر تکرار تجویز Dexamethasone 2 mg/kg i.p. بر آستانه درد. $p<0.001$***، $p<0.01$** در مقایسه با گروه حامل دارو ، $p<0.01$++ در مقایسه با 24 ساعت پس از اولین تجویز دارو. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است (8>n>6).

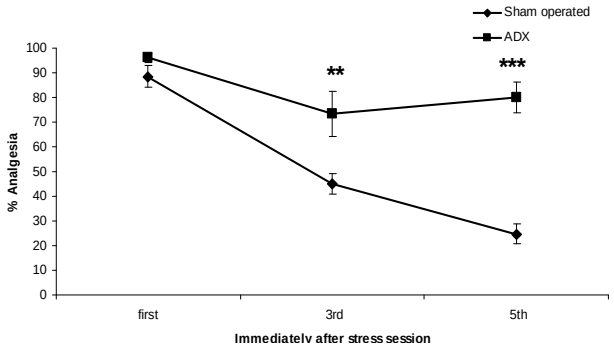
www.SID.ir



شکل۶- A) اثر برداشتن آدرنال (ADX) و ۵ روز پس از بهبودی از آثار جراحی، بر آستانه درد. **B)** اثر استرس شنای اجباری در گروه ADX بر آستانه درد. $p<0.01$** و $p<0.05$* در مقایسه با گروه شم در همان زمان. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است ($6<n<8$).

نشان از افزایش فعالیت محور HPA دارد. استرس شنای اجباری بلافاصله منجر به القای بیدردی شده است که در ساعت دوم کاملا بر طرف شده است اما از ساعت سوم تا ۲۴ ساعت بعد پردردی خفیف اما معنی داری را موجب شده است (شکل ۱). بنابر این اگر چه استرس مذبور بطور تقریبا آنی در حیوان منجر به بروز بیدردی می‌شود اما پس از مدتی نسبتاً کوتاه تغییراتی دراز مدت تر مثلا القاء تغییر در سیستم اپیوئیدی اندوژن [۳۲] را پدید می‌آورد که حساسیت جانور به درد دچار افزایش نسبتاً ماندگار می‌شود، طوری که در این مورد تا ۲۴ ساعت بعد نیز این کاهش در آستانه درد ردگیری شده است، این در حالی است که فقط یک استرس به جانور وارد شده و این اثر پردردی قابل ردگیری را پدید آورده است.

افزایش سطح کورتیکواسترون پلاسما به همان میزان اولین استرس با وجود تکرار استرس در روزهای سوم و پنجم (جدول ۱) نموداری از عدم ایجاد تحمل در بکارگیری محور HPA توسط



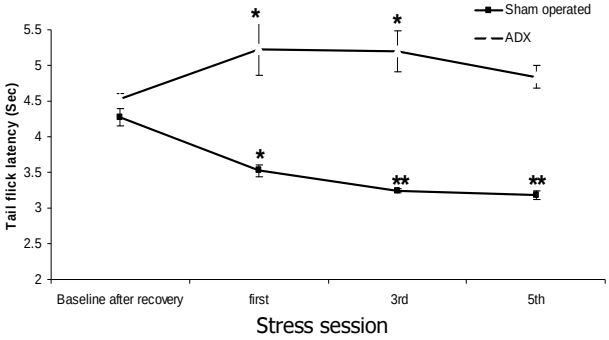
شکل۷- اثر تکرار استرس در گروه ADX، بر آستانه درد بلافاصلا پس از هر استرس . $p<0.001$*** و $p<0.01$** در مقایسه با گروه شم در همان زمان. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است ($6<n<8$).

این نوع از استرس می‌باشد.

تکرار استرس منجر به افزایش شدت پردردی ثبت شده ۲۴ ساعت پس از هر استرس شد اما همزمان اثر بیدردی استرس که بلافاصله پس از آن بروز میکرد نیز دچار کاهش شد (شکل۲) این یافته نشان میدهد تکرار استرس ضمن القاء تحمل به اثرات بیدردی استرس، می‌تواند باعث القاء پردردی بطورافزایشی هم بشود، به عبارتی همزمان با افت آستانه درد ۲۴ ساعت پس از هر استرس، بیدردی ناشی از استرس نیز کاهش می‌یابد. با این ترتیب شاید بتوان گفت که حداقل بخشی از تحمل ایجاد شده به بیدردی استرس ناشی از افت در آستانه درد یا ایجاد پردردی ناشی ازخود استرس باشد و بر این اساس شاید بتوان نمودار شکل ۲ را به عنوان مدلی از بروز تحمل به بیدردی به دلیل بروز پردردی پیشرونده در اثر استرس پیشنهاد داد.

مورفین و تعداد دیگری از اپیوئیدها دارای اثر دو گانه بیدردی و پردردی هستند [۲،۴،۲۹]. آنزیم نورآمینیداز تولید یک نوع سیالومونوگانگلیوزید غشایی به نام GM1 را به عهده دارد و مهار آن منجر به کاهش GM1 و لذا کاهش جفت شدن گیرندهای اپیوئیدی مختلف با پروتئین Gs و لذا مهار سیگنالینگ Gs می‌شود طوری که استفاده از Oseltamivir یک داروی ضد ویروسی که مهار کننده آنزیم مذبور است، توانسته است اثر پردردی دوز بسیار ناچیز مورفین را مهار نماید [۴].

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۸- اثر تکرار استرس در گروه ADX، بر آستانه درد ۲۴ ساعت پس از هر استرس. $p<0.05$* در مقایسه با مقدار پایه. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است $(6<n<8)$.

از طرفی بطور مشابهی استرس نیز هم اثر بیدردی [۳۳،۳۴] و هم پردردی [۲۶،۲۷] بروز می‌دهد، از آنجایی که بخشی از اثرات بیدردی استرس را به اپیوئیدها ربط داده‌اند [۱۳،۱۴] احتمال اینکه پردردی ناشی از استرس مزمن نیز از طریق فعال شدن مسیر سیگنالینگ Gs صورت بپذیرد قابل بررسی می‌باشد، تجویز حاد و مزمن Oseltamivir 1 mg/kg i.p.، توانست اثر پردردی استرس مزمن را مهار کند (شکل۳). بنابر این احتمالا مسیر اپیوئیدی سیگنالینگ Gs در بروز پردردی ناشی از استرس نقشی ندارد.

برای روشن تر شدن نقش محور HPA در اثرات استرس بر آستانه درد از تجویز آنالوگ صناعی کورتیکواسترون یعنی دگزامتازون استفاده گردید [۲۱]. تجویز مزمن این گلوکوکورتیکوئید منجر به مهار نسبی هیپوتالاموس و هیپوفیز شده میزان CRH و ACTH کمتر از حد معمول خواهد شد [۸] لذا اگر اثراتی از تجویز مزمن این گلوکوکورتیکوئید به جای استرس مزمن مشاهده شود، این اثرات را احتمالا میتوان به اثر فعالیت ناحیه قشری آدرنال حین استرس مزمن ارتباط داد.

تجویز حاد دگزامتازون 2 mg/kg i.p. حتی نیم ساعت بعد منجر به پردردی شده که پس از ۲۴ ساعت نیز ادامه داشته است (شکل ۴)، بنابر این میتوان احتمال داد که بخشی از اثر پردردی استرس مربوط به ترشحات گلوکوکورتیکوئیدی آدرنال باشد، در تایید، تکرار تجویز دگزامتازون همانند تکرار استرس، منجر به افزایش شدت پردردی ثبت شده ۲۴ ساعت پس از هر تجویز شد (شکل ۵) که بسیار مشابه اثر پردردی خود استرس (شکل ۲) است. بنابر این احتمال آنکه بتوان اثرات پردردی استرس را به ترشحات گلوکوکورتیکوئیدی حاصل از فعالیت آدرنال حین استرس نسبت داد بخوبی تقویت می‌شود. یافته دیگر در تایید اینست که مشابه با ناتوانی اسلتامیویر در ایجاد مهار بر پردردی ناشی از استرس (شکل ۳) این دارو نیز نتوانست اثر پردردی تجویز دگزامتازون را مهار کند (نتایج نشان داده نشده اند). لذا احتمال اینکه به این نتیجه‌گیری برسیم که استرس از طریق گلوکوکورتیکوئیدهای آدرنالی از مسیرهای سیگنالینگ دیگری بجز Gs برای ایجاد پردردی بهره ببرد افزایش پیدا می‌کند.

علاوه بر یافته‌های فوق اثرات آنتاگونیستی گزارش شده برای گلوکوکورتیکوئیدهایی مثل کورتیکواسترون و نوع صناعی آن دگزامتازون در مقابل بیدردی ناشی از استرس [۱۸] و حتی بیدردی ناشی از تحریک گیرنده میو اپیوئیدی [۳۶] احتمال انتصاب اثرات پردردی استرس و بروز تحمل ناشی از تکرار در بیدردی استرس را، به گلوکوکورتیکوئیدها تقویت می‌نماید. این احتمال با یافته‌های مربوط به گروه‌های آدرنالکتومی که مورد بحث قرار می‌گیرند بیشتر تایید می‌گردد.

این همه شواهدی از تداخل عمل گلوکوکورتیکوئیدها با سیستم درد و بیدردی دارد. مثلا با سیستمهای متعددی که برای اثر پردردی استرس مطرح شده‌اند همچون تغییر در سیستم اپیوئیدی [۳۲] کاهش میزان سروتونین در سیستم اعصاب مرکزی [۲۷]، کاهش گیرنده‌های آدنوزینی [۳۷] و افزایش فعالیت گیرنده‌های NMDA و ماده P [۲۲]، اما در ارتباط با سیگنالینگ سلولی، اثر گلوکوکورتیکوئیدها در تنظیم افزایشی کانالهای کلسیمی نوع L [۱۵] و ورود کلسیم و رهایش کلسیم از ذخایر سیتوپلاسمیک نیز مشخص شده‌اند [۶،۷] در مجموع مسیر سیگنالینگ کلسیمی به عنوان مکانیسمی برای تداخل عمل استرس و گلوکوکورتیکوئید تجویز شده در پژوهش حاضر با سیستم درد و بیدردی برای ادامه تحقیقات مکانیسمی پیشنهاد می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

برای بررسی نقش بخشهای غیر آدرنالی محور HPA در تغیرات آستانه درد حین استرس، حیوانات مورد عمل جراحی برداشتن آدرنال (ADX) قرار گرفتند، صحت عمل با تنزل سطح کورتیکواسترون پلاسمایی به حد غیر قابل تشخیص نشان داده شد (جدول ۱). آستانه درد در حیوانات ADX تغییری نکرد (شکل ۶A) اما استرس شنای اجباری توانست باعث بروز اثر بیدردی بشود که حتی ۲۴ ساعت پس از استرس دوام یافته بود (شکل ۶B). این نشان میدهد که اثر بیدردی استرس ارتباطی با ترشحات آدرنالی نداشته بلکه عدم حضور این ترشحات توانسته اثر بیدردی استرس را از دوام و شدت بیشتری در ساعتهای پس از آن برخوردار نماید و این مجدداً تاییدی بیشتر بر یافته قبلی همین تحقیق بر اثر پردردی ناشی از گلوکوکورتیکوئیدهای آدرنالی فراهم می‌کند.

در حیوانات ADX اثرات بیدردی بلافاصله پس از هر یک از استرسها در اثر استرسهای متوالی دچار تحمل اندکی نیز شده است بطوری که کاهش ناچیزی آن هم بطور نامنظم فقط در روز سوم و پنجم تکرار استرسها پدید آمده (شکل ۷). این یافته‌ها ضمن تایید اثرات پردردی ترشحات آدرنالی حین استرس مسئولیت بروز تحمل به اثر بیدردی استرس را نیز متوجه آن می‌نماید و همچنین تائیدی مجدد برای مدل پیشنهادی (نمودار ۲) در بروز تحمل به بیدردی استرس به دلیل بروز پردردی پیشرونده در اثر تکرار استرس فراهم میآورد.

هیچ یک از پنج جلسه استرس شنای اجباری نیز۲۴ ساعت پس از هر استرس نتوانسته است باعث بروز اثر پردردی بشود، بلکه یک بیدردی ناچیز هم مشاهده شد (شکل ۸). بنابر این عدم حضور ترشحات آدرنالی منجر به عدم حضور پردردی ناشی از استرس شده است و در این حالت بیدردی استرس از دوام بیشتری برخوردار شده است واین احتمال را بر می‌انگیزد که اثر بیدردی استرس مربوط به فعالیت بخشهای غیر آدرنالی محور HPA باشد، اطلاعات دیگری نیز این موضوع را حمایت می‌کنند، مثلا حین استرس از بخش قدامی غده هیپوفیز متاثر از CRF، آدرنوکورتیکوتروپین هورمون (ACTH) و بتا اندورفین [۳۰]، اپیوئیدی که می‌تواند اثر بیدردی داشته باشد تولید و آزاد می‌شود [۲۸]، علاوه بر این برخی به اثرات بیدردی CRF نیز اشاراتی داشته‌اند که این مورد مورد مجادله علمی است [۹،۱۲].

احتمال مداخله بخشهای دیگری از سیستم اعصاب مرکزی در ایجاد اثرات بیدردی ناشی از استرس نیز قابل بررسی است.

در کل داده‌های این پژوهش نشان می‌دهند احتمالا حداقل بخشی از تحمل ایجاد شده به بیدردی استرس می‌تواند ناشی از افت در آستانه درد یا ایجاد پردردی ناشی ازخود استرس باشد، احتمال اینکه استرس از طریق گلوکوکورتیکوئیدهای آدرنالی از مسیرهای سیگنالینگ دیگری بجز Gs برای ایجاد پردردی بهره ببرد وجود دارد و اثر بیدردی استرس نیز می‌تواند مربوط به فعالیت بخشهای غیر آدرنالی محور HPA یا سیستم اعصاب مرکزی باشد.

منابع

[1] Crain SM, Shen KF, Cholera toxin-B subunit blocks excitatory opioid receptor-mediated hyperalgesic effects in mice, thereby unmasking potent opioid analgesia and attenuating opioid tolerance/dependence. ***Brain Res*** 919 (2001) 20-30.

[2] Crain SM, Shen KF, Enhanced analgesic potency and reduced tolerance of morphine in 129/SvEv mice: evidence for a deficiency in GM1 ganglioside-regulated excitatory opioid receptor functions. ***Brain Res*** 856 (2000) 227–235.

[3] Crain SM, Shen KF, Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 ganglioside-regulated opioid receptor functions. ***Trends Pharmacol Sci*** 9 (1998) 358-365.

Archive of SID
www.SID.ir

[4] Crain SM, Shen KF, Neuraminidase inhibitor, oseltamivir blocks GM1 ganglioside-regulated excitatory opioid receptor-mediated hyperalgesia, enhances opioids analgesia and attenuates tolerance in mice. ***Brain Res*** 995 (2004) 260–266.

[5] D'Amour FE, Smith DL, A method for determination loss of pain sensation. ***J Pharmacol Exp Ther*** 72 (1971) 74-79.

[6] Esmaeili-Mahani S, Motamedi F, Javan M, Ahmadiani A, Involvment of hypothalamic adrenal axis on the effect of nifedipine in the development of morphine tolerance in rats. ***Pharmacol Biochem Beh*** 81 (2005) 152-157.

[7] Esmaeili-Mahani S, Vahedi S, Motamedi F, Pourshanazari A, Khaksari M, Ahmadiani A, Nifedipine potentiates antinociceptive effects of morphine in rats by decreasing hypothalamic pituitary adrenal axis activity. ***Pharmacol Biochem Be*** 82 (2005) 17-23.

[8] Gómez FE, Kloet ER, Armario A, Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. ***Am J Physiol-Reg I*** 274 (1998) 420-427.

[9] Hargreaves KM, Flores CM, Dionne RA, Mueller GP, The role of pituitary beta-endorphin in mediating corticotropin-releasing factor-induced antinociception. ***Am J Physiol*** 258 (1990) 235-242.

[10] Javan M, Kazemi B, Ahmadiani A, Motamedi F, Dexamethasone mimics the inhibitory effect of chronic pain on the development of tolerance to morphine analgesia and compensates for morphine induced changes in G proteins gene expression. ***Brain Res*** 1104 (2006) 73-79.

[11] Jorum E, Noradrenergic mechanisms in mediation of stress-induced hyperalgesia in rats. ***Pain*** 34 (1988) 349-355.

[12] Lautenbacher S, Roscher S, Kohl G, Vedder H, Krieg J, Corticotropin-releasing-hormone lacks analgesic properties: an experimental study in humans, using non-inflammatory pain. ***Pain*** 83 (1999) 1-7.

[13] Lewis JW, Sherman JE, Liebeskind JC, Opioid and non-opioid stress analgesia: assessment of tolerance and cross-tolerance with morphine. ***J Neurosci*** 1 (1981) 358-363.

[14] Lutfy K, Sadowski B, Kwon IS, Weber E, Morphine analgesia and tolerance in mice selectively bred for divergent swim stress-induced analgesia. ***Eur J Pharmacol*** 265 (1994) 171-174.

[15] Mamczarz J, Budziszewska B, Antkiewicz-michaluk L, Vetulani J, The Ca^{2+} channel blockade changes the behavioral and biochemical effects of immobilization stress. ***Neuropsychopharmacol*** 20 (1999) 248-254.

[16] Marchetti J, Burlet A, Boulange M, Study of ADH secretion in adrenalectomized rats and effects of Dexamethasone. ***Acta Endocrinol (Copenh)*** 87 (1978) 302-292.

[17] Mogil JS, Stenberg WF, Balian H, Liebeskind JG, Sadowski B, Opioid and nonopioid swim stress induced analgesia: A parametric analysis in mice. ***Physiol Behav*** 59 (1996) 123-132.

[18] Mousa S, Miller CHG, Couri D, Corticosteroid modulation and stress-induced analgesia in rats. ***Neuroendocrinology*** 33 (1981) 317-319.

Archive of SID
www.SID.ir

of c-Fos in the rat lumbar cord. ***Brain Res*** 965 (2003) 259-268.

[27] Quintero L, Moreno M, Avila C, Arcaya J, Maixner W, Suarez-Roca H, Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. ***Pharmacol Biochem Be*** 67 (2000) 449-458.

[28] Rubinstein M, Mogil GS, Japon M, Chan EC, Allen RG, Low ML, Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking stress β-endorphin by site-directed mutagenesis. ***PNAS*** 93 (1999) 3995-4000.

[29] Ruscheweyh R, Sandkuhler J, Opioids and central sensitisation: II. Induction and reversal of hyperalgesia. ***Eur J Pain*** 9 (2005) 149-152.

[30] Sarnyai ZN, Shaham Y, Heinrichs SC, The Role of Corticotropin-Releasing Factor in Drug Addiction. ***Pharmacol Rev*** 53 (2001) 209-243.

[31] Shen KF, Crain SM, Acute thermal hyperalgesia elicited by low-dose morphine in normal mice is blocked by ultra-low dose naltrexone, unmasking potent opioid analgesia. ***Brain Res*** 888 (2001) 75-82.

[32] Suarez-Roca H, Silva JA, Arcaya JL, Quintero L, Maixner W, Pinerua-Shuhaibar L, Role of mu-opioid and NMDA receptors in the development and maintenance of repeated swim stress-induced thermal hyperalgesia. ***Behav Brain Res*** 167 (2006) 205-211.

[33] Takahashi M, Deguchi Y, Kaneto H, Blockade of the development of analgesic tolerance to morphine by concurrent treatment with opioid- but not non-opioid-mediated stress in mice. ***Jpn J Pharmacol*** 46 (1988) 1-5.

[19] Nabeshima T, Yamada K, Kameyama T, Contribution of different opioid systems to footshock-induced analgesia and motor suppression. ***Eur J Pharmacol*** 92 (1983) 199-205.

[20] Nestler EJ, Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. ***Trends Pharmacol Sci*** 25 (2004) 210-218.

[21] Ni YG, Gold SJ, Iredale PA, Terwilliger RZ, Duman RS, Nestler EJ, Region-specific regulation of RGS4 (regulator of G-protein–signaling protein type 4) in brain by stress and glucocorticoids: In vivo and In vitro studies. ***J Neurosci*** 19 (1999) 3674–3680.

[22] Okano K, Kuraishi Y, Satoh M, Effects of intrathecally injected glutamate and substance P antagonists on repeated cold stress-induced hyperalgesia in rats. ***Biol Pharm Bull*** 18 (1995) 42-44.

[23] Okano K, Kuraishi Y, Satoh M, Effects of repeated cold stress on aversive responses produced by intrathecal excitatory amino acids in rats. ***Biol Pharm Bull*** 18 (1995) 1602-1604.

[24] Okano K, Ueda M, Kuraishi Y, Satoh M, Effect of repeated cold stress on capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices. ***Neurosci Res*** 29 (1997) 319-324.

[25] Pilcher CW, Browne JL, Effects of naloxone and Mr 1452 on stress-induced changes in nociception of different stimuli in rats. ***Life Sci*** 33 (1983) 697-700.

[26] Quintero L, Cuesta ML, Silva JA, Arcaya JL, Pinerua-Suhaibar L, Maixner M, Suarez-Roca H, Repeated swim stress increases pain-induced expression

Archive of SID

www.SID.ir

[34] Takahashi M, Kaneto H, Footshock- and psychological-stress prevent the development of tolerance to spinal but not supraspinal morphine. ***Jpn J Pharmacol*** 56 (1991) 121-126.

[35] Takahashi M, Senda T, Tokuyama S, Kaneto H, Further evidence for the implication of a kappa-opioid receptor mechanism in the production of psychological stress-induced analgesia. ***Jpn J Pharmacol*** 53 (1990) 487-494.

[36] Takenaka Y, Nakamura F, Usui H, Lipkowski AW, Toth G, Yoshikawa M, Anti-analgesic activity of enterostatin (VPDPR) is mediated by corticosterone. ***Peptides*** 24 (2003) 735-739.

[37] Torres ILS, Bonan CD, Crema L, Nunes ML, Battastini AMO, Freitas-Sarkis JJ, Dalmaz C, Ferreira MBC, Effect of drugs active at adenosine receptors upon chronic stress-induced hyperalgesia in rats. ***Eur J Pharmacol*** 481 (2003) 197-201.

[38] Torres ILS, Cucco SNS, Bassani M, Duarte MS, Silveira PP, Vasconcellos AP, Tabajara AS, Dantas G, Fontella FU, Dalmaz C, Ferreira MBC, Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats-effect of morphine administration. ***Neurosci Res*** 45 (2003) 277-283.

[39] Vidal C, Jacob J, Hyperalgesia induced by non-noxious stress in the rat. ***Neurosci Lett*** 32 (1982) 75-80.

[40] Weinstein IJ, Hough LB, Gogas KR, Cross-tolerance and cross-sensitization between morphine analgesia and naloxone-sensitive and cimetidine-sensitive stress-induced analgesia. ***J Pharmacol Exp Ther*** 44 (1988) 253-258.

[41] Williams JT, Christie MJ, Manzoni O, Cellular and Synaptic Adaptations Mediating Opioid Dependence. ***Physiol Rev*** 81 (2001) 299-344.

Archive of SID

www.SID.ir