

## تأثیر اتصالات منفذدار (Gap junction) نخاعی در کاهش و یا افزایش ادم التهابی پای موش صحرائی در حضور و غیاب دوزهای نرمال و بسیار کم مرفین

مرجان کمال‌پور (MSc)<sup>۱</sup>، مسعود فریدونی (PhD)<sup>۱\*</sup>، علی مقیمی (PhD)<sup>۱</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دریافت: ۹۲/۱۱/۱۸، اصلاح: ۹۲/۱۲/۱۵، پذیرش: ۹۳/۲/۲۴

### خلاصه

**سابقه و هدف:** اتصالات منفذدار (Gap junction=G.J) که مسیری برای عبور کاتیونها، پیامبرهای ثانویه و متابولیت‌های کوچک بین سلول‌های مجاور فراهم می‌آورند، در سیستم اعصاب مرکزی از جمله نخاع شناسایی شده‌اند. با توجه به اینکه کربنوکسالون یکی از پرکاربردترین مسدودکننده‌های G.J است، این مطالعه به منظور بررسی اهمیت G.J ها در نخاع در ادم التهابی القاء شده توسط فرمالین به تنهایی و در حضور دوزهای نرمال و بسیار کم مرفین انجام شد.

**مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی تعداد ۴۹ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار (۲۰۰-۱۸۰ گرم) بجز کنترل به هفت گروه هفت‌تایی تقسیم شدند، ابتدا حیوانات بیهوش شده و با انجام جراحی وسط غشای اطلس-اکسی پیتال سوراخ کوچکی جهت عبور لوله پلی اتیلن ایجاد گردید. پس از طی دوران بهبودی جراحی کانول‌گذاری برای تجویز نخاعی (i.t.) در سه دسته دریافت‌کننده داخل صفاقی سالین (i.p.)، دوز نرمال مرفین (۱۰ mg/kg, i.p.) و دوز بسیار کم مرفین (۱ μg/kg, i.p.) قرار گرفتند و هر دسته به دو گروه هفت‌تایی تقسیم شد که یک گروه سالین (i.t.) و دیگری کربنوکسالون (۱ nM, i.t.) دریافت کردند. در هر گروه حجم ادم التهابی ناشی از تزریق ۰/۰۵ ml فرمالین ۲/۵٪ به کف پای حیوانات، یک‌ساعت پس از تجویزها، به روش پلتیسومتری سنجش شد.

**یافته ها:** تجویز نخاعی کربنوکسالون ادم التهابی ناشی از فرمالین را کاهش داد (۲۶۰±۷/۲۴)، ( $p < 0/01$ ). همچنین اثرات ضد التهابی دوز نرمال مرفین را افزود (۲۲۰±۲۰/۱۲)، ( $p < 0/01$ ) و از طرف دیگر سبب کاهش و معکوس کردن اثرات پیش‌برنده التهاب دوز بسیار کم مرفین شد (۲۵۰±۱۹/۵۷)، ( $p < 0/01$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که اتصالات منفذدار احتمالاً با تسهیل آزادسازی عوامل التهابی از سلول‌های گلیای نخاعی در روند التهاب نقش دارند، لذا احتمالاً انسداد آن‌ها منجر به کاهش رهایش و انتقال عوامل التهابی در نخاع و بدنال آن کاهش فرآیند ادم التهابی و همچنین تغییر اثر ضد التهابی/پیش التهابی مرفین شده است.

**واژه های کلیدی:** اتصالات منفذدار، کربنوکسالون، مرفین، ادم، التهاب.

### مقدمه

التهاب نوروزنیک در اثر تحریکات شیمیایی، زمانی رخ می‌دهد که گیرنده‌های درد در پاسخ به مواد آزاد شده از بافت آسیب دیده یا ملتهب، تحریک شوند (۱). این مواد سوپ التهابی نامیده می‌شوند و طیف وسیعی از مولکول‌های انتقال پیام را مانند میانجی‌های عصبی، پپتیدهایی همچون ماده P، CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) و عواملی همچون پروستاگلاندین‌ها، سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را شامل می‌شوند. آزاد سازی محیطی این مواد منجر به اتساع عروق و خروج پروتئین‌های پلاسما و بروز التهاب نوروزنیک می‌شود (۲،۳). معمول‌ترین روش برای کاهش التهاب مهار تولید یا حذف اجزاء سوپ التهابی می‌باشد. مثلاً داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی، همچون آسپرین یا ایبوپروفن قادرند التهاب را به وسیله مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز درگیر در تولید پروستاگلاندین‌ها، کاهش دهند (۴). همچنین التهاب پدیده‌ای است که باعث حساس سازی محیطی و مرکزی نورون‌های مربوط به احساس درد می‌شود (۵). مدارکی وجود دارد که مکانیسم‌های نخاعی را

برای تنظیم التهاب در محیط شرح می‌دهند به عنوان مثال تزریق زیر پوستی کاراجینان باعث افزایش تحریک پذیری نورون‌های نخاعی در موش‌های صحرائی می‌شود (۶). بعلاوه، تجویز نخاعی ترکیبات مختلف می‌تواند بر روی التهاب محیطی تأثیر بگذارد. بنابراین نخاع در رفت و برگشت اطلاعات از بافت ملتهب و مغز یک ارتباطی برقرار می‌کند و در نتیجه یک حلقه بازخوردی برای کنترل عصبی التهاب فراهم می‌کند (۷). مرفین آلکالوئیدی است که از عصاره گیاه خشخاش بدست می‌آید و از دیرباز برای درمان درد مورد استفاده قرار می‌گرفته است. قدرت بی‌درد کنندگی و ماهیت تسکین دهنده مرفین، آن را به یکی از بهترین ضد دردها مبدل کرده است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که مرفین نقش‌های مهمتری از بی‌درد کنندگی، همچون مهار پاسخ‌های ایمنی و تنظیم تکثیر رشد تومورها ایفا می‌کند (۸). هدف مرفین در مورد التهاب گیرنده‌های μ اپیوئیدی پیش‌سیناپسی هستند. زمانی که آگونیست‌هایی همچون مرفین به این گیرنده‌ها متصل می‌شوند، این امر منجر به کاهش جریان رو به داخل کلسیم و

\* مسئول مقاله: دکتر مسعود فریدونی

روزانه به مدت چند ساعت در فضای آزمایشگاه قرار گرفتند و سپس دوباره به حیوانخانه برگردانده شدند.

کلیه مراحل عملیات آزمایشگاهی روی جانوران با رعایت مقررات بین المللی اخلاق علمی و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت (۱۶). در این آزمایش از داروی مرفین با دوزهای ۱۰ mg/kg و ۱ μg/kg (تهیه شده از شرکت تماء، ایران) و کربنوکسالون با غلظت ۱ نانومولار (۱ nM) (Sigma Aldrich, USA) استفاده گردید، سالیین نیز به عنوان حلال داروها مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات به صورت تصادفی در شش گروه هفت‌تایی دریافت کننده سالیین (i.p) + سالیین (i.t)، سالیین (i.p) + کربنوکسالون (۱ nM, i.t)، مرفین (i.p) + (۱۰ mg/kg, i.p) + سالیین (i.t)، مرفین (i.p) + (۱۰ mg/kg, i.p) + کربنوکسالون (۱ nM, i.t) و مرفین (i.p) + (۱۰ μg/kg, i.p) + کربنوکسالون (۱ nM, i.t) طبقه بندی شدند. در تمام گروه‌ها تجویزهای داخل صفاقی (i.p) با حجم ۱ میلی‌لیتر/کیلوگرم و پس از گذشت ۲۵ دقیقه تجویزهای نخاعی (i.t) با حجم ۱۰ میکرولیتر صورت گرفت. همچنین به منظور اطمینان از عدم تأثیر عمل جراحی جهت تجویزهای نخاعی بر نتایج آزمایش‌ها، یک گروه دیگر از موش‌های صحرایی به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که فقط سالیین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

تجویزهای داخل نخاعی بر اساس روش Rudy & Yaksh انجام گردید (۱۷). در این روش ابتدا حیوانات با تزریق ۱۰۰ mg/kg کتامین و ۲۰ mg/kg زایلانزین بی‌هوش شدند. سر حیوان در دستگاه استرنوتاکسی جهت انجام جراحی ثابت و برشی کوچک از بین گوش‌ها به طرف پایین ایجاد و عضلات گردنی کنار زده شد و به آرامی از روی تیغه اکسی‌پیتال جمجمه آزاد شدند. سپس وسط غشای اطلس-اکسی‌پیتال سوراخ کوچکی ایجاد تا مایع مغزی - نخاعی خارج شد که این امر نشانه‌ای از دسترسی به فضای تحت عنکبوتیه است. یک لوله پلی اتیلن (PE-۱۰) استریل یازده سانتیمتری آماده و هشت سانتیمتر از آن به آرامی در فضای تحت عنکبوتیه به سمت قطعه کمری نخاع پیش برده شد بطوریکه سر لوله بین قطعات کمری ۴ و ۵ قرار گرفت. سه سانتیمتر از لوله جهت تجویز داروها یا سالیین خارج از نخاع قرار گرفت. در هیچیک از حیوانات جراحی شده نباید نقص حرکتی دیده می‌شد (۱۷).

داروها یا سالیین توسط سرنگ همیلتون ۲۵ میکرولیتری و به کمک لوله رابط به صورت نخاعی تجویز شدند. جهت اندازه گیری حجم ادم ناشی از التهاب القاء شده توسط تزریق کف پای فرمالین از روش پلتیسومتری استفاده گردید. در این روش ابتدا پای عقبی سمت چپ حیوان تا علامت درج شده روی مچ قبل از تجویز داروها در ستون جیوه‌ای که مستقر روی ترازوی دیجیتال بود فرو برده شد.

از تقسیم عدد نشان داده شده توسط ترازوی دیجیتالی بر جرم حجمی جیوه، حجم پا تا علامت نشانه بدست آمد، سپس تجویزهای داخل صفاقی انجام گرفته و پس از گذشت ۲۵ دقیقه تجویزهای نخاعی انجام گرفت، با گذشت ۵ دقیقه از تجویزهای نخاعی، فرمالین به کف پای عقبی سمت چپ حیوان تزریق شد و پس از سپری شدن یکساعت دوباره حجم پا بوسیله پلتیسومتری تعیین گردید. در این روش تفاوت حجم پا قبل و بعد از تزریق کف پای فرمالین، مؤید میزان ادم ناشی از التهاب القاء شده توسط تزریق کف پای فرمالین بود (۱۸). داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به کمک نرم‌افزار آماری

کاهش آزاد سازی ماده p و به دنبال آن کاهش التهاب می‌گردد (۵). از طرفی یافته‌های پیشین حاکی از آن هستند که مرفین با مهار فعال‌سازی سلول‌های گلیا قادر است التهاب محیطی را کاهش دهد (۹).

مطالعات نشان دادند که بین نورون‌ها و سلول‌های گلیا همچون آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها در سیستم عصبی مرکزی اتصالات منفذاری وجود دارد (۱۰)، کربنوکسالون نیز مشتق سنتتیک glycyrrhetic acid است که در گیاه شیرین بیان یافت می‌شود و یکی از پر کاربردترین مسدود کننده‌های غیر اختصاصی اتصالات منفذدار در تحقیقات می‌باشد. محققین با استفاده از کروماتوگرافی مایع نشان دادند که کربنوکسالون از سد خونی مغزی عبور نمی‌کند. بنابراین برای بررسی اثر مرکزی کربنوکسالون الزاماً باید از تجویزهای داخل مغزی و یا داخل نخاعی استفاده شود (۱۱).

با توجه به آن‌که به نظر می‌رسد اتصالات منفذدار در سیستم عصبی مرکزی و در سطح نخاع از اهمیت برخوردار باشند (۱۲)، سؤال این است که آیا انسداد این اتصالات در سطح نخاع می‌تواند موجب تغییر در فرآیند التهاب نورونیک شود. از طرفی با توجه به اینکه تحریک شیمیایی گیرنده‌های محیطی درد منجر به بروز التهاب نورونیک شده است (۱۳)، یکی از اهداف این پژوهش بررسی تأثیر تجویز مرکزی کربنوکسالون به عنوان یک مسدود کننده اتصالات باز (۱۱) در سطح نخاع بر روی ادم التهابی القاء شده با تزریق فرمالین در پنجه پای موش صحرایی می‌باشد و از آنجائیکه تجویز مرفین در دوزی که معمولاً اثر بی‌دردی بروز می‌دهد، باعث کاهش ادم التهابی در پنجه پای موش صحرایی شده است (۱۴) و همچنین تجویز دوز پر درد کننده مرفین اثر پیش برنده التهاب داشته است (۱۵)، اگر اتصالات منفذدار در التهابات نورونیک نقشی داشته باشد با توجه به آنچه که برای مرفین ذکر شد هدف این پژوهش بررسی تداخل عمل مسدود کننده اتصالات منفذدار در سطح نخاع با عملکردهای ضد التهابی و یا پیش برنده التهاب برای مرفین می‌باشد.

لذا در این مطالعه برای بررسی تأثیر اتصالات منفذدار نخاعی در کاهش و یا افزایش ادم التهابی پای موش صحرایی در حضور و عدم حضور دوزهای نرمال و بسیار کم مرفین، از روش پلتیسومتری برای اندازه گیری حجم ادم التهابی القاء شده با تزریق فرمالین در پنجه پای حیوان استفاده شده است. این مطالعه به منظور به بررسی اهمیت G.J.ها در نخاع در ادم التهابی القاء شده توسط فرمالین به تنهایی و در حضور دوزهای نرمال و بسیار کم مرفین انجام شد.

## مواد و روشها

در این مطالعه تجربی در مجموع از ۴۹ سر موش صحرایی نر آلبینو نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم در هفت گروه هفت‌تایی استفاده گردید. تمامی مراحل تکثیر و پرورش حیوانات در حیوانخانه و انجام آزمایش‌ها در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. تمامی حیوانات در دمای حدود  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  و در شرایط ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی در قفس‌های مخصوصی از جنس Plexy glass نگهداری شدند. موش‌های صحرایی در تمام مدت به جز زمان انجام آزمایش‌ها به آب لوله‌کشی شهر و پلت‌های غذایی فشرده (محصول شرکت جوانه خراسان) دسترسی آزاد داشتند و یک هفته قبل از شروع آزمایش‌ها برای تطابق با محیط،

حجم ادم التهابی طی تجویز نخاعی کربنوکسالون (۱ nM) در مقایسه با گروه سالیین+(i.p) سالیین (i.t) کاهش یافت. تجویز داخل صفاقی دوز نرمال مرفین حجم ادم التهابی ایجاد شده توسط فرمالین را کاهش داد و تجویز نخاعی کربنوکسالون (۱ nM) اثر کاهشی در حجم ادم التهابی مرفین را تشدید کرد از طرفی تجویز داخل صفاقی دوز بسیار کم مرفین حجم ادم التهابی ایجاد شده توسط فرمالین را افزایش داد اما تجویز نخاعی کربنوکسالون اثر افزایشی در حجم ادم التهابی دوز بسیار کم مرفین را از بین برد و منجر به کاهش حجم ادم التهابی ناشی از فرمالین گردید (a p<0/05, b p<0/01 و c p<0/001 در مقایسه با گروه سالیین+(i.p) سالیین (i.t) و b' p<0/01 در مقایسه با گروه مرفین(۱۰ mg/kg,i.p) سالیین(i.t) و c'' p<0/001 در مقایسه با گروه مرفین(۱ μg/kg,i.p) سالیین(i.t))، نتایج به صورت mean±SEM ارائه شده اند (n=۷).

**بحث و نتیجه گیری**

یافته‌های تحقیق حاضر حاکی از آن بود که تجویز نخاعی کربنوکسالون به عنوان مسدود کننده اتصالات منفذدار (Gap junction) منجر به کاهش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین گردید. از آنجاییکه در سیستم عصبی مرکزی برخی نورون‌ها و تقریباً همه آستروسیت‌ها دارای اتصالات منفذدار هستند (۱۹)، در طول آسیب محیطی به بافت، بافت آسیب دیده و سلول‌های درگیر در سیستم ایمنی موادی شامل TNF-α، اینترلوکین‌ها، پروستاگلاندین‌ها، نیتریک-اکساید و ... ترشح می‌کنند، به طور همزمان چنین عواملی در سیستم عصبی مرکزی و در شاخ پشتی نخاع نیز آزاد می‌شوند (۲۰).

مطالعات پیشین نشان داد تزریق کف پای فرمالین منجر به فعال شدن سلول‌های گلیا خصوصاً میکروگلیاها و آستروسیت‌ها در سیستم عصبی مرکزی می‌شود. این سلول‌ها نیز پس از فعال شدن سیتوکاین‌ها و کموکاین‌های پیش-برنده التهاب را تولید می‌کنند (۲۱). همچنین التهاب محیطی ایجاد شده به وسیله تزریق CFA به پنجه پای موش صحرایی منجر به فعال شدن میکروگلیاها و آستروسیت‌ها در شاخ پشتی نخاع می‌شود (۲۲).

یافته‌های این تحقیق پیشنهاد می‌کند که مسدود شدن اتصالات منفذدار در سطح نخاع از تولید سیتوکاین‌های پیش برنده التهاب که توسط سلول‌های گلیای دورتر در نتیجه ارتباطاتی از طریق اتصالات منفذدار فعال می‌شوند، ممانعت می‌کند که مطالعات پیشین نیز مؤید این موضوع بود (۲۳). به دنبال آسیب‌های محیطی شامل تحریکات شیمیایی عوامل التهابی به طور همزمان در محیط و مرکز آزاد می‌شوند، آزاد شدن عوامل التهابی از جمله ماده P و CGRP از پایانه مرکزی فیبرهای آوران سبب فعال‌سازی سلول‌های گلیای مجاور می‌گردد. از طرفی سلول‌های گلیا از طریق اتصالات منفذدار با دیگر گلیاها ارتباط برقرار می‌کنند (۲۰)، بعلاوه حضور این اتصالات منفذدار روی آستروسیت‌ها منجر به آزاد سازی سیتوکاین‌های التهابی همچون اینترلوکین ۱- بتا از این گلیاهای فعال شده می‌شود (۲۴).

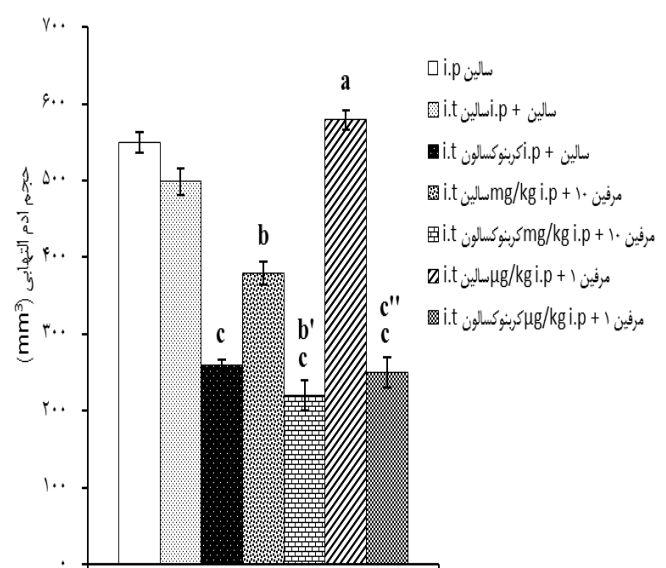
نظر به اینکه انسداد دهنده‌های اتصالات منفذدار در سطح نخاع منجر به کاهش حجم ادم التهابی گردید، اولین نکته‌ای که حائز اهمیت خواهد بود، نقش مهم اتصالات منفذدار در سطح نخاع است و دومین نکته نقش مهم این اتصالات

و به دنبال آن مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون تعقیبی GraphPad Prism 5 و تجزیه و تحلیل شد و p<0/05 معنی دار در نظر گرفته شد. تی Tukey

**یافته ها**

مقایسه نتایج حاصل از سنجش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین در گروه کنترل شامل موش‌های صحرایی جراحی نشده و دریافت کننده سالیین (i.p) و گروه دریافت کننده سالیین+(i.p) سالیین (i.t) و گروه دریافت کننده سالیین+(i.p) کربنوکسالون (i.t) حاکی از آن بود که اختلاف معنی‌داری در میزان ادم التهابی ایجاد شده توسط تزریق کف پای فرمالین در دو گروه نخست مشاهده نگردید، این مسئله بیانگر این بود که عمل جراحی جهت تجویز نخاعی در روند آزمایش بی تأثیر است. از طرفی تجویز نخاعی کربنوکسالون به طور معنی‌داری منجر به کاهش حجم ادم التهابی گردید (p<0/001)، (نمودار ۱). همچنین یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تجویز داخل صفاقی دوز معمول مرفین در گروه دریافت کننده مرفین (۱۰ mg/kg,i.p) سالیین (i.t) سبب کاهش معنی‌داری در حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین گردید (p<0/05) این در حالی است که تجویز نخاعی کربنوکسالون همراه با تجویز داخل صفاقی دوز مذکور مرفین منجر به تشدید اثرات ضد التهابی دوز معمول مرفین شده و حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین کاهش بیشتری یافت (p<0/001).

از سوی دیگر، تجویز داخل صفاقی دوز بسیار ناچیز مرفین در گروه دریافت کننده مرفین (۱ μg/kg,i.p) سالیین (i.t) سبب افزایش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین گردید (p<0/05)، اما تجویز نخاعی کربنوکسالون به همراه تجویز داخل صفاقی دوز بسیار ناچیز مرفین سبب شد که کربنوکسالون اثر پیش‌برنده التهاب این دوز از مرفین را کاهش دهد و حتی در این گروه حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین کاهش معنی‌داری یافت (p<0/001)، (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین در گروه‌های مورد مطالعه

بسیار کم مرفین، باعث تضعیف اثرات التهابی ایجاد شده توسط دوز بسیار کم مرفین گردید. مطالعات پیشین حاکی از آن است که تزریق داخل صفاقی دوزهای کم مرفین (۱ mg/kg) علاوه بر بروز پردردی، اثرات التهابی نیز دارد و منجر به افزایش ادم در پای موش می گردد (۲۸).

همچنین تحقیقات نشان دادند که آگونیست‌های گیرنده‌های اپیوئیدی مثل مرفین در دوزهای بسیار کم منجر به فعال شدن پروتئین کیناز C در سیستم عصبی مرکزی و آزاد سازی دی نورفین‌های نخاعی می شود (۲۹ و ۱۴). از آنجاییکه به دنبال آسیب‌های محیطی و آزاد سازی ماده P، آمینواسیدهای تحریکی و ATP از پایانه‌های مرکزی نورون‌های شاخ پشتی نخاع، سلول‌های گلیای مستقر در اطراف پایانه‌های مرکزی فعال می‌شوند. سلول‌های گلیای فعال شده، خود نیز فاکتورهای پیش‌برنده التهابی را آزاد می‌کنند (۳۰) و چون سلول‌های گلیا توسط اتصالات منفذدار با یکدیگر ارتباط دارند (۱۹)، احتمالاً انسداد این اتصالات می‌تواند منجر به کاهش آزاد سازی عوامل التهابی توسط سلول‌های گلیا گردد و این مسئله سبب شود تا اثرات التهابی دوز بسیار کم مرفین با انسداد اتصالات منفذدار معکوس گردد.

در کل با توجه به پراکندگی اتصالات منفذدار در سیستم عصبی مرکزی و همچنین یافته‌های به دست آمده از این پژوهش، این احتمال مطرح است که انسداد اتصالات منفذدار بتواند سبب کاهش تولید عوامل پیش‌برنده التهاب در سطح نخاع و کاهش حجم ادم التهابی گردد، همچنین انسداد اتصالات منفذدار نخاعی سبب شد تا اثر مهار کننده التهاب دوز نرمال مرفین را تقویت و اثر پیش‌برندگی التهاب دوز بسیار کم مرفین را تضعیف کند. بنابراین می‌تواند کربنوکسالون را به عنوان مسدود کننده اتصالات منفذدار در مدیریت فرآیند التهاب، به عنوان یک دیدگاه درمانی جدید پیش‌رو، مد نظر گرفت.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه فردوسی مشهد برای پشتیبانی از پروژه مرتبط با این مقاله، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

در فرآیندهای مربوط به التهاب نوروژنیک می‌باشد به نحوی که انسداد این اتصالات توسط کربنوکسالون در سطح نخاع منجر به کاهش آزاد سازی سیتوکاین‌های پیش‌برنده التهاب توسط سلول‌های گلیا و در نتیجه موجب کاهش التهاب ناشی از تزریق کف پای فرمالین شده است. همچنین در این پژوهش مشاهده شد که تجویز نخاعی کربنوکسالون در گروه موش‌های صحرایی که دوز نرمال مرفین (۱۰ mg/kg) را به صورت داخل صفاقی دریافت کرده بودند منجر به تشدید اثرات ضد التهابی دوز معمول مرفین شد.

مطالعات نشان دادند، مرفین حداقل بخشی از اثرات ضد التهابی خود را از طریق کاهش آزادسازی برخی عوامل پیش‌برنده التهاب در محیط و مرکز اعمال می‌کند. مرفین قادر است ادم التهابی القاء شده به وسیله برخی محرک‌ها همچون کاراجینان، مخمر، کپسایسین، سم مار و ... را تقلیل دهد. از مکانیسم‌های درگیر در ایجاد اثرات ضد التهابی مرفین می‌توان به مهار آزاد سازی پپتید وازواکتیو از پایانه‌های عصبی، مهار سنتز و آزاد سازی سایتوکین‌ها از لوکوسیت‌ها، مهار آزادسازی موضعی فاکتور رشد عصبی و مهار ترشح پلاسمایی اشاره کرد (۲۵). همچنین مرفین در محیط با اتصال به گیرنده‌های اپیوئیدی  $\mu$  محیطی می‌تواند فرآیند بیان ژنی سایتوکین‌ها و کموکاین‌های التهابی همچون  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و  $IL-8$  را کاهش دهد (۲۶).

در مرکز نیز مرفین قادر است مهار پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی را القاء کند که در حالت مهار پیش‌سیناپسی آزادسازی عوامل التهابی از پایانه‌های مرکزی نورون‌های آوران کاهش می‌یابد (۲۷). از طرفی، سلول‌های گلیای شاخ پشتی نخاع به واسطه اتصالات منفذدار با هم در ارتباطند (۲۰). با توجه به اینکه فعال شدن سلول‌های گلیا منجر به آزاد سازی سیتوکاین‌های التهابی می‌گردد (۲۴)، لذا این احتمال وجود دارد انسداد اتصالات منفذدار که سلول‌های گلیا را به هم مربوط می‌سازد، باعث کاهش آزاد سازی مواد التهابی و کاهش حجم ادم التهابی شده است.

از طرفی نتایج این مطالعه نشان داد که علیرغم افزایش حجم ادم التهابی در گروه دریافت کننده دوز بسیار کم مرفین به تنهایی (۱  $\mu\text{g/kg}$ )، انسداد اتصالات منفذدار به واسطه تجویز نخاعی کربنوکسالون به همراه تجویز داخل صفاقی دوز

## Effect of Spinal Gap Junctions in Reduction or Increase of Inflammatory Rat Paw Edema in Presence and Absence of Morphine Usual and Ultra-low Dose

M. Kamalpour (MSc)<sup>1</sup>, M. Fereidoni (PhD)<sup>\*1</sup>, A. Moghimi (PhD)<sup>1</sup>

1. MSc in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 16(10); Oct 2014; pp: 45-51

Received: Oct 23<sup>rd</sup> 2013, Revised: Jan 5<sup>th</sup> 2014, Accepted: Mar 6<sup>th</sup> 2014.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Gap Junctions (G.J) which provide the conduit for cations, second messengers and small metabolites translocation between the neighbor cells are identified in the central nervous system like as spinal cord. As the carbenoxolone is the most frequent blockers of G.J, this study was to investigate the importance of G.J at the level of spinal cord in inflammatory edema induced by formalin merely and at the presence of normal and ultra-low dose of morphine.

**METHODS:** In this experimental study, 49 male Wistar rats (180-200g) except control group were divided into 7 groups. First, animals were anesthetized and the center of atlas-occipital membrane was undergone surgery to create a small hole for the passage of polyethylene tube. After recovery from cannulation surgery, they were classified in three categories 1) intraperitoneal (i.p) saline, 2) normal dose of morphine (10mg/kg, i.p) 3) ultra-low dose of morphine (1µg/kg, i.p) for intrathecal administration (i.t). Each category was grouped in two groups of seven each (n=7) and one group received saline (i.t) and the second one received carbenoxolone (1nM, i.t). Inflammatory edema volume due to the sub plantar injection of formalin (0.05 ml, 2.5%) was assessed in all groups by using plethysmometric method one hour after administration.

**FINDINGS:** I.t injection of carbenoxolone reduced the inflammatory edema induced formalin ( $260 \pm 7.24$ ) ( $p < 0.001$ ), also in one hand, potentiated the anti-inflammatory effects of morphine usual dose ( $220 \pm 20.12$ ) ( $p < 0.001$ ) and on the other hand, alleviated and reversed the pro-inflammatory effects of morphine ultra-low dose ( $250 \pm 19.57$ ) ( $p < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** The results of this study showed that the G.J had an important role in the inflammatory process probably with facilitating the release of inflammatory factors from spinal glia cells. Therefore, G.J blockage possibly diminished the translocation and release of inflammatory mediators through the spinal cord and then led to alleviate the inflammatory edema progression and changed the anti-inflammatory/pro-inflammatory effects of morphine.

**KEY WORDS:** *Gap Junction, Carbenoxolone, Morphine, Edema, Inflammation.*

### Please cite this article as follows:

Kamalpour M, Fereidoni M, Moghimi A. Effect of Spinal Gap Junctions in Reduction or Increase of Inflammatory Rat Paw Edema in Presence and Absence of Morphine Usual and Ultra-low Dose. J Babol Univ Med Sci 2014;16(10):45-51.

\* Corresponding Author; M. Fereidoni (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Tel: +98 51 38762227, Fax: +98 511 8762227

E-mail: fereidoni@um.ac.ir

## References

1. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420(6917): 846-52.
2. Steinke JW, Borish L. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer): S441-5.
3. Ebrahimi Vosta Kalae S, Talebi Mazraeh Shahi A, Naseri M. Anti-Inflammation effect of alcoholic extract of *linum usitatissimum* L. in male rats. *J Babol Univ Med Sci* 2014; 16(4): 50-6. [In Persian]
4. Auriel E, Regev K, Korczyn AD. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system. *Handb Clin Neurol* 2014; 119: 577-84.
5. Boettger MK, Weber K, Gajda M, Bräuer R, Schaible HG. Spinally applied ketamine or morphine attenuate peripheral inflammation and hyperalgesia in acute and chronic phases of experimental arthritis. *Brain Behav Immun* 2010; 24(3): 474-85.
6. Coruzzi G, Adami M, Guaita E, de Esch IJ, Leurs R. Antiinflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 2007; 563(1-3): 240-4.
7. Kouček M, Takasusuki T, Terashima T, Yaksh TL, Xu Q. Effects of intrathecal SNC80, a delta receptor ligand, on nociceptive threshold and dorsal horn substance p release. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 347(2): 258-64.
8. Zhang Y, Chen Q, Yu LC. Morphine: a protective or destructive role in neurons? *Neuroscientist* 2008; 14(6): 561-70.
9. Whiteside GT, Boulet JM, Walker K. The role of central and peripheral mu opioid receptors in inflammatory pain and edema: a study using morphine and DiPOA ([8-(3,3-diphenyl-propyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-3-yl]-acetic acid). *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314(3): 1234-40.
10. Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(3): 191-200.
11. Spataro LE, Sloane EM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Schoeniger D, Jekich BM, et al. Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation. *J Pain* 2004; 5(7): 392-405.
12. Andreev YA, Vassilevski AA, Kozlov SA. Molecules to selectively target receptors for treatment of pain and neurogenic inflammation. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2012; 6(1): 35-45.
13. Connors BW. Tales of a dirty drug: carbenoxolone, gap junctions, and seizures. *Epilepsy Curr* 2012; 12(2): 66-8.
14. Sacerdote P, Bianchi M, Panerai AE. Involvement of beta-endorphin in the modulation of paw inflammatory edema in the rat. *Regul Pept* 1996; 63(2-3): 79-83.
15. Fecho K, Manning EL, Maixner W, Schmitt CP. Effects of carrageenan and morphine on acute inflammation and pain in Lewis and Fischer rats. *Brain Behav Immun* 2007; 21(1): 68-78.
16. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16(2): 109-10.
17. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17(6): 1031-6.
18. Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnani S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 43(1): 11-4.
19. Nakase T, Naus CC. Gap junctions and neurological disorders of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1662(1-2): 149-58.
20. Svensson CI, Brodin E. Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. *Mol Interv* 2010; 10(1): 25-38.
21. Qin M, Wang JJ, Cao R, Zhang H, Duan L, Gao B, et al. The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Neurosci Res* 2006; 55(4): 442-50.
22. Waldburger JM, Firestein GS. Regulation of peripheral inflammation by the central nervous system. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12(5): 370-8.

23. Spataro LE, Sloane EM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Schoeniger D, Jekich BM, et al. Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation. *J Pain* 2004; 5(7): 392-405.
24. Kielian T. Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J Neurochem* 2008; 106(3): 1000-16.
25. Brock SC, Tonussi CR. Intrathecally Injected Morphine Inhibits Inflammatory Paw Edema: The Involvement of Nitric Oxide and Cyclic-Guanosine Monophosphate. *Anesth Analg* 2008; 106(3): 965-71.
26. Chadzinska M, Hermsen T, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade BM. Cloning of opioid receptors in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their involvement in regulation of stress and immune response. *Brain Behav Immun* 2009; 23(2): 257-66.
27. Basbaum AI, Jessell TM. "The Perception of Pain," in: Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM; editors, *Principles of Neural Science*, 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Companies 2000; p: 473-91.
28. Pourpak Z, Ahmadiani A, Alebouyeh M. Involvement of interleukin-1beta in systemic morphine effects on paw oedema in a mouse model of acute inflammation. *Scand J Immunol* 2004; 59(3): 273-7.
29. Angst MS, Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology* 2006; 104(3): 570-87.
30. Bradesi S. Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22(5): 499-511.