Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(125): 29-38

The Antinociceptive Effect of 17β-estradiol in the Paragigantocellularis Lateralis Nucleus of Ovariectomized Female Rats Mediated by Estrogen Receptors

Roghaieh Khakpay[1*], Sanam Ansari[2], Fatemeh Khakpay[3]

1. Assistant Professor of Physiology, Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. M.Sc. Student of Physiology, Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Assistant Professor of Physiology, Cognitive and Neuroscience Research Center (CNRC), Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 18 Jul 2017, Accepted: 3 Sep 2017

Abstract

Background: Paragigantocellularis lateralis (LPGi) nucleus plays a key role in the processing of pain information related to the descending pain modulation. Also, 17β-estradiol is involved in the pain modulation. The aim of the present study was to investigate the role of estrogen receptors of LPGi nucleus in the 17β-estradiol-induced pain modulation in the ovariectomized rats.

Materials and Methods: In this study, the female Wistar rats (180-250 gr) were used. In order to study the role of the NMDA receptors in the 17β-estradiol-induced pain modulation in the ovariectomized rats, primarily, rats were bilaterally ovariectomized and immediately cannulation of LPGi nucleus was performed. First, drugs were injected and 15 minutes later 50 µl of 5% formalin was injected into the rat's hind paw; and then, formalin-induced paw jerking behavior was recorded for 60 min.

Results: Our results indicated that intra-LPGi injection of 17β-estradiol significantly attenuated paw jerking behavior in the both phases of formalin test. Intra-LPGi injection of estrogen receptor antagonist (ICI 182,780), had no effect on the paw jerking behavior. Pre-treatment of LPGi nucleus by ICI 182,780 counteracted the anti-nociceptive effect of 17β-estradiol both in the acute and in the chronic phases of formalin-induced paw jerking behaviour.

Conclusion: Based on the results of this study, it can be concluded that the intra-LPGi 17β-estradiol produces modest analgesia on the formalin-induced inflammatory pain in the ovariectomized rats, which is probably mediated via the esterogen receptors of this nucleus.

Keywords: Analgesia, Estrogen receptor, Ovariectomy, 17β-Estradiol.

*Corresponding Author:
Address: Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
E-mail: rkhakpai@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۸ (شماره پیاپی ۱۲۵)، آبان ۱۳۹۶، ۳۸-۲۹

اثرضددردی ۱۷بتا- استرادیول در هسته‌ی پاراژیگانتوسلولاریس کناری موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی‌شده به واسطه‌ی گیرنده‌های استروژنی

رقیه خاکپای[1*]، صنم انصاری[2]، فاطمه خاکپای[3]

۱. استادیار فیزیولوژی، گروه علوم‌جانوری، دانشکده‌ی علوم‌طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی، گروه علوم‌جانوری، دانشکده‌ی علوم‌طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و شناختی، واحد تهران پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۲۷ ، تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: هسته‌ی پاراژیگانتوسلولاریس کناری (LPGi) نقش مهمی در پردازش اطلاعات درد مربوط به مسیر تعدیل پایین‌روی درد ایفا می‌کند. ۱۷بتا-استرادیول نیز در تعدیل درد نقش دارد. در این مطالعه، نقش گیرنده‌های استروژنی هسته LPGi در تعدیل درد ناشی از ۱۷بتا-استرادیول در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از موش‌های صحرایی ماده‌ی نژاد ویستار (۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم) استفاده شد. برای بررسی نقش گیرنده‌های استروژن در تعدیل درد ناشی از ۱۷بتا-استرادیول در موش‌های صحرایی اوارکتومی‌شده، ابتدا موش‌های صحرایی به صورت دوطرفه اوارکتومی شده و بلافاصله کانول‌گذاری هسته‌ی LPGi انجام شد. ابتدا، داروها تزریق و پس از ۱۵ دقیقه ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۵ درصد به پنجه‌ی پای حیوان تزریق شد؛ سپس رفتار تکان دادن پای ملتهب ناشی از فرمالین به مدت ۶۰ دقیقه ثبت شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi سبب کاهش معنی‌دار رفتار تکان دادن پای ملتهب در هر دو فاز آزمون فرمالین می شود. تزریق آنتاگونیست گیرنده استروژن (ICI 182,780) به داخل هسته‌ی LPGi اثری بر روی رفتار تکان دادن پای ملتهب نداشت. پیش‌تیمار هسته LPGi با ICI 182,780 توانست اثر بی-دردی ناشی از ۱۷بتا-استرادیول روی تکان دادن پای ملتهب را هم طی فاز اول و هم در فاز دوم نسبت به گروه ۱۷بتا-استرادیول خنثی نماید.

نتیجه‌گیری: براساس یافته های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که تزریق ۱۷بتا-استرادیول به هسته LPGi بی‌دردی متوسطی را بر روی درد التهابی القا شده با فرمالین در موش‌های صحرایی اوراکتومی شده ایجاد می‌کند که احتمالاً از طریق گیرنده‌های استروژنی این هسته میانجی‌گری می‌شود.

واژگان کلیدی: بی‌دردی، ۱۷بتا- استرادیول، گیرنده‌ی استروژنی، اوارکتومی

* **نویسنده مسئول:** ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم‌جانوری

E-mail: rkhakpai@gmail.com

مقدمه

در حال حاضر شواهد قوی در مورد تفاوت‌های جنسی در احساس و تسکین درد وجود دارد. این تفاوت‌ها بیان‌گر آن است که هورمون‌های استروئیدی غدد جنسی مانند استرادیول و تستوسترون حساسیت به درد و بی‌دردی را تعدیل می‌کنند (۱). سندرم درد مزمن در زنان نسبت به مردان از شیوع بالاتری برخوردار است و زنان حساسیت بیشتری نسبت به درد دارند؛ بنابراین پیشنهاد شده است که استروژن به عنوان یک هورمون پیش‌درد مسئول افزایش حساسیت زنان نسبت به درد است (۲).

هسته‌ی پاراژیگانتوسلولاریس کناری (LPGi) یک هسته مشبک واقع در قسمت سری بصل‌النخاع است که در موش‌های صحرایی در جهت سری- دمی قرار گرفته است. هسته‌ی LPGi ورودی هایی را از مناطق مختلف مانند هسته‌ی لوکوس سرولئوس، هسته‌ی دستجات منزوی، ماده خاکستری دورقناتی، هسته رافه و تشکیلات مشبک بصل‌النخاعی دریافت می‌کند که همه آن‌ها به نحوی در تعدیل درد نقش دارند. استطاله‌های وابران نورون‌های LPGi به هسته‌های مهمی مانند تگمنتوم‌شکمی، هسته‌ی قوسی و بخش دمی هسته‌ی رافه ارسال می‌کنند(۳). بنابراین، هسته‌ی LPGi به‌عنوان یکی از اجزای سیستم نورآدرنرژیک پایین- روی تعدیل درد، نقشی کلیدی در پردازش اطلاعات درد بازی می‌کند (۴).

استروژن هورمون غدد جنسی هر دو جنس نر و ماده محسوب می‌شود و نقش پیچیده‌ای درتمام ساختارهای بدن از جمله سیستم عصبی بر عهده دارد. استروژن اثرات گسترده‌ای را در سراسر سیستم عصبی از طریق سیستم انکفالین‌ارژیک در نخاع، سیستم کاتکول‌آمین‌ارژیک در ساقه مغز و مغز میانی، مسیرهای سروتونرژیک مغز میانی و نورون-های کولینرژیک مغزجلویی اعمال می‌کند (۵). استرادیول اثرات ضددردی را هم در موش‌های صحرایی نر(۶) و هم در موش‌های صحرایی ماده (۷) تقویت می‌نماید. پاسخ‌های رفتاری، هورمونی و عصبی حیوانات ماده به محرک‌های دردی به مراتب شدیدتر از حیوانات نر می‌باشد. استرادیول پردردی مکانیکی القاء شده با اپی‌نفرین در سیستم عصبی محیطی را نیز کاهش می‌دهد (۸) و حساسیت به محرک‌های دردناک را در طی چرخه فحلی (۹) و سیکل قاعدگی (۱۰) تغییر می‌دهد.

برخی مطالعات نقش پیش‌دردی هورمون‌های غدد جنسی زنانه را نشان داده‌اند. با این حال، مطالعات دیگری نیز نقش ضددردی بارزی را برای استروژن گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال، در آزمایش برروی موش‌های نر و ماده که در معرض تحریک دردناک فازیک (به عنوان مثال درد حرارتی) قرار گرفتند، اثرات حاد ضددردی استروژن در هر دو تزریق داخل صفاقی و زیرجلدی به شکل واضحی مشاهده شده است (۱۱).

مطالعات مختلف نقش ۱۷بتا- استرادیول را در تعدیل درد نشان داده‌اند. تزریق ۱۷بتا- استرادیول به هسته LPGi، رفتارهای ناشی از فرمالین را در طول مرحله دوم آزمون کاهش می‌دهد. در موش‌های صحرایی نر، بخشی از اثر ضددردی ۱۷بتا- استرادیول تزریق شده به هسته LPGi روی درد التهابی ناشی از فرمالین با واسطه گیرنده‌های استروژنی میانجی‌گری می‌شود (۷).

در حیوانات آزمایشگاهی برداشتن تخمدان یک روش معمول برای تخلیه هورمون‌های جنسی است. در موش صحرایی اوارکتومی شده، استروژن باعث کاهش سریع آستانه درد مکانیکی می‌شود (۱۲). تفاوت‌هایی در پاسخ به درد ناشی از فرمالین در موش‌های صحرایی دست‌نخورده و اوارکتومی شده وجود دارد.

مطالعات مختلفی که اثر دست‌کاری هورمون‌های جنسی روی آستانه‌ی درک درد در جوندگان ماده‌ی بیدار را بررسی کرده‌اند، نتایج مبهم و دوپهلویی را گزارش داده‌اند. برخی افزایش القا شده با استرادیول را بر روی آستانه‌ی درک درد گزارش داده‌اند، برخی کاهش و گروهی دیگر نیز عدم

تغییر آن را نشان داده‌اند (۲). بنابراین در این پژوهش برای حذف اثر هورمون‌های جنسی روی آستانه‌ی درک درد، اثر ۱۷بتا- استرادیول تزریق شده به هسته LPGi بر روی درد التهابی ناشی از فرمالین در موش‌های صحرایی ماده‌ی اوارکتومی‌شده بررسی شده است؛ هم‌چنین نقش گیرنده‌های استروژنی در اثر تعدیل‌کنندگی ۱۷بتا- استرادیول مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار، در محدوده‌ی وزنی ۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد که از دانشکده‌ی علوم دانشگاه ارومیه خریداری شدند. حیوانات به طور تصادفی در گروه‌های شش‌تایی قرار می‌گرفتند و دسترسی کاملی به آب و غذا داشتند. هم‌چنین حیوانات در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. کلیه ی آزمایشات روی حیوانات با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی Institutional Animal Ethics Committee (IAEC) که توسط دانشگاه تبریز پذیرفته و امضا شده است، انجام شد.

چهل و هشت موش صحرایی ماده در ۷ گروه آزمایشی به‌این ترتیب قرار گرفتند: گروه کنترل (آزمون فرمالین در حیوانات دست‌نخورده)، گروه شم/CAN (فقط کانول‌گذاری هسته‌ی LPGi)، گروه شم/OVX (فقط خروج ظاهری تخمدان‌ها)، گروه سالین (تزریق نرمال‌سالین به‌عنوان حلال ۱۷بتا- استرادیول به هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده‌ی اوارکتومی‌شده)، گروه DMSO (تزریق DMSO به عنوان حلال آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی به هسته LPGi موش صحرایی ماده اوارکتومی شده)، گروه ۱۷بتا- استرادیول (تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده‌ی اوارکتومی‌شده)، گروه ICI,182,780 (تزریق ۲۵ نانومول ICI, به هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده‌ی اوارکتومی‌شده) و گروه ICI,182,780/۱۷بتا- استرادیول (تزریق ۲۵ نانومول ICI به داخل هسته‌ی LPGi، ۱۵ دقیقه پیش از تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده‌ی اوارکتومی‌شده). برای بررسی اثر استرادیول روی تعدیل پایین‌روی درد از آزمون فرمالین استفاده شد (۱۳). آزمون فرمالین باعث ایجاد یک درد دو مرحله‌ای می‌شود که فاز اول آن در اثر فعال شدن حاد گیرنده‌های درد و فاز دوم آن در اثر پاسخ‌های التهابی یا حساسیت بخش‌های مرکزی و تغییرات سیناسی ایجاد می‌شود. آزمون فرمالین مدل رایجی برای بررسی درد در مدل‌های درد حاد، درد تونیک و درد التهابی و گاهی‌اوقات درد مزمن و/یا پردردی می‌باشد. بنابراین آزمون فرمالین هم نشان‌گر درد حاد و هم درد پایدار می‌باشد (۱۴).

در این آزمون، ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین (خریداری‌شده از شرکت دکتر مجللی) ۵ درصد به زیر پوست پنجه‌ی پای چپ حیوان توسط سرنگ انسولین تزریق می‌شد (۳). به‌دنبال تزریق فرمالین حیوان مجموعه‌ای از رفتارهای القاشده با فرمالین را نشان می‌داد که در این مطالعه فرکانس رفتار تکان دادن پای ملتهب به مدت ۶۰ دقیقه طی دو مرحله- فاز اول از زمان تزریق تا دقیقه‌ی ۷ و فاز دوم از دقیقه‌ی ۱۶ تا دقیقه‌ی ۶۰ - ثبت می‌گردید (۳).

موش‌های صحرایی ماده‌ی بالغ با چرخه‌ی فحلی طبیعی با مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شده و جراحی با رعایت شرایط ضدعفونی انجام می‌شد. موش‌های صحرایی بی‌هوش‌شده به حالت استراحت بر روی سطح کناری قرار داده می‌شدند؛ به نحوی که سطح شکمی در امتداد دم به سمت جراح قرار گیرد. محل جراحی در سطح کناری تراشیده شده، با اسکراب جراحی تمیز می‌شد. برای رسیدن به حفره‌ی شکمی برشی یک سانتی‌متری در انتهای خلفی (دمی) قفسه‌ی سینه که ناحیه‌ی فلانک نام دارد زده شده و بافت چربی و

عضلات این ناحیه کنار زده می‌شد. سپس تخمدان و بافت چربی اطراف آن یافت شده، تخمدان و شاخ‌های رحمی از حفره‌ی شکمی خارج شده و شریان‌بند استریل (لیگاتور) در ابتدای لوله‌های فالوپ قرار داده می‌شد. سپس با برشی کوچک در نزدیکی تخمدان، تخمدان و بخشی از لوله‌های فالوپ برداشته شده، پس از بستن انتهای بریده‌شده‌ی لوله‌های فالوپ، بافت باقی‌مانده به داخل حفره‌ی صفاقی برگردانده می‌شد. پس از اطمینان از عدم خونریزی، لیگاتور برداشته شده و عضلات و پوست ناحیه‌ی برش، بخیه زده می‌شد.

تخمدان‌های چپ و راست هر دو با روشی مشابه از بدن خارج شده و حذف می‌گردیدند (۱۵). برای کانول-گذاری، حیوان پس از اوارکتومی در دستگاه استریوتاکسی مستقر می‌گردید و پوست ناحیه‌ی سر به حداقل میزان برش داده می‌شد. پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و با نگرش به فاصله‌ی آن‌ها و نسبت آن با فاصله‌ی ذکر شده در اطلس پاکسینوس [قدامی- خلفی (AP): ۱۲-؛ طرفی (L): ۱/۶± و پشتی-شکمی (DV): ۱۰/۴ میلی‌متر] نواحی سطح جمجمه منطبق با هسته‌ی مورد آزمایش مشخص می‌گردید (۱۶).

بعد از علامت‌گذاری مناطق بالا با استفاده از مته‌ی دندان‌پزشکی در محل مذکور منفذی به اندازه‌ی قطر کانول راهنما، که معمولا از سرسوزن نمره‌ی ۲۳ است، ایجاد شده و کانول راهنما به اندازه‌ای مشخص که برای هر هسته متفاوت است در درون مغز مستقر شده و قسمت رویی آن بر روی جمجمه به‌وسیله‌ی سیمان دندان‌پزشکی ثابت می‌شد. دو پیچ کوچک در استخوان جمجمه تعبیه و در درون سیمان دندان-پزشکی فرو می‌رفت. این دو پیچ در حکم مسلح‌سازی سیمان بوده و از جداشدن آن از سطح جمجمه جلوگیری می‌کند. منفذ کانول راهنما در بیرون جمجمه به‌وسیله‌ی استایلت مسدود بوده و فقط در زمان‌های تزریق دارو برداشته می‌شد. یک کانول نازکتر که معمولا از سرسوزن شماره‌ی ۳۰ می-باشد، به طول حدود دو میلی‌میر بلندتر(۱۷) از کانول راهنما تهیه شده و به‌عنوان کانول تزریق استفاده می‌شد که از یک طرف به یک لوله‌ی نازک پلی‌اتیلن وصل می‌گردید و سر دیگر لوله‌ی پلی‌اتیلن به سرنگ هامیلتون وصل شده و ۵۰۰ نانولیتر از داروی موردنظر تزریق می‌شد. بعد از اتمام جراحی موش صحرایی باید به مدت یک هفته دوره‌ی بهبودی را طی می‌کرد تا برای آزمون رفتاری آماده گردد. برای اطمینان از تزریق صحیح دارو به هسته‌ی LPGi، پس از خاتمه‌ی آزمون، رنگ Pontamine sky blue به هسته‌ی LPGi تزریق می‌شد و حیوان با دوز بالای اتر قربانی می‌شد. سپس مغز حیوان خارج شده و محل تزریق رنگ بررسی می‌شد؛ فقط داده‌های مربوط به حیواناتی که تزریق دارو به‌درستی انجام شده بود برای آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت.

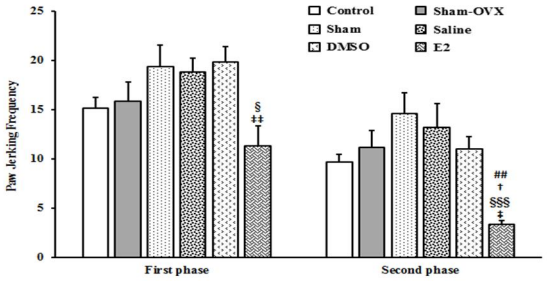
در پژوهش حاضر از نرمال سالین به عنوان حلال ۱۷بتا- استرادیول و از DMSO به عنوان حلال ICI 182,780(آنتاگونیست اختصاصی گیرنده های استروژن) استفاده شد. در این مطالعه غلظت ۰/۸ میکرومول استرادیول (خریداری شده از شرکت سیگما) (۱۳) و غلظت ۲۵ نانومول ICI 182,780 (۱۸) (خریداری شده از شرکت سیگما) مورد استفاده قرار گرفت. در روز آزمایش ۵۰۰ نانولیتر استرادیول و داروهای دیگر در هر گروه با استفاده از سرنگ هامیلتون به صورت یک طرفه به سمت راست هسته LPGi تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه آزمون فرمالین انجام شد.

تحلیل آماری داده‌ها با کمک آزمون آنووای یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS و ترسیم نمودارها با برنامه اکسل صورت گرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۶ سر موش صحرایی در هر گروه بیان شده و $p < ۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌دار بودن داده-ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در پژوهش حاضر گروه‌های کنترل، جراحی و کانول‌گذاری هسته LPGi (گروه CAN/sham)، جراحی

اوارکتومی (گروه OVX/sham)، سالین به عنوان حلال ۱۷بتا- استرادیول و DMSO به عنوان حلال ICI 182,780 تغییر معنی‌داری را در فازهای اول و دوم رفتار تکان دادن پای ملتهب نسبت به یکدیگر نشان ندادند (شکل ۱).

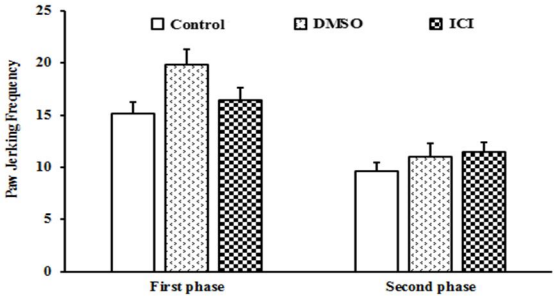


شکل۱. اثر تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi روی فرکانس تکان دادن پای ملتهب به دنبال تزریق ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۵ درصد به سطح داخلی پنجه‌ی پای چپ. نمودار نشان‌دهنده‌ی القای بی‌دردی توسط تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi می‌باشد. # نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شم، † با گروه شم/ OVX، § با گروه نرمال‌سالین و ‡ با گروه DMSO می‌باشد. # نشان‌دهنده‌ی احتمال ($p < ۰/۰۵$)، ## نشان‌دهنده‌ی احتمال ($p < ۰/۰۱$) و ### نشان‌دهنده‌ی احتمال ($p < ۰/۰۰۱$) می‌باشد. فاز اول میانگین پاسخ رفتاری ۷ دقیقه‌ی اول آزمون و فاز دوم میانگین پاسخ رفتاری بین دقیقه‌های ۱۶ تا ۶۰ می‌باشد. تعداد حیوانات آزمایشگاهی در هر گروه ۶ سر بود .
داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند.
E2: ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا-استرادیول.

تزریق غلظت ۰/۸میکرومول ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته LPGi فاز اول فرکانس تکان دادن پای ملتهب را نسبت به گروه سالین ($p<۰/۰۵$) و DMSO ($p<۰/۰۱$) به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل۱).

تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول فاز دوم فرکانس تکان دادن پای ملتهب را نسبت به هر چهار گروه OVX/sham ($p<۰/۰۵$)، CAN /sham ($p<۰/۰۱$)، سالین ($p<۰/۰۰۱$) و DMSO ($p<۰/۰۵$) به طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۱).

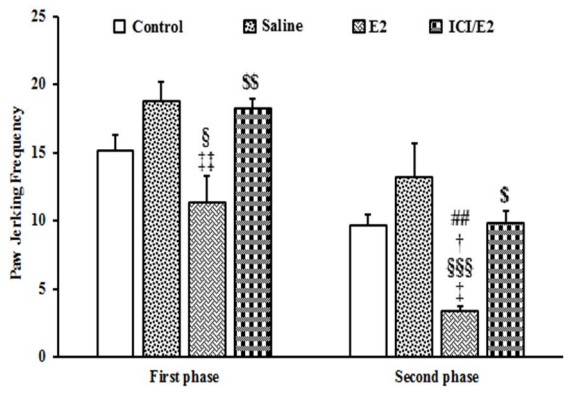
تزریق ۲۵ نانومول آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی ICI182,780 اثر معنی‌داری روی رفتار تکان دادن پای ملتهب نشان نداد (شکل۲).



شکل۲. اثر تزریق ۲۵ نانومول ICI 182,780 (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژنی) به داخل هسته‌ی LPGi روی فاز اول و دوم فرکانس تکان‌دادن پای ملتهب ناشی از تزریق ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۵ درصد به سطح داخلی پنجه‌ی پای چپ. تزریق ۲۵ نانومول آنتاگونیست گیرنده های استروژنی ICI 182,780 اثرمعنی داری روی رفتارتکان دادن پای ملتهب نشان نداد. فاز اول میانگین پاسخ رفتاری ۷ دقیقه‌ی اول آزمون و فاز دوم میانگین پاسخ رفتاری بین دقیقه‌های ۱۶ تا ۶۰ می‌باشد. در هر گروه ۶ سر موش صحرایی ماده‌ی اوارکتومی‌شده استفاده شده است.
داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند.
ICI: ۲۵ نانومول ICI 182,780.

برای بررسی نقش گیرنده‌های استروژنی در اثر بی دردی ناشی از تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته LPGi ، آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی ۱۵ دقیقه پیش از تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته LPGi تزریق شد و ۱۵ دقیقه پس از تزریق ۱۷بتا- استرادیول بلافاصله فرمالین تزریق و رفتارهای مربوط به مدت ۶۰ دقیقه ثبت شد.

پیش تیمار هسته‌ی LPGi با ۲۵ نانومول ICI182,780 توانست اثر بی‌دردی ناشی از ۱۷بتا- استرادیول را هم طی فاز اول ($p<۰/۰۱$) و هم طی فاز دوم ($p<۰/۰۵$) رفتار تکان دادن پای ملتهب خنثی نماید (شکل ۳).



شکل۳. مقایسه‌ی رفتار ناشی از تزریق فرمالین میان گروه کنترل، سالین، ۱۷بتا- استرادیول و گروهی که ۱۵ دقیقه پیش از تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi، ۲۵ نانومول ICI 182,780 دریافت کرده بودند. نمودار نشان‌دهنده‌ی فاز اول و فاز دوم آزمون فرمالین برای پاسخ تکان‌دادن پای ملتهب می‌باشد. به نظر می‌رسد اثر ضددردی ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول از طریق گیرنده‌های استروژن اعمال شده است. فاز اول میانگین پاسخ رفتاری ۷ دقیقه‌ی اول آزمون و فاز دوم میانگین پاسخ رفتاری بین دقیقه‌های ۱۶ تا ۶۰ می‌باشد. # نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شم، † با گروه شم/ OVX، § با گروه نرمال‌سالین، ‡ با گروه DMSO و $ با گروه ۱۷بتا- استرادیول می‌باشد. # نشان‌دهنده‌ی احتمال (p < ۰/۰۵)، ## نشان‌دهنده‌ی احتمال (p < ۰/۰۱) و ### نشان‌دهنده‌ی احتمال (p < ۰/۰۰۱) می‌باشد. تعداد حیوانات آزمایشگاهی در هر گروه ۶ سر بود و داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. E2: ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول و ICI/E2: گروهی که ۱۵ دقیقه پیش از تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته LPGi، ۲۵ نانومول ICI 182,780 دریافت کرده بودند.

بحث

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق دوز ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به موش‌های صحرایی اوارکتومی شده دارای اثرضددردی روی رفتارتکان دادن پای ملتهب می باشد که با پیش‌تیمار هسته LPGi با آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی این اثر خنثی می‌گردد ولی به حالت پایه‌ای برنمی‌گردد. بنابراین ممکن است بخشی از اثر ضددردی ۱۷بتا-استرادیول به‌وسیله گیرنده‌های استروژنی میانجی‌گری شود.

همان گونه که پیش از این نیز بیان شد وجود تفاوت‌های جنسیتی در ادراک درد به خوبی اثبات شده است (۱۹) و تزریق هورمون‌های جنسی، پاسخ‌های رفتاری به محرک‌های دردناک را هم در حیوانات ماده (۷) و هم در حیوانات نر (۱۱) تغییر می‌دهد. یافته‌های ما نشان دادند که تیمار هسته‌ی LPGi با ۱۷بتا- استرادیول هر دو فاز اول و دوم رفتار تکان دادن پا را کاهش می‌دهد؛ ولی برخی مطالعات نشان داده‌اند که موش‌های صحرایی اوارکتومی شده پاسخ طولانی‌تری نسبت به درد ناشی از آزمون فرمالین نشان می‌دهند (۲۰). بعد از انجام اوارکتومی کاهش استروژن به صورت تدریجی روی می‌دهد (۲۱)؛ به‌دنبال اوارکتومی گیرنده‌های استروژنی مغز نیز به‌تدریج کاهش پیدا می‌کنند (۲۱). مطالعات نشان می‌دهد که جایگزینی استروژن در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده، مقادیر بالایی از کورتیکواسترون را ذخیره کرده و درد شدید را با واسطه گیرنده‌های استروژنی مهار می‌کند (۲۲) که با یافته‌های این مطالعه مطابقت دارد.

به‌دنبال نوسانات هورمونی جنس ماده در طی چرخه فحلی، عملکرد برخی از هورمون‌ها در جهت‌های مخالف تغییر می‌کند که همین تغییرات به‌وسیله‌ی مکانیسم‌های مرکزی و محیطی، می‌توانند پاسخ به محرک‌های دردناک را تغییر دهند (۲۳). هم‌سو با یافته‌های این مطالعه گزارش شده است که در موش‌های صحرایی ماده‌ی اوارکتومی‌شده، استرادیول سبب کاهش پاسخ‌های رفتاری درد طی فاز دوم آزمون فرمالین می‌شود (۲۴). برخی از مطالعات حاکی از آن است که اوارکتومی سبب کاهش آستانه‌ی درد می‌شود (۸، ۲۳)، که با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی ندارد. مغایر با یافته‌های پژوهش اخیر، مانینو و همکاران نشان دادند که اوارکتومی رفتارهای فازهای اول و دوم آزمون فرمالین را افزایش می‌دهد و در مقایسه با موش‌های صحرایی دست‌نخورده‌ای که در فاز پرواستروس قرار گرفته‌اند، اوارکتومی تاثیر عمیقی بر رفتارهای فاز دوم دارد (۲۲). با این‌وجود،

مطابق با یافته‌های این مطالعه، برخی از محققان گزارش کرده‌اند که آستانه‌ی درد در رفلکس‌های دردی، در همه فازهای چرخه‌ی فحلی و یا بعد از اوارکتومی تغییر نمی‌کند (۲۵). هم‌سو با نتایج این مطالعه، در موش‌های صحرایی اوارکتومی‌شده، استرادیول به شکل بارزی پاسخ به محرک‌های دردزا را هم در طی فاز اول و هم در طی فاز دوم کاهش می‌دهد. بنابراین، استرادیول در مدل‌های مختلف، به شکل مداوم اثر ضددردی اعمال می‌کند (۲۴). ولی رالیا و مک کارسون نشان دادند که تزریق زیرپوستی استرادیول به موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده، سبب افزایش فرکانس تکان دادن پای ملتهب می‌شود. بنابراین نتیجه گرفتند که اگر موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده به صورت کوتاه‌مدت و شبه-پرواستروسی در معرض استرادیول قرار بگیرند، رفتار دردی برانگیخته شده با التهاب در آنها به‌طور وابسته به شدت محرک افزایش می‌یابد و سبب القای پردردی می‌گردد (۲۶)، که با یافته‌های مطالعه حاضر مغایرت دارد. درموش‌های صحرایی ماده نسبت به موش‌های صحرایی نر تحریک‌پذیری فیبرهای آوران اولیه در فاز دوم آزمون فرمالین بالاتر است که به‌دلیل افزایش رهایش ماده P (Substance P) در آنها می‌باشد؛ این تفاوت‌ها فقط به فاز دوم آزمون فرمالین اختصاص دارد و توسط استرادیول القا می‌گردد (۲۷) که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. در مدل درد التهابی آزمون فرمالین، جایگزینی ۱۷بتا-استرادیول تا سطح فیزیولوژیک استروژن، اثر ضددردی داشته و سبب کاهش رفتارهای ناشی از درد می‌شود (۲۲)] که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. یافته‌های مطالعات پیشین آزمایشگاه ما نیز نشان دادند که بخشی از اثر ضددردی ۱۷بتا-استرادیول در موش‌های صحرایی نر ممکن است به وسیله گیرنده‌های استروژنی وساطت شود؛ ولی بخش بزرگی از این اثر به وسیله گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA و GABAA وساطت می‌شود (۴، ۵). برخلاف این یافته‌ها و مطابق با نتایج پژوهش حاضر، سکارلی و همکارانش نشان دادند که انجام عمل گنادکتومی در حیوانات نر اثری بر نتایج آزمون فرمالین ندارد و در این حیوانات نتایج آزمون فرمالین مشابه حیوانات سالم می‌باشد (۲۸) که این امر نشان دهنده اثرات متفاوت هورمون‌های جنسی در مراحل مختلف درد و تناقضات موجود در آزمایشات مختلف و نشان‌دهنده‌ی نقش هورمون‌های جنسی در بروز درد و پاسخ‌های رفتاری مربوط به آن می‌باشد (۲۹). مغایر با یافته‌های این مطالعه،گاموند و همکارانش نشان دادند که هورمون‌های جنسی ماده نقش موثرتری را در کنترل درد در فاز میانی آزمون فرمالین ایفا می‌کنند و در این بین نقش کنترلی ۱۷-بتااسترادیول نسبت به مشتقات دیگر این هورمون‌ها بیشتر می‌باشد (۳۰). این در حالی است که هورمون‌های جنسی مردانه، و به طور عمده تستوسترون نقش موثرتری در کاهش درد در فاز اول و دوم آزمون فرمالین دارند بدون آن‌که اثری بر فاز میانی داشته باشند (۳۰).

بنابراین، براساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی‌شده موجب القای بی‌دردی می‌شود و این اثر ضددردی ۱۷بتا-استرادیول ممکن است از طریق گیرنده‌های استروژنی این هسته میانجی‌گری شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت و همکاری دانشگاه تبریز به انجام رسیده است. بدین وسیله از این دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. European journal of pain. 2004;8(5):397-411.
2. Stoffel EC, Ulibarri CM, Craft RM. Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and

reproductive indices in male and female rats. Pain. 2003;103(3):285-302.
3. Andrezik JA, Chan-Palay V, Palay SL. The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Anatomy and embryology. 1981;161(4):373-90.
4. Khakpay R, Barani S, Hatami Nemati H. Assessing the effect of intra-paragigantocellularis lateralis injection of 17β-estradiol on the acute and persistent pain in the male rat. Physiology and Pharmacology. 2015;18(4):455-65.
5. Khakpay R, Barani S, Hatami Nemati H. The antinociceptive effect of 17β-estradiol in the paragigantocellularis lateralis of male rats is mediated by estrogenic receptors. Physiology and Pharmacology. 2014;18(2):215-23
6. Liu N-J, Gintzler AR. Prolonged ovarian sex steroid treatment of male rats produces antinociception: identification of sex-based divergent analgesic mechanisms. Pain. 2000;85(1):273-81.
7. Dina OA, Aley K, Isenberg W, Messing RO, Levine JD. Sex hormones regulate the contribution of PKCε and PKA signalling in inflammatory pain in the rat. European Journal of Neuroscience. 2001;13(12):2227-33.
8. Kepler KL, Kest B, Kiefel JM, Cooper ML, Bodnar RJ. Roles of gender, gonadectomy and estrous phase in the analgesic effects of intracerebroventricular morphine in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior- 27-119:(1)34:1989
9. Forman L, Tingle V, Estilow S, Cater J. The response to analgesia testing is affected by gonadal steroids in the rat. Life sciences. 1989;45(5):447-54.
10. Giamberardino MA, Affaitati G, Valente R, Iezzi S, Vecchiet L. Changes in visceral pain reactivity as a function of estrous cycle in female rats with artificial ureteral calculosis. Brain research. 1997;774(1):234-8.
11. Aloisi A, Ceccarelli I. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. Neuroscience. 1999;95(2):559-66.
12. Dawson-Basoa M, Gintzler AR. Gestational and ovarian sex steroid antinociception: synergy between spinal κ and δ opioid systems. Brain research. 1998;794(1):61-7.
13. Gaumond I, Arsenault P, Marchand S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. Brain research. 2002;958(1):139-45.
14. Azhdari-Zarmehri H, Reisi Z, Vaziri A, Haghparast A, Shaigani P, Haghparast A. Involvement of orexin-2 receptors in the ventral tegmental area and nucleus accumbens in the antinociception induced by the lateral hypothalamus stimulation in rats. Peptides. 2013;47:94-8.
15. Aston-Jones G, Chiang C, Alexinsky T. Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. Progress in brain research. 1991;88:501-20.
16. Paxinos G, Watson P. The Rat Nervous Coordinates, The New Coronal Set. 2004.
17 Andrezik JA, Chan-Palay V, Palay SL. The nucleus paragigantocellularis lateralis in the rat. Conformation and cytology. Anatomy and embryology. 1981;161(4):355-71.
18. Chanda ML, Mogil JS. Sex differences in the effects of amiloride on formalin test nociception in mice. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2006;291(2):R335-R42.
19. Nasirinezhad F, Ramezanian Nick E, Sadeghi M, Fereshtenezhad M. Comparison between the effect of gonadal hormones on nociceptive behavior of male rats in two neuropathic pain models. Physiology and Pharmacology. 2009;13(2):139-50.
20. Pacini F, Molinaro E, Castagna M, Agate L, Elisei R, Ceccarelli C, et al. Recombinant human thyrotropin-stimulated serum thyroglobulin combined with neck ultrasonography has the highest sensitivity in monitoring differentiated thyroid carcinoma. The

Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2003;88(8):3668-73.
21. Ito S. Globalization and agrarian change: a case of freshwater prawn farming in Bangladesh. Journal of International Development. 2004;16(7):1003-13.
22. Mannino CA, South SM, Quinones-Jenab V, Inturrisi CE. Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. The Journal of Pain. 2007;8(4):334-42.
23 Fillingim RB, Ness T. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2000;24(4):485-501.
24. Kuba T, Kemen LM, Quinones-Jenab V. Estradiol administration mediates the inflammatory response to formalin in female rats. Brain research. 2005;1047(1):119-22.
25. Vincler M, Maixner W, Vierck CJ, Light AR. Estrous cycle modulation of nociceptive behaviors elicited by electrical stimulation and formalin. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2001;69(3):315-24.
26. Ralya A, McCarson KE. Acute estrogen surge enhances inflammatory nociception without altering spinal Fos expression. Neuroscience letters. 2014;575:91-5.
27 Zhang H, Xie M, Schools GP, Feustel PF, Wang W, Lei T ,et al. Tamoxifen mediated estrogen receptor activation protects against early impairment of hippocampal neuron excitability in an oxygen/glucose deprivation brain slice ischemia model. Brain research. 2009;1247:196-211.
28. Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Massafra C, Aloisi AM. The behavioral and neuronal effects induced by repetitive nociceptive stimulation are affected by gonadal hormones in male rats. Pain. 2003;104(1):35-47.
29. Kelly MJ, Lagrange AH, Wagner EJ, Rønnekleiv OK. Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. Steroids. 1999;64(1):64-75.
30. Gaumond I, Spooner MF, Marchand S. Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. Neuroscience. 2007;146(1):366-74.