

## اثر تجویز داخل نخاعی Genipin بر درد و بی‌دردی ناشی از مرفین در موش صحرایی

زهره عباسی، مسعود فریدونی\*، مرتضی بهنام رسولی  
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

پذیرش: ۸ خرداد ۹۲

دریافت: ۲۸ فروردین ۹۲

### چکیده

**مقدمه:** UCP2 در غشای داخلی میتوکندری، باعث تغییر در فعالیت کانال‌های  $K_{ATP}$  و تغییر در تحریک پذیری سلول می‌شود که احتمالاً با کاهش تولید ATP می‌باشد. با توجه به بیان UCP2 در اوران‌های درد در نخاع، و نقش این کانال‌ها در بی‌دردی مرفین، احتمال تأثیر تجویز داخل نخاعی Genipin، مهارکننده UCP2، بر احساس درد و بر بی‌دردی ناشی از مرفین بررسی شد.

**روش‌ها:** جهت ارزیابی درد حرارتی و شیمیایی در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به ترتیب آزمون‌های پس کشیدن دم (Tail flick) و فرمالین بکار گرفته شد و برای موضعی کردن محل اثر Genipin از تکنیک جراحی و کانول گذاری در فضای تحت عنکبوتیه استفاده گردید.

**یافته‌ها:** Genipin درد را در آزمون پس کشیدن دم ( $P < 0.001$ )، و در مرحله اول آزمون فرمالین ( $P < 0.001$ ) افزایش، ولی در مرحله دوم آزمون فرمالین کاهش داد ( $P < 0.001$ )؛ همچنین بی‌دردی مرفین را در آزمون پس کشیدن دم ( $P < 0.01$ ) و مرحله اول آزمون فرمالین ( $P < 0.001$ ) آنتاگونیزه کرد و در مرحله دوم آزمون فرمالین باعث بروز بی‌دردی نسبتاً قوی‌تری شد ( $P < 0.001$ )؛ اما اثری بر پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین نداشت.

**نتیجه‌گیری:** احتمالاً Genipin، حداقل تا حدی، با مهار UCP2، افزایش نسبت ATP/ADP، و مهار کانال‌های  $K_{ATP}$  در اوران‌های اولیه باعث کاهش آستانه درد شده، و بی‌دردی مرفین را کاهش داده است. ظاهراً اثرات ضد التهای Genipin باعث بروز بی‌دردی در مرحله دوم آزمون فرمالین شده است. ممکن است بی‌اثر بودن Genipin بر پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین به دلیل تشابه مکانیسم‌های عمل Genipin و این دوز مرفین، مثل اثر بر کانال‌های  $K_{ATP}$ ، باشد.

واژه‌های کلیدی: UCP2، Genipin، کانال‌های  $K_{ATP}$ ، مرفین

### مقدمه

بیان می‌شود و ظاهراً در احساس درد نقش دارد [۸]. مطالعات گذشته نشان دادند حیواناتی که UCP2 را بیش از حد عادی بیان می‌کنند، آستانه درد بیشتری نیز دارند [۷]. UCP2 در نورون‌هایی که به وسیله گلوکز فعال می‌شوند، باعث کاهش تولید ATP، باز شدن کانال‌های  $K_{ATP}$  در غشای سلولی، هایپریپلاریزاسیون غشاء و سرانجام کاهش برانگیختگی این نورون‌ها می‌گردد [۱۱، ۲۱]. کانال‌های  $K_{ATP}$  در نورون‌هایی که در حس کردن گلوکز نقشی ندارند، به عنوان عناصر کنترل‌کننده انرژی سلول عمل کرده، وضعیت متابولیکی سلول را به تغییر در جریان‌های بین غشایی پتاسیم

UCP2 عضوی از خانواده Uncoupling protein‌ها در غشای داخلی میتوکندری است که باعث نشت پروتون از فضای بین دو غشاء به ماتریکس میتوکندری، و در نتیجه کاهش تولید ATP می‌گردد [۲، ۱۴]. این پروتئین در شاخ خلفی نخاع مخصوصاً در ناحیه substantia gelatinosa

fereidoni@um.ac.ir  
www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله:

## مواد و روش ها

در این پژوهش از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم) استفاده شد. حیوانات تحت شرایط کنترل شده نوری (۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی) و دمایی ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) نگهداری می‌شدند و محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند و به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش‌ها روزانه به مدت چند ساعت در فضای آزمایشگاه قرار می‌گرفتند تا با محیط آن تطابق یابند. تکثیر و پرورش حیوانات در حیوانخانه و تمامی مراحل انجام آزمایش‌ها در آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی جانوری دانشگاه فردوسی مشهد و مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی موجود در خصوص کار با حیوانات آزمایشگاهی [۳۱] انجام گرفت. در این مطالعه محلول‌های Genipin (Sigma-Aldrich) با غلظت ۱ mM (از حلال DMSO ۵٪، V/V) به عنوان حامل دارو استفاده شد و مرفین (تماد) با دوزهای ۱۰ mg/kg و ۱ μg/kg (از سرم فیزیولوژی به عنوان حلال استفاده شد)، مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام آزمایشات، حیوانات به صورت تصادفی در هفت گروه حداقل ۷ تایی دریافت کننده سالیین (i.p.)، سالیین (i.t.)، سالیین (i.p.)، سالیین (i.t.)، مرفین (۱۰ mg/kg) (i.p.)، مرفین (۱۰ mg/kg) (i.t.)، مرفین (۱ μg/kg) (i.p.)، مرفین (۱ μg/kg) (i.t.)، مرفین (۱۰ mg/kg) (i.p.)، مرفین (۱۰ mg/kg) (i.t.)، مرفین (۱ μg/kg) (i.p.)، مرفین (۱ μg/kg) (i.t.) دسته‌بندی شدند. علاوه بر گروه‌های مذکور برای اطمینان از بی‌تأثیر بودن جراحی در روند آزمایش، یک گروه کنترل نیز وجود داشت که در آن حیوانات بدون عمل جراحی برای تجویز i.t. فقط سالیین (i.p.) دریافت کردند. مراحل انجام آزمایش‌ها در تمام گروه‌ها بدین صورت بود که ابتدا آستانه درد حرارتی با استفاده از دستگاه Tail flick سنجش شد سپس تجویز داخل صفاقی در هر گروه انجام شده آنگاه پس از گذشت ۲۵ دقیقه، تجویز داخل نخاعی انجام شد. نکته قابل ذکر اینست که چون زمان لازم برای توزیع تجویز داخل صفاقی در تمام بدن ۳۰ دقیقه و زمان لازم برای توزیع تجویز داخل نخاعی در سطح نخاع ۵ دقیقه می‌باشد، لذا برای همزمانی بروز اثرات تجویز داخل

و تحریک پذیری سلول جفت می‌کنند. احتمال باز شدن این کانال‌ها مستقیماً وابسته به نسبت ATP/ADP در داخل سلول است. فعال شدن کانال‌های  $K_{ATP}$  در غشاهای پیش سیناپسی باعث جریان رو به خارج پتاسیم، هایپرپلاریزاسیون غشا، افت قابل توجه در تحریک پذیری، و کاهش آزاد سازی میانجی می‌شود [۱، ۱۵، ۲۸، ۳۲].

در طب سنتی چینی از میوه *Gardenia jasminoides* برای درمان التهاب، یرقان، سردرد، ادم، تب، بیماری‌های کبدی، فشار خون [۱۲] و بهبود علائم دیابت استفاده می‌شده است. در زمینه نقش این گیاه در بهبود علائم دیابت روشن شد که Genipin، یکی از ترکیبات فعال در عصاره میوه این گیاه، با مهار UCP2، تولید ATP را افزایش داده، کانال‌های  $K_{ATP}$  را بسته، و ترشح انسولین را تحریک می‌کند [۲۹]. پس از کشف Genipin به عنوان مهار کننده UCP2، در مطالعاتی برای بررسی عملکرد فیزیولوژیک UCP2 در آدیپوسیت‌ها [۳۰]، کاردیومیوسیت‌ها [۹، ۲۵]، برخی سلول‌های سرطانی [۱۷]، و نورون‌ها [۲۱] از این مولکول استفاده شد. اثرات ضددردی اپیوئیدها، مثل مرفین، متأثر از باز شدن کانال‌های مرکزی  $K_{ATP}$  است. تجویز مهار کننده‌های این کانال‌ها به داخل بطن‌های مغزی و نخاع بی‌دردی القاء شده به وسیله تجویز سیستمیک مرفین را آنتاگونیست می‌کنند. بنابراین، باز شدن این کانال‌ها در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی از جمله نخاع اثرات بی‌دردی محیطی مرفین را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۲۳، ۲۷].

با توجه به حضور UCP2 و کانال‌های  $K_{ATP}$  در پایانه‌های آکسونی فیبرهای آوران اولیه درد، این فرض قابل طرح است که UCP2 با تغییر در میزان تولید ATP، و در نتیجه تغییر فعالیت کانال‌های  $K_{ATP}$ ، احتمالاً در تحریک پذیری آوران‌های اولیه درد و میزان آزاد سازی میانجی‌های عصبی و یا تحریک پذیری پروجکشن نورون‌ها مداخله کند؛ و بدین ترتیب بر ارسال پیام‌های درد و میزان احساس درد اثر بگذارد.

برای بررسی این فرضیه از تجویز نخاعی Genipin، مهار کننده UCP2، استفاده گردید و به منظور ارزیابی درد، آزمون‌های درد حرارتی (آزمون پس کشیدن دم، Tail flick) و درد شیمیایی (آزمون فرمالین) بکار گرفته شد.

گرفت. زمان بروز پاسخ یک بار قبل از تجویز داخل صفاقی و بار دوم ۵ دقیقه پس از تجویز داخل نخاعی بدست آمد. برای مقایسه بین گروه‌ها، نتایج به صورت درصد حداکثر اثر ممکن (Maximum Possible Effect) MPE% بیان شد:

$$\text{MPE\%} = \frac{\text{Post Drug Latency} - \text{Pre Drug Latency}}{\text{Cut of time} - \text{Pre Drug Latency}} \times 100$$

برای سنجش درد شیمیایی از آزمون فرمالین استفاده شد. این آزمون به روشی که توسط Dubuissou و Dennis در سال ۱۹۷۷ برای موش‌های صحرایی معرفی شد، انجام گرفت [۴]. تزریق زیر پوستی محلول فرمالدهید (محلول فرمالین) به کف پای عقبی موش صحرایی باعث ایجاد دو مرحله مشخص در رفتار درد می‌شود، یک مرحله اولیه پاسخ (۵ دقیقه اول پس از تزریق فرمالین، فاز نوروژنیک)، و یک مرحله ثانویه پاسخ (از دقیقه ۱۱ شروع شده و گاهی تا ۶۰ دقیقه طول می‌کشد، فاز التهابی) که با سه رفتار مشخص، لنگیدن، بالا بردن پا، و لیسیدن یا گاز گرفتن پا، همراه است. بین مرحله اول و دوم، یک اینترفاز خاموش وجود دارد که از دقیقه ۶ تا دقیقه ۱۰ و گاهی تا دقیقه ۲۰ طول می‌کشد و رفتار درد کمی طی آن مشاهده می‌شود. این گونه نظریه پردازی شده که دو مرحله مختلف نشان دهنده دو نوع مختلف درد از نظر کیفی می‌باشند. مرحله ۱، دردی است که به وسیله تحریک شیمیایی مستقیم اعصاب آوران C توسط فرمالین ایجاد شده است؛ و مرحله ۲ درد القاء شده به وسیله واکنش التهابی در بافت‌های محیطی می‌باشد [۲۲]. در این مطالعه، مقدار ۰/۰۵ ml از محلول فرمالین ۲/۵٪ به صورت زیر جلدی به کف پای عقبی حیوان تزریق و رفتار حیوان به مدت یک ساعت مورد بررسی گرفت. درجه درد هر ۱۵ ثانیه ثبت، و سپس میانگین درجه‌های درد در هر ۵ دقیقه محاسبه گردید. درجه بندی رفتارهای درد بر اساس توصیفات Dubuissou و Dennis به این صورت بود: عدد "صفر" برای وقتی که جانور دردی ندارد و کف پا روی زمین است؛ "یک" برای وقتی که فقط پنجه پا را روی زمین می‌گذارد؛ "دو" برای وقتی که پا را کاملاً بالا می‌گیرد؛ و "سه" برای وقتی که پا را لیس می‌زند و یا گاز

صفاقی و داخل نخاعی، ابتدا تجویز داخل صفاقی و سپس تجویز داخل نخاعی انجام شد. پس از گذشت ۵ دقیقه از تجویز داخل نخاعی دوباره آزمون پس کشیدن دم و بلافاصله پس از آن تزریق فرمالین به پای عقبی راست و بررسی رفتار درد حیوان به مدت یک ساعت انجام گردید.

برای کانول گذاری جهت تجویز داخل نخاعی از تکنیک Rudy و Yaksh استفاده گردید [۲۶]. بر اساس این روش، حیوانات با تجویز داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۲۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. پس از تراشیدن موها و ثابت کردن سر حیوان در دستگاه استرنوتاکس، درست در خط وسط از بین گوش‌ها برشی کوچک به طول ۲ سانتیمتر به طرف پایین ایجاد گردید. با ایجاد این برش، عضلات گردنی مشاهده شد که مشخصه این عضلات وجود یک شیار بارز بود؛ با برش عمقی در راستای این شیار و کنار زدن عضلات از روی تیغه اکسی-پیتال جمجمه، غشای اطلس-اکسی پیتال مشاهده شد. با ایجاد خراشیدگی در سطح غشای اطلس-اکسی پیتال، مایع مغزی-نخاعی خارج شد که نشانه دسترسی به فضای تحت عنکبوتیه بود. کانول پلی‌اتیلن (PE-10) در فضای تحت عنکبوتیه قرار گرفت، به آرامی به طرف قطعه کمربندی نخاع به اندازه ۸ سانتیمتر پیش برده شد و برای تجویز دارو ۳ سانتیمتر از لوله خارج نخاع باقی ماند. پس از یک دوره بهبودی ۵ تا ۷ روزه، تنها حیواناتی مورد آزمایش قرار می‌گرفتند که بعد از کانول گذاری هیچ گونه نقص حرکتی نداشتند. داروها با حجم ۱۰ میکرولیتر و به وسیله سرنگ هاملتون ۵۰ میکرولیتری تجویز شدند.

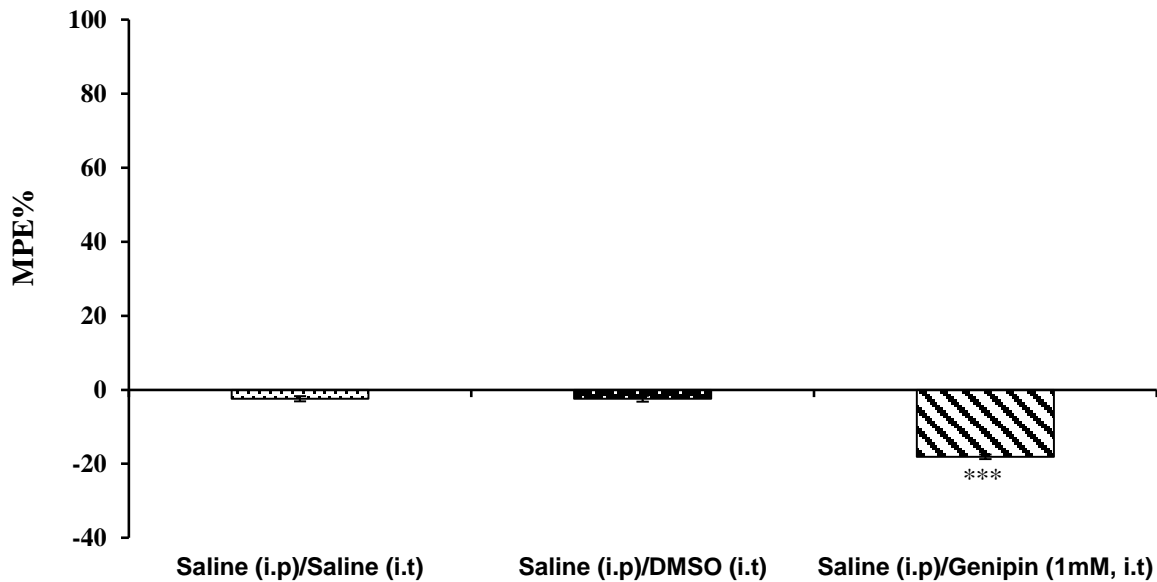
برای سنجش درد حرارتی از آزمون پس کشیدن دم به روش D'Amour و Smith استفاده گردید [۳]. شدت تابش نور دستگاه به یک سوم میانی دم جانور به گونه‌ای تنظیم شد که متوسط زمان پس کشیدن دم پس از اعمال نور بین ۴ تا ۶ ثانیه باشد. برای جلوگیری از آسیب بافتی تابش نور پس از ۱۵ ثانیه قطع می‌شد (cut-off time). در این پژوهش این آزمون سه مرتبه و به فاصله زمانی یک دقیقه در ناحیه یک سوم میانی دم انجام شد و میانگین داده‌ها برای زمان پس کشیدن دم به عنوان آستانه زمانی در بروز درد (Tail Flick Latency) برای هر حیوان مد نظر قرار

نمایش داده شدند.

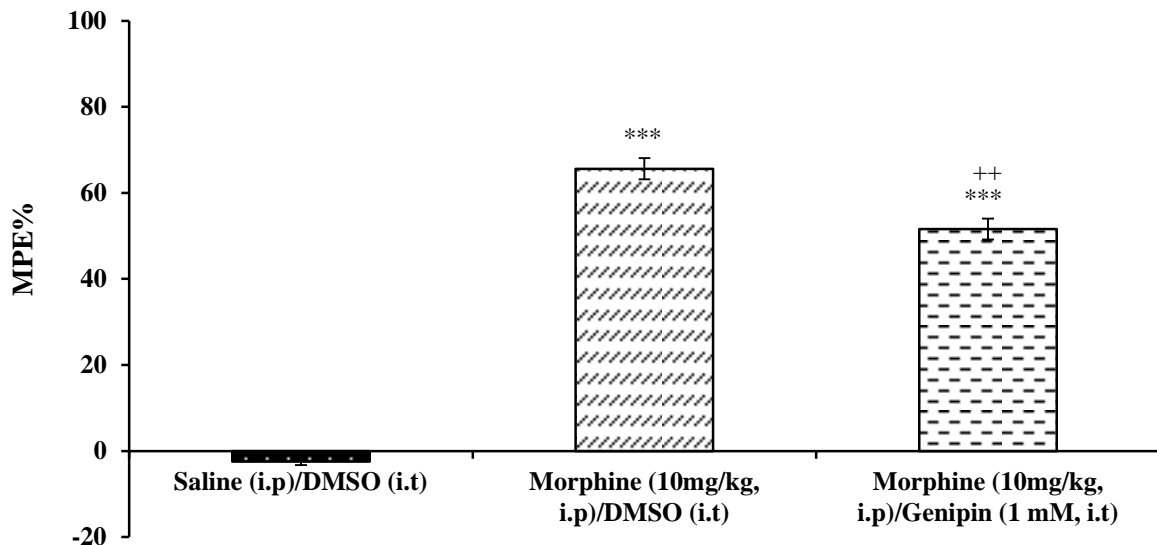
## یافته ها

در آزمون پس کشیدن دم، نتایج نشان داد که تجویز حلال DMSO در گروه سالیین (i.p) DMSO/(i.t) در

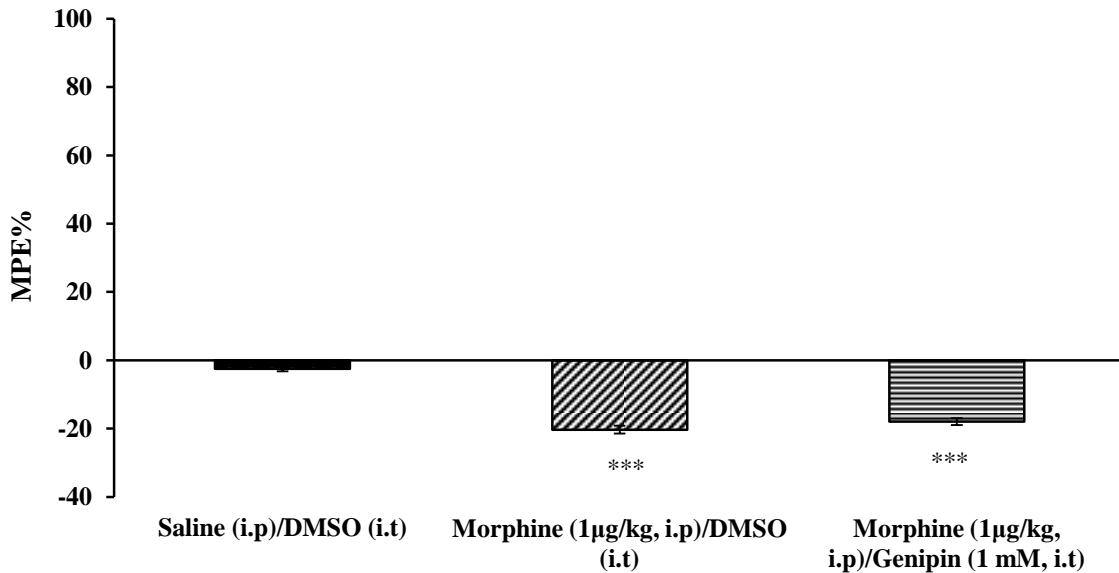
می گیرد [۴]. داده‌ها به صورت  $mean \pm SEM$  ارائه شده؛ با استفاده از نرم افزار 5 GraphPad Prism و به روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس میانگین داده‌های گروه‌ها با آزمون  $T_{student}$  مقایسه و  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. در نهایت نتایج به کمک نرم افزار Microsoft Excel 2007 بر روی نمودار



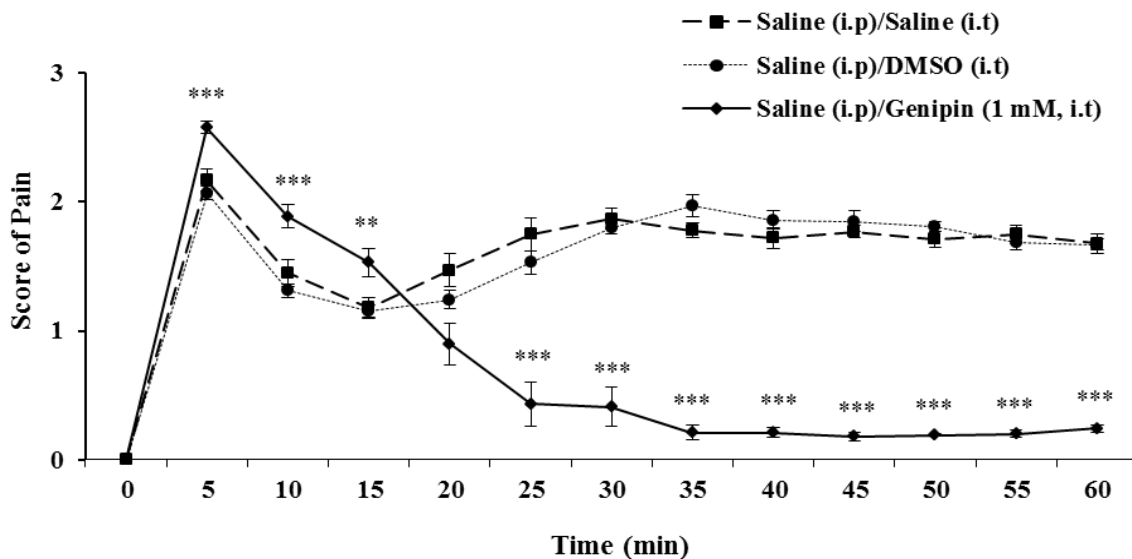
شکل ۱- مقایسه نتایج حاصل از آزمون پس کشیدن دم بین گروه‌های سالیین (i.p)/سالیین (i.t)، سالیین (i.t) DMSO/(i.p) و سالیین (i.p) Genipin (1 mM, i.t). نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه سالیین (i.p)/سالیین (i.t) و گروه سالیین (i.t) DMSO/(i.p) نبود. اما تجویز داخل نخاعی Genipin در مقایسه با سایر گروه‌ها منجر به کاهش آستانه درد حرارتی و بروز پردردی گردید. نتایج بصورت  $mean \pm SEM$  ارائه شده است،  $(n=7)$  و  $***P < 0.001$  در مقایسه با گروه سالیین (i.p)/سالیین (i.t).



شکل ۲- مقایسه نتایج حاصل از آزمون پس کشیدن دم بین گروه‌های سالیین (i.t) DMSO/(i.p) و مرفین (10 mg/kg, i.p) DMSO/(i.t) و مرفین (10 mg/kg, i.p) Genipin/(i.t). نتایج نشان داد که تجویز مرفین به همراه Genipin بصورت داخل نخاعی در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین (i.t) DMSO/(i.p)، همچنان منجر به بروز بی‌دردی در رفتار حیوان گردید، اما نتایج این گروه در مقایسه با گروه دریافت کننده مرفین و DMSO نشان داد که Genipin باعث کاهش آستانه درد حرارتی شده و بی‌دردی مرفین را آنتاگونیست کرد. نتایج بصورت  $mean \pm SEM$  ارائه شده است،  $(n=7)$  و  $***P < 0.001$  در مقایسه با گروه سالیین (i.t) DMSO/(i.p) و  $++P < 0.01$  در مقایسه با گروه مرفین (10 mg/kg, i.p) DMSO/(i.t).



شکل ۳- مقایسه نتایج حاصل از آزمون پس کشیدن دم بین گروه‌های سالیین (i.t) DMSO/(i.p) ۱ µg/kg و مرفین (i.t) DMSO/(i.p) ۱ µg/kg و مرفین (i.t) Genipin/(i.p) ۱ mM. نتایج نشان داد که تجویز دوز بسیار ناچیز مرفین به همراه Genipin در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین (i.t) DMSO/(i.p) همچنان منجر به بروز پردردی در رفتار حیوان گردید، اما نتایج این گروه در مقایسه با گروه مرفین (i.t) DMSO/(i.p) ۱ µg/kg که نشان داد که Genipin بر پردردی ناشی از دوز بسیار ناچیز مرفین اثری نداشت. نتایج بصورت mean±SEM ارائه شده است، (n=7) و  $***P<0.001$  در مقایسه با گروه سالیین (i.t) DMSO/(i.p).

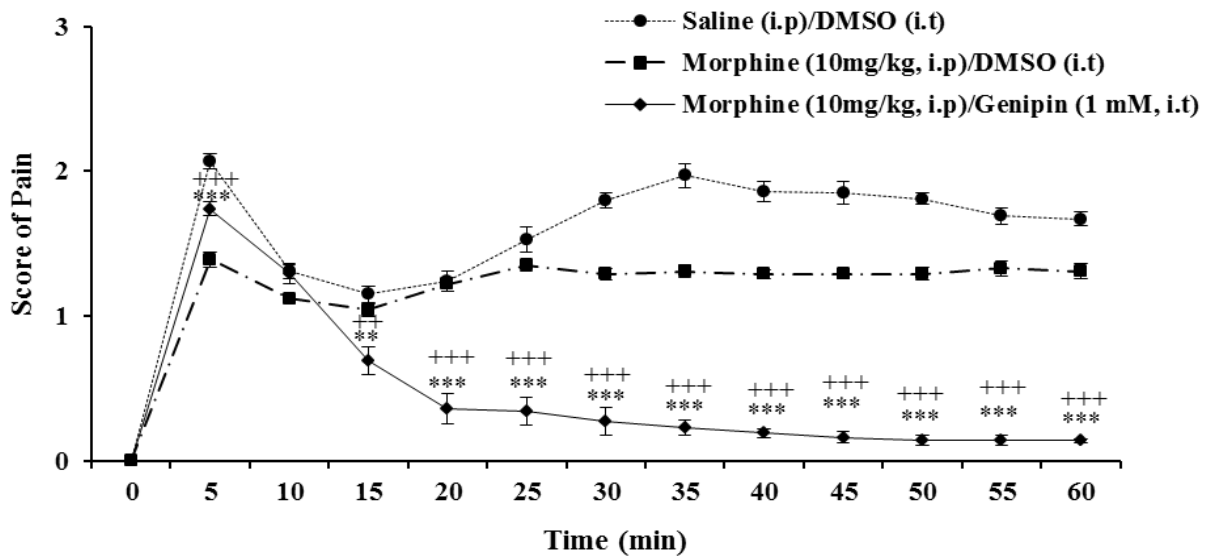


شکل ۴- مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه‌های سالیین (i.p) / سالیین (i.t)، سالیین (i.t) DMSO/(i.p) و سالیین (i.p) Genipin/(i.p) ۱ mM. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه سالیین (i.p) / سالیین (i.t) و گروه سالیین (i.t) DMSO/(i.p) نبود. اما تجویز داخل نخاعی Genipin در مقایسه با سایر گروه‌ها در مرحله اول آزمون فرمالین باعث افزایش شدت درد و در مرحله دوم شدت درد را بطور چشمگیری کاهش داد. نتایج بصورت mean±SEM ارائه شده است، (n=7) و  $***P<0.001$  و  $**P<0.01$  در مقایسه با گروه سالیین (i.p) / سالیین (i.t).

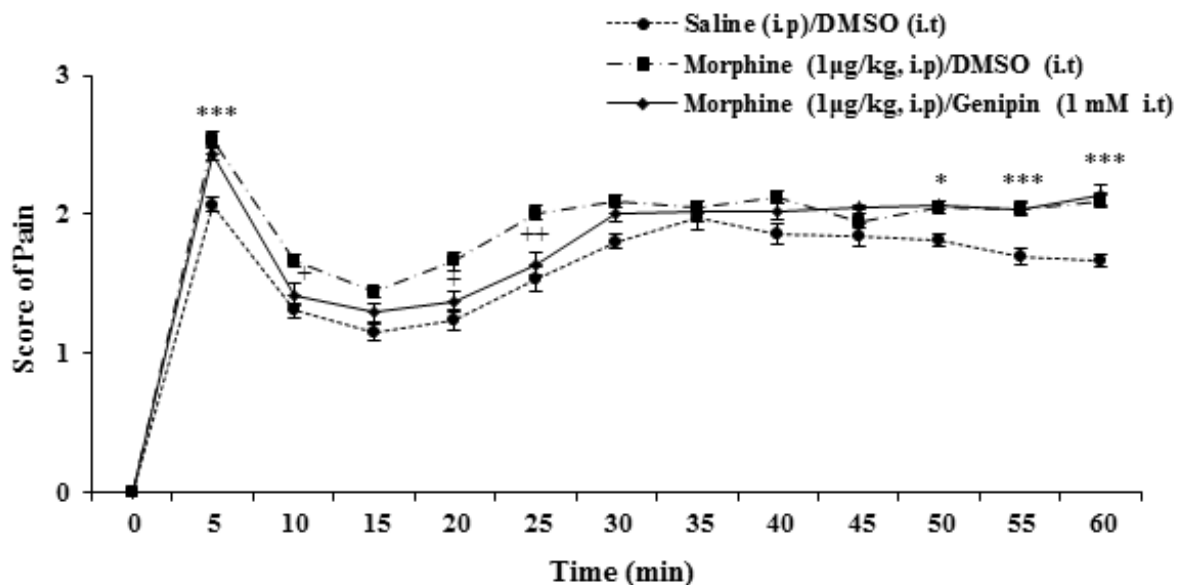
باعث کاهش معنی‌داری در آستانه درد حرارتی و القای پردردی گردید ( $P<0.001$ )، (شکل ۱).

همچنین طی آزمون پس کشیدن دم، در گروه دریافت کننده مرفین (۱۰ mg/kg) (i.p) Genipin/(i.p) ۱ mM، در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین (i.t) DMSO/(i.p)، همچنان اثرات بی‌دردی در رفتار حیوان مشاهده گردید

مقایسه با تجویز سالیین در گروه سالیین (i.p) / سالیین (i.t)، تأثیر معنی‌داری بر آستانه درد حرارتی نداشت؛ همچنین حیوانات گروه کنترل که جراحی نشده و سالیین (i.p) دریافت کرده بودند مشابه دو گروه فوق عمل کرده، بنابراین جراحی نیز بر نتایج آزمون بی تأثیر بوده است. بر اساس نتایج، تجویز نخاعی Genipin در گروه سالیین (i.p) Genipin/(i.p) ۱ mM



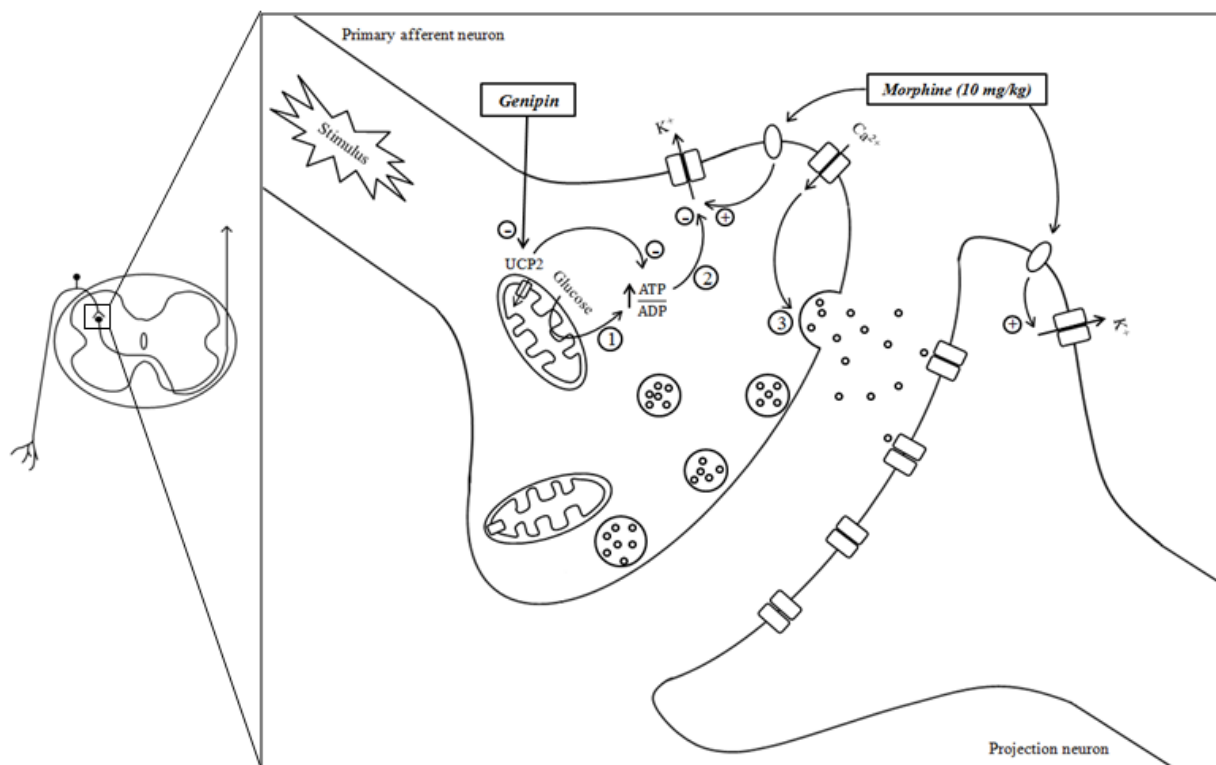
شکل ۵- مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه‌های سالیین (i.t) DMSO/(i.p) ۱۰mg/kg و مرفین (i.t) DMSO/(i.p) ۱۰mg/kg و مرفین (i.p) ۱۰mg/kg/Genipin (i.t) ۱ mM. نتایج نشان داد که تجویز مرفین به همراه Genipin در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین (i.t) DMSO/(i.p)، همچنان باعث ایجاد بی‌دردی گردید، اما نتایج این گروه در مقایسه با گروه مرفین (i.p) ۱۰mg/kg/Genipin (i.t) ۱ mM نشان داد که Genipin توان بی‌دردی ناشی از مرفین را در مرحله اول آزمون فرمالین کاهش ولی در مرحله دوم آزمون فرمالین، تقویت کرد. نتایج بصورت mean±SEM ارائه شده است، (n=7) و  $***P<0.001$  و  $**P<0.01$  در مقایسه با گروه سالیین (i.t) DMSO/(i.p)، (i.t)  $+++P<0.001$  و  $++P<0.01$  در مقایسه با گروه مرفین (i.p) ۱۰mg/kg/Genipin (i.t) ۱ mM.



شکل ۶- مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه‌های سالیین (i.t) DMSO/(i.p) ۱ µg/kg و مرفین (i.t) DMSO/(i.p) ۱ µg/kg و مرفین (i.p) ۱ µg/kg/Genipin (i.t) ۱ mM. نتایج نشان داد که تجویز دوز بسیار ناچیز مرفین به همراه Genipin در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین (i.t) DMSO/(i.p)، منجر به بروز پردردی در مرحله اول و در برخی از زمان‌های مرحله دوم آزمون فرمالین گردید، اما نتایج این گروه در مقایسه با گروه مرفین (i.p) ۱ µg/kg/Genipin (i.t) ۱ mM نشان داد که Genipin در مرحله اول آزمون فرمالین بر پردردی ناشی از دوز بسیار ناچیز مرفین اثری نداشت ولی در دقایق ۲۰ تا ۲۵ مرحله دوم آزمون فرمالین اثرات پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین را کاهش داد. نتایج بصورت mean±SEM ارائه شده است، (n=7) و  $***P<0.001$  و  $*P<0.05$  در مقایسه با گروه سالیین (i.t) DMSO/(i.p)،  $++P<0.01$  و  $+P<0.05$  در مقایسه با گروه مرفین (i.p) ۱ µg/kg/Genipin (i.t) ۱ mM.

(شکل ۲)،  $(P<0.01)$ . نتایج حاصل از آزمون پس کشیدن دم نشان داد در گروه دریافت کننده مرفین (۱ µg/kg)، سالیین (i.t) DMSO/(i.p) ۱ mM/Genipin (i.p) ۱۰ mg/kg در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین (i.t) DMSO/(i.p)، همچنان اثرات پردردی دوز بسیار

( $P<0.001$ )؛ اما به هر حال تجویز داخل نخاعی Genipin متعاقب تجویز داخل صفاقی مرفین، در مقایسه با گروه دریافت کننده مرفین (۱۰ mg/kg)، اثرات بی‌دردی مرفین را تخفیف داد



**شکل ۷-** مکانیسم پیشنهاد شده برای بروز اثرات پردرد کنندگی تجویز نخاعی Genipin و اثر آن بر بی‌دردی ناشی از مرفین. (۱) فعالیت نورون باعث افزایش مصرف گلوکز در آن نورون می‌شود. (۲) احتمالاً مشابه سلول  $\beta$  افزایش نسبت ATP/ADP باعث مهار کانال  $K_{ATP}$  (۳) باز شدن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، و سرانجام افزایش آزاد سازی میانجی‌های عصبی می‌شود. UCP2 با کاهش تولید ATP این اثر را تعدیل می‌کند. Genipin احتمالاً با مهار این پروتئین، تولید ATP را افزایش داده، باعث افزایش آزاد سازی میانجی‌های عصبی و افزایش درد شده است؛ و ممکن است به همین طریق اثرات بی‌دردی مرفین به واسطه‌ی کانال‌های  $K_{ATP}$  را آنتاگونیست کرده باشد (ترسیم توسط نگارنده).

به خوبی تخفیف داد ( $P < 0.001$ )، (شکل ۴). همچنین طی آزمون فرمالین، در گروه دریافت‌کننده مرفین ( $10 \text{ mg/kg}$ )، Genipin ( $1 \text{ mM}$ )، در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین ( $1 \text{ mg/kg}$ )، هم در مرحله نوروژنیک و هم در مرحله التهابی آزمون فرمالین اثرات ضد‌دردی مشاهده گردید ( $P < 0.001$ )؛ اما تجویز داخل نخاعی Genipin به همراه تجویز داخل صفاقی مرفین در مرحله اول آزمون فرمالین توان بی‌دردی ناشی از مرفین را کاهش داد ( $P < 0.001$ )، بعلاوه در مرحله دوم آزمون فرمالین اثر بی‌دردی نسبتاً قویتری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مرفین ( $10 \text{ mg/kg}$ )، DMSO ( $1 \text{ mg/kg}$ )، نشان داد ( $P < 0.001$ )، (شکل ۵).

و اما نتایج حاصل از آزمون فرمالین نشان داد در گروه دریافت‌کننده مرفین ( $1 \text{ mg/kg}$ )، Genipin ( $1 \text{ mM}$ )، در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین ( $1 \text{ mg/kg}$ )، DMSO ( $1 \text{ mg/kg}$ )، کم‌ترین اثرات پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین در مرحله

ناچیز مرفین در حیوان قابل ملاحظه بود ( $P < 0.001$ )؛ اما در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مرفین ( $1 \text{ mg/kg}$ )، DMSO ( $1 \text{ mg/kg}$ )، بر اثرات پردرد‌کننده دوز بسیار ناچیز مرفین تأثیر معنی‌داری نداشت (شکل ۳).

در آزمون فرمالین، باز هم همانند آزمون پس کشیدن دم، نتایج نشان دادند که تجویز حلال DMSO در گروه سالین ( $1 \text{ mg/kg}$ )، در مقایسه با تجویز سالین در گروه سالین ( $1 \text{ mg/kg}$ )، تأثیر معنی‌داری بر شدت درد شیمیایی ناشی از فرمالین نداشت؛ همچنین حیوانات گروه کنترل که جراحی نشده و سالین ( $1 \text{ mg/kg}$ ) دریافت کرده بودند مشابه دو گروه فوق عمل کرده، بنابراین جراحی بر نتایج آزمون فرمالین نیز هم بی‌تأثیر بوده است. بر اساس نتایج، تجویز داخل نخاعی Genipin در گروه سالین ( $1 \text{ mg/kg}$ )، باعث تشدید احساس درد در مرحله اول آزمون فرمالین (نوروژنیک) شد ( $P < 0.001$ )؛ اما بر خلاف مرحله اول، شدت درد شیمیایی را در مرحله دوم آزمون فرمالین (التهابی)

کاهش تولید پتانسیل عمل می‌شود [۶، ۱۹]؛ و این جریان‌های ایجاد شده به وسیله DNP با افزودن انسدادگر کانال  $K_{ATP}$  مهار می‌شود [۱۹]. از آنجا که DNP عملکرد UCP ها را تقلید می‌کند مکانیسم پیشنهاد شده بیشتر حمایت می‌شود. در مرحله اول (نوروژنیک) آزمون فرمالین، درد بطور معنی‌داری در گروه دریافت کننده Genipin افزایش یافت، (شکل ۴). به نظر می‌رسد که در این مرحله نیز مشابه مکانیسم پیشنهادی برای آزمون پس کشیدن دم، Genipin احتمالاً با مهار UCP2 در پایانه‌های آوران‌های درد در سطح نخاع باعث افزایش نسبت ATP/ADP و مهار کانال‌های  $K_{ATP}$  می‌شود. مهار این کانال‌ها با تجمع پتاسیم در این نوروها و در نتیجه افزایش تحریک پذیری آن‌ها، باعث افزایش آزاد سازی میانجی‌های عصبی از این فیبرها شده، بدین ترتیب موجب تشدید انتقال سیگنال درد می‌شود. در مرحله دوم آزمون فرمالین که وابسته به فرآیندهای التهابی است، Genipin باعث کاهش معنی‌دار درد شد، (شکل ۴). با توجه به یافته‌های درد حرارتی و مرحله اول آزمون فرمالین انتظار کاهش چشمگیر درد در مرحله دوم آزمون فرمالین در حضور Genipin نمی‌رفت؛ بنابراین توضیح این پدیده پیچیده‌تر خواهد بود. در مطالعات نشان داده شده که Genipin دارای اثرات ضد التهابی هم در بافت‌های محیطی [۱۲، ۱۳] و هم در بافت‌های عصبی [۲۰] است؛ این مولکول فعالیت فاکتور NF-Kb را در سلول‌های میکروگلیال محیط کشت سرکوب و آزاد سازی سایتوکاین‌های التهابی را از این سلول‌ها مهار می‌کند [۲۰]. احتمالاً Genipin به همین دلیل توانسته درد ایجاد شده به وسیله فرمالین را تسکین دهد. اگرچه Genipin، UCP2 را مهار کرده و انتظار می‌رفت که درد التهابی در مرحله دوم آزمون فرمالین افزایش یابد، به نظر می‌رسد که خاصیت ضد التهابی آن از طریق مهار تولیدات سلول‌های میکروگلیال شاید خیلی قوی‌تر از هر گونه اثری است که از طریق مهار UCP2 مشاهده می‌شود؛ و بدین طریق توانسته اثرات پردردی احتمالی ناشی از مهار UCP2 را که برای مرحله دوم آزمون فرمالین مورد انتظار بود پوشش دهد. از آنجا که فعال شدن کانال‌های  $K_{ATP}$  در بروز اثرات بی‌دردی مرفین در سطح نخاع نقش دارد [۲۷] و با توجه به اینکه با تجویز داخل نخاعی Genipin پس از مرفین

اول آزمون فرمالین قابل ملاحظه است ( $P < 0.001$ )، و همچنین دوز بسیار ناچیز مرفین در مرحله دوم آزمون فرمالین نیز در برخی زمان‌ها منجر به بروز پردردی گردید ( $P < 0.05$ )؛ اما در مقایسه با گروه دریافت کننده مرفین ( $1 \mu\text{g/kg}$ )، DMSO/(i.t) Genipin بر اثرات پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین در مرحله اول آزمون فرمالین تأثیر چندانی نداشت. به علاوه مرحله دوم آزمون را نیز چندان تغییری نداد. به هر حال، در دقایق ۲۰ تا ۲۵ کمی از اثر پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین کاسته شده ( $P < 0.05$ )؛ اما در دقایق بعدی همین مقدار کم نیز دیده نشد (شکل ۶).

## بحث

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تجویز داخل نخاعی Genipin باعث کاهش معنی‌دار آستانه درد حرارتی در آزمون پس کشیدن دم گردید، (شکل ۱). با توجه به حضور کانال‌های  $K_{ATP}$  در پایانه‌های پیش سیناپسی [۱۵]، چنین به نظر می‌رسد که احتمالاً مشابه سلول‌های  $\beta$  در لوزالمعده، Genipin حداقل تا حدی با مهار UCP2 در میتوکندری‌های پایانه‌های مرکزی فیبرهای آوران اولیه درد، باعث افزایش نسبت ATP/ADP شده و کانال‌های  $K_{ATP}$  را مهار می‌کند [۲۹]. از آنجا که فعالیت این کانال‌ها با تحریک پذیری سلول‌ها از جمله نوروها مرتبط است [۱۵]، پیشنهاد کردیم که Genipin احتمالاً با کاهش جریان از میان کانال‌های  $K_{ATP}$ ، به واسطه مهار UCP2، منجر به افزایش تحریک پذیری این فیبرها در شاخ خلفی نخاع، دپلاریزاسیون آن‌ها، باز شدن کانال‌های کلسیمی وابسته ولتاژ و افزایش آزاد سازی میانجی‌های عصبی در دوزا شده، بدین ترتیب احساس درد را افزایش داده است (شکل ۷). در حمایت از نتایج این مطالعه نشان داده شده که حیواناتی که UCP2 را بیش از حد عادی بیان می‌کنند، نسبت به حیوانات تیپ وحشی آستانه درد بیشتری دارند [۷]. همچنین نشان داده شده که کانال‌های  $K_{ATP}$  در کنترل پتانسیل غشاء نقش داشته و فعال شدن آن‌ها به وسیله دی‌نیترو فنول (DNP)، که یک جدا کننده مصنوعی فسفریلاسیون اکسیداتیو است، باعث افزایش جریان‌های پتاسیمی، هایپرپلاریزاسیون غشاء و



فعالیت PKA، PKC و افزایش کلسیم باعث پیشبرد التهاب می‌شود [۵، ۱۰]، لذا حضور مرفین اثرات ضد التهابی Genipin را به خوبی کاهش داده است. در کل یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که Genipin باعث افزایش احساس درد در آزمون پس کشیدن دم و مرحله اول آزمون فرمالین شده؛ و بی‌دردی مرفین را آنتاگونیست می‌کند. مکانیسم پیشنهادی چنین است: Genipin، احتمالاً با مهار UCP2، باعث افزایش تولید ATP، افزایش نسبت ATP/ADP، مهار کانال‌های  $K_{ATP}$ ، باز شدن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، در نتیجه پردردی شده است؛ و از همین طریق بی‌دردی مرفین از طریق کانال‌های  $K_{ATP}$  را نیز آنتاگونیست کرده است (شکل ۷). با توجه به مکانیسم پیشنهادی انتظار می‌رفت که مهار این پروتئین درد التهابی را نیز افزایش دهد؛ اما کاهش چشمگیری داشت. باید توجه داشت که Genipin با سرکوب فعالیت سلول‌های میکروگلیال دارای اثرات ضد التهابی است؛ شاید این اثر بوده که توانسته بر التهاب و درد ناشی از آن و همزمان بر تسهیل انتقال درد توسط خود Genipin غلبه نموده، درد را تسکین دهد. با توجه به اینکه کانال‌های  $K_{ATP}$  در نورون‌ها می‌توانند به عنوان افکتورهایی در سیستم‌های پیامبر ثانویه، مثل G-پروتئین‌ها، آبشارهای PIP، و فسفولیپاسیون‌های وابسته به پروتئین کیناز (که در پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین دخیلند) نیز عمل کنند، لذا ممکن است بخشی از اثرات پردردی و تشدید التهاب دوز بسیار ناچیز مرفین تا حدی به واسطه کانال‌های  $K_{ATP}$  بروز نماید.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مصوب دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد که با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شده است. بدینوسیله از آن سازمان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

این اثر آنتاگونیست شده است (شکل ۲ و ۵)؛ احتمالاً این دو می‌توانند یک مسیر سیگنال رسانی مشترک داشته باشند و آن کانال  $K_{ATP}$  است. مرفین با افزایش جریان از میان این کانال‌ها باعث کاهش تحریک پذیری فیبرهای آوران اولیه می‌شود [۲۷]. در مقابل، Genipin با کاهش فعالیت این کانال‌ها، احتمالاً از طریق مهار UCP2 و افزایش نسبت ATP/ADP، باعث افزایش تحریک پذیری این فیبرها شده است؛ که با کاهش تحریک پذیری پس از تجویز مرفین رقابت کرده و اثرات بی‌دردی آن را کاهش داده است (شکل ۷). بر اساس این نتایج مکانیسم پیشنهادی برای عملکرد Genipin بر احساس درد از طریق مهار UCP2 بیشتر حمایت می‌شود. در مرحله دوم آزمون فرمالین، پس از تجویز داخل نخاعی Genipin به تنهایی، بی‌دردی نسبتاً قوی تری نسبت به تزریق مرفین به تنهایی بروز کرد؛ و این اثر ضد درد با تجویز داخل نخاعی Genipin پس از مرفین تغییر معنی‌داری نیافت (شکل ۴ و ۵). ظاهراً اثرات ضد التهابی Genipin بسیار قوی است، به نحوی که تقریباً اثرات ضد التهابی و بروز اثرات ضد درد را اشیاع کرده و حضور مرفین در محدوده اشیاع اثر ضد التهابی آن بوده است.

در تجویز داخل نخاعی Genipin پس از تجویز دوز بسیار ناچیز مرفین، حضور هیچ یک از مرفین یا Genipin روی پردردی دیگری تأثیر قابل ملاحظه‌ای نداشت (شکل ۳ و ۶). این ممکن است به خاطر اشتراک در مکانیسم پردردی هر دو باشد. بر اساس این نتایج، و از آنجا که برای Genipin مهار کانال  $K_{ATP}$  مطرح است [۲۹]، این امکان می‌رود که کانال‌های  $K_{ATP}$  در بروز اثرات پردردی دوز بسیار ناچیز مرفین شرکت داشته باشند که نیازمند مطالعات بعدی است. در مرحله دوم آزمون فرمالین این دوز بسیار ناچیز مرفین باعث شد تا اثرات ضد درد Genipin کاملاً معکوس شود (شکل ۶). اگرچه Genipin از طریق سرکوب فعالیت NF- $\kappa$ B و کاهش آزاد سازی سایتوکاین‌های پیش التهابی دارای اثرات ضد التهابی است، اما دوز بسیار ناچیز مرفین احتمالاً از طریق فعال سازی GS، افزایش

## References

- [1] Allen TG, Brown DA, Modulation of the excitability of cholinergic basal forebrain neurones by KATP channels. *J Physiol* 554 (2004) 353-370.
- [2] Andrews ZB, Diano S, Horvath TL, Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: In support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* 6 (2005) 829-840.
- [3] D'Amour FE, Smith DL, A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72 (1941) 74-79.
- [4] 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) 161-174.
- [5] Esmacili-Mahani S, Shimokawa N, Javan M, Maghsoudi N, Motamedi F, Koibuchi N, Ahmadiani A, Low-dose morphine induces hyperalgesia through activation of G $\alpha$ s, protein kinase C, and L-type Ca $^{2+}$  channels in rats. *J Neurosci Res* 86 (2008) 471-479.
- [6] Gryshchenko O, Fischer IR, Dittrich M, Viatchenko-Karpinski S, Soest J, Böhm-Pinger MM, Igelmund P, Fleischmann BK, Hescheler J, Role of ATP-dependent K $^{+}$  channels in the electrical excitability of early embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cell Sci* 112 (1999) 2903-2912.
- [7] Horvath B, Spies C, Horvath G, Kox WJ, Miyamoto S, Barry S, Warden CH, Bechmann I, Diano S, Heemskerk J, Horvath TL, Uncoupling protein 2 (UCP2) lowers alcohol sensitivity and pain threshold. *Biochem Pharmacol* 64 (2002) 369-374.
- [8] Horvath B, Spies C, Warden CH, Diano S, Horvath TL, Uncoupling protein 2 in primary pain and temperature afferents of the spinal cord. *Brain Res* 955 (2002) 260-263.
- [9] Hoshov'ska IuV, Shymans'ka TV, Sahach VF, Effect of UCP2 activity inhibitor genipin on heart function of aging rats. *Fiziol Zh* 55 (2009) 28-34.
- [10] Hosseini Sh, Sabouni F, Fereidoni M, Moghimi A, Anti-inflammatory effect of shikonin on cultured astrocytes derived from rat brain. *Physiol Pharmacol* 16 (2012) 107-120.
- [11] Kong D, Vong L, Parton LE, Ye C, Tong Q, Hu X, Choi B, Brüning JC, Lowell BB, Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves KATP channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metab* 12 (2010) 545-552.
- [12] Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, Park EH, Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *J Ethnopharmacol* 103 (2006) 496-500.
- [13] Koo HJ, Song YS, Kim HJ, Lee YH, Hong SM, Kim SJ, Kim BC, Jin C, Lim CJ, Park EH, Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol* 495 (2004) 201-208.
- [14] Krauss S, Zhang CY, Lowell BB, The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 248-261.
- [15] Liss B, Roeper J, Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (Review). *Mol Membr Biol* 18 (2001) 117-127.
- [16] Ly CV, Verstreken P, Mitochondria at the synapse. *Neuroscientist* 12 (2006) 291-299.
- [17] Mailloux RJ, Adjeitey CN, Harper ME, Genipin-induced inhibition of uncoupling protein-2 sensitizes drug-resistant cancer cells to cytotoxic agents. *PLoS One* 5 (2010) e13289.
- [18] Matsuka Y, Ono T, Iwase H, Mitirattanakul S, Omoto KS, Cho T, Lam YY, Snyder B, Spigelman I, Altered ATP release and metabolism in dorsal root ganglia of neuropathic rats. *Mol Pain* 4 (2008) 458-471.
- [19] Morley GE, Anumonwo JM, Delmar M, Effects of 2,4-dinitrophenol or low [ATP] $_{i}$  on cell excitability and action potential propagation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 71 (1992) 821-830.
- [20] Nam KN, Choi YS, Jung HJ, Park GH, Park JM, Moon SK, Cho KH, Kang C, Kang I, Oh MS, Lee EH, Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. *Int Immunopharmacol* 10 (2010) 493-499.
- [21] Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB, Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 499 (2007) 228-232.
- [22] Randolph BC, Peters MA, Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. *Anesth Prog* 44 (1997) 11-16.
- [23] Rodrigues AR, Duarte ID, The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K $^{+}$  channels. *Br J Pharmacol* 129

- (2000) 110-114.
- [24] Story GM, The emerging role of TRP channels in mechanisms of temperature and pain sensation. *Curr Neuropharmacol* 4 (2006) 183-196.
- [25] Turner JD, Gaspers LD, Wang G, Thomas AP, Uncoupling protein-2 modulates myocardial excitation-contraction coupling. *Circ Res* 106 (2010) 730-738.
- [26] Yaksh TL, Rudy TA, Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 17 (1976) 1031-1036.
- [27] Yang SW, Kang YM, Guo YQ, Qiao JT, Dafny N, ATP-sensitive potassium channels mediate norepinephrine- and morphine-induced antinociception at the spinal cord level. *Int J Neurosci* 93 (1998) 217-223.
- [28] Yin XF, Fu ZG, Zhang DY, Jiang BG, Alterations in the expression of ATP-sensitive potassium channel subunit mRNA after acute peripheral nerve and spinal cord injury. *Eur Neurol* 57 (2007) 4-10.
- [29] Zhang CY, Parton LE, Ye CP, Krauss S, Shen R, Lin CT, Porco JA Jr, Lowell BB, Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced  $\beta$  cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab* 3 (2006) 417-427.
- [30] Zhou H, Zhao J, Zhang X, Inhibition of uncoupling protein 2 by genipin reduces insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 486 (2009) 88-93.
- [31] Zimmermann M, Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl* 128 (1986) 221-233.
- [32] Zoga V, Kawano T, Liang MY, Bienengraeber M, Weihrauch D, McCallum B, Gemes G, Hogan Q, Sarantopoulos C, KATP channel subunits in rat dorsal root ganglia: Alterations by painful axotomy. *Mol Pain* 6 (2010) 563-569.