● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ سیزدهم، شماره ۱، ص ۳۶-۲۹، ۱۳۸۴

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر L-NAME بر القاء ضددردی مرفین در تست فرمالین

دکتر مختار مختاری[1*]، دکتر مهرداد شریعتی[2] و لیلا رضائیان[3]

خلاصه

مقدمه: L- نیتروآرژنین متیل‌استر (L.NAME) یکی از آنالوگ‌های L- آرژنین می‌باشد و به عنوان مهارکننده آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز عمل می‌کند. نیتریک‌اکساید سنتاز آنزیمی است که باعث سنتز نیتریک‌اکساید می‌شود. از آنجا که نیتریک‌اکساید به عنوان میانجی درد شناخته شده است بنابراین تأثیر L-NAME در کاهش و تسکین درد حائز اهمیت است. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی تأثیر L-NAME بر روی اثر ضددردی القاء شده توسط مرفین و تداخل عمل این دو دارو با استفاده از آزمون فرمالین انجام شد.

روش: آزمایشات بر روی ۷۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار، با وزن تقریبی ۲۳۰-۱۸۰ گرم انجام شد. حیوانات مورد آزمایش به ۷ گروه ده‌تایی شامل گروه کنترل، شاهد، گروه دریافت‌کننده مرفین به تنهایی به میزان ۲mg/kg و گروه‌های دریافت‌کننده مرفین به میزان ۲mg/kg همراه با L-NAME به میزان ۴۰mg/kg، ۲۰، ۱۵ و گروه دریافت کننده L-NAME به تنهایی به میزان ۴۰mg/kg تقسیم شدند. تزریق داروها به صورت داخل صفاقی و پانزده دقیقه قبل از شروع آزمون فرمالین انجام گردید. به گروه شاهد نیز حجمی برابر با مرفین از سرم فیزیولوژی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. دقایق ۵-۰ و ۶۰-۱۶، به ترتیب به عنوان مراحل حاد و مزمن درد در نظر گرفته شدند. پس از ثبت پاسخ‌های رفتاری و میانگین نمره درد گروه‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: L-NAME موجب کاهش معنی‌دار درد در هر دو مرحلهٔ آزمون فرمالین گردید. همچنین گروه‌های دریافت‌کننده مرفین همراه با مقادیر مختلف L-NAME در مقایسه با گروه‌هایی که یکی از آنها را دریافت کرده بودند، کاهش درد بیشتری به‌ویژه در مرحله مزمن آزمون فرمالین در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های حاصل از این تحقیق، این دو دارو به صورت سینرژیک عمل می‌نمایند و در نتیجه تأثیر ضددردی مرفین تقویت می‌شود.

واژه‌های کلیدی: L-NAME، مرفین، ضددردی، تست فرمالین

۱-استادیار فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون ۲- استادیار جنین‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون
۳- کارشناس ارشد علوم جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون

* **نویسنده مسؤول:** گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون ● **آدرس پست الکترونیک:** mokhtar_mokhtary@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۳/۱۸ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۵/۲/۲۷ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۵/۳/۱۰

مقدمه

درد از جمله تجاربی است که هر انسانی در طول عمر خود با آن مواجه می‌شود. درد از یک طرف هشداری برای آگاهی از آسیب بافتی است و از طرف دیگر احساس ناخوشایندی است که همواره روح و جسم انسان را مورد حمله قرار می‌دهد (۹).

بیماری، التهاب و آسیب به سیستم عصبی مرکزی و محیطی موجب تغییرات بارز در مسیرهای درد مانند افزایش تحریک‌پذیری، تغییر در تنظیم بیان ژن و مولکول‌های جدید نظیر نوروترانسمیترها، آنزیم‌ها و گیرنده‌ها می‌گردد. ابتلا به بعضی دردها در دراز مدت اثرات نامطلوب روحی و روانی بر فرد تحمیل می‌کند. به همین دلیل بشر همیشه به دنبال یافتن راه‌حلی برای از بین بردن و یا کاهش درد بوده است و تاکنون تلاش‌های مؤثر زیادی در زمینه شناخت مکانیسم‌های درد و درمان انواع آن صورت گرفته است (۵).

شواهد زیادی مبنی بر دخالت سیستم‌های نوروشیمیایی مانند سیستم اوپیوئیدی در کنترل درد وجود دارند (۱۳). داروهای اوپیوئیدی به‌ویژه مرفین کارآیی بالایی در تسکین درد حاد و مزمن دارند، ولی به دلیل ایجاد تحمّل و اعتیاد پس از مصرف طولانی مدت یا مکرر، مصرف آنها در تسکین دردهای مزمن محدود شده است (۷،۲۰). داروهایی از قبیل L- نیتروآرژنین متیل‌استر (L-NAME) در صورت استفاده هم‌زمان با مرفین، اثر ضددردی و تحمّل ایجاد شده توسط مرفین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲). گیرنده‌های N ـ متیل ـD ـ آسپارتات در انتقال درد ناشی از تحریکات دردناک که در طناب نخاعی به‌وجود می‌آید و نیز افزایش قابلیت تحریک نخاعی که در شرایط درد مزمن اتفاق می‌افتد، نقش دارند. با فعال شدن این گیرنده‌ها کلسیم وارد سلول‌های عصبی شده و سپس مجموعه‌ای از رویدادهای وابسته به کلسیم فعال می‌شوند(۸). از جمله این رویدادها، فعال شدن نیتریک اکسایدسنتاز و تولید نیتریک اکساید است (۱۵).

نیتریک‌اکساید یک نوروترانسمیتر شناخته شده است که نقش مهمی در اعمال حیاتی پستانداران ایفا می‌کند، ولی نقش آن در کنترل درد و تبدیل اثرات ضد دردی اوپیوئیدها متفاوت گزارش شده است (۱۶). سایر مطالعات نشان دهنده نقش نیتریک‌اکساید در ایجاد حساسیت نسبت به درد و تداخل عمل آن با مرفین است (۲۱). به همین منظور امروزه برای تشخیص بعضی از عملکردهای فیزیولوژیکی نیتریک اکساید از مهارکننده‌های بیوسنتز نیتریک اکساید، یعنی L-NAME استفاده می‌شود (۱۲). مطالعات نشان می‌دهد التهاب های فرضی که در پاسخ به فرمالین بوجود می‌آید به دنبال تولید نیتریک‌اکساید ایجاد می‌شود و در گیرنده‌های دلتا و کاپای اوپیوئیدی تغییر ایجاد می‌کند. این عمل بعد از التهاب‌های مزمن نیز دیده می‌شود (۲۲). با توجه به اینکه تجویز مرفین با وابستگی و تحمل نسبت به این دارو همراه است بنابراین تجویز داروهایی که استفاده از آنها همراه با مرفین اثر ضددردی آن را تقویت کند و نیز میزان مصرف را کاهش دهد بسیار حائز اهمیت است. همچنین مطالعات انجام شده قبلی نشان داده است L-NAME اثر ضددردی القاء شده توسط مرفین را در تست Tail-flick افزایش می‌دهد ولی در تست Hotplate این افزایش ضددردی مشاهده نمی‌شود. بنابراین با توجه به اختلاف نظرهایی که در مورد تأثیر نیتریک‌اکساید بر روی اثر ضددردی مرفین وجود دارد، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر مقادیر مختلف L-NAME همراه با مرفین و همچنین تأثیر L-NAME و مرفین به تنهایی بر دردهای ایجادشده در آزمون فرمالین صورت گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه آزمایشگاهی و تجربی تعداد ۷۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۳۰-۱۸۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در قفس‌های استاندارد و در شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به آب و غذای کافی نگهداری می‌شدند. کلیه آزمایش‌ها در ساعات مشخصی از روز صورت گرفت. به منظور بررسی اثر مرفین همراه با L-NAME بر آستانه درد ناشی از فرمالین، حیوانات به ۷ گروه ده‌تایی تقسیم شدند. حیوانات گروه اول (کنترل) فقط فرمالین دریافت کردند. حیوانات گروه دوم (گروه شاهد)، حجمی معادل با مرفین از سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. حیوانات گروه سوم، مرفین به تنهایی به میزان ۲mg/kg به صورت داخل صفاقی

دریافت کردند. به حیوانات گروه‌های چهارم، پنجم، ششم L-NAME به ترتیب با مقادیر ۱۵، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۱۵ دقیقه بعد ۲mg/kg مرفین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در گروه هفتم فقط L-NAME به میزان ۴۰mg/kg به تنهایی تزریق شد که بهترین پاسخ را در گروه‌های قبل نشان داده بود. تزریق L-NAME، مرفین و سرم فیزیولوژی ۱۵ دقیقه قبل از تزریق فرمالین ۲/۵٪ یعنی شروع تست فرمالین انجام شد. تزریق و ثبت پاسخ‌های رفتاری حیوان به صورت دوسویه کور (Double blind) انجام گرفت. به منظور آشنایی حیوان با محیط آزمایش و رفع استرس سه روز قبل از آزمایش و همچنین قبل از هر آزمایش آنها هر بار به مدت نیم ساعت، در محفظه شیشه‌ای قرار گرفتند. ده دقیقه بعد از تزریق داروها یا سرم فیزیولوژی ۵۰ میکرولیتر محلول آبی فرمالین ۲/۵٪ به کف پای راست حیوان تزریق گردید و بلافاصله در محفظه آزمایش، از جنس پلکسی گلاس با ابعاد ۲۹×۲۹×۳۰ قرار می‌گرفتند. پاسخ رفتاری درد به کمک آینه‌ای که با زاویه ۴۵ درجه نسبت به سطح افق در زیر محفظه تعبیه شده بود، مشاهده و هر ۱۵ ثانیه یک بار پاسخ حرکتی درد به صورت اعداد ۰، ۱، ۲، ۳، (مطابق روش Dennis, Dubuisson) به شرح زیر ثبت می‌گردید (۱۹):

عدد صفر، در مواردی که حیوان هنگام راه رفتن تعادل کامل داشت و وزنش روی هر دو پا توزیع شده بود.

عدد ۱، برای هنگامی که حیوان وزن بدن خود را روی پای تزریق شده، تحمل نمی‌کرد و یا در موقع راه رفتن مشکل داشت.

عدد ۲، برای وقتی که حیوان پنجه دردناک را بلند می‌کرد و هیچ‌گونه تماسی با کف محفظه نداشت.

عدد ۳، برای زمانی که حیوان پنجه دردناک را می‌لیسید یا به شدت تکان می‌داد.

تعداد این داده‌های کمی به صورت ۱۲ بلوک ۵ دقیقه‌ای شمارش و بر اساس فرمول نمره درد (Pain score) در هر مقطع زمانی ثبت شد. ثبت داده‌ها تا ۶۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین ادامه یافت. میانگین نمره درد در هر بلوک طبق فرمول زیر محاسبه شد (۸،۲۰):

$$\text{Pain score}=\frac{0T_0+1T_1+2T_2+3T_3}{300SEC}$$

در میانگین نمره درد T_0 و T_1 و T_2 و T_3 تعداد ۱۵ ثانیه‌هایی است که حیوان در یک دوره ۵ دقیقه‌ای به ترتیب رفتارهای ۱،۰، ۲، ۳ را نشان داد. در کلیه گروه‌ها (۵-۰) دقیقه به عنوان مرحله حاد و زمان (۶۰-۱۶) دقیقه به عنوان مرحله مزمن در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج بین گروه‌های شاهد و تجربی با استفاده از تست Kroscal vallis انجام شد و برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون Tukey استفاده گردید. معیار معنی‌دار بودن $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

آنالیز آماری نتایج نشان می‌دهد که L-NAME به تنهایی و در همه مقادیر مورد استفاده همراه با مرفین باعث کاهش معنی‌دار نمره درد در هر دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین نسبت به گروه کنترل و شاهد می‌شود ($P\leq ۰/۰۵$). امّا تزریق L-NAME همراه با مرفین دارای اثرات بی‌دردی موضعی بیشتری نسبت به زمانی است که L-NAME به تنهایی تزریق شود، دارد (جدول۱ و نمودار۱).

جدول ۱: *مقایسه میانگین نمره درد در گروه‌های مورد آزمایش*

مراحل آزمون / گروه	مرحله حاد $\bar{X}\pm SD$	مرحله مزمن $\bar{X}\pm SD$
کنترل	۰/۱۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۲ ± ۰/۰۰۲
شاهد	۰/۱۷ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۲
L-NAME (۴۰mg/kg)	۰/۱۴ ± ۰/۰۰۴*	۰/۰۹ ± ۰/۰۰۷*
مرفین (۲mg/kg) + L-NAME (۱۵mg /kg)	۰/۱۳ ± ۰/۰۰۳*	۰/۰۷ ± ۰/۰۰۲*
مرفین (۲mg/kg) + L-NAME (۲۰mg/kg)	۰/۱۲ ± ۰/۰۰۴*	۰/۰۵ ± ۰/۰۰۱*
مرفین (۲mg/kg) + L-NAME (۴۰mg/kg)	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۵*	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۲*

علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و شاهد است ($P\leq ۰/۰۵$).

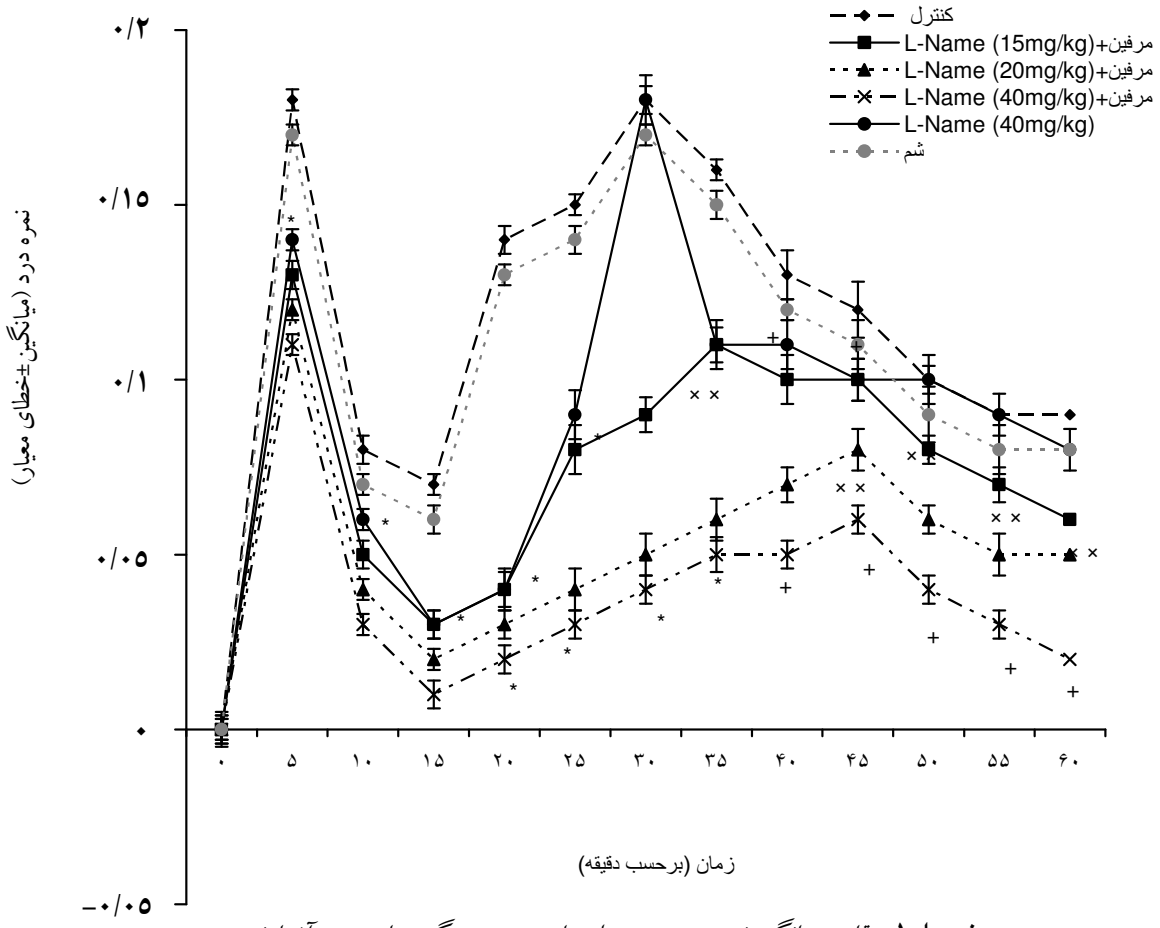
n=۱۰ * ($P\leq ۰/۰۵$)

جدول ۲: *مقایسه میانگین نمره درد در گروه‌های مورد آزمایش*

مراحل آزمون / گروه	مرحله حاد $\bar{X}\pm SD$	مرحله مزمن $\bar{X}\pm SD$
کنترل	۰/۱۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۲ ± ۰/۰۰۲
شاهد	۰/۱۷ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۲
مرفین (۲mg/kg)	۰/۱۵ ± ۰/۰۰۲*	۰/۱ ± ۰/۰۰۱*
مرفین(۲mg/kg) + L-NAME (۱۵mg /kg)	۰/۱۳ ± ۰/۰۰۳*	۰/۰۷ ± ۰/۰۰۲*
مرفین(۲mg/kg) + L-NAME (۲۰mg/kg)	۰/۱۲ ± ۰/۰۰۴*	۰/۰۵ ± ۰/۰۰۱*
مرفین(۲mg/kg) + L-NAME (۴۰mg/kg)	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۵*	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۲*

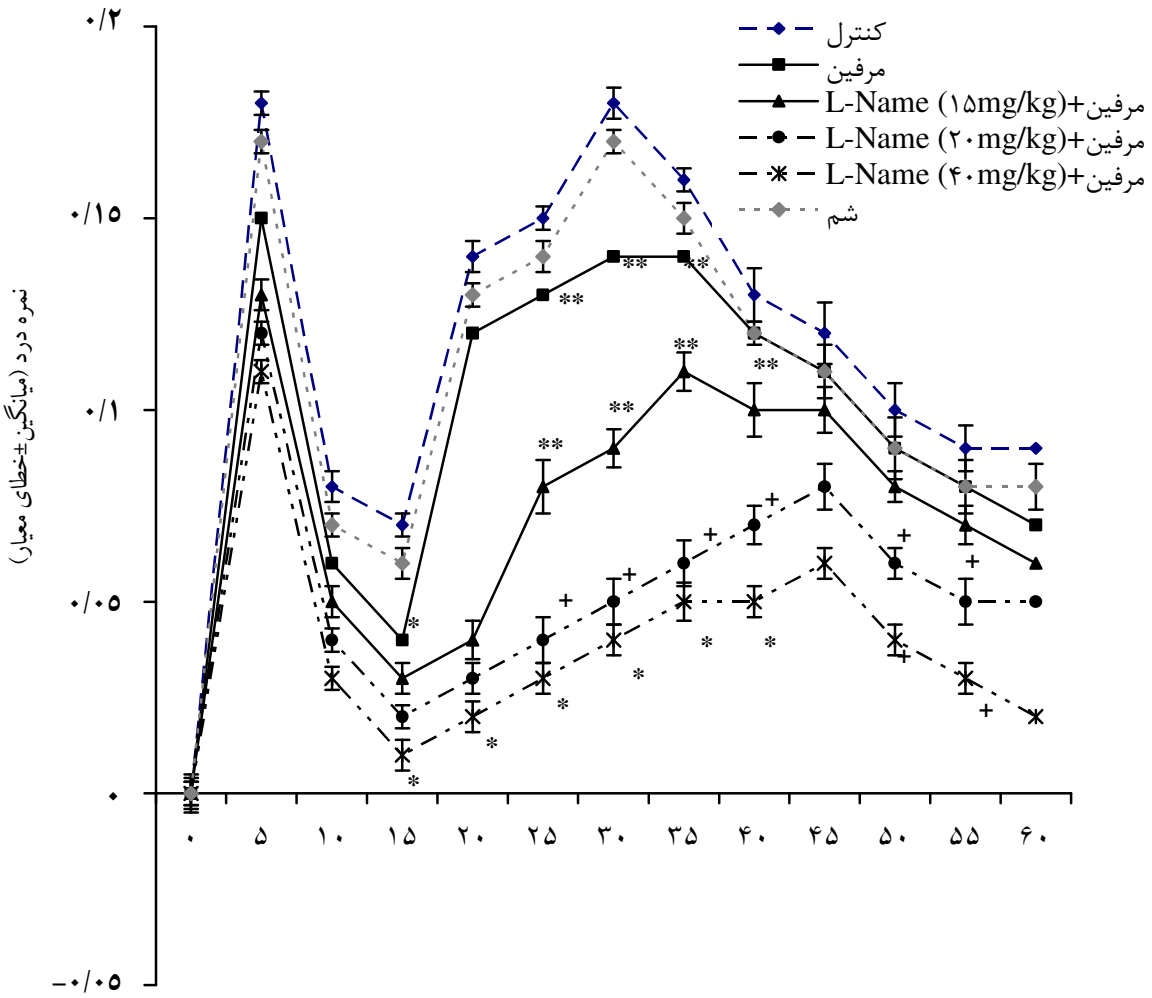
علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و شاهد است ($P\leq ۰/۰۵$).

n=۱۰ *** ($P\leq ۰/۰۵$)**



نمودار ۱: *مقایسه میانگین نمره درد در مرحله حاد و مزمن در گروه‌های مورد آزمایش*

نمودار برحسب میانگین ± خطای معیار رسم شده است. علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و شاهد است ($P<۰/۰۵$). علامت+ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و شاهد با دو گروه تجربی دیگر است ($P<۰/۰۵$). علامت × × نشان دهنده اختلاف معنی‌دار باگروه کنترل و شاهد و سه گروه تجربی دیگر است ($P<۰/۰۵$).



نمودار ۲: *مقایسه میانگین نمره درد در مرحله حاد و مزمن در گروه‌های مورد آزمایش*

نمودار برحسب میانگین±خطای معیار رسم شده است. علامت × نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و شاهد است (P<۰/۰۵). علامت + نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و شاهد با دو گروه تجربی دیگر است (P<۰/۰۵). علامت ×× نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و شاهد و سه گروه تجربی دیگر است (P<۰/۰۵).

همچنین آنالیز آماری نتایج نشان می‌دهد L-NAME در همه مقادیر مورد استفاده همراه با مرفین و مرفین به تنهایی باعث کاهش معنی‌دار نمره درد در هر دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین نسبت به گروه کنترل و شاهد می‌شوند (P≤۰/۰۵). این نتایج نشان می‌دهد تزریق L-NAME همراه با مرفین دارای اثرات بی‌دردی موضعی بیشتری نسبت به زمانی است که مرفین به تنهایی تزریق می‌شود (جدول ۲ و نمودار۲).

بحث

تاکنون تلاش‌های زیادی در زمینه شناخت مکانیسم‌های درد و درمان انواع آن صورت گرفته است. در حال حاضر کنترل درد با استفاده از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و داروهای ضددرد اوپیوئیدی صورت می‌گیرد (۵،۱۸). بر اساس برخی مطالعات داروهایی مانند L-NAME در صورت استفاده همراه با مرفین در فاصله زمانی کم، پاسخ ضددردی القاء شده توسط مرفین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۲).

یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد، تزریق L-NAME همراه با مرفین در مقایسه با تزریق هر یک از آنها به تنهایی کاهش نمره درد بیشتری را به‌وجود می‌آورد. بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق در صورتی که هر کدام از داروها به تنهایی تزریق شود پاسخ‌های درد ایجاد شده به‌وسیله آزمون فرمالین کاهش پیدا می‌کند ولی میزان این کاهش اولاً در مقایسه با زمانی که ترکیبی از دو دارو تجویز می‌شود کمتر است (۲۳) و ثانیاً L-NAME درد فاز ثانویه آزمون فرمالین را در مقایسه با فاز اولیه بیشتر کاهش می‌دهد. L-NAME پاسخ نورون‌های شاخ پشتی که به وسیله گیرنده‌های N–متیل–D–اسپارتات (NMDA) میانجی‌گری می‌شود را مهار می‌کند. اگر مرفین به تنهایی تزریق شود گیرنده‌های درد که در نتیجه تزریق فرمالین تحریک می‌شود فعالیت فیبر C را مهار می‌کند و از این طریق پاسخ‌های فاز اولیه در مقایسه با فاز ثانویه بیشتر کاهش پیدا می‌کند (۱۷).

با توجه به یافته‌های حاصل از این تحقیق، احتمالاً تجویز هم‌زمان این دو دارو تأثیر مهاری شدیدی بر درد ایجاد شده در هر دو فاز اولیه و ثانویه آزمون فرمالین می‌گذارد به طوری که درد ایجاد شده در هر دو فاز نسبت به حالت تجویز انفرادی بیشتر کاهش نشان می‌دهد. سایر مطالعات نشان داده فعالیت گیرنده‌های N – متیل ـ D آسپارتات (NMDA) در مخچه، کلسیم داخل سلولی را افزایش می‌دهد که از طریق اتصال به کالمودولین موجود بر سطح آنزیم، سبب افزایش فعالیت آنزیم نیتریک اکسایدسنتاز و تولید نیتریک اکساید از L ـ آرژنین می‌شود. همچنین با فعال شدن گوانیلات سیکلاز، میزان cGMP داخل سلولی افزایش می‌یابد. مطالعات مختلف رفتاری نشان می‌دهد عملکرد سیگنال NO-cGMP روی نورون‌های آوران درد، میانجی‌گری تأثیرات درد توسط نیتریک‌اکساید است، بنابراین احتمالاً L-NAME با مهار سیستم نخاعیNO-cGMP، اثرات ضددردی القا شده توسط مرفین را تقویت می‌کند (۱۴).

به دنبال مهار نیتریک اکسایدسنتاز ممکن است تأثیر سیناپسی ایجاد شده به وسیله گیرنده NMDA ورودی درد را کاهش داده و متناوباً فعالیت ضددردی اوپیوئیدها را افزایش دهد، همچنین با کاهش تولید پروستاگلاندین E_2 ناشی از فعالیت NMDA، اثرات ضددردی اوپیوئیدها افزایش می‌یابد (۲۲) که از طریق کاهش تحریک‌پذیری سلول بوجود می‌آید (۱). از طرف دیگر کاهش cAMP درون سلولی باعث کاهش فعالیت پروتئین کیناز A وابسته به cAMP می‌شود و در نتیجه باعث کاهش آزادسازی نوروترانسمیترهای وابسته به فعالیت پروتئین کیناز A می‌شود و از این طریق اثرات ضددردی مرفین را تقویت می‌نماید (۳). همچنین این احتمال وجود دارد، L-NAME با تحریک فعالیت ضددردی ایجاد شده به وسیله گیرنده‌های اوپیوئیدی مو و دلتا اثر ضددردی اوپیوئیدها را تقویت نماید (۱۱،۱۲).

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد L-NAME درد فاز ثانویه را در مقایسه با فاز اولیه بیشتر کاهش داده است. L-NAME در مقادیر بالا منجر به مهار پاسخ‌های فیبرهای C و A و دلتا و کاهش پاسخ فاز ثانویه فرمالین می‌شود. مطالعات نشان داده پاسخ فاز ثانویه آزمون فرمالین حاصل التهاب سطحی می‌باشد و یکی از میانجی‌هایی که در این عمل نقش دارد برادی‌کینین است. L-NAME مانع از فعالیت این میانجی‌های التهابی از جمله برادی‌کینین می‌گردد و از رسیدن آنها به جایگاه عملکردی‌شان جلوگیری می‌کند و التهاب موجود را کاهش می‌دهد(۱۰،۱۵).

تجویز L-NAME همراه با مرفین در مقادیر پایین در تست فرمالین باعث کاهش آزادسازی نیتریت و نیترات می‌شود ولی در مقادیر بالا علاوه بر کاهش این ترکیبات باعث کاهش بسیار زیاد گلوتامات نیز می‌گردد (۲۲) و فعالیت ضددردی مرفین را تشدید می‌نماید (۴).

با توجه به یافته‌های حاصل از این تحقیق می‌توان گفت L-NAME و مرفین به صورت سینرژیک عمل می‌نمایند. L-NAME همراه با مرفین در مقایسه با تجویز هر کدام به تنهایی تأثیر بیشتری بر کاهش درد ناشی از فرمالین به‌ویژه در مرحله درد مزمن دارد و در نهایت حیوان را در وضعیت بی‌دردی قرار می‌دهد.

تشکر و قدردانی

در پایان از همکاری مدیریت محترم اداره امور مبارزه با مواد مخدر دانشگاه علوم پزشکی شیراز و سرکار خانم دکتر صغری خاب‌ناده استاد دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Summary

The Effect of L-NAME on Morphine Antinociception in Formalin Test

Mokhtary M, Ph.D.,[1] Shariatie M, Ph.D[2] and Rezaeian L, MS.c[3]

1- Assistant Professor of Physiology, Department of Biology, Islamic Azad University, Kazeroun-Branch, kazeroun, Iran 2- Assistant Professor of Embriology, Department of Biology, Islamic Azad University, Kazeroun-bromch, Kazeroun, Iran 3- Master of Science in Zoology, Department of Biology, Islamic Azad University, Kazeroun branch, Kazeroun, Iran

Introduction: *N- nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), one of the L-arginine analogs, has been specified as an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS).Nitric oxide synthase is an enzyme which leads to nitric oxide synthesis. Since nitric oxide has been known as a pain mediator, it can be said that L-NAME can decrease and relieve pain. In this research the effect of L-NAME on morphine antinociception and the interaction between these two drugs were studied by using formalin test in rat.*

Methods: *Experiments were done on 70 male-wistar rats weighing 180-230gr. Rats were divided into seven groups (n =10) including: the control group, the saline group(sham), the experimental group receiving 2mg/kg of morphine, and the experimental groups receiving 15, 20, 40mg/kg L-NAME and morphine (2mg/Rat), and the group receiving 40 mg/kg of L-NAME. Injections were performed intraperitoneally fifteen minutes before starting formalin test. In sham group, an equal volume of normal saline was injected intraperitoneally. The minutes (0-5) and (16-60) were respectively considered as acute and chronic phases of pain in the formalin test. After observing animals' behavioural responses and calculating pain scores, groups were compared.*

Results: *According to the obtained results, L-NAME caused a significant nociception decrease in both phases of formalin test and this effect was dose dependent. Moreover groups that received the combination of morphine and L-NAME showed more nocieception, especially in chronic phase of formalin test, in comparison to the groups that received each in isolatin and control groups (P<0.05).*

Conclusion: *According to the results, L-NAME and morphine act synergistically. In other words, L-NAME with nitric oxide inhibitor decreases intracell signal activities of cGMP and CAMP and consequently protein Kinase A (PKA) activity related to cAMP is decreased. This leads to an increase in the releasing of neurotransmitters related to PKA, and consequently morphine antinociceptive effect is amplified.*

Key Words: *L-NAME, Morphine, Antinociception, formalin test*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2006; 13(1):29-36

References:

1. Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ. Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 2000; 20(11): 4091-8.
2. Brignola G, Calignano A, Di Rosa M. Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1994; 113(4): 1372-6.
3. Brundege JM, Diao L, Proctor WR, Dunwiddie TV. The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocompus. *Neuropharmacology* 1997; 36(9): 201-10.
4. Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. CNS plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990; 535(1): 155-8.
5. Dray A, Urban L. New pharmacological strategies for pain relief. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 253-80.
6. Dubuisson D, Dennis SG. The Formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4(2): 161-74.
7. Furst S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 1999; 48(2): 129-41.

8. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991; 14(2): 60-7.
9. Guyton AC, Hall JE. Text book of medical physiology. 9th Ed., 1996; pp609-62.
10. Haley JE, Dickenson AH, Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of bradykinin in chemical nociception in the rat. *Neurosci Lett* 1989; 97(1-2): 198-202.
11. Heinzen EL, Booth RG, Pollack GM. Neuronal nitric oxide modulates morphine antinociceptive tolerance by enhancing constitutive activity of the mu-opioid receptor. *Biochem pharmacol* 2005; 69(4): 679-88.
12. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biophsy Res Commun* 1998; (157): 87-94.
13. Khotib J, Narita M, Suzuki M, Yajima Y, Suzuki T. Functional interaction among opioid receptor types: up-regulation of mu-and delta-opioid receptor functions after repeated stimulation of kappa-opioid receptors. *Neuropharmacology* 2004; 46(4): 531-40.
14. Levy D, Strassman AM. Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. *J Neurophysiol* 2004; 92(2): 766-72.
15. Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993; 52(2): 127-36.
16. Pataki I, Telegdy G. Further evidence that nitric oxide modifies acute and chronic morphine actions in mice. *Eur J Pharmacol* 1998; 357(2-3): 157-62.
17. Sakurada C, Sugiyama A, Nakayama M, Yonezawa A, Sakurada S, Tan-No K *et al.* Antinociceptive effect of spinally injected L-NAME on the acute nociceptive response induced by low concentrations of formalin. *Neurochem Int* 2001; 38(5): 417-23.
18. Terayama R, Guan Y, Dubner R, Ren K. Activity-induced plasticity in brain stem pain modulatory circuitry after inflammation. *Neuroreport* 2000; 11(9): 1915-9.
19. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51(1): 5-17.
20. Trugillo KA, Akil H. Inhibition of opiate by non-competitive NMDA receptor amtagonists. *Brain Res* 1994; 633(1-2): 178-88.
21. Vaupel D, Kimes AS, London ED. Nitric oxide synthase inhibitors. Preclinical studies of potential use for treatment of opioid withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 1995; 13(4): 315-22.
22. Watanabe C, Sakurada T, Okuda K, Sakurada C, Ando R, Sakurada S. The role of spinal nitric oxide and glutamate in nociceptive behaviour evoked by high-dose intrathecal morphine in rats. *Pain* 2003; 106(3): 269-83.
23. Yamaguchi H, Naito H. Antinociceptive synergistic interaction between morphine and omega-nitro 1-arginine methyl ester on thermal nociceptive tests in the rats. *Can J Anaesth* 1996; 43(9): 975-81.