



بررسی اثر تزریق مهارکننده آدنیلیل سیکلاز (SQ-22536) بر پردردی ناشی از تسهیل سیناپسی منطقه

سری شکمی - میانی بصل النخاع موش صحرایی

مهدی گودرزوند^{۱*} (Ph.D.)، حسن اژدری^۲ (Ph.D.)، رقیه خاکپای^۳ (M.Sc.)

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود- دانشکده پزشکی- دکتری فیزیولوژی پزشکی. ۲- دانشگاه علوم پزشکی قزوین- دانشکده پزشکی- گروه فیزیولوژی. ۳- دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده پزشکی- گروه فیزیولوژی- دانشجوی دکتری فیزیولوژی پزشکی.

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۳، تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۷

چکیده

مقدمه: فعال شدن مسیر آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) سبب پردردی مکانیکی، حساس شدن نورون‌های درد میسر نخاعی و فسفریله شدن مسیبر مولکولی پرتئین باندشونده به جزء پاسخ‌دهنده به cAMP (CREB) می‌شود که نسخه‌برداری ژنی را شروع می‌کند. بنابراین در این مطالعه نقش آدنیلیل سیکلاز و مسیبر cAMP در تسهیل سیناپسی در منطقه سری شکمی - میانی بصل النخاع (RVM) به دنبال تزریق فرمالین در کف پای حیوان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۳۶ سر موش صحرایی نژاد اسپراگ- دالی در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده گردید. حیوانات به‌طور تصادفی به ۶ گروه شاهد، حلال دارو (سالین)، شاهد جراحی و مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومول SQ-22536 تقسیم شده و فرمالین در پای راست حیوانات تزریق گردید. میانگین نمره رفتارهای درد با استفاده از آزمون Anova در گروه‌های مختلف مقایسه شده است.

نتایج: تزریق داخل RVM غلظت ۱۰۰ نانومول SQ-22536 توانست در دقایق ۵، ۱۰، ۱۵، ۵۰ و ۵۵ علایم رفتاری درد ناشی از تزریق فرمالین را به‌طور معناداری ($P < 0.05$) کاهش دهد. همچنین غلظت ۲۰۰ نانومول SQ-22536 تنها در دقیقه ۱۵ رفتار درد را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: بنابراین مهار آدنیلیل سیکلاز به‌وسیله SQ-22536 داخل RVM سبب کاهش رفتارهای درد ناشی از آزمون فرمالین در موش صحرایی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مهارکننده آدنیلیل سیکلاز، SQ-22536، آزمون فرمالین، ناحیه سری شکمی - میانی بصل النخاع، موش صحرایی.

Original Article

Knowledge & Health 2010;4(4):11-17

Effect of Adenylyl Cyclase Inhibitor (SQ-22536) Injection in Rostral Ventromedial Medulla on Formalin Induced Nociceptive Behavior in Rats

Mahdi Goudarzvand^{1*}, Hasan Azhdari², Roghaye Khakpay³

1- Faculty of Medicine, Islamic Azad University- Shahroud Branch, Shahroud, Iran. 2- Dept. of Physiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. 3- Dept. of Physiology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Abstract:

Introduction: Activation of the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathway produces mechanical hyperalgesia, sensitizes nociceptive spinal neurons, and phosphorylates the transcription factor cAMP-responsive element binding protein (CREB), which initiates gene transcription. This study examined the role of the cAMP pathway in a model of chronic pain, by assessing associated behavioral changes after inhibition of Adenylyl cyclase in rostral ventromedial medulla (RVM).

Methods: In this study, thirty-six Sprague- Dawley rats (weighing 250-300 g) were divided into six groups including control, vehicle, sham and SQ-22536 (50, 100 and 200 nmol) groups. Formalin was injected into the right paws of all groups.

Results: Intra-RVM injection of SQ-22536 (100 nmol) decreased formalin induced nociceptive pain in the 5th, 10th, 15th, 25th, 35th, 50th and 55th minutes. Also, SQ-22536 (200 nmol) decreased formalin induced nociceptive pain in the 15th minute.

Conclusion: Therefore, inhibition of the adenylyl cyclase inhibitoion in the rostral ventromedial medulla decreases formalin induced nociceptive behaviors in rats.

Keywords: Adenylyl cyclase inhibitor, SQ-22536, Formalin test, Rostral ventromedial medulla, Rats.

Received: 24 December 2009

Accepted: 16 February 2010

*Corresponding author: M. Goudarzvand, Email: m118medical@yahoo.com

مقدمه

درد یکی از انواع حس پیکری است که یک عملکرد حفاظتی مهم دارد. درد در برابر وقوع یا احتمال بروز آسیب‌های بافتی هشدار می‌دهد تا از آن‌ها پیش‌گیری شود و یا محافظت به عمل آید. درد پایدار، که عامل اصلی ترغیب بیمار به نگرشات پزشکی است و دلیل تشخیص بسیاری از شرایط کلینیکی می‌گردد، به دو دسته تقسیم می‌شود: درد نویسیستپتیو (Nociceptive pain) که حاصل بیش‌فعالی مستقیم گیرنده‌های درد است و درد نوروپاتیکی (Neuropathic pain) که برآمده از آسیب به اعصاب محیطی و یا مرکزی می‌باشد (۱).

استطاله نورون‌های دردی در شاخ پشتی نخاع، اطلاعات را به نواحی از ساقه مغز و دیانسفال دربرگیرنده تالاموس، ماده خاکستری دور قناتی (PAG; Peri aqueductal gray)، ناحیه پارابراکیال (Para brachial)، تشکیلات مشبک بصل‌النخاع و هم‌چنین به ساختارهای لیمبیک دربرگیرنده هیپوتالاموس، آمیگدال و هسته تیغه‌ای (Septal nucleus) منتقل می‌کند (۲). هر چند کارپنتر و همکارانش در سال ۱۹۶۵ کنترل پایین‌رو بر ورودی‌های حسی راه‌های بالارو را نشان دادند، اما وجود یک سیستم تعدیل ویژه درد به‌طور واضح، به‌دست وال و ملزاک در تئوری فرضیه کنترل پنج‌راهی مطرح شد (۳). وجود اثرات فوق‌نخاعی در این تئوری مورد تأکید است. سیستم مرکزی تعدیل‌کننده درد دربرگیرنده PAG و منطقه سری شکمی - میانی بصل‌النخاع (RVM) در ساقه مغز می‌باشد. تحریک الکتریکی PAG سبب بی‌دردی قوی می‌شد که پرکاری نورون‌های خروجی RVM این بی‌دردی را وساطت می‌کنند (۴، ۵ و ۶) و این مسأله با آزمون‌های گوناگون درد ثابت شده است. این موضوع به این نکته مهم اشاره دارد که خود مغز می‌تواند اطلاعات درد را پردازش کند. این سیستم، به‌ویژه RVM، در تسهیل دردهای مرتبط با درد التهابی، آسیب عصبی، سندروم تحریک اپیوئیدی و مصرف مزمن اپیوئیدها نقش دارد (۷ و ۸). اگرچه پرکار کردن غیر انتخابی RVM سبب بی‌دردی واضح می‌شود، تحریک الکتریکی با شدت پایین و تزریق نورپپتیدها و آن-متیل-دی اسپاراتات (NMDA; N-Methyle Di-Aspartate) در این منطقه سبب تسهیل درد شده است (۹). مطالعات به غیر از پرکارسازی نشان می‌دهد که پردردی که به‌وسیله تحریک الکتریکی به‌وجود می‌آید یک اتفاق نیست. مطالعات تخریبی، دخالت RVM را در انواع گوناگون مدل‌های پردردی و درد ماندگار شامل: درد حاد ناشی از سندروم ترک اپیوئیدها، پردردی به‌وجود آمده به‌دنبال مصرف مزمن مرفین، پردردی التهابی ناشی از روغن خردل، بیماری و درد نورپاتیکی نشان می‌دهد (۱۰ و ۱۱). با همین وجود مدارکی برای مهار پایین‌رو از RVM در طی التهاب و با افزایش اثر بی‌دردی اپیوئیدها در RVM وجود دارد. تعادل مسیر نزولی تسهیلی (ناشی از فعالیت نورون‌های روشن On-cell) و مسیر نزولی مهاری (ناشی از فعالیت نورون‌های خاموش Off-cell) میزان انتقال درد در شاخ خلفی نخاع را تعیین می‌کند. مطالعات، نقش فعال شدن آدنیلیل سیکلاز

و به‌دنبال آن افزایش غلظت cAMP را در تغییرات سیناپسی، همچون تسهیل و حساس شدن، گزارش داده‌اند (۱۲ و ۱۳). بنابراین هدف این مطالعه بررسی نقش آدنیلیل سیکلاز و مسیر cAMP در تسهیل سیناپسی در منطقه RVM بصل‌النخاع بود و این سوال مطرح بود که آیا مهار آدنیلیل سیکلاز و تغییرات تسهیلی RVM می‌تواند از پردردی ناشی از تزریق فرمالین در کف پای حیوان جلوگیری کند؟ اگر چنین تغییرات سیناپسی در درد مزمن، در مسیرهای تعدیلی (Modulatory) درد در مغز میانی و نخاع اتفاق می‌افتد پس شاید مطالعه این مسیرهای تسهیل-کننده درد در مغز و نخاع و مسدود نمودن این مسیرها با داروهای مناسب، کمک شایانی به بیماران با دردهای عصبی و التهابی مزمن برای تسکین درد آن‌ها بنماید.

مواد و روش‌ها

جراحی و کانول‌گذاری:

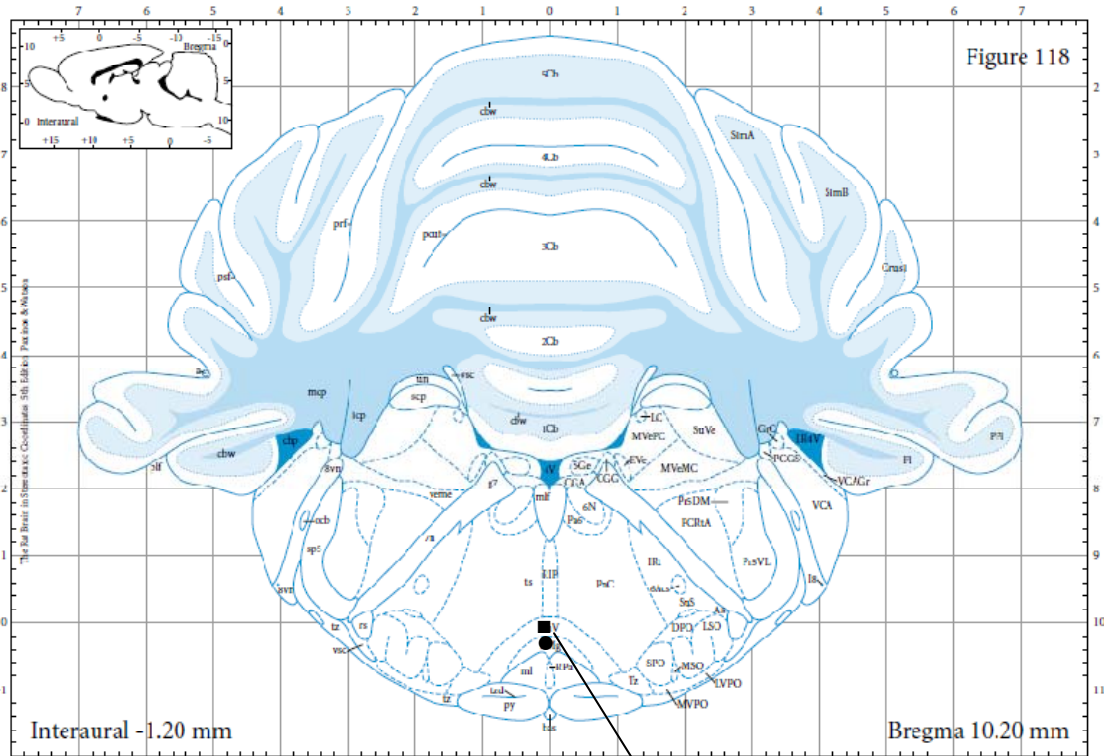
روش تزریق دارو در گروه‌های گوناگون به گونه ریزتزریق (Microinjection) می‌باشد. برای انجام تزریق داروها و ترکیبات، پس از بیهوشی حیوانات با داروهای (کتامین + رامپون)، کانول‌های تزریق و راهنما در هسته مورد آزمایش تعبیه می‌گردند. برای کانول‌گذاری، حیوان پس از بیهوش شدن در دستگاه استروئتاکسی مستقر می‌گردد و پوست ناحیه سر به حداقل میزان برش داده می‌شود. پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامپدا شناسایی شده و با نگرش به فاصله آن‌ها و نسبت آن با فاصله ذکرشده در اطلس پاکسینوس، نواحی سطح مجمله متعلق به هسته مورد آزمایش مشخص می‌گردند (۱۴). بعد از علامت گذاری مناطق فوق با استفاده از مته‌های دندان پزشکی، در محل مذکور منفذی به‌اندازه قطر کانول راهنما، که معمولاً از سرسرنگ نمره ۲۳ است، ایجاد شده و کانول راهنما به اندازه مشخص که برای هر هسته متفاوت است در درون مغز مستقر شده و قسمت رومی آن در روی مجمله به‌وسیله سیمان دندان پزشکی ثابت می‌شود. یک پیچ کوچک (Microscrew) در استخوان مجمله تعبیه و در درون سیمان دندان پزشکی فرو برده شد. این دو پیچ در حکم مسلح‌سازی سیمان بوده و از جدا شدن آن از سطح مجمله جلوگیری می‌کنند. منفذ کانول راهنما در بیرون مجمله به‌وسیله درپوش خاصی مسدود بوده و فقط در زمان‌های تزریق دارو برداشته می‌شود. یک کانول نازک‌تر که معمولاً از سوزن نمره ۳۰ می‌باشد، به اندازه‌ای که ۲ میلی‌متر بیش‌تر از نوک کانول راهنما باشد، تهیه شده و از یک طرف به یک لوله نازک پلی‌اتیلن وصل می‌گردد. سر دیگر لوله پلی‌اتیلن به سیستم تزریق دقیق وصل شده و مقدار مشخص حجم ماده تزریقی در قسمت نوک کانول تزریق وارد می‌گردد. بعد از اتمام جراحی موش باید یک هفته دوره بهبودی را طی کند.

آزمون فرمالین:

آزمون فرمالین یک روش ارزشمند و مدل مناسب برای سنجش و ارزیابی درد مداوم و پایدار برآمده از یک محرک شیمیایی می باشد و از سوی دیگر می توان اثرات درد حاد را نیز در طی فاز نخست این تست بررسی کرد (۱۵ و ۱۶). در این تست به منظور مشاهده و بررسی رفتارهای حیوان، از یک محفظه شفاف با کف مسطح، به ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ سانتی متر و از جنس پلکسی گلاس (Plexiglass) استفاده شد. برای مشاهده پنجه پای حیوان، در زیر این محفظه شفاف آینه ای تعبیه شده است و به همین علت درد حاصله، درد آینه ای نامیده می شود. در این تست، ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۲ درصد به زیر پوست پنجه پای حیوان با یک سر سوزن نمبر ۳۰ تزریق می شد. به دنبال تزریق فرمالین، حیوان مجموعه ای از رفتارهای القای شده با فرمالین و رفتارهای خودبخودی را نشان داد که به آن ها نمبر ۰ تا ۳ داده شد (۱۷). در صورتی که پای حیوان به طور طبیعی روی زمین بود نمبر صفر، پای حیوان مختصری روی زمین بود نمبر ۱، پای حیوان از زمین کنده بود نمبر ۲ و هنگامی که حیوان پایش را گاز می گرفت و یا لیس می زد نمبر ۳ در نظر گرفته شد (Licking Duration).

برای ریز تزریق داروها، ابتدا کانول گذاری هسته براساس مختصات آن در اطلس پاکسینوس (۱۷) انجام و پس از بهبودی (یک هفته بعد) حیوانات برای تست رفتاری آماده می شدند. در روز آزمایش، داروها در هر گروه (که در زیر آمده است) با استفاده از سرنگ هامیلتون (Hamilton Syringe) و لوله پلی اتیلن (PE-100) با کانول با نمبر ۲۳ (۵μl/min) تزریق می شد. گروه های مورد آزمایش:

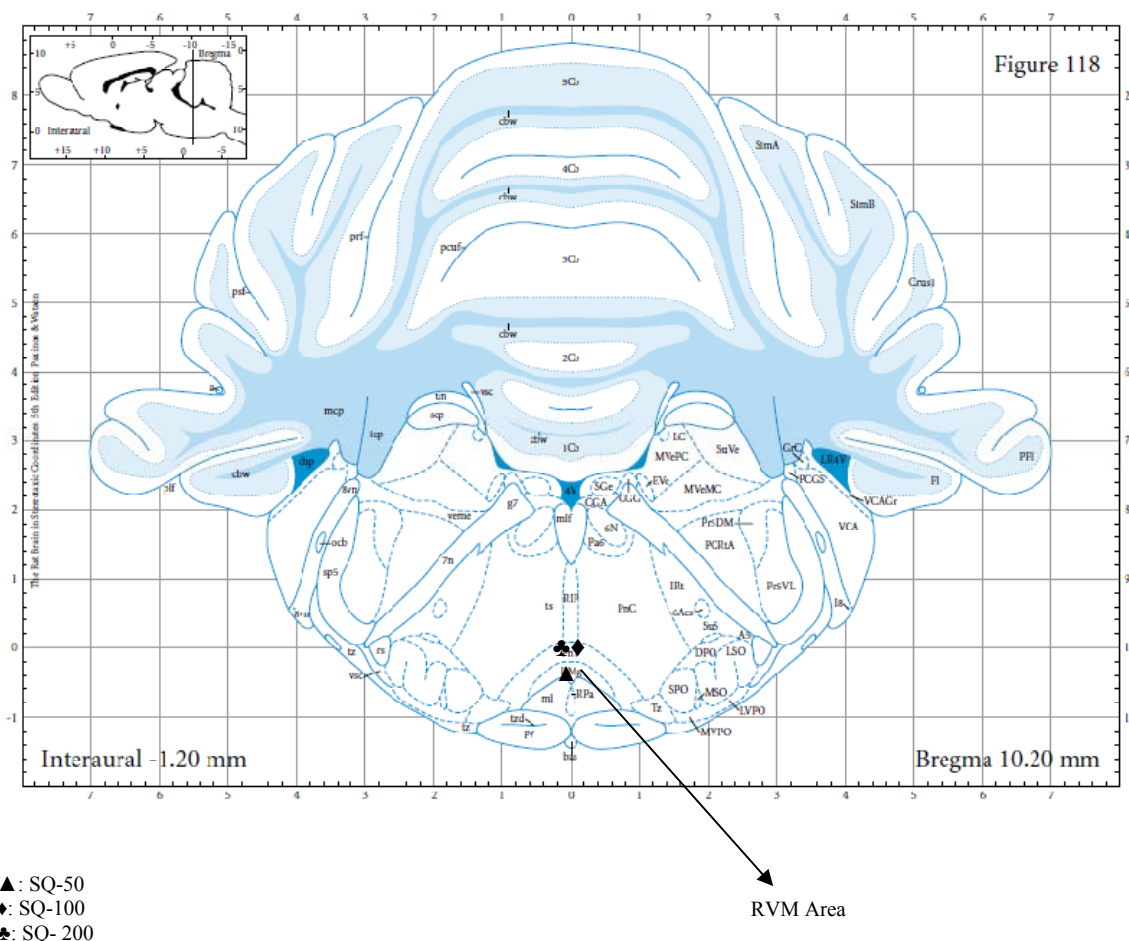
پس از به وزن رسیدن، حیوانات به طور تصادفی در گروه های شاهد، حلال دارو (vehicle)، شاهد جراحی (Sham)، SQ-22536 ۵۰ نانومول، SQ-22536 ۱۰۰ نانومول و SQ-22536 ۲۰۰ نانومول قرار گرفتند (در هر گروه n=۶). در گروه شاهد سالم تنها در کف پای حیوانات فرمالین تزریق گردید، در صورتی که در گروه حلال دارو علاوه بر فرمالین از سالین (۵ μl داخل RVM) به عنوان حلال داروی SQ-22536 استفاده شد. در گروه شاهد جراحی، پس از تزریق فرمالین در پای حیوانات، با دستگاه استرئوتاکسی تنها مختصات RVM مشخص گردید. در گروه های SQ-22536 نیز پس از تزریق فرمالین در کف پای حیوانات، داروی مهارکننده آدنیلیل سیکلاز (SQ-22536) در سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومول و با حجم ۵ μl داخل RVM تزریق گردید.



●: Control
■: Vehicle

RVM Area

شکل ۱- محل تزریق رنگ پنتامین اسکای بلو در گروه شاهد و سالین



شکل ۲- محل تزریق رنگ پنتامین اسکای بلو در گروه‌های مداخله

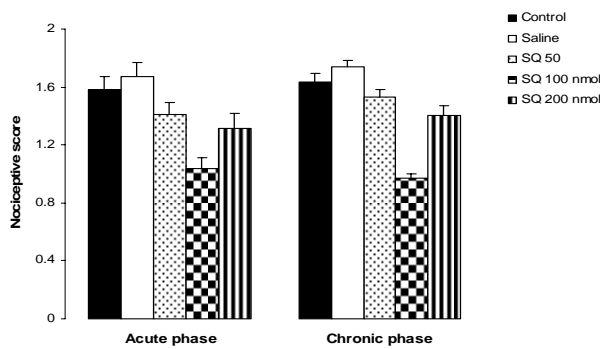
تأیید بافت‌شناسی (Verification):

پس از پایان تست فرمالین حیوانات را برای تأیید بافت‌شناسی آماده نموده و پس از بیهوشی کامل حیوانات، ۲ میکرولیتر رنگ پنتامین اسکای بلو از طریق کانولی که از قبل کاشته شده بود، تزریق گردید. سپس مغز حیوانات با پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شده و به‌طور کامل خارج گردید. پس از برش ساقه مغز، محل تزریق رنگ که نشان‌دهنده محل صحیح تزریق سالین یا داروی SQ-22536 می‌باشد، مشخص گردید. حیواناتی که محل تزریق رنگ در خارج از ناحیه RVM بود، کنار گذاشته شدند. شکل ۱ محل تزریق رنگ پنتامین اسکای بلو در گروه شاهد و سالین در منطقه RVM را نشان می‌دهد. محل تزریق رنگ پنتامین اسکای بلو در گروه‌های دریافت‌کننده مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومتر SQ-22536 در منطقه RVM در شکل ۲ نشان داده شده است. داده‌ها پس از تجزیه و تحلیل با نرم‌افزارهای SPSS به‌صورت میانگین و خطای معیار نمایش داده شده است. مقایسه میانگین بین گروه‌ها با

استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی LSD انجام شده است.

نتایج

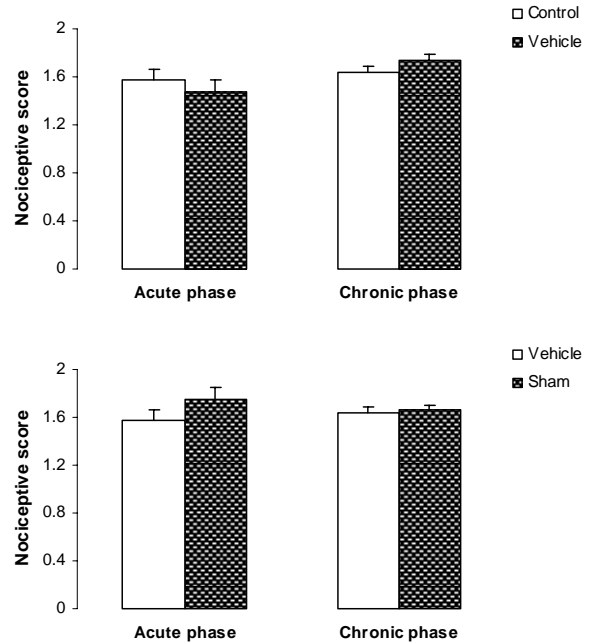
تزریق فرمالین سبب رفتارهای درد شد که از دو فاز تشکیل شده است. فاز نخست یا حاد (۱۵ دقیقه اول) و فاز دوم یا مزمن (۴۵ دقیقه دوم). تزریق سالین (۰/۵ میکرولیتر) به‌عنوان حلال دارو (Vehicle) به داخل هسته (ده دقیقه پیش از تزریق فرمالین) تغییری در رفتارهای درد فازهای نخست و دوم نداشت. همچنین بین گروه‌های شاهد جراحی (Sham) و سالین اختلاف معناداری در میانگین نمره مربوط به تست فرمالین در مرحله حاد و مزمن مشاهده نشد (نمودار ۱). تزریق غلظت ۱۰۰ نانومولار SQ-22536 توانست در دقایق ۵، ۱۰، ۱۵، ۵۰ و ۵۵ علائم رفتاری درد ناشی از تزریق فرمالین را به‌طور معناداری ($P < 0/05$) کاهش دهد. این کاهش علائم رفتاری درد در دقایق ۳۵-۲۵ نیز معنادار ($P < 0/01$) بود. همچنین غلظت ۲۰۰ نانومولار SQ-22536 تنها در دقیقه ۱۵



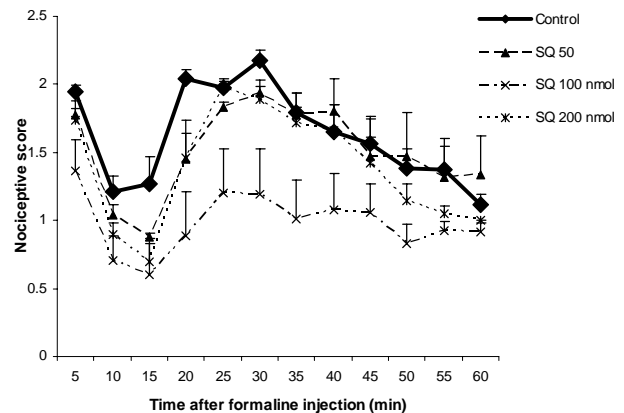
نمودار ۳- مقایسه نمره رفتارهای درد در گروه‌های مختلف در دو فاز حاد و مزمن

بحث

تزریق زیر پوستی فرمالین به کف پای موش صحرائی، یکی از مدل‌هایی است که برای مطالعه درد التهابی به کار گرفته می‌شود. فرمالین موجب آسیب بافتی، التهاب و حساس شدن سیستم اعصاب مرکزی می‌گردد و از این طریق یک درد تونیک (مزمن) ایجاد می‌نماید. تزریق زیر پوستی فرمالین اعصاب محیطی (فیبرهای نوع C) را فعال کرده و موجب فعال شدن نورون‌های شاخ خلفی نخاع می‌گردد که این امر پردردی سریع و طولانی ایجاد می‌کند (۱۸). در واقع پاسخ فرمالین در دو فاز ایجاد می‌گردد: در فاز اولیه بلافاصله بعد از تزریق فرمالین، درد شدیدی آغاز می‌گردد که این درد به وسیله تحریکات محیطی و فعال شدن فیبرهای C پدید می‌آید. فاز ثانویه یا فاز تأخیری که حدود ۲۰ دقیقه بعد آغاز می‌گردد، دردی ملایم ایجاد می‌کند که این درد به وسیله تغییرات عملکردی و بافتی در شاخ خلفی نخاع پدید می‌آید (۱۹ و ۲۰). از آزمون فرمالین به دلایل زیر استفاده گردید: ۱- آزمون فرمالین تحریک دردناک مناسبی را فراهم می‌کند. ۲- تحریک دردناک در آزمون فرمالین به طور مداوم می‌باشد و از این جهت می‌تواند مشابه درد بالینی باشد. ۳- حیوان آزمایشگاهی استرس کم‌تری را تجربه می‌کند. ۴- آزمون فرمالین دارای دو فاز می‌باشد که هر فاز نوع متفاوتی از درد را نشان می‌دهد (۲۱). در این پژوهش تزریق داخل RVM غلظت ۱۰۰ نانومولار SQ-22536 توانست در دقایق ۵، ۱۰، ۱۵، ۵۰ و ۵۵ علایم رفتاری درد ناشی از تزریق فرمالین را به طور معناداری ($P < 0.05$) کاهش دهد. این کاهش علایم رفتاری درد در دقایق ۳۵-۲۵ نیز معنادار ($P < 0.01$) بود. همچنین غلظت ۲۰۰ نانومولار SQ-22536 تنها در دقیقه ۱۵ رفتار درد را کاهش داد. غلظت ۵۰ نانومولار اثر معناداری روی علایم درد حاد و مزمن نداشت (نمودار ۲ و ۳). مطالعه‌ای نشان داد که تحریک الکتریکی RVM در شدت‌های زیاد (۱۰۰-۵۰ μA) موجب ایجاد درد و در شدت‌های کم (۲۵-۵ μA) موجب ایجاد بی‌دردی می‌شود



نمودار ۱- مقایسه نمره رفتارهای درد در گروه‌های شاهد، سالین و جراحی در دو فاز حاد و مزمن



نمودار ۲- مقایسه نمره رفتارهای درد در گروه‌های مداخله با گروه شاهد در زمان‌های متوالی

رفتار درد را به طور معنادار ($P < 0.05$) کاهش داد. غلظت ۵۰ نانومولار اثر معناداری روی علایم درد حاد و مزمن نداشت (نمودار ۲). برای بررسی بهتر اثر مقادیر مختلف SQ-22536 بر درد حاد و مزمن نمایش گراف در شکل ۴ به صورت فاز حاد (۱۵ دقیقه اول) و فاز مزمن (۴۵ دقیقه دوم) ارائه شد (نمودار ۳).

تشکر و قدردانی

این طرح پژوهشی با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود به انجام رسید. از این‌رو، من و همکارانم کمال تشکر و قدردانی را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود داریم.

References

- Kandel E, Schwartz J. The perception of pain. Principles of Neural Sciences. 4th ed. Mc- Graw-Hill Publication; 2000:472-491.
- Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. J Clin Neurophysiol 1997;14(1):2-31.
- Melzack R. From the gate to the neuromatrix. Pain 1999;1(6):121-6.
- Behbehani MM, Fields HL. Evidence that an exory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. Brain Res 1979;170(1):85-93.
- Behbehani MM, Pomeroy SL. Effect of morphine injection in periaqueductal gray on the activity of single units in nucleus raphe magnus of the rat. Brain Res 1978;149(1):266-269.
- Behbehani MM, Pomeroy SL, Mack CE. Interaction between central gray and nucleus raphe magnus: role of norepinephrine. Brain Res Bull 1981;6(5):361-64.
- Bodnar RJ, Kelly DD, Brutus M, Glusman M. Stress-induced analgesia: neural and hormonal determinants. Neurosci Biobehav Rev 1980;4(1):87-100.
- Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. Science 1980;280(4444):623-625.
- Morgan MN, Heinricher MM, Fields HL. Inhibition and facilitation of different nociceptive reflexes by spatially remote noxious stimuli. J Neurophysiol 1994;72(3):1152-160.
- Vannegas H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. Neurosci Lett 2004;361(1-3):225-28.
- Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistence pain: inhibitory or facilitatory? Brain Res Rev 2004;46(3):295-309.
- Dolan S, Nolan AM. Biphasic modulation of nociceptive processing by the cyclic AMP-protein kinase a signaling pathway in sheep spinal cord. Neurosci Lett 2001;309(3):157-160.
- Lin Q, Wu J, Willis WD. Effect of protein kinase a activation on the responses of primate spinothalamic tract neurons to mechanical stimuli. J Neurophysiol 2002;88(1):214-221.
- Heinricher MM, McGaraughty S, Tortorici V. Circuitry underlying antinociceptive actions of cholecystokinin within the rostral ventromedial medulla. J Neurophysiol 2001;85(1):280-286.
- Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. Pain 1995;60(1):91-102.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effect of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. Pain 1977;4(2):161-174.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. New York: Academic Press;2006.
- Okuda K, Sakurada, Takahashi M, Yamada T, Sakurada T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. Pain 2001;92(1-2):107-115.
- Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. Brain Res 1990;535(1):155-158.

(۲۲). در مطالعه دیگری به جای تحریک الکتریکی از تزریق ناقل عصبی گلوتامات استفاده شد که نتیجه‌ای همانند تحریک الکتریکی به دست آمد. این مطالعه نقش گیرنده‌های NMDA را در فعال کردن RVM نشان داد. ۳ جمعیت نورون در RVM شناسایی شده است. این ۳ دسته شامل سلول‌های روشن (On)، خاموش (Off) و خنثی (Neutral cells) می‌باشند. نقش نورون‌های On-cell در ایجاد پردردی خصوصاً پردردی ثانویه به خوبی مشخص شده است (۲۳). استفاده موضعی کله‌سیستوکینین (CCK) در RVM سبب پردردی احشایی و پوستی می‌شود. کله‌سیستوکینین، در مقداری که سبب پردردی می‌شود، موجب افزایش فعالیت سلول‌های On می‌گردد و سلول‌های On پردردی کله‌سیستوکینین را در RVM وساطت می‌کنند (۱۴). نوروتنسنین در مقدار کم سبب تسهیل درد و در مقادیر بالا سبب بی‌دردی می‌شود در حالی که در مقادیر متوسط اثری ندارد. رفتار پردردی به وسیله افزایش فعالیت سلول‌های On و بی‌دردی توسط بسج سلول‌های Off وساطت می‌شود و سلول‌های خنثی به نوروتنسنین پاسخ نمی‌دهند (۱۴). در دوره‌های پردردی، تعادل میان جمعیت سلول‌های Off و On به سود فعالیت بیش‌تر On-cell ها پیش می‌رود که با افزایش پاسخ‌دهی به محرک دردناک ارتباط دارد اما به-وسیله تحریک RVM بلوک می‌شود. بنابراین تحریک دردناک سبب بسج سلول‌های RVM می‌گردد که این سلول‌ها در تسهیل درد نقش دارند. این نتیجه همسو با نتایج سرور در سال ۱۹۸۴ است که RVM را حلقه فیدبک مثبت به حساب می‌آورد که توسط محرک دردناک پرکار می‌شوند. این چنین حلقه فیدبک مثبت احتمالاً موجود زنده را آماده می‌کند که با آستانه پایین‌تر و با سرعت بیش‌تری به ورودی‌های آسیب‌رسان بعدی پاسخ دهد. این که چه تغییرات سیناپسی در سلول‌های On منطقه‌ی RVM سبب تسهیل درد می‌شود همیشه مورد سؤال بوده است. با توجه به این که SQ-22536 سبب کاهش رفتارهای درد در آزمون فرمالین شد، این نتیجه مویید آن است که احتمالاً مسیر cAMP در این تغییرات سیناپسی دخیل است. فعال شدن مسیر cAMP در سیستم اعصاب مرکزی در پردازش درد دخیل می‌باشد. پردردی مکانیکی به وسیله فعال شدن مسیر cAMP ایجاد شده است (۱۲، ۲۴ و ۲۵). فعال کردن آدنیلیل سیکلاز، پاسخ نورون‌های مسیر نخاعی تالاموسی را به نیش‌گون (Pinch) افزایش می‌دهد که به وسیله مهار پرتئین کیناز A از این اثر جلوگیری می‌شود (۱۳). هم‌چنین موش‌های فاقد آدنیلیل سیکلاز ۱ و ۸ پس از آزمون فرمالین، کاهش رفتارهای درد را نشان دادند (۲۶). بلوک آدنیلیل سیکلاز یا PKA از پردردی مکانیکی و پردردی القا شده به وسیله تزریق داخل پوستی، داخل عضلانی و داخل مفصلی کاپسایسین جلوگیری نموده است (۲۲). همسو با این تحقیقات مهار آدنیلیل سیکلاز سبب کاهش رفتارهای درد در آزمون فرمالین شده است.

20. Dickensen AH, Sullivan AF. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci Lett* 1987; 83(1-2): 207-211.
21. Behbahani MM, Park MR, Celement ME. Intraction between the lateral hypothalamus and the periaqueductal gray. *J Neurosci* 1988;8(8):2780-87.
22. Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Mooney-Heberger K, Martinez J, Furness L, et al. Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res* 1994;639(2):283-99.
23. Fields HL, Heinricher MM. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;308(1136):361-374.
24. Sluka KA. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. *J Neurosci* 2002;22(13): 5687-693.
25. Sluka KA, Rees H, Chen PS, Tsuruoka M, Willis WD. Capsaicin-induced sensitization of primate spinothalamic tract cells is prevented by a protein kinase C inhibitor. *Brain Res* 1997;772(1-2):82-86.
26. Wei F, Qiu CS, Kim SJ, Muglia L, Maas JW, Pineda VV, et al. Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. *Neuron* 2002;36(4):713-26.