

## بررسی نقش درجه بندی شده سیستم گابارژیک ( $GABA_A$ ) بر ویژگی ضد دردی هسته میخی شکل در ساقه مغز

حمید شیخکانلوی میلان<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه فیزیولوژی- فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۴۶۱۶۰۷۱ فاکس: ۰۴۵۱۵۵۱۰۰۵۷ E-mail: hshmilan@gmail.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** نقش ساقه مغز بخصوص ناحیه منقاری- شکمی- میانی بصل‌النخاع یا Rostral Ventromedial Medulla (RVM) مدتهاست که از نظر کنترل درد مد نظر بوده است، در این میان نقش ماده خاکستری دور قناتی (PAG) و ناحیه منقاری - شکمی - میانی بصل‌النخاع (RVM) در ایجاد ضددردی اثبات شده است. علاوه بر این در آزمایشات انجام گرفته، معلوم شده که RVM از هسته میخی شکل یا Cuneiformis (CnF) نیز پیامهای عصبی دریافت می‌کند و احتمال می‌رود که هسته CnF نیز دارای مکانیسمی مشابه PAG باشد. بنابراین در این طرح مطالعاتی، سعی شده است نقش هسته CnF و مسیرهای مربوط به سیستم گابارژیک در امر ضددردی بررسی گردد.

**روش کار:** موشها توسط داروی تیوپنتال بیهوش شدند. با استفاده از دستگاه استریوتاکس و اطلس پاکسینوس، نقطه موردنظر (هسته CnF) در روی جمجمه مشخص گردید. بعد از یک هفته از زمان جراحی، موشها برای انجام آزمایش آماده شدند. حیوانات به سه گروه تقسیم شدند. ابتدا برای تعیین گروه کنترل، ۰/۵ میکرولیتر سالین نرمال به داخل هسته CnF تزریق گردید. سپس به روش وابسته به دوز، داروی بیکوکولین به عنوان آنتاگونیست (گیرنده‌های  $GABA_A$ ) در حد نانوگرم به داخل هسته CnF تزریق و سپس به روش وابسته به دوز، داروی بیکوکولین به عنوان آنتاگونیست (گیرنده‌های  $GABA_A$ ) به داخل هسته CnF تزریق گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان‌دهنده نقش هسته CnF در ایجاد بی‌دردی می‌باشد. چون موقعی که داروی بیکوکولین تزریق می‌گردید زمان تأخیر پس کشیدن دم موش (به عنوان شاخص احساس درد) افزایش می‌یافت که مؤید احساس بی‌دردی در موش متعاقب تزریق آنتاگونیست گیرنده‌های  $GABA_A$  می‌باشد. علاوه بر این تزریق داروی بیکوکولین به روش وابسته به دوز (با افزایش دوز دارو)، زمان تأخیر پس کشیدن دم را بیشتر افزایش داد.

**نتیجه گیری:** بر اساس نتایج مطالعه حاضر، هسته CnF نقش مؤثری در کنترل درد دارد و در این بین مسیرهای گابارژیک نیز نقش اساسی در ایجاد حالت بی‌دردی دارند.

**کلمات کلیدی:** هسته میخی شکل، بیکوکولین، گیرنده‌های گابا A، تنظیم درد

پذیرش: ۹۱/۷/۱۱

دریافت: ۹۱/۴/۲۱

**مقدمه**  
بدین ترتیب درد شخص را وادار به واکنش برای برداشتن محرک دردزا می‌کند. حتی فعالیتهای ساده‌ای همچون نشستن طولانی مدت بر روی

درد عمدتاً یک مکانیسم حفاظتی برای بدن است و زمانی ایجاد می‌شود که بافتها آسیب دیده باشند و

لطفاً به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Sheikhkanlou Milan H. Dose-Dependent Effect of  $GABA_A$  System on Antinociception Actions of Cuneiformis Nucleus in Brain Stem. J Ardabil Univ Med Sci. 2012; 12(3): 265-275. (Full Text in Persian)

در این مطالعه پژوهشی، نقش درجه بندی شده سیستم  $GABA_A$  در قالب بررسی های آنتاگونیستی آن سیستم بر خواص ضد دردی هسته میخی شکل<sup>۲</sup> در ساقه مغز مورد آزمایش واقع شده است.

## روش کار

### روشهای آزمایشگاهی ارزیابی درد

#### درد حاد<sup>۳</sup>

روشهای متفاوتی برای ارزیابی درد حاد مورد استفاده قرار می گیرند. اساس بیشتر آزمونهای مرسوم درد حاد نظیر پس کشیدن دم<sup>۴</sup> و صفحه داغ<sup>۵</sup> یک محرک فزیک با شدت بالاست [۹]. در آزمون پس کشیدن دم حرارت بر سطح پشتی دم در فاصله ۵ سانتیمتری از نوک آن متمرکز شده و فاصله زمانی بین شروع تحریک و پس کشیدن دم ثبت می گردد. در آزمون صفحه داغ موشها بر روی یک صفحه داغ که بطور الکتریکی دمای آن کنترل می شود ( $5 \pm 0.5^\circ C$ ) قرار می گیرند، و تاخیر<sup>۶</sup> در لیسیدن پاها، پرش، کوبیدن پاها بر سطح و لنگیدن حیوان ثبت می شود [۱۰].

#### روش جراحی

برای شروع آزمایشات، اولین کار جراحی جهت کانول گذاری در مغز و نهایتاً هسته مورد نظر (یعنی CnF) بود. حدود ۴۰ موش از جنس نر و از نژاد N-MRI بودند که از موسسه رازی خریداری شده بودند. موشهایی که برای جراحی و آزمایشات بعدی تزریق دارو مورد استفاده قرار گرفتند، وزن متوسط ۳۵۰-۲۵۰ گرم داشته اند. حیوانات در اتاقی با نور معمولی ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت اتاق حدود  $23 \pm 1$  درجه سانتی گراد

کفلها می تواند باعث تخریب بافتی شود، زیرا خونرسانی به پوستی که تحت فشار وزن بدن است قطع می شود. تحت شرایط متفاوت بافتها می توانند به وسیله رفلکسهای پس کشیدن، فرار، بی حرکت سازی قسمت آسیب دیده یا اجتناب از رویارویی با محرکهای مضر مشابه در آینده محافظت شوند [۱]. اندامهای حسی برای درد انتهای عصبی برهنه هستند که تقریباً در تمام بافتهای بدن یافت می شوند. ایمپالسهای درد بوسیله دو سیستم از فیبرها به سیستم عصبی مرکزی انتقال داده می شوند یک سیستم از فیبرهای میلین دار نازک گروه A- $\Delta$  دلتا به قطر ۲ تا ۵ میکرومتر تشکیل شده که سرعت هدایت آنها ۱۲ تا ۳۰ متر در ثانیه است. سیستم دیگر از فیبرهای بدون میلین گروه C با قطر ۰/۴ تا ۱/۲ میکرومتر تشکیل شده است. این فیبرها ایمپالسها را با سرعت پایین ۰/۵ تا ۳ متر در ثانیه هدایت می کنند. هر دو نوع فیبر در شاخ خلفی ختم می شوند. اتصالات سیناپسی بین فیبرهای محیطی درد و سلولهای شاخ خلفی نخاع، مکانهایی برای انجام شکل پذیری درخور توجه هستند. به همین علت، شاخ خلفی موسوم به یک دروازه<sup>۱</sup> می باشد. جائیکه ایمپالسهای درد می توانند دروازه بندی یا به عبارتی تعدیل شوند [۲].

سالهاست که هسته CnF به عنوان بخشی از سیستم صعودی درد مد نظر بوده است [۲،۳]. CnF در کنترل پیامهای دردزا نقش ایفا می کند [۲]. علاوه بر این، مسیرهای عصبی از همه قسمت های PAG و لایه عمقی برجستگی های فوقانی به CnF وارد می شوند [۴،۵]. با توجه به مطالعات هیستولوژیکی انجام گرفته در مغز موش، معلوم شده که نورونهای متراکم از GABA-T در نواحی پل مغزی و بصل النخاع وجود دارند [۶]. با توجه به این نکته می توان گفت که CnF بیشتر به عنوان یک هسته تسهیل برای تنظیم درد از نواحی فوقانی به نواحی تحتانی تا نخاع می باشد [۷،۸].

<sup>1</sup> Gate

<sup>2</sup> Cuneiformis

<sup>3</sup> Acute Pain

<sup>4</sup> Tail Flick

<sup>5</sup> Hot Plate

<sup>6</sup> Latency

می‌شد. دستگاهی که برای این آزمایش استفاده گردید دستگاهی به همین نام است. این دستگاه، قسمت‌های مختلفی از جمله حسگر<sup>۵</sup> و لامپ ایجادکننده حرارت با شدت‌های مختلف داشت.

### گروه‌های مورد آزمون

در این طرح تحقیقی از گروه‌های زیر برای آزمایش بررسی اثر ضددردی در هسته CnF استفاده شد.

۱- گروه کنترل: این گروه شامل ۱۵ موش نر با وزن متوسط ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم بود. بعد از آنکه هر کدام از موشها بمدت ۵ دقیقه در محفظه مخصوص<sup>۶</sup> قرار گرفتند آزمون TF در دقایق ۲، ۷، ۱۲، ۱۷، ۲۲ و ۲۷ و به فواصل ۵ دقیقه‌ای گرفته شد.

۲- گروه شم<sup>۷</sup>: این گروه شامل ۱۱ موش نر با وزن متوسط ۲۵۰-۳۵۰ گرم بود. قبل از آزمایش روی این گروه، موشها مورد عمل جراحی و کانول گذاری قرار گرفته و بعد از یک هفته، آزمون TF در دو نوبت انجام گرفت.

۳- گروه دریافت کننده اختصاصی گابا A گروه بیکوکولین<sup>۸</sup>: که خود شامل چهار زیر گروه به شرح زیر است:

الف) گروه ۱۲/۵ نانوگرمی بیکوکولین: این گروه شامل ۷ موش نر با وزن متوسط ۲۵۰-۳۵۰ در نوبت اول TF در دقایق ۵ و ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ صورت گرفت در فاصله بین دو نوبت TF تزریق ۱۲/۵ نانوگرم در ۰/۵ میلی لیتر bic انجام شد.

ب) گروه ۲۵ نانوگرمی: شامل ۱۰ موش نر - وزن ۲۵۰-۳۵۰ گرم. بعد از نوبت اول TF در دقایق ۵ و ۱۰ و ۱۵ و ۲۰، مقدار ۲۵ نانوگرم در ۰/۵ میلی لیتر bic تزریق گردید (به هسته) و در دقایق ۲ و ۷ و ۱۲ و ۱۷ و ۲۲ و ۲۷ TF انجام گرفت.

نگهداری می‌شدند. حیوانات به آب و غذا دسترسی کامل داشتند.

بعد از آنکه حیوانات توزین می‌شدند برحسب وزن‌شان به آنها ماده بیهوشی تیوپنتال تزریق می‌شد. در این آزمایش برای اینکه موشها در حین و بعد از عمل جراحی دچار مشکلات تنفسی از قبیل جمع شدن ترشحات در راههای هوایی نگردند و دچار مرگ نشوند. ماده بیهوشی در کمترین اندازه ممکن جهت القاء بیهوشی تزریق می‌شد. بنابراین برای بیهوش کردن موشها از غلظت داروئی ۵۵-۶۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن استفاده گردید.

حیوان بیهوش شده به روی دستگاه استریوتاکسی انتقال می‌یافت. برای پیدا کردن نقطه مورد نظر در روی جمجمه جهت رسیدن به هسته CNF از اطلس واتسون- پاکسینوس استفاده شد [۱۱]. برای رسیدن به هسته مورد نظر باید مختصات سه بعدی هسته از اطلس مذکور استخراج می‌شد و با مینا قرار دادن نقطه برگما (محل تلاقی استخوانهای آهیانه و پیشانی)، مختصات این نقطه یعنی برگما را از نظر قدامی خلفی<sup>۱</sup> و جانبی<sup>۲</sup> یادداشت و سپس با کمک اطلس مختصات سه بعدی هسته CnF تعیین و مشخص می‌شد. بعد از تعیین نقطه مورد نظر توسط مته استخوان سوراخ می‌گردید تا اینکه به سخت شامه<sup>۳</sup> دسترسی و توسط یک عدد سوزن معمولی، سخت شامه پاره و برداشته می‌شد و سپس کانول راهنما به نوک سوزن مخصوص دستگاه استریوتاکسی متصل و ثابت می‌شد و بعداً کانول راهنما توسط دستگاه استریوتاکسی پایین آورده می‌شد.

### آزمایش بی‌دردی

در این تحقیق برای آزمایش بی‌دردی از قسمت شکمی دم حیوان به روش پس کشیدن دم<sup>۴</sup> استفاده

<sup>5</sup> Sensor

<sup>6</sup> Restrainer

<sup>7</sup> Sham-Operated

<sup>8</sup> Bicucculline=bic

<sup>1</sup> AnterioPosterior (AP)

<sup>2</sup> Lateral (L)

<sup>3</sup> Dura Mater

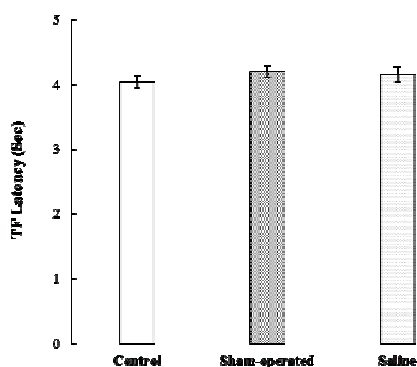
<sup>4</sup> Tail Flick

نباشد از تست غیرپارامتریک فریدمن<sup>۶</sup> استفاده می‌شد.

### یافته‌ها

#### بررسی تفاوت زمانهای پس‌کشیدن دم در گروههای کنترل، شَم و سالین

در این بررسی گروه کنترل گروهی است که بدون هیچگونه عمل جراحی و تزریق ماده دارویی زمان پس‌کشیدن دمشان (TFL) در دقایق مختلف گرفته شده است. در گروه شَم و سالین، عمل جراحی صورت گرفته است ولی فقط به گروه سالین به مقدار ۰/۵ میکرولیتر نرمال‌سالین (۰/۹٪) در محل هسته CnF تزریق شده است و TFL هر دو گروه متعاقباً ثبت شده است بطوریکه در شکل ۱ نیز ملاحظه می‌گردد تفاوت آماری معنی‌داری بین TFL های این سه گروه مشاهده نشد.



شکل ۱. بررسی نقش عمل جراحی و تزریق سالین (۰/۵ میکرولیتر) در هسته CnF بر میانگین زمان تأخیر پس‌کشیدن دم نسبت به گروه کنترل (n=11-15). داده‌ها به شکل میانگین و میانگین خطای معیار تمام دقایق مورد آزمایش بیان شده است (\*=معنی‌داری نسبت به گروه سالین ۰/۰۱ <math>p</math>)

#### نمودار خطی افزایش حداکثر ممکن اثردهی و وابسته به دوز آنتاگونیست

بطوریکه در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد اثرات بیکوکولین به عنوان آنتاگونیست رقابتی گیرنده‌های

(ج) گروه ۵۰ نانوگرمی: ۱۰ موش نر - وزن ۲۵۰-۳۵۰ گرم. در این گروه نیز همانند گروههای قبلی TF در نوبت قبل و بعد از تزریق دارو انجام گرفت، فقط تزریق دارو در اینجا برابر ۵۰ نانوگرم در ۰/۵ میلی لیتر bic بود.

(د) گروه ۱۰۰ نانوگرمی: ۱۲ موش نر وزن ۲۵۰-۳۵۰ گرم. در این گروه نیز TF در دو نوبت قبل و بعد از تزریق دارو صورت گرفت. تزریق دارو در اینجا ۱۰۰ نانوگرم در ۰/۵ میلی لیتر bic بود.

در این تحقیق، تزریق داروی bic به طریق وابسته به دوز<sup>۱</sup> تزریق شده است. بعد از گرفتن زمانهای پس‌کشیدن دم (TFL) در گروهها و دقایق مختلف، داده‌ها به صورت درصد افزایش اثرات نشان داده می‌شد که اصطلاحاً حداکثر درصد ممکن اثردهی<sup>۲</sup> نامیده می‌شود و از طریق فرمول زیر بدست می‌آید:

$$\%MPE = \frac{\text{Post drug latency (s)} - \text{base line latency (s)}}{\text{TFL cut off time (10 s)} - \text{base line latency (s)}}$$

### آنالیز آماری

داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  خطای معیار بیان شده و برای مقایسه زمان تأخیر پس‌کشیدن دم (TFL) در گروههای مختلف در دقایق مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه<sup>۳</sup> و Post-hoc، Tukey و در صورتی که زمان تأخیر پس‌کشیدن دم در تعداد زیادی از موشها بیش از ۱۰ ثانیه بود. در موشهای آزمایش شده از آزمون غیرپارامتریک کروسکال والیس<sup>۴</sup> استفاده می‌شد. جهت بررسی اختلاف درون گروهی از آزمون آنالیز واریانس اندازه گیریهای مکرر<sup>۵</sup> استفاده گردید که با Post-hoc، Tukey همراه بود. در صورتیکه توزیع داده‌ها نرمال

<sup>1</sup> Dose-Dependent

<sup>2</sup> Maximum Possible Effect %MPE

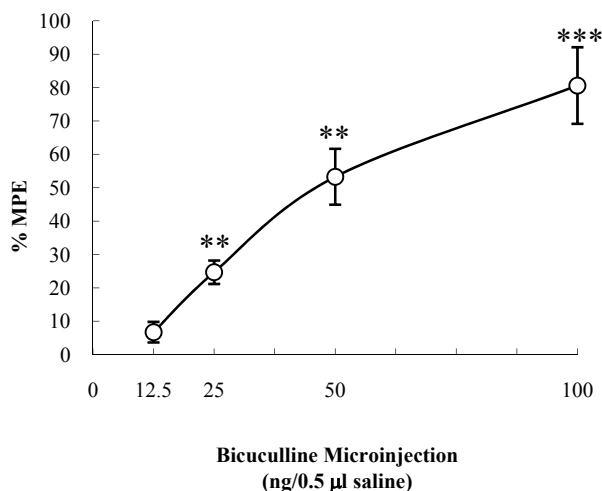
<sup>3</sup> ANOVA

<sup>4</sup> Kruskal-wallis

<sup>5</sup> Repeated measures

<sup>6</sup> Friedman

اثردهی بیکوکولین در حدود ۸۰ درصد به دست آمده است و مقایسه آماری نشان می‌دهد که اختلاف بین اثردهی بیکوکولین در این گروه با گروه کنترل ( $MPE=0\%$ )، معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.0001$ ). نکته دیگری که در این شکل دیده می‌شود اختلاف آماری فاحشی بین حداکثر ممکن اثردهی بیکوکولین در چهار گروه مورد آزمون مشاهده می‌شود.



شکل ۲. نمودار خطی و مقایسه حداکثر اثردهی ممکن (%MPE) بیکوکولین در دوزهای مختلف بر حسب %MPE (n=7-12). داده‌ها به شکل میانگین و میانگین خطای معیار (Mean ± SEM) تمام دقایق مورد آزمایش بیان شده است (سطح معنی‌داری  $p < 0.05$ )

**نمودار خطی افزایش حداکثر ممکن اثردهی و وابسته به دوز آنتاگونیست گیرنده‌های  $GABA_A$**

**بیکوکولین در دقایق مختلف پس از تزریق**

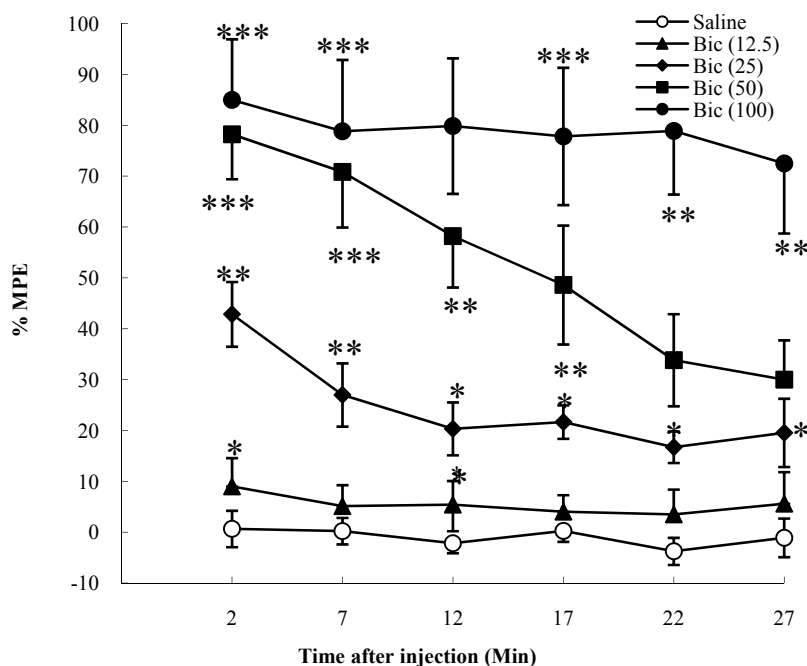
همانطوری که در شکل ۳ ملاحظه می‌گردد چهار گروه وابسته به دوز مورد استفاده قرار گرفته است. گروه اول که شامل ۷ موش است مقدار ۱۲/۵ نانوگرم به ازای ۰/۵ میکرولیتر نرمال سالین (۰/۹٪) داروی بیکوکولین به داخل هسته CnF تزریق شده است و حداکثر میزان اثردهی ممکن به درصد (%MPE) کمتر از ۱۰ درصد می‌باشد و این میزان افزایش اثر ناشی از تزریق داخل‌هسته‌ای

$GABA_A$  در ایجاد اثر ضددردی در هسته CnF به صورت وابسته به دوز در چهار گروه با دوزهای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم بررسی شده است. در این بررسی، از کل حداکثر ممکن اثردهی بیکوکولین در هر کدام از داده‌های یک گروه در دقایق و موشهای مختلف، میانگین گرفته شده است و به صورت درصد حداکثر ممکن اثردهی (%MPE) مربوط به همان گروه نشان داده شده است. در حقیقت %MPE مربوط به یک گروه و با دوز مربوطه‌اش، میانگین ادغام شده داده‌های همان گروه در دقایق مختلف و تعداد موشهای مربوط به همان گروه می‌باشد.

با توجه به شکل مشاهده می‌گردد که حداکثر ممکن اثردهی در گروهی که بیکوکولین با دوز ۱۲/۵ نانوگرم در ۰/۵ میکرولیتر نرمال سالین تزریق داخل هسته‌ای شده، کمتر از ۱۰ درصد می‌باشد. بررسی آماری نشان می‌دهد که اگر این مقدار افزایش اثردهی بیکوکولین در گروه ۱۲/۵ نانوگرمی با نسبت  $MPE=0\%$  که نمایانگر حالت کنترل می‌باشد مقایسه گردد، معنی‌دار نمی‌باشد. در گروه دوم این بررسی، بیکوکولین با دوز ۲۵ نانوگرم در ۰/۵ میکرولیتر نرمال سالین تزریق داخل هسته‌ای شده است و مقدار حداکثر ممکن اثردهی این دوز دارویی در ایجاد بی‌دردی در حدود ۲۵ درصد می‌باشد و در مقایسه آماری، تفاوت اثردهی بیکوکولین در این گروه با حالت  $MPE=0\%$  معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.01$ ). در گروه سوم این بررسی دوز ۵۰ نانوگرم به ازای ۰/۵ میکرولیتر نرمال سالین، بیکوکولین به داخل هسته CnF تزریق شده و حداکثر ممکن اثردهی به دست آمده حدود ۵۳ درصد می‌باشد که اختلاف معنی‌داری در افزایش اثردهی بیکوکولین را نشان می‌دهد ( $p < 0.01$ ). گروه چهارم این بررسی تزریق داخل هسته‌ای بیکوکولین به مقدار ۱۰۰ نانوگرم در ۰/۵ میکرولیتر نرمال سالین در هسته CnF می‌باشد. حداکثر ممکن

رفته و نهایتاً در دقیقه ۲۲ و ۲۷ به حدود ۲۷ درصد رسیده که باز نسبت به گروه سالین معنی‌دار بوده است ( $p < 0.05$ ). در این بررسی مشاهده می‌شود که هم با افزایش اثردهی بیکوکولین و هم با وجود تحلیل رفتگی نهایی، اثر دارو در این دو در حد بالاتری از گروه ۱۲/۵ نانوگرمی قرار گرفته است که این نشان‌دهنده وابسته به دوز بودن اثر ضددردی آنتاگونیست گیرنده‌های  $GABA_A$  در هسته CnF می‌باشد. گروه سوم شامل ۱۰ موش است. در این گروه مقدار داروی آنتاگونیستی بیکوکولین که به داخل‌هسته CnF تزریق شده است ۵۰ نانوگرم در ۰/۵ میکرولیتر نرمال سالین بوده است. در اینجا نیز اثردهی وابسته به دوز دارو افزایش یافته است که البته در اینجا میزان اثردهی در همه دقایق نسبت به گروه سالین معنی‌دار بوده است ( $p < 0.01$ ).

بیکوکولین، در این گروه فقط در دقیقه ۲ و ۱۲ نسبت به گروه سالین معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ). گروه دوم شامل ۱۰ موش، و مقدار بیکوکولین تزریق شده به داخل هسته CnF ۲۵ نانوگرم در ۰/۵ میکرولیتر نرمال سالین بوده است. در این گروه همانطور که در شکل مشاهده می‌شود هم میزان اثر بیکوکولین افزایش یافته و هم دوام اثر بیکوکولین در مهار گیرنده‌های  $GABA_A$  در طی دقایق بعدی نسبت به گروه اول بیشتر بوده است. بطوریکه در شکل ملاحظه می‌گردد بیشترین مقدار درصد اثردهی ممکن ناشی از تزریق داخل‌هسته‌ای این مقدار دارو، در دقیقه ۲ و ۷ حادث شده که در حدود ۴۵ درصد می‌باشد که با گروه سالین معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.01$ ). ولی این مقدار اثردهی در طی دقایق بعدی یعنی از دقیقه ۱۲ تا دقیقه ۲۷ تحلیل



شکل ۳. بررسی اثرات تزریق بیکوکولین در دوزهای مختلف بر %MPE.

داده‌ها به صورت میانگین و میانگین خطای معیار برای هر گروه وابسته به دوز بیان شده است. \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$  \*  $p < 0.05$ .

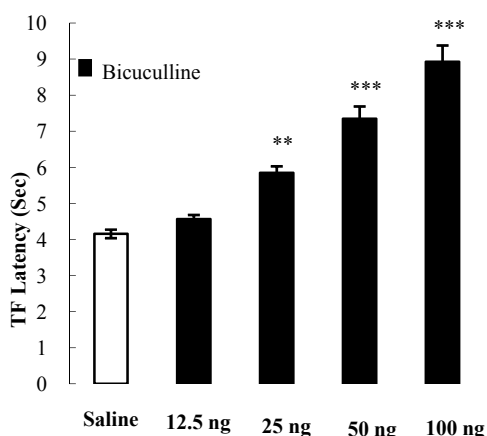
بنابراین موقعی که TF‌های گرفته شده از ثانیه دهم فراتر می‌رفتند TF آخرین حد ممکن یعنی ۱۰ در

با توجه به اینکه زمان Cut off در این طرح پژوهشی در همه‌گروهها، ثانیه دهم در نظر گرفته شده.

- دومین گروه وابسته به دوز بیکوکولین (۲۵) نانوگرم در ۰/۵ میلی لیتر سالین) میانگین TFL تمامی دقایق آن در حدود ۶±۰/۸ ثانیه می باشد که این اختلاف با گروه سالین تفاوت معنی داری دارد ( $p < 0.01$ ).

- سومین گروه وابسته به دوز (۵۰ نانوگرم در ۰/۵ میلی لیتر سالین) میانگین TFL دقایق مختلف آن، در حدود ۷/۵±۰/۳ ثانیه می باشد که این اختلاف نسبت به گروه سالین معنی دار هست ( $p < 0.001$ ).

- چهارمین گروه وابسته به دوز (۱۰۰ نانوگرم در ۰/۵ میلی لیتر سالین) بطوریکه در شکل مشاهده می گردد میانگین TFL های این گروه در دقایق متفاوت، در حدود ۹±۰/۶ ثانیه می باشد. مقایسه آماری اختلاف بین این گروه با گروه سالین را معنی دار نشان می دهد ( $p < 0.001$ ).



شکل ۴. مقایسه آماری اثرات تزریق بیکوکولین در دوزهای مختلف در هسته CnF بر میانگین زمان تأخیر پس کشیدن دم (TFL) نسبت به گروه سالین (۰/۵ میکرولیتر). داده ها بصورت میانگین و میانگین خطای معیار (Mean + SEM) تمام دقایق آزمایش بیان شده است ( $n=12-7$ ). از روش آماری ANOVA که باآزمون Tukey برای مقایسه چندگانه دنبال می شد استفاده گردید. معنی داری نسبت به گروه سالین  $p < 0.001$  \*\*\*  $p < 0.01$  \*\*

#### بحث

در مطالعات قبلی، معلوم شده بود که تحریک قسمت دمی هسته CnF بیشتر به مهار نورونهای هسته بزرگ سجافی منجر می گردید [۱۳]. در این طرح

نظر گرفته می شد. در این گروه چند تا از موشها TF شان در دقایق ۲، ۷ و ۱۲ بیشتر از ۱۰ ثانیه بود و بنابراین TF اینگونه موشها ۱۰ محسوب می گردید و احتمالاً همین بالابودن TF در دقایق ابتدایی بعضی موشها، سبب شده است که تفاوت بین اثردهی بیکوکولین در دقایق ابتدایی و انتهایی، قابل توجه باشد. گروه چهارم از ۱۲ تا موش استفاده شده است. مقدار داروی بیکوکولین که به صورت تزریق به داخل هسته CnF تزریق گردیده، ۱۰۰ نانوگرم در ۰/۵ میکرولیتر نرمال سالین می باشد. باز در اینجا اگر مقایسه آماری بین دقایق مختلف گروه ۱۰۰ نانوگرمی با گروه سالین صورت بگیرد ملاحظه می شود که بین این دو گروه اختلاف اثردهی در حد بالایی معنی دار می باشد ( $p < 0.01$ ). در این گروه به دلیل مقدار زیاد داروی تزریق شده، اختلاف اثردهی بیکوکولین در دقایق مختلف گروه معنی دار نمی باشد.

#### بررسی اثر وابسته به دوز بیکوکولین نسبت به تأخیر زمان پس کشیدن دم (TFL) بر حسب ثانیه

همانطوری که در شکل ۴ نشان داده شده است گروههای مختلف آزمایش شده، TFL های مختلف و وابسته به دوز بیکوکولین را دارند. در این بررسی با افزایش دوز بیکوکولین اثر ضد دردی بیکوکولین به صورت افزایش زمان پس کشیدن دم (TFL) نشان داده شده است. در این شکل میانگین TFL دقایق مختلف هر گروه به صورت ستونی نشان داده شده است. همانطوری که مشاهده می شود TFL های گروه سالین در حد ۴/۲±۰/۶ ثانیه می باشد و این گروه بعنوان گروه کنترل در نظر گرفته شده و گروههای دیگر با این گروه مقایسه شده است.

- اولین گروه وابسته به دوز تزریق بیکوکولین (۱۲/۵ نانوگرم در ۰/۵ میلی لیتر سالین) میانگین TFL در دقایق مختلف، حدود ۷/۵±۰/۴ ثانیه می باشد ولی این اختلاف که با گروه سالین معنی دار نمی باشد.

پژوهشی نیز، بکارگیری آنتاگونیست گیرنده‌های  $GABA_A$  باعث تأخیر در رفلکس‌های پس‌کشیدن دم می‌گردد که نشان‌دهنده نقش هسته CnF در بی‌دردی می‌باشد. مقایسه مطالعات بافت‌شناسی قبلی در هسته CnF نشان می‌دهد که آورانها و وابرانهای این هسته از ساختمانهای اطراف هسته به طور کلی مجزا می‌باشند. بطوریکه توسط واتسون و پاکسینوس تعریف شده است اصطلاح هسته CnF بیشتر به قسمت دمی این هسته مربوط می‌گردد و از بخش منقاری هسته بیشتر بعنوان هسته عمقی مزانسفال نام برده می‌شود [۱۲]. با این تعریف هسته CnF از سمت نوک تا هسته اکلوموتور و از آنجا تا قسمت شکمی بصل‌النخاع امتداد دارد [۱۳]. در آزمایشات قبلی نشان داده شده است که بعد از ۵ دقیقه از تحریک الکتریکی CnF در موش بیدار به افزایش قابل توجهی در زمان پس کشیدن دم تحریک منجر گردیده است [۱۴، ۱۵]. بنابراین با توجه به آزمایشات قبلی، معلوم می‌شود که تعبیر علت اثرات رفتاری تحریک CnF به وجود صرفاً مشکلات حرکتی و حسی، نادرست می‌باشد. در آزمایشات انجام گرفته قبلی معلوم شده است که هسته CnF برای تنظیم درد با نواحی آنتومیکی که در تنظیم درد نقش دارند، در ارتباط می‌باشد. این نواحی شامل هسته‌های مرکزی تالاموس مثل هسته سجافی بزرگ، هسته مگنوسلولار<sup>۱</sup> و سیستم‌های حرکتی مثل جسم سیاه در قاعده مغز می‌باشند [۱۶، ۱۷، ۱۸]. به همین طریق، تحریک CnF باعث مهار پاسخ نوروهای حساس به درد شاخ خلفی نخاع به تحریکات دردزا و کاهش دامنه رفلکس خم‌کنندگی عضلات می‌گردد، پس عملکرد هسته CnF در تنظیم و ایجاد حالت بی‌دردی به نظر می‌آید که ناشی از اثرش بر سیستم‌های حسی و حرکتی باشد [۱۶، ۱۸].

در این طرح مطالعه، موقعی که تزریقات وابسته به دوز بیکوکولین به داخل هسته CnF انجام شد

رفلکس‌های وابسته به دوز مهار گردید. در دوزهای پایین‌تر بیکوکولین، اثر ضددردی ایجاد شده، از حداکثر اثر و دوام اثر کمتری برخوردار بود ولی در دوزهای بالاتر اثرات ضددردی مشهودتر بود. همچنین در این طرح پژوهشی بعد از دقیقه ۱۲، دوام اثر حالت بی‌دردی دارو سیرنزولی داشت و این شاید به علت پایین بودن نیمه عمر آنتاگونیست گیرنده‌های  $GABA_A$  و پاکسازی از محل سیناپس نورون باشد. در مطالعات انجام گرفته قبلی مشخص شده است که هسته CnF و جسم خاکستری دور قناتی از نظر آنتومیکی و عملکردی، مشابهت دارند. مطالعات پژوهشی همچنین نشان می‌دهد که اثرات ضددردی PAG و هسته CnF مشترکاً از طریق ناحیه RVM و NRM (هسته سجافی بزرگ) صورت می‌گیرد و از این طریق بر شاخ خلفی نخاع اثر می‌گذارند [۱۸، ۱۹]. در این پژوهش، استفاده از بیکوکولین بعنوان آنتاگونیست گیرنده‌های  $GABA_A$ ، اهمیت نقش ماده میانجی GABA در هسته CnF را مشخص می‌کند به طوریکه تزریق بیکوکولین باعث ایجاد حالت بی‌دردی می‌شود و این حالت بی‌دردی احتمالاً به علت اشغال‌شدن گیرنده‌های  $GABA_A$  توسط داروی بیکوکولین در نوروهای واسطه هسته CnF انجام و نهایتاً موجب مهار مسیر گابارژیک باشد که به سلولهای off-cell ختم می‌گردند و بدین ترتیب سلولهای off-cell از قید مهارشدگی نوروهای گابارژیک رها و در نتیجه فعال شده و ایجاد حالت بی‌دردی می‌کنند. ولی ناحیه و نوع نورون واسطه داخل هسته CnF که داروی بیکوکولین بر آن اثر می‌کند معلوم نیست [۲۰].

### نتیجه گیری

این بررسی نشان داد که هسته CnF به طور غیرمستقیم در ایجاد بی‌دردی نقش دارد و تزریق داخل هسته‌ای آنتاگونیست گیرنده  $GABA_A$  نیز

<sup>1</sup> Magnocellular



نشان می‌دهد که هسته CnF از طریق مسیر گابارژیک باعث ایجاد حساسیت به درد می‌گردد.

## References

- 1- Cleeland CS, Gonin R, Hatfield AK, Edmonson JH, Blum RH, Stewart JA, et al. Pain and its treatment in outpatients with metastatic cancer. *New Engl J Med*. 1994 Mar;330(9):592-6.
- 2- Abols I, Basbaum A. Afferent connections of the rostral medulla of the cat: A neural substrate for midbrain-medullary interactions in the modulation of pain. *J Comp Neurol*. 1981 Sep;201(2):285-97.
- 3- McMahan S, Wall P. Electrophysiological mapping of brainstem projections of spinal cord lamina I cells in the rat. *Brain Res*. 1985 Mar; 333(1): 19-26.
- 4- Zemlan FP, Behbehani MM. Afferent projections to the nucleus cuneiformis in the rat. *Neurosci Lett*. 1984 Mar;52(1-2):103-9.
- 5- Kirouac GJ, Li S, Mabrouk G. GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*. 2004 Dec;469(2):170-84.
- 6- Nagai T, Maeda T, Imai H, McGeer P, McGeer E. Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat hindbrain. *J Comp Neurol*. 1985 Jan;231(2):260-9.
- 7- Heinricher M, Morgan M, Tortorici V, Fields H. Disinhibition of off-cells and antinociception produced by an opioid action within the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*. 1994 Mar;63(1):279-88.
- 8- Rezvanipour M, Safari T, Abbasnezhad M. A study on the effect of intracuneiformis nucleus microinjection of gabaa receptor agonist and antagonist on antinociceptive effects of morphine by formalin test in rat. *Journal of kerman university of medical sciences*. 2004 Oct;11(4): 212-18. (Full text in persian)
- 9- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992 Mar;51(1):5-17.
- 10- Kristensen JD, Karlsten R, Gordh T, Berge OG. The NMDA antagonist 3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP) has antinociceptive effect after intrathecal injection in the rat. *Pain*. 1994 Mar;56(1):59-67.
- 11- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*: Academic press; 2007(6): 98-106.
- 12- Taber E. The cytoarchitecture of the brain stem of the cat. I. Brain stem nuclei of cat. *J Comp Neurol*. 1961 Feb;116(1):27-69.
- 13- Zemlan FP, Behbehani MM. Nucleus cuneiformis and pain modulation: anatomy and behavioral pharmacology. *Brain research*. 1988 Jun;453(1-2):89-102.
- 14- Sandkühler J, Gebhart G. Characterization of inhibition of a spinal nociceptive reflex by stimulation medially and laterally in the midbrain and medulla in the pentobarbital-anesthetized rat. *Brain Res*. 1984 jul;305(1):67-76.
- 15- Dostrovsky J, Hu J, Sessle B, Sumino R. Stimulation sites in periaqueductal gray, nucleus raphe magnus and adjacent regions effective in suppressing oral-facial reflexes. *Brain Res*. 1982 Dec;252(2):287-97.
- 16- Carstens E, Watkins L. Inhibition of the responses of neurons in the rat spinal cord to noxious skin heating by stimulation in midbrain periaqueductal gray or lateral reticular formation. *Brain Res*. 1986 Sep;382(2):266-77.
- 17- Al-Rodhan N, Chipkin R, Yaksh TL. The antinociceptive effects of SCH-32615, a neutral endopeptidase (enkephalinase) inhibitor, microinjected into the periaqueductal, ventral medulla and amygdala. *Brain Res*. 1990 Jun;520(1-2):123-30.
- 18- Gray BG, Dostrovsky JO. Descending inhibitory inferences from periaqueductalgray, nucleus raphe magnus and adjacent reticular formation. I. Effects on lumbar spinal cord nociceptive and nonnociceptive neurons. *J Neurophysiol* 1983 Oct;49:932-47.

- 19- Arnault P, Roger M. The connection of the peripeduncular area studied by retrograde and anterograde transport in the rat. *J Comp Neurol*. 1987 Oct;258(3):463-76.
- 20- Haghparast A, Naderi N, Khani A, Lashgari R, Motamedi F. Formalin-Induced Differential Activation of Nucleus Cuneiformis Neurons in the Rat: An Electrophysiological Study. *The J Pain*. 2010 Jan;11(1):32-43.

## Dose-Dependent Effect of GABA<sub>A</sub> System on Antinociception Actions of Cuneiformis Nucleus in Brain Stem

Sheikhkanlou Milan H\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology & Pharmacology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

\* Corresponding Author. Tel: +98914 461 6071 Fax: +98451 551 0057 E-mail: hshmilan@gmail.com

Received: 11 July 2012

Accepted: 1 October 2012

### ABSTRACT

**Background & Objective:** It's been considered that midbrain region namely rostral ventromedial medulla (RVM) is the coring point of modulation of pain. The periaqueductal gray (PAG) matter has been documented to act as antinociceptive along with RVM. However, there are evidences demonstrating that RVM get a few connections from the cuneiformsnucleus (CnF) which might indicate CnF does have the same mechanism as PAG. Thus in this study, we tried to explore the antinociception effects of CnF and GABA<sub>A</sub> circuits.

**Methods:** Rats were anesthetized with Thiopental drug. Using the stereotaxic apparatus and Paxinos atlas, the point representing for CnF location over the scalp has been designated. One week after the surgery, rats were fully prepared for tests. Animals were put in three groups. First for control group, 0.5 µl of normal saline was injected into the CnF. Later, a few nanograms of bicuculline (as a GABA<sub>A</sub> antagonist) were administered into the CnF, dose dependently.

**Results:** From the results, it has been shown that CnF has a role in antinociception effect since the injection of bicuculline increased tail flick latency (TFL) and even further increased TFL when administered dose dependently (with high doses).

**Conclusion:** According to results of current study, CnF has a significant role in pain modulation and circuits of GABAergic system also plays a key role on its antinociception effect.

**Key Words:** Nucleus Cuneiforms; Morphine; Bicuculline; GABA<sub>A</sub> Receptors; Pain Modulation