مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۱، شماره ۳ (شماره پیاپی ۴۴)، پاییز ۱۳۸۷، ۸۷-۷۹

اثر تزریق داخل بطنی رتینوئیک اسید بر آستانه درد در موش صحرایی نر

دکتر وحید شیبانی[۱]، محمدرضا آفرینش خاکی[۲*]، زهرا حاجی علیزاده[۲]، ماندانا جعفری[۲]، راضیه عرب نژاد[۲]، دکترعلی شمسی زاده[۳]

۱-دکترای فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

۳-گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ایران

تاریخ دریافت۸۶/۸/۲۹ ، تاریخ پذیرش ۸۷/۵/۱

چکیده

مقدمه: در مطالعه حاضر، با استفاده از مدل درد حاد و مزمن اثر تزریق داخل بطنی رتینوئیک اسید در موش‌های صحرایی بر آستانه درد مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه از آزمون tail - flick و آزمون فرمالین جهت تعیین آستانه درد استفاده شد. در هر آزمون آستانه درد حاد و مزمن (یک و دو هفته) ۲۵۲ سرموش صحرایی نر بالغ با وزن(۲۵±۲۷۵)گرم مورد ارزیابی قرار گرفت. در مدل حاد، ۳۰ دقیقه قبل از تست رفتاری دارو به صورت تک دوز و در مدل مزمن، دارو بمدت یک یا دو هفته تزریق می‌شد. حیوانات در هر مدل، به صورت تصادفی در ۶ گروه هفت تایی تقسیم‌بندی شدند. در چهار گروه اول دوزهای ۶ ،۳ ، ۱، ۰/۵ میکروگرم داخل بطنی رتینوئیک اسید، در گروه پنجم حلال رتینوئیک اسید (DMSO + آب مقطر) و در گروه ششم محلول ACSF به صورت داخل بطنی تزریق شد.

نتایج: نتایج نشان داد که تزریق حاد داخل بطنی رتینوئیک اسید آستانه درد را به روش tail - flick تغییر نمی‌دهد اما تجویز مزمن رتینوئیک اسید در مقادیر ۶ ،۳ ، ۱، ۰/۵ میکروگرم داخل بطنی به مدت یک و دو هفته به طور معنی‌داری آستانه درد را در مقایسه با گروه DMSO کاهش می‌دهد($p<۰/۰۵$). هم‌چنین تزریق دوز ۳ میکروگرم داخل بطنی رتینوئیک اسید به مدت دو هفته آستانه درد را در فاز اول آزمون فرمالین کاهش می‌دهد.

نتیجه گیری: چنین نتیجه‌گیری شد که تزریق داخل بطنی رتینوئیک اسید به مدت طولانی به طور معنی‌داری سبب افزایش واکنش‌های درد در موش‌های صحرایی می‌شود.

واژگان کلیدی: درد، رتینوئیک اسید، آزمون tail - flick ، آزمون فرمالین، تزریق داخل بطنی، موش صحرایی

***نویسنده مسئول:** کرمان، بلوار جمهوری اسلامی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

Email: reza.afarinesh@gmail.com

مقدمه

درد شامل تجارب نامطلوب حسی و عاطفی بوده که پاسخ‌های آتونوم، شناختی، هیجانی و رفتاری خاصی را به دنبال دارد. درد و پاسخ‌های مربوطه توسط تحریکات دردناک ناشی از صدمات یا بیماری‌های پوستی، ساختمان‌های سوماتیک عمقی، احشاء یا عملکرد غیرطبیعی عضلات یا احشاء برانگیخته می‌شود(۱). در سال ۱۹۱۵ ویتامین A به عنوان یک ماده ضروری برای رشد و حیات شناخته شد. این ویتامین در بسیاری از اعمال فیزیولوژیکی نظیر بینایی، تولیدمثل، توسعه بافت اپیتلیال ، تمایز جنینی، رشد و تکامل مغز و نخاع(۲) و اعمالی چون حافظه و یادگیری دخالت می‌کند. اگرچه از ویتامین A به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در درمان صرع(۳)، موثر در تولید مثل (۴) و درمان بیماری آلزایمر (۵) استفاده می‌شود، اما مکانیسم‌هایی که این ویتامین می‌تواند در مغز بالغ از آن طریق اثراتش را اعمال نماید هنوز ناشناخته می‌باشد(۶،۷).

ویتامین A و مشتقات آن از جمله رتینوئیک اسید از طریق دو دسته گیرنده RAR (گیرنده رتینوئیک اسید) و RXR (گیرنده‌های x رتینوئیدی) اثرات خود را در سلول‌های بدن القا می‌کنند. هر کدام از این گیرنده‌ها سه زیر گونه α وβ وγ دارند. این گیرنده‌ها در قسمت‌های مختلفی از جمله مغز و نخاع بیان می‌شوند(۸). رتینوئیک اسید در نخاع بیشتر از طریق گیرنده‌های هترومریک RAR-RXR عمل می‌نماید. در هسته سلول،گیرنده- رتینوئیک اسید پس از الحاق به عناصر پاسخی رتینوئیک اسید ATRA response elements (RAREs) ، اثرات خود را بر بیان ژن القاء می‌کند. رتینوئیک اسید هم‌چنین سبب افزایش فسفریلاسیون آنزیم‌های کینازی هم‌چون extracellular-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) می‌شود(۹). فسفریلاسیون این آنزیم در تنظیم افزایشی آنزیم COX2 موثر می‌باشد(۱۰). گیرنده‌های رتینوئیدی در اعمال مغز در موش‌ها و هم‌چنین اعمال سیستم عصبی مرکزی در انسان نقش دارند(۱۱).

مصرف بیش از اندازه ویتامین A باعث ایجاد عوارضی نظیر کاهش وزن، سردرد، اختلالات پوستی، تب، خشکی پوست، تهوع و استفراغ می‌شود(۱۲).

مشخص شده بین رتینوئیک اسید و سنتز پروستانگلندین‌ها(۱۳) و آنزیم سیکلواکسیژناز COX-2 (۱۴-۱۷)، رابطه وجود دارد. تزریق خوراکی رتینوئیک اسید از طریق افزایش بیان ژن سیکلواکسیژناز ۲ (COX-2) که یک آنزیم کلیدی در سنتز پروستاگلندین است، سبب افزایش درد متعاقب تزریق زیر جلدی کاراگنین می‌شود(۱۴). مکانیسم‌هایی که سبب افزایش بیان ژن COX 2 می‌شود، هنوز مشخص نشده‌اند. رتینوئیک اسید ممکن است یکی از عوامل افزایش دهنده آن باشد(۱۴). الیک و همکاران (۲۰۰۶) مشخص نمودند که در سلول‌های نوروبلاستومای انسانی SH-SY5Y، رتینوئیک اسید از طریق افزایش سنتز PGE2 سبب افزایش mRNA و پروتئین COX2 می‌شود(۱۸). اگرچه تناقضاتی نیز در این درباره وجود دارد. مشخص شده که سنتز آنزیم COX2 و پروستانگلندین‌های (E2) توسط رتینوئیک اسید کاهش می‌یابد(۱۵،۱۷).

مشخص شده که تزریق داخل نخاعی رتینوئیک اسید، اندازه ناحیه میدان دریافتی حس درد را پس از تزریق کاراگنین به کف پای موش‌های صحرایی را افزایش می‌دهد(۱۰). با توجه به این که مطالعه‌ای در رابطه با اثرمستقیم تزریق ویتامین A بر آستانه درد از طریق تزریق داخل بطنی رتینوئیک اسید در مغز یافت نشد، و با توجه به این که مغز می‌تواند از طریق مسیرهای نزولی به نخاع در پردازش حس درد دخالت کند، ما بر آن شدیم تا اثرات وابسته به دوز رتینوئیک اسید را بر روی درد حاد و مزمن به روش تزریق داخل بطنی بر آستانه درد موش‌های صحرایی نر بالغ را مورد ارزیابی قرار دهیم.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. از ۲۵۲ سر

موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن۲۵± ۲۷۵گرم استفاده شد. حیوانات به صورت مجزا از هم در قفس‌هایی از جنس پلکس گلاس در دمای۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و آب و غذا نیزدر دسترس آنها قرار گرفت. هر حیوان در هر آزمون فقط یک بار تحت آزمایش قرار گرفت. در تمامی مراحل انجام این پژوهش، مصوبات مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی هم‌چون دسترسی آزادانه به آب و غذا ، کشتن بدون درد، جلوگیری از درد ناشی از جراحی مثلاً استفاده از لیدوکائین در حین عمل و افزایش بیهوده موش در هر گروه رعایت گردیده است (طرح مصوب کمیته اخلاق در مرکز تحقیقات علوم اعصاب).

از داروی رتینوئیک اسید ساخت کارخانه TOCRIS کشور انگلستان با دوزهای ۶، ۳، ۱، ۰/۵ میکروگرم محلول در یک میکروگرمDMSO استفاده شد. برای تزریق داخل بطنی (I.C.V) دارو از سرنگ هامیلتون ۲۵ میکرولیتری و لوله پلی اتیلن ۱۰ استفاده شد. تمامی تزریق‌ها در حجم ۵ میکرو لیتر و در مدت زمان یک دقیقه انجام شد. به منظور تزریق داخل بطنی حیوان ابتدا با تزریق زایلوزین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و کتامین(۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی بیهوش می شد. سپس حیوان دردستگاه استریوتاکس قرار گرفت و با استفاده ازاطلس پاکسینوز کانول گذاری در ناحیه بطن با مختصات(۳ میلی متر =D، ۱/۴±=L میلی متر ، ۰/۸ -=AP میلی متر) انجام شد(۱۹). این کانول با استفاده از خمیر دندان پزشکی فیکس گردید. دهانه کانول برای جلوگیری از عفونت به وسیله مفتول فلزی مسدود می‌گردید. یک هفته به حیوان جهت بهبودی فرصت داده می‌شد و سپس آزمایشات انجام می‌شد. برای بررسی اثر رتینوئیک اسید بر آستانه درد موش‌های صحرایی از تست‌های tail-flick و فرمالین استفاده شد. ارزیابی و ثبت داده‌ها با انتخاب ۲ پژوهش‌گر با تجربه و آموزش دیده صورت گرفت.

آزمون tail-flick:در این آزمایش از دستگاه tail-flick مدل ANALGESY-METER LE 7106 ساخت کارخانه Pan lab(Espania) استفاده شد. شدت نور مورد استفاده برابر۷ بود و از زمان ۱۰ ثانیه به عنوان قطع نوردهی (cut of time) استفاده شد. یعنی چنانچه حیوان تا مدت ۱۰ ثانیه پس از شروع تابش نور سوزان ، دم خود را نمی‌کشید به منظور جلوگیری از آسیب بافتی محرک قطع می‌شد. حیوان به صورت افقی داخل محفظه مخصوص نگهداری حیوان قرار گرفت و دم آن آزاد بود. مدت زمان تاخیر در کشیدن دم سه مرتبه و با فواصل ۵ دقیقه قبل از تزریق دارو اندازه‌گیری شد و میانگین آن به عنوان زمان تأخیر پس کشیدن دم قبل از تزریق دارو ثبت شد. حیواناتی که حداقل در دو آزمون از سه مورد فوق زمان تأخیر بیش از ۶ ثانیه داشتند از جریان آزمون حذف شدند.

در گروه‌های آزمایش با تجویز حاد، داروی رتینوئیک اسید با دوزهای ۰/۵،۱،۳، ۶ میکروگرم و درگروه‌های شاهد محلولACSF یا محلول(آب مقطر+DMSO) (هم حجم با دارو) تزریق داخل بطنی انجام می‌شد. ۱۵ دقیقه پس از تزریق آزمون tail-flick انجام شد و تا مدت ۲ ساعت و در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه ای زمان تأخیر پس کشیدن دم ثبت گردید.

در گروه‌های آزمایش با تجویز مزمن (به مدت یک و دو هفته) داروی رتینوئیک اسید با دوزهای ۶ ،۰/۳،۱،۵ میکرو گرم و درگروه‌های شاهد محلولACSF یا محلولDMSO (هم حجم با دارو) هر روز به طور متوالی تزریق شد. در روز هشتم ۳۰ دقیقه پس از آخرین تزریق دارو یا حلال، یک سری ۳ تایی از آزمون انجام شد و میانگین زمان تأخیر پس کشیدن دم ثبت گردید(۲۰).

آزمون فرمالین: از مدل ابداع شده توسط دوبویسون و دنیس برای ارزیابی درد مزمن استفاده شد. بدین ترتیب که حیوانات یک ساعت قبل از تست به منظور عادت کردن با شرایط آزمایش به داخل جعبه مخصوص تست فرمالین منتقل شدند. این جعبه مخصوص از جنس پلکس گلاس و در ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ سانتی متر ساخته شده و به منظور مشاهده بهتر حرکات حیوان آینه‌ای با زاویه ۴۵

درجه زیر آن و روبروی مشاهده کننده قرار گرفت.

در گروه‌های آزمایش با تجویز حاد ۳۰ دقیقه پس از تزریق داروی رتینوئیک اسید با دوزهای ۶ ،۳،۵، ۰/۱ میکروگرم و درگروه‌های شاهد محلول ACSF یا محلول DMSO (هم حجم با دارو)، آزمون فرمالین انجام شد.

در گروه‌های آزمایش با تجویز مزمن (به مدت یک و دو هفته)، داروی رتینوئیک اسید با دوزهای ۶ ،۳،۵، ۰/۱ میکروگرم و درگروه‌های شاهد محلول ACSF یا محلول DMSO (هم حجم بادارو) هر روز به صورت داخل بطنی تزریق می‌شد و در روز هشتم ۳۰ دقیقه پس ازآخرین تجویز دارو یا حلال، آزمون فرمالین انجام شد. بدین صورت که ابتدا مقدار ۵۰ میکرو لیتر از فرمالدئید ۲/۵ درصد به کف پای حیوان به صورت زیرجلدی (S.C) تزریق شد. سپس حیوان به جعبه مخصوص تست برگردانده شد و رفتار حیوان مورد بررسی قرار گرفت. رفتار حیوان برای مدت ۶۰ دقیقه نمره گذاری شد: هنگامی که حیوان وزن خود را به طور مساوی با هر دو پا تحمل می‌کرد(نمره صفر)، اگر پای خود را جمع کرده و آن را بالا نگه می‌داشت(نمره ۱)، واگر پا را می‌لیسید (نمره ۲)، اگر پا را می‌جوید یا به شدت تکان می‌داد به آن(نمره ۳) تعلق می‌گرفت. هر ۱۵ ثانیه نمره‌ای متناسب با رفتاری که حیوان بیشتر انجام می‌داد به حیوان داده می‌شد. نمره درد در طی ۶۰ دقیقه به صورت ۱۲ مقطع ۵ دقیقه‌ای محاسبه گردید. میانگین نمره درد در هر مقطع طبق فرمول زیر محاسبه شد(۲۱،۲۲).

$$\text{Pain score}=\frac{0T_0+1T_1+2T_2+3T_3}{20\text{min}}$$

دراین فرمول T_0 , T_1 , T_2 , T_3 تعداد ۱۵ ثانیه‌هایی است که حیوان در یک دوره ۵ دقیقه‌ای به ترتیب رفتارهای صفر، ۱ ، ۲ و ۳ را نشان می‌داد. میانگین ۵ دقیقه ابتدای هر تست به عنوان فاز اول آزمون فرمالین (درد حاد) و میانگین دقایق ۶۰-۱۵ آزمون به عنوان فاز دوم آزمون فرمالین (درد مزمن) محسوب گردید.

پس از جمع‌آوری داده‌ها محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. از آزمون‌های آماری پارامتریک آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه و دنبال شده با پس آزمون LSD استفاده شد و در مورد داده‌های ناپارامتریک از آزمون‌های معادل آنالیزهای پارامتریک استفاده شد. $p<0/05$ به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد. فرم نمایش داده‌ها به صورت Mean±S.E می‌باشد.

نتایج

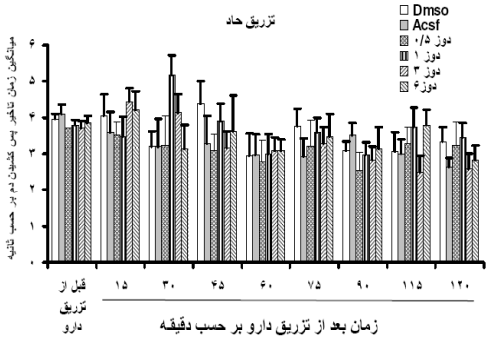
نتایج حاصل از ارزیابی آستانه درد به روش آزمون tail-flick نشان داد که زمان عقب کشیدن دم پس از تزریق حاد دوزهای ۶ ،۳،۱،۵ ۰/ میکروگرم رتینوئیک اسید در گروه‌های آزمایش، در هیچ یک از زمان‌های قبل و پس از تزریق دارو اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه DMSO نشان نمی‌دهد (نمودار ۱).

نمودار ۲ نشان می‌دهد که تزریق رتینوئیک اسید به مدت یک هفته سبب کاهش معنی‌دار آستانه درد در مقایسه با گروه DMSO می‌شود. آزمون آماری به روش آنالیز واریانس یک طرفه دنبال شده با پس آزمون LSD نشان داد که تزریق داخل بطنی دوزهای ۱،۳،۶ میکروگرم رتینوئیک اسید به مدت یک هفته سبب کاهش معنی‌دار زمان تأخیر عقب کشیدن دم در مقایسه با گروه DMSO می‌شود (به ترتیب $p=0/008$ ، $p<10^{-4}$ ، $p=0/005$). این نتایج هم‌چنین نشان داد که بین گروه DMSO و گروه ACSF اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (نمودار۲). هم‌چنین تزریق داخل بطنی دوزهای ۱،۳، ۰/۵ میکروگرم رتینوئیک اسید به مدت دو هفته سبب کاهش معنی‌دار زمان تأخیر عقب کشیدن دم در مقایسه با گروه DMSO می‌شود (به ترتیب $p=0/02$ ، $p=0/01$ ، $p=0/01$) . این نتایج هم‌چنین نشان داد بین گروه DMSO و گروه ACSF اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(نمودار۳).

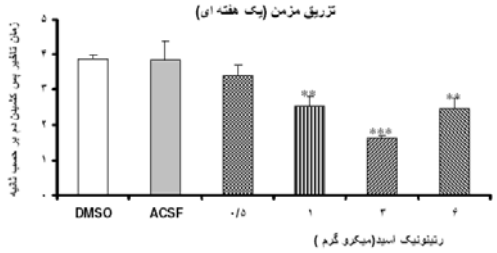
نتایج آماری به روش آنالیز واریانس نشان داد که تزریق داخل بطنی دوزهای ۶ ،۳،۱،۵ ۰/ میکروگرم

رتینوئیک اسید به صورت حاد و مزمن (تزریق یک هفته‌ای) آستانه درد را در فازهای اول (۵ دقیقه اول تزریق) و دوم (دقایق ۶۰-۱۵) آزمون فرمالین تغییر نمی‌دهد (نمودارهای ۴ و ۵).

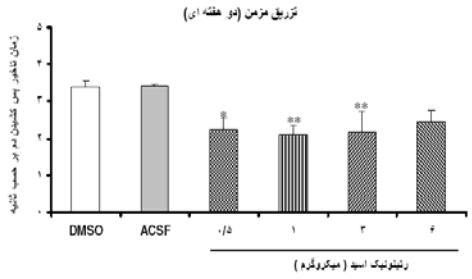
هم‌چنین این نتایج نشان داد که تزریق داخل بطنی رتینوئیک اسید به مدت دو هفته آستانه درد موش‌ها را در فاز اول آزمون فرمالین تغییر می‌دهد (p=۰/۰۰۷). پس آزمونLSD نشان داد دوز داخل بطنی دوز ۳ میکروگرم رتینوئیک اسید نمره درد را در مقایسه با گروه DMSO افزایش داده است. این نتایج هم‌چنین نشان داد که رتینوئیک اسید آستانه درد را در فاز دوم آزمون فرمالین تغییر نمی‌دهد (نمودار ۶).



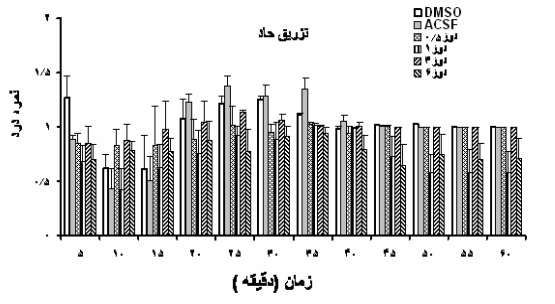
نمودار۱. اثرتزریق حاد داخل بطنی رتینوئیک اسید بر میانگین زمان تاخیرپاسخ عقب کشیدن دم.در گروه‌های رتینوئیک اسید دوزهای (۶،۳ ، ۱، ۰/۵ میکروگرم) تزریق شد. در گروه شاهد جراحی هم حجم دارو ACSF و Dmso تزریق شد. فرم نمایش داده‌ها به صورت Mean ±S.E.M می‌باشد. (n=۷).



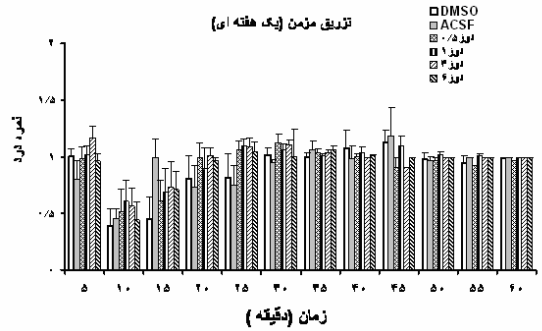
نمودار۲. اثرتزریق مزمن(به مدت یک هفته) داخل بطنی رتینوئیک اسید بر میانگین زمان تاخیرپاسخ عقب کشیدن دم.در گروه‌های رتینوئیک اسید دوزهای (۶،۳ ، ۱، ۰/۵ میکروگرم) تزریق شد. در گروه شاهد جراحی هم حجم دارو ACSF و DMSO تزریق شد. فرم نمایش داده‌ها به صورت Mean ±S.E.M می‌باشد. p<۰/۰۵*، p<۰/۰۱**، p<۰/۰۰۱***. (n=۷).



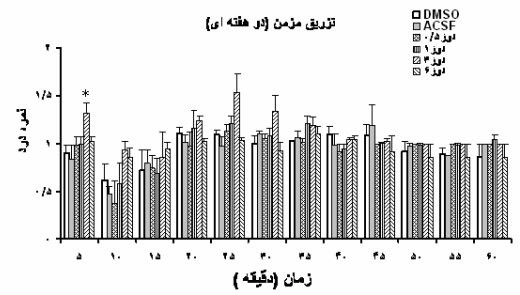
نمودار۳. اثرتزریق مزمن(به مدت دو هفته) داخل بطنی رتینوئیک اسید بر میانگین زمان تاخیرپاسخ عقب کشیدن دم.در گروه‌های رتینوئیک اسید دوزهای (۶،۳ ، ۱، ۰/۵ میکروگرم) تزریق شد. در گروه شاهد جراحی هم حجم دارو ACSF و DMSO تزریق شد. فرم نمایش داده‌ها به صورت Mean ±S.E.M می‌باشد. p<۰/۰۰۱***، p<۰/۰۱ **، p<۰/۰۵* (n=۷).



نمودار۴. اثرتزریق حاد(الف)، مزمن (یک هفته)(ب)و مزمن (دو هفته)(ج) داخل بطنی رتینوئیک اسید بر میانگین نمره درد در آزمون فرمالین.در گروه‌های رتینوئیک اسید دوزهای (۶،۳ ، ۱، ۰/۵ میکروگرم) تزریق شد. در گروه شاهد جراحی هم حجم دارو ACSF و DMSO تزریق شد. ستاره جایگاه معنی‌داری را بین گروه رتینوئیک اسید (دو هفته) با دوز ۳ میکروگرم را در مقایسه با گروه DMSO نشان می‌دهد(p<۰/۰۵*). فرم نمایش داده‌ها به صورت Mean ±S.E.M می‌باشد. (n=۷).



نمودار۵. اثرتزریق مزمن (یک هفته) داخل بطنی رتینوئیک اسید بر میانگین نمره درد در آزمون فرمالین.در گروههای رتینوئیک اسید دوزهای (۶µg، ۳، ۱، ۰/۵) تزریق شد. در گروه شاهد جراحی هم حجم دارو ACSF و DMSO تزریق شد (n=۷).



نمودار۶. اثرتزریق مزمن (دو هفته) داخل بطنی رتینوئیک اسید بر میانگین نمره درد در آزمون فرمالین.در گروههای رتینوئیک اسید دوزهای (۶µg، ۳، ۱، ۰/۵) تزریق شد. در گروه شاهد جراحی هم حجم دارو ACSF و DMSO تزریق شد. ستاره جایگاه معنی داری را بین گروه رتینوئیک اسید (دو هفته) با دوز ۳ µg را در مقایسه با گروه DMSO نشان می دهد(*p<۰/۰۵). فرم نمایش داده ها به صورت Mean ±S.E.M می باشد. (n=۷).

بحث

در این مطالعه اثر تزریق حاد و مزمن داخل بطنی رتینوئیک اسید بر آستانه درد در موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تجویز مزمن داخل بطنی رتینوئیک اسید به مدت یک و دو هفته به طور معنی‌داری آستانه درد را به روش tail - flick کاهش می‌دهد اما تزریق حاد داخل بطنی رتینوئیک اسید آستانه درد را تغییر نمی‌دهد. هم‌چنین تزریق رتینوئیک اسید با میزان ۳ میکروگرم داخل بطنی به مدت دو هفته آستانه را در فاز اول آزمون فرمالین کاهش داد.

در این مطالعه مشخص شدکه تزریق مزمن داخل بطنی رتینوئیک اسید سبب کاهش آستانه درد به روش tail - flick می‌شود. آزمون tail - flick به داروهایی که روی سیستم مرکزی عمل می‌کنند، بسیار حساس است(۲۳). در راستای مطالعه حاضر، رومرو و همکاران گزارش دادند که تجویز خوراکی رتینوئیک اسید سبب پردردی (Hyperalgesia) در موش‌های صحرایی می‌شود. آنها گزارش دادند که تزریق خوراکی رتینوئیک اسید فعالیت نورونی نخاع را تحریک می‌کند که این اثرات تحریکی سبب افزایش آلودینا و پردردی به روش درد مکانیکی و hot plate می شود. هم‌چنین آنها مشخص نمودند که تزریق خوراکی رتینوئیک اسید متعاقب کاراگنین می‌تواند از طریق افزایش بیان ژن آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ (Cox2) سبب افزایش واکنش‌های nociceptive در موش‌ها می‌شود(۶). هم‌چنین مشخص شد که تزریق داخل نخاعی رتینوئیک اسید واکنش‌های درد موش‌های صحرایی را نسبت به محرک‌های درد آور افزایش می‌دهد(۱۰). بنابراین تزریق داخل بطنی رتینوئیک اسید به طور مستقیم می‌تواند سبب افزایش درد به روش tail-flick شود. اگر چه مطالعاتی که بر روی ماکروفاژهای صفاق موش‌ها انجام شده، نشان داده‌اند که رتینوئیک اسید به طور قابل توجهی از سنتز پروستاگلاندین E و آنزیم Cox2 جلوگیری می‌کند(۱۵).

در مطالعه حاضر، تجویز حاد داخل بطنی رتینوئیک اسید تغییری بر آستانه درد در فاز اول و دوم آزمون فرمالین ایجاد نکرد. هم‌چنین مشخص شد که تزریق مزمن (دو هفته) رتینوئیک اسید با دوز ۳ میکرو گرم سبب کاهش آستانه درد در فاز اول آزمون فرمالین می‌شود. اما تغییری در آستانه درد در فاز مزمن آزمون فرمالین بوجود نمی‌آورد. مشخص شده که افزایش درد در فاز اول فرمالین (زمان ۵ دقیقه اول پس از تزریق زیر جلدی فرمالین) مربوط

به تحریک مستقیم سیستم عصبی مرکزی است و درد ناشی از تزریق زیر جلدی فرمالین در مرحله دوم آزمون فرمالین در رابطه با فرایند التهاب محیطی می‌باشد(۲۴،۲۵). سیکلواکسیژنازها cyclooxygenase(COX) از جمله آنزیم‌های موثر درسنتز پروستاگلاندینها می‌باشند(۱۳). آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ (COX-2) به صورت Constitutive در مغز بیان شده و در حالت‌های پاتولوژیکی نظیر سکته مغزی و التهاب افزایش می‌یابد (۲۶). التهاب محیطی در اثر افزایش COX-2، از طریق افزایش سنتز پروستاگلاندین‌های سیستم اعصاب مرکزی سبب ایجاد پردردی می‌شود(۲۷). از آنجا که تزریق مزمن داخل بطنی رتینوئیک اسید در فاز اول آزمون فرمالین و آزمون tail - flick سبب ایجاد پردردی می‌شود. بنابراین اثر رتینوئیک اسید کاملاً مرکزی بوده و ممکن است که مستقل از واکنش‌های در رابطه با مکانیسم‌های ضد التهاب محیطی باشد که البته در این خصوص تحقیقات بیشتر، جزئیات مربوط به این فرضیات مشخص می‌نماید.

نتیجه گیری

چنین نتیجه‌گیری شد که تزریق داخل بطنی رتینوئیک اسید به مدت طولانی به طور معنی‌داری سبب افزایش واکنش‌های درد در موش‌های صحرایی می‌شود.

منابع

1. Nasion P. Pain. Tehran: Tabibzadeh; 2004.p. 35.

2. Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. Chem Biol Interact 2003; 143(144): 201-10.

3. Sobaniec H, Sobaniec W, Sendrowski K, Sobaniec S, Pietruska M. Antioxidant activity of blood serum and saliva in patients with periodontal disease treated due to epilepsy. Adv Med Sci 2007; 52(1): 204-6

4. Tiboni GM, Bucciarelli T, Giampietro F, Sulpizio M, Diilio C. Influence of cigarette smoking on vitamin E, vitamin A, beta-carotene and lycopene concentrations in human pre-ovulatory follicular fluid. Int J Immunopathol Pharmacol 2004; 17(3): 389-93.

5. Shatenstein B, Kergoat MJ, Reid I. Poor nutrient intakes during 1-year follow-up with community-dwelling older adults with early-stage Alzheimer dementia compared to cognitively intact matched controls. J Am Diet Assoc 2007; 107(12): 2091-9

6. Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, Curreli R, et al. Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. Neuroscience 2002; 115(2): 475-82.

7. Tafti M, Ghyselinck NB. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. Arch Neurol 2007; 64(12): 1706-1711.

8. Krezel W, Kastner P, Chambon P. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. Neuroscience 1999; 89(4): 1291–300.

9. Aggarwal S, Kim SW, Cheon K, Tabassam F, Joon JH, Koo JS. Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the camp response element-binding protein in normal human bronchial epithelial cells. Mol Biol Cell 2006; 17(2): 566–75.

10. Alique M, Lucio FJ, Herrero JF. Vitamin A active metabolite, all-trans retinoic acid, induces spinal cord sensitization. II. Effects after intrathecaladministration.Br J Pharmacol 2006; 49(1): 65-72.

11. Werner EA, Deluca HF. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002; 282(3): 672-8.

12. Gamble JG. Hypervitaminosis A in a child from megadosing. J Pediatr Orthop 1985; 5(2): 219-21.

13. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998;(38): 97.

14. Romero Sandoval EA, Alique M, Moreno Manzano V, Molina C, Lucio FJ, Herrero JF. The oral administration of retinoic acid

enhances nociceptive withdrawal reflexes in rats with soft-tissue inflammation. Inflamm Res 2004; 53(7). 297-303.
15. Kim BH, Kang KS, Lee YS. Effect of retinoids on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated PGE(2) release from mouse peritoneal macrophages and TNF-alpha release from rat peripheral blood mononuclear cells. Toxicol Lett 2004; 150(2):191-201.
16. Alique M, Herrero JF, Luuo-cazana FJ. All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostaglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: involvement of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase, J Neuroinflammation 2007; 4(1):1.
17. Palozza P, Serini S, Maggiano N, Tringali G, Navarra P, Ranelletti FO, et al. ß-Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-α–Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells . J Nutr 2005; 135(1): 129-36.
18. Alique M, Lucio FJ, Herrero JF.All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostaglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: involvement of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase 1/2. Br J Pharmacol 2006; 149(1): 65-72.
19. Paxinos G, Watson C, The rat brain in the stereotaxis coordinates. 2th ed. SanDiego: Academic Press; 1986.
20. D Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation, J pharmacol. EXP 1975; (72): 74-9.
21. 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 1977; 4(2): 161-74.
22. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Pain 1992; 51(1): 5-17.
23. Carlsson KH, Jurna I. Depression by flupirtine, a novel analgesic agent, of motor and sensory responses of the nociceptive system in the rat spinal cord. Eur J Pharmacol 1987; 143(1): 89-99.
24. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain 1987; 30(1): 103-14.
25. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. Pain 1989; 38(3): 347-52.
26. Baik EJ, Kim EJ, Lee SH, Moon C. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. Brain Res 1999; 843(1-2): 118-29.
27. Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. J Biol Chem, 2004; 279(23): 24866-72.

Journal of Arak University of Medical Sciences
Autumn 2008; 11(3): 79-87

Original Article

The effect of intracerebroventricular microinjection of retinoic acid on pain threshold of male rats

Sheibani V[1], Afarinesh khaki MR[2*], Hajializadeh Z[2], Jafary M[2], Arabnezhad R[2], Shamsizadeh A[3]

1- PhD physiology, Department of Physiology and Kerman Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
2- Kerman Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
3- Department of Physiology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

Received 19 Nov, 2007 Accepted 22 Jul, 2008

Abstract

Background: Pain is an unpleasant feeling which humans experience. It is a warning sign of the damaged tissue. Due to the awful sense of pain, scientists always attempt to relieve it. Retinoic acid (RT), an active metabolite of natural vitamin A has important roles in modulation of the inflammatory responses. The aim of the present study was to analyze the pain threshold of rats which had microinjections of RT, applying acute and chronic models.

Methods and Materials: In this study, the tail flick and formalin tests were used to determine pain threshold. In each test, the acute and chronic pain thresholds of 252 Wistar male rats (275 ± 25 gr) were assayed. The druge were injected in the acute model one-dose30 minutes before behavioral testing and in chronic model two-dose for one or two-weeks. The rats of both models divided randomly into six groups (n=7). In four treatment groups retinoic acid (RT) intra cerebro ventricular (i.C.V) were injected as dosagc of 0.5, 3 and 6 (µg/kg) micrograms per kilogram. In control group, was microinjected by ACSF. In vehicle group injected RT solvent (DMSO+ Distil water).

Results: The resuits Showed acute injection of RT did not change pain thresholds in the tail-flick methd, but the chronic administration of RT (0.5, 1, 3, 6 µg/kg) reduced tail-flick latencies of the rats ($p<0.05$) in compare to DMSO group. The threshold of pain in the first phase of formalin test was reduced after injection of 3µg/kg of RT for two weeks.

Conclusion: It was concluded that chronic i.c.v. injections of RT can induce significant hyperalgesia in rat.

Key words: Pain, Retinoic Acid, Tail flick test, Formalin test, Intera cerebral ventricular (I.C.V), rat

*Corresponding author;
Email: reza.afarinesh@gmail.com
Address: Kerman Neurology Research Center, Islamic Republic Av., Kerman, Iran.