JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2019; 22(2)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

The Role of the Estrogen Receptors of Paragigantocellularis Lateralis Nucleus in the Antinociceptive Effect of 17β-Estradiol during Proestrus Phase of Estrous Cycle of Female Rats

Zahra Heidarzadeh[1], Roghaieh Khakpay[1*], Seyed Mahdi Banan Khojasteh[1], Fatemeh Khakpai[2]

1. Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Cognitive and Neuroscience Research Center (CNRC), Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: *29 October 2018*

Accepted: *16 January 2019*

Published online: *10 June 2019*

Keywords

Analgesia
Estrogen receptor
Estrus cycle
Formalin test

**** Corresponding Author:***

Roghaieh Khakpay; P.O. Box 51666-16471, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, 29 Bahman Boulevard, Tabriz, Iran.

Fax: *+98 41 3335 6027*

Email: *rkhakpai@gmail.com*

ABSTRACT

Background and Aim: Intra-paragigantocellularis lateralis (LPGi) injection of 17β-estradiol produces robust antinociceptive effect on the inflammatory pain in the both male and ovariectomized female rats which is possibly mediated through estrogen receptors of this nucleus. This study aimed to examine the role of estrogen receptors in the pain modulatory effect of 17β-estradiol during proestrus phase of female rats.

Materials and Methods: In this study, the female Wistar rats in the range of 200-270 gr were used. For studying the influence of intra-LPGi injection of 17β-estradiol on the acute inflammatory pain modulation, cannulation into the LPGi nucleus was performed after entrance into the proestrus cycle. After entrance in the proestrus phase once again, drugs were injected and 15 minutes later, formalin was injected into the rat's hind paw. Then, formalin-induced paw jerking behavior was recorded for 60 min.

Ethical Considerations: This study with research ethics code IR.TBZMED.VCR.REC.1397.385 has been approved by research ethics committee at Tabriz University of Medical Sciences.

Findngs: The results of this study showed that intra-LPGi injection of 17β-estradiol during proestrus phase significantly attenuated paw jerking frequency both in the first ($p<0.01$) and in the second ($p<0.001$) phases of formalin test. Pretreatment of the LPGi nucleus with estrogen receptor antagonist (ICI182,780) neutralized the 17β-estradiol-induced analgesia.

Conclusion: Our results indicated that intra-LPGi injection of 17β-estradiol induces robust analgesia on the inflammatory pain during the proestrus phase. Thus, it can be concluded that the antinociceptive effect of 17β-estradiol is probably mediated via estrogen receptors.

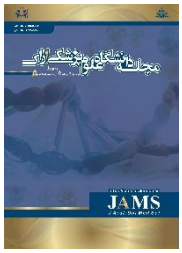
© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:

Heidarzadeh Z., Khakpay R., Banan Khojasteh SM., et al. The Role of the Estrogen Receptors of Paragigantocellularis Lateralis Nucleus in the Antinociceptive Effect of 17β-Estradiol during Proestrus Phase of Estrous Cycle of Female Rats. J Arak Uni Med Sci. 2019; 22(2): 35-46.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

JAMS
مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره بیست و دو، شماره دو، خرداد و تیر ۱۳۹۸
journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

نقش گیرنده‌های استروژنی هسته پاراژیگانتوسلولاریس کناری در اثر ضددردی ۱۷ بتا–استرادیول در طی فاز پرواستروس چرخه فحلی موش‌های صحرایی ماده

زهرا حیدرزاده[۱]، رقیه خاکپای[۱*]، سیدمهدی بانان خجسته[۱]، فاطمه خاکپای[۲]

۱. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب و شناخت، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۰۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۶

تاریخ انتشار: ۹۸/۰۳/۲۰

واژگان کلیدی

آزمون فرمالین

بی‌دردی

چرخه فحلی

گیرنده استروژن

***نویسنده مسئول:**

رقیه خاکپای

آدرس پستی: ایران، تبریز، بلوار ۲۹ بهمن، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم جانوری، کد پستی ۱۶۴۷۱-۵۱۶۶۶.

تماس: +98 41 3335 6027

Email: rkhakpai@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: تزریق ۱۷-بتا استرادیول به داخل هسته پاراژیگانتوسلولاریس کناری (LPGi) موش‌های صحرایی نر و ماده اواریکتومی شده، اثر ضددردی قوی را بر روی درد التهابی تولید می‌کند که احتمالاً به وسیله گیرنده‌های استروژنی این هسته وساطت می‌شود. هدف از این پژوهش، بررسی نقش گیرنده‌های استروژنی هسته LPGi در تعدیل درد ناشی از ۱۷بتا-استرادیول در طی فاز پرواستروس موش‌های صحرایی ماده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۷۰ گرم استفاده شد. برای بررسی اثر تزریق ۱۷ بتا-استرادیول به داخل هسته LPGi در تعدیل درد التهابی حاد، پس از ورود حیوان به فاز پرواستروس، کانول‌گذاری این هسته انجام شد. پس از ورود دوباره حیوان به فاز پرواستروس، داروها تزریق شد و ۱۵ دقیقه بعد فرمالین به پنجه پای چپ حیوان تزریق شد. سپس رفتار تکان دادن پای ملتهب ناشی از فرمالین به مدت ۶۰ دقیقه ثبت شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد اخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1397.385 به تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز رسیده است.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که در طی فاز پرواستروس، تزریق ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi رفتار تکان دادن پای ملتهب را در فاز اول ($p <$ ۰/۰۱) و فاز دوم ($p <$ ۰/۰۰۱) آزمون فرمالین به‌طور معنی‌داری کاهش داد. پیش‌تیمار هسته‌ی LPGi با آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی (ICI182, 780) اثر بی‌دردی القا شده با ۱۷بتا- استرادیول را خنثی نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که تزریق ۱۷بتا- استرادیول به هسته‌ی LPGi در فاز پرواستروس، بی‌دردی قوی را بر روی درد التهابی القا می‌کند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً اثر ضددردی ۱۷بتا- استرادیول از طریق گیرنده‌های استروژنی میانجی‌گری می‌شود.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

درد، مکانیسمی هشداردهنده برای محافظت بدن در برابر آسیب‌های بافتی بالقوه و واقعی است و به‌طور متعارف به درد حاد، پایدار و مزمن تقسیم می‌شود. دردی که بیشتر از ۳ ماه ادامه یابد، درد مزمن نامیده می‌شود و یکی از بزرگ‌ترین مشکلات سلامتی در کشورهای توسعه‌یافته محسوب می‌شود. مسیر مهاری پایین‌روی تعدیل درد (Descending inhibitory pain modulatory pathway) یکی از سیستم‌های تعدیل درد است که سبب کاهش احساس درد در پاسخ به محرک‌های دردزا می‌شود (۱).

هسته پاراژیگانتوسلولاریس کناری (LPGi) بخشی از مسیر مهاری پایین‌روی تعدیل درد می‌باشد. این هسته نیمی از ساختارهای تشکیلات مشبک (Reticular formation) بصل‌النخاع است که در موش‌های صحرایی در طول بصل‌النخاع در جهت سری-دمی قرار گرفته است. این هسته به‌عنوان حس‌گر شیمیایی بصل‌النخاع شناخته شده و اعمال قلبی-عروقی، تنفس، پاداش، رفتارهای جنسی، تعدیل درد و وابستگی به مورفین را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد (۲). هسته‌ی LPGi ورودی‌هایی را از نواحی درگیر در تعدیل درد مانند هسته‌ی لوکوس سرولئوس (LC)، ماده خاکستری دورقناتی (PAG) و هسته رافه دریافت می‌کند (۳). مهم‌ترین مسیر وابران هسته LPGi است که به هسته LC وارد می‌شود. نورون‌های هسته‌ی LPGi به محرک‌های دردناک پاسخ داده و یکی از مراکز مهم ارسال پیام‌های درد و اطلاعات حسی پیکری به هسته LC می‌باشد (۴). بنابراین، نورون‌های LPGi در پردازش اطلاعات درد، ارسال سیگنال‌های درد و نیز تعدیل درد حائز اهمیت می‌باشند (۴).

تفاوت‌های مربوط به جنسیت در درک و تعدیل درد بیان‌گر آن است که هورمون‌های استروئیدی غدد جنسی مانند استرادیول و تستوسترون در تعدیل درد نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۵). سندرم درد مزمن در زنان نسبت به مردان شیوع بالاتری دارد و زنان حساسیت بیشتری نسبت به درد دارند؛ بنابراین پیشنهاد شده است که استروژن به عنوان یک هورمون پیش‌درد (Pronociceptive)، مسئول افزایش حساسیت زنان نسبت به درد است. مطالعات نشان داده‌اند که استروژن سبب پردردی و تستوسترون سبب بی‌دردی می‌گردد (۶). با این حال، مطالعات دیگری نیز گزارش کرده‌اند که استروژن اثر ضددردی واضحی را اعمال می‌کند. به عنوان مثال، در آزمایش بر روی موش‌های نر و ماده که در معرض تحریک دردناک فاز یک (به عنوان مثال درد حرارتی) قرار گرفتند، تزریق داخل صفاقی و زیرجلدی استروژن باعث القای بی‌دردی بارزی شده است (۷).

۱۷بتا- استرادیول استروئیدی است که از تخمدان‌های جنس ماده ترشح می‌شود و نقش آن در تعدیل درد به‌خوبی نشان داده شده است (۶). ۱۷بتا- استرادیول با اتصال به گیرنده‌های داخل‌سلولی خود و از طریق واکنش آلوستریک با گیرنده‌های غشایی سایر نوروترانسمیترها مثل گیرنده‌های گلوتاماتی و GABAA درد را تعدیل می‌کند (۱). تزریق ۱۷بتا- استرادیول به‌داخل هسته‌ی LPGi در موش‌های صحرایی نر و ماده اوارکتومی‌شده سبب القای اثر ضددردی قوی روی درد التهابی القاشده با فرمالین می‌شود. این اثر ضددردی ۱۷بتا- استرادیول احتمالا از طریق واکنش با گیرنده‌های استروژنی هسته‌ی LPGi موش‌های صحرایی نر و ماده اوارکتومی‌شده میانجی‌گری می‌شود (۸، ۹).

در موش‌های صحرایی ماده نوسانات هورمونی در طول چرخه فحلی (Estrous cycle) باعث تغییراتی در تعداد و نوع سلول‌های موجود در مهبل می‌شود که با توجه به انواع سلول‌های موجود در اسمیر واژن، چرخه فحلی آن‌ها به چهار فاز تقسیم می‌گردد که به ترتیب عبارت‌اند از: فازهای پرواستروس، استروس، متاستروس و دی‌استروس (۱۰). طی چرخه فحلی، سطح سرمی هورمون‌های پرولاکتین، LH و FSH پایین باقی می‌ماند و سطح سرمی این هورمون‌ها از بعد از ظهر فاز پرواستروس افزایش می‌یابند. افزایش سطح سرمی هورمون استرادیول از فاز متاستروس شروع می‌شود و طی فاز پرواستروس به بالاترین سطح خود می‌رسد؛ سطح سرمی این هورمون طی فاز استروس به سطح پایه‌ای خود برمی‌گردد (۱۱).

چرخه‌های تولیدمثلی و هورمون‌های جنسی موجودات ماده می‌توانند بر عملکردهای مختلف سیستم عصبی از جمله درک درد موثر باشند. تحقیقات بر روی آستانه درد موش‌های صحرایی در آزمون‌های اعمال فشار بر دم و پنجه پا نشان داده است که آستانه درد در موش‌های صحرایی که در فازهای پرواستروس و استروس هستند نسبت به موش‌های صحرایی که در فازهای متاستروس و دی‌استروس هستند، پایین‌تر است (۱۲). هم‌چنین نشان داده شده است که آستانه درد موش‌های صحرایی نر با آستانه درد موش‌های صحرایی ماده طی فازهای مختلف چرخه فحلی تفاوتی ندارد؛ اما در موش‌های صحرایی ماده، آستانه درد در طی فازهای پرواستروس و دی‌استروس به‌صورت معنی‌داری از آستانه درد در طی فازهای استروس پایین‌تر است (۱۳).

همان‌گونه که بیان شد، مطالعات انجام شده بر روی موش‌های صحرایی نر و ماده‌های اوارکتومی‌شده در آزمایشگاه ما نشان داده است که ۱۷بتا-استرادیول سبب القای بی‌دردی قوی می‌شود که احتمالا به وسیله گیرنده‌های استروژنی میانجی‌گری می‌شود. از آن‌جایی که در موش‌های صحرایی ماده دست‌نخورده اثر فازهای مختلف چرخه فحلی بر روی آستانه درک درد نتایج مبهمی را گزارش کرده‌اند و از سوی دیگر اثر فازهای چرخه فحلی و هم‌چنین تزریق استرادیول بر روی درک درد التهابی به خوبی مطالعه نشده است، بنابراین در این پژوهش اثر تزریق ۱۷بتا-استرادیول به‌داخل هسته‌ی LPGi طی فاز پرواستروس چرخه فحلی موش‌های صحرایی ماده بر روی درک درد و مشارکت احتمالی گیرنده‌های استروژنی سلول در اثر تعدیل‌کنندگی ۱۷بتا- استرادیول روی درد التهابی ناشی از فرمالین بررسی شده است.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش از موش‌های صحرایی نژاد ویستار ماده، در محدوده‌ی وزنی ۲۰۰ تا ۲۷۰ گرم استفاده شد که از دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه خریداری شدند. حیوانات به‌طور تصادفی در گروه‌های شش‌تایی قرار گرفتند و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. هم‌چنین حیوانات در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. کلیه‌ی 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 (کد اخلاق: ۳۰۳/۵۲/د، ۱۳۹۵/۰۲/۰۵).

چهل و هشت سر موش صحرایی ماده که در فاز پرواستروس قرار داشتند به‌طور تصادفی به ۸ گروه آزمایشی تقسیم شدند: گروه کنترل (آزمون فرمالین در حیوانات دست‌نخورده)، گروه شم (فقط کانول‌گذاری هسته‌ی LPGi)، گروه سالین (تزریق نرمال‌سالین به‌عنوان حلال ۱۷بتا- استرادیول به هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده)، گروه DMSO [تزریق DMSO به‌عنوان حلال آنتاگونیست گیرنده‌های استروژنی (ICI 182, 780, 15) به هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده]، گروه ۱۷بتا- استرادیول (تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده) (۸، ۹)، گروه ۵۰ نانومول ICI (تزریق ۵۰ نانومول ICI 182,780, 15 به هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده) (۸، ۹)، گروه ۱۵ نانومول ICI (تزریق ۱۵ نانومول ICI 182,780, 15 به هسته‌ی LPGi موش صحرایی ماده) و گروه ۱۷بتا- استرادیول/ICI (تزریق ۱۵ نانومول ICI 182,780 به‌داخل هسته‌ی LPGi، ۱۵ دقیقه پیش از تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به‌داخل این هسته). ۵۰۰ نانولیتر استرادیول و داروهای دیگر در هر گروه به‌صورت یک‌طرفه به هسته LPGi سمت راست تزریق می‌شد و پس از ۱۵ دقیقه آزمون فرمالین انجام می‌شد.

همان‌طورکه قبلاً بیان شد چرخه‌ی فحلی موش‌های صحرایی ماده دارای چهار فاز است که سطح سرمی هورمون‌های جنسی موش‌های صحرایی، به ویژه هورمون استرادیول، در هریک از این فازها متفاوت است (۱۰، ۱۱). از آن‌جایی که سطح سرمی هورمون استرادیول طی فاز پرواستروس به بالاترین سطح خود می‌رسد (۱۱)، فاز پرواستروس برای انجام آزمایشات انتخاب شد. پیش از شروع آزمایشات مربوط به این پژوهش، هم‌سیکل‌کردن موش‌های صحرایی ماده انجام شد. مطالعات نشان داده است که

اگر حیوانات ماده به مدت دو هفته در کنار هم و در یک قفس نگهداری شوند، چرخه‌ی فحلی آن‌ها باهم همزمان می‌شود (۱۴). پس از گذشت دو هفته، روزانه در ساعت ۸ تا ۹ صبح، از واژن حیوانات اسمیرگیری واژنی انجام شده و نمونه‌ی به‌دست‌آمده به لام منتقل شده و توسط میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۴۰ بررسی شدند. فاز پرواستروس چرخه فحلی براساس وجود تعداد زیاد سلول‌های اپی‌تلیالی هسته‌دار تشخیص داده می‌شد (۱۱). پس از تایید هم‌سیکل بودن موش‌های صحرایی مورد مطالعه در هر گروه، جراحی حیوانات انجام شده و پس از هم‌سیکل شدن دوباره چرخه فحلی موش‌های صحرایی، آزمون فرمالین در فاز پرواستروس انجام می‌شد.

پس از هم‌سیکل‌کردن موش‌های صحرایی ماده در فاز پرواستروس، برای ریزتزریق داروها، ابتدا کانول‌گذاری هسته LPGiی راست انجام می‌شد. بدین منظور پس از بیهوشی با مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، حیوان در دستگاه استرئوتاکسی قرار می‌گرفت و پوست ناحیه سر به حداقل میزان برش داده می‌شد. پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و براساس مختصات ذکرشده در اطلس پاکسینوس برای ناحیه مربوط به هسته LPGi، سطح جمجمه علامت‌گذاری می‌شد: جلویی-عقبی (AP): ۱۲/۲-میلی‌متر؛ طرفی (L): ۱/۶+ میلی‌متر و پشتی-شکمی (DV): ۱۰/۵ میلی‌متر (۱۵). بعد از علامت‌گذاری ناحیه مذکور، با استفاده از مته دندانپزشکی در محل مشخص شده منفذی به اندازه قطر کانول راهنما با سرسرنگ شماره ۲۳ ایجاد می‌شد و کانول راهنما براساس عمق ذکرشده در اطلس پاکسینوس برای هسته LPGi، در درون مغز قرار می‌گرفت و قسمت بالایی آن بر روی جمجمه به‌وسیله سیمان دندانپزشکی ثابت می‌گردید. پیچ کوچکی نیز به‌صورت وارونه در استخوان جمجمه تعبیه و در درون سیمان دندانپزشکی ثابت می‌گردید. این پیچ در حکم مسلح‌سازی سیمان بوده و از جدا شدن آن از سطح جمجمه جلوگیری می‌کند. منفذ کانول راهنما در بیرون جمجمه به‌وسیله‌ی استایلت مسدود بوده و فقط در زمان‌های تزریق دارو برداشته می‌شد. پس از پایان یک هفته دوره بهبودی، هم‌سیکل بودن موش‌های صحرایی ماده در فاز پرواستروس بررسی می‌شد و در صورت تایید آن، حیوانات برای آزمون رفتاری آماده بودند. در پژوهش حاضر از نرمال سالین به عنوان حلال ۱۷بتا-استرادیول و از DMSO به عنوان حلال ICI 182,780 (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژن) استفاده شد. در این مطالعه غلظت ۰/۸ میکرومول استرادیول (خریداری شده از شرکت سیگما) (۱) و غلظت‌های ۱۵ و ۵۰ نانومول ICI 182,780 (۸، ۹) (خریداری شده از شرکت سیگما) مورد استفاده قرار گرفت. برای ریزتزریق داروها، از یک کانول نازک‌تر که معمولا از سرسوزن شماره‌ی ۳۰ تهیه می‌شد و طول آن حدود ۲ میلی‌متر بلندتر (۱) از کانول راهنما بود به‌عنوان کانول تزریق استفاده می‌شد. در روز آزمایش ۵۰۰ نانولیتر استرادیول و داروهای دیگر در هر گروه با استفاده ازکانول تزریق، لوله‌ی پلی‌اتیلن و سرنگ هامیلتون به‌صورت یک‌طرفه به سمت راست هسته LPGi تزریق می‌شد و پس از ۱۵ دقیقه آزمون فرمالین انجام می‌شد.

برای بررسی اثر استرادیول بر روی تعدیل درد از آزمون فرمالین استفاده شد. استرادیول در شرایط پایه‌ای نقش ناچیزی در تعدیل دردحاد ایفا می‌کند و اساساً در مهار فیدبکی درد مداوم و پایدار نقش دارد. آزمون فرمالین یک روش ارزش‌مند و مدل مناسب برای سنجش و ارزیابی درد مداوم و پایدار ناشی از یک محرک شیمیایی می‌باشد. در این آزمون به منظور مشاهده و بررسی رفتارهای حیوان، از یک محفظه شفاف با کف مسطح، به ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ سانتی‌متر مکعب و از جنس پلکسی‌گلس استفاده می‌شد. برای مشاهده پنجه پای حیوان، در زیر این محفظه شفاف، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه تعبیه شده است. در این آزمون، ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۵ درصد به زیر پوست پنجه پای چپ حیوان توسط یک سرسوزن شماره ۳۰ تزریق می‌شد. به دنبال تزریق فرمالین، حیوان مجموعه ای از رفتارهای القاء شده با فرمالین را نشان می‌داد که در این مطالعه رفتار تکان دادن پای ملتهب (Paw Jerking Frequency) به مدت

۶۰ دقیقه ثبت می‌گردید. پاسخ‌های رفتاری ناشی از تزریق فرمالین دارای دو فاز می‌باشد: فاز اول یا فاز حاد میانگین پاسخ‌های رفتاری ۷ دقیقه‌ی اول آزمون و فاز دوم یا فاز درد پایدار که میانگین پاسخ‌های رفتاری بین دقیقه‌های ۱۵ تا ۶۰ می‌باشد (۸، ۹).

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 برای آن‌ها به‌درستی انجام شده بود برای آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و به کمک 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 داده‌ها در نظر گرفته شد.

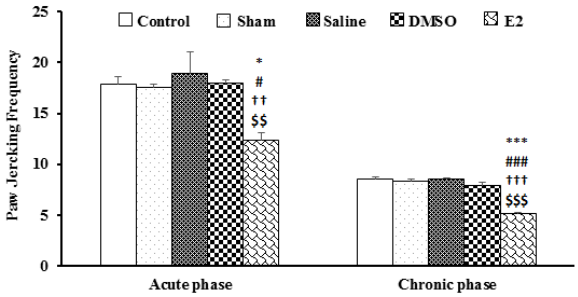
۳. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1397.385 به تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز رسیده است.

۴. یافته‌ها

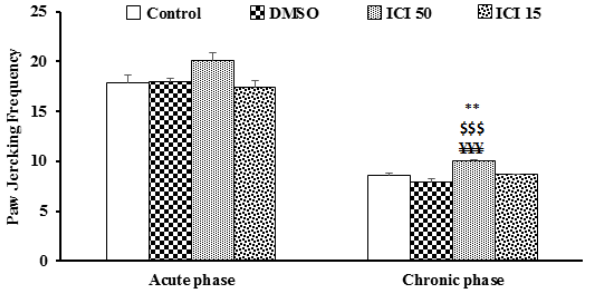
همان‌گونه که پیش از این بیان شد، پاسخ‌های رفتاری ناشی از تزریق فرمالین دارای دو فاز می‌باشد: فاز اول یا فاز حاد میانگین پاسخ‌های رفتاری ۷ دقیقه‌ی اول آزمون و فاز دوم یا فاز درد پایدار که میانگین پاسخ‌های رفتاری بین دقیقه‌های ۱۵ تا ۶۰ آزمون فرمالین می‌باشد (۸، ۹). بنابراین، در پژوهش حاضر فازهای اول و دوم فرکانس تکان دادن پای ملتهب، گروه‌های کنترل، جراحی و کانول‌گذاری هسته‌ی LPGi (گروه شم)، تزریق ۵۰۰ نانولیتر سالین به‌عنوان حلال ۱۷بتا- استرادیول و تزریق DMSO به‌عنوان حلال ICI 182,780 به داخل هسته‌ی LPGi تغییر معنی‌داری را نسبت به یکدیگر نشان ندادند (شکل ۱).

تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به داخل هسته LPGi تعداد دفعات تکان‌دادن پای ملتهب را در طی فاز اول آزمون فرمالین نسبت به گروه‌های کنترل ($p<۰/۰۵$)، شم ($p<۰/۰۵$)، سالین ($p <۰/۰۱$) و DMSO ($p <۰/۰۱$) به‌طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۱). هم‌چنین، تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷ بتا- استرادیول در طی فاز دوم، تعداد دفعات تکان دادن پای ملتهب را نسبت به گروه‌های کنترل، سالین، شم و DMSO ($p <۰/۰۰۱$) به‌طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۱).

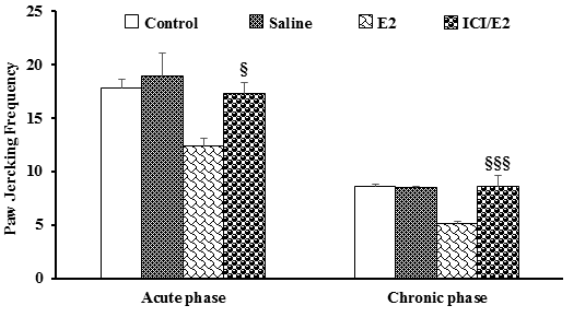


شکل ۱. اثر تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷ بتا- استرادیول به‌داخل هسته‌ی LPGi روی فرکانس تکان‌دادن پای ملتهب به‌دنبال تزریق ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۵ درصد به سطح داخلی پنجه‌ی پای چپ. * نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، # با گروه شم، † با گروه نرمال‌سالین و $ با گروه DMSO می‌باشد. * نشان‌دهنده‌ی احتمال ($p <۰/۰۵$) و ** 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 و داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

تزریق ۵۰ نانومول ICI 182,780 فقط فاز دوم رفتار تکان دادن پای ملتهب را نسبت به گروه‌های کنترل ($p <۰/۰۱$)، DMSO ($p <۰/۰۰۱$) و دوز ۱۵ نانومول ICI 182,780 ($p <۰/۰۰۱$) به‌طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۲). ولی تزریق ۱۵ نانومول ICI182.780 اثر معنی‌داری روی رفتار تکان دادن پای ملتهب طی فاز اول و دوم آزمون فرمالین نداشت (شکل ۲).



شکل ۲. اثر تزریق ۱۵ و ۵۰ نانومول آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژنی (ICI 182,780) 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. * نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، $ با گروه DMSO و ¥ با گروه ۱۵ نانومول ICI می‌باشد. ** 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. در هر گروه ۶ سر موش صحرایی ماده استفاده شده است. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده‌اند.



شکل ۳. مقایسه‌ی رفتار تکان دادن پای ملتهب میان گروه کنترل، سالین، ۱۷بتا- استرادیول و پیش‌تیمار هسته‌ی LPGi با ۱۵ نانومول ICI 182,780 طی فاز اول و فاز دوم آزمون فرمالین. فاز اول میانگین پاسخ رفتاری ۷ دقیقه‌ی اول آزمون و فاز دوم میانگین پاسخ رفتاری بین دقیقه‌های ۱۶ تا ۶۰ می‌باشد. § نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول می‌باشد. § نشان‌دهنده‌ی احتمال ($p <$ ۰/۰۵) 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.

از آن‌جایی که برای ادامه مطالعه دوزی از آنتاگونیست مورد نیاز بود که علی‌رغم داشتن اثر آنتاگونیستی تعدیل درد را تحت تاثیر قرار ندهد، براساس نتایج به دست آمده غلظت ۱۵ نانومول ICI 182,780 برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

برای بررسی نقش گیرنده‌های استروژنی در اثر بی‌دردی ناشی از تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi، آنتاگونیست این گیرنده‌ها (ICI 182,780)، ۱۵ دقیقه پیش از تزریق ۱۷بتا- استرادیول به‌داخل هسته‌ی LPGi تزریق شد و ۱۵ دقیقه پس از تزریق ۱۷بتا-استرادیول فرمالین تزریق و بلافاصله رفتار دردی ناشی از فرمالین به مدت ۶۰ دقیقه بررسی شد. پیش‌تیمار هسته‌ی LPGi با ۱۵ نانومول ICI 182,780، فرکانس تکان دادن پای ملتهب را در فاز اول ($p <$ ۰/۰۵) و فاز دوم ($p <$ ۰/۰۰۱) آزمون فرمالین به‌طور معنی‌داری افزایش داد و بی‌دردی القا شده با ۱۷بتا- استرادیول را خنثی نمود (شکل ۳).

۵. بحث

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تزریق دوز ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا- استرادیول به هسته‌ی LPGi موش‌های صحرایی ماده در طی فاز پرواستروس چرخه فحلی اثر ضددردی نسبتا قوی بر روی رفتار تکان‌دادن پای ملتهب دارد، که با پیش‌تیمار این هسته با آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژن (ICI 182,780) این اثر خنثی می‌گردد، ولی به شرایط پایه‌ای بر نمی‌گردد.

هورمون‌های استروئیدی اعمال نورونی مختلف را با تغییر میدان دریافت نورون‌ها و واکنش‌های بین‌نورونی در نواحی مغزی مختلف تنظیم می‌نمایند (۱۶). در موش‌های صحرایی نر و ماده، تحریک‌پذیری فیبرهای آوران اولیه پس از اعمال محرک دردناک تفاوت‌های جنسی را نشان می‌دهد که این تفاوت‌ها به‌وسیله رهایش ماده P برانگیخته‌شده با محرک دردناک وساطت می‌شود و این اختلاف رهایش ماده P به وسیله استرادیول میانجی‌گری می‌گردد (۱۷). بنابراین استرادیول در تکوین متمایز حساسیت مرکزی و رفتارهای دردی موش‌های صحرایی نر و ماده نقش دارد (۱۷). بسیاری از مطالعات اخیر نقش استروئیدهای جنسی را در پاسخ به محرک‌های دردزای حاد بررسی کرده اند، ولی نتایج گزارش‌شده بحث‌برانگیز

هستند. به عنوان مثال، هم افزایش و هم کاهش آستانه پاسخ به آزمون صفحه داغ و مدت زمان تاخیر آزمون پس کشیدن دم به وسیله استرادیول گزارش شده است (۱۸، ۱۹). بنابراین در مطالعه حاضر، آزمون فرمالین برگزیده شد تا علاوه بر فاز حاد درد (فاز اول)، بررسی فاز پایدار و مداوم درد (فاز دوم) نیز امکان‌پذیر باشد.

چرخه فحلی حیوانات ماده و چرخه ترشح هورمون‌های جنسی اعمال مختلف سیستم عصبی از جمله درک درد را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۰). آستانه درد در فازهای مختلف چرخه فحلی موش‌های صحرایی ماده متفاوت می‌باشد، به گونه‌ای که در آزمون صفحه داغ و تحریک دردزای پای عقبی، آستانه درد در فاز پرواستروس و استروس نسبت به سایر فازهای چرخه فحلی پایین‌تر است؛ در حالی که در آزمون پس کشیدن دم موش‌های صحرایی ماده در فاز استروس دارای بالاترین قدرت تحمل هستند که فقط یک درجه پایین‌تر از جنس نر می‌باشد، ولی در حیوانات اوارکتومی شده و فازهای مت‌استروس و دی‌استروس این امر مشاهده نشده است (۲۰).

استرادیول در تعدیل درد نقش دارد و تزریق آن پاسخ‌های رفتاری به محرک‌های دردناک را هم در حیوانات ماده (۵) و هم در حیوانات نر (۷) تغییر می‌دهد. در پژوهش اخیر نیز تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته LPGi در طی فاز پرواستروس چرخه فحلی برای بررسی اثرات مرکزی این نورواستروئید در پردازش پاسخ‌های رفتاری به محرک‌های دردناک مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که ۱۷ بتا-استرادیول سبب کاهش احساس درد و القای بی‌دردی در مدل دردی آزمون فرمالین می‌شود. در این پژوهش نیز در ادامه مطالعات پیشین آزمایشگاه ما، غلظت ۰/۸ میکرومول ۱۷بتا-استرادیول که در مطالعات پیشین اثر ضددردی موثرتری را روی رفتارهای تکان دادن پای ملتهب اعمال می‌کرد برای ادامه آزمایشات انتخاب شد.

تزریق ۰/۸ میکرومول ۱۷ بتا-استرادیول به داخل هسته LPGiی موش‌های صحرایی ماده در طی فاز پرواستروس، فرکانس رفتار تکان دادن پای ملتهب را در هر دو فاز اول و دوم آزمون فرمالین کاهش داد که نشان دهنده‌ی اثر ضددردی آن روی درد حاد و پایدار می‌باشد که با نتایج مطالعه کوبا و همکاران مغایرت دارد (۲۱). هم‌چنین، فیجز- سزابو و همکاران گزارش کرده‌اند که تیمار درازمدت موش‌های صحرایی اوارکتومی‌شده با استرادیول اثر پیش‌دردی (Pronociceptive) قوی را روی هر دو فاز آزمون التهابی فرمالین دهانی-صورتی اعمال می‌کند (۲۲). برخلاف نتایج مطالعه حاضر، مانینو و همکاران نیز نشان دادند که تزریق دوزهای مختلف ۱۷-بتا استرادیول به موش‌های صحرایی ماده پاسخ‌های رفتاری ناشی از تزریق فرمالین را فقط طی فاز دوم آزمون فرمالین کاهش می‌دهد (۲۳). نگ و موخا نیز نشان داده‌اند که استروژن بی‌دردی القاشده با فعالیت گیرنده‌های α2- آدرنرژیک را متوقف کرده و سبب القای پردردی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده می‌شود که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد (۲۴). خاکپای و همکاران نیز نشان دادند که تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته لوکوس سرلئوس اثری بر فاز حاد رفتارهای القاشده با فرمالین ندارد (۶). اما غلظت و نحوه‌ی تزریق استرادیول، روش‌های سنجش درد و جنس حیوانات مورد استفاده در مطالعات ذکر شده متفاوت بوده است.

استرادیول ممکن است پاسخ‌های التهابی را از طریق تغییر سطوح پروستاگلاندین E2 و کورتیزول تعدیل نماید. بنابراین در تولید پاسخ‌های دردی به محرک‌های التهابی نقش دارد و فاز دوم آزمون فرمالین را در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده تعدیل می‌کند (۲۱) که در پژوهش حاضر نیز استرادیول در پاسخ به درد التهابی القاشده با فرمالین نقش داشته و باعث کاهش احساس درد می‌گردد. تزریق داخل بطنی استرادیول به موش‌های صحرایی نر فاز دوم رفتارهای تکان دادن، لیسیدن و خم کردن پای ملتهب را کاهش می‌دهد (۷) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. هم‌چنین خاکپای و همکاران گزارش دادند که تزریق ۱۷- بتااسترادیول به هسته LPGi، رفتارهای ناشی از فرمالین را در فاز دوم آزمون فرمالین کاهش می‌دهد (۸). هرناندز-لئون و همکاران گزارش کرده‌اند که در مدل درد عضلانی فیبرومیالژیا تیمار موش‌های صحرایی

اوارکتومی‌شده با ۱۷-بتااسترادیول دارای اثر ضددردی و ضدآلودینایی قوی می‌باشد (۲۵) که با یافته‌های این مطالعه مطابقت دارد. در موش‌های صحرایی ماده نسبت به موش‌های صحرایی نر تحریک‌پذیری فیبرهای آوران اولیه در فاز دوم آزمون فرمالین بالاتر است که به دلیل افزایش رهایش ماده P در آن‌ها می‌باشد. این تفاوت‌ها فقط به فاز دوم آزمون اختصاص دارد و توسط استرادیول القا می‌گردد (۱۶) که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. اوارکتومی باعث شروع آهسته و طولانی‌مدت پردردی شدیدی می‌شود که به وسیله استروژن معکوس می‌شود (۲۶) که نشان‌دهنده اثر ضددردی استرادیول می‌باشد و با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. استرادیول در مدل درد التهابی ناشی از فرمالین سبب کاهش رفتارهای ناشی از درد می‌شود (۲۳) که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد. رایلا و مک‌کارلسون نشان دادند که تزریق زیرپوستی استرادیول به موش‌های صحرایی‌ماده اوارکتومی شده، سبب افزایش فرکانس تکان دادن پای ملتهب می‌شود. بنابراین اگر موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی‌شده به‌صورت کوتاه‌مدت و شبه پرواستروسی در معرض استرادیول قرار گیرند، رفتار دردی برانگیخته شده با التهاب در آن‌ها به‌طور وابسته به شدت محرک افزایش می‌یابد و سبب القا پردردی می‌گردد (۲۷) که با یافته‌های این مطالعه مغایرت دارد. مغایر با یافته‌های این مطالعه، گاموند و همکاران 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 بتا-استرادیول نسبت به مشتقات دیگر این هورمون‌ها بیشتر است. این در حالی است که هورمون‌های جنسی مردانه و به‌طور عمده تستوسترون نقش موثرتری در کاهش درد در فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین دارند، بدون آن‌که اثری بر فاز میانی داشته باشند (۲۸). با این وجود، سکارلی و همکاران 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 (۲۹) که این امر نشان‌دهنده 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.

در این مطالعه دوز بالاتر (۵۰ نانومول) ICI 182,720 سبب القای پردردی در فاز دوم رفتارهای تکان‌دادن پای ملتهب شد. با آن‌که ICI 182,780 به‌عنوان آنتاگونیست خالص گیرنده‌های استروژنی در نظر گرفته می‌شود (۲۹)، گزارش‌هایی نیز مبنی بر وجود اثر اگونیست نسبی آن وجود دارد، آنتی‌استروژن ICI 182,780 با تمایل بالایی به گیرنده‌های غشایی استروژنی GPR30 متصل می‌شود و اثرات استرادیول را تقلید می‌نماید (۳۰).

خاکپای و همکاران گزارش کردند که تزریق غلظت بالای (۱۰۰ نانومول) ICI 182,780 به داخل LC اثر ضددردی بارزی را روی فاز اول و دوم همه رفتارهای القاشده با فرمالین نشان می‌دهد (۶) که با یافته‌های این مطالعه مغایرت دارد. ولی برخلاف آن‌ها سکارلی و همکاران اثر آنتاگونیستی ICI 182,780 را در رتهای نر نشان دادند (۲۹) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

۶. نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که پیش‌تیمار هسته LPGi با آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های استروژنی (ICI 182,780)، اثر ضددردی ۱۷بتا-استرادیول روی رفتار تکان دادن پای ملتهب را خنثی می‌کند. بنابراین بخشی از اثر ضددردی ۱۷بتا- استرادیول ممکن است به وسیله گیرنده‌های داخل سلولی استروژن وساطت شود. در همین راستا، خاکپای و همکاران نشان دادند که تعدیل درد ناشی از تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi موش‌های صحرایی نر به وسیله‌ی گیرنده‌های استروژنی میانجی‌گری می‌شود (۸). مغایر با یافته‌های این پژوهش، خاکپای و همکاران نشان دادند که تزریق ICI 182,780 به داخل هسته‌ی لوکوس‌سرولئوس اثری روی رفتارهای القاشده با فرمالین ندارد (۶). رفتار تکان دادن پای ملتهب یک رفلکس فازیک هست که کاهش آن نشان‌دهنده بالا رفتن آستانه درد می‌باشد (۷). بنابراین براساس کاهش فاز

اول و دوم رفتار تکان‌دادن پای ملتهب القاشده با فرمالین می‌توان نتیجه گرفت که تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi احتمالا از طریق گیرنده‌های استروژنی باعث افزایش آستانه Nociceptorها و فیبرهای آوران اولیه می‌شود (۶).

کاهش فاز اول رفتارهای القاشده با فرمالین نشان‌دهنده آن است که تزریق ۱۷بتا-استرادیول به داخل هسته‌ی LPGi احتمالا از طریق گیرنده‌های استروژنی فعالیت نورونی مدارات نخاعی تحریک شده با محرک‌های دردی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. کاهش فاز دوم رفتارهای ناشی از تزریق فرمالین نیز بیان‌گر آن است که تیمار هسته LPGi با ۱۷بتا-استرادیول ورودی‌های دردی و پردازش محرک دردی در این هسته و متعاقب آن در نخاع را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که ۱۷بتا-استرادیول در هسته LPGi ممکن است با فعال کردن گیرنده‌های استروژنی فعالیت عصبی برانگیخته شده با درد در مدارهای نخاعی را تعدیل نموده، رفتار تکان دادن پای ملتهب را کاهش داده و سبب القای بی‌دردی شود. بدین معنی‌که ۱۷بتا-استرادیول ممکن است با فعال‌کردن گیرنده‌های استروژنی هسته LPGi و احتمالا از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ گیرنده‌های استروژنی در سلول‌ها، بیان ژن‌های درگیر در این مسیرها و ساخت پروتئین‌های درگیر در احساس، درک و تعدیل درد را تغییر دهد؛ در نتیجه باعث افزایش و یا کاهش مقدار و به دنبال آن فعالیت این پروتئین‌ها می‌گردد که آن هم به نوبه خود به تغییر فعالیت عصبی برانگیخته شده با درد در مدارهای نخاعی و فوق‌نخاعی منجر گردیده و سبب بروز بی‌دردی می‌شود.

۷. تقدیر و تشکر

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

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Khakpay R, Azaddar M, Khakpai F. Involvement of glutamate receptors of the paragigantocellularis lateralis nucleus in the pain modulatory effect of 17beta-estradiol in male rats. Acta neurologica Belgica. 2018. Epub 2018/08/23.
2. Normandin JJ, Murphy AZ. Excitotoxic lesions of the nucleus paragigantocellularis facilitate male sexual behavior but attenuate female sexual behavior in rats. Neuroscience. 2011;175:212-23. Epub 2010/12/15.
3. 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. Epub 1981/01/01.
4. 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. Epub 1991/01/01.
5. 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 .Epub 2003/06/07.
6. Khakpay R, Semnanian S, Javan M, Janahmadi M. The effect of intra-locus coeruleus injection of 17beta-estradiol on inflammatory pain modulation in male rat. Behavioural brain research. 2010; 214(2): 409-16. Epub 2010/07/06.
7. Aloisi AM, Ceccarelli I. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. Neuroscience. 2000; 95(2):559-66. Epub 2000/02/05.
8. 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.
9. Khakpay R, Ansari S, Khakpai F. The antinociceptive effect of 17β-estradiol in the paragigantocellularis lateralis nucleus of ovariectomized female rats mediated by estrogen Receptors. Arak Medical University Journal (AMUJ). 2017; 20(125):29-38.
10. Long JA, Evans HM. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena: University of California Press; 1922.
11. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia. 2002; 62(4A):609-14. Epub 2003/03/28.
12. Gulinello M, Smith SS. Anxiogenic effects of neurosteroid exposure: sex differences and altered GABAA receptor pharmacology in adult rats. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2003; 305(2):541-8. Epub 2003/02/28.
13. Jahangiri L, Kesmati M, Najafzadeh H. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effect of nanoparticles of magnesium oxide in mice with and without ketamine. European review for medical and pharmacological sciences. 2013; 17(20): 2706-10. Epub 2013/11/01.
14. Heidarifar R, Mehran N, Heidari A, Tehran HA, Koohbor M, Mansourabad MK. Effect of Dill (Anethum graveolens) on the severity of primary dysmenorrhea in compared with mefenamic acid: A randomized, double-blind trial. Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2014; 19(4):326-30. Epub 2014/08/07.
15. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates (6rd ed.). Academic PressLondonUK. 2007.
16. 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. Epub 2008/11/11.
17. Koch M, Ehret G. Immunocytochemical localization and quantitation of estrogen-binding cells in the male and female (virgin, pregnant, lactating) mouse brain. Brain research. 1989; 489(1):101-12. Epub 1989/06/05.
18. McEwen BS, Coirini H, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, Gould E, Schumacher M, et al. Steroid hormones as mediators of neural plasticity. The Journal of steroid biochemistry

and molecular biology. 1991; 39(2): 223-32. Epub 1991/08/01.

19. Tsuruoka M, Willis WD, Jr. Bilateral lesions in the area of the nucleus locus coeruleus affect the development of hyperalgesia during carrageenan-induced inflammation. Brain research. 1996; 726(1-2): 233-6. Epub 1996/07/08.
20. Gordon FT, Soliman MR. The effects of estradiol and progesterone on pain sensitivity and brain opioid receptors in ovariectomized rats. Hormones and behavior. 1996; 30(3):244-50. Epub 1996/09/01.
21. 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.
22. Fejes-Szabo A, Spekker E, Tar L, Nagy-Grocz G, Bohar Z, Laborc KF, et al. Chronic 17beta-estradiol pretreatment has pronociceptive effect on behavioral and morphological changes induced by orofacial formalin in ovariectomized rats. Journal of pain research. 2018; 11:2011-21. Epub 2018/10/13.
23. Mannino CA, South SM, Quinones-Jenab V, Inturrisi CE. Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. The journal of pain: official journal of the American Pain Society. 2007; 8(4):334-42. Epub 2006/12/05.
24. Nag S, Mokha SS. Activation of the trigeminal alpha2-adrenoceptor produces sex-specific, estrogen dependent thermal antinociception and antihyperalgesia using an operant pain assay in the rat. Behavioural brain research. 2016; 314:152-8. Epub 2016/08/11.
25. Hernandez-Leon A, De la Luz-Cuellar YE, Granados-Soto V, Gonzalez-Trujano ME, Fernandez-Guasti A. Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. Hormones and behavior. 2018; 97: 39-46. Epub 2017/10/31.
26. Sanoja R, Cervero F. Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. Eur J Pain. 2008; 12(5):573-81. Epub 2007/10/26.
27. Ralya A, McCarson KE. Acute estrogen surge enhances inflammatory nociception without altering spinal Fos expression. Neuroscience letters. 2014; 575:91-5. Epub 2014/05/28.
28. 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. Epub 2007/02/20.
29. Ceccarelli I, Fiorenzani P, Grasso G, Lariviere WR, Massafra C, Massai L, et al. Estrogen and mu-opioid receptor antagonists counteract the 17 beta-estradiol-induced licking increase and interferon-gamma reduction occurring during the formalin test in male rats. Pain. 2004; 111(1-2):181-90. Epub 2004/08/26.
30. Lu CL, Hsieh JC, Dun NJ, Oprea TI, Wang PS, Luo JC, et al. Estrogen rapidly modulates 5-hydroxytrytophan-induced visceral hypersensitivity via GPR30 in rats. Gastroenterology. 2009; 137(3):1040-50. Epub 2009/04/07.