مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره یازدهم، شمارهٔ ۲، خرداد – تیر ۱۳۸۸، صفحه ۲۴-۱۶

اثر ضددردی پیوند داخل نخاعی بخش مرکزی آدرنال به همراه استفاده از هیستوگرانین در موشهای صحرائی نوروپاتیک

فریناز نصیری نژاد*[۱]، ژاکلین سیگن[۲]

۱- دانشیار گروه فیزیولوژی و عضو مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران
۲- استاد گروه علوم اعصاب دانشگاه میامی

دریافت: ۸۷/۸/۲۹ ، اصلاح: ۸۷/۹/۱۳، پذیرش: ۸۷/۱۱/۳۰

خلاصه

سابقه و هدف: درد نوروپاتی بدنبال ایجاد آسیب به سیستم اعصاب محیطی و یا مرکزی ایجاد می شود. با وجود کثرت افراد مبتلا به آن هنوز راه درمانی مناسبی پیشنهاد نشده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر ضد دردی حاصل از تزریق هیستوگرانین به همراه پیوند بافت مرکزی آدرنال به داخل نخاع در یک مدل درد نوروپاتی طراحی شده است.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی از ۲۰ سر موش صحرایی نر استفاده شد. در ابتدای آزمایش حیوانات به ۲ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. یک هفته بعد از انجام عمل آسیب عصبی (Chronic constriction injury=CCI) بافت مرکزی آدرنال و یا عضله مخطط در فضای زیر عنکبوتیه در ناحیه کمری پیوند شد و یک هفته بعد از پیوند (هفته دوم بعد از عمل آسیب عصبی) حیوانات دوزهای متفاوتی از هیستوگرانین (µg/10ml ۰/۵، ۱، ۳، ۶) و یا نرمال سالین بصورت داخل نخاعی دریافت کردند. جهت سنجش میزان درد تست های رفتاری قبل از CCI، قبل از عمل پیوند، قبل از تزریق و ۱۰ دقیقه پس از تزریق هیستوگرانین انجام گردید.

یافته ها: انجام CCI باعث ایجاد اختلالات حسی در حیوانات شد. در حیواناتی که به همراه پیوند بافت آدرنال، ۰/۵ میکروگرم هیستوگرانین دریافت کرده بودند آستانه حس حرارتی و مکانیکی به ترتیب ۰/۶±۹/۳ و۱/۱±۹/۵ ثانیه بود که نسبت به زمان قبل از تزریق افزایش یافته بود (p<۰/۰۵). در حالیکه تزریق ۶ میکروگرم هیستوگرانین تفاوت معنی داری را در آستانه حس مکانیکی و حرارتی نسبت به زمان قبل از تزریق نشان نداد. در حیواناتی که پیوند عضله دریافت کرده بودند آستانه حس حرارتی در مقادیر بالاتر از هیستوگرانین افزایش یافته بود. بطوری که آستانه حس حرارتی بدنبال تزریق ۳ میکروگرم از هیستوگرانین از ۰/۴±۶/۴ ثانیه به ۰/۹±۹ ثانیه رسیده بود که نسبت به قبل از تزریق افزایش داشت (p<۰/۰۵). چنین تفاوت معنی داری در حیواناتی که پیوند بافت آدرنال دریافت کرده بودند در مقادیر کمتر وجود داشت (p<۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان دهنده اثر وابسته به میزان هیستوگرانین در کاهش درد بدنبال پیوند بافت مرکزی آدرنال می باشد و تزریق مقادیر اندک آن همراه با پیوند بافت مرکزی آدرنال می تواند باعث تقویت عمل پیوند گردد. بر این اساس استفاده از مقادیر اندک هیستوگرانین به همراه پیوند بافت مرکزی غده آدرنال می تواند راه درمانی مناسبی جهت از بین بردن درد کرونیک به حساب آید.

واژه های کلیدی: ***هیستوگرانین، هیپرآلجزایای مکانیکی، هیپرآلجزیای حرارتی، بخش مرکزی آدرنال.***

مقدمه

درد نوروپاتیک که بدنبال آسیب به اعصاب محیطی و یا مرکزی حاصل می شود، در بسیاری از بیماریها مثل تروما، دیابت، سکته مغزی، سرطان و بعد از اعمال جراحی سیستم عصبی دیده می شود (۱). متاسفانه با وجود تعداد زیاد مبتلایان به این عارضه هنوز راه درمانی مناسبی جهت از بین بردن آن ارائه نشده است و درمان حاضر جهت از بین بردن آن به استفاده از اوپیوئیدها و داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی و یا داروهای ضد افسردگی و ضد صرع محدود می باشد که گذشته از اثرات جانبی هیچیک بطور موثر قادر به از بین بردن درد نیستند (۳و۲). در مورد مکانیسم ایجاد این درد نظریه های مختلفی وجود دارد ولی به نظر می رسد افزایش تحریک پذیری نورونهای پس سیناپسی که بدنبال آزاد شدن نوروترانسمیترهای تحریکی ایجاد می شود باعث افزایش حساسیت نورونی در نخاع و شدت پاسخ های ایجاد شده خواهد شد در ایجاد این پدیده که Wind up - نام دارد افزایش تولید نیتریک اکسید (NO) و حساسیت رسپتورهای NMDA (N- methyl- D-aspartate) نقش مهمی دارند که استفاده از آنتاگونیست رسپتورهای NMDA می تواند درد ایجاد شده بدنبال آسیب های

* مسئول مقاله:
آدرس: تهران، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
e-mail: fnasiri@iums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

عصبی را کاهش دهد (۷-۴و۱) همچنین آنتاگونیست رسپتورهای NMDA هیپرآلجزیای (افزایش احساس درد نسبت به محرک های دردناک) حرارتی ایجاد شده بدنبال استفاده ازآگونیست های رسپتورهای NMDA را از بین می برد (۹و۸). بنابراین به نظر میرسد که فعال شدن رسپتورهای NMDA مکانیسم اصلی در ایجاد دردهای کرونیک باشد و استفاده از آنتاگونیستهای مربوطه به کاهش درد کمک کند. ولی ضعف حرکتی و اختلالات روانی ایجاد شده بدنبال مصرف این آنتاگونیست ها مواردی است که از سودمندی و استفاده آنها در درمان دردهای کرونیک می کاهد (۱۰).

یکی از مسیر های تسکین درد راههای پایین رو آدرنرژیک بوده که از طریق رسپتورهای α_2 در نخاع در شرایط فیزیولوژیک می تواند درد را کاهش دهد (۱۱). از این رو موادی که بتوانند این عمل راههای پایین رو را تقویت نمایند در شرایط پاتولوژیک میتوانند میزان درد را تخفیف دهند سلول های کرومافینی موجود در قسمت مرکزی غده آدرنال مواد متعددی از جمله کاته کول آمین ها و اوپیوئید ها ترشح می کنند که با پیوند این سلول ها به فضای زیر عنکبوتیه می توان از اثرات ضد دردی آنها بهره برد (۱۴-۱۲) هیستوگرانین که یک پپتید ۱۵ اسید آمینه ای است که اخیرا از سلول های کرومافینی بافت مرکزی آدرنال جدا شده این پپتید که به مقادیر بسیار اندک ترشح می شود به دلیل اثر مهاری آن بر صرع که بدنبال غیر فعال کردن رسپتورهای NMDA ظاهر می شود بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۶و۱۵). بر اساس این مطالعات سرین- هیستوگرانین که یک آنالوگ هیستوگرانین است می تواند هیپرآلجزیا و آلودینیای (احساس درد نسبت به محرک های غیر دردناک) ایجاد شده بدنبال تزریق داخل نخاعی آگونیست های رسپتورهای NMDA را از بین ببرد.

امروزه درمان توام راه مناسبی جهت کاهش دوز موثر داروها و ایجاد اثرات درمانی بهتر به حساب می آید و بر این روش جهت کاهش درد های کرونیک تاثیر بیشتری داشته است (۱۹-۱۷) استفاده از بلاکرهای رسپتورهای NMDA می تواند واکنش هایی را که منجر به حساسیت مرکزی در نخاع میشود را مهار نماید ولی با توجه به اثرات جانبی متعدد بلاک کننده های موجود در مقادیر موثر، این مواد راه انتخابی خوبی جهت درمان به حساب نمی آیند. لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر مقادیر مختلف از هیستوگرانین به عنوان بلاک کننده رسپتورهای NMDA به همراه پیوند داخل نخاعی بافت مرکزی غده آدرنال بر کاهش میزان درد در حیوانات نوروپاتیک می باشد.

مواد و روشها

این مطالعه از نوع تجربی بوده و حیوانات مورد مطالعه موشهای صحرایی نر بالغ از نژاد sprague Dawley در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم بودند که به صورت تصادفی انتخاب و در هر گروه از ۱۰ حیوان استفاده گردید. جهت سازگاری با محیط حیوانات یک هفته قبل از شروع آزمایش به محل مخصوص منتقل شدند و در تمام طول آزمایش بدون هیچ محدودیتی از آب و غذای مخصوص تغذیه شدند. در تمامی مراحل انجام آزمایش در این مطالعه از دستورالعمل انستیتو حمایت از حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه میامی پیروی شده است. جهت تزریق داخل نخاعی، حیوانات با استفاده از هالوتان بیهوش و توسط برشی بر روی سر غشا athlanto-occipital نمایان گردید سپس با ایجاد یک برش بر روی این غشا لوله ای (PE-10) به طول ۷/۵ سانتی متر در طول نخاع و زیر سخت شامه به سمت دم وارد و ناحیه rostral لوله بر روی سر توسط سیمان دندانپزشکی محکم و ثابت شد. پس از آن ناحیه شکاف با استفاده از نخ بخیه دوخته شد. بعد از گذشت یک هفته در صورتی که حیوانات سالم بودند و اختلال حرکتی را نشان نمی دادند جهت ایجاد آسیب عصبی (Chronic constriction injury=CCI) مجددا" بیهوش شده و بر روی عصب سیاتیک پای چپ در ناحیه قبل ازسه شاخه شدن با استفاده از نخ بخیه (۴/۰ کرومیک) ۴ گره شل به فواصل یک میلی متری زده شد و در آخر عضلات و پوست بطور جداگانه بخیه شدند. جهت انجام عمل پیوند یک هفته بعد از عمل CCI مجددا" حیوانات بیهوش و در ناحیه L_1-L_2 تحت عمل لامینکتومی (Laminectomy) واقع شدند و با ایجاد یک شکاف کوچک در ناحیه سخت شامه قطعاتی از بافت قسمت مرکزی غده آدرنال در این ناحیه قرار داده شد. برای هر حیوان بافت قسمت مرکزی دو غده که از حیوانات نر بالغ جدا گردیده بود، پیوند شد. غده های آدرنال از موشهای نر بالغ جدا شد و بلافاصله به محلول HBSS منتقل شده و توسط میکروسکوپ قسمت قشری و مرکزی آن جدا و به قطعات ۰/۵ میلی متر مکعبی تقسیم شدند. در حیواناتی که به جای قسمت مرکزی غده آدرنال پیوند ماهیچه دریافت کرده بودند تمامی مراحل مشابه پیوند بافت مرکزی غده آدرنال بود و ماهیچه مخطط از ناحیه کمری حیوانات دهنده جدا و به گیرنده منتقل گردید. جهت جلوگیری از رد بافت پیوند شده سیکلوسپورین به میزان ۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت روزانه ترزیق گردید.

جهت ارزیابی پاسخ حیوانات به تحریکات حرارتی و مکانیکی تست های رفتاری قبل از CCI (به عنوان روز کنترل) یک هفته بعد از CCI و یک هفته بعد از پیوند برای دوزهای متفاوت سرین- هیستوگرانین (میکروگرم ۶، ۳، ۱، ۰/۵) انجام گردید تمامی حیوانات قبل از تزریق و سپس ۱۰ دقیقه پس از تزریق مورد ارزیابی قرار گرفتند. تزریق از طریق لوله ای که سر آن در پشت گردن حیوان ثابت شده بود و انتهای آن در ناحیه کمری نخاع قرار داشت انجام می گردید. پس از تزریق دوز تعیین شده به داخل لوله جهت شستشوی لوله از ۱۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژیک استفاده گردید. جهت سنجش هیپرآلجزیای حرارتی از دستگاه Plantar test مدل Hargreaves استفاده شد در این دستگاه در حالیکه حیوان بالاتر از سطح میز قرار گرفته بود به کف پای آن اشعه نورانی تابیده شد و فاصله زمانی بین تابش اشعه و عکس العمل حیوان توسط دستگاه اندازه گیری شد. در این آزمایش جهت جلوگیری از آسیب بافتی cut off ۲۰ ثانیه در نظر گرفته شد (۵). این تست برای پای چپ ۳ بار با فاصله زمانی حداقل یک دقیقه انجام گردید سپس از اعداد به دست آمده میانگین گرفته و میانگین به عنوان زمان نهفته پاسخ یاد داشت گردید.

جهت سنجش پاسخ مکانیکی از دستگاه (WOOD Dale Il USA Randall-sellito stoelting) استفاده گردید. جهت این منظور در حالیکه حیوان توسط حوله ای مهار شده بود پای چپ آن در دستگاه تحت فشار افزاینده قرار گرفت و فشاری که منجر به ایجاد پاسخ (کشیدن پا) توسط حیوان گردید ثبت شد این عمل برای هر حیوان ۲ بار با فواصل زمانی حداقل یک دقیقه انجام گردید و از اعداد به دست آمده میانگین گرفته شد.

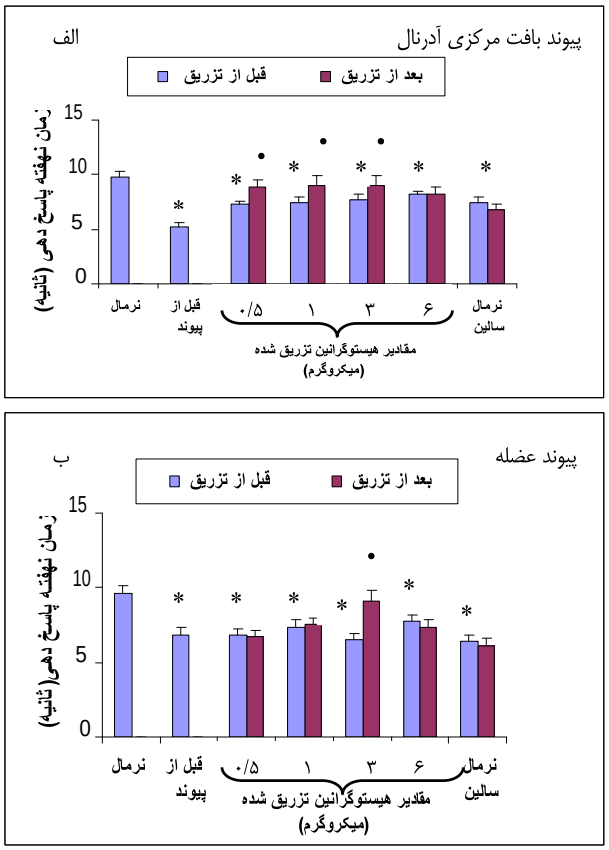
جهت تایید حضور بافت زنده در نخاع در انتهای آزمایش حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم پنتاباربیتال سدیم عمیقا"

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

بیهوش و با تزریق داخل قلبی نرمال سالین و پارافرمالدئید (pH۷/۴) پرفیوز شدند سپس نخاع خارج و در محلول ۲۰٪ ساکاروز در بافر فسفات ۰/۱ مولار قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت قطعه ای از نخاع که حاوی قطعات پیوند شده بود جدا و به مدت ۳۰ دقیقه در سرم گوسفند ۱٪ و سپس در بافر فسفات قرار داده شد. قطعات در طول شب در سرم حاوی تیروزین هیدروکسیلاز (۵۰۰ :۱) و در یخچال نگهداری شدند. سپس قطعات با بافر فسفات شستشو و در محلول حاوی آنتی بادی دوم که حاوی رودامین بود در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از گذشت یک ساعت قطعات بر روی اسلاید منتقل و در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت مطالعه تفاوت بین میانگین ها از تست two way ANOVA و Newman - Kules استفاده گردید و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

زمان پاسخ دهی در تست هیپرآلجزیای حرارتی قبل از انجام CCI, ۹/۸۳±۰/۷ و ۹/۶±۰/۶ ثانیه بود. بعد از انجام عمل CCI این زمان به ترتیب به۵/۲±۰/۴ و ۶/۸±۰/۸ کاهش یافته بود که نشان می دهد انجام عمل CCI بطور موثری پاسخ حیوانات را نسبت به محرکهای اعمال شده افزایش داده است ($p<0/05$). این امر حاکی از موثر بودن انجام عمل CCI می باشد. شکل۱ نشان دهنده تغییر در زمان پاسخ دهی به محرک حرارتی بدنبال آسیب عصبی قبل و بعد از تزریق سرین- هیستوگرانین در حیواناتی که پیوند بافت مرکزی غده آدرنال دریافت کردند (نمودار ۱ الف) و حیواناتی که پیوند بافت عضله دریافت نموده اند (شکل ۱ ب) مشاهده می گردد متوسط میزان زمان پاسخ دهی به تست حرارتی در گروه دریافت کننده بافت آدرنال از ۵/۲±۰/۴ ثانیه در قبل از انجام پیوند به میزان۷/۳±۰/۳ ثانیه یک هفته بعد از پیوند و قبل از تزریق ۰/۵ میکروگرم هیستوگرانین رسیده است. در حالیکه حیواناتی که به جای بافت مرکزی آدرنال پیوند عضله دریافت کرده بودند تغییری در میزان تحمل حیوان نسبت به محرک حرارتی وجود ندارد و میانگین زمان پاسخ دهی در تست حرارتی از ۶/۸±۰/۶ ثانیه در قبل از پیوند به ۶/۹±۰/۴ ثانیه در یک هفته بعد از پیوند و قبل از تزریق ۰/۵ میکروگرم هیستوگرانین رسیده است (نمودار ۱ ب). پیوند بافت آدرنال باعث افزایش در میزان زمان پاسخ دهی شد که البته این بهبود به طور کامل نبود به این معنی که زمان پاسخ دهی در این حیوانات هنوز به میزان قبل از جراحی نرسیده است (نمودار ۱ الف). در حیواناتی که پیوند آدرنال دریافت نموده بودند تزریق دوزهای ۰/۵، ۱ و ۳ میکروگرم سرین- هیستوگرانین زمان پاسخ دهی به تست حرارتی مورد استفاده در این آزمایش را افزایش داد. زمان پاسخ دهی به تست حرارتی در حیواناتی که پیوند آدرنال دریافت کرده بودند قبل از تزریق مقادیر متفاوت هیستوگرانین ۷/۳±۰/۳، ۷/۵±۰/۷، ۷/۷±۰/۷ و ۸/۱±۰/۳ ثانیه بود که بعد از تزریق ۰/۳، ۱، ۳ و ۶ میکروگرم هیستوگرانین این مقادیر به ۹/۳±۰/۶، ۹/۴±۰/۶، ۹/۳۵±۰/۹ و۸/۱±۰/۶ ثانیه تغییر یافته بود که حاکی از افزایش آستانه درد در حیوانات دریافت کننده مقادیر ۰/۵، ۱ و ۳ میکروگرم هیستوگرانین می باشد ($p<0/05$). در حالیکه در حیواناتی که به جای بافت آدرنال، بافت عضلانی دریافت کردند فقط تزریق ۳ میکروگرم هیستوگرانین توانست زمان تحمل حیوان را افزایش دهد در این گروه زمان پاسخ دهی قبل از تزریق ۶/۴±۰/۵ بود که بعد از تزریق به ۹±۰/۹ افزایش یافت و فقط در این گروه تفاوت معنی دار بین زمان قبل و بعد از تزریق دیده می شود ($p<0/05$). در حیواناتی که نرمال سالین دریافت کرده بودند هیچ تفاوت معنی داری در آستانه حس حرارتی در زمان قبل از تزریق با زمان بعد از تزریق وجود نداشت.



نمودار شماره ۱. تغییر در میزان تحمل حیوان نسبت به محرک حرارتی در حیوانات نرمال (قبل از عمل لوله گذاری) یک هفته بعد از ایجاد فشردگی بر روی عصب (قبل از پیوند) وقبل و بعد از تزریق دوزهای متفاوت هیستوگرانین. انجام عمل فشردگی بر عصب باعث کاهش مدت زمان تحمل در حیوانات شده است. در حیواناتی که پیوند بافت مرکزی غده آدرنال دریافت کرده اند (الف) تزریق ۰/۵، ۱ و ۳ میکروگرم هیستوگرانین پس از پیوند باعث افزایش میزان تحمل حیوانات شده است در حالی که در حیواناتی که پیوند عضله دریافت نموده اند (ب) فقط با تزریق ۳ میکروگرم هیستوگرانین میزان تحمل افزایش یافته است.

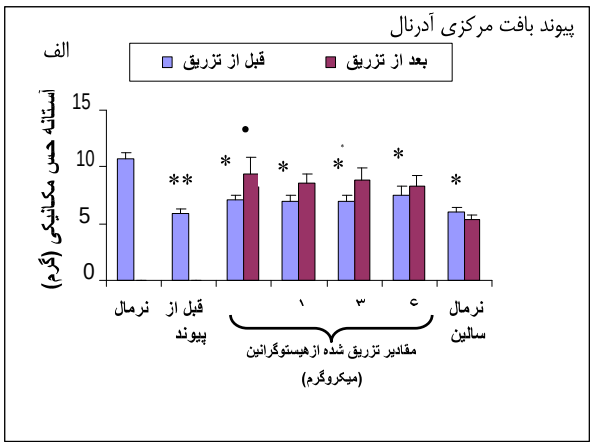
•نشان دهنده تفاوت معنی دار($p<0/05$) نسبت به روز کنترل

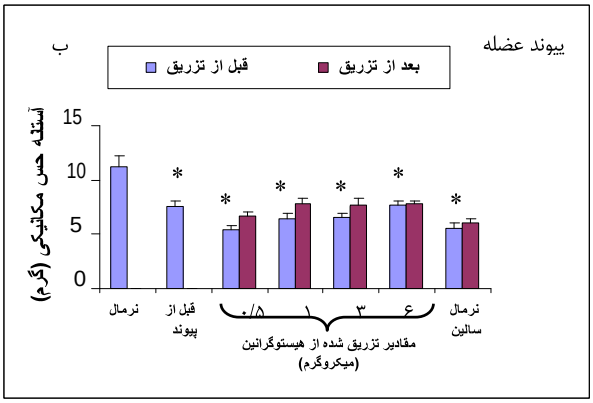
•نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p<0/05$) بین قبل و بعد از تزریق است.

آستانه حس مکانیکی قبل از انجام عمل CCI ۱۰/۹±۰/۴ و۱۱/۲±۰/۱ بود که یک هفته بعد از انجام عمل CCI به ترتیب به۵/۹±۰/۴ و ۷/۲±۰/۴ کاهش یافته بود. انجام عمل CCI باعث کاهش میزان تحمل حیوانات به فشار مکانیکی شده است بطوری که در هر دو گروه تفاوت معنی داری در کاهش

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

آستانه حس مکانیکی نسبت به حیوانات نرمال دیده می شود (p<۰/۰۵). پیوند بافت مرکزی غده آدرنال باعث افزایش اندکی در میزان تحمل حیوانات شده است بطوری که آستانه حس مکانیکی از ۵/۹±۰/۴ گرم در زمان قبل از پیوند به ۷/۱±۰/۴ گرم یک هفته بعد از پیوند و قبل از تزریق رسیده است (نمودار ۲ الف). در حالیکه پیوند بافت عضلانی چنین اثری ایجاد نکرده است و آستانه حس مکانیکی از ۷/۲±۰/۴ گرم به۵/۴±۰/۴ گرم یک هفته بعد از پیوند و قبل از تزریق کاهش یافته است (نمودار ۲ ب).





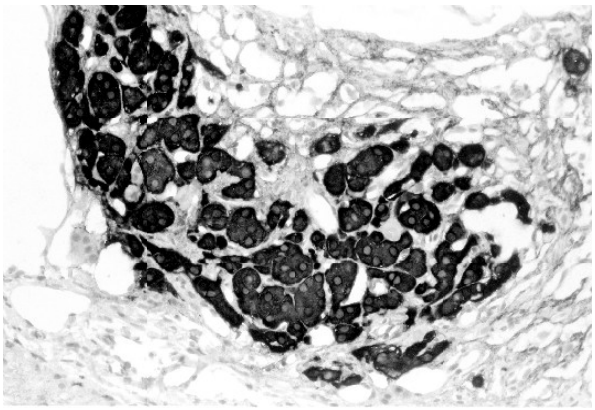
نمودار شماره ۲. تغییر در میزان تحمل حیوانات نسبت به محرک مکانیکی در حیوانات نرمال (قبل از عمل لوله گذاری) ، یک هفته بعد از ایجاد فشردگی بر روی عصب (قبل از پیوند) و قبل و پس از تزریق دوزهای مختلف هیستوگرانین . ایجاد فشردگی بر روی عصب باعث کاهش میزان تحمل حیوان شده است. تزریق هیستوگرانین در حیواناتی که پیوند بافت مرکزی غده آدرنال دریافت نموده اند (الف) منجر به افزایش میزان تحمل حیوانات شده است و این افزایش در دوز ۰/۵ میکروگرم هیستوگرانین معنی دار بوده است. تزریق هیستوگرانین در حیواناتی که پیوند عضله دریافت نموده اند (ب) تغییری در میزان تحمل نسبت به محرک مکانیکی ایجاد نکرده است.

*** نشان دهنده تفاوت معنی دار(p<۰/۰۵) نسبت به روز کنترل**

• نشان دهنده تفاوت معنی دار (p<۰/۰۵) بین قبل و بعد از تزریق است

در حیواناتی که پیوند بافت آدرنال دریافت کردند تزریق مقادیر ۰/۵، ۱ و ۳ میکروگرم از سرین هیستوگرانین باعث افزایش آستانه حس مکانیکی شد بطوری که آستانه این حس در این گروه از ۷/۱±۰/۴، ۷±۰/۵، ۷±۰/۵ و ۷/۶±۰/۶ با تزریق مقادیر ۰/۵، ۱، ۳ و ۶ میکروگرم هیستوگرانین به ترتیب به ۹/۵±۱/۱، ۸/۸±۰/۶، ۹±۰/۸ و۸/۱±۰/۶ افزایش یافته بود و این افزایش در مقدار ۰/۵ میکروگرم نسبت به قبل ازتزریق معنی داراست (p<۰/۰۵) (شکل ۲ الف). در حالیکه تزریق سرین- هیستوگرانین در حیواناتی که پیوند بافت عضلانی دریافت کردند تغییری در آستانه درد مکانیکی ایجاد نکرده است و در هیچ یک از موارد تفاوت معنی داری نسبت به زمان قبل از تزریق وجود ندارد (نمودار ۲ ب).

همچنین در حیواناتی که نرمال سالین دریافت کرده بودند نیز هیچ تفاوت معنی داری در آستانه حس مکانیکی در زمان قبل از تزریق نسبت به زمان بعد از تزریق دیده نشده است. مقادیر آستانه حس مکانیکی و حرارتی در گروه های مختلف در زمانهای قبل و بعد از تزریق در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. بافت مرکزی غده آدرنال ۳ هفته بعد از پیوند در فضای زیر عنکبوتیه پس از رنگ آمیزی با تیروزین هیدروکسیلاز زنده بوده و حاوی آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز که جهت ساخته شدن کاته کول آمین ها لازم می باشد، هستند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. بافت مرکزی غده آدرنال ۳ هفته پس از پیوند در فضای زیر عنکبوتیه. سلولها زنده بوده و حاوی آنزیم سنتز کننده کاته کول آمینها می باشند.

جدول شماره ۱. آستانه حس مکانیکی و حرارتی در گروه های مختلف آزمایش

	پاسخ حرارتی Mean±SD		پاسخ مکانیکی Mean±SD	
	پیوند آدرنال	پیوند عضله	پیوند آدرنال	پیوند عضله
قبل از CCI	۹/۸۳±۰/۷	۹/۶±۰/۶	۱۰/۹±۰/۴	۱۱/۲±۱
قبل از پیوند	۵/۲±۰/۴	۶/۸±۰/۶	۵/۹±۰/۴	۷/۲±۰/۴
هیستوگرانین (۰/۵mg)				
قبل از تزریق	۷/۳±۰/۳	۶/۹±۰/۴	۷/۱±۰/۴	۵/۴±۰/۴
بعد از تزریق	۹/۳±۰/۶	۶/۷۵±۰/۴	۹/۵±۱/۱	۶/۵±۰/۳

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

هیستوگرانین (۱mg)				
قبل از تزریق	۷/۵±۰/۷	۷/۵±۰/۶	۷±۰/۵	۶/۴±۰/۴
بعد از تزریق	۹/۴±۰/۸	۷/۶۵±۰/۴	۸/۸±۰/۶	۷/۵±۰/۵
هیستوگرانین (۳mg)				
قبل از تزریق	۷/۷±۰/۷	۶/۴±۰/۳۵	۷±۰/۵	۶/۵±۰/۳
بعد از تزریق	۹/۳۵±۰/۹	۹±۰/۹	۹±۰/۸	۷/۴±۰/۶
هیستوگرانین (۶mg)				
قبل از تزریق	۸/۱±۰/۳	۸±۰/۳۵	۷/۶±۰/۶	۷/۴±۰/۳
بعد از تزریق	۸/۱±۰/۶	۷/۶±۰/۶	۸/۱±۰/۶	۷/۵±۰/۱۵
نرمال سالین				
قبل از تزریق	۷/۳۵±۰/۵	۶/۳±۰/۴	۶±۰/۳	۵/۶±۰/۴
بعد از تزریق	۶/۴±۰/۵	۶±۰/۴	۵/۵±۰/۳	۵/۹±۰/۲

بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده نشان می دهد که پیوند بافت مرکزی غده آدرنال در فضای زیر عنکبوتیه باعث کاهش میزان هیپرآلجزیا در حیوانات نوروپاتیک می شود ولی با انجام این پیوند درد به طور کامل از بین نمی رود و تزریق آنتاگونیست رسپتور NMDA بـه نام سرین– هیستوگرانین، اثر ضد دردی پیوند بخش مرکزی غده آدرنـــال در این حیوانات را افزایش خواهد داد. همچنین همراه کردن پیوند بخش مرکزی غده آدرنال با تزریق سرین– هیستوگرانین باعث اثر بخشی بیشتر در مقادیر کمتر از این آنتاگونیست رسپتور NMDA خواهد شد. بعلاوه نتایج این مطالعه تاکیدی بر موثر بودن مدل CCI بر ایجاد درد کرونیک می باشد به این ترتیب که علائم مشاهده شده بعد از انجام عمل CCI در حیوانات مشابه علائمی است که در بیماران مبتلا دیده شده است. اطلاعات زیادی در رابطه با درگیری رسپتورهای NMDA در مناطق مسئول حس درد در سیستم عصبی وجود دارد که از بین آنها می توان نقش این رسپتورها در انتقال پیام درد در نخاع (۲۲–۲۰)، در فرآیند Sensitization در شاخ خلفـی نخاع و تنظیم پلاستیسیتی سیناپسی در مناطق مختلف سیستم عصبی (۲۶–۲۳) را نام برد. همچنین شواهدی موجود است که نشان دهنده دخالت رسپتورهای NMDA در هیپرآلجزیای مشاهده شده در دردهای التهابی می باشد (۲۸و۲۷و۹) رسپتورهای NMDA مستقیما" در انتقال پیام از فیبرهای آوران اولیه به نخاع و از آنجا به مراکز بالاتر دخالت دارند (۱). بدنبال آسیب به اعصاب محیطی تعداد رسپتورهایNMDA در مراکز عصبی تغییر می کند و این احتمال وجود دارد که پیوند بافت مرکزی غده آدرنال باعث تعدیل تعداد رسپتورهای NMDA در نخاع بعد از آسیب عصبی شود. همچنین مواد آزاد شده از این بافت می تواند افزایش میزان تورونسمیترهای تحریکی آزاد شده بدنبال آسیب بافتی را از بین ببرد. همچنان که Hentall و همکارانش نشان دادند که پیوند بخش مرکزی آدرنال باعث کاهش حساسیت مرکزی در نخاع خواهد شد (۲۹). بر اساس نظریه این محققین این عمل ضد دردی بافت مرکزی آدرنال از طریق کاهش تخلیه نورونهای C در نخاع اعمال می شود. در مطالعه این محققان پاسخ حیواناتی که پیوند عضله دریافت کرده بودند مشابه حیواناتی بود که هیچ پیوندی دریافت نکرده بودند. این امر نشان دهنده بی تاثیر بودن پیوند بافت عضله در کاهش درد می باشد. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان دهنده عدم تاثیر پیوند عضله در کاهش درد میباشد. بعلاوه بر اساس نتایج بدست آمده در آزمایشات Hentall و همکارانش پیوند بافت آدرنال پدیده حساسیت مرکزی و بدنبال آن درد را بطور کامل از بین نمی برد و فقط باعث بهبود علائم مربوط به درد میشود. در انجام تست فرمالین نیز پیوند بافت مرکزی غده آدرنال اثری بر درد حاد ندارد. در حالی که علائم مربوط به فاز دوم تست فرمالین را که نشان دهنده درد التهابی است را کاهش می دهد (۲۹). در مطالعه حاضر نیز پیوند بافت مرکزی آدرنال علائم مربوط به درد را بهبود بخشیده ولی آن را کاملا از بین نبرده است. این امر خود تاکیدی بر نتایج بدست آمده از آزمایش Hentall و همکارانش است.

کاته کوله آمین ها و اوپیوئیدها بیشترین موادی هستند که از بافت مرکزی غده آدرنال ترشح شده و در درد نیـــز موثر می باشند ولی نشان داده شده است که در صورتی که آلودینیا و هیپرآلجزیا بدنبال تزریق آگونیست های رسپتورهای NMDA حاصل شده باشد بی دردی حاصل از عمل پیوند را نمی توان با استفاده از آنتاگونیست های رسپتورهای اوپیوئیدی و یا α آدرنرژیک کاهش داد (۱۷) این امر نشان می دهد که عوامل دیگری غیر از اوپیوئید ها و کاته کوله آمین های مترشحه از بافت مرکزی غده آدرنال در کاهش درد حاصل از عمل پیوند این بافت موثر می باشند. نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده بر روی هیستوگرانین نشان داد که این ماده که در مغز و غدد فوق کلیه یافت می شود می تواند تنظیم کننده عمل رسپتورهایNMDA باشد (۱۶و۱۵) و آنالوگ آن تحت عنوان سرین – هیستوگرانین می تواند افزایش حساسیت به محرکهای درد زا را که بدنبال فشردگی بر عصب سیاتیک ایجاد می شود بهبود بخشد (۵). در این مطالعات تزریق دوز دارو جهت کاهش درد ۱میکروگرم بوده است. از آنجا که هیستوگرانین ترکیب پپتیدی می باشد بعید به نظر می رسد که استفاده سیستمیک از آن بتواند موثر واقع شود. بعلاوه این احتمال وجود دارد که مانند دیگر آنتاگونیست های NMDA عوارضی مانند اختلالات حرکتی وآتاکسی ایجاد نماید (۳۰و۱۰). البته در مطالعه حاضر با تزریق مقادیر ذکر شده از سرین هسیتوگرانین هیچ نوع اختلال حرکتی در حیوانات دیده نشد. در مطالعه ای که توسط Shukla و همکارانش و Hama و همکارانش انجام گردید نیز با مقادیر به کار رفته از هیستوگرانین اختلال حرکتی گزارش نشده است (۱۹و۱۵و۵). این امر تاکیدی بر بی خطر بودن این ترکیب در استفاده کلینیکی آن می باشد. اثرات ضد دردی هیستوگرانین در مدل های مختلف درد کرونیک متفاوت می باشد همچنین اثرات ضد دردی مختلفی از این ترکیب در تست های مختلف بکار رفته جهت سنجش درد دیده شده است ولی در تمامی آزمایشات ذکر شده حداقل دوز هیستوگرانین که باعث بهبود درد شده است دوز ۱ میکروگرم می باشد و در مقادیر کمتر اثر ضد دردی از این ترکیب دیده نشد (۵). مطالعه حاضر همچنین نشان داد در صورتی که پس از پیوند داخل نخاعی بافت مرکزی غده آدرنال از هیستوگرانین استفاده گردد، دوز موثر این ترکیب پپتیدی به میزان ۰/۵ میکروگرم کاهش خواهد یافت. بنابراین این احتمال وجود دارد که در دوز ۰/۵ میکروگرم هیستوگرانین با اثر بر روی رسپتورهای خود بر روی بافت مرکزی غده آدرنال باعث افزایش ترشح مواد ضد دردی آزاد شده از بافت پیوند شده گردد و در دوزهای بالاتر از طریق رسپتورهای خود بر روی نورونهای موجود در شاخ خلفی نخاع عمل نماید با توجه به اینکه غلظت های بالای هیستوگرانین اثر ضد دردی ندارد به نظر می رسد که توانایی هیستوگرانین جهت بهبود درد به کفه خواهد رسید و دوزهای بالاتر اثرات

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

کمتری خواهند داشت که این خود شاهد خوبی برای اثر دوگانه آگونیستی – آنتاگونیستی آن است.

نتایج مطالعات Hama و همکارانش نشان داد که تزریق ۳/۰ میکروگرم هیستوگرانین اثر ضد دردی ندارد ولی در صورتی که این تزریق با مقادیر مختلف مورفین همراه شود باعث افزایش اثر ضد دردی مورفین خواهد شد (۱۹). در آزمایشاتی که اثرات ضد دردی مقادیر مختلف سرین هیستوگرانین مورد بررسی قرار گرفت، حداقل مقدار هیستوگرانین که اثرات بیدردی داشته باشد ۱ میکروگرم است و کاهش درد در حضور مجموعه ای از مقادیر اندک هیستوگرانین و مورفین مانند آنچه در آزمایشات Hama و همکارانش گزارش شد (۱۹) و یا بدلیل حضور مقادیر اندک هیستوگرانین در کنار قطعات بافت مرکزی غده آدرنال مانند آنچه در این مطالعه مشاهد شد، میتواند بدلیل ممانعت از ترشح نوروترانسمیترهای تحریکی و یا کاهش فعالیت نورونهای پس سیناپسی در نخاع باشد. این احتمال وجود دارد که سرین- هیستوگرانین متابولیسم مواد آزاد شده از بافت مرکزی غده آدرنال را طوری تغییر دهد که اثر آنها تقویت و یا میزان ترشح آنها افزایش یابد. مکانیسم های مربوط به اثرات سینرژیسم داروها بخوبی مشخص نشده است. ولی در این مورد نظریه های زیادی وجود دارد از جمله اینکه ممکن است ارتباط متقابلی بین داروها بصورت فارماکودینامیکی باشد که در این حالت فعال شدن یک سیستم می تواند باعث تقویت عملکرد راه دیگر شود و یا اینکه یک ترکیب باعث افزایش تمایل ترکیب دیگر به رسپتورهای خود گردد. این ارتباط ممکن است بصورت فارماکوکینتیک باشد به این صورت که یک دارو با کاهش کلیرانس داروی دیگر باعث افزایش اثرات آن گردد. همچنین این احتمال نیز وجود دارد که هر دو ترکیب باعث ایجاد ماده سومی شده که اثرات بیشتری دارد (۳).

نتایج این مطالعه نیز نشان دهنده اثرات سینرژیسم بین بخش مرکزی غده فوق کلیه و سرین – هیستوگرانین، به عنوان آنتاگونیست رسپتورهای NMDA، در مدل درد نوروپاتیک مورد استفاده می باشد در این حالت اثرات ضد دردی پیوند در صورتی که با تزریق آنتاگونیست رسپتور NMDA مانند سرین- هیستوگرانین همراه باشد تقویت بهتری خواهد شد و مقدار داوری مورد استفاده نیز کاهش خواهد یافت.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

Analgesic Effect of Intrathecal Transplantation of Adrenal Medullary Tissue and Histogranin in Neuropathic Rats

F. Nasirinejad (PhD) [1*], J. Sagen (PhD) [2]

1. Associate Professor of Physiology, Physiology Research Center, Medical School, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Professor of Lois Pope Life Center, Department of Neurology, University of Miami, Miami, FL, USA

Received: Nov 19th 2008, Revised: Dec 3rd 2008, Accepted: Feb 18th 2009.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Neuropathic pain is a consequence of disease or trauma to peripheral nerves or the central nervous system. In spite of so many people suffering from neuropathic pain it is still extremely difficult to treat. The aim of this study was to examine the cumulative effect of adrenal transplantation and intrathecal injection of histogranin (HN) on pain behavior in neuropathic rats.

METHODS: In this experimental research 20 rats were allocated to 2 groups, 10 rats in each. One week after unilateral sciatic nerve ligation using chronic constriction injury (CCI) model, animals received either adrenal medullary or control striated muscle tissue transplantation in lumbar part of spinal cord. One week after animals received different doses of HN (0.5, 1, 3, 6 µg/10ml) or saline interathecally. Behavioral tests were preformed before induction of CCI, before transplantation, before injection and 10 min after injection of HN.

FINDINGS: CCI caused heat and mechanical hyperalgesia. In adrenal transplanted animals heat and mechanical thresholds in animals which received low dose of histogranin (0.5 mg/kg) was 9.3±0.6 and 9.5±1.1, respectively which increased comparing to before injection time ($p<0.05$). Injection of 6 µg HN was not effective. In muscle transplanted animals only higher dose of histogranin increase thermal threshold. Thermal threshold in this groups increased from 6.4±0.35 before injection time to 9±0.9 after injection of 3 µg of HN ($p<0.05$). However alleviation of pain was significant with the lower doses of histogranin in adrenal medullary transplanted animals ($p<0.05$).

CONCLUSION: The results showed that the pain alleviation effect of histogranin when accompained with adrenal medullary graft is dose dependant and low doses of histogranin can augment the effects of adrenal medullary transplants and may be an effective adjunct in the treatment of chronic pain.

KEY WORDS: *Histogranin, Mechanical hyperalgesia, Thermal hyperalgesia, Adrenal medulla.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Department of Physiology, Physiology Research Center, Medical School, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
E-mail: fnasiri@iums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

References

1. Millan MJ. The induction of pain: an integative review. Prog Neurobiol 1999; 57(1): 1-164.
2. Karlsten R, Gordh T. Adenosine- a new analgesic for the treatment of neuropathic pain. IASP Newsletter 2000; 1: 3-5.
3. Field MJ, Gonzalez MI, Tallarida RJ, Singh L. Gabapentin and neurokinin (1) receptor antagonist CI-1021 act synergistically in two rat models of neuropathic pain. Pharmacol Exp Ther 2002; 303(2): 730-5.
4. Ibla JC, Hayashi H, Bajic D, Soriano SG. Prolonged exposure to ketamine increases brain derived neurotrophic factor levels in developing rat brains. Curr Drug Saf 2009; 4(1): 11-6.
5. Siegan JB, Hama AT, Sagen J. Suppression of neuropathic pain by a naturally-derived peptide with NMDA antagonist activity. Brain Res 1997; 755(2): 331-4.
6. Jesse CR, Savegnago L, Nogueira CW. Effect of a metabotropic glutamate receptor 5 antagonist, MPEP, on the nociceptive response induced by intrathecal injection of excitatory aminoacids, substance P, bradykinin or cytokines in mice. Pharmacol Biochem Behav 2008; 90(4): 608-13.
7. Hentall ID, Hargraves WA, Sagen J. Inhibition by the chromaffin cell-derived peptide serine-histogranin in the rat's dorsal horn. Neurosci Lett 2007; 419(1): 88-92.
8. Liu T, Pang XY, Bai ZT, Chai ZF, Jiang F, Ji YH. Intrathecal injection of glutamate receptor antagonists/agonist selectively attenuated rat pain-related behaviors induced by the venom of scorpion Buthus martensi Karsch. Toxicon 2007; 50(8): 1073-84.
9. Piovesan EJ, Randunz V, Utiumi M, et al. Influence of NMDA and non-NMDA antagonists on acute and inflammatory pain in the trigeminal territory: a placebo control study. Arq Neuropsiquiatr 2008; 66(4): 837-43.
10. Homayoun H, Stefani MR, Adams BW, Tamagan GD, Moghaddam B. Functional interaction between NMDA and mGlu5 receptors: Effects on working memory, instrumental learning, motor behaviors, and dopamine release. Neuropsychopharmacology 2004; 29(7): 1259-69.
11. Rahman W, D'Mello R, Dickenson AH. Peripheral nerve injury-induced changes in spinal alpha (2)-adrenoceptor-mediated modulation of mechanically evoked dorsal horn neuronal responses. J Pain 2008; 9(4): 350-9.
12. Siegan JB, Sagen J. Adrenal medullary transplants attenuated sensorimotor dysfunction in rats with peripheral neuropathy. Pharmacol Biochem Behav 1998; 59: 97-104.
13. Hama AT, Unnerstall JR, Siegan JB, Sagen J. Modulation of NMDA receptor expression in the rat spinal cord by peripheral nerve injury and adrenal medullary grafting. Brain Res 1995; 687(1-2): 103-13.
14. Unsicker K. The trophic cocktail made by adrenal chromaffin cells. Exp Neurol 1993; 123(2): 167-73.
15. Shukla VK, Lemaire S, Dumont M, Merali Z. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist activity and phencyclidine-like behaviorl effects of the pentdecapeptide, [Ser^{1}] histogranin. Pharma Biochem Behav 1995; 50(1): 49-54.
16. Lemaire S, Shukla VK, Rogers C, et al. Isolation and characterization of histogranin, a natural peptide with NMDA receptor antagonist activity. Eur J Pharmacol 1993; 254(3): 247-56.
17. Eisenach JC, Gebhart GF. Spinal drug interactions, in novel aspects of pain management: opioids and beyond (Sawynok J, Cowan A, eds), New York, Wiley Liss 1999; pp: 345-62.
18. Field MJ, Gonzalez MI, Tallarida RJ, Singh L. Gabapentin and the neurokinin (1) receptor antagonists CI-1021 act synergistically in two rat models of neuropathic pain. J Pharmacol Exp Ther 2002; 303(2): 730-5.
19. Hama A, Basler A, Sagen J. Enhancement of morphine antinociception with the peptide N-methyl-D-aspartate receptor antagonist [Ser1]-histogranin in the rat formalin test. Brain Res 2006; 1095(1): 59-64.
20. Coderre TY, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. Pain 1993; 52(3): 259-85.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

21. Dubner R, Ruda M.A. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. Trends Neurosci 1992; 15(3): 96-103.
22. Zhou HY, Chen SR, Chen H, Pan HL. The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn. J Neurochem. 2009; 108(1): 305-18.
23. Qu XX, Cai J, Li MJ, et al. Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. Exp Neurol 2009; 215(2): 298-307.
24. Sunder RA, Toshniwal G, Dureja G. Ketamine as an adjuvant in sympathetic blocks for management of central sensitization following peripheral nerve injury. J Brachial Plex Peripher Nerve Inj 2008; 25(3): 22.
25. Cheng HT, Suzuki M, Hegarty DM, et al. Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-D-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. Neuroscience 2008; 155(3): 948-58.
26. Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD. Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. Neuroscientist 2008; 14(6): 609-25.
27. Liu XJ, Gingrich JR, Vargas Caballero M, et al. Treatment of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling Src from the NMDA receptor complex. Nat Med 2008; 14(12): 1325-32.
28. Slack S, Battaglia A, Cibert Goton V, Gavazzi I. EphrinB2 induces tyrosine phosphorylation of NR2B via Src-family kinases during inflammatory hyperalgesia. Neuroscience 2008; 156(1): 175-83.
29. Hentall ID, Noga BR, Sagen J. Spinal allografts of adrenal medulla block nociceptive facilitation in the dorsal horn. J Neurophysiol 2001; 85(4): 1788-92.
30. Thullier F, Lalonde R, Lestienne F. Effects of dopaminergic agents and of an NMDA receptor antagonist on motor coordination in Lurcher mutant mice. Pharmacol Biochem Behav 1999; 63(2): 213-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.2.2.9]