مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۱۲، آذر ۱۳۹۵، صفحه ۷۰-۶۴

اثر کلرید مس بر درد و ادم التهابی پا در موش صحرایی

حانیه نیکبختی (MSc)[۱]، مسعود فریدونی (PhD)[۱*]، علی اسداللهی (PhD)[۱]

۱-گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دریافت: ۹۵/۴/۲۲، اصلاح: ۹۵/۵/۶، پذیرش: ۹۵/۷/۶

خلاصه

سابقه و هدف: یون مس بعنوان یک ریزمغذی ضروری در مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی درگیر بوده و بر سیستم عصبی مرکزی، درد و التهاب مؤثر است. باتوجه به اهمیت درد بر وضعیت روحی و جسمی بیمار، این مطالعه به‌منظور دستیابی به راهکاری جدید برای کاهش درد، به بررسی اثر کلریدمس بر درد حرارتی، شیمیایی و ادم التهابی طی تجویزهای محیطی و مرکزی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۷۷ موش‌صحرایی نر نژاد ویستار (۲۰۰-۲۵۰گرم) در ۱۱ گروه هفت‌تایی شامل گروه‌های کنترل (بدون تیمار)، شم۱ (سالین،i.p) و دریافت-کننده دوزهای ۵،۱۰،۲۰،۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کلریدمس (i.p)، شم۲ (سالین، Intrathecal (i.t)) و دریافت‌کننده غلظت‌های ۰/۰۰۲mg/۱۰µl و ۰/۰۲mg/۱۰µl کلریدمس (i.t)، گروه شم۳ دریافت‌کننده همزمان سالین و نالوکسان (i.p) و گروه دریافت‌کننده همزمان کلریدمس ۱۰mg/kg و نالوکسان ۲mg/kg (i.p) استفاده شد. درد حرارتی، شیمیایی و حجم ادم التهابی با آزمون‌های Tail flick، فرمالین و پلتیسمومتری بررسی گردید. از آزمون‌های ماز صلیبی مرتفع و روتارود جهت بررسی آثار جانبی کلریدمس استفاده شد.

یافته‌ها: دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کلریدمس (i.p) بترتیب باعث کاهش درد حرارتی (۱/۶۹±۰/۳۸ و ۱/۵۵±۰/۵۳)، (p<۰/۰۰۱) و درد شیمیایی (p<۰/۰۱) و حجم ادم التهابی پا (۷۰/۴۳±۲۰/۹۶ و ۷۰/۳۸±۲۹/۰۱)، (p<۰/۰۱) شدند اما دوز ۱۰۰mg/kg منجر به مرگ موش‌ها گردید. از طرفی نالوکسان اثر ضد دردی کلریدمس را محو کرد (۰/۰۱۵±۰/۰۵۵)، (p<۰/۰۰۱). تجویز نخاعی غلظت ۰/۰۰۲ mg/۱۰µl کلریدمس اثر قابل‌توجهی بر درد درد نداشت اما غلظت ۰/۰۲mg/۱۰µl کلریدمس درد شیمیایی را کاهش داد (p<۰/۰۱). کلریدمس بر تعادل و بروز اضطراب اثری نداشت.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه تجویز نالوکسان بعنوان آنتاگونیست گیرنده‌های اوپیوئیدی اثر ضد دردی کلرید مس را محو کرد، احتمالاً کلریدمس با افزایش حساسیت گیرنده‌های اپیوئیدی به اپیوئیدهای درون‌زاد، بی‌دردی را القاء می‌کند.

واژه‌های کلیدی: کلرید مس، درد حرارتی، درد شیمیایی، ادم التهابی.

مقدمه

درد یک درک حسی پیچیده است کنترل ناکافی درد اثرات نامطلوبی بر وضعیت فیزولوژیکی و روحی بیمار دارد (۱). یکی از بهترین راهکارها جهت تسکین حس درد استفاده از مواد طبیعی نظیر ریز مغذی ها است. یون مس یکی از ریز مغذی‌های ضروری بدن است و در واکنش ها و مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی درگیر است (۲). فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون پر اکسیداز وابسته یه یون مس می باشد. از طرفی یون مس در توسعه و حفظ سیستم ایمنی بدن اهمیت دارد و به عنوان کوفاکتور آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز عمل می کند و برای دفاع آنتی اکسیدانی و ریشه کنی رادیکالهای آزاد مهم است. مطالعات حاکی از آن است که یون مس دارای ویژگی های ضد التهابی و ضد دردی است. این یافته‌ها نشان داد که ترکیب یون مس با داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی خصوصیات درمانی این داروها را ارتقاء می بخشد (۳)، بطوریکه ترکیب یون مس با این داروها فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز را تقلید کرده و توانایی هضم رادیکالهای آزاد را افزایش می دهد (۴). همچنین نشان داده شده است که ترکیب یون مس با فنوپروفن و ایمیدازول اثر ضد دردی بیشتری روی درد التهابی و سرکوب درد احشایی دارد (۵). همچنین اثرات ضد درد احشایی و التهاب مفاصل با استفاده ترکیبات متنوع ترکیب شده با مس تقویت شده است (۶). در مطالعاتی استفاده از ابزارهای متالیک از قبیل دستبندهای مسی برای کاهش دردهای مفصلی پیشنهاد شده است. اعتقاد بر این است که مس از طریق پوست جذب شده و بر آنزیم های وابسته به مس اثر می گذارد و باعث کاهش درد های التهابی می‌شود (۷). در مطالعه ای دیگر ترکیب یون مس به همراه سالسیلات برای موش‌های مبتلا به آرتریت، اثرات ضد دردی را تقویت کرد که این اثرات ضد دردی می تواند مستقل از حضور التهاب و یا اثر ضد دردی ناشی از کاهش التهاب باشد (۸). همچنین شماری از مطالعات گوناگون از افزایش حساسیت گیرنده‌های اپیوئید در حضور یون مس حکایت دارد. با تجویز درون بطن مغزی یون مس به موش اثرات ضد دردی برگشت پذیر با نالوکسان مشاهده گردیده است . لذا احتمال می رود یون مس جایگاه اتصالی گیرنده اپیوئید را اشغال کرده باشد (۶). با

▣ این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد حانیه نیکبختی دانشجوی رشته فیزیولوژی جانوری دانشگاه فردوسی مشهد می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر مسعود فریدونی
آدرس: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی. تلفن: ۳۸۷۶۲۲۲۷-۰۵۱
E-mail: fereidoni@um.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.12.9.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.12.64]

توجه به اهمیت موضوع درد و تلاش های بشر در طول تاریخ برای یافتن راهی برای مقابله و تخفیف حس درد و همچنین با توجه به یافته‌های گوناگون حاکی از نقش یون مس در تقویت اثرات ضد دردی و ضد التهابی داروهای Nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDs drug)، این تحقیق به منظور بررسی اثر تجویز صفاقی و نخاعی کلریدمس در دوزهای مختلف بر میزان درد حرارتی، درد شیمیایی ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین و اِدِم التهابی القاء شده با فرمالین در پنجه پای موش صحرایی انجام شد. اثرات جانبی ناشی از تجویز کلرید مس بر اضطراب و تعادل حرکتی از آزمون ماز صلیبی مرتفع و روتارود نیز بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۷۷ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در حیوانخانه گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد تحت شرایط استاندارد با درجه حرارت ۲۱°C، رطوبت ۵۰٪، سیکل نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و امکان دسترسی آزاد به آب و غذا، نگهداری شدند. حیوانات در ۱۱ گروه هفت‌تایی شامل گروه کنترل (بدون تیمار)، شم ۱ (دریافت کننده سالین، i.p)، گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کلرید مس (i.p)، شم ۲ (سالین،i.t)، گروه‌های دریافت کننده غلظت‌های ۰/۰۰۲mg/۱۰µl و ۰/۰۲mg/۱۰µl کلرید مس (i.t)، شم ۳ (دریافت کننده سالین به همراه نالوکسان، i.p) و گروه دریافت کننده دوز ۱۰mg/kg کلرید مس به همراه دوز mg/kg ۲ نالوکسان (i.p) تقسیم بندی شدند. درد حرارتی، شیمیایی و حجم ادم التهابی پا توسط آزمون‌های Tail flick، فرمالین و پلتیسوموتری بررسی گردید. از آزمون‌های ماز صلیبی مرتفع و روتارود نیز جهت بررسی آثار جانبی کلرید مس استفاده شد. کلیه آزمایش‌ها روی حیوانات آزمایشگاهی با حفظ قوانین بین المللی اخلاق علمی و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت (۹). در این پژوهش از کلرید مس محصول شرکت Fluka، کشور نیوزلند استفاده گردید و تمامی دوزها به استناد تحقیق Okuyama و همکاران استخراج شدند (۶). در گروه های دریافت کننده کلرید مس به همراه نالوکسان ۲۰ دقیقه پس از تجویز صفاقی کلریدمس، دوز mg/kg ۲ نالوکسان بصورت صفاقی تجویز شد و سپس موش ها مورد ارزیابی درد و التهاب قرار گرفتند.

تجویز درون‌نخاعی (i.t): به منظور انجام جراحی و کانول گذاری در نخاع برای تجویزهای نخاعی، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۲۰mg/kg) بی‌هوش شدند سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت شد و با یک برش کوچک عضلات گردنی کنار زده شد سپس با ایجاد خراش کوچکی وسط غشای اطلس- اکسی پیتال مایع مغزی‌نخاعی خارج گشت سپس یک لوله پلی اتیلن ۱۰ (PE-10) به طول ۱۱ سانتیمتر به آرامی در فضای زیرعنکبوتیه به طرف قطعه کمری نخاع پیش برده شد بطوری که ۳ سانتی متر از آن خارج از ستون مهره به منظور تجویز تیمارها و ۸ سانتیمتر آن در فضای عنکبوتیه قرار گرفت. در هیچ یک از حیوانات نباید پس از کانول گذاری نقص حرکتی دیده می‌شد. یک هفته بعد از بهبودی حیوان، دارو بصورت داخل نخاعی و در حجم مورد نظر از طریق کانول تزریق شد (۱۰). به منظور تجویز نخاعی دوزهای mg/kg ۱۰ و mg/kg ۱۰۰ طی تجویز صفاقی، لازم بود که غلظت مورد نظر هر یک از دوزها معادل سازی شود لذا با توجه به اینکه ناحیه کمری نخاع موش صحرایی حدود ۰/۲ گرم وزن دارد و حجم مجاز برای تجویز در نخاع موش صحرایی ۱۰ میکرولیتر است غلظت معادل دوزهای مد نظر محاسبه گردید.

آزمون Tail flick: به منظور سنجش آستانه تحمل درد حرارتی از آزمون Tail flick استفاده شد. در این آزمون، یک محرک گرمایی شدید در حدود ۴۰ درجه سانتیگراد به یک سوم میانی دم حیوان اعمال شد و فاصله زمانی شروع تابش حرارت تا حرکت دادن دم توسط حیوان مورد ارزیابی قرارگرفت. آستانه درد حرارتی در حیوانات دریافت کننده تیمارها به صورت درون صفاقی ۳۰ دقیقه پس از تجویز و به صورت نخاعی ۵ دقیقه پس از تجویز تعیین شد (۱۱). میزان تغییر در آستانه درد حرارتی از محاسبه تفاوت میانگین زمان تأخیر قبل و بعد از تیمار به دست آمد.

آزمون فرمالین: برای بررسی قدرت اثرات ضد دردی مواد بر روی درد پایدارتر شیمیایی که در طی آن آسیب بافتی رخ می‌دهد از آزمون فرمالین استفاده گردید. اصولاً پاسخ به درد در این آزمون شامل دو مرحله است. در مرحله اول، حیوان مدت زمان کوتاهی درد می‌کشد و سپس برای چند دقیقه درد تسکین پیدا می‌کند و در مرحله دوم، حیوان با درد طولانی‌تری روبرو است. در این آزمون مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر فرمالین ۲/۵ درصد به‌صورت زیرجلدی به‌کف پای عقبی حیوان تزریق شد. آزمون فرمالین ۳۰ دقیقه پس از تجویزهای صفاقی و ۵ دقیقه پس از تجویزهای نخاعی انجام شد. سپس رفتار درد حیوان به مدت یک ساعت مورد ارزیابی قرارگرفت. به‌منظور کمی کردن شدت درد و مقایسه بهتر بین داده‌ها به رفتاری که حیوان در قبال درد ناشی از فرمالین نشان‌داد، امتیاز دهی شد به این صورت که صفر به زمانی که حیوان هیچ دردی نشان نمی‌داد، یک به زمانی که حیوان نوک پا را روی زمین می‌گذاشت، دو به زمانی که حیوان پا را در تمام مدت بالا نگه می‌داشت و سه به زمانی که حیوان پا را تکان می‌داد، گاز می‌گرفت یا لیس می‌زد، اختصاص داده شد (۱۱).

آزمون پلتیسوموتری: پلتیسوموتری عمومی‌ترین روش ارزیابی التهاب است که میزان حجم ادم التهابی پا را محاسبه می کند. در این آزمون میزان ۰/۰۵ میلی‌لیتر از محلول فرمالین ۲/۵ درصد به کف پای حیوان تزریق و حجم پا قبل و یک ساعت پس از تزریق فرمالین تعیین شد. به این گونه که پای حیوان در منطقه مچ پا علامت گذاری گردید و تا منطقه علامت گذاری شده درون مایع قرار گرفت. در نهایت میزان ادم التهابی از رابطه $V_t - V_0$ (V_0حجم اولیه پا و V_tحجم پا یک ساعت بعد از تزریق فرمالین) مشخص شد [V=W/P (V حجم پا، W وزن مایع و P وزن مخصوص مایع)] (۱۲).

آزمون ماز صلیبی مرتفع و آزمون میله چرخان: از آزمون ماز صلیبی مرتفع بمنظور بررسی اضطراب استفاده شد. برای انجام این آزمون هر موش در مرکز ماز صلیبی مرتفع قرار گرفت. در مدت ۵ دقیقه تعداد ورود به بازوی باز و بسته و مدت زمان استقرار در هر بازو ثبت شد. در این آزمون مدت زمان بیشتر حضور موش در بازوهای بسته ماز نشان از اضطراب حیوان است (۱۳). از آزمون میله چرخان شتابدار به منظور بررسی قدرت حفظ تعادل حرکتی استفاده شد. در زیر هر میله پدالی قرار داشت که با سقوط حیوان بر روی آن تایمر دستگاه قطع گردید و سرعت و مدت زمانی که حیوان توانسته تعادل خود را روی میله چرخان حفظ کند ثبت شد (۱۴). در نهایت داده‌ها به‌صورت mean±SEM ارائه شدند و تجزیه و تحلیل آماری به کمک نرم افزار GraphPad Prism 5 انجام شد. در آزمونهای Tail flick، پلتیسوموتری، ماز صلیبی مرتفع و میله چرخان،

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.12.9.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.12.64]

آزمون‌های آماری شامل تجزیه و تحلیل یک طرفه ANOVA برای بررسی اثر بخشی تیمار و آزمون متعاقب تی (Newman-Keuls) برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

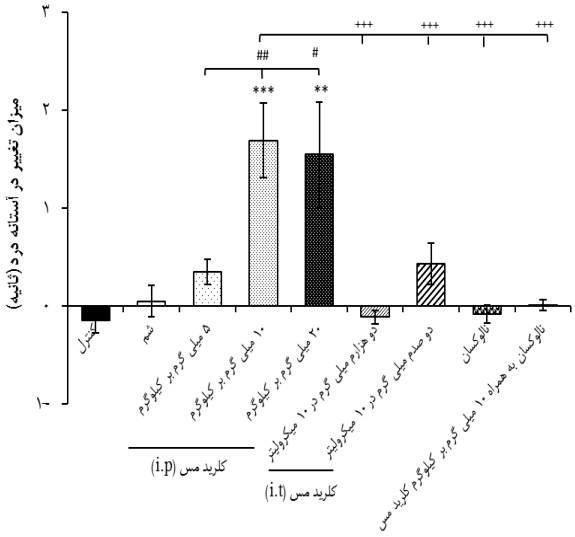
به منظور تجزیه و تحلیل داده ها در آزمون فرمالین در هر تیمار بصورت جداگانه آزمون آماریRepeated measure ANOVA به منظور بررسی اثر زمان در ایجاد تغییرات درد صورت گرفت و پس از مشخص شدن تأثیر زمان، برای بررسی اثر تیمارها در هر زمان شامل ۵، ۱۰ و ... دقیقه پس از تجویز فرمالین آزمون ANOVA یک طرفه و در صورت معنی داری آزمون تی متعاقب Newman-Keuls انجام گرفت و $p<0.05$ معنی دار در گرفته شد.

یافته ها

با توجه به اینکه در آزمون های مختلف این تحقیق تفاوت معنی داری بین گروه شم ۱، ۲ و ۳ و گروه کنترل مشاهده نگردید لذا در نمودارها فقط گروه شم ۱ برای مقایسه با سایر تیمارها استفاده گردید. نتایج حاصل از آزمون Tail flick نشان داد که تجویز داخل صفاقی کلریدمس در دوزهای ۵، ۱۰ و۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت وابسته به‌دوز منجر به افزایش آستانه درد حرارتی و بروز بی‌دردی گردید. مقایسه مؤثرترین دوز کلریدمس در تجویز صفاقی (۱۰mg/kg) و غلظت معادل آن ۰/۰۰۲mg/۱۰µl و غلظت معادل دوز ۱۰۰mg/kg (۰/۰۲mg/۱۰µl) در تجویز نخاعی کلریدمس نشان داد، تجویز نخاعی کلرید مس اثر افزایش دهنده بر آستانه درد و کاهش میزان درد را ندارد و تجویز نخاعی کلرید مس منجر به تغییر معنی داری در آستانه درد حرارتی نسبت به گروه کنترل نشد. همچنین به منظور بررسی ارتباط احتمالی میان بی‌دردی حرارتی ناشی از تجویز درون صفاقی کلریدمس با سیستم اپیوئیدی از مؤثرترین دوز تجویز درون صفاقی کلریدمس (۱۰mg/kg) به همراه آنتاگونیست سیستم اپیوئیدی (نالوکسان ۲ mg/kg) استفاده شد. نتایج نشان داد اثرات کلریدمس بر کاهش آستانه درد حرارتی و بروز بی دردی توسط نالوکسان محو گردید(نمودار ۱). در آزمون فرمالین تجویز درون صفاقی کلریدمس در دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت معنی داری باعث کاهش احساس درد شیمیایی در مقایسه با گروه کنترل شد.

درحالیکه تجویز درون‌صفاقی دوز ۵ mg/kg کلریدمس در مقایسه با گروه کنترل تغییر قابل توجهی ایجاد نکرد (نمودار ۲–الف). مقایسه بین بهترین دوز تجویز درون‌صفاقی کلریدمس (۱۰mg/kg) و غلظت معادل آن ۰/۰۰۲ mg/۱۰µl و غلظت معادل دوز ۱۰۰mg/kg (۰/۰۲mg/۱۰µl) طی تجویز مرکزی (نخاعی) نشان داد تجویز نخاعی غلظت ۰/۰۰۲mg/۱۰µl اثر معنی داری روی شدت درد شیمیایی نداشت درحالیکه تجویز نخاعی غلظت ۰/۰۲mg/۱۰µl تا حدی بر کاهش احساس درد شیمیایی مؤثر بود (نمودار ۲–ب).

بنابراین احتمال دارد مکانیسم‌های محیطی بیشتر در اثرات بی درد کنندگی کلریدمس درگیر باشند. از مؤثرترین دوز کلریدمس در تجویز صفاقی (۱۰mg/kg) و نالوکسان۲mg/kg استفاده شد تا ارتباط بی دردی ناشی از کلریدمس با سیستم اپیوئیدی بررسی گردد. بین گروه‌های شم، نالوکسان ۲mg/kg و کلریدمس (۱۰mg/kg) بهمراه نالوکسان تفاوت معنی داری وجود نداشت در حالیکه تجویز صفاقی کلریدمس ۱۰mg/kg به تنهایی به طور معنی داری باعث بروز بی دردی گردید (نمودار ۲–ج).



نمودار ۱. نتایج آزمون Tail flick اثر تجویز درون صفاقی و نخاعی کلریدمس در گروه های مختلف مورد آزمایش بر میزان آستانه درد حرارتی

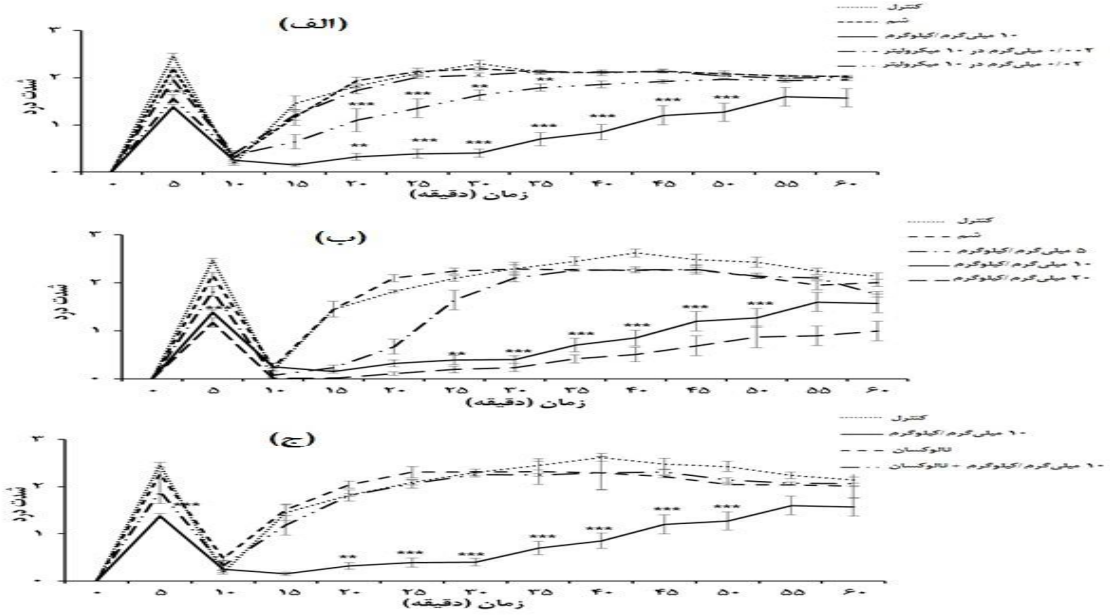
(**p<۰/۰۱ و ***p<۰/۰۰۱در مقایسه با گروه کنترل، #p<۰/۰۵ و ##p<۰/۰۱ در مقایسه با گروه دریافت کننده دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم کلرید مس و +++p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه دریافت کننده دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم کلرید مس). داده ها به صورت mean±SEM نشان داده شده اند (n=۷).

از طرفی نتایج حاصل از آزمون پلتیسموتری حاکی از آن بود که تجویز داخل صفاقی کلریدمس در دوزهایmg/kg ۱۰ و ۲۰ به صورت معنی داری سبب کاهش ادم التهابی ناشی از تزریق کف پایی فرمالین در مقایسه با گروه کنترل گردید اما دوز mg/kg ۵ نتوانست حجم ادم التهابی را بصورت معنی‌داری بکاهد. برای بررسی اثرات محیطی و مرکزی تجویز کلریدمس، آزمون پلتیسموتری بین بهترین دوز کلریدمس در تجویز صفاقی (۱۰mg/kg) و غلظت معادل آن ۱۰µl /mg ۰/۰۰۲ و همچنین غلظت معادل دوز کشنده کلرید مس (۱۰۰mg/kg)، ۰/۰۲ /mg۱۰µl در تجویز داخل نخاعی انجام گرفت و نتایج نشان داد که تجویز داخل نخاعی غلظت های متفاوت کلرید مس برخلاف تجویز داخل صفاقی بهترین دوز آن اثر معنی داری بر حجم ادم التهابی ندارد. همچنین به منظور بررسی مکانیسم اثر کلریدمس بر ادم التهابی، از دوز مؤثر کلریدمس (۱۰mg/kg) به همراه آنتاگونیست اپیوئیدی (نالوکسانmg/kg ۲) در تجویز صفاقی استفاده شد.

نتایج نشان داد که تجویز نالوکسان به تنهایی و بهمراه مؤثرترین دوز کلرور مس تغییر معنی داری در حجم ادم التهابی پا ایجاد نکرد در حالی که تجویز درون‌صفاقی کلریدمس ۱۰mg/kg به تنهایی منجر به کاهش میزان ادم التهابی در کف پای حیوان گردید (نمودار ۳). به منظور بررسی اثرات جانبی مضر ناشی از تجویز کلرور مس آزمون ماز صلیبی مرتفع و آزمون میله چرخان انجام گرفت. نتایج حاصل از آزمون ماز صلیبی مرتفع نشان داد که تجویز درون‌صفاقی

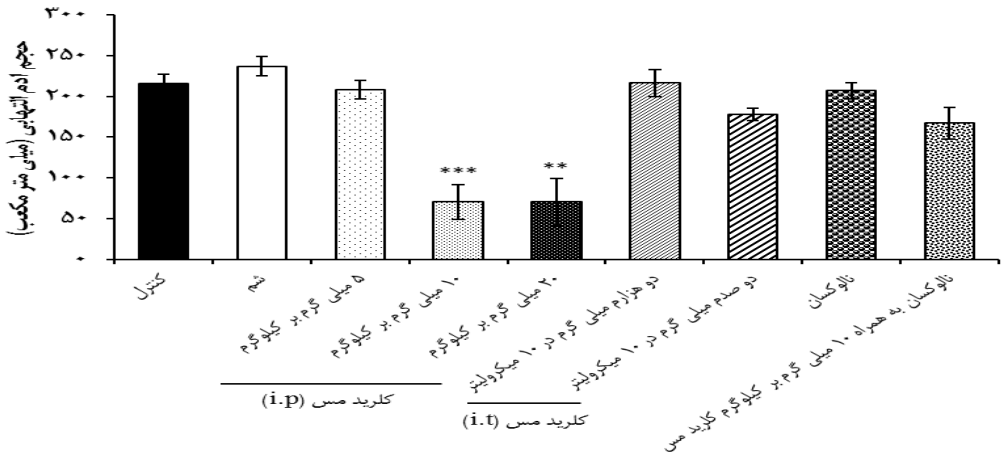
[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.12.9.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.12.64]

مؤثرترین دوز کلرید مس (۱۰mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منجر به بروز اضطراب و اختلال حرکتی در جانور نگردید (نمودار ۴).



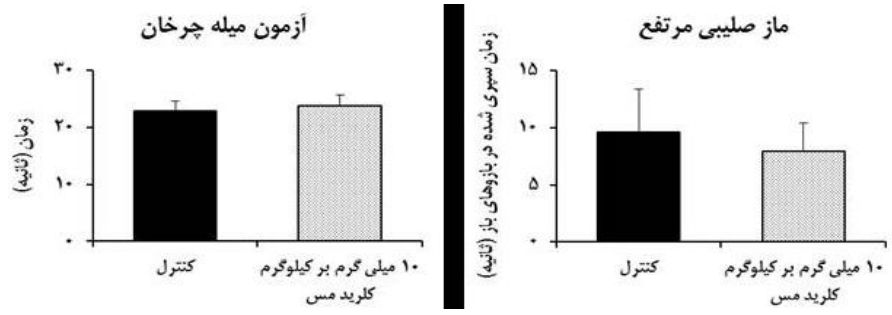
نمودار ۲. نتایج آزمون فرمالین، اثر تجویز درون صفاقی و نخاعی کلریدمس در گروه های مختلف مورد آزمایش بر میزان شدت درد شیمیایی

(الف) تجویز صفاقی دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم کلرید مس منجر به کاهش درد شیمیایی شد (ب) در حالیکه فقط تجویز نخاعی غلظت دوز معادل ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کلرید مس سبب کاهش نسبی درد شیمیایی گردید. ج) از طرفی تجویز نالوکسان به همراه مؤثرترین دوز کلرید مس سبب محو شدن اثرات ضد دردی کلرید مس شد. (**p<۰/۰۱ و***p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل). داده ها به صورت mean±SEM نشان داده شده اند. (n=۷).



نمودار ۳. نتایج آزمون پلتیسموتری. اثر تجویز درون صفاقی و نخاعی کلریدمس در گروه های مختلف مورد آزمایش بر میزان حجم ادم التهابی پا.

(**p<۰/۰۱ و ***p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل). داده ها به صورت mean±SEM نشان داده شده اند (n=۷).



نمودار ۴. نتایج آزمون ماز صلیبی مرتفع و میله چرخان. مقایسه بررسی اضطراب در ماز صلیبی مرتفع و تعادل حرکتی در آزمون میله چرخان در گروه کنترل و تجویز صفاقی مؤثرترین دوز کلرور مس تفاوت معنی داری را نشان نداد. داده ها به صورت mean±SEM نشان داده شده اند (n=۷).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.12.9.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.12.64]

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تجویز صفاقی کلرید مس به ویژه در دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش آستانه درد حرارتی، کاهش حس درد شیمیایی و میزان حجم ادم التهابی شد، این اثرات با تجویز همزمان نالوکسان و مؤثرترین دوز کلرید مس محو گردید. تجویز صفاقی دوز ۱۰۰mg/kg کلرید مس منجر به مرگ حیوانات ناشی از مسمومیت یون مس شد. مسمومیت محیطی ناشی از یون مس با تولید رادیکال آزاد درون سلول‌ها و تغییر غشای سلولی به وسیله فرآیندهای پراکسیداسیون لیپیدی و تغییر شکل پروتئین‌ها نهایتاً باعث مرگ سلول می‌شود (۱۵). تجویز نخاعی غلظت معادل مؤثرترین دوز کلرید مس ۰/۰۰۲ /mg۱۰µl اثر معنی داری را بر کاهش درد حرارتی، شیمیایی و میزان حجم ادم التهابی نشان نداد، اما تجویز نخاعی غلظت معادل دوز کشنده کلرید مس ۰/۰۲/mg۱۰µl، علی رغم بروز علائم مسمومیت طی تجویز صفاقی، کاهش معنی داری در شدت درد شیمیایی ایجاد کرد. احتمالاً اثرات کلریدمس در سطح نخاع روی گیرنده‌های اپیوئیدی وابسته به غلظت می‌باشد، اگرچه محدوده غلظتی استفاده شده سمی است و برای کاربردهای درمانی توصیه نمی‌شود. با توجه به تحقیقات پیشین مشخص شده‌است که حساسیت گیرنده‌های اپیوئیدی در حضور یون مس افزایش یافته و تجویز درون بطن مغزی یون کوپریک (Cu^{2+}) باعث ایجاد اثرات ضد دردی برگشت پذیر با نالوکسان گردید (۶، ۱۶). همچنین تجویز صفاقی سولفات مس باعث تقویت اثرات ضد دردی مورفین شد، سولفات مس به تنهایی نیز قادر است آستانه درد مکانیکی را افزایش دهد (۱۷).

همچنین مطالعات نشان داد تیمار با یک تیول احیاء مانند Dithiothreitol اثرات ضد دردی یون مس را محو کرد لذا احتمالاً یون مس با مکانیسم های اکسید–احیا گیرنده های اپیوئیدی را به اپیوئیدهای درونی حساس‌تر کرده و باعث بروز بی‌دردی می‌شود (۱۶). بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق و تأیید برگشت پذیر بودن اثرات ضد دردی یون مس به وسیله نالوکسان، می‌توان احتمال داد که یون مس باعث افزایش حساسیت گیرنده‌های اپیوئیدی به اپیوئیدهای درون‌زاد در مغز و یا در محیط و یا به طور توأم می شود اما تأثیری بر مسیر نورونهای درد نخاعی ندارد و به این ترتیب باعث تقویت اثرات ضد دردی سیستم اپیوئیدی درون‌زاد در خود مغز و محیط شده و اثرات ضد دردی از خود بروز می دهد. در مطالعات پیشین مشخص شده است که ترکیب یون مس با داروهای NSAIDs باعث تقویت اثر ضد دردی و ضد التهابی این داروها می شود (۳). بطوریکه ترکیب یون مس با فنوپروفن قادر است بطور قابل توجهی حجم ادم التهابی القاء شده با کارجنین در پنجه پای موش صحرایی را در مقایسه با فنوپروفن کاهش دهد (۴). در این پژوهش نیز اثرات ضد التهابی یون مس محرز گردید. همچنین یافته ها حاکی از آنند که در طول آسیب محیطی به بافت، سلول‌های درگیر در سیستم ایمنی اینترلوکین و پروستاگلاندین ترشح می‌کنند (۱۸). در حالیکه یون مس باعث مهار پروستاگلاندین E2 می‌شود. همچنین یون مس با مهار کانال کلسیمی بطور قابل ملاحظه‌ای باز پخش درون سلولی کلسیم را مهار کرده و در رهایی هیستامین اختلال ایجاد می‌کند و این رویدادها به طور مستقیم با عمل ضدالتهابی این کاتیون مرتبط است (۱۹). از آنجا که بخش اعظم احساس درد در مرحله دوم آزمون فرمالین مربوط به وقایع التهابی محیطی می‌باشد (۲۰)، می توان احتمال داد تجویز کلریدمس به نحو مؤثری از طریق مکانیسم های ذکر شده بروز درد شیمیایی در این مرحله را کاهش داده است. از طرفی مطالعات پیشین نشان می دهند که پیش تیمار با اپیوئیدها باعث مهار فعالیت گرایش شیمیایی مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها و مهار فرآیندهای التهابی متعاقب آن می‌شود (۲۱). همچنین تجویز مورفین به طور مؤثری مهاجرت سلول های میکروگلیال را به‌طور وابسته به دوز مهار می‌کند (۲۱)، بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که یون مس احتمالاً با افزایش حساسیت گیرنده‌های اپیوئیدی به اپیوئیدهای درونی فرآیندهای التهابی را کم و ادم التهابی القاء شده با فرمالین کاهش می‌دهد. در مجموع یافته‌های این مطالعه نشان داد با توجه به اینکه تجویز نالوکسان بعنوان آنتاگونیست گیرنده های اپیوییدی، اثر ضد دردی کلرید مس را محو کرد، احتمالاً کلرور مس از طریق افزایش حساسیت گیرنده‌های اپیوئیدی عمدتاً در سطح محیط و کمتر در سطح مرکزی، باعث بروز کاهش احساس درد حرارتی، شیمیایی و میزان ادم التهابی می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد جهت حمایت از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.12.9.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.12.64]

The Effect of Copper Chloride (CuCl2) on Pain and Inflammatory Paw Edema in Rats

H. Nikbakhty (MSc)[1], M. Fereidoni (PhD)*[1], A. Asadollahi (PhD)[1]

1.Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(12); Dec 2016; PP: 64-70
Received: Jul 12th 2016, Revised: Jul 27th 2016, Accepted: Sep 27th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: As a crucial micronutrient, copper ion is engaged in various biochemical pathways and affects central nervous system, pain, and inflammation. Considering the significance of pain in physical and mental condition of patients, the present study aims to find new ways to reduce pain by investigating the effect of copper chloride on thermal and chemical pain and inflammatory edema through central and peripheral administrations.

METHODS: In this empirical study, 77 male Wister rats (200–250g) were divided into 11 groups (n=7) including control group (with no treatment), sham 1 (saline, i.p) receiving 5, 10, 20 and 100 mg/kg $CuCl_2$ intraperitoneally (i.p), sham 2 (saline, intrathecal (i.t)) receiving 0.002mg/10µl and 0.02mg/10µl $CuCl_2$ intrathecally (i.t), sham 3 group receiving saline plus naloxone intraperitoneally (i.p) and the group receiving 10 mg/kg $CuCl_2$ plus 2 mg/kg naloxone intraperitoneally (i.p). Thermal and chemical pain and the volume of inflammatory edema were assessed using tail flick, formalin and plethysmometery tests, respectively. Elevated plus maze and rotarod tests were used to examine the side effects of $CuCl_2$.

FINDINGS: 10 and 20 mg/kg $CuCl_2$ (i.p) respectively reduced thermal pain (1.69±0.38 and 1.55±0.53) ($p<0.001$) and chemical pain ($p<0.01$) and reduced inflammatory paw edema (70.43±20.96 and 70.38±29.01) ($p<0.01$). However, rats receiving 100 mg/kg $CuCl_2$ did not survive. On the other hand, naloxone abolished the analgesic effect of CuCl2 (0.015±0.055) ($p<0.001$). Intrathecal administration of 0.002mg/10µl $CuCl_2$ had no significant effect on pain but 0.02 mg/1 0 µl $CuCl_2$ reduced chemical pain ($p<0.01$). $CuCl_2$ had no effect on balance and anxiety.

CONCLUSION: Since administration of naloxone as opioid receptor antagonist abolished the analgesic effect of $CuCl_2$, $CuCl_2$ may induce analgesia by increasing the sensitivity of opioid receptors to endogenous opioids.

KEY WORDS: *$CuCl_2$, Thermal pain, Chemical pain, Inflammatory edema*.

Please cite this article as follows:

Nikbakhty H, Fereidoni M, Asadollahi A. The Effect of Copper Chloride (CuCl2) on Pain and Inflammatory Paw Edema in Rats. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(12): 64-70.

***Corresponding author: M. Fereidoni (PhD)**
Address: Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R.Iran
Tel: +98 51 38762227
E-mail: fereidoni@um.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.12.9.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.12.64]

References

1.Kamali A, Shokrpour M, Vatanpour K. Comparison of effect of additive midazolam with neostigmine to lidocaine 5% in post operation pain in colporrhaphy surgery in spinal anesthesia. Arak Univ Med Sci J. 2012;15(5):35-41.
2.Mathie A, Sutton GL, Clarke CE, Veale EL. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. Pharmacol Ther. 2006;111(3):567-83.
3.Agotegaray MA, Boeris MA, Quinzani OV. Significant anti-inflammatory properties of a copper(II) fenoprofenate complex compared with its parent drug: Physical and chemical characterization of the complex. J Braz Chem Soc. 2010;21(12):2294-301.
4.Agotegaray MA, Boeris MA, Diez AS, Prat MR, Quinzani OV. Dinuclear copper(II) complexes of Fenoprofen: synthesis, spectroscopic, thermal, and SOD-mimic activity studies. J Coord Chem. 2011;64(13):2246-61.
5.Agotegaray M, Gumilar F, Boeris M, Toso R, Minetti A. Enhanced analgesic properties and reduced ulcerogenic effect of a mononuclear copper(II) complex with fenoprofen in comparison to the parent drug: promising insights in the treatment of chronic inflammatory diseases. Biomed Res Int. 2014;2014: 505987.
6.Okuyama S, Hashimoto S, Aihara H, Willingham WM, Sorenson JR. Copper complexes of non-steroidal antiinflammatory agents: analgesic activity and possible opioid receptor activation. Agents Actions. 1987; 21(1-2):130-44.
7.Singer A, Lokugamage DA, Sharma DY, Pathberiya MD. The Impact of Copper Inserts in Relieving Joint Pain. Orthotics-online, 12 New Cavendish Street, London, W1G 8UN Available from: https://www.theoriginalcopperheeler.com/Singer/Prof_Singer_paper_The_Impact_of_Copper_Inserts.pdf
8.Jacka T, Bernard CC, Singer G. Copper salicylate as an anti-inflammatory and analgesic agent in arthritic rats. Life Sci. 1983;32(9):1023-30.
9.Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain. 1983; 16(2): 109-10.
10.Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. Physiol Behav. 1976;17(6):1031-6.
11.Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. Curr Protoc Neurosci. 2007; Chapter 8: Unit 8-9.
12.Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnanian S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. J Pharmacol Toxicol Methods. 2000;43(1):11-4.
13.Tatarczynska E, Klodzinska A, Chojnacka-Wojcik E, Palucha A, Gasparini F, Kuhn R, et al. Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. Br J Pharmacol. 2001;132(7):1423-30.
14.Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. J Vis Exp. 2013;29(75): 2609.
15.Sinkovic A, Strdin A, Svensek F. Severe acute copper sulphate poisoning: a case report. Arh Hig Rada Toksikol. 2008;59(1):31-5.
16.Marzullo G, Hine B. Opiate receptor function may be modulated through an oxidation-reduction mechanism. Science. 1980; 208(4448): 1171-3.
17.Iwata H, Watanabe K, Matsui Y. Change of copper concentration in the central nervous system after morphine treatment and effect of copper on morphine analgesia in rats. Pharmacol Res Com. 1971;3(2):147-53.
18.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.
19.Ferrer X, Moreno JJ. Effects of copper, iron and zinc on oedema formation induced by phospholipase A2. Comp Biochem Physiol C. 1992; 102(2): 325-7.
20.Tjølsen A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Pain. 1992; 51(1): 5-17.
21.McCarthy L, Wetzel M, Sliker JK, Eisenstein TK, Rogers TJ. Opioids, opioid receptors, and the immune response. Drug Alcohol Depend. 2001;62(2):111-23.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.12.9.5]
[DOI: 10.22088/jbums.18.12.64]