

بررسی اثرات فرمالين و سلکوکسیب بر توليد نیتريک اکساید محيطی

پریچهر حسن زاده^{*۱}، آنا حسن زاده^۲

خلاصه

سابقه و هدف: گزارشات متناقضی در خصوص نقش نیتريک اکساید در پردازش پیام‌های درد و التهاب منتشر شده‌اند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی میزان تولید نیتريک اکساید محیطی در پی تجویز غلظت‌های مختلف فرمالين (القاء کننده درد التهابی) و سلکوکسیب (داروی ضد درد و ضد التهاب) طراحی گردید.

مواد و روش‌ها: درد التهابی حاد و مزمن به واسطه تزریق فرمالين ۱ درصد، ۲/۵ درصد و ۵ درصد به موش‌های صحرایی نر بالغ القاء گردید. ۱/۵ و ۲۴ ساعت پس از تزریق حاد و ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق فرمالين طی تجویز مزمن ۴ روزه، آنالیز اسپکتروفتومتریک نیتريت سرم انجام شد. اثر تجویز حاد و مزمن سلکوکسیب با دوزهای ۱۰، ۲۰، و ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم/داخل صفاقی به صورت پیش درمانی یا به تنهایی بر میزان تولید نیتريک اکساید در فواصل زمانی مشابه مورد ارزیابی قرار گرفت. تحلیل داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس دو طرفه انجام شد.

نتایج: تجویز فرمالين به طور وابسته به دوز و زمان منجر به افزایش نیتريت سرمی گردید. تجویز دوز ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم سلکوکسیب به استثنای اینکه بر میزان نیتريت حاصل از تزریق فرمالين ۵ درصد پس از ۱/۵ ساعت بی تاثیر بود، مانع از تولید نیتريت در سایر موارد گردید. در عین حال، ۱/۵ ساعت پس از تجویز مستقل این دوز، افزایش قابل توجه نیتريت سرمی ملاحظه گردید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد نیتريک اکساید مسیرهای نشانه پردازشی وابسته به فرمالين را تحت تاثیر قرار دهد. سلکوکسیب بسته به شرایط تجویز، اثرات متفاوتی را بر تولید نیتريک اکساید محیطی اعمال می‌نماید.

واژگان کلیدی: نیتريک اکساید، فرمالين، سلکوکسیب

۱- استادیار گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی آجا تهران

۲- گروه بیولوژی مولوکولی دانشکده علوم سلولی مولوکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

* نویسنده مسوول: پریچهر حسن زاده

آدرس: تهران، خیابان فاطمی غربی، خیابان سرهنگ اعتماد زاده، دانشگاه علوم پزشکی آجا

پست الکترونیک: pari_has@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۲ ۱۸۸ ۷۷۴۵

دورنویس: ۰۲۱ ۸۸۰۲۱۹۱۳

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۳

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۷/۱۲/۲۴

مقدمه

درد التهابی روندی پاتولوژیک است که متشکل از وقایع پیچیده داخل و خارج سلولی می‌باشد. شناخت مکانیسم‌ها و عوامل مرتبط با بروز درد التهابی همواره در کانون توجه محققین بوده و در همین راستا از مدل‌های مختلفی جهت القای درد التهابی استفاده شده است [۱]. طی سال‌های متمادی، فرمالين به عنوان ابزاری مناسب جهت القای التهاب نورونیک و درد مداوم به کار گرفته شده است. پاسخ دو فازی ایجاد شده در پی تزریق زیر جلدی فرمالين متشکل از فازهای حاد و تونیک بوده که توسط یک فاصله زمانی مشخص قابل تفکیک می‌باشند. فاز اولیه (درد حاد) ناشی از فعال شدن مستقیم گیرنده‌های درد (nociceptors) می‌باشد. فاز دوم منعکس کننده مکانیسم‌های نوروپلاستیک

مرکزی شامل فعال شدن گیرنده‌های (N-methyl-D-;NMDA aspartate) در نخاع بوده و به طور معمول با التهاب بافت‌های محیطی و تسهیل هدایت نخاعی همراه است [۲]. در سال‌های اخیر، نیتريک اکساید (NO) به عنوان مولکول نشانه پردازشی که قابلیت برانگیختن پاسخ‌های بیولوژیک متنوعی را دارد، مورد توجه محققین قرار گرفته است. این مولکول که در واقع محصول اثر آنزیم نیتريک اکساید سنتاز (Nitric Oxide Synthase; NOS) بر ال-آرژنینین (L-arginine) می‌باشد، در هدایت و تعدیل اطلاعات مرتبط با درد نقش مهمی را ایفا می‌کند. NO در نورون-های نخاعی نیز تولید شده و در پردازش پیام‌های درد در نخاع واجد اثر عمده‌ای است [۳]. مطالعات نشان داده‌اند که التهاب ناشی از تزریق فرمالين اغلب همراه با افزایش NOS در نورون-

مواد و روش ها

حیوانات: در تحقیق حاضر از موش های صحرایی نر بالغ از نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شده است. حیوانات ضمن دسترسی به غذای مخصوص و آب آشامیدنی، در سیکل تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شده و قواعد مربوط به استانداردهای اخلاقی مصوب IASP (International Association for the Study of Pain) رعایت گردید [۱۶].

تجویز فرمالین: غلظت های مختلف فرمالین به طور حاد و مزمن تجویز شدند. برای تجویز حاد، سه گروه حیوان در نظر گرفته شد و برای هر یک از گروه ها ۵۰ میکرولیتر از یکی از غلظت های فرمالین ۱ درصد، ۲/۵ درصد، و ۵ درصد در هر دو کف پا تزریق شد (n=۷/گروه). تجویز مزمن فرمالین طی ۴ روز انجام شد و روند تزریق به منظور به حداقل رساندن آسیب بافتی بدین ترتیب بود: در روز اول تزریق، هر یک از غلظت های یاد شده فرمالین به طور دو طرفه به کف پای حیوان تزریق گردید و در روز دوم، تزریقات دو طرفه در سطوح پشتی پا انجام شد. روند تزریق در روزهای سوم و چهارم نیز به ترتیب فوق الذکر تکرار گردید. گروه های کنترل دریافت کننده سالین از روند مشابهی پیروی نمودند (n=۷/گروه). از آنجایی که هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی تغییرات بیوشیمیایی ناشی از تزریق فرمالین بود، لذا رفتارهای ناشی از تجویز فرمالین مورد بررسی قرار نگرفت.

ارزیابی تولید NO محیطی در پی تزریق فرمالین: با توجه به اینکه نیمه عمر NO در سیستم های بیولوژیک فوق العاده کوتاه می باشد؛ لذا در مطالعه حاضر، تعیین غلظت نیتريت (متابولیت NO) در سرم توسط روش گریس (Griess method) که نوعی روش رنگ سنجی است، به عنوان معیاری جهت ارزیابی میزان تولید و فعالیت NO محیطی مد نظر قرار گرفت [۱۷]. در ضمن، با استناد به مطالعات قبلی، زمان بندی مشخصی جهت تعیین غلظت نیتريت در نظر گرفته شد [۱۸، ۱۹]. به طور خلاصه، ۱/۵ و ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد غلظت های مختلف فرمالین و ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق در روش مزمن (ساعت ۱۲۰)، خون-گیری از حیوان و جداسازی سرم در پی ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ انجام شد. به منظور دپروتئینه نمودن سرم، ۲۰۰ میکرولیتر اسید سولفوسالیسیک ۳۵ درصد به ۵۰۰ میکرولیتر سرم افزوده شد. مخلوط حاصل، هر ۵ دقیقه یک بار به مدت ۳۰ دقیقه با دستگاه، هم زده شده و در پی آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی جداشده و

های شاخ خلفی نخاع می باشد؛ به طوری که تجویز مهار کننده-های این آنزیم به صورت خوراکی، داخل صفاقی و یا داخل نخاعی منجر به تضعیف قابل توجه رفتارهای ناشی از تجویز فرمالین می شود [۴]. مطالعه Omote نشان داده است که آبشار محیطی NO-NMDA در تست فرمالین فعال می شود [۵]. نکته جالب توجه در مورد NO، اثرات ظاهرا متناقضی است که در مورد این بیومولکول گزارش شده است. بر اساس برخی گزارشات، NO واجد اثر ضد تب بوده و در پی دودی ناشی از تجویز مخدرها نقش دارد [۷، ۶]. همچنین به نظر می رسد اثر ضد درد استیل کولین تا حدودی ناشی از تولید NO باشد [۸]. پی-دودی ناشی از تجویز نئوستیگمین یا کلونیدین نیز به واسطه تجویز مهار کننده های NOS از بین می رود [۱۰، ۹]. طبق گزارش Rocha، NO در بروز درد التهابی مفصل ناشی از تجویز zymosan، نقش دوگانه ای را ایفا می کند [۱۱]. با عنایت به موارد یاد شده و همچنین اطلاعات اندک گزارش شده در ارتباط با نقش NO محیطی در بروز درد التهابی، هدف عمده از طراحی مطالعه حاضر، ارزیابی میزان تولید NO محیطی در پی تزریق فرمالین (به عنوان مدل درد التهابی) بوده است. از آنجایی که بررسی اثر یک داروی ضد درد و ضد التهاب نیز بر روند مذکور ضروری به نظر می رسید، سلکوکسیب مد نظر قرار گرفت. داروی مذکور که مهار کننده انتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) می باشد، به طور عمده در آرتريت روماتوئید، استئوآرتريت، و دردهای حاد تجویز گردیده و تقریباً فاقد عوارض گوارشی است [۱۲]. طی سال های اخیر مشخص شده است که میزان فعالیت NO و COX-2 تحت شرایط التهاب زا یا وجود انواع بدخیمی ها افزایش می یابد. NO نیز به نوبه خود موجب افزایش بیش از پیش فعالیت COX-2 شده و تجویز مهار کننده های iNOS؛ inducible nitric oxide synthase موجب مهار بیان COX-2 می شود [۱۳]. در همین ارتباط، تعامل بین COX-2 و iNOS جهت ارائه راه کارهای درمانی مناسب تر در بیماری های مزمن التهابی مانند استئوآرتريت مورد عنایت محققین قرار گرفته است [۱۴]. از طرف دیگر، سلکوکسیب واجد اثرات درمانی دیگری از جمله اثر ضد تومور است که به نظر می رسد ناشی از القای آپوپتوز در سلول سرطانی بوده و ارتباطی به مهار COX-2 نداشته باشد [۱۵]. این مورد موجب شده است تا ارزیابی سایر مکانیسم اثرهای سلکوکسیب بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد. لذا در این مطالعه، علاوه بر بررسی اثر سلکوکسیب بر تولید احتمالی NO در پی تزریق فرمالین، اثر تجویز مستقل آن نیز بر میزان تولید NO مد نظر قرار گرفت.

نتایج

خاطر نشان می‌گردد آنالیز واریانس دو طرفه نشان دهنده اثر هر یک از فاکتورهای زمان و غلظت فرمالین بر میزان نیتريت سرمی بود ($P < 0/01$). علاوه بر این، تعامل بین فاکتورهای مذکور نیز مشاهده گردید ($P < 0/05$).

اثر تزریق فرمالین بر تولید NO محیطی: ۱/۵ و ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد فرمالین ۱ درصد، افزایش قابل توجهی در میزان نیتريت سرمی مشاهده نشد. هر چند که ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق مزمن، غلظت نیتريت در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری یافت (نمودار ۱) ($p < 0/001$). ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد و مزمن فرمالین ۲/۵ درصد، میزان نیتريت افزایش چشمگیری یافت (نمودار ۱) ($p < 0/001$), در حالی که ۱/۵ ساعت پس از تزریق حاد اثر قابل توجهی مشاهده نگردید ($p > 0/05$). سنجش غلظت نیتريت در پی تجویز حاد و مزمن فرمالین ۵ درصد در کلیه فواصل زمانی مذکور حاکی از افزایش قابل توجه غلظت نیتريت در مقایسه با گروه کنترل و سایر غلظت‌های فرمالین بود (نمودار ۱، $p < 0/001$).

اثر پیش درمانی با سلوکسیب بر غلظت NO حاصل از تزریق فرمالین: پیش درمانی با سلوکسیب با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم منجر به کاهش نیتريت حاصل از تجویز فرمالین نشد (نمودارهای ۲ و ۳) ($p > 0/05$). پیش درمانی با دوز ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم سلوکسیب، به جز بی تاثیر بودن آن بر میزان نیتريت حاصل از تزریق فرمالین ۵ درصد پس از ۱/۵ ساعت (نمودار ۴) ($p > 0/05$), در تمامی موارد دیگر باعث کاهش چشمگیر میزان نیتريت گردید (نمودار ۴).

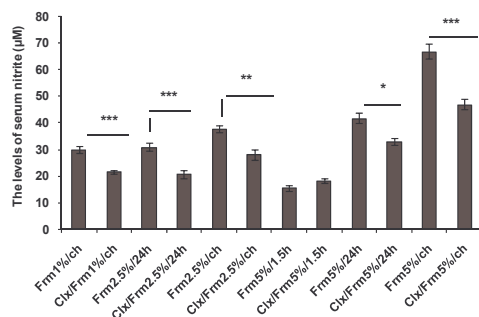
اثر سلوکسیب بر تولید NO محیطی: تجویز حاد و مزمن سلوکسیب با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم در هیچ یک از فواصل زمانی یاد شده، اثر چشمگیری بر میزان نیتريت سرم نداشت (نمودار ۵) ۱/۵ ساعت پس از تجویز حاد دوز ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم سلوکسیب، افزایش معنی داری در غلظت نیتريت سرم ملاحظه گردید (نمودار ۵) ($p < 0/05$), در حالی که ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد (۲۴ ساعت) و مزمن (۱۲۰ ساعت) دوز مذکور، تغییری در میزان نیتريت در مقایسه با گروه کنترل ملاحظه نگردید (نمودار ۵) ($p > 0/05$).

به آن بافر شامل ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آمونیوم ۵ درصد و ۶۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۵ درصد افزوده شد. PH ترکیب حاصل در حدود ۸ تنظیم شده و با حجم مساوی از واکنش گر Griess شامل (sulphanilic acid (%1w v⁻¹ و N-(1-naphthyl) ethylenediamide (0.1 w v⁻¹) در اسید فسفریک ۵ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نوری نمونه ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر در برابر ترکیب آب مقطر و معرف گریس قرائت گردید. غلظت نیتريت با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نیتريت سدیم (۱۰۰-۱ میکرومولار) در برابر جذب نوری آن تعیین شد.

ارزیابی اثر سلوکسیب بر میزان NO حاصل از تجویز فرمالین: در صورت افزایش غلظت نیتريت در پی تجویز حاد یا مزمن هر یک از غلظت‌های فرمالین، در مرحله بعد، سلوکسیب (Searle) با دوزهای ۱۰، ۲۰، و ۴۰ میلی گرم (حلال: DMSO; Dimethyl Sulfoxide; Sigma) ۲۰ در صد در سالیان) ۲۰ دقیقه قبل از تجویز فرمالین به طور داخل صفاقی تزریق شد. سپس، مراحل فوق الذکر جهت سنجش میزان نیتريت سرمی تکرار گردید.

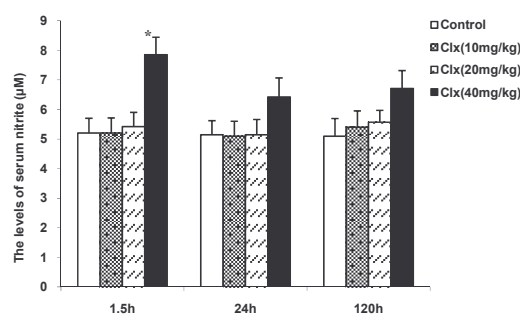
اثر تجویز مستقل سلوکسیب بر تولید NO محیطی: این دارو با دوزهای یاد شده تحت تجویز حاد و مزمن (طی ۴ روز) قرار گرفت. سپس میزان نیتريت سرمی در فواصل زمانی مشابه (۱/۵ و ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد، و ۲۴ ساعت پس از تجویز مزمن؛ ساعت ۱۲۰) تعیین گردید [۱۷]. گروه های کنترل حجم معادلی از DMSO ۲۰ درصد در سالیان را دریافت کردند.

آزمون آماری: ANOVA دو طرفه همراه با تست تعقیبی توکی جهت آنالیز میزان نیتريت سرمی در نظر گرفته شد. در ضمن، ارزیابی اثرات هر یک از متغیرهای مستقل شامل زمان و غلظت فرمالین بر میزات نیتريت و همچنین تعامل احتمالی بین آنها نیز مد نظر قرار گرفت. هر یک از فاکتورهای مذکور به ترتیب دارای سه سطح، (۱/۵، ۲۴ و ۱۲۰ ساعت) و (۱، ۲/۵ و ۵ درصد) بودند. یادآور می شود قبل از این مرحله، آزمون Kolmogorov-Smirnov به منظور ارزیابی توزیع نرمال داده ها استفاده شد و در صورت لزوم، تبدیل داده ها به منظور نرمال نمودن و کاهش پراکندگی داده‌ها انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان شده اند. $p < 0/05$ به عنوان حداقل سطح تفاوت معنی-دار تلقی گردید.



نمودار ۴- اثر پیش درمانی با دوز ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم سلکوکسیب بر میزان نیتريت سرمی حاصل از تجویز فرمالین: پیش درمانی با دوز مذکور به جز عدم تاثیر آن بر میزان نیتريت که ۱/۵ ساعت پس از تزریق فرمالین ۵ درصد تولید شده بود، منجر به کاهش قابل توجه نیتريت در سایر موارد گردید. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده اند.

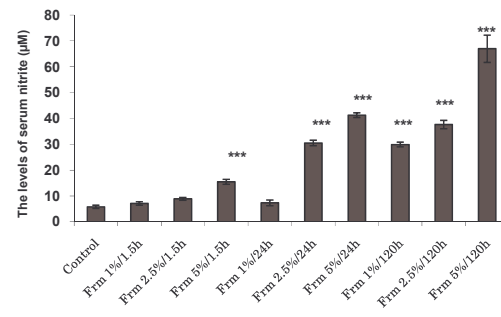
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$



نمودار ۵- اثر تجویز دوز های مختلف سلکوکسیب بر میزان نیتريت سرمی: ۱/۵ ساعت پس از تجویز حاد سلکوکسیب با دوز ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم، افزایش معنی داری در میزان نیتريت ملاحظه گردید. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده اند. * $p < 0.05$

بحث

جراحت بافتی یا حضور ماده خارجی در بدن منجر به آغاز وقایع پیچیده پاتوفیزیولوژیکی می شود که می تواند به صورت درد التهابی نمود یابد. در مطالعه حاضر، سه غلظت مختلف فرمالین به منظور ارزیابی نسبی تغییرات بیوشیمیایی حاصل شده شامل سنجش میزان تولید NO مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه، تجویز فرمالین به طور وابسته به غلظت و زمان باعث افزایش میزان نیتريت سرم گردید که نقش فرمالین ۵ درصد به مراتب بیش از سایر غلظت ها بود (نمودار ۱). به نظر می رسد تزریق مکرر فرمالین ۵ درصد که تحریک دردزای شدیدتری را اعمال می کند [۱]، پیامدهای چشمگیرتری از جمله افزایش تولید نیز در پی داشته باشد یادآور می شود تزریق فرمالین هایپراآلژزای



نمودار ۱- تجویز حاد و مزمن فرمالین ۵ درصد در کلیه فواصل زمانی موجب افزایش قابل توجه نیتريت در مقایسه با گروه کنترل و غلظت-های ۱ درصد و ۲/۵ درصد شد. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده اند. *** $p < 0.001$

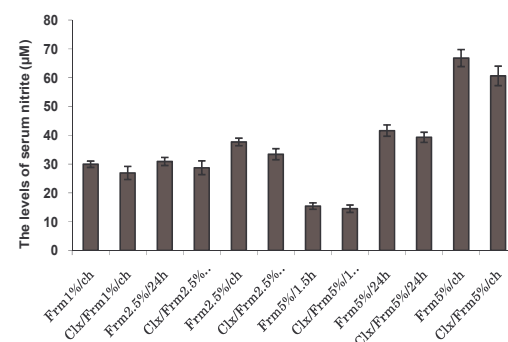
1.5h/...: ۱/۵ ساعت پس از تجویز حاد

24h/...: ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد

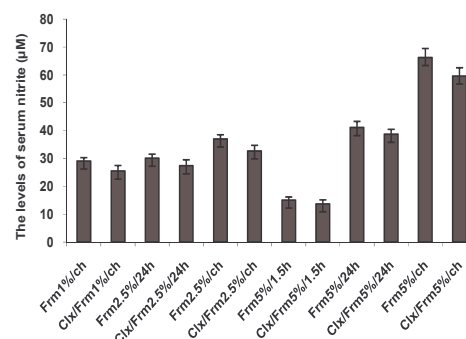
ch/...: ۲۴ ساعت پس از تجویز مزمن

Clx/...: پیش درمانی با سلکوکسیب

Frm: فرمالین



نمودار ۲- اثر پیش درمانی با سلکوکسیب ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم بر میزان نیتريت سرمی حاصل از تجویز فرمالین: با تجویز دوز یاد شده، تغییر چشمگیری در میزان نیتريت حاصله ملاحظه نشد. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده اند.



نمودار ۳- اثر پیش درمانی با سلکوکسیب ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم بر غلظت نیتريت سرمی حاصل از تجویز فرمالین: اثر قابل توجهی در اثر تجویز دوز مذکور ایجاد نشد. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده اند.

ارتباط با تجویز مستقل سلوکوکسیب بر میزان تولید NO محیطی ملاحظه گردید، افزایش میزان نیتريت سرمی ۱/۵ ساعت پس از تجویز سلوکوکسیب با دوز ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم بود (نمودار ۵). در نگاه اول، یافته اخیر با توجه به نقش NO در درد و کاهش تولید آن در پی پیش درمانی با سلوکوکسیب، یک تناقض به نظر می‌رسد. هر چند که عدم توانایی دوز مذکور در کاهش نیتريت حاصل از تجویز فرمالین ۵ درصد پس از گذشت ۱/۵ ساعت (نمودار ۴)، ممکن است تا حدودی تناقض یاد شده را حذف کند. از طرف دیگر، همان گونه که قبلاً نیز اشاره گردید، در سال های اخیر نقش NO در بروز بی دردی نیز از جانب برخی از محققین عنوان شده است. بر اساس گزارشات، این غلظت‌های بالای بیومولکول به طور معمول در بروز درد نقش داشته و غلظت‌های کم آن در ظهور بی دردی ایفای نقش می‌نماید [۲۸]. بدین ترتیب به نظر می‌رسد یک غلظت پایه از NO در بدن موجود باشد که به عنوان جزء تاثیرگذار در مکانیسم‌های دفاعی یا واکنش‌های جبرانی بر علیه محرک‌های دردزا عمل نماید. در همین راستا، طی سالیان اخیر عرضه داروهای ضد درد مهار کننده COX-2 که واجد استخلاف آزاد کننده NO باشند، رو به افزایش بوده است. این داروها نسل جدیدی از داروهای ضد درد و ضد التهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) بوده و به دلیل توانایی رهایش NO، سمیت گوارشی کمتری در مقایسه با NSAID های استاندارد دارند. این داروها مانع از تجمع پلاکتی نیز می‌شوند. AZD3582 ترکیبی از این دسته است که طی سال‌های اخیر به دلیل اثر ضد درد مناسب و محافظت از دستگاه گوارش مورد توجه محققین قرار گرفته و به نظر می‌رسد از پتانسیل درمانی لازم جهت ارائه به مراکز بالینی برخوردار باشد [۲۹]. به طور کلی، یافته‌های مرتبط با اثر سلوکوکسیب بر میزان نیتريت مؤید این نکته می‌باشند که سلوکوکسیب واجد اثرات مختلفی بر میزان تولید NO محیطی است؛ به طوری که این دارو مانع از افزایش بیش از حد NO در شرایط التهابی شده و در عین حال در اولین مراحل اثر درمانی خود موجب تحریک تولید NO می‌گردد. البته میزان افزایش مذکور در مقایسه با NO حاصل از درد التهابی به مراتب کمتر است (مقایسه نمودارهای ۱ و ۵). با توجه به نمودار ۵ ملاحظه می‌شود ۲۴ ساعت پس از تجویز حاد و مزمن سلوکوکسیب افزایش چشمگیری در میزان نیتريت ایجاد نمی‌شود. علت مورد مذکور احتمالاً مربوط به نیمه عمر یک ساعته سلوکوکسیب است. لذا به نظر نمی‌رسد در فواصل زمانی ذکر شده (ساعات ۲۴ و ۱۲۰) غلظت مناسبی از دارو در خون جهت القای تولید NO موجود باشد. نمودار ۵ نشان می‌دهد که تجویز دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی

طولانی مدتی را در مناطق وسیعی از بدن القاء نموده و غالباً همراه با تولید و تجمع یون‌ها، پپتیدها، لیپیدها، و سایتوکاین‌های التهابی می‌باشد که در نهایت فعال شدن اعصاب محیطی و مرکزی و همچنین القای سیت سلولی را در پی خواهد داشت [۲]. افزایش تولید NO در پی تزریق فرمالین، احتمالاً در اثر افزایش فعالیت آنزیم iNOS می‌باشد که دارای نقش بارزی در بروز ضایعات التهابی، دردهای مزمن، و القای آسیب سیت سلولی در نورون‌ها می‌باشد [۲۰]. یافته اخیر، تائیدی بر نتایج مطالعات قبلی است که مبین نقش NO در مکانیسم‌های ایجاد و هدایت درد در سیستم‌های عصبی محیطی و مرکزی می‌باشند [۲۲، ۲۱]. آنچه که در ارتباط با افزایش تولید NO محیطی در پی تزریق فرمالین حایز اهمیت بیشتری است، بالا بودن میزان نیتريت سرم علی‌رغم گذشت ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق فرمالین می‌باشد (نمودار ۱). این مورد، نشان دهنده تداوم درد التهابی ناشی از تزریق فرمالین تا مدت‌ها پس از اعمال تحریک اولیه بوده و همچنین منعکس کننده روندی پاتولوژیک همراه با تغییرات دینامیک و پیش رونده می‌باشد. پیش درمانی با دوز ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم سلوکوکسیب به عنوان داروی ضد درد و ضد التهاب سبب کاهش چشمگیر میزان نیتريت حاصل از تزریق فرمالین گردید (نمودار ۴)؛ در حالی که با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم داروی مذکور، اثر قابل توجهی در این خصوص ملاحظه نگردید (نمودارهای ۲ و ۳). این یافته‌ها علاوه بر تائید نقش درد التهابی حاصل از تزریق فرمالین در القای تولید NO، نشان می‌دهند که سلوکوکسیب روندهای اکسایتوتوکسیک مرتبط با درد التهابی را به طور وابسته به دوز تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابر گزارش Ozgocmen، غلظت نیتريت سرمی در بیماران دریافت کننده سلوکوکسیب، کاهش قابل توجهی می‌یابد [۲۳]. علاوه بر این، Matsuda نیز نشان داده است که سلوکوکسیب قادر است افزایش NO ناشی از osteoarthritic chondrocytes را کاهش دهد [۲۴]. نظر به افزایش فعالیت NO و COX-2 تحت شرایط التهابی، تشدید فعالیت COX-2 توسط NO، و تعامل بین iNOS و COX-2 در مدل‌های التهابی [۲۵]، به نظر می‌رسد سلوکوکسیب اثر درمانی خود را تا حدودی از طریق دخالت در عملکرد iNOS اعمال می‌کند. به عبارت دیگر، سلوکوکسیب علاوه بر مهار COX-2 محیطی و نخاعی [۱۲]، مسیر وابسته به NO را نیز تحت تأثیر قرار داده و اثر مهاری خود را بر پیامدهای درد التهابی اعمال می‌کند. البته در همین ارتباط نباید نقش سایر مکانیسم‌ها از جمله مهار NF-kappa B (فاکتور هسته ای دخیل در بروز درد) یا تغییر در فعالیت کینازهای سلولی [۲۷، ۲۶] را نادیده گرفت. آنچه که در

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این مطالعه مبین نقش NO در روندهای التهابی و ضد التهابی می باشند. با توجه به افزایش قابل توجه NO در پی تزریق غلظت های مختلف فرمالین، به نظر می رسد القای درد التهابی به مدت طولانی تر می تواند آسیب و سمیت محیطی را در پی داشته باشد. لذا تجویز مهار کننده و یا خنثی کننده های NO را می توان به عنوان عامل محافظت کننده در برابر عوارض ناشی از القای این نوع از درد پاتولوژیک در نظر گرفت. در ضمن، مطالعه حاضر نشان داد که سلوکسیب علاوه بر مکانیسم اثرهای شناخته شده، مسیرهای وابسته به NO را نیز جهت بروز اثرات خود تحت تأثیر قرار می دهد. البته اثر مذکور بسته به شرایط تجویز می تواند کاملاً متفاوت باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله، نویسندگان تشکر صمیمانه خود را خدمت جناب آقای دکتر زواران، عضو هیات علمی گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس، و پرسنل محترم گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی ایران بابت اهدای برخی از مواد مصرفی تقدیم می دارند.

گرم/کیلوگرم سلوکسیب موجب افزایش نیتريت سرامي در مقایسه با گروه کنترل نشد. این یافته بار دیگر اهمیت دوز- پاسخ را خاطر نشان می سازد. در مجموع، نتایج این مطالعه در ارتباط با عملکرد سلوکسیب موید این نکته است که داروی مذکور جزو داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی نسل دوم است که محرک تولید NO می باشد. مطالعات قبلی نشان داده اند که افزایش میزان NO محیطی منجر به افزایش cGMP، اتساع عروق، افزایش جریان خون بافتی، حفظ پتانسیل طبیعی غشاء، و در نهایت موجب تضعیف درد می شود [۳۰]. نتایج یک مطالعه حاکی از این است که سلوکسیب به طور منحصر به فرد موجب اتساع عروق کرونر کوچکچه هندی و اتساع آئورت در موش صحرایی شده و همچنین دارای اثر تقویت کننده در مسیر نشانه پردازی NO/cGMP به واسطه مهار اختصاصی فسفودی استراز ۵ می باشد [۳۱]. تحریک تولید NO توسط سلوکسیب، شاید تا حدودی کم خطر بودن این دارو را در سیستم قلبی عروقی به ذهن متبادر سازد؛ هر چند که مورد اخیر همچنان به عنوان یک موضوع بحث برانگیز مطرح می باشد. در مجموع، با عنایت به یافته های دور از انتظار در مورد سلوکسیب، به نظر می رسد داروی مذکور همچنان با ناشناخته هایایی همراه است.

References:

- [1] Banna NR, Saadé NE, Atweh SF, Jabbur SJ. Prolonged discharge of wide-dynamic-range spinal neurons evoked by formaldehyde injected in their cutaneous receptive fields. *Exp Neurol* 1986; 93(1):275-8.
- [2] Dickenson AH, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987;30(3):349-60.
- [3] Anbar M, Gratt BM. Role of nitric oxide in the physiopathology of pain. *J Pain Symptom Manage* 1997;14(4):225-54.
- [4] Przewlocka B, Micka J, Capone F, Machelska H, Pavone F. Intrathecal oxotremorine affects formalin-induced behavior and spinal nitric oxide synthase immunoreactivity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 62(3):531-6.
- [5] Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Nakayama Y, Hazama K, Namiki A. Activation of peripheral NMDA-nitric oxide cascade in formalin test. *Anesthesiology* 2000;93(1):173-8.
- [6] Benamar K, Geller EB, Adler MW. Role of the nitric oxide pathway in kappa-opioid-induced hypothermia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303(1):375-8.
- [7] Homayoun H, Khavandgar S, Dehpour AR. The selective role of nitric oxide in opioid-mediated footshock stress antinociception in mice. *Physiol Behav* 2003;79 (4-5):567-73.
- [8] Patil CS, Jain NK, Singh VP, Kulkarni SK. Cholinergic-NO-cGMP mediation of sildenafil-induced antinociception. *Indian J Exp Biol* 2004;42(4):361-7.
- [9] Przesmycki K, Dzieciuch JA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z. Nitric oxide modulates spinal antinociceptive effect of clonidine but not that of baclofen in the formalin test in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 1999;9(1-2):115-21.
- [10] Chen SR, Khan GM, Pan HL. Antiallodynic effect of intrathecal neostigmine is mediated by spinal nitric oxide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Anesthesiology* 2001;95(4): 1007-12.
- [11] da S Rocha JC, Peixoto ME, Jancar S. de Q Cunha F. de A Ribeiro R. da Rocha FA. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* 2002;136(4):588-96.
- [12] Frampton JE, Keating GM. Celecoxib: a review of its use in the management of arthritis and acute pain. *Drugs* 2007;67(16):2433-72.

- [13] Park SW, Lee SG, Song SH, Heo DS, Park BJ, Lee DW, et al. The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003;107(5):729-738.
- [14] Needleman P, Manning PT. Interactions between the inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) pathways: implications for therapeutic intervention in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 1999;7(4):367-70.
- [15] Yoshinaka R, Shibata MA, Morimoto J, Tanigawa N, Otsuki Y. COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. *Anticancer Res* 2006; 26(6B): 4245-54.
- [16] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109-10.
- [17] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126(1):131-8.
- [18] Amini H, Ahmadiani A. Increase in testosterone metabolism in the rat central nervous system by formalin-induced tonic pain. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;74(1):199-204.
- [19] Zhang FY, Wan Y, Zhang ZK, Light AR, Fu KY. Peripheral formalin injection induces long-lasting increases in cyclooxygenase 1 expression by microglia in the spinal cord. *J Pain* 2007;8(2):110-7.
- [20] Hassanzadeh P, Ahmadiani A. Nitric oxide and c-Jun N-terminal Kinase are involved in the development of dark neurons induced by inflammatory pain. *Synapse* 2006;59(2):101-6.
- [21] Robbins RA, Grisham MB. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(6):857-60.
- [22] Levy D, Zochodne DW. NO Pain: Potential Roles of Nitric Oxide in Neuropathic Pain. *Pain Pract* 2004; 4(1):11-18.
- [23] Ozgocmen S, Ardicoglu O, Erdogan H, Fadillioglu E, Gudul H. In vivo effect of celecoxib and tenoxicam on oxidant/anti-oxidant status of patients with knee osteoarthritis. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35(2):137-43.
- [24] Matsuda K, Nakamura S, Matsushita T. Celecoxib inhibits nitric oxide production in chondrocytes of ligament-damaged osteoarthritic rat joints. *Rheumatol Int* 2006;26(11):991-5.
- [25] Clancy R, Varenika B, Huang W, Ballou L, Attur M, Amin AR, et al. Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J Immunol* 2000; 165(3):1582-87.
- [26] Yoshinaka R, Shibata MA, Morimoto J, Tanigawa N, Otsuki Y. COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. *Anticancer Res* 2006;26(6B):4245-54.
- [27] Kirkova M, Alexandova A, Kesiova M, Tsvetanova E, Georgieva A, Todorov S. Potential antioxidant activity of celecoxib and amtolmetin guacyl: in vitro studies. *Auton Autacoid Pharmacol* 2007;27(1):13-18.
- [28] Gladwin MT, Raat NJH, Shiva S, Dezfulian C, Hogg N, Kim-Shapiro DB, et al. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(5):H2026-H2035.
- [29] Michael Hill C, Sindet-Pederson S, Seymour RA, Hawkesford JE 2nd, Coulthard P, Lamey PJ, et al. Analgesic efficacy of the cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donor AZD3582 in postoperative dental pain: Comparison with naproxen and rofecoxib in two randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther* 2006;28(9):1279-95.
- [30] Arasapam G, Scherer M, Cool JC, Foster BK, Xian CJ. Roles of COX-2 and iNOS in the bony repair of the injured growth plate cartilage. *J Cell Biochem* 2006;99(2):450-61.
- [31] Klein T, Eltze M, Grebe T, Hatzelmann A, Kömhoff M. Celecoxib dilates guinea-pig coronaries and rat aortic rings and amplifies NO/cGMP signaling by PDE5 inhibition. *Cardiovasc Res* 2007;75(2):390-7.