

## رفتارهای دردناک ناشی از تزریق فرمالین و تحمل نسبت به مرفین در رت نر معتاد

نعمت الله غیبی\* دکتر محمد جاودان\*\*

### Noxious behaviours from injection of formalin and morphine tolerance of addicted male rats

N.Gheibi M.Javdan

#### \*Abstract

**Background:** Formalin as a chemical noxious stimulus evokes biphasic pain that its latter phase as a chronic inflammation pain is similar to clinical pain.

**Objective:** Assessment of noxious behaviours from subcutaneous injection of formalin and morphine tolerance effects on the responses of addicted male rats.

**Methods:** Flinching and licking behaviours scored as quantitative pain. Experiments were carried out in normal and morphine addicted rats. Behaviour scores measured quantitative after injection of formalin in plantar region of hind paw. Assessment of morphine tolerance was carried out by intrapritoneal injection of morphine (10mg/Kg) 10 minute before formalin injection.

**Findings:** In this study, we observed biphasic model of formalin test. Morphine injection in normal animals suppressed noxious behaviours. Flinching and licking responses evoked by formalin not affected by morphine injection. Licking scores in addicted rats have significant difference from normal rats ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Addicted rats showed tolerance to morphine analgesia after formalin injection. Hyperalgesic effects of formalin injection observed in addicted rats.

**Keywords:** Formalin, Pain, Morphine, Addiction, Tolerance, Male Rat

#### \* چکیده

**زمینه:** فرمالین، محرک دردزای شیمیایی، یک درد دو مرحله ای ایجاد می کند که مرحله دوم آن الگویی از درد التهابی مزمن مشابه دردهای بالینی است.

**هدف:** مطالعه به منظور ارزیابی رفتارهای دردناک ناشی از تزریق زیرجلدی فرمالین و اثرات تحمل نسبت به مرفین در نوع پاسخ رت های نر معتاد انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۰ انجام شد آزمایش های کمی درد برای دو رفتار لیسیدن مکان تزریق و جمع کردن پوست پشت در موش های سالم و معتاد با تزریق فرمالین ۲/۵ درصد مورد سنجش قرار گرفتند. برای بررسی تحمل نسبت به بی دردی ناشی از مرفین، مقدار ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم مرفین به صورت درون صفاقی تزریق و سنجش درد ادامه یافت.

**یافته ها:** الگوی درد دو مرحله ای ناشی از فرمالین در حیوان های سالم و معتاد مشاهده شد. در گروه سالم رفتارهای دردناک با تزریق مرفین مهار شدند. تزریق درون صفاقی مرفین در گروه معتاد در هیچ کدام از پاسخ های دردناک ناشی از تزریق فرمالین تفاوت معنی دار نداشت. پاسخ لیسیدن مکان تزریق در گروه معتاد افزایش معنی داری نسبت به حیوانات سالم نشان داد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به یافته ها، مصرف دراز مدت مرفین در رت های معتاد تشدید درد ناشی از فرمالین را نسبت به حیوان های سالم به دنبال دارد. رت های معتاد تحت تزریق فرمالین، نسبت به بی دردی ناشی از تزریق مرفین تحمل نشان می دهند.

**کلید واژه ها:** فرمالین، درد، مرفین، اعتیاد، تحمل، رت نر

\* مربی بخش فیزیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و دانشجوی دکتری بیوفیزیولوژی

\*\* استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی قزوین  
آدرس مکاتبه: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی



**\* مقدمه :**

آزمون فرمالین توسط دایسون و دنیس (۱۹۹۷) تشریح شد و به عنوان الگوی درد التهابی مزمن عمومیت پیدا کرد.<sup>(۱)</sup> رفتارهای دردزای فرمالین الگوی معتبری از درد بالینی یعنی درد مزمن است که انسان ها نیز تجربه می کنند.<sup>(۲)</sup>

با تزریق زیرجلدی فرمالین رقیق شده (۲/۵ درصد) به کف پنجه عقبی حیوان، رفتارهای مربوط به حس درد طی دو مرحله قابل مشاهده است؛ مرحله اول پاسخ تحریکی گذراست که حدود ۲ تا ۵ دقیقه طول می کشد، در صورتی که مرحله دوم بسته به غلظت فرمالین، حدود ۲۵ تا ۴۵ دقیقه به طول می انجامد.<sup>(۳)</sup> مرفین اولین اپیوئید طبیعی است که خصوصیات آن شناسایی شد. تحقیقات بیش تر در پستانداران به شناخت اپیوئیدهایی با منشأ داخلی و نیز گیرنده های این اپیوئیدها منجر شد. انکفالین ها و اندورفین ها به خصوص بتا اندورفین از اپیوئیدهای درون زاد هستند.<sup>(۴)</sup> استفاده مکرر و زیاد اپیوئیدها باعث ایجاد سه حالت تحمل، وابستگی روانی و جسمی می شود. تحمل، پس از مصرف مکرر داروی اپیوئیدی رخ می دهد و باعث می شود که موجود برای رسیدن به همان تأثیر اولیه به میزان بیش تری از دارو نیاز داشته باشد.<sup>(۵)</sup> اپیوئیدهای مصرف شده یا همان اپیوئیدهای خارجی مثل مرفین بر روی گیرنده های اپیوئیدی با منشأ داخلی ( $\delta, \kappa, \mu$ ) اثر می کنند و با یک بازخورد منفی، ساخت پپتیدهای با منشأ داخلی را کاهش می دهند.<sup>(۶)</sup>

هدف از این مطالعه بررسی پاسخ های بی دردی ناشی از تزریق مرفین در حیوان های معتاد و مقایسه نوع پاسخ های دردناک فرمالین در حیوان های سالم و معتاد است.

**\* مواد و روش ها :**

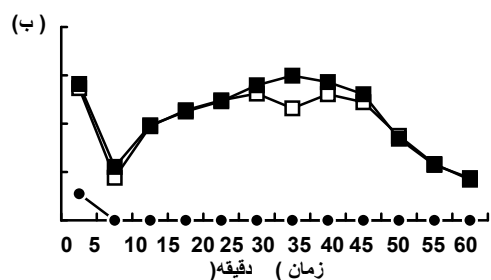
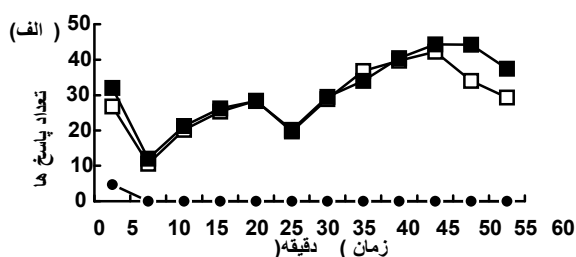
این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۰ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین بر روی ۴۰ رت نر نژاد NMRI (شرکت رازی، ایران) با وزن ۱۵۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد که تحت شرایط چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی گراد در قفس های پنج تایی نگه داری می شدند و به طور آزاد غذا دریافت می نمودند. حیوان ها در چهار گروه ۱۰ تایی سالم شاهد، سالم مرفینی، معتاد شاهد و معتاد مرفینی مورد آزمایش قرار گرفتند. برای القای درد از محلول فرمالدئید ۳۷ درصد غلظت ۲/۵ درصد استفاده و به هر کدام از حیوان های مورد آزمایش ۵۰ میکرولیتر تزریق شد. در آزمایش های انجام شده رفتارهای وابسته به درد به طور کمی با شمارش تعداد حرکت و لرزش ناحیه پشتی حیوان و جمع کردن پوست این ناحیه (Flinching) و تعداد دفعه هایی که حیوان مکان مورد تزریق را با زبان خود می لیسید (Licking) در بازه های زمانی ۵ دقیقه و به مدت ۶۰ دقیقه بررسی و ثبت شد.

دو گروه سالم به مدت ۲۱ روز آب و سوکروز دریافت نمودند. در گروه سالم شاهد پس از تزریق درون صفاقی ۱ میلی لیتر سالین و سپس ۵۰ میکرولیتر فرمالین به صورت زیرجلدی در کف پنجه عقبی حیوان، امتیازبندی دو رفتار لیسیدن مکان تزریق و جمع کردن پوست پشت انجام شد. در گروه سالم مرفینی، ابتدا محلول مرفین سولفات با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی به هر حیوان تزریق شد و پس از ۱۰ دقیقه با تزریق فرمالین به کف پنجه عقبی حیوان امتیازبندی دو شاخص مذکور صورت گرفت.

دو گروه معتاد با روش لیونگ و همکاران وابستگی به مرفین پیدا کردند؛<sup>(۷)</sup> به این صورت که دارو را در دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی گرم در

در دسته دوم موش های سالم که مرفین دریافت نمودند رفتارهای دردناک ناشی از فرمالین مهار شدند و تنها پاسخ ناچیزی در مرحله اول دردناک مشاهده شد. گروه معتاد شاهد (سالینی)، دو مرحله اولیه (حاد) و ثانویه (مزمن) را در هر دو رفتار دردناک ناشی از تزریق فرمالین نشان دادند. در گروه معتاد مرفینی که به جای سالین مرفین درون صفاقی دریافت نمودند، در هر دو رفتار دردناک ناشی از فرمالین تحمل نسبت به مرفین مشاهده شد، ولی مقایسه پاسخ دهی آنها با گروه معتاد شاهد از نظر آماری اختلاف معنی دار نشان نداد (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- مقایسه رفتارهای جمع کردن پوست پشت (الف) و لیسیدن (ب)، ناشی از فرمالین در سه گروه سالم مرفینی (●)، معتاد شاهد (□) و معتاد مرفینی (■)



تجزیه و تحلیل پاسخ های رفتاری ناشی از تزریق فرمالین در گروه معتاد شاهد در مقایسه با حیوان های سالم شاهد، تنها در رفتار لیسیدن

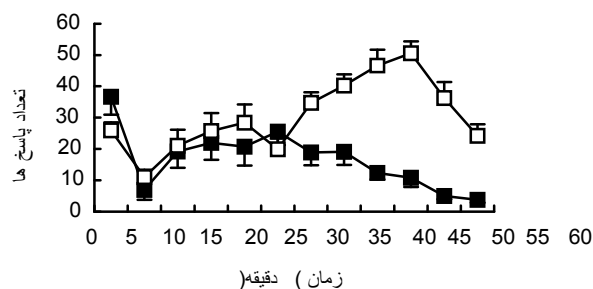
میلی لیتر هر کدام ۴۸ ساعت و طی روزهای بعد تا روز بیست و یکم، با غلظت ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر دریافت نمودند. مرفین به صورت محلول در آب و مخلوط با ۳ درصد سوکروز برای از بین بردن تلخی آن استفاده می شد. مقدار متوسط نوشیدن آب و در نتیجه مصرف دارو تا پایان این دوره روزانه ۶۰ تا ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود. این حیوان ها پس از این دوره با تزریق مقدار ۲ میلی گرم بر کیلوگرم نالوکسان نشانه های سندرم ترک را نشان دادند. در گروه معتاد شاهد ۱ میلی لیتر سالین به صورت درون صفاقی تزریق و سپس فرمالین به کف پنجه عقبی تزریق و رفتارهای پاسخ به درد امتیازبندی شد. در گروه معتاد مرفینی با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت محلول در سالین و به طور درون صفاقی تزریق و پس از ده دقیقه با تزریق فرمالین به کف پنجه عقبی رفتارهای دردناک فوق شمارش شدند.

در گروه های متفاوت تعداد امتیازها در پنج دقیقه اول تا دوازدهم یعنی به طور کلی ۶۰ دقیقه به برنامه نرم افزاری Excel وارد و برای محاسبه سطح معنی داری از آزمون آماری t استفاده شد.

### \* یافته ها :

در گروه سالم شاهد هر دو رفتار جمع کردن پوست پشت و لیسیدن، مدل دو مرحله ای درد ناشی از فرمالین را نشان داد (نمودار شماره ۱).

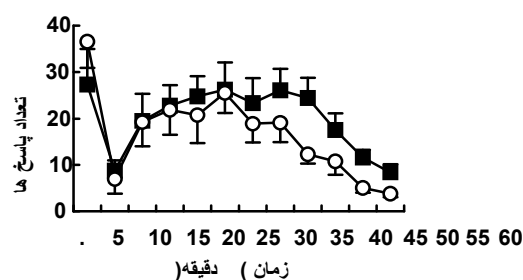
نمودار ۱- پاسخ های رفتاری ناشی از فرمالین در گروه سالم شاهد، (□) جمع کردن پوست پشت (■) لیسیدن



اول (حاد) با وجود تزریق مرفین تعدادی از این رفتارهای دردناک مشاهده شد، شاید به این دلیل که فعالیت ذاتی اپیوئیدها با توجه به شدت محرک دردزا متفاوت است.<sup>(۹)</sup> روش های مختلفی برای ایجاد وابستگی و تحمل به مرفین نظیر تزریق روزانه مرفین به صورت درون صفاقی یا استفاده از کپسول های زیرجلدی وجود دارند.<sup>(۱۰،۷)</sup> آنچه روش حل کردن مرفین در آب آشامیدنی را نسبت به سایر روش های ایجاد وابستگی متمایز می کند شباهت آن به الگوی وابستگی و اعتیاد در انسان است، زیرا در این روش حیوان میزان مرفین مصرفی خودش را تنظیم می کند.<sup>(۱۱)</sup> اکثر مطالعه های مربوط به اثرات درد محیطی یا مرکزی در حیوان ها صورت می گیرند و ما می توانیم در شرایط بالینی تا حدی از آنها کمک بگیریم. اما در مصرف داروهای مربوط به تقلیل درد به خصوص دردهای مزمن بعد از جراحی ها تجویزکنندگان با این سؤال روبه رو می شوند که کدام ترکیب دارویی مناسب تر است یا کدام مسیر احساس درد ممکن است در یک عمل جراحی به خصوص درگیر باشد. آیا باید حساسیت گیرنده های محیطی را مهار کرد یا مسیرهای آوران درد، تحریک پذیری نخاع یا حساسیت مرکزی را مهار نمود. مطالعه ها نشان داده اند که ترکیب یک آگونیست گیرنده اپیوئیدی به همراه یک آنتاگونیست گیرنده NMDA برای مهار حساس شدن ضروری است.<sup>(۱۲)</sup> اپیوئیدها عمده ترین سهم درمانی مربوط به دردهای حاد و برخی دردهای مزمن را به خود اختصاص می دهند، اما این مطالعه و دیگر مطالعه ها نشان می دهند که نقش آنها پیچیده تر از آن است که تصور می شود. شواهد نشان می دهند که تحمل حاد به اپیوئیدها ممکن است خیلی سریع رخ دهد.<sup>(۱۳)</sup> آنتاگونیست های NMDA بر روی این تحمل حاد اثر معکوس

با سطح معنی داری  $p < 0.05$  افزایش نشان داد (نمودار شماره ۳).

نمودار ۳- مقایسه رفتارهای لیسیدن گروه معنادار شاهد (■) و گروه سالم شاهد (○)



#### \* بحث و نتیجه گیری :

یافته های این مطالعه همان الگوی دو مرحله ای دردزایی فرمالین یعنی مرحله حاد و مزمن را در توافق با سایر تحقیق ها نشان داد.<sup>(۱)</sup> در مطالعه های کمی کردن درد به کمک آزمون فرمالین، رفتارهای دردناک مانند لیسیدن موضع تزریق و جمع کردن پوست پشت به دلیل اهمیت، به عنوان مبنای امتیازبندی درد در نظر گرفته شده اند.<sup>(۸)</sup> تفاوت پاسخ دهی به فرمالین در رفتارهای مورد سنجش ناشی از تنوع احساس درد و الگوهای متفاوت درد است.

اپیوئیدهایی نظیر مرفین با فرونشاندن فعالیت سیستم های درک درد در سطوح بالاتر محور عصبی، اثر خود را اعمال می کنند. در رت های سالمی که تحت تزریق مرفین درون صفاقی قرار گرفتند، این ماده با القای بی دردی رفتارهای دردناک ناشی از فرمالین را متوقف می نمود و این به دلیل عملکرد مرفین به عنوان یک اپیوئید خارجی قابل انتظار بود. مرفین به عنوان یک متوقف کننده رفتارهای دردناک در مرحله دوم (مزمن) کاملاً مؤثر است. در این مطالعه در مرحله

2. Tjolsen A, Berge O G, Hunskaar S, Rosland J H, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17
3. Kandel E R, Schwartz J H. Principle of neural science. Elsevier 1985; 385-99
4. Reisine T. Opiate receptors. *Neuropharmacology* 1995; 463-72
5. Yu w, Haoj XuX, Wiesenfeld-Hallin Z. The development of morphine tolerance and dependence in rats with chronic pain. *Brain Res* 1997; 756: 141-6
6. Trujillo K A, Akil H. Opiate tolerance and dependence: recent finding and synthesis. *New Biol* 1991 3: 915-23
7. Leung C M, Dai S, Oglec W. Rapid induction of dependence to morphine in rats. *Neuropharmacology* 1986; 25: 305-7
8. Fields H L, Basbaum A I. Central nervous system mechanism of pain modulation. In: *Text book of pain*. Wall P D, Melzack R, (Eds). 3rd ed, London, Churchill Livingstone, 1994, 243-57
9. Millan M J. Kappa-opioid receptor-mediated antinociception in the rat I, comparative actions of mu-and kappa-opioids against anoxious thermal, pressure and electrical stimuli. *J Pharamacol Exp Ther* 1989; 251: 334-41
10. Rasmussen K. The role of the locus coeruleus and N Methyl D- aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 1995; 13: 295-300
11. Badawy A A, Evans C M, Evans M. Production of tolerance and physical dependence in the rat by simple administration of morphine in drinking water. *Br J Phamacol* 1982; 75: 485-91

دارند.<sup>(۱۴)</sup> دوز بالای اپیوئیدها قبل از جراحی منجر به تحمل حاد در انسان می شود و برای کاهش درد بعد از عمل افزایش نیاز به مصرف اپیوئیدها را به دنبال دارد. در یک مطالعه زنانی که دوز بالایی از فنتانیل برای القای بی هوشی دریافت نموده بودند در مقایسه با آنهایی که با دوز کمتر بی هوش شده بودند، درد شدیدتری داشتند و در نتیجه نیاز بیش تری به مصرف اپیوئیدها در اولین ساعت های بعد از عمل نشان دادند.<sup>(۱۵)</sup>

در این مطالعه نیز گروه معتاد به دوزی از مرفین که در حیوان های سالم بی دردی را القاء می نمود، تحمل نشان دادند. در گروه معتاد رفتار دردناک لیسیدن بیش تر از نمونه های سالم بود. تحقیق های سایر محققین نشان داده است که مصرف مزمن مرفین (اعتیاد) منجر به تشدید درد (Hyperalgesia) در اثر تحریک های دردناک می شود.<sup>(۱۶)</sup> شواهد متعدد نشان داده اند که مسیرهای نزولی مهارکننده درد در بی دردی ناشی از مرفین در آزمون فرمالین دخیل هستند و تحمل به مرفین در موش های معتادی که تحت تزریق فرمالین قرار گرفته اند، ناشی از عدم عملکرد این سیستم کنترل نزولی است.<sup>(۱۷و۱۸)</sup>

به طور خلاصه در رت های نر معتاد به دلیل مصرف مزمن مرفین اثرات تشدید درد ناشی از فرمالین نسبت به رت های سالم مشاهده شد و این حیوان ها نسبت به بی دردی ناشی از تزریق مرفین تحمل نشان دادند.

#### \* مراجع :

1. Dubuisson, D, Dennis S G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-74

12. Aida S, Yamakura T, Baba H, Taga K, Fukuda S, Shimoji K. Pre-emptive analgesia by intravenous low-dose ketamine and epidural morphine in gastrectomy: a randomized double blind study. *Anesthesiology* 2000; 92: 1624–30
13. Vinik H R, Kissin I. Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanyl infusion in humans. *Anesth Analg* 1998; 86: 1307-11
14. Shimoyama N, Shimoyama M, Inturrisi CE, Elliot KJ. Ketamine attenuates and reverses morphine tolerance in rodents. *Anesthesiology* 1996; 85: 1357- 66
15. Chia Y Y, Liu K, Wang J J, Kuo M C, Ho ST. Intraoperative high dose fentanyl induces postoperative fentanyl tolerance. *Can J Anaesth* 1999; 46(9): 872–7
16. Mao J, Price D D, Mayer D J. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 334-41
17. Abbott F V, Melzack F. Brainstem lesions dissociate neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. *Brain Res* 1982; 251: 149-55
18. Detweiler D J, Rohade D S, Basbaum A I. The development of opioid tolerance in the formalin test in the rat. *Pain* 1995; 63: 251-4