Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(96): 80-92

The Antinociceptive Effects of Iranian Cobra Snake Venom using Formalin Test

Zahra Hadi Chegeni[1], Shahrbanoo Oryan[2], Abbas Zare Mirak Abadi[3*], Azam Bakhtiarian[4], Somayyeh Akbari[1], Giti Ghamami[4], Khadijeh Nazari[1]

1- Kharazmi University, Tehran, Iran.
2- Department of Biology, Kharazmi University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Department of Venomous animals and Antivenom Production, Karaj Razi Serum Making Institute, Karaj, Iran.
4- Department of pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 9 Dec 2014, Accepted: 28 Jan 2015

Abstract

Background: There have been numerous reports of snake venoms being employed as analgesics in attempts to relieve severe pain associated with cancer, immune dysfunction and viral infections. This study investigates the antinociceptive effects of iranian cobra snake venom (Naja naja oxiana*)* in comparison with morphine and lidocain on laboratorial femal mice.

Materials and Methods: This study has been done on 48 NMRI female mice of 18-20 g in weight. Antinociceptive activeity of snake venom was evaluated by formalin test. In this test, the animals were divided into 6 groups (each group consisting of 8 mice): Sham, positive Control (receiving morphine at dose of 5 mg/kg, and receiving lidocain at dose of 20 mg/kg), and experimental groups receiving venom at doses of 1, 3 and 4/5 µg/mice. In all groups, the formalin test was recorded for 60 min after administration of venom and drugs in mice. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey test.

Results: The results showed that the venom of *Naja naja oxiana* decreased nociception meaningfully in both acute and chronic phases. We also showed that this venom revealed even a better analgesic activity in comparison with morphine and lidocain.

Conclusion: This study showed that the antinociceptive effect of the venom was mediated through central nervous system and peripheral mechanisms. Although details of the mechanism remain unclear, and further studies should be considered to demonstrate its therapeutic effects.

Keywords: Formalin test, Morphine, Mice, Pain, Snake venom

*Corresponding Author:
Address: Department of Venomous animals and Antivenom Production, Karaj Razi Serum Making Institute, Karaj, Iran
Email: Abbaszare83@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۳ (شماره پیاپی۹۶)، خرداد ۱۳۹۴، ۹۲-۸۰

اثرات ضد دردی سم مار کبری ایرانی با استفاده از آزمون فرمالین

زهرا هادی چگنی[۱]، شهربانو عریان[۲]، عباس زارع میرک آبادی[۳*]، اعظم بختیاریان[۴]، سمیه اکبری[۱]، گیتی غمامی[۵]، خدیجه نظری[۱]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه حیوانات سمی و تولید پاد زهر، موسسه سرم سازی رازی کرج، کرج، ایران
۴- استاد، گروه فارماکولوژی، علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵- کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: گزارش‌های بی‌شماری در مورد استفاده از سموم مارها جهت تخفیف درد همراه با سرطان، اختلال در سیستم ایمنی و عفونت‌های ویروسی وجود دارد. در این تحقیق اثر ضددردی سم مار کبرای ایرانی (ناجا ناجا اکسیانا) در مقایسه با مورفین و لیدوکائین در موش سوری آزمایشگاهی ماده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی از ۴۸ سر موش سوری ماده نژاد NMRI با وزن ۱۸ تا ۲۰ گرم استفاده شد. فعالیت ضد دردی سم مار به وسیله آزمون فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تست حیوانات به ۶ گروه (هر گروه شامل ۸ موش) شاهد، کنترل مثبت (دریافت کننده مورفین با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و لیدوکائین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه‌های تجربی دریافت کننده سم با دوزهای ۱، ۳ و ۴/۵ میکروگرم به ازای هر موش تقسیم شدند. در همه گروه‌ها، تست فرمالین برای ۶۰ دقیقه بعد از تزریق سم و داروها در موش ثبت شد. داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که سم مار ناجاناجا اکسیانا، موجب کاهش معنی‌دار درد هم در فاز حاد و هم در فاز مزمن می‌شود. هم‌چنین مشخص شد که این سم، اثر ضد دردی بهتری نسبت به مورفین و لیدوکائین دارد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که سم مار ناجاناجا اکسیانا اثر ضد دردی خود را از طریق سیستم عصبی مرکزی و مکانیسم‌های محیطی اعمال می‌کند، هرچند جزئیات مکانیسم عمل آن ناشناخته است و مطالعات بیشتری برای تعیین اثرات درمانی آن مورد نیاز می‌باشد.

واژگان کلیدی: فرمالین تست، مورفین، موش سوری، درد، سم مار

***نویسنده مسئول:** کرج، موسسه سرم سازی رازی کرج، گروه حیوانات سمی و تولید پادزهر
Email: zareabbas83@gmail.com

مقدمه

درد تجربه حس ناخوشایندی است که در اثر آسیب بافتی حاد یا بالقوه ایجاد می‌گردد و به عنوان شاخصی برای شناسایی بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود. درد مزمن یک مشکل رو به رشد در بهداشت عمومی است. در حال حاضر حدود ۲۹ درصد از کانادایی‌ها از درد مزمن رنج می‌برند. پیش‌بینی‌ها بر این است که در دو دهه آینده از سه نفر کانادایی یک نفر دچار درد مزمن خواهد شد. در حال حاضر میلیون‌ها کانادایی در حال مصرف داروهای مسکن هستند، اما با این حال بعضی از افراد قادر به کنترل درد خود نمی‌باشند. درد مقاوم به درمان، یک دلیل عمده رنج و ناتوانی در جامعه ماست. پزشکان درد مزمن را به عنوان نشانه‌ای از بیماری یا آسیب می‌دانند، شواهدی وجود دارد که درد می‌تواند منجر به مرگ شود. هم‌چنین نشان داده شده که درد کنترل نشده عملکرد سیستم ایمنی بدن را مختل کرده و باعث ترویج رشد تومور می‌شود. درد مزمن به ویژه اگر با افسردگی همراه باشد می‌تواند خطراقدام به خودکشی را افزایش دهد(۱).

آمار ارقام هشدار دهنده در جهان نشان می‌دهد که بیش از ۵۰ درصد از بیماران هنوز از درد شدید و غیر قابل تحمل بعد از جراحی و تروما رنج می‌برند. در حال حاضر درمان درد باید اولویت بیشتری داشته باشد. در سال ۱۹۹۵ هیئت آمریکایی‌ها، درد را به عنوان پنجمین علامت حیاتی اعلام کردند، این امر منجر به ارزیابی اجباری و معالجه درد در بیمارستان‌ها شد. بنابراین مشاهده می‌گردد که تحقیقات برای اداره نمودن درد از چه اهمیتی برخوردار است. تاکنون تلاش‌های موثر زیادی در زمینه شناخت مکانیسم‌های درد و درمان انواع آن توسط محققان و پزشکان صورت گرفته است(۱). در حال حاضر کنترل درد با استفاده از داروهای ضد درد اپیوئیدی و داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی صورت می‌گیرد. داروهای ضد درد اپیوئیدی به ویژه مرفین کارایی بالایی در تسکین درد حاد و مزمن دارند(۲، ۳). این داروها اثرات خود را با اثر بر سه گیرنده اوپیوئیدی مو، کاپا و دلتا واقع در سیستم عصبی مرکزی به ویژه نخاع شوکی و ساقه مغز اعمال می‌کنند، اما با القای تحمل و وابستگی فیزیکی و هم‌چنین افزایش حساسیت نسبت به درد یا هایپرآلرژی باعث بروز اثرات ناخواسته می‌شوند و بنابراین باید در مصرف آنها احتیاط نمود(۲، ۳). هم‌چنین، داروهای ضد درد ملایم‌تر مانند داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSADIs) شناخته شده‌اند که اثر خود را از طریق جلوگیری از سنتز ایکوزانوئیدها (مانند پروستاگلاندین‌ها) به وسیله‌ی مهار آنزیم سیکلواکسیژناز (Cyclo-oxygenase-COX) اعمال می‌کنند و باعث مهار درد در مراحل اولیه آن و در قسمت محیطی می‌شوند(۴، ۵). استفاده طولانی مدت از آنها منجر به ایجاد تحمل یا وابستگی نمی‌شود، اما با مهار COX باعث بروز عوارض گوارشی مانند خونریزی در دستگاه گوارش می‌شوند(۶). با توجه به آثار زیان بخش داروهای شیمیایی و پرداخت هزینه‌های گزاف برای تهیه آنها محققان در پی یافتن داروهای جدیدی در زمینه کاهش درد هستند تا عوارض کمتری نسبت به داروهای موجود داشته باشند.

ترس از مار ریشه در بسیاری از فرهنگ‌ها دارد، اما قرن‌هاست که زهر مار برای انسان به عنوان درمان شناخته شده است. اعتقاد به خاصیت دارویی زهر از گذشته‌های دور وجود داشته است، ولی چون در آن زمان‌ها از وجود زهر و غده آن اطلاعی نداشتند، لذا از لاشه مار سمی برای درمان استفاده می‌کردند. اما امروزه از بزاق یا به عبارتی همان زهر می‌توان انواع داروها، سرم و واکسن تهیه کرد(۷، ۸). زهر مارها خاصیت اسیدی دارد و وزن مخصوص آن بین ۱۰۳۰ تا ۱۰۷۰ کیلو دالتون می‌باشد، هم‌چنین از مجموعه‌ای شامل، پروتئین‌های سمی مانند نوروتوکسین، کاردیوتوکسین و سیتوتوکسین‌ها، میوتوکسین‌ها، مواد منعقد کننده و ضدانعقادی و آنزیم‌هایی مانند پروتئازها، اکسیدازها، فسفولیپازها و غیره تشکیل شده است که در بین تمام زهرهای طبیعی بیشترین پیچیدگی را

دارد(۹، ۱۰). شرمان و همکاران در مشاهدات خود دریافتند که زهر مار افعی مالزی دارای خاصیت رقیق کنندگی خون است و می‌تواند در درمان بیماران مبتلا به حمله قلبی موثر باشد. زهر مار دارای خاصیت ضد تشنجی است. هم‌چنین کالمت و همکاران از زهر مار کبرا برای تولید داروهای جدید درمان سرطان در موش استفاده کردند(۱۱).

در سال ۱۹۰۰، سموم مارها جهت تسکین درد همراه با سرطان پیشرفته استفاده شدند. چندین گزارش مبنی بر اثر ضد دردی گونه‌های مختلف سموم کبرا اعلام شده است. متچ نشان داد که زهر مار کبرا در دوزهای بسیار کم دارای اثر ضد درد است(۱۱).

هم‌چنین در سال ۱۹۹۸ مانسین و همکاران با استفاده از دو تست هات پلیت و اسید استیک رایتینگ نشان دادند که *Crotamine* یک نوروتوکسین جدا شده از سم *durissus terrificus Crotalus* است که حتی در دوزهای به شدت کم هم دارای اثر ضد دردی قوی‌تری نسبت به مورفین می‌باشد. هم‌چنین نشان دادند که اثر ضد دردی این سم از طریق نالوکسان بلوک می‌شود، لذا پیشنهاد کردند که از طریق مکانیسم اوپیوئیدی اثر ضد دردی را اعمال کند(۱۲، ۱۳). اخیرا ژانگ و همکاران نشان دادند که نوروتوکسین بزرگ دیگری از سم *durissus terrificus Crotalus* دارای اثرات آنتی توموری نیز هست که اثرات ضد دردی را جداگانه اعمال می‌کند و با استیل سالیسیلیک اسید هم افزایی دارد. این توکسین باعث کاهش درد در بیمارانی با تومورهای جامد در فاز یک می‌شود. این مطالعات نشان داد که نوروتوکسین‌های سموم مارها می‌توانند پایه‌ای برای درمان‌های مدرن تسکین درد باشد(۱۴).

زهر مار *ناجا ناجا اکسیانا* مختص به خانواده *Elapidea* (کبراها) و در نتیجه عصب گراست(۱۵). از تیره الاپیده دو نوع کبرا به نام‌های *ناجا ناجا اکسیانا* و *والترنینزیا اژپتیا* در ایران یافت می‌شود که به علت پراکندگی بیشتر جنس *ناجا*، مطالعه را در مورد این جنس انجام دادیم که محل زیست آن بیشتر در استان‌های خراسان و گرگان می‌باشد(۷). با توجه به اثرات درمانی زهر *ناجاناجا اکسیانا* و هم چنین عوارض جانبی و زیاد داروهای نارکوتیک، انجام مطالعه‌ای در زمینه اثرات بی‌دردی این سم ضروری به نظر می‌رسد. به علت عدم گزارشی مبنی بر اثرات ضد دردی این گونه، در این مطالعه اثر سم خام مار *ناجا ناجا اکسیانا* به روش آزمون فرمالین در دو فاز حاد و مزمن در موش سوری ماده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

حیوانات و شرایط آزمایش

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. در مطالعه تجربی حاضر، سم خام *ناجا ناجا اکسیانا* از موسسه سرم سازی کرج تهیه شد و مقدار ۱ میلی‌گرم از زهر لیوفلیز شده مار *ناجا ناجا اکسیانا* در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل شد و در ۱۰ تیوپ در یخچال ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا هنگام تزریق از آنها استفاده شود و تا زمان آزمایش در شرایط مناسب نگهداری شد. در این تحقیق، موش‌های ماده بالغ نژاد NMRI با محدوده وزنی ۱۸ تا ۲۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی تهران خریداری شدند و در شرایط مناسب آزمایشگاهی با درجه حرارت کنترل شده (۲±۲۳) درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی بین ۴۰ تا۶۰ درصد نگهداری شدند. حیوانات دسترسی مداوم به آب و غذا داشتند. میزان LD_{50} سم خام مار کبرای ایرانی ۷/۸ میکروگرم به ازای هر موش محاسبه گردید. موش‌ها به ۶ گروه ۸ تایی تقسیم شدند که گروه یک گروه کنترل (بدون مداخله) و گروه‌های دو، سه و چهار شامل موش‌هایی بودند که سم خام را در مقادیر حجمی ۱، ۳ و ۴/۵ میکرو گرم به ازای هر موش و به صورت درون صفاقی دریافت نمودند. گروه پنج و شش نیز شامل موش‌هایی بودند که داروی استاندارد مورفین و لیدوکائین را به ترتیب با دوز ۵ و ۲۰ میلی‌گرم به صورت درون

صفاقی دریافت نمودند. مورفین از شرکت دارو پخش ایران، لیدوکائین از شرکت داروسازی ابوریحان و هم‌چنین فرمالدهید از شرکت رومیل انگلیس خریداری شد.

فعالیت ضد دردی حیوانات با استفاده از تست فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت. یک ساعت قبل از تست، حیوانات در قفس استاندارد ۱۳×۱۲×۳۰ سانتی‌متر قرار داده شدند که به عنوان قفس مشاهده در نظر گرفته شد. ۲۰ دقیقه بعد از تزریق سم خام و داروها به صورت درون صفاقی، مقدار ۲۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد به صورت زیر جلدی به سطح پشتی پای راست حیوان تزریق شد. دوره‌های زمانی صفر تا ۵ دقیقه و سپس ۱۵ تا ۶۰ دقیقه به عنوان شاخص درد اندازه‌گیری شد. از آن جایی که لیسیدن پای عقبی به ندرت در رفتار طبیعی حیوان رخ می‌دهد، پاسخی که در صورت استفاده از پای عقبی ایجاد می‌شود، در مقایسه با پای جلویی بیشتر به درد اختصاص دارد(۶). مهم‌ترین ویژگی آزمون فرمالین این است که جوندگان دو پاسخ را به درد نشان می‌دهند که ظاهراً دو مکانیسم مختلف دارد: درد حاصله در ۵ دقیقه اول پس از تزریق فرمالین، درد حاد است. سپس حیوان بعد از ۱۰ دقیقه رفتار خاصی نشان نمی‌دهد تا این که حیوان دوباره شروع به لیسیدن کف پای عقبی می‌کند و درد حاصله در فاصله زمانی ۱۵ یا ۲۰ دقیقه تا ۶۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین که درد مزمن نام دارد(۶).

اساس نمره گذاری به شرح زیر می‌باشد:

امتیاز صفر: هر دو پنجه روی کف جایگاه قرار گرفته و وزن حیوان به طور مساوی روی آنها قرار دارد. حین حرکت نیز ترجیح اختیاری جهت استفاده از پنجه مقابل وجود ندارد.

امتیاز یک: پای تزریق شده به آرامی روی کف یا بخشی از بدن حیوان قرار گرفته و فشار کمی روی آن اعمال می‌شود و حین حرکت لنگش واضحی دیده می‌شود.

امتیاز دو: پای تزریق شده کاملا از کف جعبه برداشته شده و هیچ تماسی با سطح ندارد و پای مقابل محکم روی سطح قرار می‌گیرد.

امتیاز سه: پای تزریق شده را می‌لیسد، گاز می‌گیرد یا به شدت می‌لرزاند. در نهایت نمره درد به صورت ۱۰ بلوک ۵ دقیقه‌ای محاسبه می‌گردد و میانگین نمره درد در هر بلوک طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود(۶):

$$PainScore = \frac{OT_0 + 1T_1 + 2T_2 + 3T_3}{20}$$

در این فرمول T_0 و T_1 و T_2 و T_3 تعداد ۱۵ ثانیه‌هایی است که حیوان در یک دوره ۵ دقیقه‌ای به ترتیب رفتارهای ۰، ۱، ۲ و ۳ را نشان می‌دهد.

نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار در ۸ موش ارائه گردید. داده‌های به دست آمده با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (آنووای یک طرفه) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آزمون توکی برای مقایسه چند گروه و آزمون آماری تی تست برای مقایسه دو گروه با هم استفاده شد و $p<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها نیز از برنامه‌های Excel و Word 2010 استفاده شد. پس از اتمام آزمایش‌ها موش‌ها به روش قطع نخاع کشته شدند.

یافته‌ها

۱- رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین در کف پای حیوان در گروه کنترل: تزریق فرمالین سبب رفتارهای دردی شد که در بازه زمانی ۶۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین مشاهده شدند. این رفتارها از دو فاز تشکیل شده که این دو فاز از طریق اینترفاز از یکدیگر جدا می‌شوند. فاز اول از دقیقه صفر تا ۵ می‌باشد. بعد از فاز اول رفتارهای دردی طی مرحله اینترفاز که از دقیقه ۵ تا ۱۵ می‌باشد کاهش پیدا می‌کند. سپس فاز دوم شروع می‌شود که در این مرحله از دقیقه ۱۵ تا ۶۰ رفتارهای دردی رتبه بندی می‌گردد(شکل ۱).

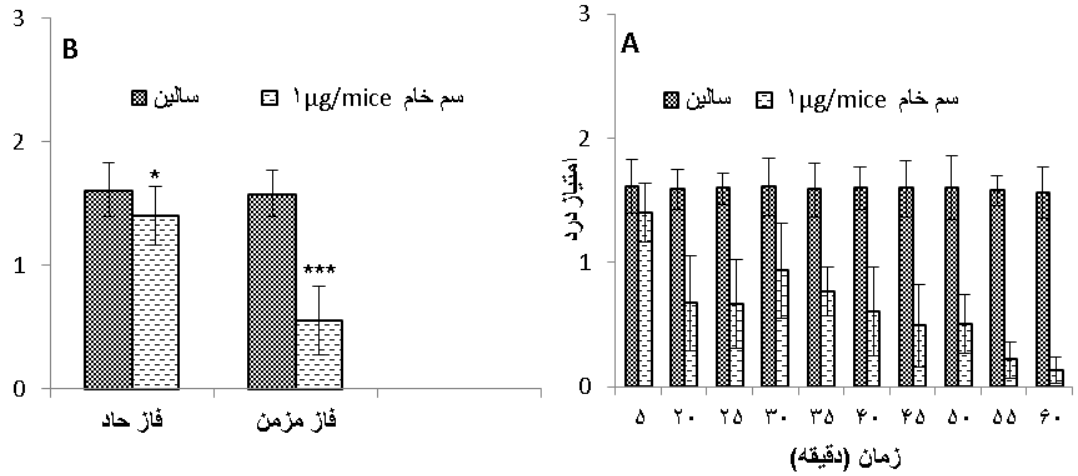
۲- اثر تزریق سم خام در دوز ۱ میکروگرم در موش بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین: شکل ۱ تأثیر تزریق سم خام با دوز ۱ میکروگرم در موش بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین را نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه کنترل، سبب کاهش معنی‌دار رفتارهای دردی در هر دو فاز آزمون فرمالین شد.

۳- اثر تزریق سم خام در دوز ۳ میکروگرم به ازای هر موش بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین: شکل۲ تأثیر تزریق سم خام در دوز ۳ میکروگرم به ازای هر موش بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین را نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه کنترل سبب کاهش معنی‌دار رفتارهای دردی در فاز اول و دوم آزمون فرمالین شد.

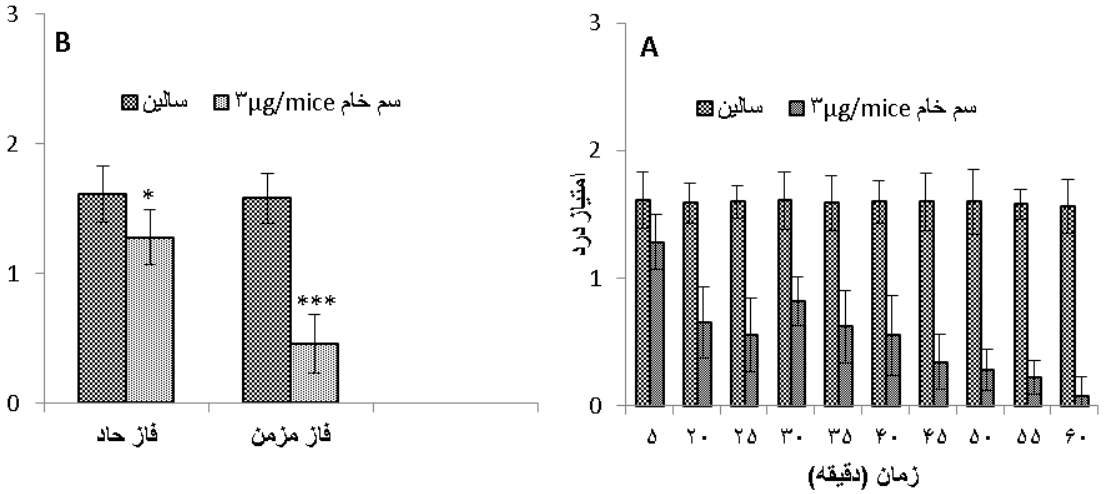
۴- اثر تزریق سم خام در دوز ۴/۵ میکروگرم به ازای هر موش بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین: شکل ۳، تأثیر تزریق سم خام در دوز ۴/۵ میکروگرم به ازای هر موش بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین را نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه کنترل سبب کاهش معنی‌دار رفتارهای دردی در هر دو فاز آزمون فرمالین شد.

۵- مقایسه اثر دوزهای مختلف سم خام با مورفین بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین: شکل ۴ مقایسه اثر دوزهای مختلف سم خام با مورفین بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین را نشان می‌دهد که اثر تزریق سم خام در دوزهای مختلف بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین قابل توجه می‌باشد و نسبت به مورفین بهتر عمل می‌کند. بر اساس تست توکی بیشترین اثر ضد دردی سم خام در فاز حاد و مزمن تست فرمالین، مربوط به دوز ۴/۵ میکروگرم است. بر اساس تست توکی در این دو فاز دوزهای ۱، ۳ و ۴/۵ میکروگرم و گروه دریافت کننده مورفین، تفاوت معنی‌داری با هم داشتند. در هر دو فاز درد، اثر ضد دردی سم نیز با افزایش میزان دوز تزریقی افزایش یافت، از این رو دوز ۴/۵ بیشترین اثر ضد دردی را نشان داد.

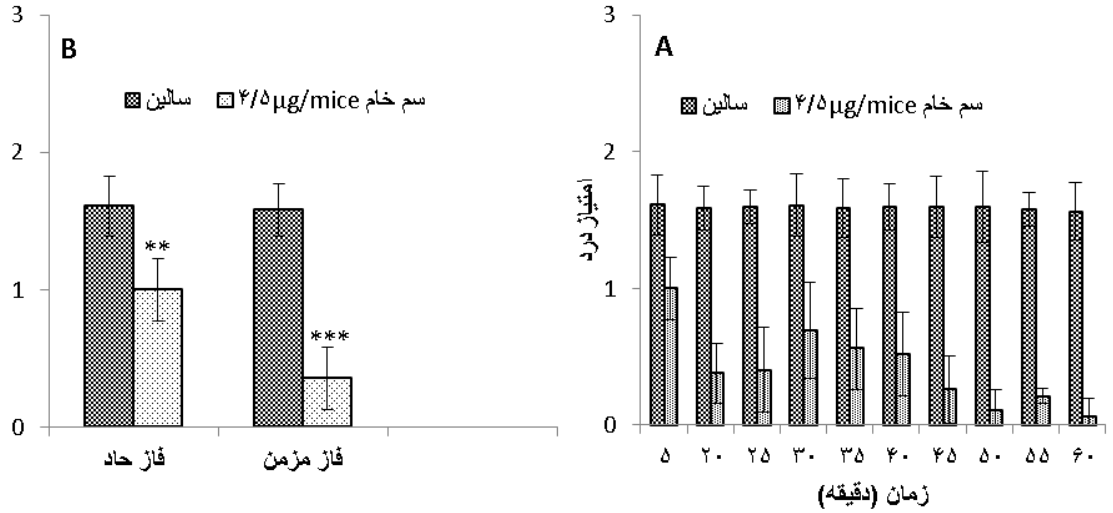
۶. مقایسه اثر دوزهای مختلف سم خام *ناجا ناجا اکسیانا* با لیدوکائین بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین: شکل ۵ مقایسه اثر دوزهای مختلف سم خام با لیدوکائین بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین را نشان می‌دهد که اثر ضد دردی سم خام در دوزهای مختلف بر رفتارهای دردی ناشی از فرمالین نسبت به لیدوکائین بهتر است. بر اساس تست توکی دو فاز مزمن و حاد دوزهای ۱، ۳ و ۴/۵ میکروگرم و گروه دریافت کننده لیدوکائین، تفاوت معنی‌داری با هم داشتند. فاز حاد لیدوکائین در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد($p>۰/۰۵$). لذا لیدوکائین بر خلاف سم فقط توانست رفتارهای دردی را در فاز مزمن کاهش دهد.



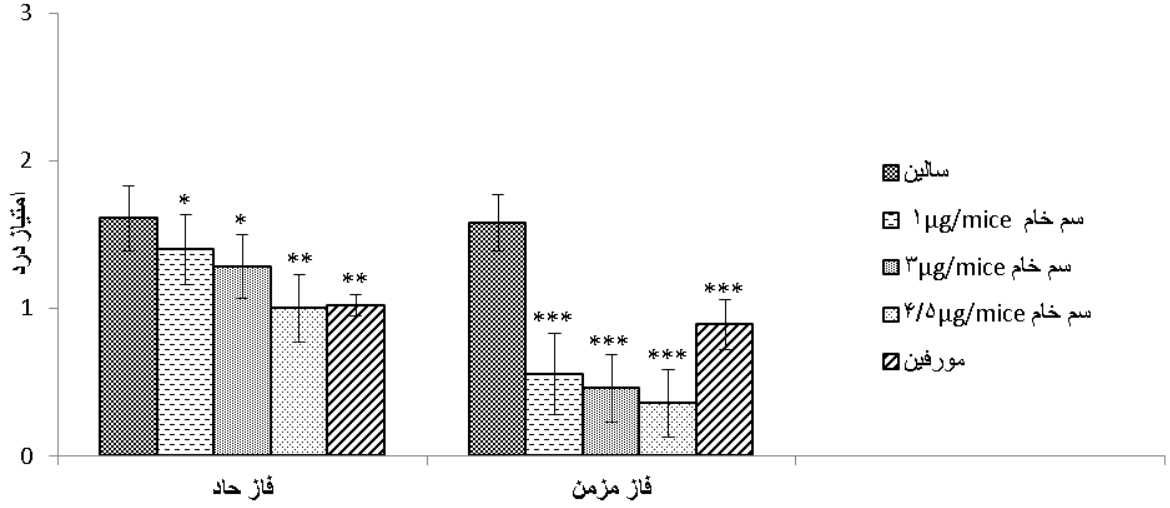
شکل ۱. اثر تزریق سم خام در دوز ۱میکروگرم به ازای هر موش بر روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین برای مدت زمان ۶۰ دقیقه (A) و نمودار ستونی میانگین نمره آزمون فرمالین در فاز ۱ و فاز ۲ آزمون فرمالین (B)، (*p<۰/۰۵; ***p<۰/۰۰۱).



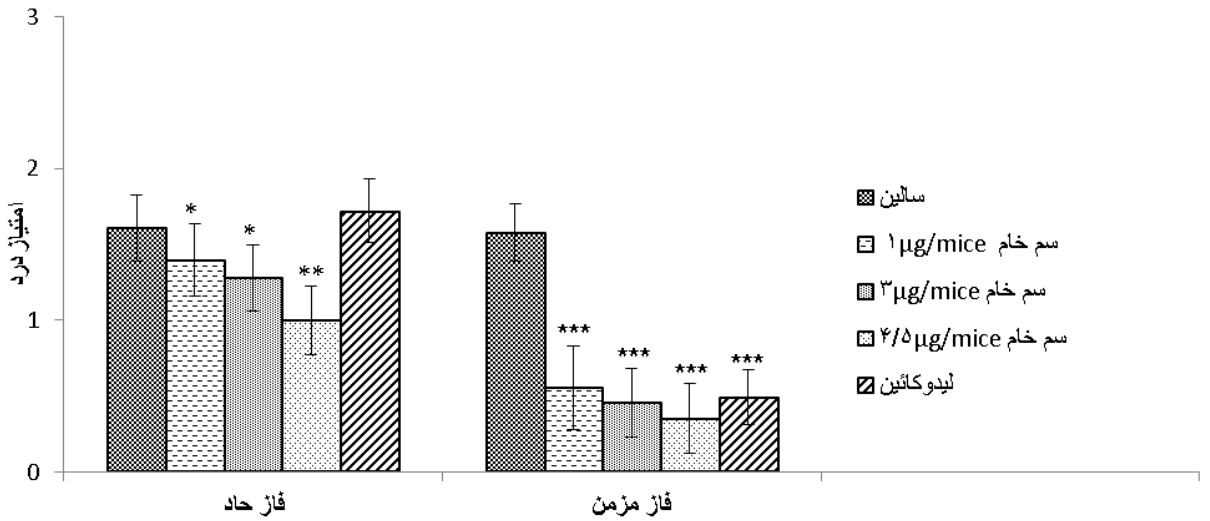
شکل ۲. اثر تزریق سم خام در دوز ۳ میکروگرم به ازای هر موش بر روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین برای مدت زمان ۶۰ دقیقه (A) و نمودار ستونی میانگین نمره آزمون فرمالین در فاز ۱ و فاز۲ آزمون فرمالین (B)، (*p<۰/۰۵; ***p<۰/۰۰۱).



شکل ۳. اثر تزریق سم خام در دوز ۴/۵ بر روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین برای مدت زمان ۶۰ دقیقه (A) و نمودار میانگین نمره آزمون فرمالین در فاز ۱و فاز ۲ آزمون فرمالین (B)، (*p<۰/۰۰۱ ;**p<۰/۰۱).**



شکل ۴. مقایسه اثر دوزهای مختلف سم خام با مورفین و گروه کنترل بر روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین، نمودار ستونی میانگین نمره آزمون فرمالین در فاز ۱و فاز ۲ آزمون فرمالین، (*p<۰/۰۰۱;**p<۰/۰۱; *p<۰/۰۵).**



شکل ۵. مقایسه اثرات دوزهای مختلف سم خام با لیدوکائین و گروه کنترل بر روی رفتارهای دردی ناشی از تزریق فرمالین، نمودار میانگین نمره آزمون فرمالین در فاز ۱ و فاز ۲ آزمون فرمالین، (p<۰/۰۰۱*;p<۰/۰۱** ;p<۰/۰۵*).**

تست فرمالین یک مدل پذیرفته شده از ایجاد درد متوسط و مداوم است و از این جهت که آسیب بافتی ایجاد می‌کند به دردهای بالینی نزدیک‌تر است. مهم‌ترین ویژگی تست فرمالین ایجاد رفتارهای درد دو فازی است. اولین فاز غالباً در اثر فعال سازی فیبرهای C می‌باشد که مرحله حاد درد را منعکس می‌کند. اثر تولید شده در فاز اولیه احتمالاً منجر به اثرات فوری و مستقیم آنها بر گیرنده‌های حسی، گیرنده‌های برادی کینین یا مسیر گلوتاماترژیک می‌گردد. مکانیسم‌های فاز ثانویه‌ی پاسخ فرمالین به نظر می‌رسد که به فرآیندهای التهابی محیطی و تغییرات عملکردی در شاخ پشتی طناب نخاعی مربوط باشد. این مطالعات بر نقش ضروری ورودی‌های آوران در محل‌های محیطی در فاز ثانویه و اثر آنها در تولید و حفظ فاز ثانویه تاکید می‌کند(۱۸-۱۶).

الگوی دو مرحله‌ای تست فرمالین که بازتاب دو فرایند آسیب شناختی متفاوتی است، این امکان را فراهم می‌کند تا مکانیسم‌های موثر احتمالی در بی‌دردی روشن گردند. داروهایی که اثرات ضد دردی آنها مکانیسمی مرکزی دارند، تقریبا به یک اندازه هر دو فاز تست فرمالین را تحت

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سم خام مار *ناجا ناجا اکسیانا* همانند مورفین بر روی هر دو فاز تست فرمالین اثر گذاشته و باعث کاهش معنی‌داری در بروز علائم ناشی از ترزیق فرمالین می‌گردد. اما لیدوکائین فقط قادر به مهار فاز ثانویه دردی است که از طریق تست فرمالین القا می‌شود و می‌توان نتیجه گرفت که لیدوکائین به صورت محیطی اثر ضد دردی خود را اعمال می‌کند.

با پیدایش علوم جدید و صنایع داروسازی تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تولید داروهای ضد درد صناعی به عمل آمده است. اما به علت عوارضی که این داروها به دنبال دارند گرایش افراد به استفاده از داروهایی با منبع طبیعی هم‌چنان پابرجاست. به همین دلیل اخیرا محققان درصدد بررسی علمی اثرات داروهای سنتی بر آمده‌اند و مدل‌های مختلفی جهت ارزیابی اثرات ضد دردی این داروها ارائه شده است که یکی از آنها استفاده از آزمایش فرمالین برای ارزیابی دردهای مزمن است.

اخیرا نشان داده شده است که بی‌حس کننده‌های کتامین و ترامادول جریانات نیکوتینی ایجاد شده به وسیله رسپتورهای آلفا-۷ بیان شده در تخمک‌های زنوپوس را مهار می‌کنند(۲۶). محققان به این نتیجه رسیدند که کتامین رسپتورهای پس سیناپسی نیکوتینی و هم‌چنین جریانات داخلی لیگاند دریچه دار را نیز مهار می‌کند(۲۷). کتامین باعث مهار برانگیختگی نیکوتین پیش سیناپسی تسهیل کننده آزاد سازی گلوتامات می‌شود(۲۸). گزارشات حاکی است که آلفا توکسین اثرات کتامین را مهار می‌کند. آلفا کبرا توکسین (CTX) یک نوروتوکسین با زنجیره‌ی بلند است و همولوگ آلفا توکسین که در سیستم عصبی محیطی یافت می‌شود دارای میل ترکیبی زیاد در مغز است نه در ساقه مغز(۲۸ ،۲۹). چنین اثبات شده است که زیر واحد آلفا-۷ می‌تواند یون‌های Ca را هدایت کند که در نتیجه اثر مستقیمی بر آزاد سازی نوروترنسمیتر دارد. هرچند هنوز مشخص نیست که آیا چنین نوروتوکسینی با زنجیره بلند می‌تواند به CNS برسد و اثر ضد دردی را اعمال کند یا خیر(۳۰).

اثرات ضد دردی چندین سموم دیگر شناخته شده است که با یافته‌های این پژوهش مبنی بر ضد درد بودن سم مار *ناجا ناجا اکسیانا* هم خوانی دارد از جمله:

در سال ۲۰۰۶ چن و همکاران با استفاده از دو تست هات پلیت و اسید استیک رایتینگ نشان دادند که CTX از *Thailand Cobra(Naja Kaouthia)* در دوزهای ۳۰، ۴۵ و ۶۸ میکروگرم بر کیلوگرم دارای اثر ضد دردی است که پیک این اثر ۳ ساعت بعد از تزریق سم مشاهده می‌شود. این اثرات ضد دردی از طریق سیستم عصبی مرکزی و بدون ارتباط با مسیرهای اوپیوئیدی اعمال می‌شود(۳۱).

در سال ۲۰۰۸، جیانگ و همکاران با استفاده از دو تست هات پلیت و اسید استیک رایتینگ نشان دادند که تزریق درون صفاقی سم خام ناجا ناجا آترا در دوزهای ۰/۱۱۱، ۰/۲۲۲و ۰/۴۴۴ میلی گرم بر کیلوگرم و نوروتوکسین جدا شده تأثیر قرار می‌دهند. در حالی که داروهای ضد دردی که به صورت محیطی عمل می‌کنند، فاز تاخیری تست فرمالین را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهند(۱۸-۱۶).

اثر ضد دردی سم خام در هر دو فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین، احتمال این که سم خام ب‌تواند علاوه بر تاثیر مرکزی با اثر گذاری بر سیستم اعصاب محیطی اثرات ضد دردی از خود نشان دهد را نیز تقویت می‌کند. اثر ضد دردی سم مار *ناجا ناجا اکسیانا* در این آزمون یک اثر محیطی بود، هرچند یک اثر مرکزی نیز درهیپوتالاموس مطرح گردید(۱۹، ۲۰).

در مطالعات مختلف نشان داده شده که مرکز لوکوس سوولئوس که منبع اصلی نورآدرنرژیکی سیستم عصبی مرکزی است، به لحاظ ورودی‌ها و خروجی‌های زیادی که دارد می‌تواند در واکنش درد نقش داشته باشد. این مرکز به عنوان بخش اصلی سیستم کنترل درد نزولی نورآدرنرژیکی، نقش مهمی را در مهار درد در سطح نخاع ایفا می‌کند(۱۹، ۲۰). هم‌چنین در مطالعات مختلف نشان داده شده که این هسته در درد حاد ناشی از فرمالین دخالت داشته و در صورت تخریب الکتریکی آن افزایش درد در حیوان دیده نمی‌شود(۲۱). هم‌چنین گزارش شد که مرکز لوکوس سرولئوس در فاز دوم درد آزمون فرمالین حیوان هوشیار نقش‌های مختلفی را در ارتباط با کنترل پاسخ‌های داده شده به آزمون فرمالین ایفا می‌کند(۲۲).

نوروتوکسین‌ها جزء ترکیبات اصلی زهر مارهای خانواده کبرا هستند که باعث بلوک شدن گیرنده‌های استیل کولین وابسته به نیکوتین در اتصالات عصبی- عضلانی می‌شوند. گزارشات حاکی است که یک آلفا- نوروتوکسین پس سیناپسی با زنجیره نسبتاً کوتاه که از سم مار ناجا ناجا آترا استحصال گردیده است، دارای فعالیت ضد دردی است(۲۵-۲۳). این توکسین به طور مرکزی و مستقل از مکانیسم اوپیوئیدی اثر ضد دردی را ایجاد می‌کند(۲۵). از طرف دیگر،

میکروگرم خودداری شد. از طرف دیگر، به علت نزدیک‌تر شدن دوزهای بالاتر از ۴/۵ میکروگرم به دوزهایی که سبب مرگ حیوانات می‌شد، دوزهای بالاتر را بررسی نکردیم. هم‌چنین دوزهای اعلام شده به عنوان ضد درد با توجه به مطالعات بافتی که انجام دادیم فاقد اثرات مخرب بافتی بر روی اندام‌های مختلف بدن موش بودند.

نتیجه‌گیری

هر چند مکانیسم اثر سم مار ناجاناجا اکسیانا مشخص نیست و اظهار نظر قطعی در این زمینه نیاز به تحقیقات بیشتر دارد، اما با توجه به نتایج پژوهش‌های انجام شده بر روی انواع سموم دارای اثرات ضد درد و وجود نوروتوکسین‌ها در این سموم و با توجه به اثر آن بر سیستم اعصاب مرکزی و محیطی، سم این مار احتمالا هم به صورت محیطی و هم به صورت مرکزی (نخاعی و فوق نخاعی) اثر تعدیلی بر درد داشته و منجر به افزایش مقاومت در برابر درد و کاهش پاسخ دهی به دردهای حاد و مزمن می‌شود. لذا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی تداخل سم با آنتاگونیست‌ها و آگونیست‌های موثر بر درد، جهت تعیین مسیرهای دقیق تاثیر سم، جدا سازی و شناسایی فراکسیون‌های مختلف این سم جهت تعیین جزء فعال عامل ضد درد و هم‌چنین اثر احتمالی ضد التهابی این توکسین مطالعه شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر پرتوآذر، مهندس کاویانی و سرکار خانم دکتر اسلیمی جهت فراهم سازی امکانات برای انجام این مطالعه و هم‌چنین از کلیه پرسنل گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدر دانی می‌گردد.

از *Najanalgesin* در دوزهای۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم یک پاسخ دو فازی وابسته به دوز ایجاد کردند: یک فاز حاد، فاز اولیه ضد دردی و یک فاز تونیک، فاز ثانویه با اثر ضد دردی طولانی مدت، که فاز حاد ۰/۵ ساعت بعد از تزریق سم ظاهر می‌شود، سپس کم می‌شود و دوباره ۳ ساعت بعد از تزریق مشاهده می‌شود. هم‌چنین نشان دادند که اثر ضد دردی این سم هم از طریق سیستم کولینرژیک و هم از طریق سیستم اوپیوئیدرژیک اعمال می‌شود(۳۲).

بینه و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کردند که زهر مار ناجا ناجا دارای تعداد زیادی پپتید مقاوم به حرارت است، زیرا بعد از حرارت دیدن به مدت ۳۰۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۲ کاردیوتوکسین، نوروتوکسین و سیتوتوکسین متفاوت را به وسیله‌ی اسپکتوفوتومتری جرمی از آن جدا کردند و مورد بررسی قرار دادند. علیرغم آن که زهر، فعالیت توکسینی خود را ۶۰ دقیقه بعد از حرارت دیدن کاملا از دست می‌دهد و حرارت به عنوان تکنیکی ساده می‌تواند باعث خنثی سازی زهر مار کبرا شود، اما هنوز برخی از فعالیت‌های فارماکولوژیکی و بیولوژیکی خود را حتی بعد از گذشت ۳۰۰ دقیقه حفظ می‌کند، به طوری که در تست فرمالین موش، زهری که برای مدت۶۰ تا ۳۰۰ دقیقه حرارت دیده باشد فعالیت ضد درد بهتری نسبت به لیدوکائین از خود نشان می‌دهد(۳۳). مطالعات بینه نشان می‌دهد که می‌توان با حرارت دادن سموم کبرا اثرات آنها را خنثی کرد، به طوری که فقط اثر ضد دردی آن باقی بماند تا بتواند جانشینی مناسب برای مسکن‌های شیمیایی رایج باشد.

این مطالعات نشان داد که اثر ضد دردی سم *ناجاناجا اکسیانا* در دوزهای کم ۱، ۳ و ۴/۵ میکروگرم در مقایسه با مورفین و لیدوکائین قوی‌تر عمل می‌کند و می‌تواند جایگزینی مناسب برای بیماران وابسته به مورفین باشد. با توجه به این که سم مار کبرا در دوزهای بالا باعث شل شدن عضلات و اختلال در حرکات حیوان می‌شود، از تزریق سم خام بالاتر از دوز ۴/۵

منابع

1. Portenoy RK. Current pharmacotherapy of chronic pain. Journal of pain and symptom management. 2000;19(1):16-20.
2. Mangione MP, Crowley-Matoka M. Improving pain management communication: how patients understand the terms “opioid” and “narcotic”. Journal of general internal medicine. 2008; 23(9): 1336-8.
3. Law P, Loh H, Wei L-N. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. Neuropharmacology. 2004;47:300-11.
4. Rostom A, Dubé C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the US Preventive Services Task Force. Annals of internal medicine. 2007;146(5):376-89.
5. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacological reviews. 2004;56(3):387-437.
6. 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. 1978;4:161-74.
7. Cruz LS, Vargas R, Lopes AA. Snakebite envenomation and death in the developing world. Ethnicity & Disease. 2009;19(1):42-3.
8. Haji R. Venomous snakes and snake bite. Zoocheck Canada Inc. 2000.p.1-14.
9. Bailey P, Wilce J. Venom as a source of useful biologically active molecules. Emergency Medicine. 2001;13(1):28-36.
10. Williams D, Welton R. The composition and actions of Papua New Guinean snake venoms. Clinical Management of Snakebite in Papua New Guinea. 2000; 3: 1 -22.
11. Pal SK, Gomes A, Dasgupta S, Gomes A. Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. Indian journal of experimental biology. 2002;40(12):1353-8.
12. Mancin AC, Soares AM, Andrião-Escarso SH, Faça VM, Greene LJ, Zuccolotto S, et al. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. Toxicon. 1998; 36(12): 1927-37.
13. Rudd CJ, Viskatis LJ, Vidal JC, Etcheverry MA. In vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. Investigational new drugs. 1994;12(3):183-4.
14. Cura JE, Blanzaco DP, Brisson C, Cura MA, Cabrol R, Larrateguy L, et al. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA2, NSC-624244) in patients with advanced cancer. Clinical Cancer Research. 2002; 8(4): 1033-41.
15. Jamunaa A, Vejayan J, Halijah I, Sharifah S, Ambu S. Cytotoxicity of Southeast Asian snake venoms. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2012; 18(2): 150-6.
16. Sevostianova N, Danysz W, Bespalov AY. Analgesic effects of morphine and loperamide in the rat formalin test: interactions with NMDA receptor antagonists. European journal of pharmacology. 2005;525(1):83-90.
17. Garcıa M, Fernandez M, Alvarez A, Saenz M. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of Pimenta racemosa var. ozua (Mirtaceae). Journal of ethnopharmacology. 2004;91(1):69-73.
18. Zeashan H, Amresh G, Rao CV, Singh S. Antinociceptive activity of Amaranthus spinosus in experimental animals. Journal of ethnopharmacology. 2009;122(3):492-6.
19. Condés-Lara M. Different direct pathways of locus coeruleus to medial prefrontal cortex and centrolateral thalamic nucleus: electrical stimulation effects on the evoked responses to nociceptive peripheral stimulation. European Journal of Pain. 1998;2(1):15-23.
20. Sagen J, Proudfit HK. Effect of intrathecally administered noradrenergic antagonists on

nociception in the rat. Brain research. 1984; 310(2): 295-301.
21. Semnanian S, Dashti M. The effect of locus coeruleus lesioning on tonic and phasic pain. Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI). 1994;8(1):31-4.
22. Sajedianfard J, Khatami S, Semnanian S, Naghdi N, Jorjani M. In vivo measurement of noradrenaline in the locus coeruleus of rats during the formalin test: a microdialysis study. European journal of pharmacology. 2005;512(2):153-6.
23. Yang CC. Cobrotoxin: structure and function. Journal of natural toxins. 1999;8(2):221-33.
24. Grasset E. [The cobra neurotoxin; pharmacology and clinical applications in the treatment of pain.]. Medecine et hygiene. 1952; 10(212):55-8.
25. Chen R, Robinson SE. The effect of cholinergic manipulations on the analgesic response to cobrotoxin in mice. Life sciences. 1990; 47(21):1949-54.
26. Shiraishi M, Minami K, Uezono Y, Yanagihara N, Shigematsu A, Shibuya I. Inhibitory effects of tramadol on nicotinic acetylcholine receptors in adrenal chromaffin cells and in Xenopus oocytes expressing α7 receptors. British journal of pharmacology. 2002;136(2):207-16.
27. Irnaten M, Wang J, Venkatesan P, Evans C, Andresen M, Mendelowitz D. Ketamine inhibits presynaptic and postsynaptic nicotinic excitation of identified cardiac parasympathetic neurons in nucleus ambiguus. Anesthesiology. 2002; 96(3): 667-74.
28. Lukas RJ. Diversity and Patterns of Regulation of Nicotinic Receptor Subtypesa. Annals of the New York Academy of Sciences. 1995; 757(1):153-68.
29. Dajas-Bailador F, Costa G, Dajas F, Emmett S. Effects of α-erabutoxin, α-bungarotoxin, α-cobratoxin and fasciculin on the nicotine-evoked release of dopamine in the rat striatum in vivo. Neurochemistry international. 1998;33(4):307-12.
30. Léna C, Changeux J-P. Role of Ca2+ ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. The Journal of neuroscience. 1997; 17(2): 576-85.
31. Chen Z-x, Zhang H-l, Gu Z-l, Chen B-w, Han R, Reid PF, et al. A long-form α-neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia. Acta Pharmacologica Sinica. 2006; 27(4):402-8.
32. Jiang W-j, Liang Y-x, Han L-p, Qiu P-x, Yuan J, Zhao S-j. Purification and characterization of a novel antinociceptive toxin from cobra venom (Naja naja atra). Toxicon. 2008; 52(5):638-46.
33. Binh D, Thanh T, Chi P. Proteomic characterization of the thermostable toxins from Naja naja venom. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2010; 16(4):631-8.