ORIGINAL ARTICLE

Effects of Intrathecal Administration of Vitamin K2 on Pain in the Tail Flick and Formalin Test in Rats

Fatemeh Hajipoor[1],
Masoud Fereidoni[2],
Ali Moghimi[3]

[1] MSc Student in Animal Physiology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2] Associate Professor, Applied Research Center for Neurofeedback and Neurobehavioral Sciences, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3] Professor, Applied Research Center for Neurofeedback and Neurobehavioral Sciences, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received March 14, 2014 ; Accepted November 22, 2014)

Abstract

Background and purpose: Vitamin K2 is one of the derivatives of vitamin K belonging to fat-soluble vitamins' family. Other derivatives of vitamin K in the brain must be converted to K2 and this can reflect its importance in the nervous system. There are some evidences on analgesic effects of vitamin K. This study investigated the effects of intrathecal administration of vitamin K2 on pain in the tail-flick and formalin-test.

Material and methods: In this experimental study, male Wistar rats (200-250g) after cannulation surgery for intrathecal administration (i.t), were divided into four groups (n=7 per group) including (DMSO) and vitamin K2 (2, 10, 20µg/10µl). Pain threshold was measured in each group by tail-flick test and chemical pain was evaluated using the formalin-test.

Results: Vitamin K2 (20µg/10µl,i.t) significantly reduced pain threshold and led to hyperalgesia in the tail-flick test ($P<0.01$). But intrathecal administration of all concentrations of vitamin K2 decreased formalin-induced pain during the two phases of formalin-test ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed that intrathecal administration of vitamin K2 in high concentrations induced hyperalgesia in the Tail flick test, but it produced analgesia during the formalin test. According to the essential roles of Aδ fibers in pain transmission during the tail-flick test and the role of NMDA receptor in the formalin test, determination of the mechanisms involved in these effects requires further research.

Keywords: Vitamin K2, Pain, Intrathecal administration, Tail-flick test, Formalin test.

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(119): 132-140 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۹ آذر سال ۱۳۹۳ (۱۴۰-۱۳۲)

اثر تجویز داخل نخاعی ویتامین K2 بر رفتار درد در آزمون های Tail flick و فرمالین در موش صحرایی

فاطمه حجی پور[۱]
مسعود فریدونی[۲]
علی مقیمی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: ویتامین K2 از مشتقات ویتامین K و محلول در چربی است. این ویتامین به دلیل توانایی عبور از سد خونی- مغزی با مقادیر فراوانی در مغز حضور دارد. سایر مشتقات ویتامین K برای حضور در مغز باید به فرم K2 تبدیل شوند که نشان‌دهنده اهمیت آن در سیستم عصبی است. شواهدی مبنی بر اثرات ضد دردی ویتامین K2 وجود دارد. بررسی اثرات تجویز نخاعی آن بر درد طی آزمون Tail-flick و فرمالین، هدف این مطالعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر بالغ ویستار (۲۵۰g-۲۰۰) استفاده شد. موش‌ها تحت عمل جراحی جهت تجویز نخاعی (i.t) در چهار گروه هفت تایی (DMSO,i.t) و ویتامین K2 (۲۰µg/۱۰µl,i.t، ۱۰، ۲) قرار گرفتند. در هر گروه آستانه درد توسط آزمون Tail-flick و شدت درد شیمیایی با آزمون فرمالین سنجش شد.

یافته‌ها: ویتامین K2 در غلظت (۲۰µg/۱۰µl,i.t) به طور معنی‌داری باعث کاهش آستانه درد و بروز پردردی در آزمون Tail-flick شد ($p < ۰/۰۱$). اما تجویز نخاعی هر سه غلظت ویتامین K2 منجر به کاهش درد ناشی از تزریق فرمالین در هر دو مرحله آزمون فرمالین گردید ($p < ۰/۰۵$).

استنتاج: با توجه به یافته های این تحقیق، تجویز نخاعی ویتامین K2 در بیش‌ترین غلظت استفاده شده باعث بروز پردردی طی آزمون Tail flick گردید، ولی در آزمون فرمالین منجر به بروز بی‌دردی شد، با توجه به نقش عمده فیبرهای Aδ در انتقال درد طی آزمون Tail-flick و نقش فعالیت گیرنده‌های NMDA، طی آزمون فرمالین، بررسی مکانیسم‌های دخیل در این اثرات نیازمند تحقیقات بیش تری است.

واژه های کلیدی: ویتامین K2، درد، تجویز نخاعی، آزمون Tail-flick، آزمون فرمالین

مقدمه

درد احساسی است نامطلوب که در اثر آسیب وارده به بافت‌های مختلف ایجاد می‌گردد و به عنوان یک عامل هشدار دهنده، وجود خطر و یا عوامل آسیب‌رسان در یک عضو را نشان می‌دهد(۱). هم‌چنین درد نتیجه‌ای از کنش میان انواع ورودی‌های سیناپسی در راهی است که از گیرنده‌های محیطی شروع شده و از محور سیستم عصبی در نخاع و تنه مغزی بالا می‌رود و سرانجام به قشر مغز و ساختارهای لیمبیک می‌رسد(۳،۲).

مولف مسئول: مسعود فریدونی- مشهد: خراسان رضوی، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، مرکز پژوهش های کاربردی نوروفیدبک، علوم اعصاب و رفتار
E-mail: fereidoni@um.ac.ir

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. دانشیار، مرکز پژوهش های کاربردی نوروفیدبک، علوم اعصاب و رفتار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. استاد، مرکز پژوهش های کاربردی نوروفیدبک، علوم اعصاب و رفتار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۲/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱/۳۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۹/۱

در شـرایط فیزیولوژیـک سـیگنال‌هـای درد از طریـق محرک‌های شدید گرمایی، مکـانیکی و شـیمیایی تولیـد شده و فیبرهای عصبی شـامل فیبرهـای C و Aδ را فعـال می‌کنند(۱). با توجه به این که داروهای ضد درد در کنار اثرات تعدیل‌کنندگی بر درد، دارای عـوارض نـامطلوبی نیز هستند، تلاش برای یـافتن داروهـای ضـد درد جدیـد که دارای عارضه کم تری باشند، امری بسیار مهم بوده و این چنین به نظر می‌رسد، گروه ویتامین‌ها کـه از دیربـاز به عنوان کلیدی برای درمان انواع بیماری‌ها با کم تـرین عوارض بوده‌اند، جایگاه مناسبی داشته باشند(۴). در ایـن میان یکی از ویتامین‌هـای محلـول در چربـی، کـه عامـل اصلی در فرآیند انعقـاد طبیعـی خـون اسـت، ویتـامین K مـی‌باشـد. تمـامی اعضـای خـانواده ایـن ویتـامین از بـه اشتراک گذاشتن یک حلقـه نفتوکوئینـون متیلـه شـده و زنجیره‌هـای جـانبی آلیفاتیـک متفـاوت کـه منشـأ انـواع مختلف این ویتامین می‌باشد، تشکیل شده‌اند(۵). ویتامین K2 یـــــا Menaquinone (Menatetrenone) دارای زنجیره‌های جانبی متشکل از تعداد متغیـری ایزوپرنوئیـد غیراشباع می‌باشد(۶). ایـن ویتـامین توسـط بـاکتری‌هـای روده‌ای سنتز شده و به وسیله شیلومیکرون‌ها به بافت‌های مختلف منتقل می‌شود(۷). مقادیر فراوانی از ویتـامین K2 در مغز و به خصوص در مناطق پر تراکم میلینی هم چون پل مغزی و مغزمیانی حضـور دارد و بـرای رشـد طبیعـی مغز نیز مورد نیـاز اسـت(۸). در اثـر کمبـود ایـن ویتـامین مهم، خطر ابتلا به بیماری‌هایی هم چون پوکی استخوان، آترواسـکلروزیس، سـرطان پروسـتات، سـرطان کبـد، دیابت، پوسیدگی دندان‌ها، بیماری‌های کلیوی، آلزایمر، پارکینسون و غیـره افـزایش مـی‌یابـد(۵، ۷). ویتـامین K2 دارای اثرات آنتی اکسیدانی چشمگیری نیـز مـی‌باشـد و این ویتامین را به عنوان عاملی در برابر رادیکال‌های آزاد و اسـترس اکسـیداتیو و در واقـع بـه عنـوان یـک عامـل نوروپروتکتیو معرفی می‌کند(۹). یافته‌های پیشین حـاکی از آن اسـت کـه احسـاس درد در بیمـاران زن مبـتلا بـه پوکی استخوان به دنبال تجویز ویتامین K2 کاهش یافتـه اسـت(۱۰). از طرفـی کـاهش درد در بیمـاران مبـتلا بـه آرتریت روماتوئید نیز با مصرف ویتامین K2 بـه وضـوح مشاهده شده است(۱۱). هم‌چنین در پژوهشی آستانه درد در موش‌های دیابتی، به دنبال تجویز ویتامین K2 افزایش یافت(۱۲). با توجه به اثرات ضـد دردی مشـاهده شـده از ویتـامین K2 در مطالعـات پیشـین، هـدف ایـن پـژوهش بررسی اثر ویتامین K2 طـی تجـویز نخـاعی بـر احسـاس درد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر بـالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گـرم اسـتفاده شد. حیوانات در شرایط محیطی کنترل شده (۱۲ سـاعت روشنایی /۱۲ سـاعت تـاریکی) و دمـای ۲۲±۲ °C و بـه دور از هر گونه آلودگی صوتی به صورت گـروه‌هـای ۵ تایی در قفس‌هـایی از جـنس پلکسـی‌گـلاس نگـه‌داری شدند. آن‌ها در تمام مدت به جز زمان انجام آزمـایش‌هـا به آب و غذا دسترسـی آزاد داشـتند و چنـد روز قبـل از انجام آزمایش‌ها برای تطـابق بـا محـیط، روزانـه چنـدین سـاعت در فضـای آزمایشـگاه قـرار مـی‌گرفتنـد. تمـامی مراحل آزمایش‌ها برای یکنواخت‌سـازی اثـر ریتـم‌هـای سیرکادین در پاسخ‌های حیوانات بین ساعت ۱۰ صبح تـا ۲ بعدازظهر انجام گردید. کلیه مراحل تکثیـر و پـرورش حیوانات در حیوانخانه و انجام آزمایش‌ها در آزمایشـگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشگاه فردوسی مشـهد و مطابق با دستورالعمل‌هـای اخلاقـی در خصـوص کـار بـا حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت(۱۳). در ایـن تحقیـق از پـــودر ویتـــامین K2 (تهیـــه شـــده از شـــرکت Sargent Welch، آمریکـا) و از حـلال ۰/۵ درصـد DMSO (Dimethyl sulfoxide) (تهیه شـده از شـرکت Merck، آلمان) به عنوان حامل دارو استفاده گردیـد. بـه منظور انجام آزمایش‌ها، حیوانـات بـه طـور تصـادفی در چهار گروه ۷ تایی شامل گـروه دریافـت‌کننـده DMSO طـی تجـویز نخـاعی (Intrathecal injection-i.t) و

گروه‌های دریافت‌کننده غلظت‌های ۲، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در ۱۰ میکرولیتر دریافت‌کننده ویتامین K2 (i.t) تقسیم‌بندی شدند. علاوه بر این چهار گروه، برای اطمینان از بی‌تأثیر بودن عمل جراحی جهت تجویز نخاعی در روند آزمایش، یک گروه از حیوانات دست نخورده (Intact Animal) نیز در نظر گرفته شد که در آن، حیوانات تحت عمل جراحی و هم‌چنین تیماری قرار نگرفته و سپس کلیه مراحل مشابه سایر گروه‌ها بر روی آن‌ها انجام گردید. مراحل انجام آزمایش‌ها در تمامی گروه‌ها بدینصورت بود که ابتدا آستانه درد توسط آزمون Tail flick سنجیده شد (در توضیحات مربوط به آزمون Tail flick بیان گردید)، سپس تجویز نخاعی دارو انجام شد و پس از گذشت مدت زمان ۵ دقیقه از تجویز نخاعی دارو، مجدداً آستانه درد سنجش گردید، پس از آن تزریق کف پایی فرمالین انجام شده و رفتار درد در حیوان به مدت ۶۰ دقیقه ثبت گردید. به منظور تجویز نخاعی در گروه‌ها، کانول‌گذاری در فضای تحت عنکبوتیه به روش Yaksh و Rudy انجام گرفت(۱۴).

در این روش ابتدا حیوان توسط تزریق درون‌صفاقی کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلوزین (۲۰mg/kg) بی‌هوش گردید. پس از آن که موهای پشت سر حیوان تراشیده شد، سرش در دستگاه استرئوتاکس (ساخت شرکت Narishige، ژاپن) ثابت گردید. سپس در فاصله بین گوش‌ها و به طرف پایین برشی به اندازه ۲ سانتی‌متر ایجاد شد و با باز شدن برش، عضلات گردنی قابل رؤیت شدند. پس از آن عضلات به آرامی کنار زده شدند تا جایی که غشاء اطلس- اکسی‌پیتال نمایان گردید. با ایجاد خراشی بر روی این غشاء مایع مغزی- نخاعی خارج شد که نشان دهنده دست‌یابی به فضای تحت عنکبوتیه بود. سپس ۸ سانتی‌متر از یک کانول پلی‌اتیلن (PE-10) استریل ۱۱ سانتیمتری به فضای تحت عنکبوتیه وارد شد و ۳ سانتیمتر از آن برای تجویز دارو، خارج از نخاع باقی ماند. در این حالت انتهای کانول بین قطعات کمری ۴ و ۵ قرار می‌گیرد. پس از گذشت یک دوره بهبودی ۷ روزه، تقریباً تمامی حیوانات جراحی شده مورد آزمایش قرار گرفتند زیرا هیچ‌گونه نقص حرکتی در آن‌ها مشاهده نگردید. تجویزهای نخاعی با حجم ۱۰ میکرولیتر و به کمک سرنگ هامیلتون ۵۰ میکرولیتری انجام شدند.

آزمون Tail flick

جهت سنجش آستانه درد در سطح نخاعی از آزمون Tail flick بر اساس روشی از D'Amour و Smith استفاده گردید(۱۵). در این آزمون ابتدا شدت نور دستگاه (Intensity=5) طوری تنظیم شد که زمان متوسط پاسخ دهی پایه حیوان بین۴ تا ۶ ثانیه باشد. هم چنین برای جلوگیری از هر گونه آسیب بافتی در حیوان یک زمان قطع تابش نور بر دم (Cut-off time) برابر با ۱۵ ثانیه در نظر گرفته شد. تابش نور به قسمت یک سوم میانی دم حیوان توسط دستگاه Tail flick (ساخت شرکت Sparco، ایران)، سه بار و به فاصله زمانی یک دقیقه انجام گردید. سپس میانگین زمان‌های پس کشیدن دم به عنوان آستانه بروز درد (Tail Flick Latency) برای هر حیوان مد نظر قرار گرفت. به منظور مقایسه بین گروه‌ها، نتایج به صورت درصد حداکثر اثر ممکن (Maximum Possible Effect-MPE%) با استفاده از فرمول زیر بیان شدند(۱۶).

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

آزمون فرمالین

برای سنجش درد ناشی از محرک‌های دردزای شیمیایی از آزمون فرمالین استفاده گردید(۱۷). در این روش ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۲/۵ درصد به کف پای راست عقبی موش صحرایی تزریق شد و موجب بروز دو مرحله رفتار درد در حیوان گردید که مرحله اول یا مرحله نوروژنیک تقریباً در ۱۰ دقیقه اول آزمون رخ می‌دهد و مرحله دوم یا مرحله التهابی تقریباً از دقیقه

۱۶ تا ۲۰ آزمون شروع شده و گاهی تا ۶۰ دقیقه به طول می‌انجامد. در بین مراحل اول و دوم آزمون فرمالین، یک مرحله بینابینی خاموش نیز وجود دارد که تقریباً از دقیقه ۱۰ آزمون شروع شده و تا دقیقه ۱۶ تا ۲۰ آزمون ادامه می‌یابد که در طول این مرحله بینابینی، رفتارهای ناشی از درد اندکی در حیوان مشاهده می‌شود. پس از آن شدت درد شیمیایی در حیوان به صورت کمیتی درآمده و از صفر تا سه درجه‌بندی گردید و در هر ۱۵ ثانیه پاسخ‌های رفتاری مربوط به درد شیمیایی به صورت اعداد صفر که در آن حیوان هیچ دردی نداشته و به راحتی وزن خود را بر روی پای مورد تزریق تحمل می‌کند، یک که در آن پای حیوان حین حرکت می‌لنگد و یا در حال حرکت نوک پای مورد تزریق را روی زمین می‌گذارد، دو که در آن حیوان پای مورد تزریق را در تمام مدت بالا نگه می‌دارد و سه که در آن حیوان پای مورد تزریق را تکان می‌دهد، گاز می‌گیرد یا لیس می‌زند، ثبت شد. سپس میانگین شدت کمّی درد در هر ۵ دقیقه محاسبه گردید.

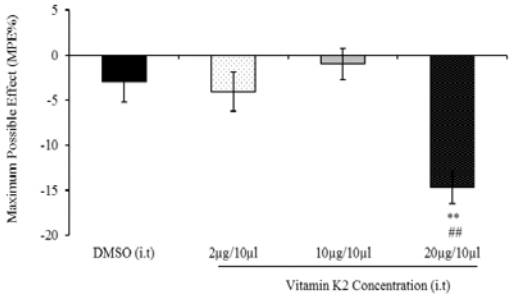
آنالیزهای آماری

در این پژوهش داده‌ها در هر گروه توزیع نرمال داشته و به صورت mean±SEM ارائه شدند. معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها به کمک آزمون ANOVA یک طرفه مشخص و متعاقب آن مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون تی Newman-Keuls و با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 5 انجام شد. به علاوه $p<۰/۰۵$ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

مقایسه نتایج حاصل از آزمون Tail flick بین گروه حیوانات دست‌نخورده (بدون جراحی و دریافت دارو) و گروه دریافت‌کننده حلال DMSO طی تجویز i.t، تفاوت معنی‌داری در آستانه درد نشان نداد، بنابراین انجام عمل جراحی جهت تجویز نخاعی و استفاده از حلال DMSO به عنوان حامل دارو بر ادامه روند آزمایش‌ها بی‌تأثیر بود. از طرفی مقایسه نتایج حاصل از تجویز نخاعی غلظت‌های مختلف ویتامین K2 طی آزمون Tail flick نشان داد که فقط تجویز نخاعی غلظت ۲۰μg/۱۰μl ویتامین K2 (۱/۸±۱۴/۶۹-) منجر به کاهش معنی‌داری در آستانه درد و بروز پردردی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده DMSO(i.t) (۲/۲±۳/۰۱-) و سایر گروه‌های دریافت‌کننده غلظت‌های ویتامین K2 (۱۰μg/۱۰μl و ۲) (۱/۷±۰/۹۸- و ۲/۱±۴/۰۶-) گردید ($p<۰/۰۱$) و تجویز نخاعی غلظت‌های ۱۰ μg/۱۰μl و ۲ اثر معنی‌داری بر آستانه درد بروز ندادند (نمودار شماره ۱).

از طرفی مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین نیز نشان داد که شدت درد شیمیایی ناشی از تزریق کف پایی فرمالین در گروه حیوانات دست‌نخورده (بدون جراحی و دریافت دارو) و گروه دریافت‌کننده حلال DMSO طی تجویز i.t، تفاوت معنی‌داری نداشت.



نمودار شماره ۱: اثر تجویز نخاعی غلظت های ۲۰μg/۱۰μl و ۱۰، ۲ ویتامین K2 بر آستانه درد طی آزمون Tail flick. تجویز نخاعی غلظت ۲۰μg/۱۰μl ویتامین K2 منجر به کاهش آستانه درد و بروز پردردی گردید. داده ها به صورت mean±SEM ارائه شده اند و (n=۷)، (**P<0.01 در مقایسه با گروه DMSO (i.t) و ##P<0.01 در مقایسه با غلظت های ۱۰μg/۱۰μl و ۲ ویتامین K2).

اما یافته‌های حاصل از آزمون فرمالین حاکی از آن بود که تجویز نخاعی غلظت‌های ۲μg/۱۰μl ($p<۰/۰۱$)، ۱۰μg/۱۰μl ($p<۰/۰۵$) و ۲۰μg/۱۰μl ($p<۰/۰۱$) ویتامین K2 در مقایسه با گروه دریافت‌کننده DMSO (i.t) منجر

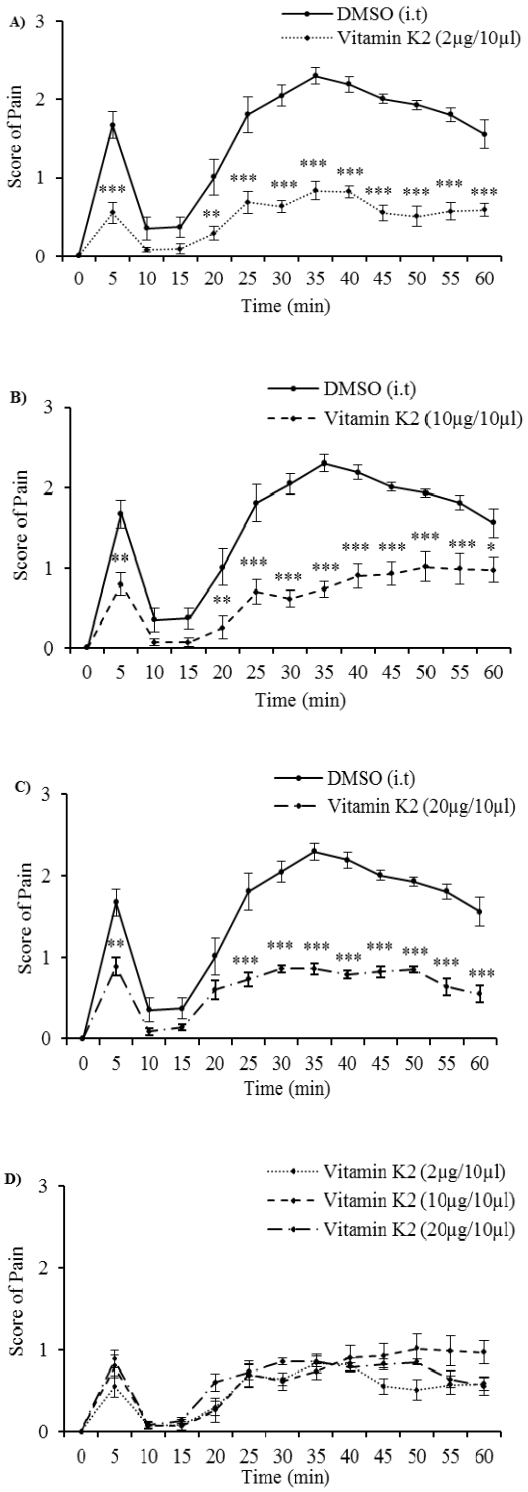
به کاهش چشمگیر شدت درد شیمیایی ایجاد شده توسط تزریق کف پایی فرمالین در هر دو مرحله اول (نوروژنیک) و دوم (التهابی) درد طی آزمون فرمالین و بروز بی‌دردی شدند (نمودار شماره ۲A،B،C). از سوی دیگر نتایج آزمون فرمالین نشان داد که هر سه گروه دریافت‌کننده ویتامین K2 با غلظت‌های ۲۰μg/۱۰μl و ۱۰، ۲ مشابه یکدیگر عمل کرده و تفاوت معنی‌داری در شدت درد شیمیایی ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین بین آن‌ها دیده نشد (نمودار شماره ۲D).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تجویز نخاعی ویتامین K2 منجر به کاهش آستانه درد حین آزمون Tail flick می‌گردد، به طوری که غلظت ۲۰μg/۱۰μl به طور چشمگیری آستانه درد را در آزمون Tail flick کاهش داد و باعث بروز پردردی شد (نمودار شماره ۱).

از آن‌جا که بخشی از سیگنال‌های درد طی آزمون Tail flick توسط فیبرهای Aδ منتقل می‌شود(۱۸) و میانجی عصبی آزاد شده از این فیبرهای عصبی در شاخ پشتی نخاع گلوتامات می باشد که یک میانجی تحریکی بوده و به دلیل کوتاهی زمان اثر عمدتاً بر گیرنده‌های AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) اثر می‌گذارد؛ از طرفی نورون‌های شاخ پشتی نخاع علاوه بر فیبرهای آوران اولیه، هدف راه نزولی از ساقه مغز نیز می‌باشند که میانجی‌های مونوآمینی را مورد استفاده قرار می‌دهند. از جمله این مونوآمین‌ها سروتونین است که در تنظیم انتقال درد شرکت دارد ومنجر به مهار انتقال درد در سطح نخاع و مغز می‌گردد(۱۹). به نظر می‌رسد تاکنون شواهدی مبنی بر اثرات ویتامین K2 بر گیرنده‌های AMPA وجود ندارد، اما مطالعات پیشین حاکی از آنند که ویتامین K و انواع مشتقاتش با میزان حساسیت به سروتونین نسبت عکس دارد و در شرایط کمبود ویتامین K این میزان سروتونین افزایش می‌یابد(۲۰). بنابراین احتمال می‌رود هنگامی که غلظت ویتامین K2 در نخاع افزایش می‌یابد، این امر موجب کاهش میزان سروتونین شود و لذا عملکرد تحریکی که در شرایط عادی از طریق سروتونین روی اینترنورون‌های گاباارژیک اعمال می‌شد، مهار گردد و در پی آن، مهار ناشی ازمسیرهای صعودی درد درسطح نخاع نیز کاهش یابد. در پی این وقایع عملکرد گیرنده‌های گلوتاماتی AMPA نیز تسهیل می‌گردد(۲۱). با توجه به این مطالب می‌توان انتظار داشت در آزمون Tail flick که علائم درد عمدتاً از طریق فیبرهای Aδ و با تحریک گیرنده‌های AMPA در شاخ پشتی نخاع رخ می‌دهد، به دنبال تجویز نخاعی ویتامین K2 احتمالاً به دلیل تسهیل بیش‌تر گیرنده‌های AMPA در سطح نخاع، آستانه درد کاهش می‌یابد که اثبات این وقایع و تأیید نقش گیرنده‌های AMPA در این مسیر نیازمند تحقیقات بعدی می‌باشد. از طرفی یافته‌های مطالعه حاضر مؤید آن بود که مرحله اول و دوم درد در آزمون فرمالین یعنی مرحله نوروژنیک و التهابی با تجویز نخاعی غلظت‌های ویتامین K2 کاهش یافت و ویتامین K2 منجر به بروز بی‌دردی گردید (نمودار شماره ۲). از آن‌جا که انتقال حس درد طی آزمون فرمالین عمدتاً بر عهده فیبرهای C می‌باشد(۱۷)، فیبرهای C علاوه بر میانجی عصبی گلوتامات، ماده P را نیز به عنوان میانجی به فضای سیناپسی آزاد می‌کند و هر دو گیرنده گلوتاماترژیک و به خصوص گیرنده NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor) را فعال می‌کنند(۱۸). تاکنون شواهدی مبنی بر اثر مستقیم ویتامین K2 بر سیستم گلوتاماترژیک و گیرنده‌های NMDA نیز به دست نیامده است، اما نتایج حاصل از پژوهش Onodera و سایر همکارانش نشان داد که تجویز درون صفاقی و سیستمیک ویتامین K2 از طریق مهار آزادسازی برادی‌کینین و ماده P در نخاع منجر به بروز اثرات بی‌دردی می‌گردد و احتمالاً در این بی‌دردی، اثرات مهاری ویتامین K2 بر گیرنده NMDA نیز اهمیت دارند(۲۲)، و به دنبال این تحقیق محققان پژوهش حاضر

می‌خواستند بدانند آیا اثرات ضد دردی ویتامین K2 که در تجویز سیستمیک به دست آمده بود آیا می‌تواند ناشی از اثر ویتامین K2 در سطح نخاع و در سیستم اعصاب مرکزی اعمال گردیده باشد، و به این دلیل در این تحقیق از تجویز نخاعی استفاده گردید. مطالعات دیگر حاکی از آن بود که ویتامین K2 منجر به مهار نیتریک‌اکساید سنتز شده توسط iNOS (Inducible nitric oxide synthase) می‌گردد(۲۳)، با توجه به این که تحریک گیرنده‌های NMDA می‌تواند موجب القای فعالیت آنزیم iNOS و آزادسازی NO (Nitric oxide) و بروز درد و التهاب گردد(۲۴)؛ در نتیجه ممانعت از سنتز NO توسط ویتامین K2 را شاید بتوان ناشی از اثرات مهاری این ویتامین بر گیرنده‌های NMDA و به دنبال آن مهار آنزیم iNOS و مهار درد عنوان نمود که این مورد نیز نیازمند تحقیق بیش‌تر است. از طرفی آسیب بافتی ناشی از تزریق کف پایی فرمالین منجر به آزادسازی واسطه‌های التهابی، از جمله برادیکینین، هیستامین، NO و رادیکال‌های آزادی هم‌چون ROS (Reactive oxygen species) از سلول‌های آسیب دیده می‌شود، علاوه بر واسطه‌های التهابی، فاکتورهای نوروژنیک مانند ماده P و CGRP (Calcitonin gene-related peptide) نیز از پایانه‌های محیطی آوران‌های اولیه آزاد می‌شوند(۲۵). در یک بررسی بر بیماران آلزایمری مشخص شد که تجویز ویتامین K2 با خاصیت آنتی‌اکسیدانی که دارد، قادر است رادیکال‌های آزاد از جمله ROS دخیل در فرآیندهای التهابی را از بین ببرد(۹). از طرف دیگر ویتامین K2 بر برادیکینین نیز که از فاکتورهای التهابی مؤثر در احساس درد در مرحله دوم آزمون فرمالین است، اثر مهاری دارد(۲۲). با توجه به اثرات ضد التهابی مذکور می‌توان توانایی مهار ویتامین K2 بر درد در مرحله دوم آزمون فرمالین را نیز توجیه کرد. به طور کلی نتایج



نمودار شماره ۲: اثر تجویز نخاعی غلظت های ۲۰µg/۱۰µl و ۱۰، ۲ ویتامین K2 بر شدت درد شیمیایی طی آزمون فرمالین. تجویز نخاعی هر سه غلظت ویتامین K2 منجر به کاهش شدت درد شیمیایی ناشی از تزریق کف پایی فرمالین و بروز بی دردی گردید. داده ها به صورت mean±SEM ارائه شده اند و (n=۷)، (*P<0.05، **P<0.01 و ***P<0.001 در مقایسه با گروه (DMSO (i.t).

حاصل از این تحقیق نشان داد که تجویز نخاعی ویتامین K2 موجب کاهش آستانه درد و بروز پردردی در آزمون Tail flick شد و از سوی دیگر تجویز نخاعی ویتامین K2 منجر به بروز بی‌دردی در هر دو مرحله درد نوروژنیک و التهابی طی آزمون فرمالین گردید. مقایسه نتایج حاصل از اثرات تجویز صفاقی ویتامین K2 بر درد که در مطالعات پیشین بررسی شده(۲۲) و اثرات تجویز نخاعی آن بر درد در پژوهش حاضر، شاید بتوان گفت حداقل بخشی از اثرات بی‌دردی ناشی از تجویز درون صفاقی ویتامین K2 از طریق اثرات آن در سطح نخاع اعمال می گردد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه مصوب دانشجویی در مقطع کارشناسی‌ارشد می‌باشد که با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شده است. بدینوسیله از آن سازمان مراتب تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Helms JE, Barone CP. Physiology and treatment of pain. Crit Care Nurse 2008; 28(6): 38-49.
2. Fürst S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. Brain Res Bull 1999; 48(2): 129-141.
3. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell 2009; 139(2): 267-284.
4. Rahal A, Ahmad AH, Kumar A, Mahima, Verma AK, Chakraborty S, et al. Clinical drug interactions: a holistic view. Pak J Biol Sci 2013; 16(16): 751-758.
5. Ferland G, Sadowski JA, O'Brien ME. Dietary induced subclinical vitamin K deficiency in normal human subjects. J Clin Invest 1993; 91(4): 1761-1768.
6. Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K. Thromb Haemost 2008; 100(4): 530-547.
7. Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ. Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. Br J Nutr 1994; 72(3): 415-425.
8. Ferland G. Vitamin K, an emerging nutrient in brain function. Biofactors 2012; 38(2): 151-157.
9. Westhofen P, Watzka M, Marinova M, Hass M, Kirfel G, Müller J, et al. Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. J Biol Chem 2011; 286(17): 15085-15094.
10. Iwamoto I, Kosha S, Noguchi S, Murakami M, Fujino T, Douchi T, et al. A longitudinal study of the effect of vitamin K2 on bone mineral density in postmenopausal women a comparative study with vitamin D3 and estrogen-progestin therapy. Maturitas 1999; 31(2): 161-164.
11. Okamoto H. Vitamin K and rheumatoid arthritis. IUBMB Life 2008; 60(6): 355-361.
12. Onodera K, Zushida K, Kamei J. Antinociceptive effect of vitamin K2 (menatetrenone) in diabetic mice. Jpn J Pharmacol 2001; 85(3): 335-337.
13. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 1983; 16(2): 109-110.
14. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. Physiol Behav 1976; 17(6): 1031-1036.

15. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. J Pharmacol Exp Ther 1941; 72(1): 74-79.
16. Abbasi Z, Fereidoni M, Behnam-Rassouli M. Effects of intrathecal administration of genipin on pain and morphine induced analgesia in rats. Physiol Pharmacol 2013; 17(2): 164-175.
17. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Pain 1992; 51(1): 5-17.
18. Fu X, Froicu D, Sinatra R. Anatomic and physiological principles of pain. In: Essentials of pain management. Vadivelu N, Urman RD, Hines RL (Eds). New York; Springer, 2011. p. 31-44.
19. Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. Trends Pharmacol Sci 2004; 25(12): 613-617.
20. Bogdanov NG, Polushkin BV. Increase in serotonin (5-hydroxytryptamine) sensitivity of segments of the colon of rats with avitaminosis K caused by ligation of the bile duct. Bull Exp Biol Med 1965; 60(5): 1244-1246.
21. Ciranna L. Serotonin as a Modulator of Glutamate- and GABA-Mediated Neurotransmission: Implications in Physiological Functions and in Pathology. Curr Neuropharmacol 2006; 4(2): 101-114.
22. Onodera K, Shinoda H, Zushida K, Taki K, Kamei J. Antinociceptive effect induced by intraperitoneal administration of vitamin K2 (menatetrenone) in ICR mice. Life Sci 2000; 68(1): 91-97.
23. Moriya M, Nakatsuji Y, Okuno T, Hamasaki T, Sawada M, Sakoda S. Vitamin K2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. J Neuroimmunol 2005; 170(1-2): 11-20.
24. Bowman GL. Ascorbic acid, cognitive function, and Alzheimer's disease: a current review and future direction. BioFactors 2012; 38(2): 114-122.
25. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. Br J Anaesth 2001; 87(1): 3-11.