Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱٤ (٤)، ۳۵۸ – ۳۷۱
زمستان ۱۳۸۹

اثرات وابسته به غلظت مرفین، آسپیرین، کپسایسین و عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز در مدل درد حرارتی و شیمیایی در مگس سرکه (*DROSOPHILA MELANOGASTER*)

ملیحه اسکندری، مسعود فریدونی*، علی مقیمی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

دریافت: ۱۷ خرداد ۸۹ پذیرش: ۱۵ آبان ۸۹

چکیده

مقدمه: مطالعات درد در حیوانات آزمایشگاهی با نگرانی های اخلاقی روبروست، بنابراین انجام تحقیقات درد در بی مهرگان به ویژه حشرات مورد استقبال محققان قرار گرفته است. در این تحقیق مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) به عنوان مدل درد جایگزین مهره داران بکار گرفته شد و اثرات درد و بی دردی کپسایسین، عصاره فلفل قرمز، مرفین و آسپیرین بررسی شد.

روش‌ها: لارو سن ۳ و مگس بالغ تیپ وحشی استفاده شد. آستانه و شدت پاسخ به درد حرارتی (روش Hot plate) در دماهای مختلف و درد شیمیایی (روش Writhing) درغلظت های مختلف اسید استیک، کپسایسین و عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز سنجش و پاسخ پیچ وتابی لارو در گروه های مجزا (n=7) ثبت شد. پاسخ مگس بالغ نیز به روش Hot plate در دماهای مختلف ارزیابی و مدت زمان استقرار مگس روی صفحه داغ ثبت شد (n=10). همچنین اثر غلظت های مختلف مرفین و آسپیرین روی درد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: افزایش دما، غلظت اسید، کپسایسین و عصاره فلفل قرمز باعث افزایش حرکات پیچ وتابی لارو می شود. در مگس بالغ افزایش دما باعث کاهش زمان تحمل حرارتی روی صفحه داغ می شود. در مدل های ذکر شده، افزایش غلظت مرفین و آسپیرین، اثر ضددردی معنی داری نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بر طبق نتایج، پیشنهاد می شود که مگس سرکه می تواند به عنوان مدلی برای ارزیابی درد و داروهای ضد دردی بکار رود. احتمالا کانال Painless مگس (مشابه کانال TRPA1 پستانداران) در انتقال درد حرارتی و شیمیایی نقش دارد و مرفین اثر خود را از طریق پروتئین G_i و آسپیرین از طریق مهار COX2 مگس اعمال می کند.

واژه‌های کلیدی: مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*)، درد، کاپسایسین، مرفین، آسپیرین

مقدمه

درد عامل هشداردهنده ای است که در صورت احتمال و یا وجود خطر خود را به صورت یک احساس ناخوشایند حاد یا مزمن نشان می دهد و از شایع ترین مشکلاتی است که انسان همواره با آن دست به گریبان بوده و سال هاست تلاش می کند تا برای رهایی از آن چاره ای پیدا کند. با وجودی که سابقه تشخیص و درمان درد به چندین هزار سال قبل می رسد اما هنوز هم یکی از مشکلات درمانی در انسان است. درباره مکانیسم های موثر در مسیرهای درد، واسطه های شیمیایی، ارتباطات نورونی، گیرنده های مرتبط با مدارهای تعدیل کننده و

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: fereidoni@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل درد هنوز اطلاعات آنچنان جامعی در دست نیست که بتوان آنرا بخوبی تحت کنترل درآورد و لذا به تحقیقات بیشتری نیازمنداست. آزمایشات درد با استفاده از موارد انسانی چالش برانگیز (به طور اجتناب ناپذیری) غیرعینی و دارای محدودیتهای اخلاقی است، بنابراین از مدل های آزمایشگاهی حیوانی برای بررسی درد استفاده می شود، با این حال مطالعات درد بر روی مدل های حیوانی چالش ها و محدودیت های اخلاقی و کاربردی خود را دارند [۱۵،۴]. از آنجایی که هیچ گونه بحث اخلاقی جدی در مورد تجارب *in vivo* در حشرات صورت نگرفته است و با توجه به شباهت های سلولی و مولکولی بین مگس سرکه (*Drosophila melanogaster*) و پستانداران، کوتاه بودن سیکل زندگی مگس، احتیاجات غذایی ساده این جانور و این که در هر نسل فرزندان زیادی بوجود می آورند، احتمال دارد که مدل جانوری مگس سرکه برای غربال گری و استفاده از بی درد کننده های بالقوه مفروض در کشف فیزیوپاتولوژی درد و فارماکولوژی داروهای جدید بسیار مفید باشد [۲،۱۴].

لارو مگس سرکه در پاسخ به دمای بالای ۳۸°C پاسخ پیچ وتابی از خود نشان می دهد. به وسیله غربال گری ژنتیکی در مگس سرکه مشخص شده که مگس سرکه مولکولی مرتبط با گیرنده های وانیلوئیدی بنام painless را کد می کند. ژن painless در نورون های محیطی تیپ II با دندریت های گسترده در زیر اپیدرم و در گروهی از نورون های چشایی مانند بریستل های حسی در قطعات دهانی (Labial palpus) و Tarsus پاها و بال جلوئی در مگس سرکه بیان می شود (محصول این ژن، مشابه گیرنده های وانیلوئیدی VR1 در پستانداران است که به وسیله کپسایسین تحریک شده و در سلول های عصبی واجد فیبرهای C پستانداران بیان می شود) [۲۱]. در مگس جهش یافته در ژن Painless، پاسخ کاهش یافته ای در دمای بین ۴۲ °C-۴۸ دیده می شود. در حالی که دمای بالاتر از ۵۲ °C در این موتان، پاسخی شبیه پاسخ مشاهده شده در تیپ وحشی دیده می شود [۲۸]. مگس سرکه بالغ در مقابل محرک آسیب رسان مانند دما و مواد آسیب رسان شیمیایی پاسخ پرشی از خود نشان می دهد، به نظر می رسد که مدت اقامت یا تحمل حیوان بالغ در مقابل محرک آسیب رسان یا زمان پاسخ با افزایش دما کاهش یابد [۱۲]. تزریق داروهای ضددردی (آگونیست گیرنده $GABA_B$)، به شکم مگس سرکه در پاسخ جانور به محرک های آسیب رسان گرمایی موثربوده است، به نحوی که زمان پاسخ به گرما را کاهش می دهد [۱۴] لذا شاید مگس سرکه بتواند مدل مناسبی در بررسی اثر داروهای ضددردی باشد. در تحقیق پیش رو مگس سرکه در حالت لاروی و بالغ به منظورارزیابی در تحقیقات درد بعنوان یک جایگزین مناسب به جای مهره داران و مدل سازی درد و بی دردی بکار گرفته شد و بعلاوه بر روی اثرات غلظت های مختلف مرفین، آسپیرین، کپسایسین و عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز بر درد حرارتی و شیمیایی به منظور بررسی تفاوت یا شباهت های احتمالی با اثرات شناخته قبلی آن ها در این مدل حیوانی تحقیق شد.

مواد و روشها

برای انجام آزمایش ها از لارو سن ۳ و مگس های بالغ سرکه تیپ وحشی و موتان vestigial استفاده شد. احتیاجات غذایی مگس سرکه ساده است و در آزمایشگاه مگس سرکه در ظروف شیشه ای نگهداری می شود. مواد لازم برای تهیه محیط کشت مگس شامل گلوکز ۳۴g، آرد سفید g ۱۷، آگار ۸/۵g، مخمر ۸/۵g، اسیدآسکوربیک ۳g، اسیدپروپیونیک ۳cc و ۳۳۰cc آب است. آب، آرد سفید، مخمر و گلوکز نقش تامین مواد غذایی را دارد. آگار برای جامد شدن محیط کشت لازم است. اگر محیط کشت شل باشد روی مگس سرکه برمی گردد و باعث مرگ مگس می شود. اسیدآسکوربیک (ویتامین C) برای تخم گذاری و برای طی مرحله لاروی به شفیرگی لازم است. همچنین اسید آسکوربیک و اسیدپروپیونیک یک محیط اسیدی را فراهم کرده و نقش قارچ کش و میکروب کش دارند [۲۰].

ابتدا محیط کشت تهیه شده سپس درظروف شیشه ای استریل قرار داده می شود، پس از آن مگس ها روی محیط کشت رها شده و درب گذاری می شوند. چرخه زندگی مگس سرکه در دمای ۲۵-۲۷ C^o انکوباتور، ۱۰ روز بوده، دماهای بالاتر یا کمتر باعث مرگ مگس و یا عقیم شدن مگس می شود. بعد از ۶ روز، لارو سن ۳ و در پایان ۱۰ روز، مگس بالغ به منظور آزمایش قابل استفاده است.

مدل سازی در ارزیابی درد حرارتی، روش Hot plate برای

www.SID.ir

Archive of SID

لارو مگس سرکه: روش Hot plate یکی از روش های استاندارد برای بررسی درد و بی دردی در جوندگان می باشد. در این آزمون که برای تحقیق بر روی درد در لارو مگس سرکه معادل سازی شده است، گروه های مجزای لارو (N≥7) برای هر یک از دماهای ۳۵ °C تا ۴۷ °C مورد آزمون قرار گرفتند، حرکات پیچ و تابی لارو معلق در ۳cc محلول سرم فیزیولوژی داخل پتری شیشه ای مستقر بر Hot plate در مدت ۳ دقیقه شمارش شد (این زمان بر اساس غربال گری های انجام شده بکارگرفته شد) و تقسیم بر ۳ شد تا تعداد حرکات در یک دقیقه به دست آید.

مدل سازی برای درد شیمیایی، روش Writhing برای لارو مگس سرکه: استفاده از روش Writhing در جوندگان با تزریق اسیداستیک بصورت داخل صفاقی و اندازه گیری حرکات پیچ و تابی ناشی از تحریک گیرنده های درد در حفره صفاقی بصورت استانداد مرسوم است [۹]، همین آزمون برای تحقیق بر روی درد در لارو مگس سرکه معادل سازی شده است. در این آزمون، گروه های مجزای لارو (N≥7) درهر یک از غلظت های مختلف اسیداستیک (از صفر تا ۱۰۰٪ با فاصله گام های ۱۰٪) مورد آزمون قرار گرفتند. تعداد حرکات پیچ و تابی لارو درمدت ۵ دقیقه (این زمان بر اساس غربال گری های انجام شده بدست آمد)، در محلول اسیداستیک با غلظت مورد نظر شمارش شد و تقسیم بر ۵ شد تا تعداد حرکات دریک دقیقه به دست آید. در گروه کنترل، لاروها در محلول ۳cc سرم فیزیولوژی (اسید صفر درصد) قرار داده شده و سپس مقایسه بین گروه کنترل و گروههای ذکر شده صورت گرفت.

اثر پردرد کننده کپسایسین و عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز بر لارو مگس سرکه: عصاره هیدروالکلی فلفلی به روش ۲۴ ساعت خیساندن در اتانول ۵۰٪ و سپس تغلیظ عصاره صاف شده و سنجش مقدار ماده خشک عصاره تهیه شد [۱۷]. در این آزمون، گروه های مجزای لارو مگس (N≥7) در هر یک از غلظت های مختلف کپسایسین و محلول فلفل قرمز (۱۰،۲۰،۴۰،۸۰g/lit) مورد آزمون قرار گرفتند. تعداد حرکات لارو در ۵ دقیقه اول شمارش شد و تقسیم بر ۵ شد تا تعداد حرکات در یک دقیقه به دست آید. نتایج با گروه کنترل (۳cc محلول سرم فیزیولوژی) مقایسه شد.

مدل سازی در ارزیابی درد حرارتی (روش Hot plate) برای مگس بالغ: ۱- بررسی پاسخ مگس سرکه بالغ با بال چسبیده به درد حرارتی: برای پیش گیری از فرار، می بایست قدرت پرواز مگس بالغ مهار شود، به این منظور تعدادی مگس را با اتر بیهوش کرده، سپس با استفاده از چسب قطره ای دو بال مگس از پشت به هم چسبانده شد. ۲۴ ساعت بعد از به هوش آمدن، در گروه های مجزا (N≥10) برای هر یک از دماهای مختلف ۳۹ °C تا ۴۷ °C مدت زمان استقرار مگس روی Hot plate (مدت اقامت مگس قبل از فرار یا پرش) مورد بررسی قرار گرفت.

۲- بررسی پاسخ مگس سرکه بالغ بدون بال به درد حرارتی: ابتدا مگس ها بیهوش شده و سپس با استفاده از پنس دو بال از تنه جدا شد. گروه های مجزا (N≥10) در هر یک از دماهای مختلف ۳۹ °C تا ۴۷ °C مورد آزمون قرار گرفته و مدت زمان استقرار روی صفحه ثبت شد.

۳- بررسی پاسخ مگس سرکه بالغ موتان vestigial به درد حرارتی: این موتان مگس به طور ژنتیکی به دلیل شکل بال پیچیده ای که دارد فاقد قدرت پرواز است. در این آزمون گروه های مجزا (N≥10) برای هر یک از دماهای مختلف ۳۹ °C تا ۴۷ °C و به روش Hot plate مورد آزمون قرار گرفتند.

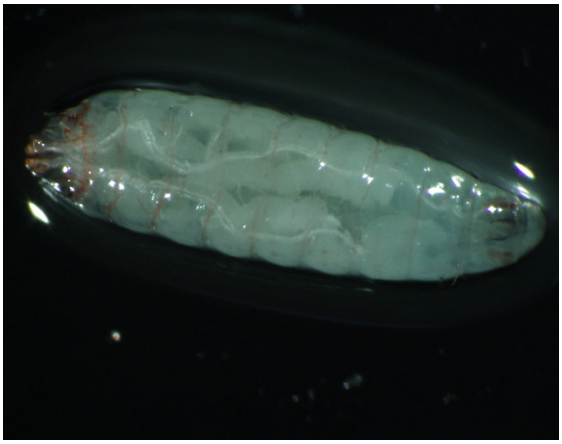
برای آن که نشان داده شود که داروهای مورد استفاده می تواند وارد لوله گوارش شوند، لاروها در محلول دارویی که حاوی رنگ فوشین بود، به مدت نیم ساعت قرار داده شدند، سپس دستگاه گوارش از بدن بیرون کشیده و در میدان دید استرئومیکروسکوپ تصویربرداری شد و رنگین شدن لوله گوارش تاییدی بر قابلیت ورود داروهای محلول به سیستم گوارشی از طریق مذکور می باشد.

۱- مرفین: لاروها (N≥7) نیم ساعت در محلول مرفین با غلظت های مختلف (mg/lit ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰) قرار داده شدند و با استفاده از هر دو مدل درد حرارتی (دمای ۴۷°C) و درد شیمیایی (اسیداستیک ۴۰٪) و غلظت g/lit ۸۰ عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز که بیشترین احساس درد را پدید می آورند، اثر غلظت های یاد شده مرفین بر احساس درد سنجش شد.

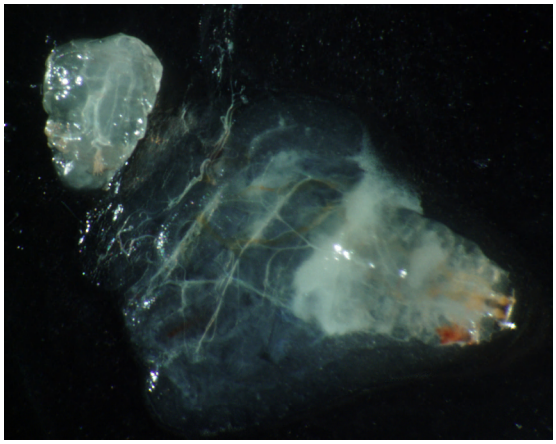
۲- آسپیرین: لاروها (N≥7) نیم ساعت در محلول غلظتهای مختلف آسپیرین (۵g/lit، ۲/۵ ، ۱/۲، ۰/۶، ۰/۳) قرار داده شدند و با استفاده از هر دو مدل ذکر شده مدل درد حرارتی (دمای

www.SID.ir

Archive of SID



لارو قبل از قرار دادن در محلول رنگی



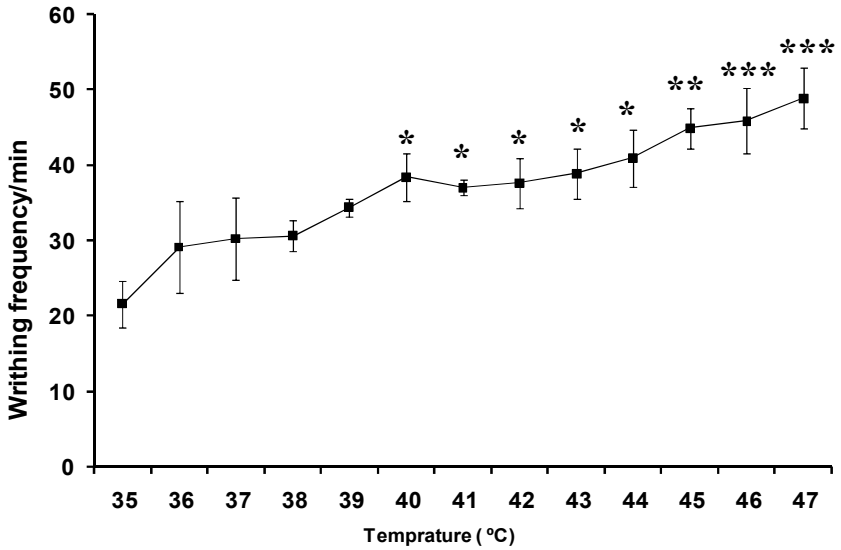
لارو بعد از قرار دادن در محلول رنگی

۴۷°C) و درد شیمیایی (اسیداستیک ۴۰٪) و غلظت ۸۰g/lit عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز که بیشترین احساس درد را پدید می آورند، اثر غلظت های مذکور آسپیرین بر احساس درد سنجش شد.

نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده اند. تجزیه و تحلیل های آماری با نرم افزار (Instat Graphpad) صورت گرفت. تفاوت بین گروه ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way Anova) و میانگین داده ها با آزمون Student- Newman- keuls، با حداقل معناداری ($p<0.05$) مقایسه شدند. نمودارها نیز با نرم افزار آماری Exel رسم شدند.

یافته ها

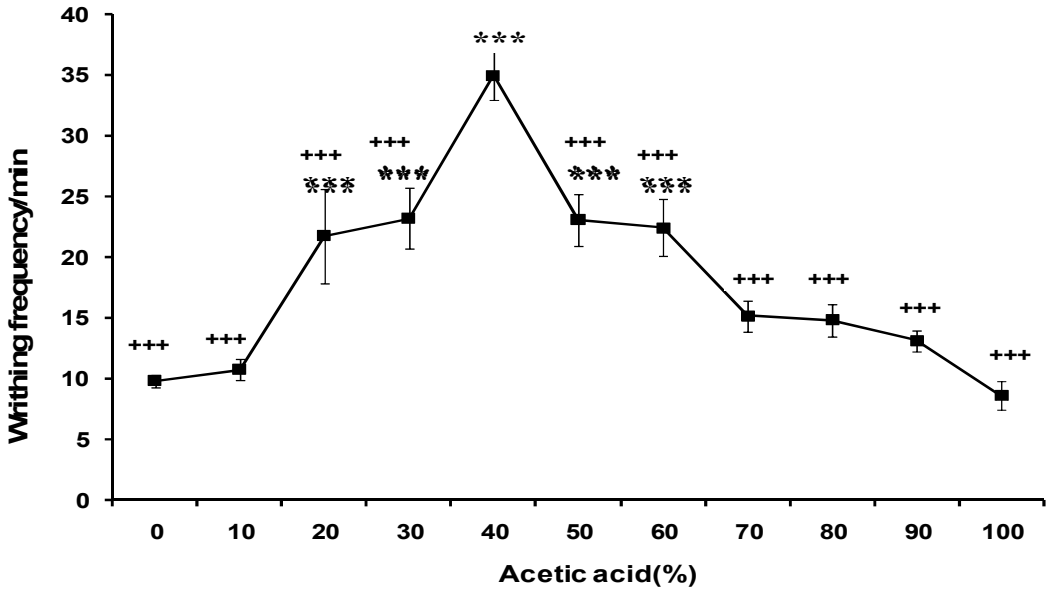
اثر دماهای مختلف از ۳۵ °C تا ۴۷ °C بر حرکات پیچ و تابی (مدل درد حرارتی) در لارو مگس: افزایش دما از ۳۵ °C تا ۴۷ °C باعث افزایش حرکات پیچ وتابی لارو مگس سرکه می شود. آستانه تغییر معنی دار در پاسخ در ۴۰ °C ($p< 0.05$) بوده و بیشترین پاسخ در ۴۷ °C می باشد ($p< 0/01$) (شکل ۱). اثر غلظت های مختلف اسیداستیک گلاسیال بر حرکات پیچ وتابی لارو (آزمون Writhing): افزایش غلظت اسید از ۲۰ ٪ تا ۴۰ ٪ باعث افزایش معنی دار تعداد حرکات لارو می شود.



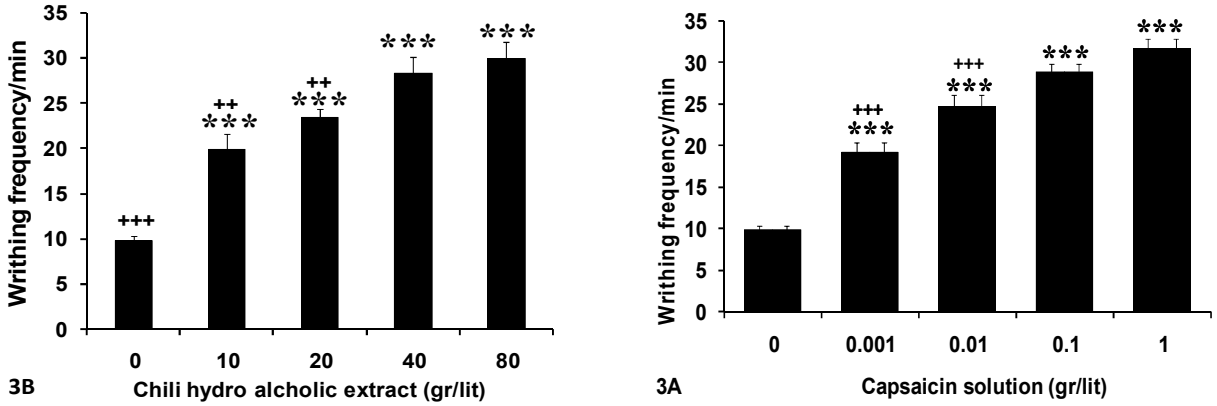
شکل ۱- اثر دماهای مختلف بر حرکات پیچ وتابی لارو مگس سرکه. افزایش دما باعث افزایش تعداد حرکات پیچ و تابی لارو می شود. آستانه دما برای افزایش معنی داری در حرکات پیچ وتابی ۴۰ °C می باشد و افزایش دما باعث افزایش معنی داری در پاسخ به محرک دمایی شده است. ($p<0.001$*** و $p<0.01$ ** و $p<0.05$ * در مقایسه با پاسخ جانور در دمای ۳۵°C به عنوان کنترل)، نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است (n=7).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثرغلظت های مختلف اسید استیک بر حرکات پیچ وتابی لارو مگس سرکه. افزایش غلظت اسید باعث افزایش معنی دار تعداد حرکات لارو می شود. آستانه غلظت اسید برای این افزایش ۲۰٪ می باشد و افزایش غلظت تا ۴۰٪ باعث افزایش معنی دار پاسخ به محرک دمایی شده است. اما افزایش غلظت از محدوده ۴۰٪ تا ۱۰۰٪ منجر به کاهش پاسخ ها شده است. ($p<0.001$*** در مقایسه با پاسخ جانور در گروه کنترل (اسید صفر درصد) و$p<0.001$$^{+++}$ (مقایسه با گروه اسید ۴۰٪)، نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است (n=7).



شکل۳- اثرغلظت های مختلف محلول کپسایسین (شکل ۳A) و عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز (شکل۳B) بر حرکات پیچ وتابی لارو مگس سرکه. افزایش غلظت هر دو مورد باعث افزایش تعداد حرکات پیچ و تابی لارومی شود ($p<0.001$ *** در مقایسه با پاسخ جانور در گروه کنترل (غلظت کپسایسین و عصاره صفر g/lit). ($p<0.001$ $^{+++}$ و $p<0.01$$^{++}$در مقایسه با گروه کپسایسین g/lit ۱ و $p<0.001$$^{+++}$و$p<0.01$ $^{++}$ در مقایسه با گروه عصاره فلفل g/lit ۸۰). نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است. (n=7).

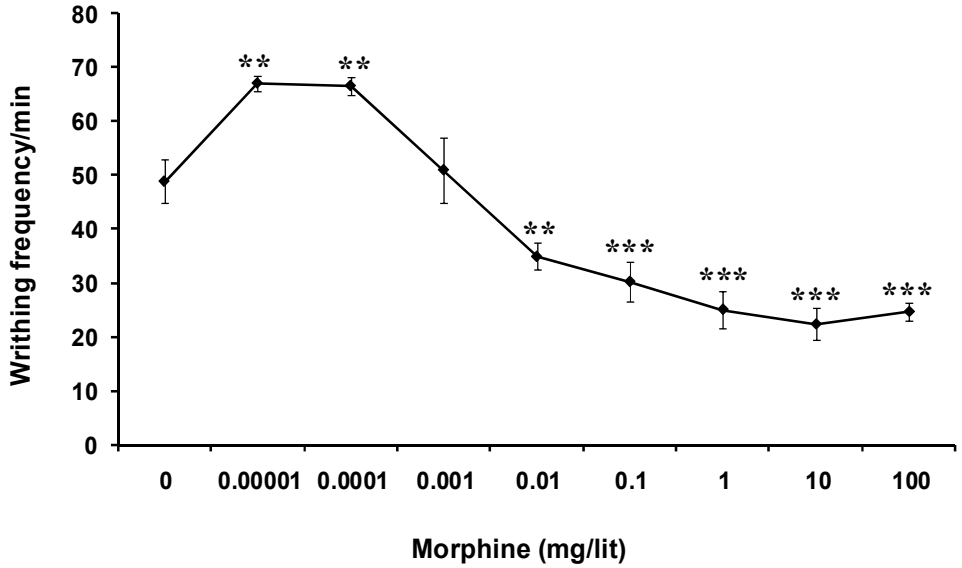
آستانه غلظت برای افزایش معنی دار حرکات لارو غلظت ۲۰٪ ($P<0.001$) و ماکزیمم پاسخ در غلظت ۴۰٪ اسید بوده است ($P<0.001$) و غلظت های بیشتر از ۴۰ ٪ کاهش معناداری در تعداد حرکات لارو را نشان داد ($P<0.01$) (شکل ۲).

اثر غلظت های مختلف محلول کپسایسین و عصاره فلفل قرمز برحرکات پیچ و تابی لارو مگس سرکه: افزایش غلظت محلول کپسایسین باعث افزایش تعداد حرکات پیچ و تابی لارو می شود. غلظت های g/lit ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ کپسایسین باعث افزایش معناداری در تعداد حرکات لارو مگس سرکه شده اند ($p<0.001$). بیشترین پاسخ در غلظت های g/lit ۰/۱، ۱ می باشد (شکل۳A).

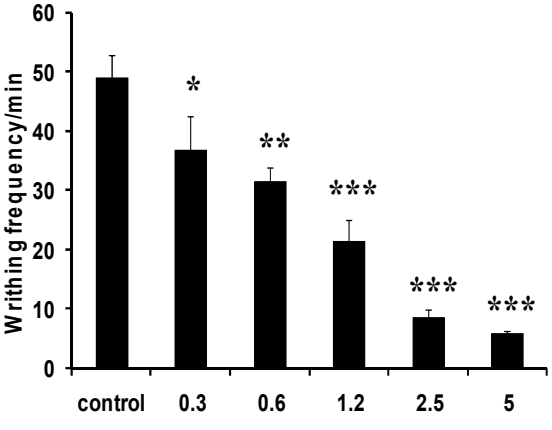
غلظت های g/lit ۱۰،۲۰،۴۰،۸۰ عصاره هیدرو الکلی فلفل قرمز باعث افزایش معناداری در تعداد حرکات لارو مگس سرکه شده اند. بیشترین پاسخ در غلظت های g/lit ۸۰ و ۴۰ می باشد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- اثر غلظت های مختلف مرفین بر حرکات پیچ و تابی لارو مگس سرکه در دمای ۴۷ °C در مدل درد حرارتی. غلظت هـای mg/lit ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ مـرفین کاهش معنی داری را درتعداد حرکات لارو نشان دادند(p<0.001***) و غلظت های mg/lit ۰/۰۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ باعث افزایش حرکات پـیچ وتـابی در لارو مگـس سـرکه و بروز پردردی شده است.(p<0.01 **). (p<0.001 *** و 0.01 >p** وp<0.05* در مقایسه با پاسخ جانور درگروه کنترل بدون حضور مرفین (دمـای ۴۷ °C)، نتـایج بـه صورت Mean ± SEM ارائه شده است (n=7).



شکل ٥- اثر غلظت های مختلف آسپیرین بر حرکات پیچ و تابی لارو مگس سرکه. دردمای ۴۷C° و در مدل درد حرارتی غلظت های مختلف آسپیرین باعث کاهش معنی داری در تعداد حرکات لارو شده اند که موید اثر ضددردی آسپیرین است. (p<0.001***وp<0.01**وp<0.05 *در مقایسه با پاسخ جانور درگروه کنترل (۴۷°C)، نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است. (n=7).

(شکل۳B).

اثر ضددردی غلظت های مختلف مرفین درمدل آزمـون درد حرارتی در لارومگس سرکه: نتایج نشان داد که مرفین از غلظت های g/lit ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ باعث کـاهش معنـاداری در تعـداد حرکات لارو در دمای ۴۷ ºC شده است (P<0.001) کـه موید اثر بی درد کننده مـرفین و افـزایش آسـتانه درد در لارو مگـس است. مرفین حتی با غلظت mg/lit ۰/۰۱ (P<0.01) نیز باعـث کـاهش حرکـات لارو شـده اسـت. کـاهش غلظـت مـرفین (mg/lit۰/۰۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱) باعث افزایش حرکات پیچ وتـابی در لارو مگس سرکه و بروز پردردی شده است (P<0.01). نتایج با گروه کنترل بدون حضور مرفین (۴۷ ºC) مقایسه شـده اسـت (شکل ۴). اثر ضددردی غلظت هـای مختلـف آسـپیرین درمـدل آزمون درد حرارتی در لارو مگس سرکه: آسپیرین با غلظت های g/lit۱/۲، ۲/۵، ۵ (P<0.001)، g/lit۰/۶ (P<0.01) و g/lit۰/۳ (p<0.05) باعـث کـاهش معنـاداری در تعـداد حرکـات لارو در دمای۴۷ ºC شده است کـه نشـانگر اثـر ضـددردی آسـپیرین و افزایش آستانه درد در لارو مگس است (شکل ۵).

اثر ضددردی غلظت های مختلف مرفین درمدل درد شیمیایی، آزمون Writhing با اسید استیک ۴۰٪، در لارو مگس سرکه: مرفین از غلظت های mg/lit ۱۰،۱۰۰(P<0.001) و mg/lit۱ و ۰/۱ (P<0.01) باعث کاهش معناداری در تعداد حرکات لارو در اسید ۴۰٪ شده است که موید اثر بی درد کننده مرفین و افزایش آستانه درد شیمیایی ناشی از اسید در لارو مگس است. غلظت های کمتر مرفین تغییر معناداری در تعداد

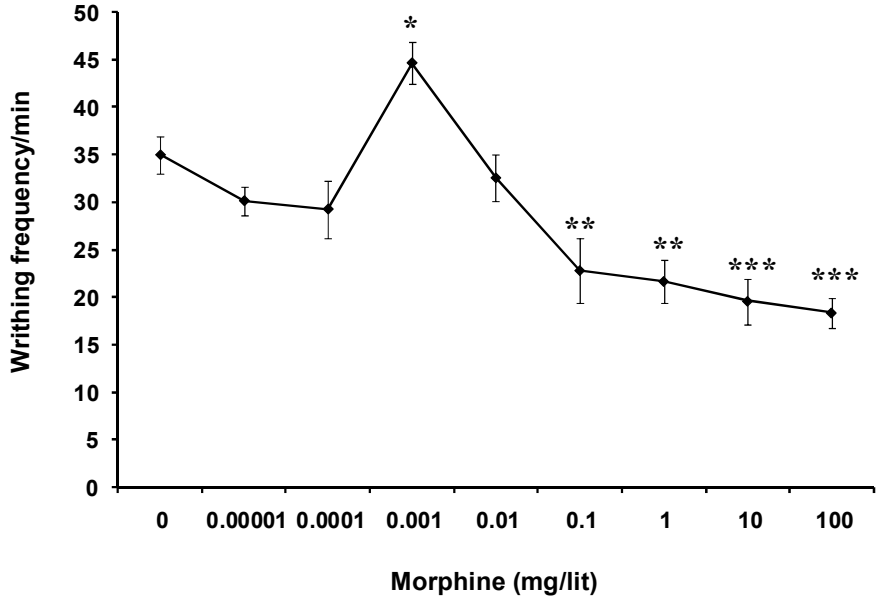
www.SID.ir

Archive of SID

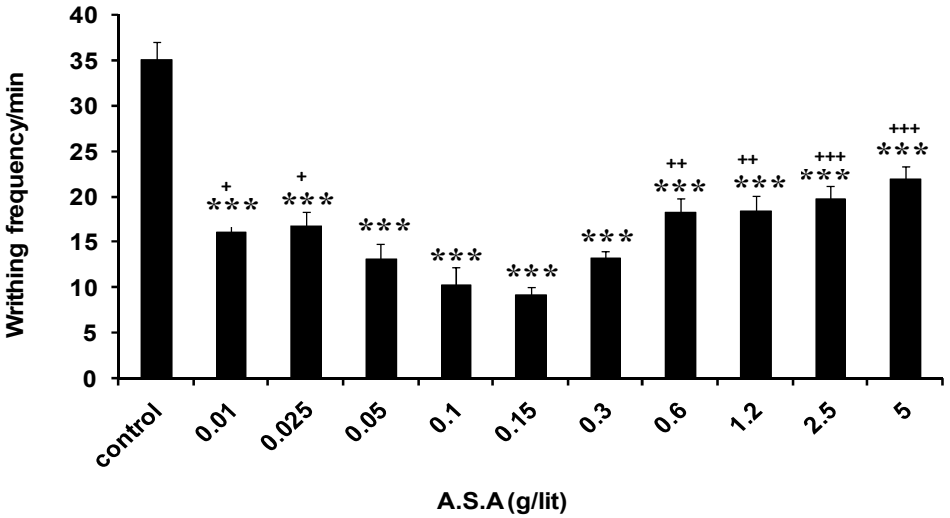
حرکات لارو نشان ندادند. غلظت mg/lit ۰/۰۰۱ مرفین باعث افزایش تعداد حرکات لارو و بروز پردردی در اسید ۴۰٪ شده است. (شکل ۶).

اثر ضددردی غلظت های مختلف آسپیرین در مدل درد شیمیایی، آزمون Writhing با اسید استیک ۴۰٪ در لارو مگس سرکه: آسپیرین ازغلظت های g/lit ۰/۰۱تا ۵ کاهش معنی داری را در تعداد حرکات لارو دراسید استیک ۴۰٪ در مقایسه با گروه کنترل باعث شدند که بیانگر اثر ضددردی آسپیرین در اسید استیک ۴۰٪ می باشد. (P<۰/۰۰۱).

موثرترین غلظت های آسپیرین در محدوده g/lit ۰/۰۵ تا



شکل۶- اثر غلظت های مختلف مرفین بر حرکات پیچ و تابی لارو مگس سرکه در اسید استیک ۴۰٪ ، در مدل درد شیمیایی. غلظت های mg/lit ۰/۰۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ مرفین باعث کاهش معنی داری در تعداد حرکات لارو شده اند که موید اثر ضددردی مرفین در درد شیمیایی ناشی از اسید در لارو مگس سرکه است. (p<0.001*** و p<0.01** و p<0.05 * در مقایسه با پاسخ جانور در گروه کنترل (اسیداستیک ۴۰٪)، نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است (n=7).



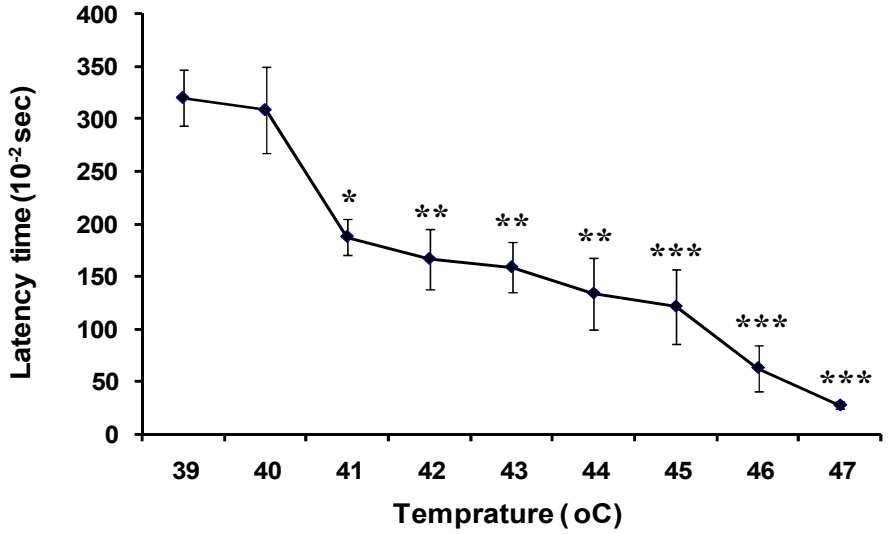
شکل۷- اثر غلظت های مختلف آسپیرین بر حرکات پیچ و تابی لارو مگس سرکه در اسید استیک ۴۰٪ در مدل درد شیمیایی، غلظت های آسپیرین (ASA) از gr/lit ۰/۰۱ تا gr/lit ۵ کاهش معنی داری را درتعداد حرکات لارو دراسید استیک ۴۰٪ در مقایسه با گروه کنترل باعث شدند. (p<0.001***و p<0.01**و p<0.05* در مقایسه با پاسخ جانور در گروه کنترل (اسیداستیک ۴۰٪) و p<0.001+++,p<0.01++ و p<0.05+ مقایسه با پاسخ جانور درگروه gr/lit ۰/۱۵ (موثرترین غلظت آسپیرین)، نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است. (n=7).

www.SID.ir

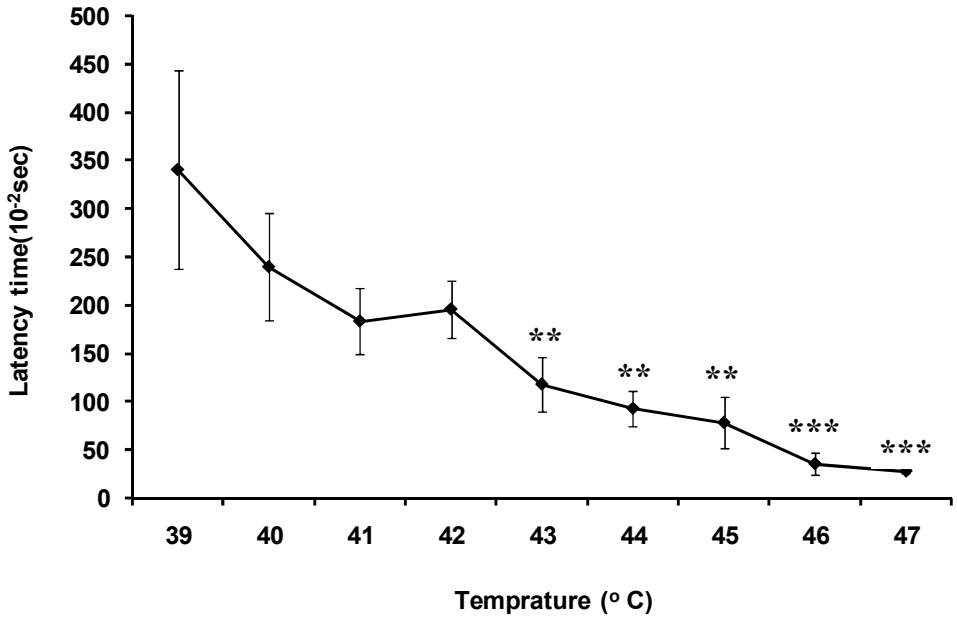
Archive of SID

۰/۳ قرار داشت و غلظت دو سوی این محدوده اثرات ضددردی کمتری در اسیداستیک ۴۰٪ بروز دادند (شکل ۷).

نتایج مدل درد حرارتی برای مگس سرکه بالغ: پاسخ مگس سرکه بالغ با بال چسبیده به حرارت: افزایش دما از ۳۹ °C تا ۴۷ °C باعث کاهش زمان پاسخ مگس سرکه به حرارت می شود. آستانه پاسخ در دمای ۴۱ °C بوده ($p<0.05$) و بیشترین پاسخ در ۴۷ °C می باشد ($p<0.001$) (شکل ۸). پاسخ مگس سرکه بالغ با بال های جدا شده، به درد حرارتی: افزایش



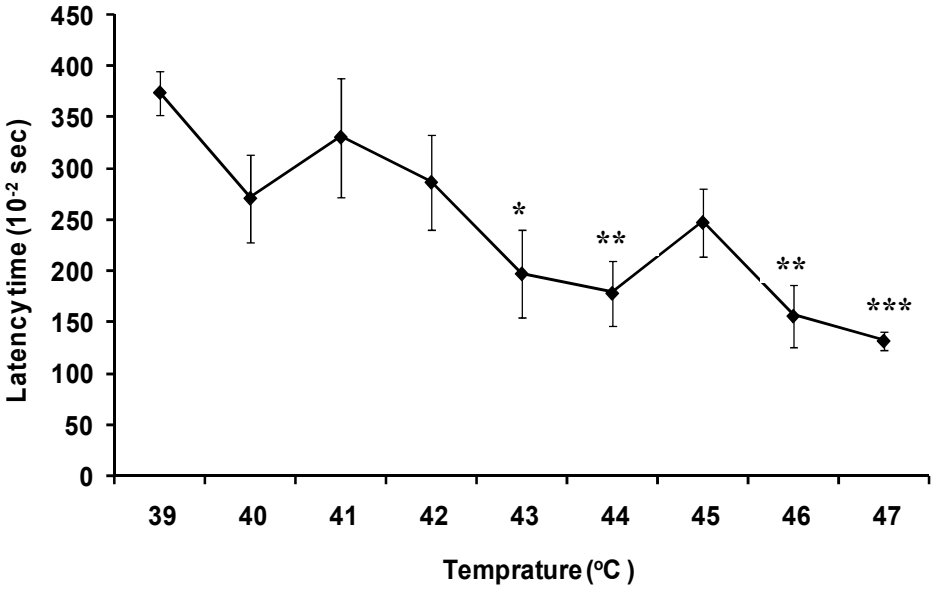
شکل ۸- اثر دماهای مختلف در ایجاد درد در مگس سرکه بالغ با بال چسبیده. افزایش دما از ۳۹ °C تا ۴۷ °C باعث کاهش زمان پاسخ مگس سرکه به حرارت (مدت زمان استقرار روی صفحه Hotplate تا هنگام فرار یا پرش) می شود. آستانه پاسخ در دمای ۴۱ °C بوده، بیشترین پاسخ در ۴۷ °C می باشد.
($p<0.001$ ***و$p<0.01$ **و$p<0.05$ * در مقایسه با پاسخ جانور در دمای۳۹ °C. نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است (n=10).



شکل ۹- اثر دماهای مختلف در ایجاد درد در مگس سرکه بالغ بدون بال. افزایش دما ا ز ۳۹ °C تا ۴۷ °C باعث کاهش زمان پاسخ مگس بالغ به حرارت می شود. آستانه پاسخ در دمای ۴۳ °C بوده ، بیشترین پاسخ در ۴۷ °C می باشد ($p<0.001$*** و $p<0.01$** و$p<0.05$* در مقایسه با پاسخ جانور در دمای ۳۹ °C نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۰- اثر دماهای مختلف در ایجاد درد در مگس سرکه بالغ موتان Vestigial به درد حرارتی. افزایش دما از ۳۹ºC تا ۴۷ °C باعث کاهش زمان پاسخ مگس بالغ به حرارت (مدت زمان استقرار روی Hot plate) می شود. آستانه پاسخ در دمای ºC ۴۳ بوده (p<0.05*)، بیشترین پاسخ در ºC ۴۷ می باشد. (p<0.001 ***و p<0.01 ** و p<0.05 * در مقایسه با پاسخ جانور در دمای ºC ۳۹ نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه شده است (n=10).

دما از ۳۹ºC تا ºC ۴۷ باعث کاهش زمان پاسخ مگس سرکه با بال های جدا شده به حرارت می شود. آستانه پاسخ در دمای ºC ۴۳ بوده (p<0.05) و بیشترین پاسخ در ºC ۴۷ می باشد (p<0.001) (شکل ۹).

پاسخ مگس سرکه جهش یافته Vestigial به درد حرارتی: افزایش دما از ºC ۳۹ تا ºC ۴۷ باعث کاهش زمان پاسخ مگس سرکه Vestigial به حرارت می شود. آستانه پاسخ در دمای ºC ۴۳ بوده (p<0.05) و بیشترین پاسخ در ºC ۴۷ می باشد (P<0.001) (شکل ۱۰).

بحث

استفاده از مدل های آزمایشگاهی برای بررسی درد در سال های اخیر افزایش چشم گیری یافته است [۱۵]. در این مطالعه از مگس سرکه به عنوان مدل در مطالعات درد استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که لاروها به افزایش دما واکنش نشان داده و رفتارهای مربوط به بروز درد افزایش می یابد (شکل ۱). نورون های تیپ II (dentritic arborization) در اپیدرم مگس سرکه مشابه گیرنده های C پستانداران، در انتقال درد حرارتی و شیمیایی در مگس نقش دارند [۲۴]. گروهی از کانال های خانواده TRP در مگس درد را میانجی گری می کنند. مگس سرکه ۴ نوع کانال TRPAرا داراست که هر کدام آستانه دمایی خاص خود را دارند و در دمای خاصی فعال می شوند [۱۲]. کانال Painless از خانواده کانال های TRPA در مگس و در نورون های تیپ II و گروهی از نورون های چشایی مگس سرکه بیان می شود [۲۱]. این کانال مشابه کانال TRPA1 پستانداران بوده و در پاسخ به دمای آسیب رسان (دمای بالاتر از ºC ۴۰) فعال می شود [۲۵] و اثرات دردزایی حرارتی مشاهده شده در این تحقیق را قابل توجیه می کند. کانال Painless مشابه گیرنده های وانیلوئیدی (VR) پستانداران، به محرک های مختلفی از جمله محرک های دمایی، یون های H^+ و میانجی های التهابی پاسخ می دهد و به عنوان مولکول هماهنگ کننده محرک های دردناک شیمیایی و فیزیکی از جمله گرمای آسیب زننده و PH های پایین عمل می کنند [۲۵]. در پژوهش حاضر افزایش غلظت اسیداستیک گلاسیال باعث بروز حرکات پیچ وتابی در لارو مگس می شود (شکل ۲). این واکنش به وسیله فعال شدن کانال Painless و انتقال درد از طریق نورون های تیپ II موجود در اپیدرم به مراکز عصبی قابل توجیه است. افزایش غلظت اسید از۱۰٪ تا ۴۰٪ افزایش و از ۴۰٪ تا ۱۰۰٪ کاهش را در تعداد حرکات نشان داد که می تواند به علت اثرات

www.SID.ir

Archive of SID

سمی اسید در تغییر ماهیت پروتئین ها و لذا کاهش فعالیت آنزیم ها باشد (شکل ۲). مگس سرکه در برابر مواد شیمیایی مختلف واکنش های متفاوتی از خود نشان می دهد. پروتوسربروم در مغز مگس سرکه مرکز مربوط به اجتناب از مواد شیمیایی زیان آور و رفلکس های Proboscic می باشد. همانند گیرنده های وانیلوئیدی پستانداران، گیرنده ای بنام painless در مگس سرکه در نورون های بیان کننده Gr66a وجود دارد و تحریک آن باعث می شود مگس از محلول حاوی کپسایسین اجتناب کند [۵]. در لارومگس سرکه نیز یک سری نورون های حسی بیان کننده painless در سیستم گوارشی جانورعلاوه برپاسخ به درد، در پاسخ به یک سری محرک های شیمیایی مانند کپسایسین نقش دارند. جهش یافته painless برخلاف تیپ وحشی از کپسایسین اجتناب نمی کند و حتی به سمت آن کشیده می شود [۱، ۱۷، ۲۷]. در پژوهش حاضر افزایش غلظت کپسایسین از ۰/۰۰۱ g/lit تا ۱ منجر به افزایش پاسخ به محرک شیمیایی دردناک شد (شکل۳A). افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز باعث افزایش احساس درد می شود. از آن جایی که کپسایسین (ماده تند فلفل قرمز) باعث تحریک نورون های حسی و بروز درد سوزشی می شوند [۸] بنابراین احتمالا این رفتار در هر دو مورد کپسایسین خالص و عصاره هیدروالکلی فلفل قرمز می تواند به وسیله فعال شدن گیرنده های Painless در نورون های تیپ II در اپیدرم لارو مگس و همچنین به علت تحریک همین نوع گیرنده در سیستم گوارشی لارو مگس وانتقال پیام به پروتوسربروم و ایجاد رفلکس های اجتنابی باشد [۱]. آستانه غلظت در بروز پاسخ های درد برای کپسایسین خالص ۱۰ هزار مرتبه کم تر از عصاره فلفل است (شکل ۳). بنابراین صرف نظر از تفاوت محتوایی کپسایسین در عصاره، انگیزه جستجو برای امکان وجود بی درد کننده بالقوه در عصاره فلفل پس از جداسازی کپسایسین ازآن فراهم می شود. اخیرا توجه خاصی به مواد فنلی موجود در گیاهان که خاصیت مهاری، ضد التهابی و ضد سرطان دارند، شده است. به عنوان مثال کپسایسین دارای اثر ضدالتهابی است که از طریق اثر بر آنزیم فسفولیپاز A2 (یک آنزیم کلیدی در فرآیندهای التهابی) [۲۳] و مهار COX2 می تواند اثرات ضدالتهابی خود را اعمال کند، بنابراین اثر ضدالتهابی هم می توان برای فلفل در نظر گرفت، همانطور که از این ماده در درمان دردهای آرتریتی در انسان استفاده می شود [۱۰]. در بکار گیری مگس بالغ بهوش در مدل درد حرارتی برای جلوگیری از فرار، قدرت پرواز با جدا کردن بالها، با چسباندن بال ها و بکار گیری جهش یافته Vestigial (نقص در ژن طرح بال روی کروموزوم شماره ۲ منجر به کوتاه شدن بال ها در مقایسه با تیپ وحشی شده است [۲]) از جانور سلب شد، افزایش دما از ۳۹ ^{o}C تا ۴۷ ^{o}C احساس درد را افزایش می دهد، بیشترین احساس درد در ۴۷ ^{o}C می باشد (شکلهای ۸، ۹ و ۱۰). بنابراین استفاده از مگس بالغ در تجربیات مربوط به درد امکان پذیر می باشد. به نظر می رسید جداکردن بال به منظور اجتناب از فرار جانور منجر به افزایش حساسیت به محرک درد شود اما تفاوت معناداری درمقابل محرک حرارتی درد در مقایسه با گروه طبیعی با بال چسبیده وجود نداشت. معلوم شده که بین دما و اندازه بال در مگس سرکه ارتباط وجود دارد که از طریق تاثیر روی تغییر در سرعت رشد و افزایش تقسیم سلولی اعمال می شود [۷]. لذا احتمال این که بین ژن های کروموزوم شماره ۲ در محدوده ژن Vestigial و احساس درد حرارتی، رابطه ای وجود داشته باشد قابل بررسی بیشتر است.

در هر دو مدل درد حرارتی و شیمیایی (درد ایجاد شده به وسیله اسید)، افزایش غلظت مرفین، اثرات ضددردی معنی داری را باعث شدند (شکل های ۴،۶). در توجیه باید گفت عمدتا اثرات اپیوئید ها بر اعمال سلول های عصبی شامل کاهش تحریک پذیری غشا و در نتیجه کاهش شلیک نورونی و مهار نوروترنسمیترها می باشد. بیشترین نقش مطالعه شده اپیوئیدها کنترل درد است. گیرنده μ در پستانداران اصلی ترین جایگاه عمل مرفین است و مسئول اثر ضددردی آن هستند. گیرنده های اپیوئیدی کوپل شونده با پروتئین های G به سیستم های افکتور متعددی نظیر فعالیت آدنیلات سیکلاز، تجزیه فسفواینوزیتید و نیز کانال های Ca^{+2} و K^{+} که مستقیما به پروتئین های G مرتبطند جفت می شوند. خصوصیت اصلی رسپتورهای μ، توانایی آن ها در فعال سازی برخی از اعضا پروتئین های Go و Gi است. این پروتئین ها اعمال متعددی در انواع سلول ها انجام می دهند که شامل اثر بر کانال های Ca^{+} K^{+} است [۱۳].

Drostar1 و Drostar2 دو گیرنده اپیوئیدی کوپل شونده با پروتئین های G در مغز مگس سرکه بالغ می باشد و گروهی از

www.SID.ir

Archive of SID

گیرنده های اپیوئیدی μ نیز در سلول های Schneider 2 مگس بیان می شوند که مشابه گیرنده های μ انسان است [۱۱]. همچنین مشاهده شده که G پروتئین ها به مقدار زیاد در سلول های Sf9 و Schneider2 مگس به مقدار زیاد بیان می شوند [۱۹].

کانال painless (گیرنده وانیلوئیدی مگس) یک سنسور مستقیم دمایی است و فعالیت آن وابسته به Ca^{+2} است. Ca^{+2} در حساس سازی کانال به دما و کاهش آستانه فعالیت موثر است. ناحیه N ترمینال کانال Painless در فعالیت دمایی وابسته به Ca^{+2} کانال درگیر می شود [۲۲]. بنابراین احتمالا مرفین با مهار کانال های کلسیمی موجود در نورون های حسی در مگس و کاهش Ca^{+2} باعث کاهش آستانه فعالیت، غیرفعال شدن کانال Painless و بروز اثر ضددردی می شود. از طرفی فعال شدن گیرنده های اپیوئیدی نفوذپذیری غشا را به K^{+} بالا برده و هیپرپولاریزاسیون ایجاد می کند. اگرچه شواهد معتبری برای تنظیم نفوذپذیری K^{+} توسط گیرنده های اپیوئیدی در مگس در دست نیست ولی شواهد قابل ملاحظه ای برهم کنش بین گیرنده های اپیوئیدی و کانال های پتاسیمی از طریق پروتئین های G را نشان می دهند. از طرفی فعال سازی پروتئین های G به وسیله گیرنده های اپیوئیدی باعث افزایش نفوذپذیری کانال های پتاسیمی، کاهش نفوذپذیری کانال های Ca+2 و اثرات ضددردی می شود [۱۱].

در پستانداران، مرفین در دوزهای بسیار ناچیز احتمالا از طریق فعال کردن $G_{\alpha s}$، پروتئین کیناز C و کانال های کلسیمی نوع L پردردی را باعث می شود [۶]. در مگس سرکه هم غلظت های ناچیز مرفین باعث بروز پردردی شد (شکل ۴،۶). اطلاعات کافی در مورد مکانیسم پردردی ناشی از غلظت های ناچیز مرفین در مگس وجود ندارد، اما، از آنجایی که رسپتورهای اپیوئیدی μ در سلولهای Schneider2 مگس مشابه گیرنده های μ انسان است وبا توجه به شباهت مکانیسم عمل اپیوئید ها در مگس و پستانداران، به نظر می رسد پردردی ناشی از مرفین، نتیجه ای از فعال کردن Gαs، کانال های کلسیمی و از طریق مکانیسمی مشابه پستانداران رخ دهد که نیازمند مطالعه بیشتر است.

گیرنده های درد مسئول آغاز التهاب نیز هستند، تحریکات زیان آور می تواند از طریق اثر بر فیبرهای عصبی و آزادسازی ماده P (SP) و CGRP باعث ایجاد درد شوند. مواد مزبور نه تنها از همان پایانه ای که تحریک می شود بلکه از سایر پایانه های همان نویسیسپتور رها می شوند. در مگس سرکه SP مشابه پستانداران وجود دارد و به عنوان یک نوروهورمون عمل کرده و از پایانه های عصبی به گردش خون آزاد می شود و همچنین به عنوان یک نوروترنسمیتر/مدولاتور در مغز و به وسیله اینترنورون ها آزاد می شود. در مغز مگس ۱۰ نورون آزادکننده SP تشخیص داده شده است. دوتا از آن ها از رابط های دوطرفه و پروتوسربرال شکمی و پشتی گسترش یافتند. جسم سلولی دو تای دیگر آن ها در گانگلیون زیرمری مشخص شده است. در گانگلیون سینه ای –شکمی ۱۰ نورون آزادکننده SP وجود دارد. جسم سلولی ۸ تا از این نورون ها در گانگلیون سینه ای و دو تا دیگر در گانگلیون شکمی واقع است [۱۶]. مولکول بسیار مشابه CGRP پستانداران در مگس سرکه به نام DH_{31} وجود دارد که از لحاظ توالی و عملکردی بسیار مشابه CGRP پستانداران بوده و میتواند در ایجاد درد و التهاب در مگس نقش داشته باشد [۲۳]. یکی از فعالترین عوامل تولید کننده درد پپتید برادی کینین است که احتمالا از طریق فعال کردن هر دو نوع آوران های درد C و Aδ و سنتز و رها سازی پروستاگلاندین ها از سلول های مجاور ناحیه آسیب دیده، موجب تشدید التهاب می شود. از آنجایی که این التهاب به وسیله فعالیت عصبی ایجاد می شود به آن التهاب نوروژنیک می گویند. گیرنده برادی کینین B2 در سلول های Sf21 حشرات به مقدار زیاد بیان می شود و مشابه گیرنده برادی کینین B2 انسانی است و می تواند یکی از عوامل ایجاد کننده التهاب و درد در مگس باشد [۱۸].

لذا واکنش های التهابی مشابه پستانداران در مگس رخ می دهد و بنابراین در مگس محرک های حرارتی و شیمیایی نیز می توانند از طریق ایجاد التهاب و آزادسازی SP، CGRP و برادی کینین از پایانه های عصبی، باعث بروز درد شوند، لذا این شباهتها، تعمیم یافته های حاصل از بررسی داروهای موثر بر درد و مکانیسم های فیزیولوژیکی درد را در مگس سرکه به پستانداران وحتی انسان، کاربردی تر می سازد.

درد التهابی شامل حساس سازی گیرنده های درد است که در همه دردهای التهابی ایجاد می شود. عوامل هیپرآلژزیک که گیرنده های درد را حساس می کنند شامل محصولات

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدآراشیدونیک مانند پروستاگلاندین و سیکلواکسیژناز است. آسپیرین و سایر NSAIDs از حساس سازی گیرنده های درد جلوگیری می کنند. آسپیرین به طور غیر قابل برگشت مسیر سیکلواکسیژناز را مهار می کند. به طریق مشابه آنزیم سیکلواکسیژناز در سطوح بالایی در حشرات یافت می شود [۳]. این آنزیم در سلول های Schneider2 مگس سرکه به مقدار فراوان یافت شده است. پروستاگلاندین در حشرات در فرآیندهای بیولوژیکی مانند درد، التهاب و فعالیت های تولید مثلی نقش دارد.

آنزیم سیکلواکسیژناز در مگس سرکه در مقایسه با آنزیم سیکلواکسیژناز در پستانداران از لحاظ توالی اسیدآمینه ای ۳۸ ٪ مشابه و ۲۴٪ دقیقا یکسان است. همانند پستانداران آنزیم سیکلواکسیژناز مگس سرکه به غشا باند می شود (۱۸ آمینواسید کدکننده یک سیگنال پپتید) و گلیکوزیله می باشد [۲۶]. همانطور که نتایج این مطالعه نشان می دهد در مدل درد حرارتی، مدل درد شیمیایی و درد ایجاد شده به وسیله عصاره فلفل قرمز، غلظت های مختلف آسپیرین دارای اثرات ضددردی مناسبی هستند (شکل های ۵،۷). آسپیرین و سایر NSAIDs از حساس سازی گیرنده های درد جلوگیری می کنند. با توجه به این شواهد، به نظر می رسد مهار واکنش های التهابی توسط آسپرین با مکانیسمی مشابه پستانداران و از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز۲ (COX2) مگس رخ می دهد. با توجه به اثر آسپیرین در درد القا شده به وسیله حرارت، اسید، به نظر می رسد اثرات ضددردی آسپیرین شامل بخشی اثرات مرکزی و مهار مکانیسم های تحریکی در CNS و بخشی اثرات محیطی و مهار واکنش های التهابی باشد. در مقایسه با مدل درد حرارتی، در مدل درد شیمیایی (اسید استیک) غلظت های پایین تر آسپیرین اثر ضددردی بروز دادند و نتیجتا شاید بتوان گفت اثرات محیطی آسپیرین قوی تر از اثرات مرکزی آن است.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است.

References

[1] Al-Anzi B, Tracey WD, Benzer S, Response of *Drosophila* to wasabi is mediated by *painless*, the fly homolog of mammalian TRPA1/ANKTM1. ***Curr Biol*** 16 (2006) 1034–1040.

[2] Coulthard AB, Nolan N, Bell JB, Hilliker AJ, Transvection at the vestigial locus of *Drosophila melanogaster*. ***Genetics*** 170 (2005) 1711–1721.

[3] Cromlish WA, Payette P, Culp SA, Ouellet M, Percival MD, Kennedy BP, High-level expression of active human cyclooxygenase-2 in insect cell. ***Arch Biochem Biophys*** 314 (2002) 193-199.

[4] David J, Allan IB, Molecular mechanisms of nociception. ***Nature*** 413 (2001) 203-210.

[5] Ebbs ML, Amrein H, Taste and pheromone perception in the fruit fly Drosophila melanogaster. ***Pflugers Arch*** 454 (2007) 735-747.

[6] Esmaeili-Mahani S. Low-dose morphine induces hyperalgesia through activation of G (alphas), protein kinase C, and l-type Ca+2 channels in rats. ***Journal Neurosci Research*** 86 (2008) 471-479.

[7] Harnly MH, The temprature effective period and the growth curves for length and area of the vestigial wings of Drosophila melanogaster. ***Genetic*** 21 (1935) 84-103.

[8] Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U, Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenase: Endogenous capsaicin substances. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 97 (2000) 6155–6160.

[9] Jegede IA, Nwinyi FC, Muazzam I, Akumka DD, Njan AA, Shok M, Micromorphological, anti-nociceptive and antiinflammatory investigations of stem bark of Daniellia oliveri. ***Afr J Biotechnol*** 5 (2006) 930-935.

[10] Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T, Yu R, Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting IkB-a degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. ***Cell Signal*** 15 (2003) 299-306.

[11] Kreienkamp HJ, Larusson HJ, Witte I, Roeder T, Birgul N, Honck HH, Harder S, Ellinghausen G, Buck F, Richter D, Functional annotation of two orphan G-

www.SID.ir

Archive of SID

protein-coupled receptors, Drostar1 and -2, Drosophila melanogaster and their ligands by reverse pharmacology. ***J Biol Chem*** 277 (2002) 39937-39943.

[12] Lee Y, Lee Y, Lee J, Bang S, Hyun S, Kang J, Hong ST, Bae E, Kaang BK, Kim J, Pyrexia is a new thermal transient receptor potential channel endowing tolerance to high temperatures in *Drosophila melanogaster*. ***Nat Genet*** 37 (2005) 305-310.

[13] Lutfy K, Hossain SM, Khaliq I, Maidment NT, Orphanin FQ/nociceptin attenuates the development of morphine tolerance in rats. ***Br J Pharmacol*** 134 (2001) 529-534.

[14] Manev H, Dimitrijevic N, Drosophila model for in vivo pharmacological analgesia research. ***Eur J Pharmacol*** 491 (2004) 207-208.

[15] Mogil JS, Animal models of pain: progress and challenges. ***Nat Rev Neurosci*** 10 (2009) 283-294.

[16] Nässel DR, Lundquist T, Höög A, Grimelius L, Substance P-like immunoreactive neurons in the nervous system of Drosophila. ***Brain Res*** 507 (1990) 225-233

[17] Ogbonnia S, Adekunle AA, Bosa MK, Enwuru VN, Evaluation of acute and subacute toxicity of Alstonia congensis Engler (Apocynaceae) bark and Xylopia aethiopica (Dunal) A. Rich (Annonaceae) fruits mixtures used in the treatment of diabetes. ***Afr J Biotechnol*** 7 (2008) 701-705.

[18] Reyes-Cruz G, Vázquez-Prado J, Müller-Esterl W, Vaca L, Regulation of the human bradykinin B2 receptor expressed in sf21 insect cells: A possible role for tyrosine kinases. ***J Cell Biochem*** 76 (2000) 658-673.

[19] Saidak Z, Blake-Palmer K, Hay DL, Northup JK, Glass M, Differential activation of G-proteins by mu-opioid receptor agonists. ***Br J Pharmacol*** 147 (2006).671–680.

[20] Sang JH, The quantitative nutritional reqirements of Drosophila melanogaster. ***J Exp Biol*** 33 (1956) 45-72.

[21] Scott K. Taste recognition: food for thought. ***Neuron*** 48 (2005) 455–464.

[22] Sokabe T, Tsujiuchi S, Kadowaki T, Tominaga M, Drosophila painless is a Ca 2+-requiring channel activated by noxious heat. ***J Neurosci*** 28 (2008) 9929 – 9938.

[23] Surh A, Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. ***Mutat Res*** 428 (1999) 305-327.

[24] Tobin DM, Bargmann CI, Invertebrate nociception: behaviors, neurons and molecules. ***J Neurobiol*** 61(2004) 161-174.

[25] Tominaga M, Molecular mechanisms of trigeminal nociception and sensation of pungency. ***Chem Senses*** 1 (2005) 191-192.

[26] Tootle TL, Spradling AC. Drosophila Pxt: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation. ***Development*** 135 (2008) 839-847.

[27] Tracey WD Jr, Wilson RI, Laurent G, Benzer S, Painless, a Drosophila gene essential for nociception. ***Cell*** 113 (2003) 261–273.

[28] Xu SY, Cang CL, Liu XF, Peng YQ, Ye YZ, Zhao ZQ, Guo AK, Thermal nociception in adult Drosophila: behavioral characterization and the role of the painless gene. ***Genes brain behav*** 5 (2006) 602–613.

www.SID.ir