

اثرات تجویز نخاعی هموگلوبین بر رفتارهای دردی و التهاب در موش صحرایی

امین گچیز: کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
* **مسعود فریدونی:** دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (*نویسنده مسئول). fereidoni@um.ac.ir
مرتضی بهنام‌رسولی: استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: هموگلوبین پروتئینی است که در گلبول‌های قرمز خون وجود دارد و نقش آن حمل و نقل گازهای اکسیژن و دی‌اکسیدکربن در خون می‌باشد. این پروتئین دارای گروه هم که یک گروه پروستتیک است می‌باشد. مولکول هموگلوبین به‌عنوان یک القاء‌کننده قوی آنزیم هم‌اکسیژناز است. همچنین مولکول‌های آزاد‌کننده مونوکسیدکربن (CORMs) دارای اثرات ضد‌دردی بر درد نوروپاتی هستند، بنابراین تحقیق حاضر بر این فرضیه استوار بوده است که تجویز نخاعی هموگلوبین می‌تواند با افزایش تولید CO موجب تخفیف درد حرارتی و شیمیایی و التهاب شود.

روش کار: در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۳۰۰ گرم) به سه گروه دریافت‌کننده طی تجویز نخاعی سالیین، تجویز حاد هموگلوبین و تجویز مزمن هموگلوبین طی ۵ روز متوالی (۱ mg/ml) تقسیم‌بندی شدند. درد حرارتی توسط آزمون Tail flick قبل و ۵ دقیقه بعد از تجویز نخاعی مورد سنجش قرار گرفت و پاسخ به درد شیمیایی با تزریق کف پای فرمالین طی یک ساعت ثبت گردید. حجم پا قبل از تجویز ها و یکساعت پس از تزریق کف پای فرمالین به روش پلتیسومتری برای سنجش میزان ادم التهابی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که تجویز نخاعی حاد و مزمن هموگلوبین موجب کاهش معنی‌دار درد شیمیایی ($p < 0.01$) و التهاب ($p < 0.01$) ناشی از تزریق کف پای فرمالین گردید. از طرفی اگرچه تجویز حاد هموگلوبین بر آستانه درد حرارتی اثری نداشت اما تجویز مزمن هموگلوبین منجر به افزایش معنی‌دار آستانه درد حرارتی شد ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: هموگلوبین احتمالاً از طریق افزایش سطح مونو‌اکسیدکربن در بافت نخاعی، میزان درد شیمیایی و التهاب را کاهش می‌دهد، از طرفی بیشتر بودن این اثر در گروه مزمن نسبت به گروه حاد احتمالاً به علت اثر هموگلوبین در سطح ژنی و بر روی بیان ژن هم‌اکسیژناز می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: هموگلوبین، درد، التهاب، تجویز نخاعی

مقدمه

بویژه به صورت پاراکراین است (۱). مونوکسیدکربن درون‌زاد حداقل از دو منبع شامل اتواکسیداسیون فنول‌ها، فلاونوئیدها و هالومتان‌ها، اکسیداسیون نوری ترکیبات آلی و پر اکسیداسیون چربی‌های غشاء و همچنین واکنش هم‌اکسیژناز تولید می‌گردد که البته این واکنش منبع اصلی تولید CO در بدن است و هموگلوبین به‌عنوان قوی‌ترین القاء‌کننده این آنزیم شناخته شده است (۱،۲).

آنزیم هم‌اکسیژناز (HO-Hemoxygenase) با تخریب هم (Heme) علاوه بر اینکه باعث آزادسازی آهن از هم می‌شود، با شکستن پل‌های کربن‌متان، باعث آزادسازی CO می‌شود (۳). بیان این آنزیم به وسیله هم و بسیاری از القاء‌کننده‌های غیر همی مثل فلزات سنگین (کبالت و

گلبول‌های قرمز خون دارای مولکول پیچیده‌ای به نام هموگلوبین هستند که از یک قسمت پروتئینی به نام گلوبین و یک رنگدانه آهن‌دار به نام هم تشکیل شده است. گلوبین مرکب از ۴ زنجیره پلی‌پپتیدی است که به هر زنجیره یک پورفیرین آهن‌دار (هم) متصل شده است. مولکول هموگلوبین به‌عنوان یک القاء‌کننده قوی آنزیم هم‌اکسیژناز است از طرفی مونوکسید کربن (CO) گازی است بی‌رنگ، بی‌بو و بی‌طعم که از هوا سبک‌تر است و در غلظت‌های زیاد سمی است اما تحت متابولیسم طبیعی بدن نیز به میزان اندک تولید و احتمالاً دارای عملکرد زیستی در بدن می‌باشد. مطالعات اخیر در ارتباط با این مولکول نشان دهنده نقش آن در ارتباطات بین سلولی

مرگبار و از طرف دیگر اثرات ضددردی مشاهده شده از تجویز مولکول‌های آزاد کننده CO بر درد نوروپاتیک (۱۰، ۱۱)، می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که شاید تجویز نخاعی هموگلوبین با افزایش میزان CO در سیستم عصبی مرکزی و همچنین اثر بر بیان آنزیم هم اکسیژناز، موجب کاهش درد شیمیایی و حرارتی و التهاب گردد. بدین منظور در مطالعه حاضر با استفاده از آزمون‌های Tail flick و فرمالین و اندازه گیری حجم ادم التهابی القاء شده با تزریق کف پای فرمالین به روش پلتیسمومتری، اثرات تجویز نخاعی حاد و مزمن هموگلوبین بر درد حرارتی، شیمیایی و التهاب مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (سن ۲/۵ ماه و وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) استفاده شد. تمامی حیوانات در شرایط محیطی ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای $22 \pm 2^\circ\text{C}$ و بدون هرگونه آلودگی صوتی در قفس‌های مخصوصی از جنس Plexy glass به صورت گروه‌های سه‌تایی نگهداری شدند. موش‌های صحرایی در تمام مدت به جز زمان انجام آزمایش‌ها به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند، تمامی آزمایش‌ها بین ساعت ۱۰ صبح تا ۲ بعدازظهر انجام شدند. کلیه مراحل تکثیر و پرورش حیوانات و انجام آزمایش‌ها در حیوانخانه و آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی انجام گرفت. همچنین کلیه عملیات آزمایشگاهی با رعایت مقررات بین‌المللی اخلاق و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت (۱۲).

استخراج و آماده‌سازی هموگلوبین: تخلیص پروتئین هموگلوبین توسط نمک آمونیوم سولفات یک روش بسیار کارآمد برای استخراج این پروتئین می‌باشد. در این روش ابتدا با خون‌گیری از قلب، به کمک سرنگ انسولین آغشته شده با هیپارین، از قلب ۳ موش صحرایی بالغ حدود ۱۰ میلی‌لیتر خون جمع‌آوری شد. سپس خون هیپارینه شده به

کادمیم)، آرسنیک سه ظرفیتی، عوامل سولفیدریلی، شوک حرارتی، استرس اکسیداتیو، هیپوآکسی و هایپراکسی، سیتوکاین‌های التهابی، پروستاگلاندین‌ها و هورمون‌ها القاء می‌شود (۴). از این موضوع می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که آنزیم هم‌اکسیژناز علاوه بر نقشی که در تجزیه هم دارد می‌تواند نقش سودمندی در حفظ هموستازی سلولی نیز داشته باشد (۲). در بدن دو ایزوform آنزیم هم‌اکسیژناز شناخته شده است؛ آنزیم هم‌اکسیژناز ۱ (HO-1) که در بیشتر بافت‌های بدن حضور دارد و آنزیم هم‌اکسیژناز ۲ (HO-2) که بیشتر در سلول‌های اندوتلیال و نورون‌ها بیان می‌شود و در مغز و بخش‌های مختلف سیستم عصبی دارای توزیع فراوانی است و توزیع آن منطبق با توزیع آنزیم گوانیل سیکلاز می‌باشد (۵،۶).

از گزارشات منتشر شده چنین گمان می‌رود که CO به عنوان یک مولکول حد واسط در پیام‌رسانی بعضی از فرآیندهای سیستم عصبی از جمله انتقال سیگنال‌های بویایی، long term potentiation (LTP)، شل‌شدگی عروقی غیر کولینرژیک - غیر آدرنرژیک، تنظیم کولینرژیک ریت‌های شبانه روزی و تنظیم اتونوم عملکرد قلبی عروقی ایفای نقش می‌کند (۷، ۸، ۲). افزایش تولید CO در ماکروفاژهای ششی، در حضور اندوتوکسین لیپوپلی ساکارید (LPS) و متعاقب آن فاکتور نکروز کننده توموری (TNF- α) نشان می‌دهند که CO از شش‌ها در شرایط شوک اندوتوکسیک محافظت می‌کند (۹). در این رابطه در مطالعات پیشین گزارش شده است که تیمار موش‌های صحرایی با هموگلوبین منجر به محافظت کامل موش‌ها در مقابل اندوتوکسمی کشنده می‌شود (۱۰). علاوه بر این مونوکسیدکربن در سلول‌های عصبی آسیب دیده و همچنین ماکروفاژهای موجود در محل آسیب، در کاهش فعال‌سازی ماکروفاژها و کاهش حساسیت به درد مؤثر است (۱۱).

با توجه به مطالب فوق مبنی بر نقش مولکول هموگلوبین به عنوان یک القاء کننده قوی آنزیم هم‌اکسیژناز در محافظت در مقابل اندوتوکسمی

هموگلوبین حاصله، محلول‌هایی با غلظت‌های مشخص از پودر هموگلوبین در سالی‌ن تهیه گردید و درجه خلوص آن‌ها به کمک روش سیان مت هموگلوبین (همی‌گلوبین سیانید HiCN) و با استفاده از دستگاه Sismax k800 اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج حاصله درصد خلوص پودر هموگلوبین استخراج شده بیش از ۹۶/۵٪ تعیین گردید.

به منظور انجام آزمایش‌ها، حیوانات بصورت تصادفی در چهار گروه هفت‌تایی کنترل (بدون تیمار)، شم (دریافت ۱۰ میکرولیتر سالی‌ن طی تجویز نخاعی)، گروه حاد هموگلوبین (دریافت کننده ۱۰ میکرولیتر از محلول با غلظت ۱ mg/ml هموگلوبین طی تجویز نخاعی) و گروه مزمن هموگلوبین (دریافت کننده ۱۰ میکرولیتر از محلول با غلظت ۱ mg/ml هموگلوبین طی تجویز نخاعی به مدت ۵ روز) گروه‌بندی شدند.

روش کانول گذاری جهت تجویز نخاعی

(Intrathecal injection – i.t): کانول گذاری در فضای تحت عنکبوتیه بر اساس روش Yaksh و Rudy انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی محلول کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلوزین (۲۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. سپس موهای پشت سر حیوان تراشیده شد و سر در دستگاه استرئوتاکس ثابت گردید آنگاه در فاصله بین گوش‌ها و به طرف پایین برشی به اندازه ۲ سانتیمتر ایجاد و عضلات به آرامی کنار زده شد تا غشاء اطلس-اکسی پیتال نمایان گردد، در این هنگام با کمک یک سوزن سر کج سوراخی در این غشاء ایجاد و یک لوله پلی اتیلن (PE=10) به طول ۱۱ سانتیمتر که در فاصله ۸ سانتیمتری از یک طرف آن به وسیله پارافیلیم برجستگی کوچکی ایجاد شده بود به فضای تحت عنکبوتیه فرو برده شد. به طوری که انتهای کانول بین قطعات کمری ۴ و ۵ قرار گرفت. از ۳ سانتیمتر لوله که خارج از بدن باقی مانده بود برای تجویزها استفاده شد. شایان ذکر است که در هیچ یک از حیوانات بعد از کانول گذاری و سپری شدن یک دوره بهبودی ۵ روزه، نباید نقص حرکتی دیده شود (۱۴).

مراحل انجام آزمایش‌ها در تمام گروه‌ها به این

مدت ۱۰ دقیقه با شتاب جاذبه ۱۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از ته نشین شدن گلبول‌های قرمز و جداسازی پلاسما، گلبول‌های قرمز در محلول ۵۰ mmol/l Tris-HCl، ۱/۷٪ NaCl و ۱ mmol/l EDTA با pH=۸/۵ معلق شدند. به منظور بهتر شسته شدن گلبول‌های قرمز این مرحله دوبار دیگر نیز تکرار شد. سپس به منظور لیز شدن قطعات سلولی آخرین رسوب (گلبول‌های قرمز شسته شده) در محلول ۵۰ mmol/l Tris-HCl و ۱ mmol/l EDTA بدون نمک NaCl معلق و در فریزر منجمد شد. محلول منجمد شده، با قرار گرفتن در دمای اتاق ذوب گردید، این عمل دو بار تکرار و نهایتاً گلبول‌های قرمز لیز شدند. قطعات سلولی لیز شده به کمک سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه ته نشین شده و پس از جدا کردن آن‌ها، محلول باقی مانده که عمدتاً حاوی هموگلوبین بود، آماده ورود به فرآیند نمک زدایی شد. محلول حاوی هموگلوبین، به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴۱ درجه، در محلول آمونیوم کلرید ۰/۸٪ اشباع قرار گرفت. در انتهای این مرحله، هموگلوبین به صورت توده‌های پروتئینی معلق در محلول قابل مشاهده بود. توده‌های پروتئینی معلق به کمک سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه به صورت رسوب ته نشین شدند. در این مرحله فرآیند استخراج به پایان رسید اما از آنجایی که رسوب بدست آمده به طور طبیعی حاوی مقداری نمک آمونیوم سولفات نیز بود برای جدا سازی محلول هموگلوبین از نمک آمونیوم سولفات از روش دیالیز استفاده شد. بدین منظور با قرار دادن محلول حاوی هموگلوبین در داخل کیسه دیالیزی و دیالیز آن در مقابل محلول بافر فسفات ۱۰ mmol/l به حجم ۴ لیتر و به مدت ۱۲ ساعت، فرآیند حذف نمک از محلول انجام شد (۱۳). در نهایت به منظور حذف کامل آب از محلول و تبدیل هموگلوبین محلول به صورت پودر، از روش خشک شدن انجمادی (لیوفیلیزینگ) استفاده گردید. برای این منظور، محلول هموگلوبین در دستگاه لیوفیلیزر (ساخت کمپانی Christ آلمان) قرار گرفت و در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد و تحت شرایط خلاء به شکل پودر درآمد. سپس به منظور تأیید درجه خلوص پودر

بررسی و ثبت قرار گرفت. پاسخ رفتاری در جوندگان طی آزمون فرمالین دو مرحله‌ای است. درد در مرحله اول (فاز نورونیک) وابسته به مکانیسم‌های نورونیک و پاسخ درد در این مرحله ناشی از تحریک مستقیم فرمالین بر روی پایانه‌های عصبی محیطی می‌باشد که در ۵ تا ۱۰ دقیقه اول تزریق رخ می‌دهد، در حالی که در مرحله دوم پاسخ درد در نتیجه التهاب و آزاد شدن میانجی‌های التهابی بروز می‌کند (فاز التهابی) که تقریباً از دقیقه ۲۰ شروع شده و گاهی تا ۶۰ دقیقه به طول می‌انجامد. همچنین می‌توان شدت درد را در این آزمون بصورت کمی‌تی از صفر تا ۳ درجه بندی کرد، بطوریکه عدد صفر زمانی است که حیوان هیچ دردی ندارد، در عدد یک حیوان در اثر درد می‌لنگد، در عدد ۲ حیوان پای مورد تزریق فرمالین را در تمام مدت بالا نگه می‌دارد و در عدد ۳ حیوان پا را به شدت تکان می‌دهد، گاز می‌گیرد یا لیس می‌زند (۱۶).

آزمون پلتیسومتری: روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری التهاب وجود دارد که وابسته به پارامترهای متغیر طی التهاب هستند. معمولترین روش مورد استفاده، اندازه‌گیری حجم ادم ایجاد شده است. روش پلتیسومتری دیجیتال برای اولین بار توسط فریدونی و همکاران در سال ۲۰۰۰ برای اندازه‌گیری حجم ادم ناشی از عوامل پاتولوژیک یا آزمایشگاهی ارائه شد (۱۷). در این مطالعه از فرمالین برای القاء التهاب استفاده گردید. حجم پای مورد تزریق به روش پلتیسومتری (ستون محتوی سیال واقع شده بر روی ترازوی دیجیتال) اندازه‌گیری شد. عدد به دست آمده از ترازو، تقسیم بر جرم حجمی سیال به عنوان حجم پا ثبت گردید. اندازه‌گیری حجم اولیه (پیش از تیمار و تزریق فرمالین) و نهایی پای حیوان در هر دو حالت تا یک محل مشخص و یکسان (مچ پا) صورت گرفت. سپس توسط فرمول زیر حجم ادم التهابی القاء شده با فرمالین به صورت زیر محاسبه گردید:

= حجم ادم التهابی

حجم اولیه پا - حجم پا ۶۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین

ترتیب بود که ابتدا حجم اولیه پا به روش پلتیسومتری و آستانه درد حرارتی توسط آزمون Tail flick سنجش شد. ۵ دقیقه پس از تجویز نخاعی یا آخرین تجویز نخاعی در گروه هموگلوبین مزمن، مجدداً آستانه درد حرارتی اندازه‌گیری شد، سپس ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول فرمالین ۲/۵٪ به کف پای حیوان تزریق شد و به مدت یکساعت آزمون فرمالین انجام گرفت. پس از آن حجم نهایی پای مورد تزریق فرمالین، مجدداً به روش پلتیسومتری تعیین گردید.

آزمون Tail flick: برای سنجش آستانه درد حرارتی در موش صحرایی از آزمون Tail flick به روش D'Amour و Smith استفاده شد. در این آزمون حیوان در رستریئر قرار گرفت بصورتیکه دم آن بیرون باشد. شدت نور دستگاه Tail flick (Sparco، ایران) طوری تنظیم گردید که زمان متوسط پاسخ‌دهی پایه بین ۴ تا ۶ ثانیه باشد و زمان ۱۵ ثانیه نیز به عنوان زمان قطع تابش نور به یک سوم میانی دم حیوان (Cut of time) برای جلوگیری از هرگونه ایجاد آسیب بافتی، در نظر گرفته شد. زمان پاسخ دهی قبل و ۵ دقیقه پس از تجویز نخاعی اندازه‌گیری شد، این زمان حاصل میانگین سه بار اندازه‌گیری متوالی با فواصل یک دقیقه‌ای بود و این میانگین به عنوان آستانه درد (Tail flick latency) در نظر گرفته شد، برای مقایسه بین گروه‌ها میزان درصد حداکثر اثر ممکن (Maximum Possible Effect) (MPE%) با در نظر گرفتن تفاضل زمان پس کشیدن دم قبل و بعد از تیمار و نیز زمان قطع تابش نور با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۵).

Post drug latency – Pre drug latency

MPE% = $\frac{\text{Post drug latency} - \text{Pre drug latency}}{\text{Cut off time} - \text{Pre drug latency}} \times 100$

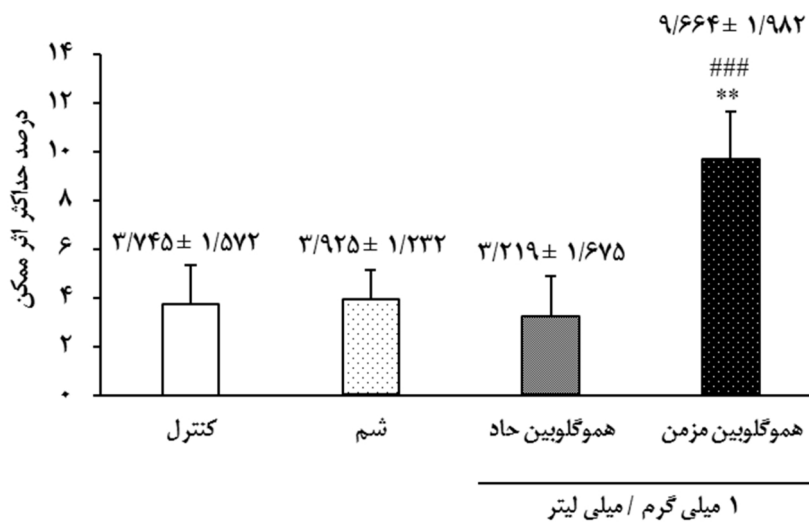
Cut off time – Pre drug latency

آزمون فرمالین: به منظور سنجش شدت درد شیمیایی از آزمون فرمالین استفاده گردید. بدینصورت که پس از گذشت ۵ دقیقه از هر تجویز نخاعی، محلول فرمالین ۲/۵٪ به میزان ۰/۰۵ میلی‌لیتر به کف پای حیوان تزریق شد و رفتار حیوان به مدت ۶۰ دقیقه، هر ۱۵ ثانیه یکبار مورد

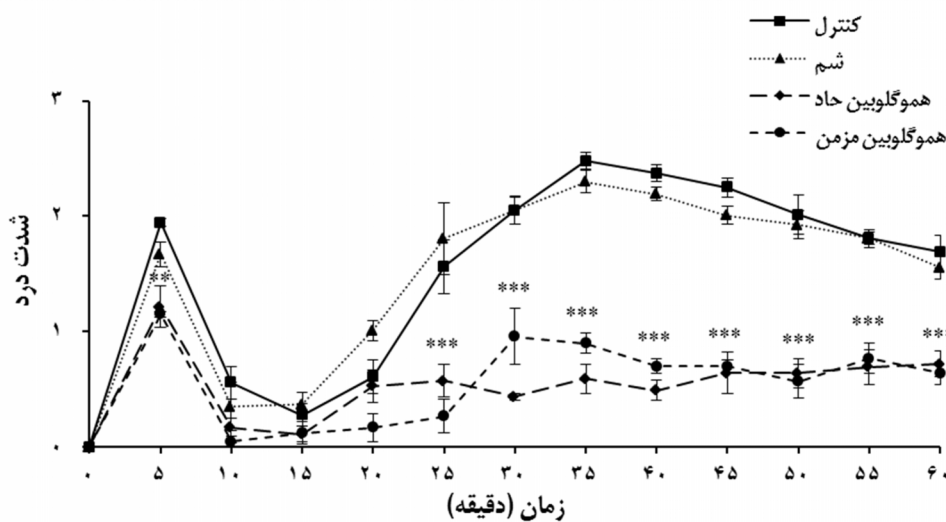
یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون Tail flick: یافته‌های حاصل از آزمون Tail flick نشان داد که آستانه درد حرارتی در گروه کنترل و شم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. همچنین تجویز نخاعی محلول هموگلوبین (۱ mg/ml) به صورت حاد در مقایسه با گروه شم منجر به اختلاف معنی‌داری در آستانه درد حرارتی طی آزمون Tail flick نگردید؛ اما تجویز نخاعی محلول هموگلوبین

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج بصورت mean±SEM ارائه شدند. معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها با آزمون ANOVA یک‌طرفه و به کمک نرم افزار آماری GraphPad Prism 6 و به دنبال آن مقایسه میانگین‌ها با آزمون متعاقب T-student-neuwmann-keuls و با حداقل سطح معنی‌داری $p < 0.05$ برآورد شدند.



شکل ۱- مقایسه آستانه درد حرارتی بین گروه‌های کنترل (بدون تیمار)، شم (سالین، i.t.) و دریافت کننده هموگلوبین بصورت حاد و مزمن (۱ mg/ml، i.t.) در آزمون Tail flick. نتایج بصورت mean±SEM ارائه شده‌اند. ($p < 0.01$ در مقایسه با گروه شم و $p < 0.01$ در مقایسه با گروه هموگلوبین حاد).



شکل ۲- مقایسه شدت درد شیمیایی بین گروه‌های کنترل (بدون تیمار)، شم (سالین، i.t.) و دریافت کننده هموگلوبین بصورت حاد و مزمن (۱ mg/ml، i.t.) در آزمون فرمالین. نتایج بصورت mean±SEM ارائه شده‌اند. ($p < 0.001$ و $p < 0.01$ در مقایسه با گروه شم).

ناشی از تزریق کفپایی فرمالین بین دو گروه کنترل و شم گویای عدم وجود تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه بود؛ اما تجویز نخاعی محلول هموگلوبین (۱mg/ml) به صورت حاد و مزمن طی ۵ روز متوالی در مقایسه با گروه شم منجر به کاهش معنی‌داری در حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کفپایی فرمالین طی آزمون پلتیسومتری گردید ($p < 0.001$). از طرفی هر دو گروه دریافت کننده محلول هموگلوبین بصورت حاد و مزمن تقریباً به میزان مشابهی حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کفپایی فرمالین را کاهش دادند. (شکل ۳).

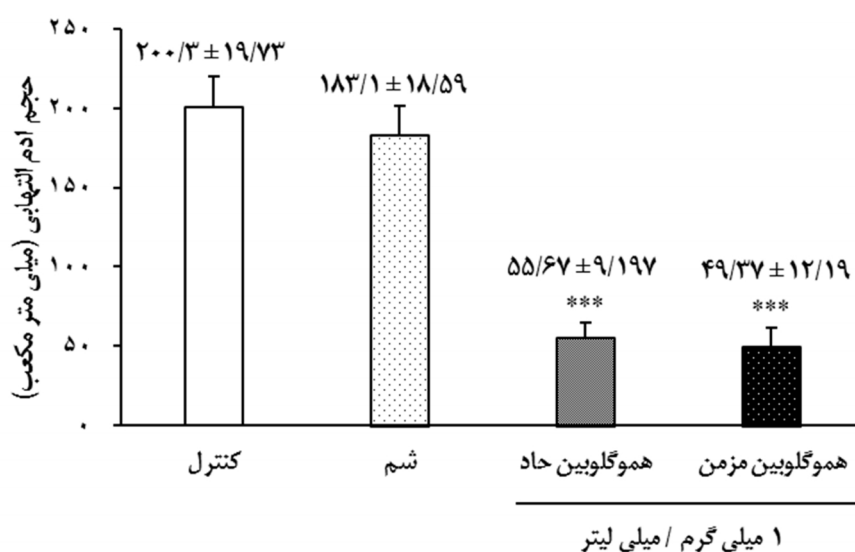
بحث و نتیجه‌گیری

شناسایی و معرفی مولکول مونوکسیدکربن به عنوان یک مولکول درونزاد در بدن که دارای عملکردهای فیزیولوژیک منحصر به فردی می‌باشد، یک موضوع قابل توجه است که نشان دهنده نقش مهم این مولکول در بدن است (۱). بعلاوه شناسایی حضور این مولکول در قسمت‌های مهمی از سیستم عصبی مرکزی مانند هیپوتالاموس، هیپوفیز، هیپوکمپ و نخاع و همچنین اهمیت این مولکول در فرآیندهای فیزیولوژیکی مهم همچون انتقال سیگنال‌های بویایی، Long term potentiation (LTP)، شل شدگی عروقی غیر

(۱mg/ml) به صورت مزمن طی ۵ روز متوالی، منجر به افزایش معنی‌داری در آستانه درد حرارتی و کاهش احساس درد در مقایسه با گروه شم ($p < 0.001$) و هموگلوبین حاد ($p < 0.001$) شد (شکل ۱).

نتایج حاصل از آزمون فرمالین: مقایسه یافته‌های حاصل از آزمون فرمالین در دو گروه کنترل و شم حاکی از آن بود که پاسخ درد در این دو گروه مشابه یکدیگر بوده و شامل هر دو فاز اول و دوم درد بود، اما تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد. از طرفی تجویز نخاعی محلول هموگلوبین (۱mg/ml) به صورت حاد و مزمن طی ۵ روز متوالی در مقایسه با گروه شم، منجر به کاهش معنی‌دار شدت درد شیمیایی ایجاد شده ناشی از تزریق کفپایی فرمالین در هر دو فاز اول (نورونیک) و فاز دوم (التهابی) آزمون فرمالین گردید ($p < 0.001$)؛ اما تجویز نخاعی محلول هموگلوبین (۱mg/ml) در هر دو حالت حاد و مزمن، اثرات مشابهی را در هر دو فاز نورونیک و التهابی آزمون فرمالین نشان داد و اختلاف معنی‌داری در شدت درد شیمیایی بین این دو گروه مشاهده نشد (شکل ۲).

نتایج حاصل از آزمون پلتیسومتری: مقایسه نتایج حاصل از سنجش حجم ادم التهابی



شکل ۳- مقایسه حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کفپایی فرمالین بین گروه‌های کنترل (بدون تیمار)، شم (سالین، i.t.) و دریافت کننده هموگلوبین بصورت حاد و مزمن (۱mg/ml، i.t.) از آزمون پلتیسومتری. نتایج بصورت mean ± SEM ارائه شده‌اند. ($p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه شم).

flick (مدت زمان لازم برای اثر I-NAME)، منجر به تأخیر در شروع پر دردی حرارتی گردید. این موضوع نشان داد که مهار تولید NO باعث افزایش آستانه درد حرارتی می‌شود (۲۰). با توجه به این مورد می‌توان انتظار داشت که احتمالاً هر ماده دیگری که باعث کاهش سطح NO در نورون‌ها یا سلول‌های پشتیبان در سطح نخاع شود در کاهش درد حرارتی مؤثر خواهد بود (۲۱). از آنجایی که مولکول هموگلوبین یکی از مولکول‌هایی است که تمایل زیادی به اتصال به مولکول‌های NO دارد (۱۰)، می‌توان اینگونه استنباط کرد که هموگلوبین (در حالت تجویز مزمن) احتمالاً بخشی از اثرات خود را از طریق جذب NO و کاهش میزان این مولکول در سلول‌های عصبی انجام داده و از این طریق آستانه درد حرارتی را در طی آزمون Tail flick افزایش می‌دهد. همچنین با توجه به اینکه یکی دیگر از اعمال مولکول هموگلوبین اثر بر آنزیم HO و تولید CO است (۲)، نقش مولکول CO بر درد حرارتی موضوع قابل توجه دیگری است که باید آن را مد نظر قرار داد که احتمالاً تجویز هموگلوبین در حالت مزمن علاوه بر اثری که در القاء آنزیم HO دارد، با اثر در سطح ژنی نیز باعث افزایش بیان این آنزیم شده که این امر در نهایت منجر به کاهش بیشتر حساسیت به درد حرارتی می‌گردد.

از طرف دیگر نتایج حاصل از تحقیق حاضر حاکی از آن بود که تجویز حاد و مزمن نخاعی هموگلوبین منجر به کاهش شدت درد شیمیایی و حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین شد (شکل ۲ و ۳). برای توجیه این مسئله می‌توان گفت هموگلوبین بعنوان سوپسترای آنزیم هم-اکسیژناز، باعث فعال شدن این آنزیم و افزایش سطح مونوکسیدکربن در سلول می‌گردد. افزایش میزان CO در نهایت منجر به افزایش فعالیت آنزیم گوانیلات سیکلاز و تولید cGMP شده که این امر با کاهش فعالیت نورون‌های انتقال دهنده درد، انتقال پیام‌های درد به مراکز بالاتر را کاهش می‌دهد و باعث تخفیف احساس درد در حیوان می‌شود (۲۲). CO تولید شده همچنین ممکن است قسمتی از نقش خود را با اثر بر حساسیت

کولینرژیک - غیر آدرنرژیک، تنظیم کولینرژیک ریتم‌های شبانه روزی، تنظیم اتونوم عملکرد قلبی عروقی و حافظه و یادگیری ایفا می‌کند، یک موضوع قابل توجه می‌باشد و عملکردهای مهم این مولکول را در سیستم عصبی نشان می‌دهد (۲،۷،۸). مولکول مونوکسیدکربن در خارج از سیستم عصبی نیز نقش‌هایی از جمله نقش تنظیمی در فرآیندهایی مانند تنظیم ترشح بی‌کربنات، تنظیم فرآیند آزادسازی هورمونهای پانکراس و ... ایفا می‌کند (۱۸). توانایی بالقوه این مولکول در درمان برخی از بیماری‌ها مانند نقش آن به عنوان یک فاکتور محافظتی در برابر شوک اندوتوکسیک (۱۰)، نیز از جمله مواردی است که اهمیت انجام تحقیقات بیشتر بر این مولکول را ضروری می‌نماید. مولکول مونوکسیدکربن از لحاظ عملکردی شباهت زیادی به مولکول نیتریک اکسید دارد، اثرات مهم این مولکول در فرآیندهای سلولی مانند فعال کردن آنزیم گوانیل سیکلاز و پروتئین کینازهای وابسته به cGMP، فعال کردن پمپ سدیم-پتاسیم، تأثیر بر کانال‌های پتاسیمی و ... نیز از جمله موارد قابل توجه است (۱،۶). یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که تجویز نخاعی محلول هموگلوبین بصورت حاد در مقایسه با گروه شم منجر به بروز اختلاف معنی‌داری در آستانه درد حرارتی طی آزمون Tail flick نشد ولی تجویز نخاعی مزمن محلول هموگلوبین به طور معنی‌داری منجر به افزایش آستانه درد حرارتی و بروز بی‌دردی در آزمون Tail flick شد (شکل ۱). مطالعات پیشین حاکی از آن بود که گیرنده‌های NMDA به همراه مولکول نیتریک اکساید (NO) نقش اصلی را در پردردی حرارتی ایفا می‌کند. اینگونه تصور می‌شود که در هنگام بروز درد حرارتی، این گیرنده از طریق راه انداختن یک سیگنال درون سلولی و اثر بر روی آنزیم نیتریک اکسید سنتاز باعث فعال شدن این آنزیم شده و بدین ترتیب سطح NO سلولی را افزایش می‌دهد (۱۹). تحقیقات گذشته نشان دادند که تزریق L-NAME (۲۰۰ nmol تا ۲)، (مهار کننده ی آنزیم NG-nitro-l-arginine methyl ester, NOS) حدود ۳۰ دقیقه قبل از انجام تست Tail

review. *Cortex*; 2015.

2. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*. 2006;86(2):583-650.

3. Rogers B, Yakopson V, Teng ZP, Guo Y, Regan RF. Heme oxygenase-2 knockout neurons are less vulnerable to hemoglobin toxicity. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(8):872-81.

4. Mautes AE, Kim DH, Sharp FR, Panter S, Sato M, Maida N, Bergeron M, Guenther K, Noble LJ. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in the contused spinal cord of the rat. *Brain Res*. 1998;795(1-2):17-24.

5. Chen-Roetling J, Regan RF. Effect of heme oxygenase-1 on the vulnerability of astrocytes and neurons to hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350(1):233-7.

6. Ryter SW, Choi AM. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res*. 2015;5244(15):00216-9.

7. Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, Ruat M, Flavahan NA, Snyder SH. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(2):795-8.

8. Panahian N, Maines MD. Site of injury-directed induction of heme oxygenase-1 and -2 in experimental spinal cord injury: differential functions in neuronal defense mechanisms? *J Neurochem*. 2001;76(2):539-54.

9. Lakkisto P, Kytö V, Forsten H, Siren JM, Segersvärd H, Voipio-Pulkki LM, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide promote neovascularization after myocardial infarction by modulating the expression of HIF-1 α , SDF-1 α and VEGF-B. *Eur J Pharmacol*. 2010;635(1-3):156-64.

10. Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13(5):595-601.

11. Hervera A, Leánez S, Negrete R, Motterlini R, Pol O. Carbon monoxide reduces neuropathic pain and spinal microglial activation by inhibiting nitric oxide synthesis in mice. *PLoS One*. 2012;7(8):e43693.

12. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.

13. Van Beekvelt MC, Colier WN, Wevers RA, Van Engelen BG. Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O₂ consumption and blood flow in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2001;90(2):511-9.

14. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*. 1976;17(6):1031-6.

گیرنده‌های گلوتاماتی متابوتروفیکی و گیرنده‌های AMPA ایفا کند و از این طریق بر میزان حساسیت مسیر درد شیمیایی تأثیر بگذارد (۲۳). همچنین می‌توان اثرات ضد التهابی هموگلوبین را نیز به این صورت توضیح داد که احتمالاً هموگلوبین از طریق افزایش سطح CO هم در مرکز و هم در محیط (به علت نقش CO به عنوان پیام رسان عقب رونده و توانایی انتشار از طریق غشاء)، بخشی از اثرات ضد التهابی خود را از طریق مهار عوامل پیش التهابی دخیل در تولید حساسیت و التهاب مانند فاکتور نکروزه کننده توموری آلفا (TNF- α)، اینترلوکین ۱ و اینترلوکین β -۱ و بخشی دیگر را از طریق افزایش تولید عوامل ضد التهابی مانند اینترلوکین ۱۰ اعمال می‌کند (۲۴) و بدین ترتیب از حجم ادم التهابی ناشی از القاء تزریق کف پایی فرمالین می‌کاهد. همچنین هموگلوبین با تأثیر بر میزان NO در سلول‌ها، بر گیرنده‌های AMPA و NMDA اثر می‌گذارد و فعالیت نورون‌ها را کاهش می‌دهد و از این طریق آزادسازی میانجی‌های التهابی را در سیستم عصبی مرکزی و احتمالاً محیط کم می‌کند (۲۳، ۲۴)؛ بنابراین می‌توان احتمال داد که این گونه هموگلوبین منجر به بروز اثرات ضد دردی و ضد التهابی مشاهده شده در این پژوهش شده است که نیازمند پژوهش‌های بیشتر می‌باشد. برای ادامه این تحقیقات و به منظور بررسی تغییرات ستوه آنزیم هم‌اکسیژناز در بافت نیازمند آنتی‌بادی در تکنیک‌های وسترن بلات و ایمنوهیستوشیمی می‌باشیم که تهیه آنها مشکل می‌باشد از طرفی برای ادامه بررسی‌ها و تحقیقات بیشتر از دید مکانیسمی به آزاد کننده‌های مونوکسید کربن نیز نیاز است که باید برای تهیه آنها در داخل کشور اقدام نمود اما به دلیل عدم کاربردهای بیشتر، احتمال تحقیق روی تهیه آنها مقرون به صرفه نمی‌باشد.

منابع

1. Sykes OT, Walker E. The neurotoxicology of carbon monoxide - Historical perspective and

15. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1941;72:74-8.
16. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 1992;51(1):5-17.
17. Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnian S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;43(1):11-4.
18. Henningson R, Alm P, Ekström P, Lundquist I. Heme oxygenase and carbon monoxide: regulatory roles in islet hormone release: a biochemical, immunohistochemical, and confocal microscopic study. *Diabetes.* 1999;48(1):66-76.
19. Meller ST, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience.* 1994;60(2):367-74.
20. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg.* 2003;97(4):1108-16.
21. Parodi J, Montecinos-Oliva C, Varas R, Alfaro IE, Serrano FG, Varas-Godoy M, et al. Wnt5a inhibits K⁺ currents in hippocampal synapses through nitric oxide production. *Mol Cell Neurosci.* 2015;68:314-322.
22. Carvalho PG, Branco LG, Panissi CR. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociception induced by acute painful stimulus in rats. *Brain Res.* 2011;1385:107-13.
23. Steiner AA, Branco LG, Cunha FQ, Ferreira SH. Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. *Br J Pharmacol.* 2001;132(8): 1673-82.
24. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 2000;6(4):422-8.

The effects of intrathecal administration of hemoglobin on pain and inflammation in rat

Amin Gachpaz, MSc, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

***Masoud Fereidoni**, Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (*Corresponding author). fereidoni@um.ac.ir

Morteza Behnam-Rassouli, Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Background: Hemoglobin is a protein in red blood cells, and the role of that is to transport the oxygen and carbon dioxide in the blood. This protein has a heme group that is a prosthetic group. Hemoglobin is known as a potent inducer for heme oxygenase enzyme. Also the administration of CO releasing compounds (CORMs) can reduce the neuropathic pain. So this study is based on the assumption that intrathecal administration of hemoglobin can be lead to elevation of CO production and reduction in thermal and chemical pain and inflammation.

Methods: The male Wistar rats (200-250 g) were randomly divided into 3 groups included saline treatment, acute treatment of hemoglobin and chronic treatment of hemoglobin (1mg/ml) for 5 constitutive days. Thermal pain sensation was assessed using Tail flick test before and 5 minutes after i.t. injection and responses of chemical pain to sub plantar formalin (2.5%, 5µl) injection were recorded for one hour. Paw volume was measured before treatments and one hour after sub-plantar injection of formalin for inflammatory edema assessment using plethysmometry test.

Results: Results from this experiment showed that acute and chronic i.t. injection of hemoglobin reduced the chemical pain ($p<0.01$) and also inflammation ($p<0.001$) due to hind paw sub-plantar injection of formalin. Although the acute i.t. injection of hemoglobin had no prominent effect on thermal pain latency but chronic i.t. injection of hemoglobin reduced thermal pain latency significantly ($p<0.01$).

Conclusion: Hemoglobin reduces pain sensation and inflammation probably due to increasing the level of CO in spinal cord tissue. This effect was higher in chronic group that is possibly due to the effects of hemoglobin on the heme oxygenase gene expression.

Keywords: Hemoglobin, Pain, Inflammation, Intrathecal administration