

نقش کانالهای پتاسیمی (BK) در بی دردی حاصله از گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک

عیسی هوشمند (MSc)^۱، مهرداد جهانشاهی (PhD)^۲، قاسم عطارزاده یزدی (PhD)^{۳*}

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان
۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان
۳- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان

دریافت: ۹۴/۲/۷، اصلاح: ۹۴/۴/۱۶، پذیرش: ۹۴/۷/۶

خلاصه

سابقه و هدف: میلیونها نفر در جهان از درد رنج می برند و سالانه میلیونها دلار برای آن هزینه می شود. داروهای ضددرد مانند آگونیستهای گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک با عوارض کمتر می توانند در کاهش درد و هزینه موثر باشند. بر اساس مطالعات، کانالهای پتاسیمی نقش مهمی در مکانیسم ضددردی این گیرنده ها بازی می کنند. این مطالعه به منظور بررسی نقش کانالهای پتاسیمی BK در بیدردی حاصله از آگونیستهای گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۵۶ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم در ۷ گروه ۸ تایی انجام شد. کلونیدین ۰/۷ mg/kg IP و یوهیمین ۱ mg/kg IP و ۵۰۰ mg/kg بصورت ICV استفاده شد. ایبروتوکسین با دوز ۱۰۰ nm بصورت ICV تزریق گردید. نرمال سالین و DMSO بعنوان حلال استفاده شد. برای سنجش درد از آزمون فرمالین با غلظت فرمالین ۲٪ استفاده گردید.

یافته ها: تزریق داخل صفاقی کلونیدین با ۰/۷ mg/kg درد مزمن ناشی از تزریق فرمالین را کاهش داد که تزریق مرکزی (۵۰۰ mg/kg) و داخل صفاقی (۱ mg/kg) یوهیمین بترتیب با نمره درد مزمن ۲/۳۹±۰/۱۳ و ۲/۰۹±۰/۰۷ اثرات ضد دردی کلونیدین با نمره درد مزمن ۱/۵۵±۰/۱۴ را بطور معنی داری مهار نمود ($p < 0.001$). همچنین ایبروتوکسین با دوز ۱۰۰ nm بصورت ICV با نمره درد مزمن ۲/۳۳±۰/۱۶ باعث مهار اثرات ضد دردی کلونیدین شد.

نتیجه گیری: آگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک باعث بی دردی در حیوانات شده و آنتاگونیست این گیرنده اثرات بی دردی آگونیست این گیرنده ها را مهار می کند. مهار کانال های BK مانع از بروز اثرات بی دردی ناشی از آگونیست این گیرنده می گردد.

واژه های کلیدی: گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک، آزمون فرمالین، درد، کانال پتاسیمی BK.

مقدمه

(۱۰-۸). کانالهای پتاسیمی نقش مهمی در مکانیسم ضد دردی آگونیستهای گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک ایفا می کنند (۱۱). یکی از مهمترین این کانالها، کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم (KCa) است که بر اساس میزان هدایت کانال به سه خانواده مختلف کانالهای وابسته به کلسیم با هدایت زیاد (BK)، متوسط (IK) و کم (SK) طبقه بندی می شوند (۱۲). نتایج مطالعات نشان داد که کانالهای پتاسیمی BK با درد ارتباط دارند (۱۳-۱۵). همچنین گزارش شده که بلوک نمودن این نوع کانالها در سطح نخاع می تواند باعث درد نوروپاتیک در راتها شود (۱۶). از سوی دیگر در مطالعه ای گزارش شده که فعال سازی کانالهای پتاسیمی ممکن است اثرات ضد دردی کلونیدین را افزایش دهد (۱۷). باز شدن کانالهای پتاسیمی باعث خروج پتاسیم و در نتیجه هایپرپلاریزه شدن غشاء سلول می شود که این عمل توسط گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک بر روی کانالهای پتاسیمی نیز صورت می گیرد (۱۸ و ۱۹). شناخت نقش کانالهای پتاسیمی در درد می تواند پنجره جدیدی رو به درمان درد باز کند. لذا در مطالعه حاضر، نقش

گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک جزء خانواده بزرگ گیرنده های آدرنژیک هستند که با اتصال به G پروتئینهای مهاری (Gi) اعمال خود را انجام می دهند. گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک دارای سه زیر مجموعه شامل α_{2A} ، α_{2B} و α_{2C} هستند (۱). زیر مجموعه های گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک بطور وسیع هم در سیستم عصبی مرکزی و هم در محیط توزیع شده است (۲-۴). آگونیستهای گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک بطور کلی در درمان فشار خون بالا مورد استفاده قرار می گیرند ولی بطور گسترده در گلوکوم، کاهش عوارض محرومیت از مورفین و در بیهوشی عمومی و مراقبتهای ویژه کاربرد دارند (۵ و ۶). آگونیستهای این گیرنده باعث بلوک فیبرهای عصبی بویژه نوع C می شوند و همچنین از طریق گیرنده های ایپیویدی و آدنوزینی باعث اثرات ضددردی می شوند (۷). گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک با تحریک Gi یا کاهش دادن سطوح CAMP داخل سلول روی هدایت یونی تاثیر می گذارند (۶ و ۷). مطالعات مختلف گزارش نموده اند که کلونیدین، آگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک، می تواند درد را کاهش دهد

این مقاله حاصل پایان نامه عیسی هوشمند دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر قاسم عطارزاده یزدی

ادرس: بندرعباس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی. تلفن: ۰۷۶۱-۶۶۶۸۱۷۲

E-mail: gattarzadeh@yahoo.com

پیچها محکم گردید. پس از جراحی رت‌ها در قفسهای مجزا قرار داده شدند و ۷ روز جهت بهبودی حیوان در نظر گرفته شد. تزریق ICV با سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری انجام شد. در این مطالعه از آزمون فرمالین جهت ایجاد درد مزمن در همه گروه‌های مورد مطالعه استفاده گردید. آزمون فرمالین یک روش با ارزش و مدلی مناسب برای ارزیابی و سنجش درد مداوم و پایدار ناشی از محرک شیمیایی است (۲۳). آزمون فرمالین را می‌توان به دو فاز تقسیم کرد که هر فاز نوع متفاوتی از درد را نشان می‌دهد.

فاز اول بعنوان مرحله درد حاد، بلافاصله بعد از زمان تزریق دارو از دقیقه ۰ تا دقیقه ۷ است که از تحریک گیرنده‌های محیطی و تخریب بافتی ناشی می‌شود و درد شدیدی که ایجاد می‌کند ناشی از فعال شدن فیبرهای عصبی نوع C نسبت به تحریکات محیطی است. از دقیقه ۸ تا ۱۴ مرحله اینترفاز است که رفتارهای درد در این مرحله کاهش یافته یا از بین می‌رود و از دقیقه ۱۵ تا ۶۰ فاز دوم یا تأخیری است. در این فاز درد ملایمی وجود دارد که معرف درد مزمن است و از تحریک اعصاب محیطی و افزایش حساسیت نورونهای مرکزی و همچنین به علت تغییرات عملکردی و بافتی در شاخ خلفی نخاع ایجاد می‌شود (۲۳). برای انجام این آزمون، فرمالین با حجم $50 \mu\text{l}$ و با غلظت ۲٪ به صورت زیر جلدی بوسیله سرسوزن شماره ۳۱ به کف پای جلویی سمت چپ رت تزریق شد. بلافاصله بعد از تزریق، رت در اتاق فرمالین (محفظه پلاستیکی روشن با ابعاد $40 \times 40 \times 40$ سانتی متر) قرار گرفت.

برای مشاهده بهتر پنجه پای رت‌ها آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه در کف محفظه گذاشته شد. رفتارهای خاص مرتبط با درد از دقیقه ۰ تا دقیقه ۶۰ مورد ارزیابی قرار گرفت و هر پانزده ثانیه به حیوان نمره داده شده و ثبت گردید. حیوان در حالت طبیعی پای خود را بر روی زمین قرار می‌دهد اما زمانیکه تزریق فرمالین انجام می‌گیرد بلافاصله بعد از تزریق درد را از خود نشان می‌دهد، بدین صورت که اگر حیوان پای خود را بطور کامل روی زمین قرار دهد نمره ۰ داده می‌شود و اگر حیوان پایش را بلند کند ولی پنجه کاملاً از سطح کف جدا نشود و اندکی تماس داشته باشد نمره ۱ دریافت می‌کند. اگر حیوان کاملاً پای خود را از کف جدا کند نمره ۲ و در صورتیکه پایش را کاملاً بلند کرده و شروع به لیسیدن و گاز گرفتن ناحیه تزریق بکند نمره ۳ داده می‌شود. در ادامه از هر یک دقیقه و در نهایت از هر سه دقیقه میانگین گرفته شد. تمام نمره‌دهی‌ها توسط یک نفر انجام گردید (۲۴). آزمون فرمالین روزانه در محدوده زمانی ۹ صبح تا ۱۲ ظهر انجام گردید. برای گروههای اول، دوم و سوم طی دو هفته و برای گروههای چهارم و پنجم و همچنین گروههای ششم و هفتم با تنظیم زمان جراحی و دوره بهبودی هر دو گروه طی یک هفته آزمون فرمالین گرفته شد. انتخاب هفته‌ها بر اساس بهبودی موش‌ها پس از کانول گذاری با دستگاه استرئوتاکس بود. این مطالعه بر روی فاز دوم درد (درد مزمن) متمرکز شده و بر اساس این، میانگینهای سه دقیقه‌ای از دقیقه ۱۵ تا دقیقه ۶۰ در گروههای مختلف با یکدیگر مقایسه گردید. ۲ ساعت بعد از اتمام آزمایشات، حیوانات توسط بیهوشی عمیق با کلروفورم کشته شدند. از طریق کانول راهنما رنگ متیلن بلو 1% ($50 \mu\text{l}$) تزریق شده و مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده و در محلول پارافرمالددید ۴٪ قرار گرفت. بعد از یک هفته محل ورود کانول به بطن جانبی سمت راست مغز بوسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. در صورت صحیح نبودن محل کانول، حیوان از مطالعه خارج گردید (۲۴). در نهایت داده‌ها در نرم افزار Graph-pad

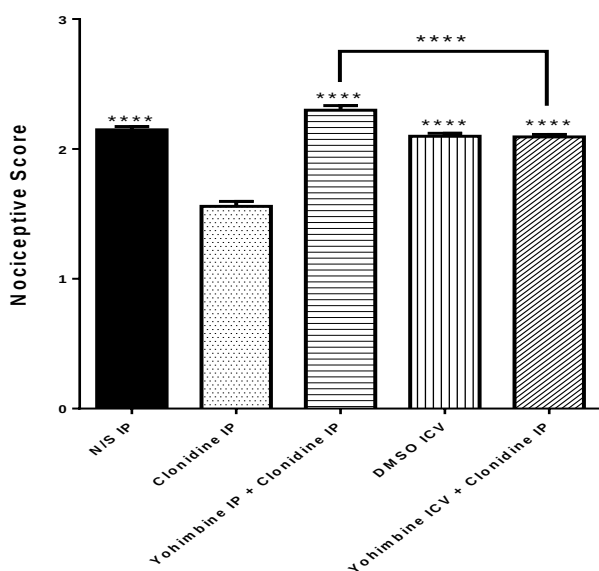
کانالهای پتاسیمی BK در بی‌دردی حاصله از آگونیستهای گیرنده‌های آلفا-۲ آدرنرژیک با استفاده از آزمون فرمالین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی بر روی ۵۶ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی $250-300$ گرم که از انستیتو پاستور واحد شمال خریداری شد، انجام گردید. حیوانات در قفسهای جداگانه در محدوده دمایی $22-24$ درجه سانتیگراد و در سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با دسترسی کامل به غذا و آب و حداقل استرس نگهداری شدند. رعایت ملاحظات اخلاقی برای کمتر رنج کشیدن حیوانات بر اساس کمیته اخلاق پزشکی و نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام گردید. جهت انجام مطالعه، حیوانات بطور تصادفی در ۷ گروه ۸ تایی دسته بندی شدند. ۱- گروه کنترل: دریافت کننده تزریق داخل صفاقی نرمال سالین با حجم 1 ml/kg ، ۲- گروه کلونیدین (آگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنرژیک): دریافت کننده تزریق داخل صفاقی کلونیدین (Sigma) با دوز 0.7 mg/kg (با حجم 1 ml/kg) (۲۰)، ۳- گروه یوهیمین (آنتاگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنرژیک): $\text{IP} +$ کلونیدین: دریافت کننده یوهیمین (Tocris) با دوز 1 mg/kg بصورت IP (۲۱) و ۵ دقیقه بعد تزریق IP کلونیدین، ۴- گروه DMSO: دریافت کننده تزریق داخل بطن مغزی DMSO (ICV) با حجم $5 \mu\text{l}$ ، ۵- گروه یوهیمین ICV + کلونیدین: دریافت کننده تزریق ICV یوهیمین با دوز $5 \mu\text{g/kg}$ (۲۱) و ۵ دقیقه بعد تزریق IP کلونیدین، ۶- گروه ایبریوتوکسین (مهار کننده اختصاصی کانالهای پتاسیمی BK): دریافت کننده ایبریوتوکسین (Tocris) با دوز 100 nm بصورت تزریق ICV (۲۲)، ۷- گروه ایبریوتوکسین + کلونیدین: دریافت کننده ایبریوتوکسین بصورت ICV و ۵ دقیقه بعد تزریق IP کلونیدین.

روش جراحی و کانول گذاری در ناحیه بطنهای جانبی مغز (ICV): موشهای صحرایی با استفاده از تزریق IP ترکیب کتامین (100 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی رت‌ها در دستگاه استرئوتاکسی در وضعیت سر صاف قرار داده شدند. زیر بدن حیوان یک صفحه گرم شونده گذاشته شد. موی ناحیه سر حیوان بوسیله دستگاه شیو تراشیده و سطح چشمهای حیوان در طول جراحی خیس نگه داشته شد. به کمک بتادین ناحیه جراحی ضدعفونی گردید. با رعایت اصول استریل و به کمک تیغ جراحی شماره ۲۲ پوست سر به اندازه دو سانتیمتر برش داده شد. به کمک سوآپ پنبه از خونریزی جلوگیری شده و لایه‌های پوششی روی جمجمه به آرامی کنار زده شد تا استخوان جمجمه و نواحی برگما و لامبدا و درزها کاملاً آشکار شود. ناحیه دقیق کانول گذاری به کمک دستگاه استرئوتاکس با استفاده از اطلس پاکسینوس با مختصات $\text{AP} = -0.8$, $\text{ML} = 1.5$, $\text{DV} = -4.2$ علامت گذاری گردید. به کمک مته دندانپزشکی سوراخی در ضخامت استخوان جمجمه در استخوان فرونتال نزدیک جایگاه کانول راهنما و سوراخی دیگر در ضخامت استخوان پس سری حیوان ایجاد گردید و در هرکدام یک عدد پیچ دندانپزشکی محکم گردید. در ادامه سوراخی جهت ورود کانول راهنما به کمک مته در محل علامت گذاری شده ایجاد گردید. کانول راهنما با اندازه (۲۲ G) بصورت یکطرفه در بطن جانبی مغز در سمت راست، تا عمق 3 mm فرستاده شد و به کمک سیمان دندان پزشکی به

اثرات آگونیست و آنتاگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک بر درد مزمن ناشی از تزریق فرمالین: مطالعه حاضر نشان داد که تزریق کلونیدین به تنهایی با دوز 0.7 mg/kg باعث کاهش معنی دار رفتارهای دردی در فاز مزمن آزمون فرمالین با نمره درد 1.4 ± 0.56 در مقایسه با گروه کنترل با نمره درد 1.0 ± 0.2 گردید ($p < 0.001$). تزریق نرمال سالین تاثیر خاصی روی درد نداشته و در مقابل کلونیدین بعنوان آگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک باعث ایجاد بی دردی در رتھا شده و در نتیجه حیوان درد کمتری را از خود نشان داد. تزریق داخل صفاقی یوهمبین بعنوان آنتاگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک با دوز 1 mg/kg ، قبل از تزریق کلونیدین، اثرات ضد دردی کلونیدین را بطور معنی داری مهار نمود ($p < 0.001$) (نمودار ۳). DMSO مورد استفاده در گروهها با حجم $5 \mu\text{l}$ تاثیر خاصی روی درد نداشت. این گروه بعنوان گروه کنترل برای گروه یوهمبین ICV در نظر گرفته می شود زیرا حلال یوهمبین بکار رفته در مطالعه DMSO می باشد. مقایسه گروه DMSO با گروه نرمال سالین هیچ اختلاف معنی داری را بین این دو گروه نشان نداد. مقایسه بین گروه یوهمبین ICV با گروه DMSO هیچگونه اختلاف معنی داری را بر اساس $p < 0.05$ بین این دو گروه نشان نداد. در مقابل، مقایسه بین گروه کلونیدین و گروه یوهمبین ICV اختلاف معنی دار بین دو گروه را مشخص نمود ($p < 0.001$). بعلاوه، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه یوهمبین IP نسبت به گروه یوهمبین ICV وجود دارد ($p < 0.001$). این یافته نشان می دهد که گروه یوهمبین IP نسبت به گروه یوهمبین ICV درد شدیدتری را از خود نشان داده است (نمودار ۳).



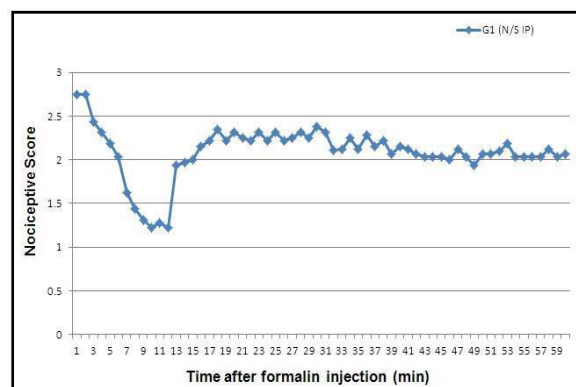
نمودار ۳. نقش گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک بر درد

گروه ۱: 1 ml/kg نرمال سالین IP، گروه ۲: 0.7 mg/kg کلونیدین IP، گروه ۳: 1 mg/kg یوهمبین IP + 0.7 mg/kg کلونیدین IP، گروه ۴: تزریق $5 \mu\text{l}$ DMSO بصورت ICV، گروه ۵: تزریق ICV یوهمبین با دوز $5 \mu\text{g/kg}$ به اضافه 0.7 mg/kg کلونیدین IP می باشد ($N=15$).
**** اختلاف معنی دار با $p < 0.001$ با گروه کلونیدین

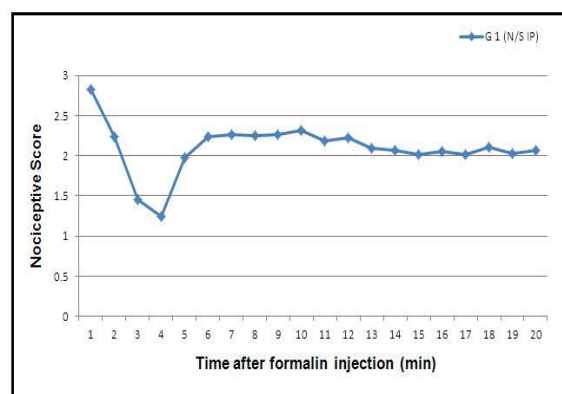
PRISM ثبت گردید. داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه One-way ANOVA و تست مکمل Fisher's LSD تجزیه و تحلیل شدند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

رفتار درد ناشی از تزریق فرمالین: تزریق فرمالین سبب رفتارهای دردی شدید در رتھا گردید که فازهای ۱ و ۲ و فاز میانی ناشی از تزریق فرمالین مشاهده گردید. در مطالعه حاضر در بازه زمانی ۰ تا ۶۰ دقیقه برای گروه کنترل ارائه گردید (نمودار ۱). بر اساس میانگینهای سه دقیقه ای حاصل از آزمون فرمالین، بیست بخش بدست آمد که بخش ۱ و ۲ معرف فاز یک و بخشهای ۳ و ۴ و ۵ معرف فاز بینابینی و بخشهای ۶ تا ۲۰ معرف فاز ۲ یا درد مزمن می باشد (نمودار ۲).



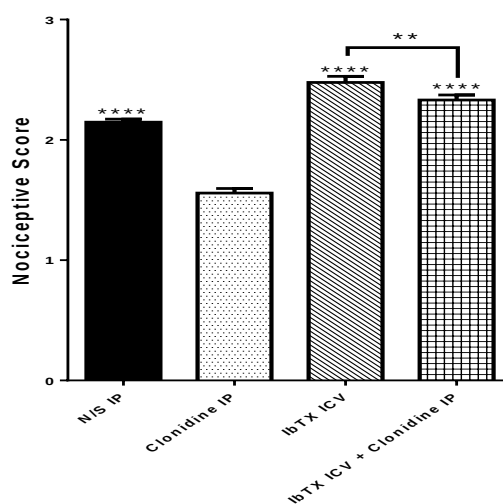
نمودار ۱. رفتارهای درد ناشی از تزریق فرمالین برای مدت زمان ۶۰ دقیقه در گروه کنترل (نرمال سالین) براساس میانگینهای یک دقیقه ای، از دقیقه صفر تا دقیقه ۷ فاز اول، از دقیقه ۸ تا ۱۴ مرحله اینترفاز است که رفتارهای دردی در این مرحله کاهش یافته و از دقیقه ۱۵ تا ۶۰ فاز دوم یا تاخیری است



نمودار ۲. رفتارهای درد ناشی از تزریق فرمالین برای مدت زمان ۶۰ دقیقه در گروه کنترل (نرمال سالین) براساس میانگینهای ۳ دقیقه ای، ۱ و ۲ فاز ۱، ۳ و ۴ و ۵ اینترفاز و از ۶ تا ۲۰ فاز ۲ یا تاخیری آزمون فرمالین در گروه کنترل (نرمال سالین)

فرمالین نداشت که در مطالعات قبلی انجام شده نیز بیان شده بود. استفاده تنها یا ترکیب کلونیدین با داروهای دیگر در مطالعات انجام شده قبلی توسط محققان دیگر، اثرات ضد دردی آن را نشان داده است (۳۲-۳۶). کلونیدین به روشهای مختلفی در مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است و بررسی های انجام شده اثرات ضد دردی آن را نشان داده است. از جمله این روشها استفاده از کلونیدین بصورت اینتراتکال (۳۳)، اپیدورال (۳۴) و پماد موضعی (۳۵) است. نتایج مطالعه ما نشان داد که اثرات ضد دردی در گروه های دریافت کننده یوهمین بعنوان آنتاگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک، دیده نشد. گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک بدنال دریافت یوهمین مهار شده و در نتیجه کلونیدین تزریق شده بدنال یوهمین IP و هم یوهمین ICV نتوانست اثرات ضد دردی خود را نشان دهد. این نتایج با یافته های محققین دیگر همخوانی دارد (۳۶ و ۳۷). این مطالعه نشان داد که گروه دریافت کننده یوهمین IP درد شدیدتری را نسبت به گروه دریافت کننده یوهمین ICV از خود نشان دادند. این یافته پیشنهاد می کند که در گروه دریافت کننده یوهمین IP بطور سراسری گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک مهار شده و کلونیدین IP نتوانست اثرات ضد دردی خود را نشان دهد ولی در مقابل در گروه دریافت کننده یوهمین ICV فقط گیرنده های مرکزی آلفا-۲ آدرنژیک آنتاگونیزه شده و پس از دریافت کلونیدین IP، کلونیدین تا حدودی توانسته بود اثرات ضد دردی خود را نسبت به گروه قبل از خود نشان دهد و در نتیجه اعضای گروه درد کمتری را از خود نشان داده بودند. در مطالعه حاضر نشان داده شد که ایبریوتوکسین مهار کننده کانالهای پتاسیمی BK (۳۸)، باعث تشدید درد در حیوان می شود. همچنین مهار کانالهای پتاسیمی BK اثرات ضد دردی ناشی از کلونیدین بعنوان آگونیست گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک را مهار می کند. این مطالعه نشان داد که گروهی که ایبریوتوکسین ICV دریافت کرده بودند و بدنال آن کلونیدین بصورت داخل صفاقی تزریق گردید، مهار کانالهای BK مرکزی توسط ایبریوتوکسین، مانع بروز اثرات ضد دردی کلونیدین در رت ها شده بود و در نتیجه حیوانات رفتارهای ناشی از درد را از خود نشان دادند. باتوجه به این که کانالهای پتاسیمی BK بطور فراوان در سیستم عصبی مرکزی (۳۹ و ۴۰) توزیع شده اند، این یافته ارتباط کانالهای BK با درد را نشان می دهد که در مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر نیز نشان داده شده است (۱۶ و ۱۸). تحریک این کانالها باعث افزایش خروج پتاسیم از غشای سلول و باعث هایپرپلاریزه شدن پتانسیل غشای پایه سلول می شود (۱۶ و ۱۸). همچنین طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر مشخص گردید که گروه دریافت کننده کلونیدین IP که از قبل ایبریوتوکسین بصورت ICV دریافت کرده بودند درد کمتری را نسبت به گروه ایبریوتوکسین ICV تنها، از خود نشان دادند. این نتیجه نشان می دهد که با وجود مهار اثرات ضد دردی کلونیدین توسط ایبریوتوکسین، کلونیدین تا حدودی توانسته بود که اثرات ضد دردی خود را نشان دهد. این یافته پیشنهاد می کند که کلونیدین می تواند اثرات ضد دردی خود را از مسیرهای دیگری غیر از کانالهای پتاسیمی BK نیز اعمال کند. بر اساس یافته های حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر، نقش کانالهای پتاسیمی در اثرات ضد دردی ناشی از آگونیست گیرنده های آلفا-۲ آدرنوسپتورها مشخص گردید (۱۶ و ۱۸). کلونیدین و سایر آگونیست گیرنده های آلفا-۲ آدرنوسپتورها به کمک کانالهای پتاسیمی باعث هایپرپلاریزه شدن غشای سلول می شوند (۴۱). نتایج بدست آمده از این مطالعه و یافته های حاصل از مطالعات قبلی محققین دیگر نشان می دهد که، بررسی

اثرات مهارکننده کانالهای BK بر درد مزمن و بی دردی حاصل از آگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک در آزمون فرمالین: تزریق ICV ایبریوتوکسین به تنهایی باعث افزایش معناداری در درد مزمن ناشی از تزریق فرمالین در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p < 0.001$). در گروه ایبریوتوکسین ICV+کلونیدین نیز با توجه به دریافت ایبریوتوکسین و سپس دریافت کلونیدین بدنال آن رفتارهای دردی شدید در رت ها دیده شد. مقایسه این گروه با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد ($p < 0.001$). درد در گروه ایبریوتوکسین ICV+کلونیدین نسبت به گروه کنترل شدیدتر بوده است. مقایسه گروه های دریافت کننده ایبریوتوکسین و نیز ایبریوتوکسین+کلونیدین با گروه کلونیدین، مشخص نمود که اختلاف معنی داری بین گروه کلونیدین با دو گروه دیگر برقرار است، به این معنی که گروه کلونیدین اثرات ضد دردی خود را نشان داده در حالیکه گروه ایبریوتوکسین و ایبریوتوکسین+کلونیدین درد شدیدی را از خود بروز دادند (نمودار ۴). همچنین اختلاف معنی داری بین گروه ایبریوتوکسین و گروه ایبریوتوکسین + کلونیدین وجود دارد ($p < 0.01$), بدین صورت که گروه ایبریوتوکسین درد شدیدتری را از خود نشان داده و در مقابل در گروه دیگر درد نسبتاً کاهش یافته است (نمودار ۴).



نمودار ۴. مکانیسم بی دردی گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک.

مقایسه گروههای کلونیدین (IP با دوز ۰/۷ mg/kg)، ایبریوتوکسین (تزریق ICV با دوز ۱۰۰ nm) و ایبریوتوکسین (تزریق ICV با دوز ۱۰۰ nm) به اضافه کلونیدین (IP با دوز ۰/۷mg/kg) با گروه سالی (تزریق IP) (N=۱۵). Mean±SEM. ** اختلاف با $p < 0.01$ و **** در سطح $p < 0.0001$ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کانالهای پتاسیمی BK در اثرات ضد دردی ناشی از آگونیست گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک نقش دارد. در این مطالعه مشخص گردید که کلونیدین بعنوان آگونیست گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک باعث ایجاد اثرات ضد دردی در موشهای صحرایی می شود. همچنانکه اثرات ضد دردی کلونیدین توسط محققین دیگر نیز بیان شده بود (۲۵). یوهمین بعنوان آنتاگونیست گیرنده های آلفا-۲ آدرنژیک باعث مهار اثرات ضد دردی کلونیدین در این مطالعه شد که با مطالعات محققان دیگر همخوانی دارد. نرمال سالی و DMSO بکار رفته در مطالعه حاضر تاثیری بر روی درد رت ها بدنال آزمون

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان جهت حمایت مالی و نیز از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان جهت انجام آزمایشات رفتاری تشکر و قدردانی می گردد.

کانالهای پتاسیمی می تواند در درک مکانیسم درد، کمک کننده باشد و پنجره جدیدی رو به درمان درد در بالین باز کند (۴۴-۴۲). نتایج مطالعه نشان داد که آگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک باعث بی دردی در حیوانات شده و آنتاگونیست این گیرنده اثرات بی دردی آگونیست گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک را مهار می کند. مهار کانال های پتاسیمی BK مانع بروز اثرات بی دردی ناشی از آگونیست این گیرنده می گردد.

The Role of BK Potassium Channels in Analgesia Produced by Alpha-2 Adrenergic Receptors

E. Houshmand (MSc)¹, M. Jahanshahi (PhD)², GH. Attarzadeh-Yazdi (PhD)^{*3}

1.Department of Physiology, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, I.R. Iran

2.Neuroscience Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R. Iran

3.Molecular Medicine Research Centre, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(2); Feb 2016; PP:32-40

Received: Apr 27th 2015, Revised: Jul 7th 2015, Accepted: Sep 28th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Millions of people suffer from pain worldwide, and annually, great economic costs are imposed on societies for pain relief. Analgesics such as alpha-2 adrenergic receptor agonists, which have low risk of complications, can be effective in assuaging pain and reducing costs. According to former studies, potassium channels play an important role in the analgesic mechanism of these receptors. This study aimed to determine the role of BK potassium channels in analgesia induced by alpha-2 adrenergic receptors.

METHODS: This study was performed on 56 male Wistar rats weighing 250-300 g that were divided into seven groups of eight rats. We administered 0.7 mg/kg intraperitoneal (IP) injection of clonidine, 1 mg/kg IP injection of yohimbine, and 5 mg/kg intracerebroventricular (ICV) injection of yohimbine. Iberitoxin at a dose of 100 nm was also injected ICV. Normal saline and DMSO were applied as solvents. Pain severity was evaluated using formalin test at a concentration of 2%.

FINDINGS: The chronic pain induced by formalin injection was relieved by IP injection of 0.7 mg/kg clonidine. Moreover, 5 µg/kg and 1 µg/kg ICV administration of yohimbine with mean chronic pain scores of 2.29±0.13 and 2.09±0.07, respectively, could significantly inhibit analgesic effect of clonidine with mean chronic pain score of 1.55±0.14 (p<0.001). ICV injection of iberitoxin with mean chronic pain score of 2.33±0.16 at a dose of 100 nm significantly diminished analgesic effects of clonidine.

CONCLUSION: Alpha-2 adrenergic receptor agonists could induce analgesia in the animals, and the antagonist of this receptor inhibited the analgesic effect of agonists of these receptors. BK channel inhibition prevented analgesic effect of adrenergic receptor agonists, as well.

KEY WORDS: Alpha-2 adrenergic receptor, BK potassium channel, Formalin test, Pain.

Please cite this article as follows:

Houshmand E, Jahanshahi M, Attarzadeh-Yazdi GH. The Role of BK Potassium Channels in Analgesia Produced by Alpha-2 Adrenergic Receptors. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(2):32-40.

***Corresponding Author: Attarzadeh-Yazdi (PhD)**

Address: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, I.R.Iran.

Tel: +98 761 6668172

E-mail: gattarzadeh@yahoo.com

References

1. Balogh B, Szilágyi A, Gyires K, Bylund DB, Mátyus P. Molecular modelling of subtypes ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$ and $\alpha 2C$) of $\alpha 2$ -adrenoceptors: A comparative study. *Neurochem Int*. 2009;55(6):355-61.
2. McCune S, Voigt M, Hill J. Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience*. 1993;57(1):143-51.
3. Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, et al. Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;21(1-2):133-49.
4. Nicholas AP, Hokfelt T, Pieribone VA. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17(7):245-55.
5. Gyires K, Zádori ZS, Török T, Mátyus P. $\alpha 2$ -Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem Int*. 2009;55(7):447-53.
6. Farag E, Argalious M, Sessler DI, Kurz A, Ebrahim ZY, Schubert A. Use of $\alpha 2$ -agonists in neuroanesthesia: an overview. *Ochsner J*. 2011;11(1):57-69.
7. Chetty S. Dexmedetomidine for acute postoperative pain. *S Afr J Anaesthesia Analgesia*. 2011;17(1):139-40.
8. Agthe AG, Kim GR, Mathias KB, Hendrix CW, Chavez-Valdez R, Jansson L, et al. Clonidine as an adjunct therapy to opioids for neonatal abstinence syndrome: a randomized, controlled trial. *Pediatrics*. 2009;123(5): 849-56.
9. Mossetti V, Vicchio N, Ivani G. Local anesthesia and adjuvants in pediatric regional anesthesia. *Curr Drug Targets*. 2012;13(7):952-60.
10. Zhang F, Feng X, Dong R, Wang H, Liu J, Li W, et al. Effects of clonidine on bilateral pain behaviors and inflammatory response in rats under the state of neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2011;505(3):254-9.
11. Galeotti N, Ghelardini C, Vinci MC, Bartolini A. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of $\alpha 2$ -adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. 1999;126(5):1214-20.
12. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. Calcium activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8(3):321-9.
13. Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ. Inhibition of trigeminovascular dural nociceptive afferents by $Ca(2+)$ -activated $K(+)$ (MaxiK/BK(Ca)) channel opening. *Pain*. 2010;151(1):128-36.
14. Hayashi Y, Kawaji K, Sun L, Zhang X, Koyano K, Yokoyama T, et al. Microglial Ca^{2+} -activated K^{+} channels are possible molecular targets for the analgesic effects of S-ketamine on neuropathic pain. *J Neurosci*. 2011;31(48):17370-82.
15. Wu Y, Liu Y, Hou P, Yan Z, Kong W, Liu B, et al. TRPV1 channels are functionally coupled with BK (mSlo1) channels in rat dorsal root ganglion (DRG) neurons. *PLoS One*. 2013;8(10): 78203.
16. Chen SR, Cai YQ, Pan HL. Plasticity and emerging role of BKCa channels in nociceptive control in neuropathic pain. *J Neurochem*. 2009;110(1):352-62.
17. Yamazumi I, Okuda T, Koga Y. Involvement of potassium channels in spinal antinociceptions induced by fentanyl, clonidine and bethanechol in rats. *JPN Pharmacol*. 2001;87(4):268-76.
18. Ocana M, Cendan CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur J Pharmacol*. 2004;500(1):203-19.
19. Wu RS, Marx SO. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: α - and β -subunits. *Kidney Int*. 2010;78(10):963-74.
20. Sabetkasaei M, Rezai Gharai L. Effect of Spinal and Systemic Clonidine Administration on the Postoperative Analgesia in Morphine-dependent and Naïve Rats. *Iran J Pharmaceut Res*. 2006;(5)2:117-21.

- 21.Semnanian S, Attarzadeh G, Pourgholami MH. Peripheral and central effects of dexmedetomidine, a specific α -2 adrenergic agonist, oil phasic and tonic pain. *Physiol Pharmacol*. 1997;1(1):74-81.
- 22.Cao XH, Chen SR, Li L, Pan HL. Nerve injury increases brain-derived neurotrophic factor levels to suppress BK channel activity in primary sensory neurons. *J Neurochem*. 2012;121(6):944-53.
- 23.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.
- 24.Azhdari Zarmehri H, Haidari-Oranji N, Soleimani N, Sofiabadi M. Effects of lidocaine injections into the rostral ventromedial medulla on nociceptive behaviours in hot-plate and formalin tests in rats. *Koomesh*. 2013;14(4):490-6.
- 25.Neil MJ. Clonidine: clinical pharmacology and therapeutic use in pain management. *Curr Clin Pharmacol*. 2011;6(4):280-7.
- 26.Kelley TC, Adams MJ, Mulliken BD, Dalury DF. Efficacy of multimodal perioperative analgesia protocol with periarticular medication injection in total knee arthroplasty: a randomized, double-blinded study. *J Arthroplasty*. 2013;28(8):1274-7.
- 27.Makau CM, Towett PK, Abelson KS, Kanui TI. Intrathecal administration of clonidine or yohimbine decreases the nociceptive behavior caused by formalin injection in the marsh terrapin (*Pelomedusa subrufa*). *Brain Behav*. 2014;4(6):850-7.
- 28.Kumar A, Maitra S, Khanna P, Baidya DK. Clonidine for management of chronic pain: A brief review of the current evidences. *Saudi J Anaesth*. 2014;8(1):92-6.
- 29.Santiago AEQ, Issy AM, Sakata RK. Effects of Preoperative Intravenous Clonidine in Patients Undergoing Cataract Surgery: A Double-Blind, Randomized Trial. *J Ophthalmol*. 2014;2014:346549.
- 30.Stone LS, German JP, Kitto KF, Fairbanks CA, Wilcox GL. Morphine and clonidine combination therapy improves therapeutic window in mice: synergy in antinociceptive but not in sedative or cardiovascular effects. *PLoS One*. 2014;9(10):e109903.
- 31.Górniak M, Proost JH, Veckeneer M, Mulder VC, Wubbels RJ. Clonidine as an Adjuvant to Prolong Local Analgesia in Conventional Scleral Buckle Surgery. *J Ocular Pharmacol Ther*. 2014;30(9):777-82.
- 32.Rauck RL, North J, Eisenach JC. Intrathecal clonidine and adenosine: effects on pain and sensory processing in patients with chronic regional pain syndrome. *Pain*. 2015;156(1):88-95.
- 33.Pirbudak L, Sevinç A, Maralcan G, Kılıç E. Pain management with intrathecal clonidine in a colon cancer patient with opioid hyperalgesia: case presentation. *Agri: Agri (Algoloji) Derneği'nin Yayın organidir. J Turk Soci Algology*. 2014;26(2):93-6.
- 34.Ayad AE, El Masry A. Epidural Steroid and Clonidine for Chronic Intractable Post-thoracotomy Pain: A Pilot Study. *Pain Practice*. 2012;12(1):7-13.
- 35.Campbell CM, Kipnes MS, Stouch BC, Brady KL, Kelly M, Schmidt WK, et al. Randomized control trial of topical clonidine for treatment of painful diabetic neuropathy. *Pain*. 2012;153(9):1815-23.
- 36.Howe JR, Wang JY, Yaksh TL. Selective antagonist of the antinociceptive effect of intrathecal applied α adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983;224(3):552-8.
- 37.Sierralta F, Naquira D, Pinardi G, Miranda H. α -adrenoceptor and opioid receptor modulation of clonidine-induced antinociception. *Br J Pharmacol*. 1996;119(3):551-4.
- 38.Zhang XL, Mok L, Charbonnet M, Lee K, Gold MS. Inflammation-induced changes in BKCa currents in cutaneous dorsal root ganglion neurons from the adult rat. *Mol Pain*. 2012;8(37):1-12.
- 39.Knaus HG, Schwarzer C, Koch R, Eberhart A, Kaczorowski GJ, Glossmann H, et al. Distribution of high-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J Neurosci*. 1996; 16(3):955-63.

40. Chang CP, Dworetzky SI, Wang J, Goldstein ME. Differential expression of the α and β subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Mol Brain Res*. 1997;45(1):33-40.
41. Tatsumi H, Costa M, Schimerlik M, North R. Potassium conductance increased by noradrenaline, opioids, somatostatin, and G-proteins: whole-cell recording from guinea pig submucous neurons. *J Neurosci*. 1990;10(5):1675-82.
42. Tsantoulas C, Zhu L, Shaifta Y, Grist J, Ward JP, Raouf R, et al. Sensory neuron downregulation of the Kv9. 1 potassium channel subunit mediates neuropathic pain following nerve injury. *J Neurosci*. 2012;32 (48):17502-13.
43. Tsantoulas C, McMahon SB. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci*. 2014;37(3):146-58.
44. Liu CY, Lu ZY, Li N, Yu LH, Zhao YF, Ma B. The role of large-conductance, calcium-activated potassium channels in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Cephalalgia*. 2015;35(1):16-35.