

Alterations of noradrenalin and one of its metabolites in the Locus Coeruleus nucleus in formalin induced pain in anesthetized rat

Javad Sajedianfard^{1*}, Faramarz Azarang¹, Elahe Solimannejad²

1. Dept. Physiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. Dept. Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 10 Nov 2007

Revised: 11 Feb 2008

Accepted: 1 Mar 2008

Abstract

Introduction: Pain as a complex process in central nervous system (CNS) has been studied by many researchers. Pain is controlled by several CNS pathways, one of the most important of which, is the descending noradrenergic system. This system begins from locus coeruleus (LC) nucleus in pons and ends in the spinal cord. In this research, the effect of pain induced by formalin was studied.

Methods: Male Sprague-Dawley rats weighing 280-320 g were categorized into two groups of control (injection of 50 μ l normal saline) and test (injection of 50 μ l 2.5% formalin). Rats were anesthetized by pentobarbital sodium (50 mg/kg i.p.). Microdialysis probes were inserted 24 hrs before the test was done. Rats were anesthetized by urethane and formalin test for induction of chemical and tonic pain was performed on the hind paw of the animals. Micro dialysis samples were taken in 15 minutes intervals and noradrenaline (NA) and its metabolite, 3-methoxy 4-hydroxy phenylglycol (MHPG), were measured by HPLC-ECD.

Results: The NA and MHPG concentration in the first and second phases of formalin test did not change significantly in neither test nor control groups.

Conclusion: LC has no role in perception of pain induced by formalin test during anesthesia.

Keywords: Pain, Formalin test, locus coeruleus, Microdialysis, Noradrenaline.

* Corresponding Author Email: sajedian@shirazu.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

بررسی تغییرات غلظت نور آدرنالین و متابولیت آن در هسته لوکوس سروئوس در درد ایجاد شده بر اثر تزریق فرمالین در موش صحرایی بیهوش

چوادیان فرد^{۱*}، فرامرز آذرنگ^۱، الهه سلیمان نژاد^۲

۱. بخش فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز

۲. بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران

دریافت: آبان ۸۶ بازبینی: بهمن ۸۶ پذیرش: اسفند ۸۶

چکیده

مقدمه: درد به عنوان یکی از روندهای پیچیده در سیستم عصبی مرکزی همیشه مورد نظر محققین بوده است. در سیستم عصبی مرکزی مسیرهای متفاوتی برای کنترل درد وجود دارد. از مهم ترین این مراکز، سیستم کنترل درد نزولی نورآدرنژیکی و هسته لوکوس سروئوس (LC) می باشد که از پل دماغی شروع شده و به شاخ پشتی نخاع ختم می گردد. در این تحقیق اثر درد ایجاد شده توسط تزریق فرمالین در موش بیهوش در هسته LC مطالعه گردید.

روش ها: برای بررسی اثرات درد در هسته LC از موش صحرایی به وزن تقریبی ۲۸۰ تا ۳۲۰ گرم در ۲ گروه کنترل (تزریق ۱ ۵۰ سالین نرمال) و آزمایش (تزریق ۱ ۵۰ فرمالین ۲/۵٪) استفاده شد موش های صحرایی توسط پنتوباریتال سدیم (۵۰ mg/kg i.p.) بیهوش گردیدند. کاوند میکرودیالیز با زاویه ۱۵ درجه در هسته LC سمت چپ کاشته شده و ۲۴ ساعت پس از آن، میکرودیالیز انجام گرفت. قبل از شروع دیالیز ابتدا حیوانات توسط اورتان بیهوش شده و فرمالین ۲/۵٪ به عنوان عامل ایجاد کننده درد شیمیایی و تونیک زیر پوست پای عقب تزریق گردید. نمونه های میکرودیالیز در فواصل ۱۵ دقیقه ای جمع آوری شد. برای تعیین غلظت نورآدرنالین (NA) و متابولیت آن، ۳- متوکسی ۴- هیدروکسی فیل گلیکول (MHPG)، از دستگاه HPLC-ECD استفاده گردید.

یافته ها: غلظت NA و MHPG در هسته LC در طی فازهای اول و دوم آزمون فرمالین، تغییرات معنی داری نداشت.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که در حالت بیهوشی، هسته LC در دردهای شیمیایی و تونیک نقشی ایفاء نمی کند.

واژه های کلیدی: درد، آزمون فرمالین، هسته لوکوس سروئوس، میکرودیالیز، نورآدرنالین،

مقدمه

رفتاری اثر خود را در مناطق هدف خود در سیستم عصبی مرکزی اعمال می کند [۷]. با توجه به ورودی ها و خروجی های زیاد این هسته میتواند در اعمال از جمله، درد، استرس و سندرم ترک اعتیاد دخالت کند [۲۸]. این هسته به عنوان بخش اصلی در سیستم کنترل درد نزولی نورآدرنژیکی، نقش مهمی را در مهار درد در سطح نخاع ایفاء می نماید [۲۱ و ۲۴].

گیرنده های اصلی هسته LC، گیرنده های α_1 و α_2 آدرنژیک بوده و گیرنده α_2 نقش اصلی را در سیستم کنترل درد

هسته لوکوس سروئوس اصلی ترین منبع نورآدرنژیکی در سیستم عصبی مرکزی (گروه سلول های A6) به شمار می رود [۴]. این هسته دارای انشعابات زیادی در قسمت های مختلف مغز و نخاع بوده و بدین ترتیب در تحریکات مختلف حسی و

sajedian@shirazu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

مواد و روش‌ها

۵ عدد موش صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley با وزن ۲۸۰-۳۲۰g در هر گروه بکار برده شد. پیش نویس (پروتوکول) بکار رفته در این مطالعه در کمیته رعایت حقوق حیوانات دانشکده دامپزشکی شیراز به تصویب رسیده است.

پروب‌های بکار رفته در این مطالعه، پروب متحدالمرکز دیالیز فعال به طول ۱-۰/۷ mm و از جنس regenerated cellulose dialysis tubing با مشخصات: Speetra/pro hollow fiber: molecular weight cutoff: 6000 da, OD: 0.250mm بوده که در آزمایشگاه طبق روش مرجع ساخته شد [۲۲]. ریکاوری نسبی نورآدرنالین و متابولیت اصلی آن (MHPG)، قبل از کاشتن کاوند مشخص شد [۱۹]. در این روش ریکاوری ۲۵٪ بدست آمد.

پس از وزن کردن حیوان، بیهوشی توسط داروی پنتوباریتال سدیم به میزان ۵۰ mg/kg بصورت تزریق داخل صفاقی (i.p.) القاء گردید [۱۲]. پس از اطمینان از بیهوشی کامل، حیوان را در دستگاه استرئوتاکسی (Stoelting) قرار داده و پروب را با زاویه ۱۵° و با مختصات ۱۱/۵ mm - A/P از برگما و ۱/۳ mm L/m از خط میانی جمجمه و ۷/۹ mm - D/V از سطح خارجی جمجمه، در هسته LC سمت چپ کاشته شد.

۲۴ ساعت بعد از انجام عمل کاشت کاوند، حیوان توسط داروی بیهوشی اورتان (Sigma) با دوز ۱/۵g/kg بصورت داخل صفاقی بیهوش شد [۱۶ و ۱۵ و ۹]. بعد از اتصال پمپ تزریق خودکار (WPI, SP 210, Syringe pump) به کاوند کاشته شده روی سر حیوان، محلول ACSF با سرعت ۲ μl/min تزریق شد. مدت زمان جمع آوری نمونه‌های میکرودیالیز ۱۵ دقیقه انتخاب و سپس اقدام به جمع آوری نمونه‌ها شد.

ترکیب ACSF شامل: ۱ CaCl₂، ۳ KCl، ۴ NaCl، ۱۰ Glucose، ۱ NaOH، ۲۶ NaHCO₃، ۱/۲۵ NaH₂PO₄، ۲ MgSO₄، آب مقطر استریل و pH= ۷/۴ انتخاب شد. مقادیر فوق بر حسب میلی مولار می‌باشد [۲۲].

پس از جمع آوری ۲ نمونه اول در گروه آزمایش، ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵٪ [۵] و در گروه کنترل ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی زیر پوست کف پای عقب سمت راست حیوان

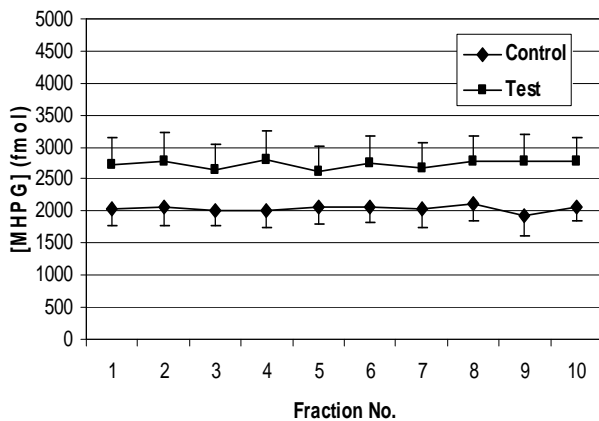
نزولی نورآدرنژیک ایفاء می‌کند [۱۸]. این گیرنده‌ها در موش صحرایی، در طول محور عقبی-جلویی این هسته توزیع شده‌اند. تراکم گیرنده‌های α₂ آدرنژیک اکثراً در اطراف جسم سلولی نرون‌های نورآدرنژیک و دندریته‌های این سلولها مشاهده می‌شود [۳]. گیرنده‌های دیگری نیز در این هسته وجود دارند که در اعمال دیگر نقش دارند [۶ و ۷].

نورآدرنالین، دوپامین و سروتونین واسطه‌های شیمیایی هسته LC بوده و نورآدرنالین در این میان مهم ترین واسطه شیمیایی می‌باشد [۲۸]. MHPG متابولیت اصلی نورآدرنالین است و به عنوان متابولیت خارج سلولی در هسته LC قابل اندازه‌گیری می‌باشد [۱۰].

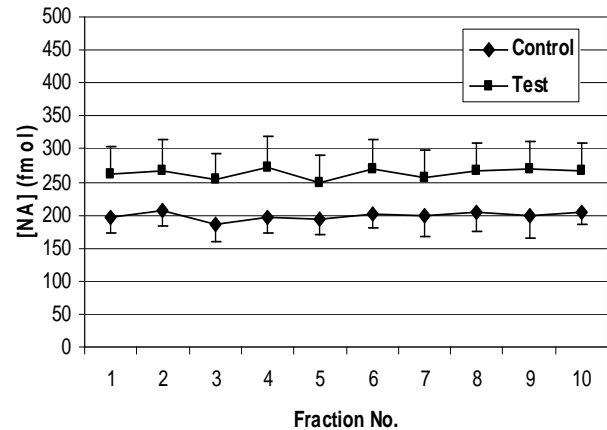
آزمون فرمالین یکی از روش‌های با ارزش برای ارزیابی و مطالعه دردهای پایدار و مزمن در حیوانات می‌باشد و بطور وسیع به کار می‌رود [۱۳]. درد ایجاد شده در اثر تزریق فرمالین در موش صحرایی دارای دو فاز بوده که هر کدام انعکاس پروسه‌های پاتولوژیکی مختلف می‌باشند [۵ و ۲۵]. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که هسته LC در درد حاد ناشی از آزمون فرمالین دخالت داشته و در صورت تخریب الکتریکی آن، افزایش پاسخ رفتاری درد در موش صحرایی دیده می‌شود [۲۴]. هم چنین گزارش شده است که در موش‌های صحرایی هوشیار در فاز دوم درد در آزمون فرمالین، غلظت NA و MHPG افزایش می‌یابد [۲۲]. بنابراین هسته LC ممکن است دارای نقش‌های مختلفی در رابطه با کنترل پاسخ‌های داده شده به آزمون فرمالین باشد [۲۲].

برای مطالعه بر میزان ترشح واسطه‌های شیمیایی و متابولیت‌های آنها در هسته LC در شرایط *in vivo* از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. در این میان، روش میکرودیالیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۲۸]. میکرودیالیز یک روش نمونه‌گیری بر پایه کاوند است که در طی دو دهه اخیر بطور گسترده‌ای رواج پیدا کرده است [۱۱]. HPLC-ECD بخاطر حساسیت بالا و آسانی کار با آن، یک روش ایده آل برای آنالیز نمونه‌های میکرودیالیز و اندازه‌گیری ترکیبات کمیاب مانند نروترانسمیترها می‌باشد [۲۹].

با توجه به اینکه بیهوشی عمومی هسته‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، این مطالعه بر آن است که چگونگی تاثیر بیهوشی را بر کارکرد هسته LC ارزیابی نماید.



شکل ۲- تغییرات غلظت MHPG بر حسب فمتومول در هر نمونه (۳۰ میکرولیتر و مدت زمان ۱۵ دقیقه) در گروه کنترل و گروه آزمایش (mean \pm SEM). اختلاف معنی‌داری بین دو گروه و در بین نمونه‌های هر گروه مشاهده نشد. نمونه‌های ۱-۲: قبل از تزریق نمونه ۳؛ زمان تزریق یا فاز اول آزمون فرمالین نمونه‌های ۱۰-۴: پس از تزریق و یا فاز دوم آزمون فرمالین



شکل ۱- تغییرات غلظت نورآدرنالین (NA) بر حسب فمتومول در هر نمونه (۳۰ میکرولیتر و مدت زمان ۱۵ دقیقه) در گروه کنترل و گروه آزمایش (فرمالین) (mean \pm SEM). اختلاف معنی‌داری بین دو گروه و در بین نمونه‌های هر گروه مشاهده نشد. نمونه‌های ۱-۲: قبل از تزریق نمونه ۳؛ زمان تزریق و یا فاز اول آزمون فرمالین نمونه‌های ۱۰-۴: پس از تزریق و یا فاز دوم آزمون فرمالین.

تزریق گردید.

به منظور اندازه‌گیری نورآدرنالین و MHPG در نمونه‌های میکرودیالیز جمع آوری شده، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (High pressure liquid chromatography = HPLC) با ردیاب الکتروشیمیایی (Electrochemical detector = ECD) با مشخصات زیر استفاده گردید.

پمپ (Waters 510-USA)، ستون کروماتوگرافی فاز معکوس (TRACER EXCEL, 120 ODSA, 5 μ M) همراه با نگهبان ستون، ردیاب الکتروشیمیایی (Pharmacia LKB, Type - 2143 RPE, USA). پتانسیلی اکسیداسیون سلول ECD در حدود 0.6 ± 0.5 mv و شدت جریان دستگاه در حدود 1 ± 0.1 nA بود.

فاز متحرک ترکیبی از: 30 mg EDTA، 8 g NaH_2PO_4 ، 360 mg 1-octane-sulfonic acid، 20% Methanol، آب مقطر با درجه HPLC و $\text{pH} = 3.5$. سرعت جریان فاز متحرک 1 ml/min تعیین گردید.

برای مقایسه غلظت منوآمینها در زمان‌های مختلف بین دو گروه کنترل و آزمایش از آزمون T غیر وابسته (Student-independent T test) (سطح معنی داری $p < 0.05$) و برای مقایسه زمانهای مختلف نمونه‌گیری در هر گروه از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه تکراری و برای بدست آوردن محل اختلاف از آزمون تکمیلی دانکن استفاده گردید.

یافته‌ها

در گروه کنترل، غلظت پایه نورآدرنالین در هسته LC، قبل از تزریق (mean+SEM) $201/77 \pm 45/81$ (fmol) ($n=5$) بود. در ۱۵ دقیقه پس از تزریق (معادل فاز اول درد فرمالین) به $186/63 \pm 35/67$ و سپس به $197/84 \pm 21/44$ (معادل فاز دوم درد فرمالین) رسید. این تغییرات از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۱).

در گروه آزمایش، غلظت پایه نورآدرنالین در هسته LC، قبل از تزریق (mean+SEM) $224/63 \pm 22/56$ (fmol) ($n=5$) بود. در ۱۵ دقیقه پس از تزریق (فاز اول درد فرمالین) به $254/54 \pm 38/46$ و سپس به $262/31 \pm 45/24$ (فاز دوم درد فرمالین) رسید. این تغییرات نیز از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۱). همچنین اختلاف معنی‌داری بین دو گروه کنترل و آزمایش مشاهده نشد.

در گروه کنترل غلظت پایه MHPG، قبل از تزریق (fmol) (mean+SEM) $2050/04 \pm 322/98$ ($n=5$) بود. در اولین نمونه پس از تزریق (فاز اول فرمالین) به $2001/54 \pm 334/2$ و سپس به $411/93 \pm 204/1$ (فاز دوم فرمالین) رسید. این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۲-۴). در گروه آزمایش، غلظت پایه MHPG قبل از تزریق (fmol) (mean+SEM) $2744/64 \pm 431/46$ ($n=5$)

تخریب هسته LC در موش صحرایی هوشیار افزایش رفتار درد حاصله از تزریق فرمالین را بدنبال داشته است [۲۴] و استرس ناشی از ورود سر سوزن تزریق سرم فیزیولوژی و درد ایجاد شده در فاز اول فرمالین، باعث افزایش کارکرد هسته LC و در نتیجه بالا رفتن ترشح NA در موش صحرایی هوشیار می شود [۲۲]. بنابراین بیهوشی عمومی می تواند دلیل عدم پاسخ هسته LC به استرس و درد ناشی از آزمون فرمالین در این مطالعه باشد.

هسته LC ورودی های زیادی از نقاط مختلف سیستم عصبی مرکزی دریافت می کند که مهم ترین آنها هسته پارازیگانتوسولولاریس (PGi) و هسته پرپوزیتوس هیپوگلوسی (PrH) می باشد. همچنین این هسته به مناطق زیادی در CNS عصب دهی دارد [۲۸ و ۲۹]، با توجه به ورودی ها و خروجی های متعدد هسته LC این هسته در اعمال فیزیولوژیک مختلفی شرکت دارد که مهم ترین آنها استرس، سندرم ترک اعتیاد و درد می باشد که پاسخ هسته LC به این اعمال در حالت هوشیاری به اثبات رسیده است [۲۸ و ۲۹].

داروهای بیهوشی باعث دپرسیون برگشت پذیر CNS شده و بسیاری از فعالیت های آن را در سطوح مختلف دچار تغییر و نقصان می کند. همچنین باعث کاهش و توقف فعالیت های الکتریکی موثر در عملکرد CNS می شود [۱].

مکانیسم عمل داروی بیهوشی اورتان بدرستی شناخته شده نیست، این دارو شاید با تاثیر بر ورودی های تحریکی (PGi) و مهار (PrH) هسته LC عملکرد طبیعی آن را دچار اختلال کند. از طرفی هسته LC خود نیز می تواند مستقیماً تحت تاثیر بیهوشی اورتان قرار گرفته و فعالیت های طبیعی آن دچار اختلال گردد.

در این مطالعه غلظت پایه MHPG، fmol/sample $323/98 \pm 2050/04$ بدست آمد که بالاتر از مقادیر بدست آمده در مطالعات قبلی بود (۶۸). پس از تزریق سرم فیزیولوژی در گروه کنترل و فرمالین در گروه آزمایش، از نظر آماری اختلاف معنی داری در روند تغییرات MHPG نسبت به غلظت پایه آن مشاهده نشد. این روند تغییرات در گروه کنترل و آزمایش نسبت به همدیگر مشابه بودند و اختلاف معنی داری وجود نداشت.

با توجه به اینکه MHPG متابولیت اصلی نورآدرنالین است (۳۷)، غلظت آن تحت تاثیر تغییرات غلظت NA می باشد

۱۵ دقیقه پس از تزریق به $385/01 \pm 2654/81$ و سپس به $2710/94 \pm 244/41$ (فاز دوم فرمالین) رسید. این تغییرات نیز از نظر آماری معنی دار نبوده و متناسب با تغییرات غلظت نورآدرنالین بود (شکل ۲).

بحث

در گروه کنترل غلظت پایه نورآدرنالین (fmol) $45/81 \pm 201/77$ بدست آمده است. محققان در مطالعات گذشته غلظت های پایه متفاوتی از NA در هسته LC گزارش کرده اند که در مقایسه با غلظت پایه بدست آمده در این مطالعه کمتر می باشند [۱۷ و ۲۲ و ۲۷].

این اختلاف را شاید بتوان بدلیل زیر دانست: تفاوت در روش کاشت، شکل، نوع و خصوصیات اجزاء کاوند میکرودیالیز. تفاوت در روش اندازه گیری مونوآمین ها از قبیل نوع دستگاه HPLC-ECD بکار رفته، اختلاف پتانسیل و شدت جریان دستگاه HPLC، استفاده از فاز متحرک با خصوصیات متفاوت و استفاده از استانداردهای متفاوت در اندازه گیری و مهم تر از همه انجام عمل میکرودیالیز در شرایط بیهوشی با داروی اورتان در این مطالعه که شاید علت اصلی بالاتر بودن غلظت پایه NA در این مطالعه نسبت به مطالعات گذشته باشد. تزریق داخل وریدی (i.v.) اورتان با دوز 800 mg/kg در موش صحرایی هوشیار، باعث بالا رفتن غلظت NA تا $9/4 \pm 152$ درصد مقدار پایه آن در هسته پاراوونتریکولار هیپوتالاموس (PVN) و همچنین افزایش معنی داری در غلظت NA پلاسمای خون محیطی می شود. در حالی که تزریق i.v. داروهای بیهوشی دیگر مانند پنتوباریتال سدیم و کلرلوز باعث کاهش غلظت NA در هسته PVN می شود [۲۶]. با توجه به ارتباط سیستم های نورآدرنرژیک هسته PVN با هسته LC [۲۶]، داروی اورتان می تواند باعث افزایش کارکرد هسته LC شود.

در این مطالعه مشخص گردید که پس از تزریق سرم فیزیولوژی در گروه کنترل و فرمالین در گروه آزمایش، هیچ گونه تغییرات معنی داری در غلظت NA نسبت به غلظت پایه آن در هسته LC مشاهده نشد. این امر نشان دهنده این حقیقت است که تحت بیهوشی با داروی اورتان، هسته LC پاسخی جهت کنترل درد ناشی از آزمون فرمالین نداده است.

161-174.

- [6] Fukui M, Takishita A, Zhang N, Nakagawa T, Minami M, Satoh M, Involvement of locus coeruleus noradrenergic neurons in supraspinal antinociception by alpha, beta-methylene-ATP in rats. *J Pharmacol Sci* 94 (2004) 153-160.
- [7] Gaalen MV, Kavahara H, Kavahara Y, Westerink BHC, The locus coeruleus noradrenergic system in the rat brain studied by dual-probe microdialysis. *Brain Res* 763 (1997) 56-62.
- [8] Heal DJ, Prow MR, Buckett WR, Measurement of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) in mouse brain by HPLC with electrochemical detection, as an index of noradrenaline utilization and presynaptic alpha-2 adrenoceptor function. *Br J Pharmacol* 96 (1989) 547-556.
- [9] Hedo G, Lopez-Garcia JA, Alpha1A adrenoceptors modulate potentiation of spinal nociceptive pathways in the rat spinal cord in vitro. *Neuropharmacology* 41 (2001) 862-869.
- [10] Javelle N, Renaud B, Lambas-Senas L, Monoamine metabolism in the locus coeruleus measured concurrently with behavior during opiate withdrawal: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. *J Neurochem* 68 (1997) 683-690.
- [11] Joukhdar C, Muller M, Microdialysis: current applications in clinical pharmacokinetic studies and its potential role in the future. *Clin Pharmacokinet* 44 (2005) 895-913.
- [12] Kang YM, Ouyang W, Chen JY, Qiao JT, Dafny N, Norepinephrine modulates single hypothalamic arcuate neurons via alpha(1) and beta adrenergic receptors. *Brain Res* 869 (2000) 146-157.
- [13] Kim SJ, Thomas KS, Calejesan AA, Zhuo M, Macromolecular synthesis contributes to nociceptive response to subcutaneous formalin injection in mice. *Neuropharmacology* 37 (1998) 1091-1093.
- [14] Kohno Y, Tanaka M, Nakagava R, Toshima N, Nagasaki N, Regional distribution and production rate of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulphate (MHPG-SO₄) in rat brain. *J Neurochem* 36 (1981) 286-289.
- [15] Lategan AJ, Marien MR, Colpaert FC, Effects of locus coeruleus lesions on the release of endogenous dopamine in the rat nucleus accumbence and caudate nucleus as

[۸و۱۴و۲۲و۲۳]. در این مطالعه غلظت NA تغییرات معنی‌داری نداشته است و انتظار می‌رود که در غلظت MHPG نیز تغییری مشاهده نگردد. با توجه به دلایل فوق، می‌توان بالا بودن غلظت پایه MHPG را در این مطالعه نسبت به مطالعات گذشته مانند NA توضیح داد.

در این تحقیق مشخص شد که هسته LC در حالت بیهوشی در کنترل درد فرمالین فعالیت ندارد. این پاسخ خلاف آن چیزی است که در حالت هوشیاری در هسته LC دیده شده است. احتمالاً داروی اورتان از طریق مکانیسم‌های اتونومیک و اندوکرینی باعث بالا رفتن سطح پایه غلظت NA و MHPG در هسته LC می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از شورای پژوهشی دانشگاه شیراز به خاطر تأمین اعتبار این طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- [1] Adams HR, editor. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 8th ed. Iowa State University, 2001, p. 149-273.
- [2] Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet Q, Ennis M, Van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhatter R, Akaoka H, Drolet G, Astier B, Chalety P, Valentin R, Williams J, Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res* 88 (1991) 47-75.
- [3] Chamba G, Weissmann D, Rousset C, Renaud B, Pujol JF, Distribution of alpha-1 and alpha-2 binding sites in the rat locus coeruleus. *Brain Res Bull* 26 (1991) 185-193.
- [4] Condes-Lara M, Different direct pathways of locus coeruleus to medial prefrontal cortex and entrolateral thalamic nucleus: electrical stimulation effects on the evoked responses to nociceptive peripheral stimulation. *Eur J Pain* 2 (1998) 15-23.
- [5] 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* 4 (1977)

- microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 512 (2005) 153-156.
- [23] Sedlock ML, Edwards DJ, Opposite effects of chronic imipramine treatment on brain and urine MHPG levels in the rat. *Biol Psychiatry* 20 (1985) 858-865.
- [24] Semnani S, Dashti M, The effect of locus coeruleus lesioning on tonic and phasic pain. *Med J IR Iran* 8 (1994) 31-34.
- [25] Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R, Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38 (1989) 347-352.
- [26] Shimokawa A, Jin QH, Ishizuka Y, Kunitake T, Takasaki M, Kannan H, Effect of anesthetics on norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus region of awaked rats. *Neurosci Lett* 244 (1998) 21-24.
- [27] Shouse MN, Staba RJ, Ko PY, Saqib SF, Farber P, Monoamines and seizures: microdialysis finding in locus coeruleus and amygdala before and during amygdala kindling. *Brain Res* 892 (2001) 176-192.
- [28] Singewald N, Philippu A, Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog Neurobiol* 56 (1998) 237-267.
- [29] Xu F, Gao M, Wang L, Jin L, Study on the effect of electromagnetic impulse on neurotransmitter metabolism in nerve cells by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection coupled with microdialysis. *Anal Biochem* 307 (2002) 33-39.
- determined by intracerebral microdialysis. *Brain Res* 523 (1990) 134-138.
- [16] Palamarchouk VS, Swiergiel AH, Dunn AJ, Hippocampal noradrenergic responses to CRF injected into the locus coeruleus of unanesthetized rats. *Brain Res* 950 (2002) 31-38.
- [17] Pudovkina OL, Kavahara Y, de Vries J, Westerink BH, The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dual-probe microdialysis. *Brain Res* 906 (2001) 38-45.
- [18] Pudovkina OL, Westerink BH, Functional role of alpha1-adrenoceptors in the locus coeruleus: A microdialysis study. *Brain Res* 1061 (2005) 50-56.
- [19] Robert F, Lamba S, Senas L, Ortemann C, Pujol JF, Renaud B, Microdialysis monitoring of 3,4-dihydroxy phenylalanine accumulation changes in tyrosine hydroxylase activity of rat locus coeruleus. *J Neurochem* 60 (1993) 721-729.
- [20] Rosenbloom AJ, Sipe DM, Weedn VW, Microdialysis of proteins: Performance of the CMA/20 probe. *J Neurosci Meth* 148 (2005) 147-153.
- [21] Sagen J, Proudfit HK, Effect of intrathecally administered noradrenergic antagonists on nociception in the rat. *Brain Res* 310 (1984) 295-301.
- [22] Sajedianfard J, Khatami SH, Semnani S, Naghdi N, Jourjani M, In vivo measurement of noradrenaline in the locus coeruleus of rats during the formalin test: A